

**Charakterisierung von Virus-spezifischen T-Zellen
gegen CMV, EBV und AdV
nach GMP-konformer, simultaner Isolierung
für die adoptive Immuntherapie**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Lena Hartl
aus Herrenberg

Tübingen
2015

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

30.04.2015

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee

2. Berichterstatter:

PD Dr. Tobias Feuchtinger

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	2
2.1 Das humane Cytomegalievirus	3
2.2 Das Epstein-Barr-Virus	4
2.3 Das humane Adenovirus	6
2.4 Adoptiver T-Zelltransfer	7
2.4.1 Geschichte und Methoden des adoptiven T-Zelltransfers.....	7
2.4.1.1 <i>Donor Lymphocyte Infusion</i> (DLI).....	8
2.4.1.2 <i>In vitro</i> Stimulation und Expansion Virus-spezifischer T-Zellen.....	8
2.4.1.3 Direkte Isolation von Virus-spezifischen T-Zellen	9
2.4.1.4 Generierung multivirus-spezifischer T-Zellen.....	11
2.4.2 Adoptiver T-Zelltransfer in der klinischen Anwendung	12
2.4.2.1 Adoptiver T-Zelltransfer CMV-spezifischer T-Zellen	12
2.4.2.2 Adoptiver T-Zelltransfer EBV-spezifischer T-Zellen.....	14
2.4.2.3 Adoptiver T-Zelltransfer AdV-spezifischer T-Zellen	16
2.4.2.4 Adoptiver T-Zelltransfer CMV-, EBV- und AdV-spezifischer T-Zellen.....	17
3 Zielsetzung	19
4 Material und Methoden	20
4.1 Materialien	20
4.1.1 Plastik und Glaswaren/ Verbrauchsmaterialien	20
4.1.2 Reagenzien und Chemikalien.....	21
4.1.3 Medien und Zytokine	21
4.1.4 FACS Antikörper	22
4.1.4.1 Oberflächenfärbungen	22
4.1.4.2 Intrazelluläre Färbungen.....	22
4.1.4.3 Isotyp-Kontrollen	23
4.1.4.4 Sonstige.....	23
4.1.5 MHC-I-Streptamere.....	23
4.1.6 Peptid-Pools und Peptide	24
4.1.7 Geräte.....	25
4.2 Methoden.....	26
4.2.1 Allgemeine Zellkulturmethoden	26

4.2.1.1	Isolierung von PBMCs aus Vollblut oder Leukapheresat.....	26
4.2.1.2	Bestimmung der Zellzahl und Vitalität.....	27
4.2.1.3	Einfrieren von Zellen.....	27
4.2.1.4	Auftauen von Zellen.....	28
4.2.1.5	Bestrahlen der Zellen.....	28
4.2.1.6	Beads waschen.....	29
4.2.2	Gewinnung Virus-spezifischer T-Zellen.....	29
4.2.2.1	Isolierung Virus-spezifischer T-Zellen mittels <i>IFNγ Capture System</i>	29
4.2.2.2	Kultivierung und Expansion der Virus-spezifischen T-Zellen.....	32
4.2.3	Charakterisierung der T-Zellen.....	34
4.2.3.1	Kontroll-FACS nach Isolierung Virus-spezifischer T-Zellen.....	34
4.2.3.2	Oberflächenfärbung mit MHC-I-Streptameren.....	34
4.2.3.3	Intrazelluläres FACS zum Nachweis von IFN γ -Produktion.....	36
4.2.3.4	Intrazelluläres FACS zum Nachweis von IFN γ -, TNF α - und IL-2-Produktion.....	38
4.2.3.5	CSA-FACS.....	40
5	Ergebnisse.....	43
5.1	Nachweis IFN γ -produzierender T-Zellen aus gesunden Spendern nach Stimulation mit viralen Antigenen.....	43
5.2	Die IFN γ -Produktion während des Protokolls zur Isolierung Virus-spezifischer T-Zellen ist reversibel.....	47
5.3	Isolierung Virus-spezifischer T-Zellen.....	48
5.3.1	Isolierung Virus-spezifischer T-Zellen im Labormaßstab.....	49
5.3.2	Isolierung Virus-spezifischer T-Zellen im GMP-Reinraum.....	51
5.4	Weitere Analysen der Virus-spezifischen T-Zellen.....	64
5.4.1	Polyfunktionalität der isolierten und expandierten Virus-spezifischen T-Zellen.....	64
5.4.2	Epitopspezifität der isolierten und expandierten Virus-spezifischen T-Zellen.....	65
5.4.2.1	Intrazelluläres FACS zum Nachweis der IFN γ -Produktion nach Stimulation mit Peptiden.....	65
5.4.2.2	Oberflächenfärbung mit MHC-I-Streptameren.....	69
5.5	Vergleich verschiedener EBV-Antigene im Screening.....	71
6	Diskussion.....	72
6.1	Antigenauswahl und Screening der Spender.....	72
6.2	Simultane Isolierung Virus-spezifischer T-Zellen gegen mehrere Antigene.....	74
6.3	Expansion Virus-spezifischer T-Zellen.....	75

6.4 Analysen der expandierten Virus-spezifischen T-Zellen	76
6.5 Neue EBV-Antigene für die Isolierung EBV-spezifischer T-Zellen	79
6.6 Schlussfolgerung und Ausblick.....	79
7 Abkürzungsverzeichnis	81
8 Anhang	83
8.1 Akademischer Lebenslauf.....	83
8.2 Veröffentlichungen.....	84
9 Danksagung	85
10Literaturverzeichnis	86

1 Zusammenfassung

Die Therapie viraler Infektionen nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSZT) stellt aufgrund der Toxizität und limitierten Wirksamkeit der zur Verfügung stehenden Virostatika nach wie vor eine große Herausforderung dar. Als attraktive Behandlungsoption bietet sich hier die Immuntherapie in Form eines adoptiven T-Zelltransfers an. Die bislang für eine klinische Anwendung zur Verfügung stehenden Protokolle dienen jedoch entweder nur der Isolation Antigen-spezifischer T-Zellen gegen einzelne Viren oder sind sehr zeitaufwendig. Der Fokus der aktuellen Forschung liegt daher auf der Entwicklung zeitsparender Protokolle und der simultanen Isolierung von Antigen-spezifischen T-Zellen gegen mehrere Viren für einen prophylaktischen Einsatz sowie zur Therapie multipler Infektionen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein für den klinischen Einsatz geeignetes, GMP-konformes und zeitsparendes Protokoll zur simultanen Isolierung und anschließenden Charakterisierung Antigen-spezifischer polyklonaler CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen gegen die nach allogener HSZT häufig auftretenden Viren Adenovirus (AdV), Epstein-Barr-Virus (EBV) und Cytomegalievirus (CMV) evaluiert. Als Isolationsmethode wurde der *Cytokine Sekretion Assay* (CSA) in Kombination mit magnetischer Anreicherung nach Antigenstimulation gewählt. Dabei war es möglich, selbst aus sehr geringen Ausgangsfrequenzen und unterschiedlicher Dominanz einzelner Spezifitäten eine simultane Isolation von Antigen-spezifischen T-Zellen gegen AdV, EBV und CMV durchzuführen. Mit der Entwicklung eines geeigneten Expansionsprotokolls wurden die angereicherten T-Zellen nach einer 14-tägigen Expansion hinsichtlich ihrer Virus-Spezifität, Polyfunktionalität und Epitopspezifität untersucht. Von sieben nach GMP-Richtlinien durchgeführten Isolationen Virus-spezifischer T-Zellen war die Anreicherung aller im Screening gefundener Spezifitäten in sechs Fällen (86%) erfolgreich. Je nach Antigen waren 3-33% der CD4⁺ und 7-35% der CD8⁺ T-Zellen polyfunktional im Sinne einer simultanen Sekretion von IFN γ , TNF α und IL-2. Ebenso war es möglich, unter den isolierten Virus-spezifischen T-Zellen für alle untersuchten Spender epitopspezifische T-Zellen gegen HLA-gematchte Peptide nachzuweisen. In der Praxis hat sich die gewählte Screening-Methode – ein direkt *ex vivo* durchgeführtes intrazelluläres FACS auf IFN γ -Produktion – leider als nicht ausreichend prädikativ erwiesen, da die geringen Frequenzen Virus-spezifischer T-Zellen zu nahe an der Nachweisgrenze liegen. Eine Isolation Virus-spezifischer T-Zellen gegen die im Screening als positiv eingestuften Spezifitäten war unter den CD4⁺ T-Zellen nur zu 91% (20/22) und unter den CD8⁺ T-Zellen nur zu 85% (22/26) möglich. Hier könnte für die Zukunft über eine dem Screening vorangehende Antigen-spezifische Expansion nachgedacht werden. In einigen Fällen war es bereits möglich, die klinische Wirksamkeit der so isolierten „multivirus-spezifischen“ T-Zellen im Rahmen von sogenannten „individuellen Heilversuchen“ nachzuweisen.

Das hier entwickelte GMP-konforme Protokoll zur simultanen Isolierung Antigen-spezifischer T-Zellen gegen AdV, EBV und CMV bietet somit eine attraktive Behandlungsoption bei viralen Infektionen nach allogener HSZT. Für einen Wirksamkeitsnachweis sollten jedoch GCP-konforme, kontrollierte klinische Studien durchgeführt werden.

2 Einleitung

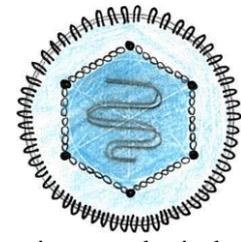
Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) stellt eine wichtige Therapieoption für viele maligne hämatopoetische Erkrankungen dar. Die Rekonstitution des neuen Spender-Immunsystems kann dabei je nach Art des Transplantats und der erforderlichen immunsuppressiven Therapie zwischen drei und sechs Monaten dauern¹⁻³. Während dieser Zeit ist das Risiko einer Infektion natürlich besonders hoch. 10-20% der Todesfälle nach einer allogenen HSZT werden durch Infektionen verursacht und treten im Median nach drei Monaten auf^{4,5}. Rund ein Drittel (31%) dieser Infektionen sind viralen Ursprungs⁴. Häufige Erreger einer viralen Infektion nach HSZT sind zum einen reaktivierte persistierende Herpesviren (z.B. Cytomegalievirus, Epstein-Barr-Virus) und zum anderen akute Infektionen mit respiratorischen Viren (z.B. Adenovirus).

Da eine Pharmakotherapie dieser lebensgefährlichen Virusinfektionen aufgrund der hohen Toxizität und zum Teil limitierten Wirksamkeit der Virostatika sowie zunehmend auftretender Resistenzen oftmals nicht erfolgreich ist, bedarf es dringend weiterer neuer Therapieoptionen. Eine erfolgreiche Kontrolle der viralen Infektion ist bei diesen transient immunsupprimierten Patienten stark an eine möglichst schnelle Immunrekonstitution gebunden. Die zelluläre Immuntherapie bietet hier eine Möglichkeit, das Immunsystem des Patienten zu unterstützen. Beim adoptiven T-Zell-Transfer werden Pathogen-spezifische T-Zellen eines immunkompetenten Spenders (meist der Stammzellspender) aus dessen peripherem Blut isoliert und in den Patienten infundiert. Die Anreicherung ausschließlich Pathogen-spezifischer T-Zellen dient dabei unter anderem der Vermeidung einer *Graft-versus-Host-Disease* (GvHD), für die das Risiko beim Einsatz unselektierter Spender-T-Zellen deutlich höher liegt.

Ein adoptiver T-Zell-Transfer nach allogener HSZT ist bisher gegen virale Infektionen mit Cytomegalieviren, Epstein-Barr-Viren und Adenoviren möglich. Die verschiedenen Isolationsmethoden Virus-spezifischer T-Zellen sind jedoch meist sehr zeitaufwendig und kostspielig. Da eine Virusinfektion nach allogener HSZT oft akut lebensbedrohlich ist und manche Patienten zeitgleich mehrere verschiedene Infektionen haben, liegt der Fokus der aktuellen Forschung auf der Entwicklung zeitsparender Protokolle und der simultanen Isolierung von spezifischen T-Zellen gegen mehrere Viren.

2.1 Das humane Cytomegalievirus

Das humane Cytomegalievirus (CMV) gehört zur Familie der β -Herpesviren und wird auch als humanes Herpesvirus 5 (HHV-5) bezeichnet. Eine CMV-Infektion immunkompetenter Menschen verläuft meist inapparent, kann jedoch selten eine infektiöse Mononukleose auslösen⁶. Nach der akuten Infektion persistiert das Virus lebenslang im Wirtsorganismus, wobei es zu immer wiederkehrenden endogenen Virus-Reaktivierungen kommt. Die immunologische Kontrolle der Infektion erfolgt vor allem durch $CD8^+$ T-Zellen, aber auch natürliche Killerzellen (NK-Zellen), schwerpunktmäßig über den zellulären Arm der Immunantwort⁶⁻⁸. Die lebenslange Persistenz des Virus wird durch einige virale Escape-Mechanismen erleichtert. So wird zum einen die Expression von MHC-I-Molekülen auf infizierten Zellen herabreguliert, und zum anderen die IFN γ -induzierte MHC-II-abhängige Antigenpräsentation durch Makrophagen beeinflusst⁶.

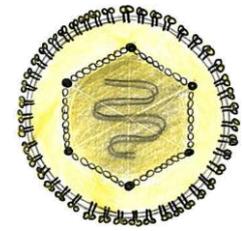


Sobald die immunologische Kontrolle über die persistierende Infektion durch zum Beispiel starke medikamentöse Immunsuppression, in AIDS-Patienten oder nach HSZT negativ beeinflusst wird, so kann es zu einer lebensbedrohlichen unkontrollierten Virus-Replikation kommen. Zu den häufigen Manifestationen einer CMV-Infektion in immunsupprimierten Patienten zählen die CMV-Retinitis^{9,10}, -Hepatitis⁹, -Pneumonie^{9,11,12} sowie gastrointestinale Ulcera und Erosionen^{9,13,14}. Die Inzidenz für das Auftreten einer CMV-Infektion nach allogener HSZT innerhalb von 100 Tagen nach Transplantation liegt bei 60-70%, wobei das Risiko unter CMV-positiven Patienten und solchen, die ein Transplantat eines CMV-positiven Spenders bekommen haben, am höchsten ist^{15,16}. In der Schwangerschaft kann eine kongenitale CMV-Infektion zu schweren Missbildungen bis hin zum Tod des Fötus führen^{17,18}. Für die Pharmakotherapie einer CMV-Infektion stehen Immunglobuline und der Guanosin-Antimetabolit Ganciclovir zur Verfügung. Sollte Ganciclovir aufgrund seiner starken myelosuppressiven Nebenwirkung oder einer möglichen Resistenz nicht zum Einsatz kommen, kann auf das Phosphonsäure-Derivat Foscarnet ausgewichen werden, welches wiederum eine ausgeprägte Nephrotoxizität aufweist. Ein Impfstoff gegen CMV steht zurzeit leider noch nicht zur Verfügung.

Als Hauptziele einer CMV-spezifischen T-Zell-Immunantwort wurden das Phosphoprotein pp65 und das *immediate early* 1 (IE-1) Protein identifiziert¹⁹⁻²². Dabei wird die $CD8^+$ T-Zell-Antwort gegen CMV von pp65-spezifischen T-Zellen dominiert²³. Die Rolle des IE-1 als geeignetes Target einer CMV-spezifischen Immuntherapie war lange Zeit umstritten, da neben der stärkeren Präsenz pp65-spezifischer T-Zellen die Prozessierung des IE-1-Antigens direkt durch pp65 inhibiert werden kann²⁴ und vermutet wurde, dass das Virus selbst die Antigen-Präsentation von IE-1 auf MHC-I-Komplexen selektiv inhibiert²⁵. Inzwischen wird die Rolle des IE-1 jedoch neu diskutiert^{21,26-28}. So wurde zum Beispiel in einer Studie gezeigt, dass die relative Dominanz pp65- und IE-1-spezifischer T-Zellen von Spender zu Spender variieren kann²⁶. Für die T-Zell-Stimulation zur Isolierung CMV-spezifischer T-Zellen wurde in dieser Arbeit aufgrund langjähriger Erfahrungswerte mit diesem Antigen und dem Umstand, dass eine $CD8^+$ T-Zell-vermittelte Immunantwort trotz allem häufiger gegen pp65 als gegen IE-1 gerichtet ist^{23,27}, das CMV-Matrixprotein pp65 ausgewählt.

2.2 Das Epstein-Barr-Virus

Das Epstein-Barr-Virus (EBV; oder humanes Herpesvirus 4; HHV-4) gehört zur Familie der γ -Herpesviren und wurde 1964 als erstes onkogenes Virus entdeckt²⁹. Aufgrund des gehäufteten Auftretens von Burkitt-Lymphomen in bestimmten geografischen Gebieten Ost- und Zentralafrikas war schon länger vermutet worden, dass diese Erkrankung einen infektiösen Ursprung haben könnte. Im Jahre 1964 gelang es dann Epstein, Achong und Barr, Viruspartikel in aus Burkitt Lymphomen isolierten Zellen elektronenmikroskopisch nachzuweisen²⁹. Die Hypothese des krebsauslösenden Virus wurde später mit dem Nachweis von EBV-DNA in humanen Nasopharynx-Karzinomen³⁰ und der Entwicklung von Lymphomen in mit EBV infizierten Affen³¹ untermauert. Inzwischen ist eine ganze Reihe EBV-assoziiierter maligner Erkrankungen bekannt: Burkitt-Lymphom, Nasopharynx-Karzinom, *Post-Transplantation Lymphoproliferative Disorder* (PTLD), Hodgkin-Lymphom, AIDS-assoziierte Lymphome, Adenocarcinom und einige mehr³².



Das Epstein-Barr-Virus wird in zwei Stämme unterteilt: EBV-1 (früher Typ A), welcher häufiger in den sogenannten entwickelten Ländern auftritt; und EBV-2 (früher Typ B), der gehäuft in Afrika und bei AIDS-Patienten zu finden ist³². Die beiden Stämme unterscheiden sich neben ihrer unterschiedlichen geografischen Ausbreitung in der Aminosäuresequenz der nukleären Antigene EBNA1, EBNA2A, EBNA2B, EBNA3A, EBNA3B und EBNA3C³²⁻³⁷.

Die Primärinfektion mit EBV verläuft besonders im Kindesalter meist asymptomatisch und mündet in einer lebenslangen Latenz des Virus in infizierten B-Zellen. Findet die Übertragung erst im jungen Erwachsenenalter statt, so manifestiert sich die Infektion in 25% der Patienten in Form einer infektiösen Mononukleose (IM)^{38,39}. An der Immunantwort gegen EBV sind sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunität (NK- und T-Zellen) beteiligt⁴⁰. EBV besitzt die besondere Fähigkeit, B-Zellen *in vitro* in kontinuierlich proliferierende, latent infizierte sogenannte B-LCLs (*B-Lymphoblastoid Cell Lines*) zu transformieren⁴¹. Bei transplantierten Patienten kann die latente EBV-Infektion als Folge der Immunsuppression reaktiviert werden und eine PTLD auslösen. Die Inzidenz einer PTLD nach allogener HSZT beträgt bis zu 25%⁴². Für die Pharmakotherapie steht hier der monoklonale anti-CD20 Antikörper Rituximab und das Cytosin-Nukleotid-Analogon Cidofovir zur Verfügung. Gegen EBV ist zurzeit leider noch kein zugelassener Impfstoff im Handel.

In der lytischen Phase der EBV-Infektion exprimieren die infizierten Zellen eine Vielzahl an Antigenen. Dabei wird mit der Expression der *immediate early* (IE)-Antigene BZLF1 und BRLF1 begonnen; gefolgt von den *early* (E)-Antigenen, zu denen unter anderem BMRF1, BMLF1 und BALF2 zählen. Das Ende der lytischen Phase ist gekennzeichnet durch die Expression der *late* (L)-Antigene, wie zum Beispiel BCRF1, BNRF1 und BLLF1. Während der latenten Phase einer EBV-Infektion werden sechs nukleäre Antigene (*EBV nuclear antigens*: EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C und EBNA3L), drei Membranproteine (*Latent Membrane Proteins*: LMP1, LMP2a und LMP2b), einige RNAs, welche in microRNAs prozessiert werden (BARTs), und zwei nichtkodierende RNAs (EBER1 und EBER2) exprimiert. Die latente Phase der

Virusinfektion wird basierend auf dem Expressionsmuster der latenten Antigene, den jeweils assoziierten malignen Erkrankungen und den verschiedenen infizierten Zelltypen in vier Latenzstadien eingeteilt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Latenzstadien der EBV-Infektion (adaptiert nach Thorley-Lawson *et al.*⁴¹)

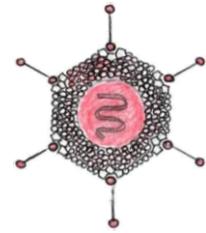
Transkriptionsprogramm	Exprimierte Gene	Zelltyp	Assoziierte Erkrankung
Latenz III (Wachstum)	EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C, EBNA3L, LMP1, LMP2a, LMP2b, EBER1, EBER2, BART	Neu infizierte B-Zellen	PTLD, AIDS-assoziiertes B-Zell-Lymphom
Latenz II (Standard)	EBNA1, LMP1, LMP2a, LMP2b, EBER1, EBER2, BART	B-Zellen aus dem Keimzentrum	Nasopharynx-Karzinom, Hodgkin-Lymphom
Latenz I (EBNA1-only)	EBNA1, EBER1(?), EBER2(?), BART(?)	Sich teilende B-Gedächtniszellen	Burkitt-Lymphom
Latenz 0	EBER1, EBER2, BART(?)	Ruhende B-Gedächtniszellen	

Die EBV-spezifische Immunantwort der CD4⁺ T-Zellen richtet sich gegen das gesamte Spektrum der latenten und lytischen Antigene. Die Immundominanz unter den latenten Antigenen fällt dabei von EBNA1 über EBNA3C zu LMP1 und LMP2 ab^{43,44}. Bei den CD8⁺ T-Zellen dominiert die Immunantwort besonders während der akuten Infektion gegen die lytischen Antigene. Die Hierarchie der Immundominanz verhält sich hier unter den latenten Antigenen etwas anders, so ist EBNA3C immundominanter als EBNA1, gefolgt von LMP2 und zuletzt LMP1⁴⁵. Die Erkennung EBV-infizierter Zellen durch EBNA1-spezifische CD8⁺ T-Zellen wird jedoch durch eine Glycin-Alanin-Wiederholung in der Aminosäuresequenz von EBNA1, welche die Präsentation von EBNA1-Peptiden auf MHC-Klasse-I-Molekülen über die Beeinflussung der Prozessierung hemmt, erschwert⁴⁵. Im Gegensatz zur CD4⁺ T-Zellvermittelten Immunantwort gegen Antigene der lytischen Phase, welche gegen ein breites Spektrum von IE-, E- und L-Antigenen gerichtet ist, konzentriert sich die der CD8⁺ T-Zellen besonders auf die IE- und etwas weniger auf die E-Antigene^{46,47}.

Für die T-Zell-Stimulation zur Isolierung EBV-spezifischer T-Zellen wurden in dieser Arbeit die drei in GMP-Qualität verfügbaren EBV-Antigene EBNA1, LMP2a und BZLF1 (PepTivator; Firma Miltenyi) ausgewählt. Die Auswahl von drei EBV-Antigenen hat dabei mehrere Gründe. EBNA1 wird in allen Latenzstadien exprimiert, hat jedoch den Nachteil, dass die Effektivität EBNA1-spezifischer CD8⁺ T-Zellen aufgrund der bereits beschriebenen mangelhaften Präsentation von EBNA1-Peptiden über MHC-I-Moleküle⁴⁵ nicht abschließend geklärt ist. Da die PTLD zum Latenztyp III zählt, wird LMP2a hier ebenfalls exprimiert. Allerdings ist EBNA1 sowohl für CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen deutlich immundominanter als LMP2a⁴³. BZLF1 ist als IE-Antigen unter den lytischen Antigenen sowohl für CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen immundominant^{46,47}. Wie wichtig die Rolle BZLF1-spezifischer T-Zellen für die Immunantwort gegen eine PTLD ist, ist jedoch noch nicht abschließend geklärt.

2.3 Das humane Adenovirus

Die Familie der humanen Adenoviren (AdV) gehört zu den unbehüllten doppelsträngigen DNA-Viren mit ikosaedrischem Kapsid, das sich aus Hexon-, Penton- und Fiber-Proteinen zusammensetzt. 1953 isolierten Rowe *et al.* ein „*adenoid-degenerating-agent*“ aus humanem adenoiden Drüsengewebe⁴⁸, welches erst später als Virus identifiziert werden konnte und seither als Adenovirus bezeichnet wird⁴⁹. Die Adenoviren werden in sieben Spezies (A-G) und inzwischen 67 bekannte Serotypen eingeteilt⁵⁰.



Eine AdV-Infektion tritt typischerweise das erste Mal im Kindesalter auf, wobei sich diese in immunkompetenten Individuen zumeist in Form einer selbstlimitierenden Infektion des Gastrointestinaltrakts, der Atemwege oder als Konjunktivitis äußert⁵¹⁻⁵⁴. Die hierbei am häufigsten vorkommenden Serotypen gehören den Spezies B, C und D an^{51,54-56}. Der Verlauf einer AdV-Infektion bei immungeschwächten Patienten kann sich deutlich dramatischer abspielen, wobei die Mortalitätsrate je nach Studie bei 19-60% liegt^{54,57,58}. Eine AdV-Infektion kann sich dabei unter anderem auch als Hepatitis, Pankreatitis und Nephritis manifestieren und bis zum Multiorganversagen führen^{51,54,59} und wird am häufigsten von AdV-Serotypen der Spezies A, B, C und D verursacht^{54,60,61}. Die Inzidenz für eine AdV-Infektion nach einer allogenen HSZT ist besonders bei pädiatrischen Patienten hoch und wird je nach Studie von 17-49% beschrieben^{53,57,58,62,63}.

Zur Therapie einer AdV-Infektion wird am häufigsten das Cytosin-Nukleotid-Analogon Cidofovir eingesetzt⁶³⁻⁶⁵. Leider gibt es hierzu noch keine ausführlicheren kontrollierten Studien im Zusammenhang mit einer AdV-Therapie. Tritt eine AdV-Infektion nach einer allogenen HSZT auf, so zeigt sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Voranschreiten der Immunrestitution AdV-spezifischer T-Zellen und dem Schweregrad der Infektion und der damit verbundenen Mortalität⁶⁶⁻⁶⁸. Ein adoptiver T-Zelltransfer mit AdV-spezifischen T-Zellen erscheint hier somit als naheliegende Therapieform.

Für die T-Zell-Stimulation zur Isolierung AdV-spezifischer T-Zellen wurde in dieser Arbeit das Kapsid-Protein Hexon verwendet. Das Hexon-Protein hat den Vorteil, dass es unter den verschiedenen AdV-Spezies eine Homologie von ca. 80% aufweist⁶⁹ und sowohl unter CD4⁺ als auch CD8⁺ Hexon-spezifischen T-Zellen eine ausgeprägte Kreuzreaktivität gegen die verschiedenen Spezies besteht^{56,70-74}.

2.4 Adoptiver T-Zelltransfer

Wie bereits beschrieben ist die erfolgreiche Kontrolle einer viralen Infektion nach allogener HSZT an eine möglichst schnelle Immunrekonstitution gebunden. Eine mögliche therapeutische Maßnahme ist daher die Reduktion der immunsuppressiven Begleitmedikation. Allerdings ist dies mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer GvHD verbunden und nur wirksam, wenn der Patient bereits eigene T-Zellen gebildet hat. Der Einsatz antiviraler Medikamente ist aufgrund ihrer hohen Toxizität und zum Teil limitierten Wirksamkeit sowie zunehmend auftretender Resistenzen oftmals alleine nicht erfolgreich. Als unterstützende immuntherapeutische Maßnahme bei Versagen antiviraler Pharmakotherapie hat sich inzwischen die Methode des adoptiven T-Zelltransfers als sehr vielversprechend erwiesen. Seit den Anfängen in den 90er Jahren wurden die Techniken zur Isolierung Pathogen-spezifischer T-Zellen für den adoptiven T-Zelltransfer stetig weiterentwickelt und verbessert. Im Folgenden soll auf die verschiedenen Methoden des adoptiven T-Zelltransfers und deren Geschichte sowie auf den aktuellen Erfahrungsstand in der klinischen Erprobung eingegangen werden.

2.4.1 Geschichte und Methoden des adoptiven T-Zelltransfers

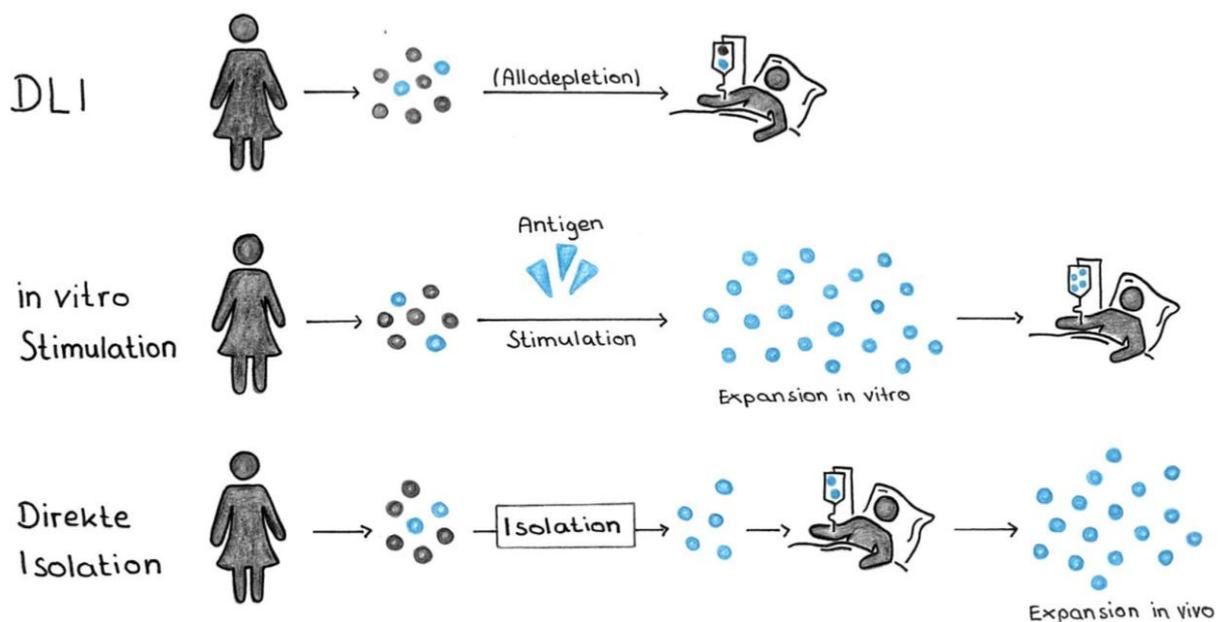


Abbildung 1: Die drei Grundprinzipien des adoptiven T-Zelltransfers

DLI (Donor Lymphocyte Infusion): Direkte Infusion unmanipulierter bzw. zuvor allodepletierter Lymphozyten.
In vitro Stimulation: Isolation von Spenderlymphozyten gefolgt von einer Stimulation und Expansion Pathogen-spezifischer T-Zellen mit Antigen *in vitro*.

Direkte Isolation: Isolation von Spenderlymphozyten mit anschließender direkter Isolation Pathogen-spezifischer T-Zellen *in vitro* (siehe hierzu auch Abbildung 2). Die Expansion der spezifischen T-Zellen erfolgt hier *in vivo*.

2.4.1.1 Donor Lymphocyte Infusion (DLI)

Nachdem Kolb und seine Kollegen 1990 den Einsatz unmanipulierter Spenderlymphozyten (*Donor Lymphocyte Infusion*, DLI) zur Therapie rezidivierender chronischer myeloischer Leukämie (CML) beschrieben hatten⁷⁵, legten Papadopoulos *et al.* 1994 den Grundstein für den Einsatz der DLI bei Patienten mit viralen Infektionen nach HSZT, indem sie Patienten mit EBV-assoziiierter PTLD mit Infusionen unmanipulierter Spenderlymphozyten EBV-seropositiver Spender behandelten⁷⁶. Der Einsatz unmanipulierter Spenderlymphozyten birgt jedoch ein relativ hohes Risiko für das Entwickeln einer GvHD und so wurden in den folgenden Jahren mehrere Strategien entwickelt, um dieses Risiko möglichst gering zu halten. Eine Möglichkeit besteht darin, die T-Zellen mit Suizidgenen zu transduzieren, welche im Fall einer GvHD aktiviert werden können^{77,78}. Eine andere Option liegt in der Depletion alloreaktiver Zellen, basierend auf der Expression von Aktivierungsmarkern oder dem Einsatz von Immunotoxin⁷⁹⁻⁸¹. Um das Risiko einer GvHD noch weiter zu minimieren, wurden parallel verschiedenste Protokolle zur Isolation ausschließlich Pathogen-spezifischer T-Zellen entwickelt.

2.4.1.2 In vitro Stimulation und Expansion Virus-spezifischer T-Zellen

Die erste Anreicherung Virus-spezifischer T-Zellen wurde 1990 von der Gruppe um Riddell und Greenberg dokumentiert^{82,83}. Für die Generierung CMV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen infizierten sie zunächst autologe Fibroblasten mit CMV und kultivierten diese dann zusammen mit Spender-PBMCs (*Peripheral-Blood Mononuclear Cells*) *in vitro*. Nach einer klonalen Expansion wurden CD4⁺ T-Zellen depletiert und die so erhaltenen CMV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen in die Patienten infundiert. Bemerkenswert ist hier, dass bei keinem der behandelten Patienten signifikante Nebenwirkungen auftraten^{82,83}. Bereits in dieser frühen Phase wurde auf die wichtige Rolle von CD4⁺ T-Helferzellen für die Ausbildung einer stabilen CD8⁺ T-Zellvermittelten Immunität diskutiert⁸³. Dieser Umstand veranlasste Einsele und seine Kollegen zur Entwicklung eines Protokolls für die Generierung CMV-spezifischer polyklonaler CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellpopulationen⁸⁴. Die Expansion der Virus-spezifischen T-Zellen erfolgte dabei über eine wiederholte Stimulation der kultivierten Spender-PBMCs mit CMV-Antigen⁸⁴. Peggs *et al.* veröffentlichten zur selben Zeit ein Protokoll, bei dem die CMV-spezifischen Spender-T-Zellen während der Expansion mit dendritischen Zellen (DCs) restimuliert wurden, welche zur Vermeidung der Verwendung lebender Viren mit Viruslysat gepulst waren⁸⁵. Rooney und ihre Kollegen generierten EBV-spezifische T-Zellen, indem sie PBMCs mit bestrahlten autologen EBV-transformierten B-Zellen kokultivierten^{86,87}. Da die EBV-spezifischen T-Zellen vor der Infusion in den Patienten mittels eines für Neomycin-Resistenz codierenden retroviralen Vektors genetisch markiert wurden, war es möglich, die Persistenz der infundierten T-Zellen im Patienten über Jahre hinweg zu verfolgen⁸⁸. Zusammengefasst können die Spender-PBMCs bei der Expansion Virus-spezifischer T-Zellen auf verschiedene Arten stimuliert werden. So finden hier zum Beispiel mit CMV infizierte autologe Fibroblasten^{82,83}, CMV-Antigen⁸⁴, mit Viruslysat gepulste DCs⁸⁵ und bestrahlte autologe EBV-transformierte B-Zellen (B-LCLs)^{86,87} Verwendung.

2.4.1.3 Direkte Isolation von Virus-spezifischen T-Zellen

Neben der Generierung Virus-spezifischer T-Zellen über die *in vitro*-Expansion von Spender-PBMCs unter repetitiver bzw. kontinuierlicher Antigenstimulation gibt es auch die Möglichkeit, Virus-spezifische T-Zellen direkt *ex vivo* zu isolieren und gleich darauf in den Patienten zu infundieren, wo diese dann erst *in vivo* expandieren. In Fachkreisen wird darüber diskutiert, ob diese Vorgehensweise der exzessiven Expansion *in vitro* vorzuziehen sei. Bei einer *in vitro*-Expansion verringert sich zwar die Alloreaktivität der T-Zellen⁸⁹, in der klinischen Erfahrung bedeutet eine *in vitro* nachgewiesene Alloreaktivität jedoch nicht automatisch die Entwicklung einer GvHD im Patienten⁹⁰. Außerdem exprimieren *in vitro* expandierte CD8⁺ T-Zellen das proapoptische Molekül Fas und regulieren die Expression von CD28 herab, was mit einer Überstimulation in Verbindung gebracht wurde⁹¹. Des Weiteren könnte die Proliferation direkt isolierter und applizierter T-Zellen unter physiologischen Bedingungen einen effizienteren immunologischen Schutz bieten als bereits zuvor exzessiv *in vitro* expandierte T-Zellen.

Für die direkte Isolation Virus-spezifischer T-Zellen stehen prinzipiell drei verschiedene Methoden zur Verfügung: (i) die Selektion unter Verwendung von MHC-Multimeren, (ii) eine Isolation mittels *Cytokine Sekretion Assay* (CSA) sowie (iii) die Anreicherung basierend auf der Expression von Aktivierungsmarkern (Abbildung 2).

Die MHC-Multimere fanden ursprünglich nur bei der Detektion und Quantifizierung Epitop-spezifischer T-Zellen Verwendung. Es handelt sich hierbei um mit Peptid-Epitopen beladene MHC-Multimere, die an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind. Die MHC-Multimere können dann über deren T-Zell-Rezeptor an die jeweilige Epitop-spezifische T-Zelle binden und im Durchflusszytometer detektiert werden^{92,93}. Keenan *et al.* veröffentlichten 2001 eine Methode zur Isolation CMV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen mittels MHC-Klasse-I-Tetrameren⁹⁴. Dabei wurden die CMV-spezifischen T-Zellen zunächst mit an Phycoerythrin (PE)-gekoppelte MHC-Tetramere markiert und dann unter Verwendung von an anti-PE-Antikörper konjugierte magnetische Beads mittels magnetischer Zellseparation angereichert⁹⁴. Die Reinheit der isolierten Virus-spezifischen T-Zellen ist bei Verwendung der MHC-Multimer-Methode in der Regel sehr hoch und erreicht Werte von ca. 95%⁹⁴. Eine Weiterentwicklung der MHC-Multimer-Technik, die sogenannte Streptamer-Technik, macht es möglich, die bei der Isolation verwendeten Multimere nach der magnetischen Anreicherung rückstandslos von den T-Zellen zu entfernen und damit deren funktionellen Status komplett wiederherzustellen. Durch Zugabe von Biotin nach der magnetischen Isolation monomerisieren die Streptamere und dissoziieren daraufhin aufgrund der niedrigen Bindungsaffinität einzelner MHC-Moleküle zum T-Zell-Rezeptor selbstständig von der T-Zelle⁹⁵. Der Vorteil einer MHC-Multimer-basierten Isolation liegt darin, dass der Phänotyp und der funktionelle Status der T-Zellen unbeeinflusst bleiben. Leider gibt es zurzeit vornehmlich MHC-Klasse-I-Multimere, welche nur die Isolation von CD8⁺ T-Zellen erlauben. Darüber hinaus sind noch nicht für alle HLA-Typen ausreichend viele virale T-Zell-Epitope bekannt, um für jeden Spender die passenden MHC-Multimere zu generieren.

Der *Cytokine Sekretion Assay* (CSA) bietet unabhängig vom HLA-Typ des Spenders die Möglichkeit, polyklonale CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zu isolieren^{96,97}. Da diese Technik auf einer

Antigen-spezifischen Sekretion von Interferon- γ (IFN γ) basiert, werden hierbei ausschließlich funktionelle T-Zellen angereichert. Für die Isolation mittels CSA werden die Spender-PBMCs zunächst mit Antigen stimuliert. Danach werden alle Lymphozyten mit einem anti-CD45-Antikörper, welcher wiederum an einen anti-IFN γ -Antikörper gekoppelt ist, markiert. Dieser Antikörper „fängt“ nun in der daran anschließenden Sekretionsphase das von der Antigen-spezifisch IFN γ -produzierenden T-Zelle sezernierte IFN γ ab. Wird die Sekretionsphase beendet, so tragen alle zuvor IFN γ -produzierenden T-Zellen IFN γ auf ihrer Zelloberfläche. Nach der Zugabe von an magnetische Beads gekoppelte anti-IFN γ -Antikörper können die Antigen-spezifischen T-Zellen über eine magnetische Säule angereichert werden.

Eine dritte Möglichkeit zur Isolation Antigen-spezifischer T-Zellen ist die Anreicherung basierend auf der Expression von Aktivierungsmarkern nach Stimulation mit Antigenen. Bei dieser Methode werden die Spender-PBMCs mit Antigenen stimuliert und die daraufhin exprimierten Aktivierungsmarker mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert. Nach der Zugabe von anti-Fluorochrom-Magnetbeads können die Antigen-spezifischen T-Zellen über eine magnetische Säule angereichert werden. Bisher wurde diese Technik zur Isolation Antigen-spezifischer CD8 $^+$ T-Zellen über die Expression von CD137 (4-1BB)⁹⁸ sowie zur Anreicherung Antigen-spezifischer CD4 $^+$ T-Zellen über die Expression von CD154 (CD40L)⁹⁹ angewendet.

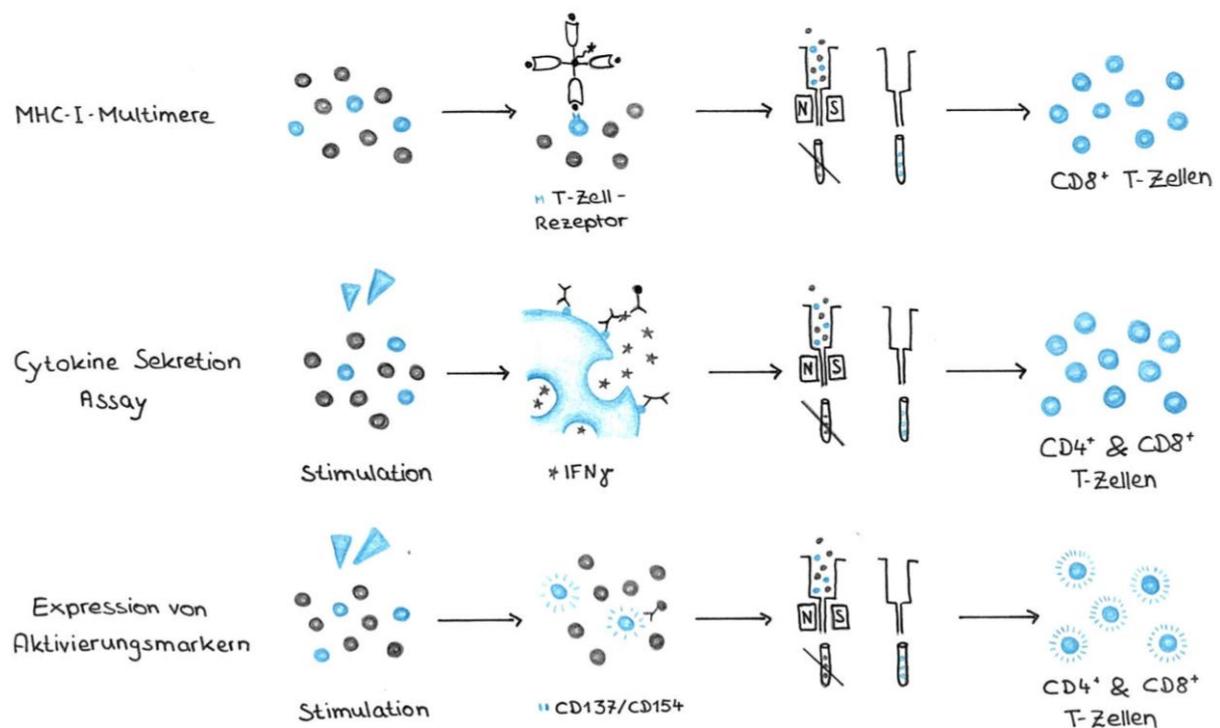


Abbildung 2: Methoden zur direkten Selektion Virus-spezifischer T-Zellen

MHC-Klasse-I-Multimere: Erlaubt die Isolation Antigen-spezifischer CD8 $^+$ T-Zellen, allerdings ist diese Methode auf die bisher bekannten T-Zell-Epitope beschränkt.

Cytokine Sekretion Assay (CSA): Magnetische Isolation Antigen-spezifisch IFN γ -sekretierender polyklonaler CD4 $^+$ und CD8 $^+$ T-Zellen.

Expression von Aktivierungsmarkern: Magnetische Isolation Antigen-spezifischer polyklonaler CD4 $^+$ und CD8 $^+$ T-Zellen basierend auf der Expression von Aktivierungsmarkern nach Stimulation mit Antigenen.

2.4.1.4 Generierung multivirus-spezifischer T-Zellen

Die meisten Protokolle für die Anreicherung Virus-spezifischer T-Zellen sind relativ zeitaufwendig und generell sehr teuer. Die simultane Isolation Antigen-spezifischer T-Zellen gegen mehrere Viren in einem einzigen Protokoll hat daher gleich mehrere Vorteile. So kann damit auch Patienten geholfen werden, die zeitgleich mehrere Virusinfektionen haben, ohne dass der Spender gleich mehrfach eine größere Menge PBMCs spenden muss. Eine adoptive T-Zelltherapie mit Antigen-spezifischer T-Zellen gegen mehrere Viren bei einer Infektion mit nur einem der drei Viren kann zugleich prophylaktisch gegen die anderen Viren eingesetzt werden. Außerdem sind die Herstellungskosten natürlich deutlich höher, wenn man gezwungen ist, mehrere Isolationen hintereinander durchzuführen. Ein aktueller Schwerpunkt in der Forschung auf dem Gebiet des adoptiven T-Zelltransfers liegt daher auf der Entwicklung neuer Protokolle zur simultanen Isolation Antigen-spezifischer T-Zellen gegen mehrere Viren in einem Schritt. Ein erster Ansatz war hier die Verwendung von B-LCLs, die mit einem pp65-exprimierenden adenoviralen Vektor transduziert wurden, als Antigen-präsentierende Zellen (*Antigen Presenting Cell*, APC)¹⁰⁰. Die Spender-PBMCs wurden mit den nun Hexon, pp65 und den latenten EBV-Antigenen exprimierenden B-LCL über einen längeren Zeitraum stimuliert und expandiert. Die Generierung AdV-, EBV- und CMV-spezifischer T-Zellen dauert mit diesem Protokoll jedoch mehrere Wochen, da man vor der Expansion noch die beschriebenen B-LCLs herstellen muss. In einem anderen Protokoll wurden zur Generierung von APCs PBMCs nacheinander mit einem Ad5f35-pp65 (AdV und CMV)- und einem Ad5f35-LMP2 (AdV und EBV)-Vektor transduziert¹⁰¹. Um das gesamte Protokoll zur Isolation AdV-, EBV- und CMV-spezifischer T-Zellen unter 48 Stunden zu halten, wurden die Spender-PBMCs nach der Stimulation mit den zuvor generierten APCs direkt mittels CSA magnetisch angereichert. Eine dritte Möglichkeit zur Generierung von APCs für die simultane Isolation AdV-, EBV- und CMV-spezifischer T-Zellen ist die Verwendung von bestrahlten DCs, bei denen zuvor eine Nukleofektion mit für LMP2 (EBV), EBNA1 (EBV), BZLF1 (EBV), Hexon (AdV), pp65 (CMV) und IE-1 (CMV) codierenden DNA-Plasmiden durchgeführt wurde¹⁰². Bei diesem Protokoll werden die Spender-PBMCs zuerst für 6-7 Tage mit den APCs stimuliert und danach nochmals über 4-6 Tage expandiert.

Zandvliet und seine Kollegen testeten für die Isolation AdV-, EBV- und CMV-spezifischer T-Zellen zwei verschiedene Ansätze¹⁰³. Zum einen wurden dabei Virus-spezifische T-Zellen nach der Stimulation von Spender-PBMCs mit einem Mix von je drei viralen Antigenen (AdV, EBV, CMV oder Influenza) mittels CSA (IFN γ -Produktion) oder über die Expression von CD137 (Aktivierungsmarker) magnetisch angereichert. Dabei konnte bezüglich der Frequenzen und auch der Funktionalität Antigen-spezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen kein nennenswerter Unterschied festgestellt werden¹⁰³. Khanna *et al.* isolierten AdV-, EBV- und CMV-spezifische T-Zellen mittels magnetischer Anreicherung basierend auf der Expression des Aktivierungsmarkers CD154 nach Stimulation mit viralen Antigenen¹⁰⁴.

2.4.2 Adoptiver T-Zelltransfer in der klinischen Anwendung

2.4.2.1 Adoptiver T-Zelltransfer CMV-spezifischer T-Zellen

Der erste adoptive T-Zelltransfer mit CMV-spezifischen T-Zellen wurde 1992 von Riddell und seinen Kollegen durchgeführt⁸³. Dafür wurden zunächst Spender-PBMCs mit autologen CMV-infizierten Fibroblasten stimuliert, klonal expandiert und dann die CD4⁺ T-Zellen depletiert. Die drei behandelten Patienten bekamen die so erhaltenen CMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen einmal wöchentlich in ansteigender Dosierung über einen Zeitraum von insgesamt vier Wochen infundiert. In diesen ersten adoptiven T-Zelltransfers wurden keine akuten Toxizitäten beobachtet und keiner der drei Patienten entwickelte eine CMV-Virämie oder Pneumonie⁸³. In einer nachfolgenden Studie wurden 14 Patienten mit auf dieselbe Weise generierten CMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen behandelt¹⁰⁵. Auch hier wurden keine schweren Nebenwirkungen beobachtet und alle Patienten zeigten eine Rekonstitution CMV-spezifischer T-Zellen. Keiner der behandelten Patienten entwickelte eine CMV-Virämie¹⁰⁵. Einsele und seine Kollegen behandelten acht Patienten, die eine therapieresistente CMV-Infektion hatten, mit polyklonalen CMV-spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen⁸⁴. Von sieben evaluierbaren Patienten sprachen fünf dauerhaft auf die Therapie an, bei einem Patienten war dafür eine weitere Infusion CMV-spezifischer T-Zellen notwendig und bei einem Patienten zeigte sich leider nur ein transienter Effekt in der Reduktion der Viruslast⁸⁴. Etwas später dokumentierten Peggs *et al.* die Behandlung von 16 Patienten mit polyklonalen CMV-spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen¹⁰⁶. Acht der Patienten benötigten danach keine Behandlung mit antiviralen Medikamenten mehr, die anderen acht erhielten weiterhin Ganciclovir. Die untersuchten Patienten zeigten dabei eine beträchtliche Expansion der CMV-spezifischen T-Zellen und nur zwei von 14 evaluierbaren Patienten hatten später eine Reaktivierung der CMV-Infektion¹⁰⁶. Perruccio und ihre Kollegen behandelten 25 Patienten prophylaktisch mit CMV-spezifischen CD4⁺ T-Zellklonen¹⁰⁷. Für die Generierung der T-Zellklone wurden Spender-PBMC mit CMV-Antigen stimuliert und über die *limiting dilution*-Methode klonal expandiert. Nach dem adoptiven T-Zelltransfer entwickelten sieben Patienten eine CMV-Reaktivierung. Von fünf Patienten mit aktiver CMV-Erkrankung konnten drei Patienten die Infektion eliminieren¹⁰⁷. Eine noch größere Studie zur prophylaktischen Anwendung CMV-spezifischer T-Zellen mit insgesamt 50 Patienten veröffentlichten Blyth *et al.*¹⁰⁸. Der adoptive T-Zelltransfer erfolgte hier mit *in vitro* stimulierten und expandierten polyklonalen CMV-spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Nach der prophylaktischen Behandlung entwickelten fünf der 50 Patienten eine CMV-Reaktivierung und nur einer der Patienten benötigte zusätzlich eine pharmakologische antivirale Therapie. Durch die prophylaktische Anwendung des adoptiven T-Zelltransfers mit CMV-spezifischen T-Zellen konnte hier der Bedarf einer antiviralen Therapie gegen CMV von 36% in der Kontrollgruppe auf 17% gesenkt werden¹⁰⁸.

Der erste adoptive Transfer mittels MHC-Tetramer-Technik isolierter Virus-spezifischer T-Zellen wurde von Cobbold und seinen Kollegen durchgeführt. Nach der adoptiven T-

Tabelle 2: Adoptiver T-Zelltransfer CMV-spezifischer T-Zellen

Autor/Jahr	Methode / Zelltyp	Zahl der Patienten	Ansprechen der Patienten	Dosis
Riddell 1992 ⁸³	<i>In vitro</i> Stimulation und Expansion. Allogene CMV-spezifische CD8 ⁺ Klone	3	Kein Patient entwickelte CMV-Virämie oder Pneumonie	3,3 x 10 ⁷ bis 10 ⁹ Zellen/m ²
Walter 1995 ¹⁰⁵	<i>In vitro</i> Stimulation und Expansion. Allogene CMV-spezifische CD8 ⁺ Klone	14 (11)	Kein Patient entwickelte CMV-Infektion	3,3 x 10 ⁷ bis 10 ⁹ Zellen/m ²
Einsele 2002 ⁸⁴	<i>In vitro</i> Stimulation und Expansion. Allogene CMV-spezifische polyklonale CD8 ⁺ und CD4 ⁺ T-Zellen	8	5/7 evaluierbare Patienten eliminierten die Infektion	10 ⁷ Zellen/m ²
Peggs 2003 ¹⁰⁶	<i>In vitro</i> Stimulation und Expansion. Allogene CMV-spezifische polyklonale CD8 ⁺ und CD4 ⁺ T-Zellen	16	Rekonstitution antiviraler Immunität. Massive Expansion der transferten Zellen	10 ⁵ Zellen/kg
Perruccio 2005 ¹⁰⁷	<i>In vitro</i> Stimulation und klonale Expansion. Allogene CMV-spezifische CD4 ⁺ Klone	25 Prophylaktisch	7/25 Patienten hatten eine CMV-Reaktivierung, 5/25 Patienten entwickelten aktive CMV-Erkrankung (3 davon eliminierten die Infektion)	10 ⁵ bis 3 x 10 ⁶ Zellen/kg
Cobbold 2005 ¹⁰⁹	Direkte Isolation allogener CMV-spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen mit MHC-I-Tetrameren	9	8/9 Patienten eliminierten die Infektion	1,2 bis 33 x 10 ³ Zellen/kg
Feuchtinger 2010 ¹¹⁰	Direkte Isolation CMV-spezifischer polyklonaler CD8 ⁺ und CD4 ⁺ T-Zellen über CSA	18	15/18 zeigten Ansprechen (Eliminierung des Virus oder signifikante Reduktion der Viruslast)	1,2 bis 166 x 10 ³ Zellen/kg
Peggs 2011 ¹¹¹	Direkte Isolation CMV-spezifischer polyklonaler CD8 ⁺ und CD4 ⁺ T-Zellen über CSA	18 (11 Therapie / 7 Prophylaxe)	Therapie: 2/11 benötigen keine zusätzlichen Virostatika. Prophylaxe: 6/7 bleiben virusfrei	10 ⁴ CD3 ⁺ T-Zellen/kg
Schmitt 2011 ¹¹²	Direkte Isolation allogener CMV-spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen mit MHC-I-Streptameren	2	Beide Patienten kontrollierten die CMV-Virämie	0,37 und 2,2 x 10 ⁵ Zellen/kg
Meij 2012 ¹¹³	Isolation CMV-spezifischer polyklonaler CD8 ⁺ und CD4 ⁺ T-Zellen über CSA mit anschließender Expansion	6	6/6 Patienten eliminierten die Infektion	0,9 x 10 ⁴ bis 3,1 x 10 ⁵ Zellen/kg
Uhlen 2012 ¹¹⁴	Direkte Isolation allogener CMV-spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen mit MHC-I-Pentameren. Z.T. <i>third-party</i> Spender	5	4/5 komplettes Ansprechen 1/5 Nonresponder	0,8 bis 24,6 x 10 ⁴ Zellen/kg
Blyth 2013 ¹⁰⁸	<i>In vitro</i> Stimulation und Expansion. Allogene CMV-spezifische polyklonale CD8 ⁺ und CD4 ⁺ T-Zellen	50 Prophylaktisch	5/50 hatten danach eine CMV-Reaktivierung (1 Patient davon benötigte antivirale Therapie)	2 x 10 ⁷ Zellen/m ²

Zelltherapie konnten acht von neun Patienten die CMV-Infektion eliminieren¹⁰⁹. Schmitt *et al.* beschrieben die Behandlung von zwei Patienten mit Streptamer-selektierten CMV-spezifischen T-Zellen, von denen danach beide die CMV-Infektion über die Entwicklung einer langanhaltenden CMV-spezifischen T-Zell-Immunität kontrollieren konnten¹¹². Uhlin und seine Kollegen isolierten CMV-spezifische CD8⁺ T-Zellen für den adoptiven T-Zelltransfer mittels MHC-I-Pentameren und magnetischer Anreicherung¹¹⁴. Sie behandelten insgesamt fünf Patienten mit CMV-Infektion nach HSZT, wobei drei Patienten die CMV-spezifischen T-Zellen von einem haploidentischen sogenannten *third-party* Spender erhielten. Vier der fünf Patienten sprachen auf die Therapie an. Nur ein Patient mit *third-party* Spender zeigte kein Ansprechen auf die Therapie¹¹⁴.

Die Wirksamkeit und Sicherheit des adoptiven T-Zelltransfers mit über CSA-angereicherten CMV-spezifischen T-Zellen konnte erstmals von Feuchtinger und Kollegen anhand von 18 Patienten gezeigt werden, von denen 15 Patienten die Viruslast signifikant reduzieren oder das

Virus eliminieren konnten¹¹⁰. Peggs und seine Kollegen behandelten insgesamt 18 Patienten mit über CSA-angereicherten CMV-spezifischen T-Zellen, wobei die Therapie bei sieben Patienten rein prophylaktisch und bei elf Patienten nach dem Nachweis von CMV-DNA jedoch vor Ausbruch einer aktiven Erkrankung erfolgte¹¹¹. Zwei der elf Patienten mit CMV-Nachweis benötigten danach keine zusätzliche antivirale Therapie. Von den sieben prophylaktisch behandelten Patienten blieben über die ersten sechs Monate nach adoptivem T-Zelltransfer zunächst alle virusfrei. Nur ein Patient entwickelte später eine CMV-Infektion¹¹¹. Meij *et al.* behandelten sechs Patienten mit über CSA angereicherten und anschließend *in vitro* expandierten CMV-spezifischen T-Zellen. Nach dem adoptiven T-Zelltransfer eliminierten alle sechs Patienten die CMV-Infektion¹¹³.

2.4.2.2 Adoptiver T-Zelltransfer EBV-spezifischer T-Zellen

Bereits zwei Jahre nach den Erfolgen von Riddell *et al.* auf dem Gebiet der adoptiven T-Zelltherapie bei CMV-Infektionen weiteten Papadopoulos und seine Kollegen diese Therapieform auf die Behandlung von EBV-Infektionen aus. Sie setzten 1994 bei fünf Patienten unmanipulierte Spenderlymphozyten (DLI) zur Therapie EBV-assoziiierter PTLD nach allogener Knochenmarkstransplantation ein⁷⁶. Obwohl alle fünf Patienten auf die Therapie ansprachen, starben zwei der fünf Patienten später an Lungenversagen⁷⁶. Um das Risiko einer GvHD geringer zu halten und die Therapie allgemein spezifischer zu gestalten, wurden auch hier bald nicht mehr unmanipulierte Spenderlymphozyten eingesetzt, sondern EBV-spezifische T-Zellen generiert. Einen direkten Vergleich der DLI und EBV-spezifischen T-Zellen im Einsatz gegen die EBV-assoziierte PTLD führten Doubrovina und ihre Kollegen durch¹¹⁵. Von insgesamt 49 Patienten erhielten 30 eine DLI und 19 *in vitro* stimulierte und expandierte EBV-spezifische T-Zellen. Auf die Therapie mit DLI sprachen 73% (22/30) der Patienten komplett (21 Patienten) oder partiell (1 Patient) an, in der Gruppe der mit EBV-spezifischen T-Zellen behandelten Patienten lag die Ansprechrate mit 68% (13/19) in einem ähnlichen Rahmen. Wie erwartet, zeigte sich bei der Inzidenz für eine GvHD ein größerer Unterschied zwischen den beiden Therapieformen. Nach einer DLI entwickelten 17% der Patienten eine GvHD. Unter den 19 Patienten, die mit EBV-spezifischen T-Zellen behandelt wurden, entwickelte hingegen kein einziger Patient eine GvHD. In dieser Studie konnte auch ein Zusammenhang zwischen einer beeinträchtigten Erkennung von Tumorzellen durch die EBV-spezifischen T-Zellen und einem Therapieversagen gezeigt werden, was auf einen möglichen Resistenzmechanismus EBV-assoziiierter PTLDs hindeutet¹¹⁵. Rooney *et al.* behandelten 10 Patienten mit *in vitro* stimulierten und expandierten EBV-spezifischen T-Zellen⁸⁶. Von den 10 Patienten bekamen drei den adoptiven T-Zelltransfer als Therapie einer bestehenden EBV-Reaktivierung und sieben als prophylaktische Behandlung. Keiner der sieben Patienten, welche die EBV-spezifischen T-Zellen prophylaktisch erhalten hatten, entwickelte eine EBV-Infektion und bei den drei Patienten mit bestehender EBV-Reaktivierung fiel die Viruslast nach der Behandlung auf ein normales Level ab⁸⁶. Einige Jahre später dokumentierte dieselbe Gruppe eine Langzeit-Beobachtungsstudie über den prophylaktischen und therapeutischen Einsatz EBV-spezifischer T-Zellen in 114 Patienten⁸⁸. Im Gegensatz zu einer Kontrollgruppe, in der 11,5% (7/61) der Patienten im ersten Jahr nach Transplantation eine PTLD entwickelten⁸⁷, gab

Tabelle 3: Adoptiver T-Zelltransfer EBV-spezifischer T-Zellen

Autor/Jahr	Methode / Zelltyp	Zahl der Patienten	Ansprechen der Patienten	Dosis
Papadopoulos 1994 ⁷⁶	Unmanipulierte Spender-Lymphozyten (DLI)	5	5/5 sprachen an. 2/5 starben an Lungenversagen	0,12 bis 1,0 x 10 ⁶ Zellen/kg
Rooney 1995 ⁸⁶	<i>In vitro</i> Stimulation und Expansion. Allogene EBV-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten	10 (3/10 mit EBV-Reaktivierung 7/10 Prophylaxe)	EBV-Reaktivierung: 3/3 senken Viruslast Prophylaxe: 7/7 bleiben ohne Reaktivierung	0,2 bis 1,2 x 10 ⁸ Zellen/m ²
Haque 2002 ¹¹⁶	<i>In vitro</i> Stimulation und Expansion. Allogene EBV-spezifische polyklonale CD8 ⁺ und CD4 ⁺ T-Zellen <i>Third-party</i> Spender	8	4/8 Remission (3/4 komplett und 1/4 partiell) 4/8 Patienten keine Remission	10 ⁶ Zellen/kg
Haque 2007 ¹¹⁷	<i>In vitro</i> Stimulation und Expansion. Allogene EBV-spezifische polyklonale CD8 ⁺ und CD4 ⁺ T-Zellen <i>Third-party</i> Spender	33	14/33 komplette Remission, 3/33 partielles Ansprechen, 16/33 kein Ansprechen	2 x 10 ⁶ Zellen/kg
Heslop 2010 ⁸⁸	<i>In vitro</i> Stimulation und Expansion. Allogene EBV-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten	114 (13 mit EBV-Reaktivierung 101 Prophylaxe)	Therapie: 11/13 komplettes Ansprechen Prophylaxe: kein Patient entwickelt EBV-assoziierte PTLD	1 bis 5 x 10 ⁷ Zellen/m ²
Uhlin 2010 ^{114,118}	Direkte Isolation allogener EBV-spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen mit MHC-I-Pentameren. <i>Third-party</i> Spender	1	1/1 komplettes Ansprechen. Nach 2. Reaktivierung erneut komplettes Ansprechen.	1,1 x 10 ⁴ Zellen/kg und 2 x 10 ⁴ Zellen/kg
Moosmann 2010 ¹¹⁹	Direkte Isolation EBV-spezifischer polyklonaler CD8 ⁺ und CD4 ⁺ T-Zellen über CSA	6	3/6 sprachen an	0,4 bis 9,7 x 10 ⁴ Zellen/kg
Dobrovina 2012 ¹¹⁵	DLI oder <i>In vitro</i> Stimulation und Expansion. Allogene EBV-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten	DLI: 30 EBV-spez.: 19	DLI: 21/30 komplettes, 1/30 partielles Ansprechen EBV-spez.: 13/19 komplettes Ansprechen	DLI: 0,2 bis 1x10 ⁶ CD3 ⁺ Zellen/kg EBV-spez.: 10 ⁶ Zellen/kg
Icheva 2012 ¹²⁰	Direkte Isolation EBV-spezifischer polyklonaler CD8 ⁺ und CD4 ⁺ T-Zellen über CSA	10	7/10 sprachen an	0,15 bis 53,8 x 10 ³ Zellen/kg
Gallot 2014 ¹²¹	<i>In vitro</i> Stimulation und Expansion. Allogene EBV-spezifische polyklonale CD8 ⁺ und CD4 ⁺ T-Zellen <i>Third-party</i> Spender	11	4/10 evaluierbare Patienten sprachen an (3/4 komplett und 1/4 partiell)	5 x 10 ⁶ Zellen/kg

es in der Gruppe von 101 prophylaktisch behandelten Patienten keinen einzigen Fall eines Lymphoms⁸⁸. Unter den 13 Patienten mit einer EBV-assoziierten PTLD sprachen mit elf Patienten 80% auf die Therapie mit EBV-spezifischen T-Zellen an. Bei einem der beiden Patienten, die nicht auf die Therapie ansprachen, konnte eine Mutation im EBNA3B-Gen identifiziert werden, die die Erkennung der EBV-infizierten Zellen durch die Spender-T-Zellen verhinderte¹²². Aufgrund einer genetischen Markierung der EBV-spezifischen T-Zellen konnte deren Persistenz im Patienten später über 105 Monate nachgewiesen werden⁸⁸.

Bei organtransplantierten Patienten mit PTLD ist es meist unmöglich, den Organspender auch für die Spende von PBMCs für die Generierung EBV-spezifischer T-Zellen zu akquirieren, da diese ja meist bereits gestorben sind. Um die adoptive T-Zelltherapie mit EBV-spezifischen T-Zellen auch diesen Patienten zugänglich zu machen, kam die Idee auf, in solchen Fällen EBV-spezifische T-Zellen von HLA-gematchten, sogenannten *third-party* Spendern, zu verwenden. In einer ersten Pilotstudie zu diesem Thema behandelten Haque und Kollegen acht PTLD-Patienten mit partiell HLA-gematchten EBV-spezifischen T-Zellen¹¹⁶. Drei der acht Patienten sprachen komplett, einer nur partiell auf die Therapie an und vier Patienten zeigten leider kein

Ansprechen. Bemerkenswerterweise entwickelte keiner der acht Patienten eine GvHD¹¹⁶. Nach diesen ersten Erfolgen wurde daran eine Multicenter-Studie mit 33 Patienten angeschlossen. Dabei erreichten 14 Patienten eine komplette Remission, drei sprachen nur partiell an und 16 Patienten zeigten leider kein Ansprechen auf die Therapie. In dieser Studie wurde ein signifikant besseres Ansprechen beobachtet, wenn die EBV-spezifischen T-Zellen höhere Anteile an CD4⁺ T-Zellen enthielten¹¹⁷. Gallot *et al.* behandelten elf Patienten ebenfalls mit *in vitro* stimulierten und expandierten EBV-spezifischen T-Zellen von *third-party* Spendern¹²¹. Dabei sprachen drei von zehn evaluierbaren Patienten komplett an und einer nur partiell. Die Autoren brachten das schlechte Ergebnis mit dem geringen HLA-match in Zusammenhang, da es hier für HLA-Klasse-I nur 1-3 und für HLA-Klasse-II nur 0-4 Übereinstimmungen zwischen Spender und Empfänger gab¹²¹.

Die Anreicherung Virus-spezifischer T-Zellen mittels MHC-I-Multimer-Technik wurde auch zur Isolation EBV-spezifischer T-Zellen angewendet. So behandelten Uhlin und seine Kollegen zunächst einen Patient mit über MHC-I-Pentamere und magnetische Isolation angereicherte EBV-spezifische CD8⁺ T-Zellen eines haploidenten *third-party* Spenders¹¹⁸. Die Patientin reaktivierte die EBV-Infektion zwar nach dem ersten dauerhaften Ansprechen, konnte diese jedoch nach einem zweiten adoptiven T-Zelltransfer ebenfalls eliminieren^{114,118}.

Für die Behandlung von sechs Patienten mit EBV-assoziiertes PTLD isolierten Moosmann und Kollegen polyklonale CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nach einer Stimulation mit 23 Peptiden aus elf EBV-Antigenen mittels CSA und magnetischer Anreicherung¹¹⁹. Drei der Patienten starben nach einem, sieben und elf Tagen an einem bereits zum Zeitpunkt des adoptiven T-Zelltransfers bestehenden Multiorganversagen. Die anderen drei Patienten sprachen auf die Therapie an¹¹⁹. Icheva *et al.* behandelten 10 Patienten mit einer EBV-Reaktivierung oder PTLD nach allogener HSZT mit EBV-spezifischen Zellen, die nach Stimulation mit dem EBNA1-Antigen mittels CSA angereichert wurden¹²⁰. In acht der 10 Patienten wurde nach der Therapie eine Expansion EBV-spezifischer T-Zellen beobachtet, was bei sieben Patienten mit klinischem und virologischem Ansprechen verbunden war¹²⁰.

2.4.2.3 Adoptiver T-Zelltransfer AdV-spezifischer T-Zellen

Für die erste Behandlung einer AdV-Infektion nach Stammzelltransplantation mit adoptivem T-Zelltransfer wurden 1994 noch unmanipulierte Spenderlymphozyten (DLI) verwendet. Hromas und Kollegen behandelten einen 19-jährigen Patienten mit therapieresistenter AdV-Infektion mit einer DLI von 10⁶ CD3⁺ T-Zellen/kg Körpergewicht und erzielten damit ein komplettes Ansprechen des Patienten, ohne dass dieser eine GvHD entwickelte¹²³. Feuchtinger *et al.* isolierten für die adoptive T-Zelltherapie von AdV-Infektionen polyklonale Hexon-spezifische CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen mittels CSA und magnetischer Anreicherung¹²⁴. Insgesamt wurden neun pädiatrische Patienten mit AdV-Infektionen nach allogener HSZT behandelt. Fünf von sechs evaluierbaren Patienten sprachen dabei auf die Therapie an, was mit einer *in vivo*-Expansion AdV-spezifischer T-Zellen verbunden war. Kein Patient entwickelte eine GvHD und es konnten auch keine akuten Toxizitäten festgestellt werden¹²⁴. In einer daran anschließenden Studie im selben Zentrum mit 30 Patienten konnte die Wirksamkeit und Sicherheit AdV-spezifischer T-

Zellen bestätigt werden. Von den 30 behandelten Patienten sprachen 21 auf die Therapie an, darunter 14 Patienten, die das Virus komplett eliminieren konnten¹²⁵. Die Wirksamkeit der adoptiven T-Zelltherapie mit über CSA angereicherten polyklonalen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen bei AdV-Infektionen konnte von einer anderen Gruppe ebenfalls bestätigt werden. Hier wurde eine 7-jährige Patientin mit Hexon-spezifischen T-Zellen eines haploidenten *third-party* Spenders behandelt. Die Patientin konnte die Infektion unter Rekonstitution einer AdV-spezifischen Immunantwort eliminieren, entwickelte jedoch eine GvHD der Haut und der Leber¹²⁶.

Der erste Einsatz von mittels MHC-I-Pentameren und magnetischer Isolation angereicherter AdV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen war leider nicht erfolgreich. Der so behandelte Patient zeigte nur eine sehr kurze transiente Rekonstitution AdV-spezifischer Spender-T-Zellen und, nachdem auch ein zweiter adoptiver T-Zelltransfer nicht von Erfolg gekrönt war, verstarb der Patient an der AdV-Infektion¹¹⁴.

Geyeregger und seine Kollegen reicherten AdV-spezifische T-Zellen über *in vitro* Stimulation und Expansion an¹²⁷. Einer der beiden behandelten Patienten sprach sehr gut auf die Therapie an und konnte selbst eine später auftretende neue AdV-Infektion eliminieren. Der andere Patient sprach zwar zumindest transient auf die Therapie an, entwickelte jedoch parallel eine intestinale und hepatische GvHD Stadium IV und verstarb schließlich 117 Tage nach dem adoptiven T-Zelltransfer an einem mit der AdV-Infektion- und GvHD-assoziierten Multiorganversagen¹²⁷.

Tabelle 4: Adoptiver T-Zelltransfer AdV-spezifischer T-Zellen

Autor/Jahr	Methode / Zelltyp	Zahl der Patienten	Ansprechen der Patienten	Dosis
Hromas 1994 ¹²³	Unmanipulierte Spender-Lymphozyten (DLI)	1	1/1 komplettes Ansprechen	10 ⁶ CD3 ⁺ Zellen/kg
Feuchtinger 2006 ¹²⁴	Direkte Isolation AdV-spezifischer polyklonaler CD8 ⁺ und CD4 ⁺ T-Zellen über CSA	9	Ansprechen bei 5/6 evaluierbaren Patienten	1,2 bis 50 x 10 ³ Zellen/kg
Qasim 2011 ¹²⁶	Direkte Isolation AdV-spezifischer polyklonaler CD8 ⁺ und CD4 ⁺ T-Zellen über CSA. <i>Third-party</i> Spender	1	1/1 komplettes Ansprechen	10 ⁴ Zellen/kg
Uhlin 2012 ¹¹⁴	Direkte Isolation allogener AdV-spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen mit MHC-I-Pentameren. <i>Third-party</i> Spender	1	Kein Ansprechen	3,1 x 10 ⁴ und 1,7 x 10 ⁴ Zellen/kg
Geyeregger 2014 ¹²⁷	<i>In vitro</i> Stimulation und Expansion. Allogene AdV-spezifische polyklonale CD8 ⁺ und CD4 ⁺ T-Zellen	2	1/2 komplettes, 1/2 partielles Ansprechen	10 ⁴ CD3 ⁺ Zellen/kg
Feucht 2015 ¹²⁵	Direkte Isolation AdV-spezifischer polyklonaler CD8 ⁺ und CD4 ⁺ T-Zellen über CSA	30	21/30 sprachen an	0,3 bis 24 x 10 ³ CD3 ⁺ Zellen/kg

2.4.2.4 Adoptiver T-Zelltransfer CMV-, EBV- und AdV-spezifischer T-Zellen

Leen *et al.* waren die ersten, die 2006 elf Patienten mit Virus-spezifischen T-Zellen gegen CMV, EBV und AdV behandelten¹⁰⁰. Für die Anreicherung der „multivirus-spezifischen“ T-Zellen wurden dabei zuerst B-LCL generiert und mit einem pp65-exprimierenden adenoviralen Vektor transduziert. Nun wurden die Spender-PBMCs mit den Hexon-, pp65 und den latenten EBV-Antigenen exprimierenden B-LCL stimuliert und expandiert. Alle Patienten, die eine CMV-, EBV- oder AdV-Infektion entwickelten, konnten die Viruslast schnell senken. Das Ansprechen

war auch hier wieder mit einer Expansion der Virus-spezifischen T-Zellen *in vivo* verbunden. Im Gegensatz zu CMV- und EBV-spezifischen T-Zellen, expandierten die AdV-spezifischen T-Zellen nur im Fall einer bestehenden Infektion¹⁰⁰. Dieser Umstand könnte den prophylaktischen Einsatz AdV-spezifischer T-Zellen einschränken, für eine abschließende Bewertung sollte man allerdings weitere Studien abwarten. Gerdemann und ihre Kollegen dokumentierten 2013 die Behandlung von zehn Patienten mit „multivirus-spezifischen“ T-Zellen¹²⁸. Hierbei wurde für die Generierung AdV-, EBV- und CMV-spezifischer T-Zellen ein etwas abgewandeltes, schnelleres Protokoll angewendet. Als APCs wurden Spender-DCs verwendet, bei denen zuvor eine Nukleofektion mit für LMP2 (EBV), EBNA1 (EBV), BZLF1 (EBV), Hexon (AdV), pp65 (CMV) und IE-1 (CMV) codierenden DNA-Plasmiden durchgeführt wurde. Danach wurden Spender-PBMCs mit den so präparierten DCs für 6-7 Tage stimuliert und nochmals über 4-6 Tage expandiert¹⁰². Unter den zehn behandelten Patienten fanden sich drei mit einer CMV-Infektion, zwei mit einer EBV-Infektion, einer mit AdV-Infektion und vier Patienten mit je zwei Infektionen zur selben Zeit (zwei Patienten: EBV und AdV; zwei Patienten CMV und AdV). Die Ansprechrate auf den adoptiven T-Zelltransfer lag insgesamt bei 80%, unter den vier Patienten mit einer multiplen Infektion lag die Ansprechrate sogar bei 100%¹²⁸.

Generell kann mit dem adoptiven T-Zelltransfer gegen mehrere Viren gleichzeitig all jenen Patienten geholfen werden, die mehr als eine Infektion parallel haben. Man könnte allen Patienten mit einer Infektion gleichzeitig prophylaktisch einen immunologischen Schutz vor den anderen beiden Viren geben oder die Therapie generell jedem Patienten nach allogener HSZT als reine Prophylaxe zukommen lassen. Darüber hinaus ist die simultane Isolierung CMV-, EBV- und AdV-spezifischer T-Zellen in der Herstellung deutlich kostengünstiger. Somit stellt der adoptive T-Zelltransfer mit CMV-, EBV- und AdV-spezifischen T-Zellen eine vielversprechende Therapieoption nach allogener HSZT dar.

Tabelle 5: Adoptiver T-Zelltransfer CMV-, EBV- und AdV-spezifischer T-Zellen

Autor/Jahr	Methode / Zelltyp	Zahl der Patienten	Ansprechen der Patienten	Dosis
Leen 2006 ¹⁰⁰	<i>In vitro</i> Stimulation und Expansion. Allogene CMV-, EBV und AdV-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten	11	Alle Patienten, die eine Infektion hatten oder entwickelten, konnten diese eliminieren	5 x 10 ⁶ bis 1 x 10 ⁸ Zellen/m ²
Gerdemann 2013 ¹²⁸	<i>In vitro</i> Stimulation und Expansion. Allogene CMV-, EBV und AdV-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten.	10 (Infektionen: 3/10 CMV, 1/10 AdV, 2/10 EBV, 2/10 EBV+AdV, 2/10 CMV+AdV)	8/10 komplettes Ansprechen (darunter alle 4 Patienten mit zwei Infektionen)	5 x 10 ⁶ bis 2 x 10 ⁷ Zellen/m ²

3 Zielsetzung

Für zahlreiche maligne hämatopoetische Erkrankungen stellt die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) eine wichtige Therapieform dar. Der Erfolg einer Pharmakotherapie ist dabei leider durch die auftretenden Resistenzen der Viren und die limitierte Wirksamkeit sowie ausgeprägte Toxizitäten der zur Verfügung stehenden Virostatika stark eingeschränkt. Als attraktive Behandlungsoption bietet sich hier die Immuntherapie in Form eines adoptiven T-Zelltransfers an.

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines standardisierten GMP-Protokolls zur simultanen *ex vivo* Isolation Antigen-spezifischer T-Zellen gegen mehrere Viren zur Therapie und Prophylaxe multipler Infektionen nach allogener HSZT. Hierfür eignet sich die magnetische Anreicherung basierend auf dem CSA, um unabhängig vom HLA-Typ des Spenders Antigen-spezifische, polyklonale CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zeit- und kostensparend zu isolieren. Außerdem ist dieses Protokoll zur Isolation Antigen-spezifischer T-Zellen gegen einzelne Viren bereits klinisch erprobt und die benötigten Materialien sind in GMP-Qualität erhältlich. Für die Entwicklung eines solchen Protokolls muss zunächst eine geeignete Auswahl viraler Antigene getroffen werden. Der Antigenmix sollte dabei die Isolation Virus-spezifischer T-Zellen ohne zu stark ausgeprägte Konkurrenz der Antigene untereinander erlauben. Des Weiteren sollte eine ausgewogene Anreicherung aller Spezifitäten ohne Bevorzugung einer in der Ausgangsfraktion dominierenden Spezifität gewährleistet sein. Anschließend an die simultane Isolierung der Virus-spezifischen T-Zellen mittels CSA muss ein Protokoll entwickelt werden, nach dem die angereicherten T-Zellen für eine ausführliche Charakterisierung expandiert werden können. Die nachfolgende Charakterisierung der simultan isolierten und expandierten Virus-spezifischen T-Zellen sollte Analysen über die Verteilung der einzelnen Spezifitäten im Produkt, deren Polyfunktionalität und Epitopspezifität gegen HLA-gematchte Peptide einschließen.

4 Material und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Plastik und Glaswaren/ Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Details	Firma
Butterfly	Safety-Multifly-Kanülen, Nr.2, grün, 0,8x19 mm	Sarstedt
Cryo-Röhrchen	Cryo.STM PP, mit Schraubverschluss, steril	Greiner bio-one
FACS-Tubes	Falcon® 5mL Round Bottom Test Tube, without Cap	Corning
FACS-Tubes, klein	Röhrchen, 1,3 ml, PP, runder Boden, 8,5 x 44 mm, Natur	Greiner bio-one
FACS-Tubes mit Deckel	Falcon® 5mL Round Bottom Test Tube, with Snap Cap	Corning
Falcons	Tube 15 ml, PP, conical bottom, with blue screw cap	Greiner bio-one
	Tube 50 ml, PP, conical bottom, with blue screw cap	Greiner bio-one
Kanüle dick	Microlance™ 3, 1,1 x 40 mm	Becton Dickinson
Kanüle dünn	Sterican® Einmal-Injektions-Kanüle, 0,9 x 70 mm	B. Braun
MACS-Säule LS	MACS LS Column	Miltenyi
Pipettenspitzen	Crystal pipet tip „E“ – volumes 0.5-20 µl	ratiolab
	Crystal pipet tip „G“ – volumes 0.1-10 µl	ratiolab
	Yellow tip 1-200 µl	SciMart
	Pipettenspitzen ohne Filter 1000 µl, blau	SciMart
Probenröhrchen 0,5 ml	Probenröhrchen, 0,5 ml, farblos, steril, mit Loopverschluss	Biozym
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Reaktionsgefäß 1,5 ml, mit angehängtem Deckel, natur	Greiner bio-one
Spritzen	0,01-1 ml / Luer Solo, Injekt®-F, Feindosierungsspritze, steril	B. Braun
	10 ml / Luer Solo, Inket®, 2teilige Einmalspritze, steril	B. Braun
	20 ml / Luer Solo, Injekt®, 2teilige Einmalspritze, steril	B. Braun
	50 ml / Luer-Lok™-Spritze, Amber, steril	Becton Dickinson
Stabpipetten	Costar® 2 ml Stripette®	Corning
	Costar® 5 ml Stripette®	Corning
	Costar® 10 ml Stripette®	Corning
	Costar® 25 ml Stripette®	Corning
	Costar® 50 ml Stripette®	Corning
Sterilfilter	Minisart® Syringe Filter single use, hydrophilic, Porengröße 0.20 µm	Sartorius
	Minisart® Syringe Filter single use, hydrophilic, Porengröße 0.45 µm	Sartorius
Reagent Reservoir	Costar® Reagent Reservoir, 50 ml, steril	Corning
Zellkulturflaschen	Cell culture flask 50 ml 25 cm ² PS, with red filter screw cap	Greiner bio-one
	Cell culture flask 250 ml 75 cm ² PS, with red filter screw cap	Greiner bio-one
	Cell culture flask 550 ml 175 cm ² PS, with red filter screw cap	Greiner bio-one
Zellkulturplatten	Cell culture microplate 96 well PS, U-bottom	Greiner bio-one
	Corning® 96 well clear round bottom TC-treated microplate, with lid	Corning
	Costar® 48 well clear TC-treated multiple well plattes	Corning
	Cell culture multiwell plate 24 well PS, U-bottom	Greiner bio-one
	Cell culture multiwell plate 6 well PS, U-bottom	Greiner bio-one
Zell-scraper	Costar® Cell-scraper	Corning

4.1.2 Reagenzien und Chemikalien

Bezeichnung	Details	Firma
Brefeldin A	Brefeldin A from <i>Penicillium brefeldinatum</i>	Sigma-Aldrich
CCS-Kit	CliniMACS® Cytokine Capture System (IFN γ) enthält: IFN γ Catchmatrix Reagent IFN γ Enrichment Reagent	Miltenyi
CSA-Kit	IFN γ Secretion Assay – Cell Enrichment and Detection Kit (PE) enthält: IFN γ Catch Reagent IFN γ Detection Antibody-PE Anti-PE Microbeads	Miltenyi
CD4 MicroBeads	CD4 MicroBeads, human	Miltenyi
DMSO	CryoSure-DMSO >99,9% USP grade	WAK-Chemie
Dynabeads	Dynabeads® T-cell activator CD3/CD28	Invitrogen
FACS-Clean	BD FACS Clean Soutlion	Becton Dickinson
FACS-Flow	BD FACFlow Sheath Fluid	Becton Dickinson
FACS-Rinse	BD FACSRinse Solution	Becton Dickinson
Ficoll/Paque	Biocoll Separating Solution	BiochromAG
Fix und Perm Kit	FIX&PERM Cell permeabilization kit	ADG
Kompensationsbeads	ArC™ Amine Reactive Compensations Bead Kit AbC™ Anti-Mouse Bead Kit BD™ CompBead anti-mouse Ig, κ BD™ CompBead anti-rat Ig, κ	Invitrogen Invitrogen Becton Dickinson Becton Dickinson
L-Glutamin	L-Glutamine 200mM	BiochromAG
MACS-Puffer	CliniMACS® PBS/EDTA-Buffer pH7.2	Miltenyi
Na-Heparin	Heparin-Natrium-25 000-ratiopharm	Ratiopharm
PBS	Dulbecco's PBS (1x)	PAA
PFA 1%	1% Paraformaldehyde in PBS	Sigma-Aldrich/PAA
Pulmozyme	Pulmozyme® 2500 E. (2,5 ml)	Roche
Steriles Wasser	Aqua ad iniectabilia, Mini-Plasco® connect	B. Braun
Trypanblau	Trypan blue solution 0,4%	Sigma

4.1.3 Medien und Zytokine

Bezeichnung	Details	Firma
IL-2	Proleukin, 18×10^6 IE (für 1ml Lösung)	Novartis
IL-7	rh IL-7 preclinical grade, $\geq 5 \times 10^7$ IU/ml	CellGenix™
IL-15	rh IL-15 preclinical grade, $\geq 8 \times 10^6$ IU/ml Recombinant Human IL-15	CellGenix™ R&D Systems
FCS	Fetal Bovine Serum, 500 ml	BiochromAG
Human-Serum	Gepooltes Human-Serum aus den Blutbanken Tübingen und Ulm	
Human-Albumin 5%	Humanalbin®, 50 g Protein/l (5%), 50 ml	CSL Behring
Human-Albumin 20%	Human-Albumin 20% Behring, salzarm, 200 g Protein/l (20%), 50 ml	CSL Behring
RPMI 1640 Medium	RPMI 1640 Medium, Low endotoxin, 500 ml	BiochromAG
TexMACS Medium	TexMACS Medium, research grade, 500 ml	Miltenyi

Selbst hergestellte Medien	Zusammensetzung	
AB-Medium	500 ml	RPMI 1640 Medium
	50 ml	Human-Serum (AB-Serum)
	5 ml	L-Glutamin
HA-Medium	500 ml	RPMI 1640 Medium
	50 ml	Human-Albumin 20%
	5 ml	L-Glutamin
Einfriermedium	80%	Human-Albumin 5%
	20%	DMSO

4.1.4 FACS Antikörper

4.1.4.1 Oberflächenfärbungen

Antigen	Farbe	Klon	Firma
Maus anti-human CD3	APC	clone SK7, IgG ₁ κ	Becton Dickinson
	BV510	clone OKT3, IgG _{2a} κ	Biologend
	Pe-Cy7	clone SK7, IgG ₁ κ	Becton Dickinson
Maus anti-human CD4	APC-H7	clone SK3, IgG ₁ κ	Becton Dickinson
	PerCp	clone SK3, IgG ₁ κ	Becton Dickinson
Maus anti-human CD8	FITC	clone SK1, IgG ₁ κ	Becton Dickinson
	PB	clone DK25, IgG ₁ κ	Dako
Maus anti-human CD45RA	BV711	clone HI100, IgG _{2b} κ	Biologend
Maus anti-human CD56	APC	clone B159, IgG ₁ κ	BD Pharmingen
	BV421	clone HCD56, IgG ₁ κ	Biologend
	BV711	clone HCD56, IgG ₁ κ	Biologend
Maus anti-human CD62L	PE-CF 594	clone DREG-56, IgG ₁ κ	BD Horizon
Maus anti-human Linage 1 CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56 (lin 1)	FITC	clone SK7, 3G8, SJ25C1, L27, MφP9, NCAM16.2 IgG ₁ κ/ IgG _{2b} κ	Becton Dickinson
Ratte anti-human CD197	PeCy7	clone 3D12, IgG _{2a} κ	Becton Dickinson

4.1.4.2 Intrazelluläre Färbungen

Antigen	Farbe	Klon	Firma
Maus anti-human IFN γ	PE	clone 25723.11, IgG _{2b} κ	Becton Dickinson
Maus anti-human IL-2	APC	clone 5.344.111, IgG ₁ κ	Becton Dickinson
Maus anti-human TNF α	BV421	clone MAB 11, IgG ₁ κ	Biologend

4.1.4.3 Isotyp-Kontrollen

Isotyp	Farbe	Klon	Firma
Isotyp „Simultest“ $\gamma 1/ \gamma 2a$	FITC/PE	clone X40/X39, IgG ₁ κ /IgG _{2a} κ	Becton Dickinson
Isotyp: Maus $\gamma 1$	AF-647	clone ICFC, IgG ₁ κ	Biologend
	APC	clone X40, IgG ₁ κ	Becton Dickinson
	PE	clone X40, IgG ₁ κ	Becton Dickinson
	PerCp	clone X40, IgG ₁ κ	Becton Dickinson
Isotyp: Maus $\gamma 2a$	FITC	clone X39, IgG _{2a} κ	Becton Dickinson
	PerCp	clone X39, IgG _{2a} κ	Becton Dickinson
Isotyp: Ratte $\gamma 2a$	PeCy7	clone R35-95, IgG _{2a} κ	Becton Dickinson

4.1.4.4 Sonstige

AF350	Alexa Fluor® 350 carboxylic acid, succinimidyl ester (invitrogen)
eFluor780	Fixable Viability Dye eFluor® 780 (eBioscience)

4.1.5 MHC-I-Streptamere

Best CELLer Staining Kits der Firma iba-lifescience

In Kombination mit *Strep-Tactin PE for MHC I Streptamer, Best CELLer*

HLA-Typ	Virus	Antigen	Peptid
HLA A*01:01	AdV	Hexon	LDLGQNLLY
HLA A*02:01	CMV	pp65	NLVPMVATV
	EBV	LMP2	FLYALALL
	HIV	pol	ILKEPVHGV
HLA A*24:02	AdV	Hexon	TYFSLNNKF
	CMV	pp65	QYDPVAALFL
	EBV	LMP2	PYLFWLAAI
HLA A*35:01	EBV	EBNA1	HPVGEADYFEY
HLA B*08	CMV	IE-1	QIKVRVDMV
	EBV	BZLF1	RAKFKQLL

4.1.6 Peptid-Pools und Peptide

Peptid-Pools: für Forschung Research-grade und im GMP-Reinraum in GMP-Qualität.

Antigen	Bezeichnung im Katalog	Firma
Actin (ACTS) [neg. Kontr.]	PepMix™ Human (Actin)	JPT
MBP [neg. Kontr.]	PepTivator MBP Isoform 1, human	Miltenyi
MOG [neg. Kontr.]	PepTivator MOG, human	Miltenyi
AdV Hexon	PepTivator AdV5 Hexon, human	Miltenyi
CMV pp65	PepTivator CMV pp65, human	Miltenyi
EBV BZLF1	PepTivator EBV BZLF1, human	Miltenyi
EBV EBNA1	PepTivator EBV EBNA1, human	Miltenyi
EBV LMP2a	PepTivator EBV LMP2a, human	Miltenyi
EBV Consensus (Mix von 43 Peptiden aus verschiedenen EBV Proteinen; Peptidlänge: 8-22 aa; 32 MHC I Peptide und 11 MHC II Peptide)	PepTivator EBV Consensus, human	Miltenyi

Peptide: bezogen von AG Stevanović: University of Tübingen Interfaculty Institute for Cell Biology Department of Immunology, Auf der Morgenstelle 15, D-72076 Tübingen

Protein	Peptidsequenz
BZLF1 (EBV)	RAKFKQLL
EBNA1 (EBV)	KTSLYNLRRGTALA
EBNA1 (EBV)	YNLRRGTAL
Hexon (AdV)	EPTLLYVLF
Hexon (AdV)	LTDLGQNLLY
Hexon (AdV)	MEINLNANLW
Hexon (AdV)	NEIGVGNNF
Hexon (AdV)	TYFSLNNKF
Hexon (AdV)	YVLFVFDVV
LMP2a (EBV)	CLGGLLTMV
LMP2a (EBV)	ESEERPPTY
LMP2a (EBV)	FLYALALL
LMP2a (EBV)	PYLFWLAAI
LMP2a (EBV)	TYGPVFMCL
pp65 (CMV)	HPTFTSQYRIQKLE
pp65 (CMV)	KPGKISHIMLDVAFTSH
pp65 (CMV)	MLNIPSINV
pp65 (CMV)	NLVPMVATV
pp65 (CMV)	QYDPVAALFL
pp65 (CMV)	RIPHERNGFTVL
pp65 (CMV)	TPRVTGGGAM
pp65 (CMV)	YQEFFWDANDIYRIF
pp65 (CMV)	YSEHPTFTSQY
gag p17; HIV-1	GSEELRSLY
RNA-Helikase DDX5; human	YLLPAIVHI
TEGT; human	AYVHVMVTHF
HB2P; human	APRTVALTA
MET; human	AVKCLKIDL
Keratin 8; human	AESMYQIKY
FLNA; human	ETVITVSTKAAGK GK

4.1.7 Geräte

Gerät	Firma
Akku Rotator: MACSmix™ Tube Rotator	Miltenyi
Durchflusszytometer: FACS Calibur	Becton Dickinson
Durchflusszytometer: LSR II	Becton Dickinson
Einkanalpipetten: 2.5µl; 10µl; 20µl; 100µl; 200µl; 1000µl	Gilson / Eppendorf
Feuchtinkubator Heracell®	Heraeus
Gefrierschrank -80°C: -86°C Freezer	Forma Scientific
Gefrierschränke -20°C	Liebherr
Kühlschränke 2-8°C	Liebherr
Lichtmikroskope CX40 / IM	Olympus
MACS-Magnet: MidiMACS Separator mit MACS MultiStand	Miltenyi
Mehrkanalpipette 200µl: Transferpette®	Eppendorf
MrFrosty Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene™
Neubauer Zählkammer, Tiefe 0,1 mm	LO Laboroptik
Pipetierhilfe Pipetboy acu	IBS Integra Biosciences
Sicherheitswerkbank Herasafe®	Heraeus
Vortexer: Reagenzglasschüttler Reax top	Heidolph
Wasserbad GFL 1083	GFL
Zentrifuge Mikro 22R	Hettich
Zentrifuge Rotanta 46 RSC	Hettich

4.2 Methoden

4.2.1 Allgemeine Zellkulturmethoden

4.2.1.1 Isolierung von PBMCs aus Vollblut oder Leukapheresat

Verwendete Materialien: Na-heparinisertes Vollblut oder Leukapheresat
 PBS (RT)
 Ficoll/Paque (RT)
 Medium (37°C)
 50-ml-Falcons
 je nach Versuch Zellkulturflasche, FACS Tube etc.

Durchführung: Sterile Arbeitsweise an einer Sterilbank

Pro 15 ml Vollblut bzw. pro 7,5 ml Leukapheresat 15 ml Ficoll in ein 50-ml-Falcon vorbereiten (dabei darauf achten, dass die Ficoll-Lösung nicht zu lange im Licht steht). Dann Vollblut 1:2 mit PBS verdünnen (Leukapheresat wird 1:4 verdünnt) und die vorbereitete Ficoll-Lösung mit je 35 ml langsam überschichten. Die Ficoll-Zentrifugation wird bei 800 g, ausgeschalteter Bremsfunktion und RT 30 min. durchgeführt. Danach werden die Interphasen, welche die PBMCs enthalten, mit einer Stabpipette vorsichtig abgenommen und in ein bereitgestelltes 50-ml-Falcon gepoolt, mit PBS aufgefüllt und ein weiteres Mal zentrifugiert (500 g, 10 min., RT). Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand verworfen, das Zellpellet in PBS resuspendiert, ein Aliquot für die Zellzahl entnommen und erneut zentrifugiert (400 g, 10 min., RT). Während der Zentrifugation wird die Zellzahl bestimmt und die erforderliche Menge Medium für den nachfolgenden Versuch ermittelt. Nach dem Zentrifugieren wird wieder der Überstand verworfen und das Zellpellet in der zuvor ermittelten Menge warmem Medium resuspendiert. Die Zellen können nun je nach Versuch in Kultur genommen, eingefroren oder direkt anderweitig weiter verarbeitet werden.

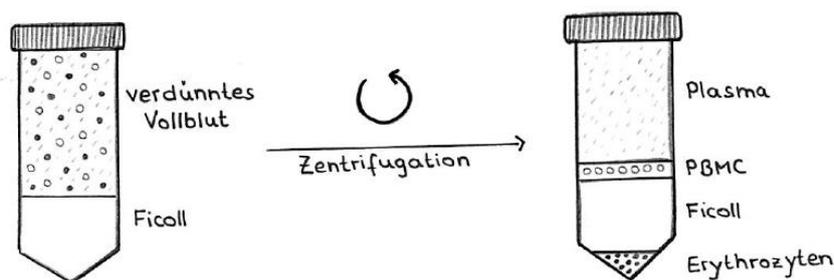


Abbildung 3: Isolierung von PBMCs aus Vollblut oder Leukapheresat

Die Ficoll-Lösung wird zunächst vorsichtig mit dem verdünnten Vollblut überschichtet. Bei der anschließenden Zentrifugation werden die Erythrozyten, die PBMC-Fraktion und das Plasma nach ihrer unterschiedlichen Dichte aufgetrennt. Die PBMCs können nun vorsichtig mit einer Pipette abgezogen werden.

4.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Verwendete Materialien: Zu zählende Zellen
 PBS für Verdünnung (optional)
 Neubauer Zählkammer
 Trypanblau

Durchführung:

Zellsuspension gut mischen und ein Aliquot entnehmen ($\geq 10 \mu\text{l}$). Falls die Zelldichte sehr hoch ist, sollte das Zählaliquot mit PBS verdünnt werden. Nun werden $10 \mu\text{l}$ der Zählprobe mit $10 \mu\text{l}$ Trypanblau-Lösung gemischt und in die Neubauer-Zählkammer pipettiert und unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Vitale Zellen werden vom Trypanblau nicht angefärbt, tote Zellen nehmen Trypanblau auf und erscheinen unter dem Lichtmikroskop blau. Für die Berechnung der Zellzahl kann folgende Formel verwendet werden:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{gezählte Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor Trypanblau}}{\text{ausgezählte Quadranten}} \times 10^4 (\times \text{Verdünnungsfaktor PBS}) / \text{ml}$$

4.2.1.3 Einfrieren von Zellen

Verwendete Materialien: Zellen
 Medium
 Einfriermedium
 Cryotubes
 „Mr. Frosty“ Freezing Container

Vorbereitung:

Zuerst wird die benötigte Menge an Medium berechnet: Bei Aliquots à 5×10^6 Zellen sind es 0,5 ml Medium/Aliquot, bei Aliquots $>1 \times 10^7$ Zellen 1 ml Medium/Aliquot. Für das Einfriermedium berechnet man die Menge analog. Die Cryotubes können nun schon beschriftet und bereitgestellt werden.

Durchführung: Sterile Arbeitsweise an einer Sterilbank

Die Zellen werden zuerst zentrifugiert (300 g, 10 min., RT). Danach wird der Überstand abgenommen und das Zellpellet in der berechneten Menge Medium resuspendiert. Die folgenden Schritte müssen in sehr zügiger Abfolge geschehen, damit die Zellen möglichst kurz mit dem DMSO in Kontakt kommen, bevor sie eingefroren werden. Nach Zugabe des Einfriermediums wird gut gemischt und die Aliquots werden direkt in die vorbereiteten Cryotubes pipettiert. Als nächstes werden die Cryotubes für den Einfrierprozess im „Mr. Frosty“ in den -80°C Gefrierschrank gestellt. Am nächsten Tag können die eingefrorenen Zellen entweder im -80°C Gefrierschrank zwischengelagert oder direkt in den Stickstofftank überführt werden.

4.2.1.4 Auftauen von Zellen

Verwendete Materialien: Zellaliquot
Medium (37°C)
Falcon Tubes
Pulmozym (DNase, optional)

Vorbereitung:

Pro Zellaliquot ein 15-ml-Falcon mit je 12 ml 37°C warmem Medium bereitstellen. Sichern, dass eine Zentrifuge bei RT oder 37°C (besser) frei ist.

Durchführung: Sterile Arbeitsweise an einer Sterilbank

Am besten alle Cryotubes nacheinander auftauen (Zwischenlagerung auf Trockeneis möglich). Beim Auftauvorgang wird schichtweise abgetaut: Mit einer Stabpipette etwas warmes Medium auf die gefrorenen Zellen geben und direkt wieder in das Falcon mit dem warmen Medium zurück. Dieser Vorgang wird so lange wiederholt, bis das ganze Aliquot aufgetaut ist. Dann wird das Falcon mit den Zellen zentrifugiert (300 g, 10 min., RT oder 37°C), der Überstand abgenommen und das Pellet in 10 ml Medium resuspendiert. Nun ein weiteres Mal zentrifugieren (300 g, 10 min., RT oder 37°C) und den Überstand abnehmen. Das Zellpellet kann nun je nach Versuch in Medium, PBS oder anderem resuspendiert werden.

Anmerkung:

Für funktionelle Tests mit T-Zellen oder auch bei bestimmten Oberflächenfärbungen ist eine Resting-Phase über Nacht im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) vonnöten. Des Weiteren kann es für eine bessere Regenerierung der Zellen von Vorteil sein, die Zellen nach dem Auftauen über Nacht in einem Pulmozym-haltigen Medium regenerieren zu lassen (Pulmozymkonzentration: 3 µg/ml). Das Pulmozym wird am nächsten Morgen einfach durch Waschen der Zellen entfernt.

4.2.1.5 Bestrahlen der Zellen

Durchführung:

Die Zellen werden in geschlossenen 15-ml-Falcons bestrahlt. Die Strahlendosis für die Generierung von Feederzellen beträgt einmalig 30 Gy.

4.2.1.6 Beads waschen

Verwendete Materialien: Dynabeads®
 PBS
 Medium
 1,5 ml Reaktionsgefäß
 1 ml Spritze mit Kanüle
 Magnet für Dynabeads®

Durchführung: Sterile Arbeitsweise an einer Sterilbank

Berechnung der benötigten Menge an Dynabeads® (Konzentration der Dynabeads®: 4×10^7 Beads/ml). Das Vial mit den Dynabeads® muss direkt vor dem Entnehmen der Beads sehr gut gevortext werden! Die zuvor ermittelte Menge an Dynabeads® in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführen und mindestens 1 ml PBS dazu geben. Das Tube muss jetzt 5 sec. gevortext werden bevor es für 1 min. in den Magnet gestellt wird. Dabei werden die Dynabeads® an der Tubewand magnetisch fixiert und der Überstand ohne die Dynabeads® kann nach Ablauf der Minute mit der Spritze abgezogen und verworfen werden. Danach kann das Tube aus dem Magnet entfernt werden und die Dynabeads® in der Menge Medium, die zuvor aus dem Vial entnommen wurde, resuspendiert werden.

Einsatzkonzentration für die Expansion Virus-spezifischer T-Zellen: 1 Dynabead® : 1 Zelle.

4.2.2 Gewinnung Virus-spezifischer T-Zellen

4.2.2.1 Isolierung Virus-spezifischer T-Zellen mittels *IFN γ Capture System*

4.2.2.1.1 Labormaßstab

Verwendete Materialien:

Tag 0 Ficoll: Na-heparinisieretes Vollblut oder Leukapheresat
 PBS (RT)
 Ficoll/Paque (RT)
 AB-Medium (37°C)
 50-ml-Falcons
 Je nach Versuch Zellkulturflasche, FACS Tube etc.

Tag 1 Stimulation: SEB
 MOG
 Antigene
 15-ml-Falcons

Sekretion: MACS-Puffer (4°C)
 PBS (4°C)
 50-ml-Falcons
 15-ml-Falcons
 FACS Tubes
 Zellscraper
 CCS-Kit
 HA-Medium (37°C)
 Akku-Rotatoren
 2 MACS-Säulen LS
 MACS-Magnet
 AB-Medium (37°C)

Vorbereitung:

Am Tag 0 Akku-Rotatoren laden
 HA-Medium herstellen
 AB-Medium herstellen

Am Tag 1 Zentrifuge auf 4°C kühlen
 PBS und MACS-Puffer kalt stellen
 Wanne mit Eis bereitstellen
 MACS-Säulen LS in den Kühlschrank (4-8°C)

Durchführung: Sterile Arbeitsweise an einer Sterilbank

Tag 0

A) PBMC Isolation

(Siehe Protokoll „4.2.1.1 Isolierung von PBMCs aus Vollblut oder Leukapheresat“)

Nach der Isolation maximal 1×10^9 PBMCs für die Anreicherung auf 1×10^7 Zellen/ml einstellen und über Nacht im Brutschank (37°C, 5% CO₂) lagern.

Tag 1

A) Stimulation

Für die Kontrollen je 0,5 ml Zellen aus der Zellkulturflasche in zwei 15-ml-Falcons geben (dabei mit der Pipette leicht am Boden kratzen, um auch adhärenente antigenpräsentierende Zellen in der Kontrolle zu haben).

In eine Kontrolle gibt man 5 µl SEB (Positivkontrolle), in die andere 10 µl MOG (Negativkontrolle). In die Kulturflasche mit den restlichen PBMCs (Target Sample) wird die erforderliche Menge an Antigen pipettiert. Dabei soll die Konzentration jedes einzelnen Peptids 1 µg/ml betragen.

Die PBMCs werden nun für die Stimulation sechs Stunden im Brutschank (37°C, 5% CO₂) inkubiert.

B) Sekretion und Beladung mit Beads (IFN γ -Enrichment Reagent)

Zunächst werden die Zellen des Target Samples mit dem Zellscraper in maximal 25 ml Portionen

in 50-ml-Falcons geerntet. Die Zellkulturflasche mit kaltem PBS nachspülen und die Falcons mit kaltem PBS auf 50 ml auffüllen. Nach der Zentrifugation (300 g, 10 min., 4°C) werden die Zellpellets in ein 50-ml-Falcon gepoolt und mit kaltem PBS aufgefüllt. An dieser Stelle wird ein Aliquot zur Zellzahlbestimmung entnommen. Nun die Kontrollen auf 15 ml mit kaltem PBS auffüllen und zusammen mit dem Target Sample zentrifugieren (300 g, 10 min., 4°C). Nachdem der Überstand komplett abgenommen wurde, das Target Sample in 1 ml und die Kontrollen in 100 µl kaltem PBS resuspendieren. Nach Zugabe des *INF γ Catchmatrix Reagent* (750 µl ins Target Sample, 75 µl zu den Kontrollen) folgt eine 5-minütige Inkubation auf Eis. Die Zellen sollen nun auf maximal 1×10^6 Zellen/ml in warmem HA-Medium eingestellt werden. Dabei ist zu beachten, dass wieder maximal 25 ml Target Sample pro 50-ml-Falcon verteilt werden.

Die anschließende Sekretionsphase erfolgt im Akku Rotator bei slow continuous Rotation im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) für exakt 45 Minuten. Danach werden die Tubes mit kaltem PBS aufgefüllt und bis zu 20 min. auf Eis abgekühlt. Nach dem Stoppen der Sekretionsphase werden die Zellen zentrifugiert (300 g, 10 min., 4°C), das Target Sample in ein Tube gepoolt, mit kaltem MACS-Puffer aufgefüllt und erneut zentrifugiert (300 g, 10 min., 4°C). Nach der Zentrifugation die Überstände komplett abnehmen. Die Kontrollen sind jetzt fertig und können für das Kontroll-FACS (4.2.3.1 Kontroll-FACS nach Isolierung Virus-spezifischer T-Zellen) vorbereitet werden. Das Target Sample wird in 1 ml MACS-Puffer resuspendiert. Davon können 20 µl als Kontrolle vor Isolation für das Kontroll-FACS vorbereitet werden. Der Rest wird nun mit 750 µl Beads (IFN γ Enrichment Reagent) beladen und 15 min. unter gelegentlichem Schwenken auf Eis inkubiert.

C) Anreicherung

Das Target Sample wird mit MACS-Puffer aufgefüllt, zentrifugiert (300 g, 10 min., 4°C) und in 5 ml MACS-Puffer aufgenommen. Es folgt die Isolation über die MACS-Säule LS. Zuerst wird die Säule drei Mal mit MACS-Puffer gewaschen (in ein 50-ml-Falcon „Eluat“). Dann wird das Target Sample auf die Säule gegeben und drei Mal mit 3 ml MACS-Puffer gewaschen (alles in ein 50-ml-Falcon „Negativfraktion“). Jetzt werden 5 ml MACS-Puffer auf die Säule gegeben, die Säule aus dem Magnetfeld über ein 15-ml-Falcon gehalten und die „erste Positivfraktion“ mit dem Stempel aus der Säule gedrückt. Nun wird die Prozedur wiederholt: Eine zweite Säule wird dreimal mit MACS-Puffer gewaschen (in ein 50-ml-Falcon „Eluat“). Dann wird das Target Sample aus dem 15-ml-Falcon „erste Positivfraktion“ auf die Säule gegeben und dreimal mit 3 ml MACS-Puffer gewaschen (alles in das 50-ml-Falcon „Negativfraktion“). Jetzt werden 5 ml MACS-Puffer auf die Säule gegeben, die Säule aus dem Magnetfeld über ein 15-ml-Falcon gehalten und die „zweite Positivfraktion“ mit dem Stempel aus der Säule gedrückt.

Von der Negativfraktion werden 20 µl für das Kontroll-FACS (4.2.3.1 Kontroll-FACS nach Isolierung Virus-spezifischer T-Zellen) abgezweigt. Der Rest wird für die anschließende Expansion der Positivfraktion benötigt.

Die Positivfraktion wird zentrifugiert (300 g, 10 min., 4°C) und in 1 ml MACS-Puffer aufgenommen. Nun wird die Zellzahl bestimmt und 20 µl für das Kontroll-FACS (4.2.3.1 Kontroll-FACS nach Isolierung Virus-spezifischer T-Zellen) entnommen.

D) Kultivierung und Expansion der Virus-spezifischen T-Zellen

Siehe „4.2.2.2 Kultivierung und Expansion der Virus-spezifischen T-Zellen“

4.2.2.1.2 Im Reinraum mit „CliniMACS®“

Die Isolation Virus-spezifischer T-Zellen wurde im GMP-Labor der Universitäts-Kinderklinik Tübingen nach den dort gültigen SOPs etabliert, durchgeführt und ausgewertet.

Kultivierung und Expansion der Virus-spezifischen T-Zellen: Siehe „4.2.2.2 Kultivierung und Expansion der Virus-spezifischen T-Zellen“

4.2.2.1.3 Im Reinraum mit „CliniMACS Prodigy®“

Die Isolation Virus-spezifischer T-Zellen wurde im GMP-Labor der Universitäts-Kinderklinik Tübingen nach den dort gültigen SOPs etabliert, durchgeführt und ausgewertet.

Kultivierung und Expansion der Virus-spezifischen T-Zellen: Siehe „4.2.2.2 Kultivierung und Expansion der Virus-spezifischen T-Zellen“

4.2.2.2 Kultivierung und Expansion der Virus-spezifischen T-Zellen

Verwendete Materialien: PBS
 Medium
 Dynabeads®
 Zytokine (IL-2, IL-7, IL-15)
 Zellkulturflaschen
 96-Well Zellkulturplatte: U-bottom, Greiner bio-one
 Falcon Tubes

Vorbereitung: Beads waschen (siehe zugehöriges Protokoll)
 Medium (37°C)
 PBS (RT)

Durchführung: Sterile Arbeitsweise an einer Sterilbank

A) Expansion ansetzen (Tag 0):

Für die Expansion werden die Zellen der Positivfraktion zentrifugiert (300 g 10 min. RT) und in Medium auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen / ml eingestellt. Die Zellen werden dann in eine 96-Well-Rundbodenplatte ausgesät.

Zu den Zellen der Positivfraktion gibt man in einem Verhältnis von 1:1 gewaschene Dynabeads. Well gut resuspendieren und für 1-2 Stunden in den Brutschrank (37°C; 5% CO₂) stellen. Hintergrund: Die Beads sollen mit den Zellen der Positivfraktion in Kontakt kommen.

Währenddessen werden die Zellen der Negativfraktion zentrifugiert (300g 10 min. RT), in Medium aufgenommen und auf eine Konzentration von 8×10^6 Zellen / ml eingestellt. Nun wird ein Teil der Negativfraktion bestrahlt (=Feederzellen): Zu 2 ml der Negativfraktion (16×10^6 Zellen) werden 6 ml AB-Medium gegeben (d.h. jetzt 8 ml Zellen mit einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml). Diese 8 ml werden jetzt mit 30 Gy bestrahlt.

Der Rest der Negativfraktion kann direkt eingefroren (Aliquots à 8×10^6 Zellen) oder verworfen werden.

Nach Ende der 1-2 Stunden im Brutschrank kann die Positivfraktion mit der bestrahlten Negativfraktion gemischt werden. Dabei kommen 100 Feederzellen (bestrahlte Negativfraktion) auf 1 Zelle der Positivfraktion. Dafür wird die entsprechende Menge Feederzellen in eine Zellkulturflasche der passenden Größe (<10 ml: 25 cm^2 , <40 ml: 75 cm^2 , <90 ml: 175 cm^2) gegeben. Dazu kommt die mit den Beads inkubierte Positivfraktion aus der 96-Well Platte. Die Zellkonzentration der Kultur beträgt nun immer noch ca. 2×10^6 Zellen/ml. Die Zellsuspension wird durch Mediumzugabe auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Als letztes erfolgt die Gabe von Zytokinen: IL-2 50 U/ml; IL-7 10 ng/ml; IL-15 10 ng/ml.

Die Zellen können jetzt zur Expansion in den Brutschrank (37°C ; 5% CO_2) gestellt werden.

B) Expansion über 14 Tage:

Alle 2-3 Tage erfolgt ein halber Mediumwechsel mit Zytokingabe unter Annahme eines kompletten Zytokinverbrauchs in 2-3 Tagen. Die Zellen werden bei jedem halben Mediumwechsel erneut auf ca. 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Langsam expandierende Zellen (Medium auch am Tag 7 kaum orange/gelb gefärbt) können während der Expansionsphase auch in 2×10^6 Zellen / ml eingestellt werden.

Der letzte Mediumwechsel mit Zytokingabe erfolgt mindestens 2 Tage vor der Ernte (also spätestens am Tag 12).

Protokoll für halben Mediumwechsel mit Zytokingabe:

Bestimmung der Zellzahl und Vitalität mittels Trypanblaufärbung in der Neubauer Zählkammer. Berechnung des neuen Volumens für eine Zellkonzentration von ca. 1×10^6 Zellen/ml.

Volumenunterschied = altes Volumen / neues Volumen

Vorgehen wenn Volumenunterschied $> 0,5$: Halber Mediumwechsel

Die Hälfte der Zellsuspension in ein Falcon geben und zentrifugieren (300 g 10 min. RT). Überstand verwerfen und Zellpellet in neuem AB-Medium (so viel, wie für neu ausgerechnetes Volumen fehlt) resuspendieren und in die Zellkulturflasche zurückgeben.

Zytokingabe: IL-2 (50 U/ml); IL-7 (10 ng/ml); IL-15 (10 ng/ml)

Die Zellen können jetzt wieder in den Brutschrank (37°C ; 5% CO_2) gestellt werden.

Vorgehen wenn Volumenunterschied $\leq 0,5$: Mediumzugabe

Fehlende Menge an AB-Medium zu den Zellen in die Zellkulturflasche geben.

Zytokingabe: IL-2 (50 U/ml); IL-7 (10 ng/ml); IL-15 (10 ng/ml)

Die Zellen können jetzt wieder in den Brutschrank (37°C ; 5% CO_2) gestellt werden.

C) Ernte der Expansion am Tag 14:

Am Tag 14 wird die Expansion geerntet. Je nach Plan kann die expandierte Positivfraktion direkt für Analysen verwendet und/oder eingefroren werden.

4.2.3 Charakterisierung der T-Zellen

4.2.3.1 Kontroll-FACS nach Isolierung Virus-spezifischer T-Zellen

Verwendete Materialien:

FACS-Färbung: Zellen für das Kontroll-FACS aus: „4.2.2.1 Isolierung Virus-spezifischer T-Zellen mittels *IFN γ Capture System*“
PBS
FACS-Antikörper:
CD3-APC; CD4-PerCp; CD8-FITC;
IFN γ Detection Antibody-PE (aus CSA-Kit)
FACS-Tubes

Durchführung:

Die in „4.2.2.1 Isolierung Virus-spezifischer T-Zellen mittels *IFN γ Capture System*“ zur Kontrolle abgezwigten Zellen werden in FACS-Tubes gegeben. Zu den Zellen kommen 3 μ l CD3-APC, 5 μ l CD4-PerCp, 5 μ l CD8-FITC und 10 μ l IFN γ Detection Antibody-PE. Es folgt eine Inkubation von 30 min. im Dunkeln bei 4°C. Danach 4 ml PBS pro Tube zugeben, zentrifugieren (300 g 5 min. RT) und den Überstand verwerfen. Die gefärbten Zellen können nun am FACS-Calibur gemessen werden.

4.2.3.2 Oberflächenfärbung mit MHC-I-Streptameren

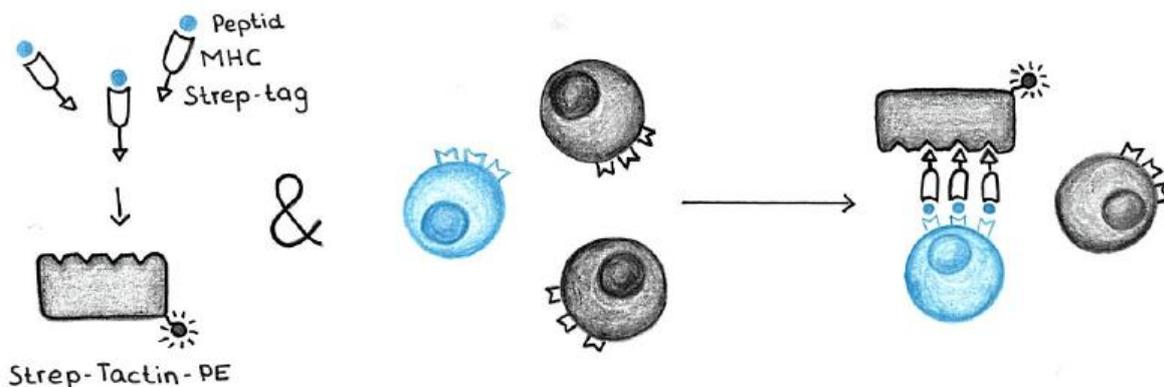


Abbildung 4: Oberflächenfärbung mit MHC-I-Streptameren

Für die Streptamer-Färbung werden mehrere Peptid-beladenen MHC-I-Strep-tag-Monomere an einen Strep-Tactin-PE-Komplex gekoppelt. Diese MHC-I-Streptamere können nun zur Oberflächenfärbung Peptid-spezifischer T-Zellen verwendet werden. Die MHC-I-Streptamer-positiven T-Zellen können anschließend mit dem Durchflusszytometer detektiert werden.

Verwendete Materialien:

Ficoll: Na-heparinisertes Vollblut oder Leukapheresat
PBS (RT)
Ficoll/Paque (RT)

	Medium (37°C)
	50-ml-Falcons
	15-ml-Falcons
Oder Auftauen:	Zellaliquot
	Medium (37°C)
	50-ml-Falcons
	15-ml-Falcons
	Pulmozym (optinal)
FACS-Färbung:	PBS
	Buffer IS (iba)
	Steriles Wasser
	MHC-I-Streptamer
	Strep-Tactin-PE
	FACS-Antikörper:
	CD3-BV510; CD8-FITC; CD56-BV421; (CD45RA-BV711;
	CD62L-PE CF594; CCR7-PE Cy7; PE Cy7-Isotyp)
	eFluor780
	96-Well-Zellkulturplatte: round bottom, with lid, Corning®
	FACS-Tubes, klein
	PFA 1% (optional)

Durchführung:**A) PBMC Isolation**

(Siehe Protokoll „4.2.1.1 Isolierung von PBMCs aus Vollblut oder Leukapheresat“)

Oder Probe auftauen

(Siehe Protokoll „4.2.1.4 Auftauen von Zellen“)

Nach der Vorbereitung der Zellen sollen diese in Medium (TexMACS-Medium; falls die Zellen zuvor in AB-Medium kultiviert wurden, sollte man hier bei AB-Medium bleiben) auf maximal 1×10^7 Zellen/ml einstellen. Je 100 μl (d.h. maximal 1×10^6 Zellen) Zellsuspension pro Well in der 96-Well-Platte aussäen, dabei immer ein Well Abstand lassen und die umliegenden Wells bei längerer Inkubation mit Medium füllen. Die Zellen können im Brutschank (37°C, 5% CO₂) gelagert werden.

B) Färbung

Zuerst wird der Buffer IS 1:10 mit sterilem Wasser verdünnt. Dann können die Streptamere an Strep-Tactin-PE gekoppelt werden: 0,8 μl MHC-I-Streptamer, 8,2 μl Buffer IS und 1,0 μl Strep-Tactin-PE werden für 45 min. im Dunkeln auf Eis inkubiert (0,8 μl MHC-I-Streptamer und 8,2 μl Buffer IS können im Voraus gemischt und als 9 μl Aliquot im -80°C Schrank gelagert werden). In dieser Zeit werden die Zellen vorbereitet. Nachdem die Zellen zentrifugiert (1800 rpm, 5 min., 4°C) und der Überstand abgekippt wurde werden diese in 200 μl Buffer IS resuspendiert und

erneut zentrifugiert (1800 rpm, 5 min., 4°C). Der Überstand wird vollständig abgekippt und das Pellet in den 10 µl gekoppeltem Streptamer resuspendiert. Die Färbung mit den Streptameren soll für 45 min. im Dunkeln auf Eis stattfinden. Nach dieser Zeit werden die Wells mit je 200 µl Buffer IS aufgefüllt und die Platte zentrifugiert (1800 rpm, 5 min., 4°C). Nachdem der Überstand abgekippt ist, werden die restlichen Oberflächenantikörper zu den Zellen pipettiert: 2 µl/Well CD3-BV510, 10 µl/Well CD8-FITC und 5 µl/Well CD56-BV421 (falls gewünscht dazu die Differenzierungsmarker 3,5 µl/Well CD45RA-BV711, 0,2 µl/Well CD62L-PE CF594 und 3,0 µl/Well CCR7-PE Cy7 bzw. den dazugehörigen Isotyp). Danach erfolgt die Zugabe von 0,1 µl/Well eFluor780 und 30 µl/Well Buffer IS als Mastermix. Anschließend wird für 30 min. im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wird die Platte zentrifugiert (1800 rpm, 5 min., 4°C), der Überstand abgekippt, die Pellets in je 200 µl Puffer resuspendiert, erneut zentrifugiert (1800 rpm, 5 min., 4°C) und das Pellet nach dem Abkippen des Überstands in Puffer resuspendiert und in kleine FACS-Tubes überführt. Die gefärbten Zellen können entweder direkt gemessen oder fixiert (Zugabe von 50 µl PFA 1% auf 50 µl Zellen) im Kühlschrank bis zur Messung am LSRII aufbewahrt werden.

4.2.3.3 Intrazelluläres FACS zum Nachweis von IFN γ -Produktion

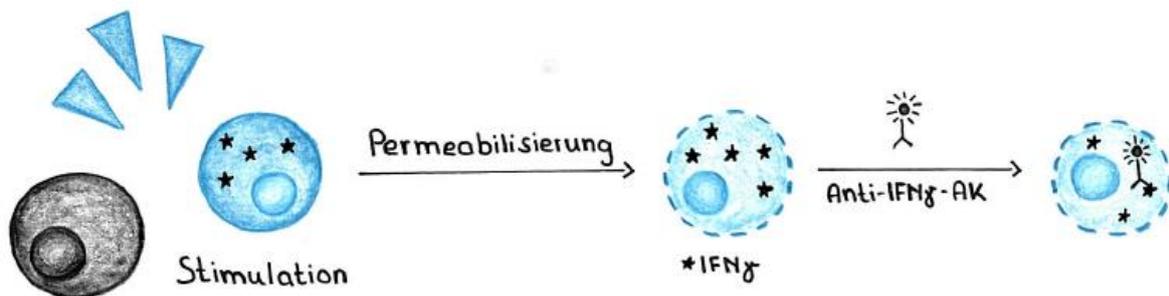


Abbildung 5: Intrazelluläres FACS zum Nachweis von IFN γ -Produktion

Nach der Stimulation mit Antigenen produzieren die dafür spezifischen T-Zellen IFN γ , welches nach einer Permeabilisierung der Zelle intrazellulär mit Anti-IFN γ -Antikörpern markiert werden kann. Anschließend können die IFN γ -positiven T-Zellen mit dem Durchflusszytometer detektiert werden.

Verwendete Materialien:

Ficoll:	Na-heparinisertes Vollblut oder Leukapheresat
	PBS (RT)
	Ficoll/Paque (RT)
	Medium (37°C)
	50-ml-Falcons
	15-ml-Falcons
Oder Auftauen:	Zellaliquot
	Medium (37°C)
	50-ml-Falcons
	15-ml-Falcons
	Pulmozym (optinal)

Stimulation:	SEB MOG Antigene 96-Well-Zellkulturplatte: round bottom, with lid, Corning®
FACS-Färbung	MACS-Puffer (4°C) PBS (4°C) 50-ml-Falcons 15-ml-Falcons FACS Tubes, klein Medium (37°C) FACS-Antikörper: CD3-PE Cy7; CD4-APC H7; CD8-Pacific Blue; (CD56-APC); IFN γ -PE Alexa Fluor 350 Fix und Perm Kit, ADG PFA 1% (optional)
<u>Durchführung:</u>	Sterile Arbeitsweise an einer Sterilbank

A) PBMC Isolation

(Siehe Protokoll „4.2.1.1 Isolierung von PBMCs aus Vollblut oder Leukapheresat“)

Oder Probe auftauen

(Siehe Protokoll „4.2.1.4 Auftauen von Zellen“)

Nach der Vorbereitung der Zellen sollen diese in Medium (TexMACS-Medium; falls die Zellen zuvor in AB-Medium kultiviert wurden, sollte man hier bei AB-Medium bleiben) auf maximal 1×10^7 Zellen/ml einstellen. Je 100 μ l (d.h. maximal 1×10^6 Zellen) Zellsuspension pro Well in der 96-Well-Platte aussäen, dabei immer ein Well Abstand lassen und die umliegenden Wells bei längerer Inkubation mit Medium füllen. An dieser Stelle kann der Versuch unterbrochen und die Zellen können über Nacht im Brutschank (37°C, 5% CO₂) gelagert werden.

B) Stimulation

Die Zugabe der Kontroll-Antigene (SEB und MOG) und der restlichen Antigene zu den PBMCs erfolgt nach Herstellerangaben. Sind keine Herstellerangaben verfügbar, wird pro Peptid 1 μ g/ml eingesetzt. Dabei werden die Antigene für ein Volumen von 150 μ l berechnet, da nach zwei Stunden Inkubation 50 μ l Brefeldin A zugegeben wird. Danach werden die Zellen für die Stimulation zwei Stunden im Brutschank (37°C, 5% CO₂) inkubiert.

Brefeldin A Gabe: Zuerst wird ein Brefeldin A-Mastermix hergestellt. Die Konzentration soll 30 μ g/ml betragen. Von diesem Mastermix wird pro Well 50 μ l (1,5 μ g Brefeldin A) zu den Zellen gegeben. Dabei darauf achten, das Well möglichst wenig zu resuspendieren. Danach werden die Zellen für weitere vier Stunden im Brutschank (37°C, 5% CO₂) inkubiert.

C) FACS-Färbung Ab diesem Schritt kann auch unsteril weiter gearbeitet werden. Nach den insgesamt sechs Stunden Inkubation wird die Platte mit den stimulierten Zellen mit Parafilm umwickelt und im Kühlschrank auf 4°C abgekühlt (Abstoppen der Stimulation). In dieser Zeit können die FACS-Antikörper als Mastermix vorbereitet werden: Je 5 µl/Well von CD3-PE Cy7, CD4-APC H7 und CD8-Pacific Blue, (10 µl/Well CD56-APC) und 75 µl/Well Puffer. Nach einer Zentrifugation der Zellen (1800 rpm, 5 min., 4°C) wird der Überstand abgekippt und die Pellets in je 100 µl Mastermix resuspendiert. Es folgt eine Inkubation von 10 min. im Dunkeln bei RT, in welcher der Alexa Fluor 350-Mastermix vorbereitet wird. Die Stock-Lösung wird mit Puffer so verdünnt, dass die Endkonzentration von AF350 8,4 µg/ml beträgt. Von dieser Lösung werden nach der Inkubation 100 µl/Well zu den Zellen mit den Oberflächenantikörpern pipettiert und das Ganze für weitere 10 min. im Dunkeln bei RT inkubiert. Danach wird zentrifugiert (1800 rpm, 5 min., 4°C), der Überstand abgekippt, die Pellets in je 200 µl Puffer resuspendiert, erneut zentrifugiert (1800 rpm, 5 min., 4°C) und das Pellet nach dem Abkippen des Überstands in 100 µl Reagenz A (Fixierung) resuspendiert. Nach 10 min. Inkubation im Dunkeln bei RT und Zugabe von je 100 µl Puffer/Well wird zentrifugiert (1800 rpm, 5 min., 4°C) und der Überstand abgekippt. Nun erfolgt die Permeabilisierung, indem die Zellen nach Zugabe von 100 µl Reagenz B mit der Pipette manuell lysiert werden (intensives Resuspendieren). Nach Zusatz von 10 µl/Well IFN γ -PE wird für 30 min. im Dunkeln bei RT intrazellulär gefärbt. Danach wird zentrifugiert (1800 rpm, 5 min., 4°C), der Überstand abgekippt, die Pellets in je 200 µl Puffer resuspendiert, erneut zentrifugiert (1800 rpm, 5 min., 4°C) und das Pellet nach dem Abkippen des Überstands in Puffer resuspendiert und in kleine FACS-Tubes überführt. Die gefärbten Zellen können entweder direkt gemessen oder fixiert (Zugabe von 50 µl PFA 1% auf 50 µl Zellen) im Kühlschrank bis zur Messung am LSRII aufbewahrt werden.

4.2.3.4 Intrazelluläres FACS zum Nachweis von IFN γ -, TNF α - und IL-2-Produktion

Verwendete Materialien:

Ficoll:	Na-heparinisertes Vollblut oder Leukapheresat
	PBS (RT)
	Ficoll/Paque (RT)
	Medium (37°C)
	50-ml-Falcons
	15-ml-Falcons
Oder Auftauen:	Zellaliquot
	Medium (37°C)
	50-ml-Falcons
	15-ml-Falcons
	Pulmozym (optional)

Stimulation:	SEB MOG Antigene 96-Well-Zellkulturplatte: round bottom, with lid, Corning®
FACS-Färbung	MACS-Puffer (4°C) PBS (4°C) 50-ml-Falcons 15-ml-Falcons kleine FACS Tubes Medium (37°C) FACS-Antikörper: CD3-PE Cy7; CD4-PerCp; CD8-FITC; CD56-BV711 IFN γ -PE; IL-2-APC; TNF α -BV421 eFluor780 Fix und Perm Kit, ADG PFA 1% (optional)
<u>Durchführung:</u>	Sterile Arbeitsweise an einer Sterilbank

A) PBMC Isolation

(Siehe Protokoll „4.2.1.1 Isolierung von PBMCs aus Vollblut oder Leukapheresat“)

Oder Probe auftauen

(Siehe Protokoll „4.2.1.4 Auftauen von Zellen“)

Nach der Vorbereitung der Zellen sollen diese in Medium (TexMACS-Medium; falls die Zellen zuvor in AB-Medium kultiviert wurden, sollte man hier bei AB-Medium bleiben) auf maximal 1×10^7 Zellen/ml einstellen. Je 100 μ l (d.h. maximal 1×10^6 Zellen) Zellsuspension pro Well in der 96-Well-Platte aussäen, dabei immer ein Well Abstand lassen und die umliegenden Wells bei längerer Inkubation mit Medium füllen. An dieser Stelle kann der Versuch unterbrochen und die Zellen können über Nacht im Brutschank (37°C, 5% CO₂) gelagert werden.

B) Stimulation

Die Zugabe der Kontroll-Antigene (SEB und MOG) und der restlichen Antigene zu den PBMCs erfolgt nach Herstellerangaben. Sind keine Herstellerangaben verfügbar, wird pro Peptid 1 μ g/ml eingesetzt. Dabei werden die Antigene für ein Volumen von 150 μ l berechnet, da nach zwei Stunden Inkubation 50 μ l Brefeldin A zugegeben wird. Danach werden die Zellen für die Stimulation zwei Stunden im Brutschank (37°C, 5% CO₂) inkubiert.

Brefeldin A Gabe: Zuerst wird ein Brefeldin A-Mastermix hergestellt. Die Konzentration soll 30 μ g/ml betragen. Von diesem Mastermix werden pro Well 50 μ l (1,5 μ g Brefeldin A) zu den Zellen gegeben. Dabei darauf achten, das Well möglichst wenig zu resuspendieren. Danach werden die Zellen für weitere vier Stunden im Brutschank (37°C, 5% CO₂) inkubiert.

C) FACS-Färbung

Ab diesem Schritt kann auch unsteril weiter gearbeitet werden. Nach den insgesamt sechs Stunden Inkubation wird die Platte mit den stimulierten Zellen mit Parafilm umwickelt und im Kühlschrank auf 4°C abgekühlt (Abstoppen der Stimulation). In dieser Zeit können die FACS-Antikörper als Mastermix vorbereitet werden: Je 5 µl/Well von CD3-PE Cy7, CD4-PerCp und CD56-BV711, 10 µl/Well CD8-FITC und 75 µl/Well Puffer. Nach einer Zentrifugation der Zellen (1800 rpm, 5 min., 4°C) wird der Überstand abgekippt und die Pellets in je 100 µl Mastermix resuspendiert. Es folgt eine Inkubation von 10 min. im Dunkeln bei RT, in welcher der eFluor780-Mastermix vorbereitet wird. Pro Well sollen 0,2 µl eFluor780 und 100 µl Puffer eingesetzt werden. Nach der Inkubation wird also 100 µl eFluor780-Mastermix/Well zu den Zellen mit den Oberflächenantikörpern pipettiert und das Ganze für weitere 10 min. im Dunkeln bei RT inkubiert. Danach wird zentrifugiert (1800 rpm, 5 min., 4°C), der Überstand abgekippt, die Pellets in je 200 µl Puffer resuspendiert, erneut zentrifugiert (1800 rpm, 5 min., 4°C) und das Pellet nach dem Abkippen des Überstands in 100 µl Reagenz A (Fixierung) resuspendiert. Nach 10 min. Inkubation im Dunkeln bei RT und Zugabe von je 100 µl Puffer/Well wird zentrifugiert (1800 rpm, 5 min., 4°C) und der Überstand abgekippt. Nun erfolgt die Permeabilisierung, indem die Zellen nach Zugabe von 100 µl Reagenz B mit der Pipette manuell lysiert werden (intensives Resuspendieren). Nach Zusatz von 10 µl/Well IFN γ -PE, 20 µl/Well IL-2-APC und 5 µl/Well TNF α -BV421 wird für 30 min. im Dunkeln bei RT intrazellulär gefärbt. Danach wird zentrifugiert (1800 rpm, 5 min., 4°C), der Überstand abgekippt, die Pellets in je 200 µl Puffer resuspendiert, erneut zentrifugiert (1800 rpm, 5 min., 4°C) und das Pellet nach dem Abkippen des Überstands in Puffer resuspendiert und in kleine FACS-Tubes überführt. Die gefärbten Zellen können entweder direkt gemessen oder fixiert (Zugabe von 50 µl PFA 1% auf 50 µl Zellen) im Kühlschrank bis zur Messung am LSRII aufbewahrt werden.

4.2.3.5 CSA-FACS

Verwendete Materialien:

Tag 0 Ficoll:	Na-heparinisertes Vollblut oder Leukapheresat PBS (RT) Ficoll/Paque (RT) AB-Medium (37°C) 50-ml-Falcons 15-ml-Falcons
Tag 1 Stimulation:	SEB MOG Antigene 15-ml-Falcons
Sekretion:	MACS-Puffer (4°C) PBS (4°C) 50-ml-Falcons

15-ml-Falcons
 FACS Tubes
 CSA-Kit
 HA-Medium (37°C)
 Akku-Rotatoren
 AB-Medium (37°C)

FACS-Färbung: FACS-Antikörper.
 CD3-PE Cy7; CD4-APC H7; CD8-Pacific Blue
 IFN γ Detection Antibody-PE aus CSA-Kit
 Alexa Fluor 350
 FACS-Tubes

Vorbereitung:

Am Tag 0 Akku-Rotatoren laden
 HA-Medium herstellen
 AB-Medium herstellen

Am Tag 1 Zentrifuge auf 4°C reservieren
 PBS und MACS-Puffer kalt stellen
 Wanne mit Eis bereitstellen

Durchführung: Sterile Arbeitsweise an einer Sterilbank

Tag 0

A) PBMC Isolation

(Siehe Protokoll „4.2.1.1 Isolierung von PBMCs aus Vollblut oder Leukapheresat“)

Nach der Isolation die PBMCs für die Anreicherung auf 5×10^6 Zellen/ml einstellen, je 500 μ l Zellsuspension pro 15-ml-Falcon ansetzen und über Nacht im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) lagern. Dabei sollten die Falcons im Brutschrank schräg mit angedrehtem Deckel lagern.

Tag 1

A) Stimulation

Die Zugabe der Kontroll-Antigene (SEB und MOG) und der restlichen Antigene zu den PBMCs erfolgt nach Herstellerangaben. Danach werden die Zellen für die Stimulation sechs Stunden im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) inkubiert.

B) Sekretion und FACS-Färbung

Zunächst werden die 15-ml-Falcons mit 10 ml kaltem PBS aufgefüllt, zentrifugiert (300 g, 10 min., RT). Danach wird der Überstand vollständig abgenommen und das Pellet in 100 μ l kaltem PBS resuspendiert. Nun das tatsächliche Volumen im Tube genau bestimmen und das gleiche Volumen *INF γ Catch Reagent* dazugeben. Die Falcons werden nun gevortext und 5 min. auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation gibt man 1 ml HA-Medium pro 1×10^6 Zellen (d.h. 2,5 ml/Tube) in die Falcons, spannt diese in den Akku-Rotator und lässt die Zellen bei slow continuous Rotation exakt 45 min. sekretieren. Dabei sollten die Falcons alle 5 min. zusätzlich von Hand

geschwenkt werden. Währenddessen wird die Alexa Fluor 350-Färbelösung vorbereitet: 1µl/ml Lösung in kaltem PBS. Nach der Sekretionsphase werden pro Tube 2,5 ml kalte Färbelösung zugesetzt, sofort gemischt und 10 min. im Dunkeln auf Eis inkubiert. In dieser Zeit können die FACS-Antikörper vorbereitet werden: Je 5 µl/Tube von CD3-PE Cy7, CD4-APC H7 und CD8-Pacific Blue. Nach einer Zentrifugation der Zellen (300 g, 10 min., RT) wird der Überstand abgenommen, das Pellet in 100 µl PBS resuspendiert und die Zellen werden zusammen mit den vorbereiteten Antikörpern in FACS-Tubes überführt. Dazu gibt man 20 µl IFN γ Detection Antibody-PE/Tube (außer in die FMO-Kontrolle) und inkubiert ein weiteres Mal 10 min. im Dunkeln auf Eis. Nach zweimaligem Waschen mit je 4 ml PBS können die Zellen am LSR II gemessen werden.

5 Ergebnisse

5.1 Nachweis IFN γ -produzierender T-Zellen aus gesunden Spendern nach Stimulation mit viralen Antigenen

Da sich diese Arbeit mit der Isolation Virus-spezifischer T-Zellen, basierend auf ihrer Fähigkeit, nach Stimulation mit viralen Antigenen IFN γ zu produzieren, beschäftigt, war es zunächst wichtig zu untersuchen, ob die in unserem Setting verwendeten Antigene in der Lage sind, eine solche IFN γ -Produktion der Spender-T-Zellen zu induzieren. Als Screening-Methode wurde das intrazelluläre FACS zum Nachweis von IFN γ -Produktion gewählt. Diese Methode kommt der späteren Isolationsmethode, dem *IFN γ Capture System*, sehr nahe. Hier wird zwar nicht die sezernierte, jedoch die intrazellulär produzierte Menge an IFN γ gemessen. Um des Weiteren möglichst nahe am späteren Setting zu bleiben, wurde das intrazelluläre FACS nach der Isolierung von Spender-PBMCs direkt *ex vivo* nach 6 Stunden Antigen-Stimulation durchgeführt. Dies führt dazu, dass man im intrazellulären FACS je nach Immunogenität des Antigens nur eine relativ niedrige IFN γ -Produktion sieht. In allen folgenden Experimenten wurde eine Immunantwort auf das entsprechende Antigen daher in zwei Kategorien eingeteilt: Die Bezeichnung „Positiv“ für alle IFN γ -Frequenzen, die mehr als doppelt so hoch wie die der Negativkontrolle sind, und „(Positiv)“ für alle IFN γ -Frequenzen, die höher, jedoch nicht doppelt so hoch wie die der Negativkontrolle sind. Außerdem wird ein positives Ergebnis nur dann als auswertbar eingestuft, wenn mindestens 10 Zellen pro Messung IFN γ produzieren.

Für die Isolierung Virus-spezifischer T-Zellen mittels *IFN γ Capture System* im GMP-zertifizierten Reinraumlabor zur Anwendung im Patienten dürfen nur GMP-zertifizierte Antigene verwendet werden. Zu Beginn dieser Arbeit standen hierzu die folgenden fünf viralen Antigene in Form von Peptid-Pools (PepTivator; Firma Miltenyi) zur Verfügung: AdV Hexon; EBV EBNA1, EBV LMP2a, EBV BZLF1 und CMV pp65. Diese fünf Peptid-Pools waren für die Vortestungen auch in Research-Qualität verfügbar. Die in dieser Arbeit verwendeten PepTivatoren der Firma Miltenyi bestehen aus lyophilisierten 15-mer-Peptiden welche mit 11 Aminosäuren Überlappung das gesamte Protein umspannen und sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen stimulieren können. Die Verwendung von Peptid-Pools löst im Vergleich zu ganzen Proteinen bereits nach 6 Stunden einen detektierbaren Anstieg der IFN γ -Produktion aus. Dies liegt vermutlich daran, dass die einzelnen Peptide im Gegensatz zu ganzen Proteinen, welche vor der Präsentation über MHC-Moleküle zunächst prozessiert werden müssen, zumindest teilweise über direkte Bindung an externalisierte MHC-Moleküle präsentiert werden können.

Im Folgenden soll zunächst geklärt werden, ob es mit den ausgewählten Antigenen möglich ist, bei gesunden Spendern eine detektierbare IFN γ -Produktion auszulösen (Abbildung 6) und ob es ebenso möglich ist, für die Stimulation der Spender-PBMCs alle fünf Antigene auf einmal zuzugeben, oder ob dies zu einer zu starken Reduktion der IFN γ -Produktion durch zum Beispiel auftretende Antigen-Kompetition führt.

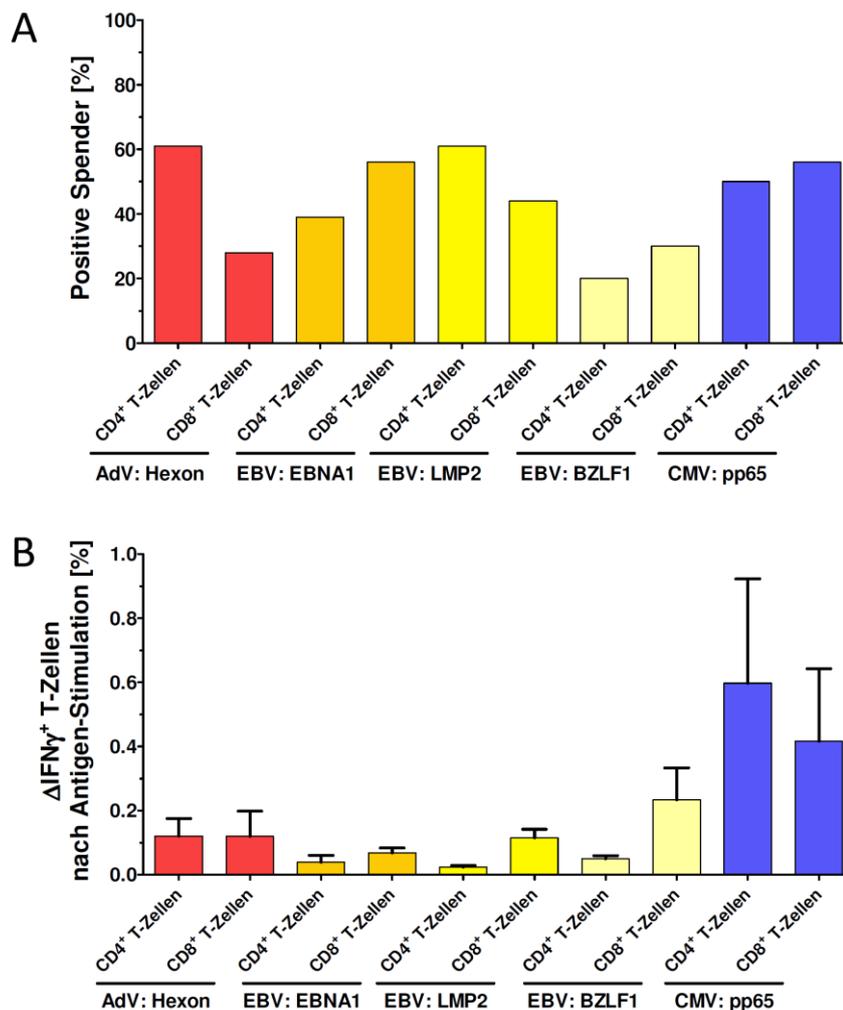


Abbildung 6: Screening gesunder Spender auf IFN γ -produzierende T-Zellen nach Antigen-Stimulation

Nach der Isolierung von PBMCs aus Vollblut oder Leukapheresat von gesunden Spendern wurde ein intrazelluläres FACS zum Nachweis von IFN γ -Produktion nach Antigen-Stimulation durchgeführt. (A) Anteil positiver Spender im Screening (n=18; BZLF1: n=10). (B) Frequenz IFN γ -produzierender CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nach Antigen-Stimulation (n=18; BZLF1: n=10). Δ IFN γ ⁺ T-Zellen: Die Negativkontrolle wurde bereits abgezogen. Die Werte von Nonrespondern (Δ IFN γ ⁺ T-Zellen ≤ 0) sind in dieser Grafik nicht enthalten. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aller Messungen für die jeweiligen Antigene. Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM (Standardfehler des Mittelwerts).

Für das Screening gesunder Spender wurden aus deren Vollblut bzw. Leukapheresat PBMCs isoliert und entweder zwischenzeitlich eingefroren oder direkt verwendet. Nachfolgend wurde nach 6-stündiger Stimulationsphase mit viralen Antigenen (Peptid-Pools) die Antigen-spezifische Produktion von IFN γ der Spender-T-Zellen im intrazellulären FACS durchflusszytometrisch ermittelt. Dabei wurden für die Stimulation die viralen Antigene jeweils einzeln zugegeben, um zu ermitteln, gegen welche Antigene der Spender eine spezifische Immunantwort zeigt. Um jedoch auch die zu erwartende Effektivität der simultanen Isolation mit allen Antigenen zusammen abschätzen zu können, wurde ein Teil der PBMCs mit einem Antigen-Mix aus allen fünf Antigenen stimuliert.

In Abbildung 6 sind die Ergebnisse von 18 gesunden Spendern (BZLF1: n=10) zusammengefasst. Abbildung 6A illustriert, wie viele Spender eine Immunantwort gegen die einzelnen Antigene gezeigt haben. Dabei reichte die Frequenz der positiven Antworten im Fall der CD4⁺ T-Zellen von 20% (BZLF1) bis 61% (Hexon und LMP2a). Bei den CD8⁺ T-Zellen reagierten 28% (Hexon) bis 56% (EBNA1 und pp65) der Spender auf das getestete Antigen. Zusammengefasst war also prinzipiell gegen alle fünf Antigene sowohl eine CD4⁺- als auch eine CD8⁺-vermittelte Immunantwort auslösbar. In dem hier getesteten Spender-Kollektiv sind gegen Hexon und LMP2a öfter CD4⁺ T-Zell-Antworten, gegen EBNA1, BZLF1 und pp65 häufiger CD8⁺ T-Zell-Antworten detektiert worden. Unter den drei EBV-spezifischen Antigenen zeigten im Vergleich zu den beiden latenten Antigenen EBNA1 und LMP2a weniger Spender eine IFN γ -Produktion nach Stimulation mit dem lytischen Antigen BZLF1 (CD4⁺ T-Zellen: 20%; CD8⁺ T-Zellen: 30%). Allerdings war hier die Zahl der untersuchten Spender auch geringer als bei den anderen vier Antigenen.

In Abbildung 6B sind die Frequenzen IFN γ -produzierender CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nach Stimulation mit den fünf Antigenen zu sehen. Dabei dominierte unter den drei EBV-Antigenen EBNA1, LMP2a und BZLF1 die CD8⁺ T-Zellvermittelte Immunantwort, unter den pp65-spezifischen T-Zellen die CD4⁺ T-Zellvermittelte Immunantwort und bei den Hexon-spezifischen T-Zellen war kein nennenswerter Unterschied zu erkennen. Insgesamt waren nach Stimulation mit dem CMV-Antigen pp65 im Mittel deutlich höhere Frequenzen IFN γ -produzierender T-Zellen detektierbar als bei den anderen Antigenen. Dies warf die Frage auf, ob ein immundominanteres Antigen wie pp65 eine simultane Isolation von Virus-spezifischen T-Zellen gegen mehrere Antigene durch seine stärkere Präsenz behindern kann, worauf in dieser Arbeit im weiteren Verlauf auch eingegangen wird (siehe hierzu insbesondere Abbildung 16).

In Abbildung 7 ist dargestellt, ob die Fähigkeit der T-Zellen zur Produktion von IFN γ durch eine simultane Stimulation mit allen fünf Antigenen durch eine eventuell auftretende Konkurrenz unter den Antigenen bzw. einer Überladung an Antigenen eingeschränkt wird. Hierfür wurden die Frequenzen IFN γ -produzierender T-Zellen nach separater Stimulation mit den einzelnen Antigenen summiert und den Frequenzen IFN γ -produzierender T-Zellen nach simultaner Stimulation mit dem Mix aus allen fünf Antigenen gegenübergestellt. Dabei war im Fall der CD4⁺ T-Zellen die Fähigkeit der IFN γ -Produktion nach Stimulation mit dem Antigen-Mix im Mittel zwar leicht eingeschränkt, zeigte jedoch in der statistischen Auswertung keine Signifikanz (Abbildung 7A). Bei den CD8⁺ T-Zellen war eine etwas deutlichere Abnahme der produzierten Menge an IFN γ nach Stimulation mit dem Antigen-Mix zu sehen. Hier zeigte sich auch eine geringe Signifikanz ($P=0,0289$) im Unterschied der Frequenzen IFN γ -produzierender CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 7B). Die leichte Abnahme der IFN γ -Produktion wurde jedoch als tolerierbar eingestuft, da die Frequenz nach Stimulation mit dem Mix aus fünf Antigenen immer noch deutlich über der nach Stimulation mit den einzelnen Antigenen liegt und eine Isolierung Antigen-spezifischer T-Zellen mittels *IFN γ Capture System* auch bei niedrigeren Frequenzen prinzipiell möglich ist.

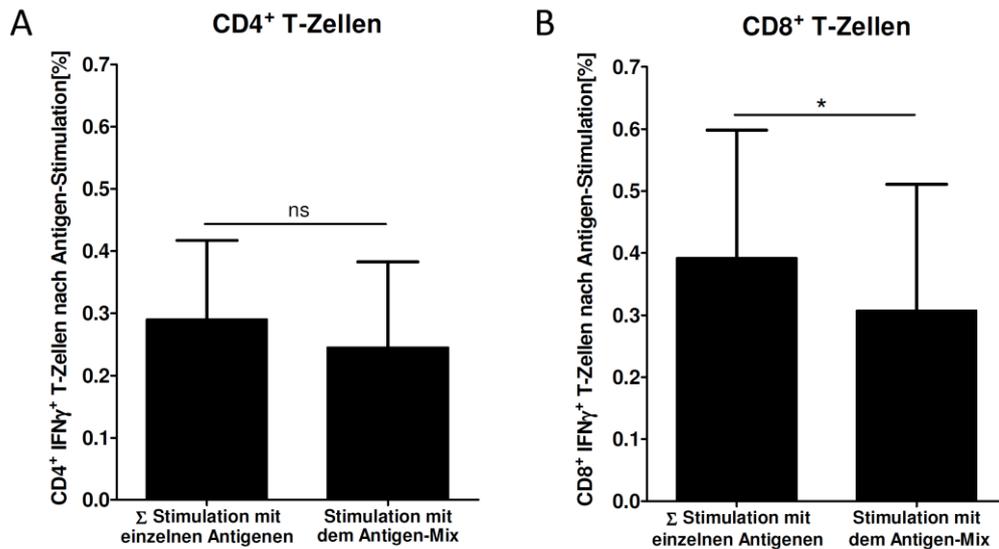


Abbildung 7: Vergleich der Frequenz IFN γ -produzierender CD4⁺ (A) und CD8⁺ (B) T-Zellen nach Stimulation mit einzelnen Antigenen und mit einem Mix aus verschiedenen Antigenen

Nach der Isolierung von PBMCs aus Vollblut oder Leukapheresat von gesunden Spendern (n=11) wurde ein intrazelluläres FACS zum Nachweis von IFN γ -Produktion nach Antigen-Stimulation durchgeführt. Dabei wurden die Proben sowohl separat mit den einzelnen Antigenen (Hexon, EBNA1, LMP2a, BZLF1 und pp65) als auch mit allen Antigenen im Mix stimuliert. Für die Grafik wurden die Frequenzen IFN γ -produzierender CD4⁺ (A) und CD8⁺ (B) T-Zellen nach Stimulation mit einzelnen Antigenen addiert und im Vergleich zu der Frequenz IFN γ -produzierender CD4⁺ (A) und CD8⁺ (B) T-Zellen nach Stimulation mit dem Antigen-Mix dargestellt. In der Grafik finden sich jeweils die Mittelwerte aller Messungen. Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM (Standardfehler des Mittelwerts). Für die statistische Analyse wurde der gepaarte t-Test durchgeführt: CD4⁺ T-Zellen (A) $P=0,0616$ (ns) und CD8⁺ T-Zellen (B) $P=0,0289$ (*).

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass alle fünf Antigene bei gesunden Spendern eine IFN γ -basierte Immunantwort von sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen auslösen können (Abbildung 6A). Dabei fiel die Frequenz der IFN γ -Produktion nach Stimulation mit dem CMV-Antigen pp65 am höchsten aus (Abbildung 6B). Die geringe Abnahme der Frequenz IFN γ -produzierender CD8⁺ T-Zellen nach Stimulation mit dem Antigen-Mix im Verhältnis zur separaten Stimulation mit den einzelnen Antigenen wurde als tolerierbar eingestuft (Abbildung 7). Auf die auftretende Frage nach einer möglichen Beeinflussung einer simultanen Isolation Antigen-spezifischer T-Zellen durch dominantere Antigene, wie zum Beispiel pp65, wird in dieser Arbeit im weiteren Verlauf eingegangen (siehe hierzu insbesondere Abbildung 16).

5.2 Die IFN γ -Produktion während des Protokolls zur Isolierung Virus-spezifischer T-Zellen ist reversibel

Um die Sicherheit und Verträglichkeit Antigen-spezifischer T-Zellen zur Anwendung im Patienten zu gewährleisten, muss unter anderem sichergestellt sein, dass die isolierten T-Zellen zum Zeitpunkt der Applikation auf keinen Fall durch anhaltende Produktion von IFN γ eine überschießende Zytokinproduktion (sogenannter „Zytokinsturm“) im Patienten auslösen können. Um daher den Verlauf der IFN γ -Produktion der T-Zellen während des Protokolls zur Isolierung Virus-spezifischer T-Zellen mittels *IFN γ Capture System* zu verfolgen, wurde folgender Versuch gewählt: Bei der Durchführung eines CSA-FACS wurde das *IFN γ Catch Reagent* einmal, wie normal üblich, vor der Sekretionsphase zugegeben, um die IFN γ -Produktion während der Isolationsphase zu detektieren. Bei einer separaten Probe wurde das *IFN γ Catch Reagent* jedoch erst nach der Sekretion und Abkühlungsphase dazugegeben. Da im letzteren Setting im Vergleich zur Negativkontrolle keine IFN γ -Produktion mehr detektierbar war, kann davon ausgegangen werden, dass die Antigen-spezifischen T-Zellen im Patienten ohne weitere spezifische Aktivierung keinen Zytokinsturm auslösen (Abbildung 8).

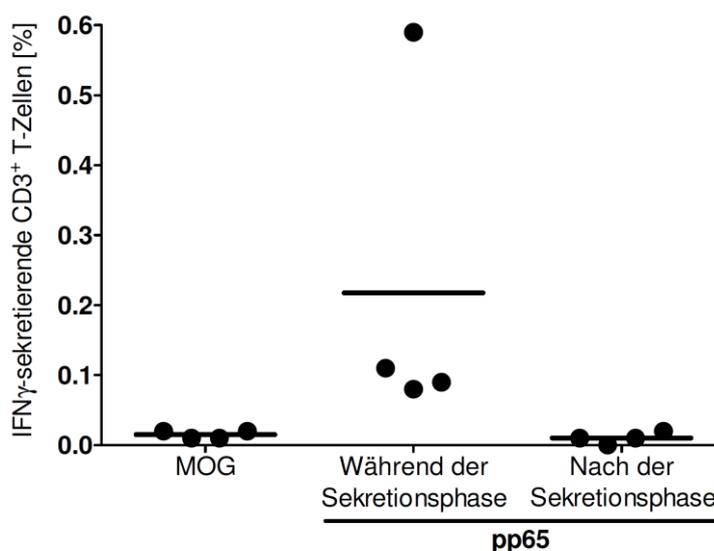


Abbildung 8: Reversible IFN γ -Produktion der T-Zellen während des Protokolls zur Isolierung Virus-spezifischer T-Zellen mittels *IFN γ Capture System*

Nach der Isolierung von PBMCs aus Vollblut oder Leukapheresat von gesunden Spendern (n=4) wurde ein CSA-FACS durchgeführt. Die Stimulation der Proben erfolgte entweder mit der Negativkontrolle (MOG) oder dem pp65-Antigen. Durch Zugabe des *IFN γ Catch Reagent* vor bzw. nach der Sekretionsphase wurde die IFN γ -Produktion der T-Zellen während des Protokolls verfolgt. In der Grafik sind sowohl die einzelnen Werte (Punkte) als auch die Mittelwerte (Linie) dargestellt (Publiziert in Feucht J. *et al.* 2014¹²⁹).

5.3 Isolierung Virus-spezifischer T-Zellen

Für die simultane Isolierung Virus-spezifischer T-Zellen gegen mehrere Antigene musste zunächst ein Protokoll gefunden werden, mit dem man den Erfolg der Anreicherung jeder einzelnen Spezifität überprüfen kann. Bei dem Protokoll zur Isolierung Antigen-spezifischer T-Zellen mittels IFN γ Capture System kann direkt nach der Anreicherung nur analysiert werden, wie hoch der Anteil isolierter IFN γ -produzierender CD4 $^{+}$ und CD8 $^{+}$ T-Zellen in der Positivfraktion ist. Dies gibt Aufschluss über die Reinheit der Isolierung bezogen auf den Gesamtanteil Virus-spezifischer T-Zellen, unspezifisch angereicherter IFN γ -negativer CD3 $^{+}$ T-Zellen und CD3-negativer Zellen, liefert jedoch keine Aussage über die Verteilung der einzelnen Spezifitäten im Produkt. Dass dieser Nachweis nicht direkt im Anschluss an die Isolierung durchgeführt werden kann, liegt vor allem an der geringen Zellzahl der Positivfraktion, die zudem bei der klinischen Anwendung zum größtmöglichen Anteil dem Patienten zur Verfügung gestellt werden sollte. Aus diesem Grund wurde ein Protokoll entwickelt, mit dem ein kleiner Teil der Positivfraktion nach der Isolierung über 14 Tage expandiert werden kann (Abbildung 9). Die 14-tägige Expansion der Positivfraktion erfolgte dabei unter Zugabe von bestrahlten autologen PBMCs der Negativfraktion („Feeder Zellen“) im Verhältnis 100:1 zur Positivfraktion, anti-CD3/CD28-Beads (Dynabeads®; Firma Invitrogen) im Verhältnis 1:1, IL-2 (50 U/ml), IL-7 (10 ng/ml) und IL-15 (10 ng/ml). Nach der Expansion wurden die Zellen entweder zur späteren Analyse kryokonserviert oder direkt untersucht. Als Standardprotokoll zur Analyse der expandierten Positivfraktion wurde wie beim Screening das intrazelluläre FACS zum Nachweis

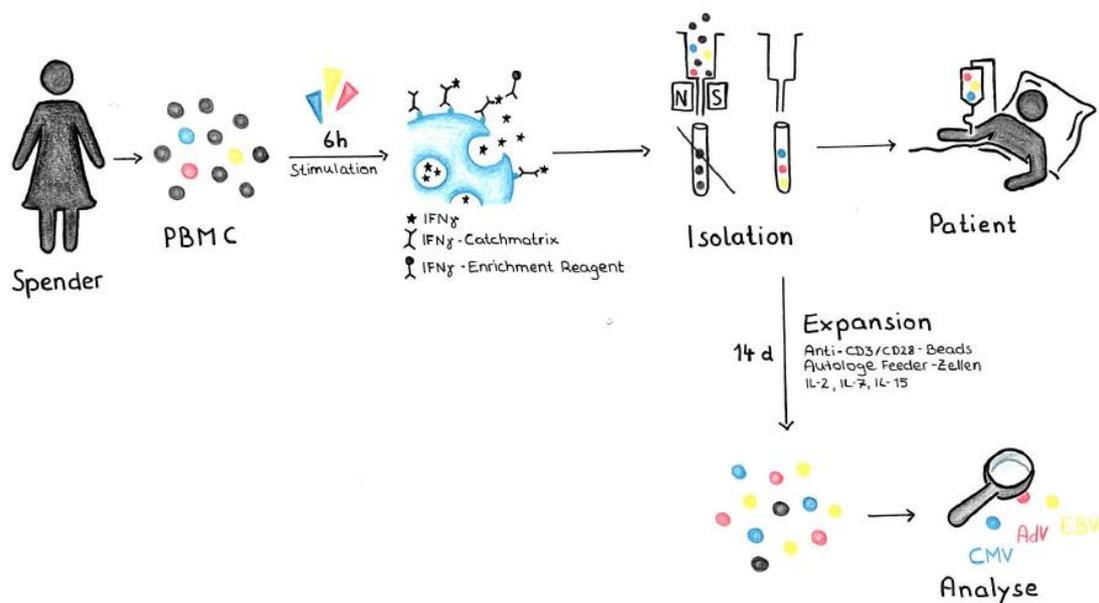


Abbildung 9: Gewinnung, Expansion und Analyse Virus-spezifischer T-Zellen

Nach der Stimulation von Spender-PBMCs mit viralen Antigenen werden die Virus-spezifischen T-Zellen mittels CSA und magnetischer Anreicherung isoliert. Der Großteil Virus-spezifischer T-Zellen kann direkt für den adoptiven T-Zelltransfer verwendet werden. Ein kleiner Teil der Positivfraktion wird für ausführlichere Analysen über 14 Tage mit autologen „Feeder-Zellen“ (bestrahlte Negativfraktion), Anti-CD3/CD28-Beads und Zytokinen (IL-2, IL-7 und IL-15) expandiert.

von IFN γ gewählt. Waren nach der Expansion ausreichend Zellen vorhanden, konnten zusätzliche Analysen bezüglich Funktionalität, Polyfunktionalität und Epitopspezifität der expandierten Positivfraktion durchgeführt werden.

5.3.1 Isolierung Virus-spezifischer T-Zellen im Labormaßstab

Vor der ersten simultanen Anreicherung Virus-spezifischer T-Zellen gegen mehrere Antigene im GMP-Reinraumlabor sollte die prinzipielle Durchführbarkeit der geplanten Isolierungsmethode im normalen Forschungslabor getestet werden. Dafür wurde aus den zuvor gescreenten möglichen gesunden Spendern ein Spender ausgewählt, der eine IFN γ -vermittelte Immunantwort gegen alle drei Viren aufweist. Die Ergebnisse aus diesem Testlauf sind in Abbildung 10 aufgezeigt.

Im Screening zeigten sowohl die CD4⁺ also auch die CD8⁺ T-Zellen des ausgewählten Spenders eine IFN γ -Produktion nach Stimulation mit dem AdV-Antigen Hexon, dem EBV-Antigen LMP2a und dem CMV-Antigen pp65. Auch die Stimulation mit dem Antigen-Mix induzierte eine ausreichend hohe IFN γ -Produktion. Gegen das EBV-Antigen EBNA1 war keine IFN γ -Produktion detektierbar (Abbildung 10A). Da jedoch eine positive Antwort gegen je einen der drei Viren vorhanden war, konnte dieser Spender für einen Testlauf verwendet werden. In Abbildung 10D wird deutlich, dass die IFN γ -produzierenden T-Zellen in ihrer relativen Frequenz zueinander unterschiedlich stark vertreten waren und das CMV-Antigen pp65 im Vergleich zu Hexon und LMP2a dominierte. Da sich diese Arbeit auch mit dem Einfluss unterschiedlich dominant vertretener Immunantworten gegen die einzelnen Antigene auf die Durchführbarkeit einer simultanen Isolierung Antigen-spezifischer T-Zellen befasst, macht dieser Umstand den ausgewählten Spender zu einem gut geeigneten Spender für einen Testlauf im Labormaßstab.

Für die simultane Isolierung Antigen-spezifischer T-Zellen wurden am ersten Tag die Spender-PBMCs aus 200 ml Vollblut isoliert und über Nacht im Brutschrank gelagert. Am nächsten Tag folgten die Stimulation mit einem Mix aus Hexon, EBNA1, LMP2a und pp65 und die Isolierung IFN γ -produzierender T-Zellen mittels *IFN γ Capture System* über magnetische Anreicherung. In der dabei erhaltenen Positivfraktion waren 94% der CD3⁺ T-Zellen IFN γ -positiv. Bei der anschließenden Expansion der Positivfraktion konnte eine 21-fache Expansionsrate erzielt werden (Abbildung 10C). In der Analyse der expandierten Positivfraktion mittels intrazellulärem FACS zum Nachweis von IFN γ waren wie beim Screening Hexon-, LMP2a- und pp65-spezifische CD4⁺ T-Zellen nachweisbar. Unter den CD8⁺ T-Zellen fanden sich Hexon- und pp65-spezifische T-Zellen. Die beim Screening nur sehr schwach vertretenen LMP2a-spezifischen CD8⁺ T-Zellen waren in dieser Analyse leider nicht mehr detektierbar. Wie schon beim Screening waren auch in der isolierten und expandierten Positivfraktion keine EBNA1-spezifischen T-Zellen nachzuweisen (Abbildung 10B). In Abbildung 10D ist dargestellt, wie sich die relativen Frequenzen der einzelnen Spezifitäten vor und nach der Anreicherung zueinander verhalten. Sowohl bei den CD4⁺ als auch den CD8⁺ T-Zellen dominierten beim Screening des

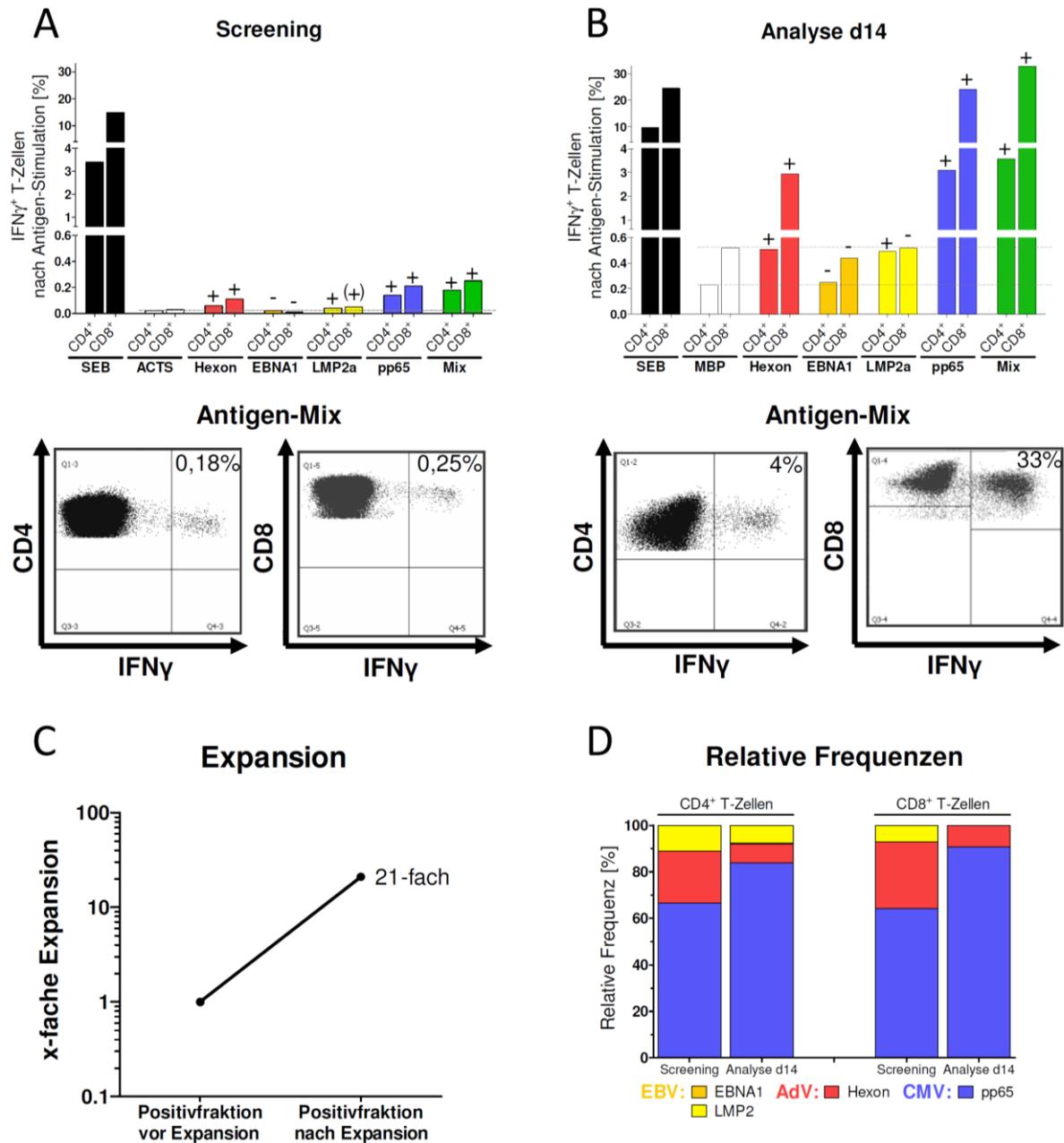


Abbildung 10: Zusammenfassung der Gewinnung Virus-spezifischer T-Zellen im Labormaßstab

(A) Screening des gesunden Spenders. Nach der Isolierung von PBMCs aus Vollblut des Spenders wurde ein intrazelluläres FACS zum Nachweis von IFN γ -Produktion nach Antigen-Stimulation durchgeführt. Dargestellt sind die Frequenzen IFN γ -produzierender T-Zellen nach Stimulation mit den verschiedenen Antigenen, der Negativkontrolle (ACTS) und der Positivkontrolle (SEB). Darunter die dazugehörigen FACS-Plots nach Stimulation mit dem Mix der einzelnen Antigene. (B) Analyse der expandierten Positivfraktion an Tag 14. Nach der 14-tägigen Kultivierung und Expansion der Virus-spezifischen T-Zellen wurde ein intrazelluläres FACS zum Nachweis von IFN γ -Produktion nach Antigen-Stimulation durchgeführt. Dargestellt sind die Frequenzen IFN γ -produzierender T-Zellen nach Stimulation mit den verschiedenen Antigenen, der Negativkontrolle (MBP) und der Positivkontrolle (SEB). Darunter die dazugehörigen FACS-Plots nach Stimulation mit dem Mix der einzelnen Antigene. Kennzeichnung über den Balken in (A) und (B): „-“: Frequenz gleich hoch oder niedriger als die der Negativkontrolle; „(+)-“: Frequenz höher, jedoch nicht doppelt so hoch wie die der Negativkontrolle; „+“: Frequenz doppelt so hoch wie die der Negativkontrolle. (C) Ergebnis der Kultivierung und Expansion der isolierten Virus-spezifischen T-Zellen. (D) Vergleich der relativen Frequenzen Antigen-spezifischer T-Zellen vor und nach Isolation und Expansion über 14 Tage. Für die Darstellung wurden die Ergebnisse aus (A) und (B) verwendet, wobei die Negativkontrollen jeweils von den entsprechenden Werten abgezogen wurden.

Spenders die pp65-spezifischen T-Zellen. Diese Dominanz war nach der Isolierung und Expansion sogar noch etwas deutlicher ausgeprägt. Die relativen Frequenzen aller drei Spezifitäten waren nach der Isolation und Expansion leicht verschoben, bildeten jedoch kein grundlegend anderes Muster.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass eine simultane Isolierung Virus-spezifischer T-Zellen gegen mehrere Antigene prinzipiell möglich ist. Die Anreicherung der weniger stark vertretenen Spezifitäten war zumindest bei den CD4⁺ T-Zellen trotz der deutlichen Dominanz einer einzelnen Spezifität (hier pp65) erfolgreich. Inwieweit das Fehlen LMP2a-spezifischer CD8⁺ T-Zellen in der expandierten Positivfraktion durch die stärkere Präsenz pp65-spezifischer T-Zellen direkt beeinflusst wurde, kann in diesem einen Experiment nicht abschließend beantwortet werden.

5.3.2 Isolierung Virus-spezifischer T-Zellen im GMP-Reinraum

Die simultane Isolierung Virus-spezifischer T-Zellen gegen verschiedene Antigene im GMP-zertifizierten Reinraumlabor der Universitäts-Kinderklinik Tübingen wurde für die Patienten von GMP-Reinraum-Fachkräften nach den dort gültigen SOPs etabliert, durchgeführt und ausgewertet. Für die magnetische Isolation standen das CliniMACS® und später auch das CliniMACS Prodigy® System der Firma Miltenyi zur Verfügung. Insgesamt wurden sieben Anreicherungen im GMP-Reinraumlabor durchgeführt, deren Isolationsergebnisse für diese Arbeit zur Verfügung gestellt wurden. Dabei wurde fünfmal auf Hexon, EBNA1, LMP2a, BZLF1 und pp65 angereichert. Einmal gegen Hexon, EBNA1 und pp65 und von Spender 3 konnte zusätzlich eine Isolation gegen die drei EBV-Antigene EBNA1, LMP2a und BZLF1 durchgeführt werden (Tabelle 6).

Tabelle 6: Spezifitäten der Isolationen im GMP-Labor

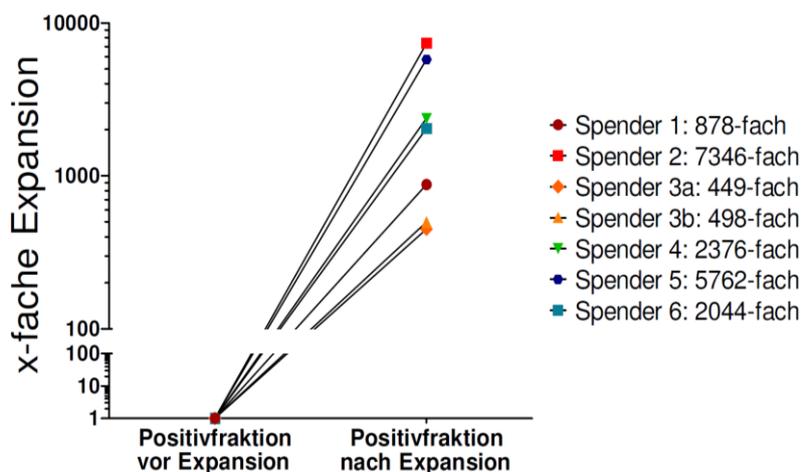
Spender	Spezifität	Isolationmethode
Spender 1	Hexon, EBNA1, pp65	CliniMACS®
Spender 2	Hexon, EBNA1, LMP2a, BZLF1, pp65	CliniMACS®
Spender 3a	EBNA1, LMP2a, BZLF1	CliniMACS®
Spender 3b	Hexon, EBNA1, LMP2a, BZLF1, pp65	CliniMACS®
Spender 4	Hexon, EBNA1, LMP2a, BZLF1, pp65	CliniMACS Prodigy®
Spender 5	Hexon, EBNA1, LMP2a, BZLF1, pp65	CliniMACS Prodigy®
Spender 6	Hexon, EBNA1, LMP2a, BZLF1, pp65	CliniMACS Prodigy®

Tabelle 7 gibt eine Übersicht über die bei der Isolierung Virus-spezifischer T-Zellen eingesetzten Ausgangszellzahlen, der Zellzahl der erhaltenen Positivfraktion, der Zellzahlen vor und nach der 14-tägigen Expansion der angereicherten Virus-spezifischen T-Zellen sowie der daraus resultierenden Expansionsraten. Dabei fällt auf, dass die Expansionsraten der beiden Anreicherungen bei Spender 3 mit einer 449- und 498-fachen Expansion sehr dicht beieinander liegen. Da eine wiederholte Isolation jedoch nur in diesem einen Fall durchgeführt wurde, kann hieraus alleine noch keine Aussage über eine Spenderabhängigkeit in der Expansionsrate getroffen werden. In Abbildung 11 sind die Expansionsraten der einzelnen Anreicherungen noch einmal grafisch zusammengefasst.

Tabelle 7: Zellzahlen im Verlauf des Protokolls

Die Ausgangszellzahl steht für die bei der Isolierung eingesetzte Zahl der Spender-PBMCs, die Zellzahl vor Expansion für den zur Expansion eingesetzten Teil der Positivfraktion und die Zellzahl nach Expansion für die Gesamtzellzahl nach Ende der 14-tägigen Expansion. Die Bestimmung der Zellzahl und Vitalität wurden mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer durchgeführt. MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung.

Spender	Ausgangszellzahl	Zellzahl Positivfraktion	Zellzahl vor Expansion	Zellzahl nach Expansion	Expansionsrate
Spender 1	1×10^9	570.000	5×10^4	4.388×10^4	878-fach
Spender 2	1×10^9	2.260.000	5×10^4	36.730×10^4	7367-fach
Spender 3a	1×10^9	810.000	$4,86 \times 10^4$	2.180×10^4	449-fach
3b	$1,1 \times 10^9$	500.000	5×10^4	2.490×10^4	498-fach
Spender 4	1×10^9	1.550.000	5×10^4	11.880×10^4	2376-fach
Spender 5	1×10^9	287.000	5×10^4	28.810×10^4	5762-fach
Spender 6	1×10^9	1.758.000	5×10^4	10.220×10^4	2044-fach
MW	$1,0143 \times 10^9$	1.105.000	$4,98 \times 10^4$	13.814×10^4	2767,71-fach
SD	37.796.447	749.094	529	136.571.878	2735
Median	1×10^9	810.000	5×10^4	10.220×10^4	2044-fach
Min.	1×10^9	287.000	$4,86 \times 10^4$	2.180×10^4	449-fach
Max.	$1,1 \times 10^9$	2.260.000	5×10^4	36.730×10^4	7367-fach

**Abbildung 11: Übersicht über die Expansion der Positivfraktionen**

Nach der Isolation und 14-tägigen Expansion der Virus-spezifischen T-Zellen wurde aus der Zellzahl der zur Expansion eingesetzten Positivfraktion und der Zellzahl nach Kultivierung und Expansion über 14 Tage die Expansionsrate bestimmt.

Ein möglicher Parameter zur Beurteilung der Isolation und Expansion Virus-spezifischer T-Zellen ist die Erfassung der Frequenzen von T-Zellen im Verlauf des Protokolls. Dazu liefert Tabelle 8 eine Übersicht über die Frequenzen von CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zum Zeitpunkt des Screenings, direkt nach der Isolation und nach 14-tägiger Expansion. Die Frequenzen der T-Zell-Subpopulationen beim Screening beziehen sich dabei auf die Spender-PBMCs, nach Isolation und nach Expansion beziehen sich die Frequenzen auf die Positivfraktion und können daher nicht direkt mit den Werten aus dem Screening verglichen werden.

Tabelle 8: T-Zellen im Verlauf des Protokolls

Die Frequenzen von CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt: Intrazelluläres FACS zum Nachweis von IFN γ -Produktion beim Screening und nach Expansion über 14 Tage bzw. Kontroll-FACS nach Isolierung Virus-spezifischer T-Zellen (entspricht einem CSA-FACS). MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung.

Spender	Screening			Nach Isolation			Nach Expansion		
	CD3 ⁺ /Lymph.	CD4 ⁺ /CD3 ⁺	CD8 ⁺ /CD3 ⁺	CD3 ⁺ /Lymph.	CD4 ⁺ /CD3 ⁺	CD8 ⁺ /CD3 ⁺	CD3 ⁺ /Lymph.	CD4 ⁺ /CD3 ⁺	CD8 ⁺ /CD3 ⁺
Spender 1	64 %	81 %	12 %	18 %	75 %	14 %	99 %	89 %	1 %
Spender 2	68 %	84 %	9 %	37 %	48 %	49 %	98 %	37 %	63 %
Spender 3a	52 %	59 %	30 %	41 %	14 %	83 %	99 %	7 %	75 %
3b	52 %	59 %	30 %	27 %	34 %	43 %	100 %	4 %	89 %
Spender 4	69 %	55 %	34 %	40 %	17 %	51 %	94 %	10 %	33 %
Spender 5	61 %	81 %	12 %	65 %	49 %	48 %	100 %	12 %	59 %
Spender 6	67 %	68 %	26 %	61 %	34 %	56 %	99 %	10 %	63 %
MW	62 %	70 %	22 %	41 %	39 %	49 %	98 %	24 %	55 %
SD	7,2	12,3	10,5	16,9	21	20,3	2,1	30,6	29,2

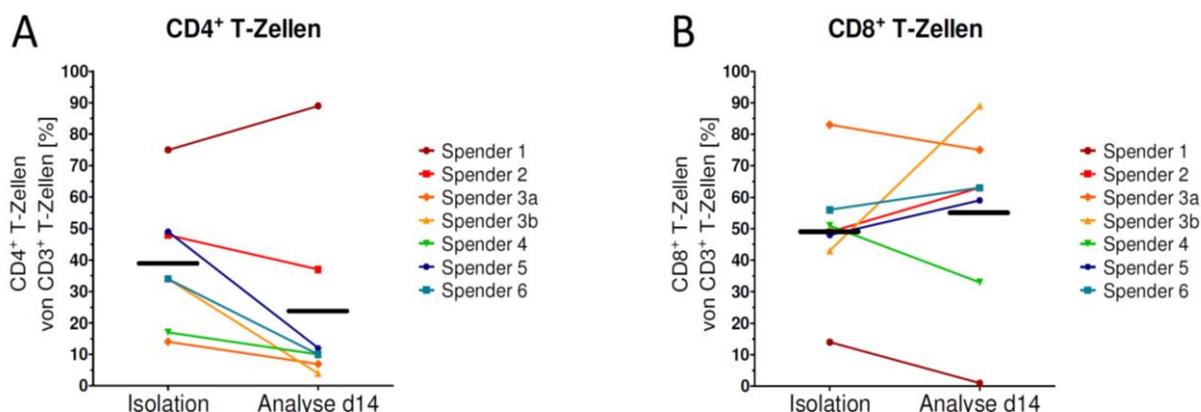


Abbildung 12: Vergleich der Prozentanteile von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen unter den CD3⁺ T-Zellen in der Positivfraktion zum Zeitpunkt direkt nach Isolation und nach 14-tägiger Kultivierung und Expansion

Die Werte CD4⁺ (A) und CD8⁺ (B) T-Zellen unter den CD3⁺ T-Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt: Kontroll-FACS nach Isolierung Virus-spezifischer T-Zellen (entspricht einem CSA-FACS) bzw. intrazelluläres FACS zum Nachweis von IFN γ -Produktion nach der Expansion über 14 Tage. Die verbundenen Punkte stellen die Ergebnisse der einzelnen Spender dar, die schwarze Linie den jeweiligen Mittelwert.

Der mittlere Anteil von CD3⁺ T-Zellen an den Lymphozyten der Positivfraktion lag dabei bei 41%. Nach der Expansion betrug die Frequenz CD3⁺ T-Zellen im Mittel 98%, was auf eine sehr spezifische Expansion der Virus-spezifischen T-Zellen hinweist. Das Verhältnis von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen war nach der Expansion leicht verschoben. So proliferierten in der Regel die CD8⁺ T-Zellen stärker als die CD4⁺ T-Zellen (Mittelwert der Frequenz der CD8⁺ T-Zellen: vorher 49%, nachher 55% von CD3⁺ T-Zellen; Mittelwert der Frequenz der CD4⁺ T-Zellen: vorher 39%, nachher 24% von CD3⁺ T-Zellen). Diese Beobachtung ist in Abbildung 12 noch einmal grafisch dargestellt. Da die Zellzahl der Positivfraktion über die Dauer der Expansion stark zunahm, handelte es sich bei den CD4⁺ T-Zellen nur um eine Abnahme des Anteils an CD3⁺ T-Zellen, die Gesamtzellzahl der CD4⁺ T-Zellen nahm dabei trotzdem zu.

Einer der wichtigsten Parameter zur direkten Kontrolle der Isolation Antigen-spezifischer T-Zellen stellen in dieser Arbeit die Frequenzen IFN γ -produzierender T-Zellen dar. Wie bereits dargelegt, ist es unmittelbar nach der Isolation nur möglich, den Gesamtanteil aller Virus-spezifischen IFN γ -produzierender T-Zellen zu ermitteln, nicht jedoch jeder einzelnen Spezifität. In Tabelle 9 ist die IFN γ -Produktion der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Verlauf des Protokolls zu den Zeitpunkten des Screenings, direkt nach Isolation und nach der Expansion über 14 Tage zusammengestellt. Die Frequenzen Antigen-spezifischer T-Zellen im Ausgangsmaterial waren dabei mit im Mittel 0,11% (CD4⁺ T-Zellen) und 0,66% (CD8⁺ T-Zellen) sehr niedrig. Trotzdem war es möglich, eine Anreicherung der Virus-spezifischen T-Zellen auf im Mittel 63% (CD4⁺ T-Zellen) und 69% (CD8⁺ T-Zellen) in der Positivfraktion zu erzielen. Das beste Ergebnis bei der Isolation von CD4⁺ T-Zellen lag bei 89% (Spender 6) und bei CD8⁺ T-Zellen sogar bei 99% (Spender 4). Nach der 14-tägigen Expansion der Positivfraktion lag die mittlere Frequenz IFN γ -produzierender T-Zellen nach Stimulation mit dem Antigen-Mix der CD4⁺ T-Zellen bei 40% und für CD8⁺ T-Zellen bei 55%. Dass die Frequenz nach der Expansion zum Teil etwas niedriger waren als direkt nach der Anreicherung, könnte daran liegen, dass beim Kontroll-FACS nach der Isolation alle während der Sekretionsphase tatsächlich IFN γ -produzierenden T-Zellen erfasst werden. Beim intrazellulären FACS nach der Expansion ist es theoretisch denkbar, dass zwar ein größerer Anteil als erfasst Antigen-spezifisch ist, jedoch gerade im Zeitrahmen der Analyse kein IFN γ produzierten. Eine höhere Frequenz in der Analyse nach der Expansion würde sich durch eine bevorzugte Proliferation von Antigen-spezifischen T-Zellen erklären lassen.

Tabelle 9: IFN γ ⁺ T-Zellen im Verlauf des Protokolls

Die Werte der IFN γ ⁺ CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt: Intrazelluläres FACS zum Nachweis von IFN γ -Produktion beim Screening und nach Expansion über 14 Tage bzw. Kontroll-FACS nach Isolierung Virus-spezifischer T-Zellen (entspricht einem CSA-FACS). Dabei wurde beim Screening Spender-PBMCs und nach Isolation sowie nach Expansion die Positivfraktion untersucht. MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung.

Spender	IFN γ ⁺ T-Zellen nach Stimulation mit dem Antigen-Mix					
	Screening Methode: ICS		Nach Isolation Methode: CSA		Nach Expansion Methode: ICS	
	CD4 ⁺ T-Zellen	CD8 ⁺ T-Zellen	CD4 ⁺ T-Zellen	CD8 ⁺ T-Zellen	CD4 ⁺ T-Zellen	CD8 ⁺ T-Zellen
Spender 1	0,05 %	0,04 %	75 %	68 %	31 %	89 %
Spender 2	0,03 %	0,37 %	53 %	75 %	73 %	52 %
Spender 3a	0,02 %	0,06 %	53 %	58 %	44 %	25 %
3b	0,28 %	0,02 %	51 %	11 %	44 %	0,3 %
Spender 4	0,06 %	1,51 %	82 %	99 %	8 %	63 %
Spender 5	0,05 %	0,50 %	35 %	78 %	50 %	71 %
Spender 6	0,29 %	2,12 %	89 %	96 %	30 %	88 %
MW	0,11 %	0,66 %	62,57 %	69,29 %	40,00 %	55,47 %
SD	0,1	0,8	19,6	29,5	20,1	32,8

Abbildung 13 zeigt die Zunahme der Frequenzen jeder einzelnen Spezifität durch die Isolation und Expansion im Vergleich zum Screening der Spender. So war zusammengenommen die Anreicherung LMP2a-spezifischer T-Zellen am wenigsten effektiv. Der Anstieg Hexon-spezifischer T-Zellen war bei den CD4⁺ T-Zellen sehr deutlich, die Frequenzen pp65- und BZLF1-spezifischer T-Zellen erhöhten sich bei CD8⁺ T-Zellen am stärksten.

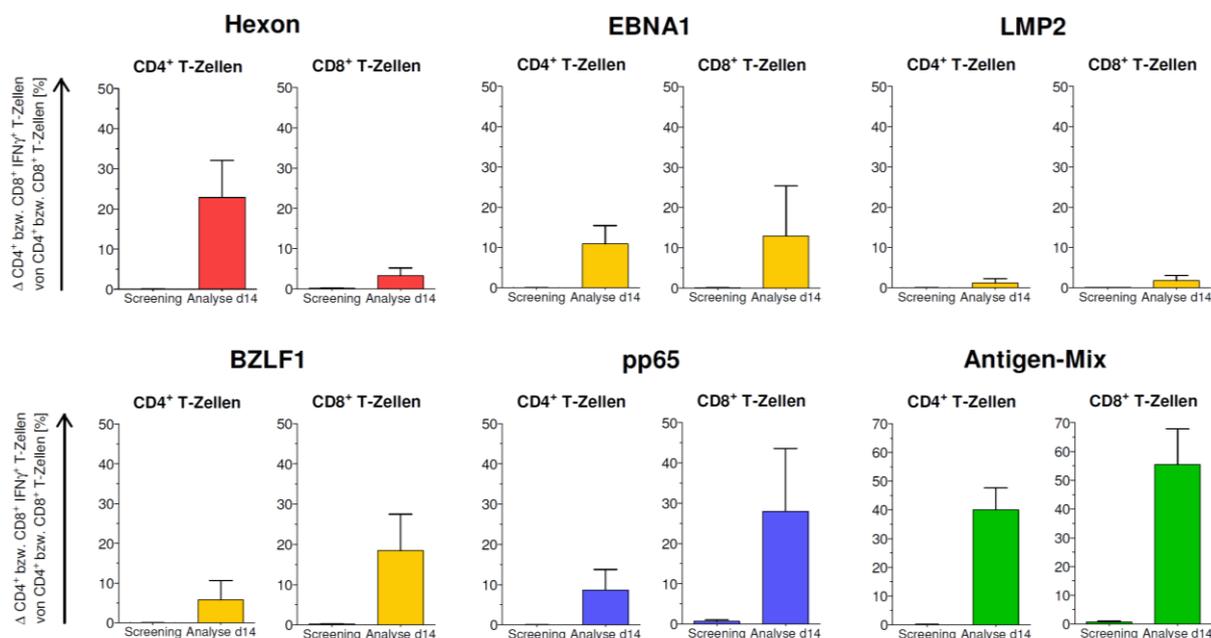


Abbildung 13: Anstieg der Frequenz IFN γ -produzierender T-Zellen nach Isolation und 14-tägiger Expansion Virus-spezifischer T-Zellen

Dargestellt sind die Frequenzen IFN γ -produzierender T-Zellen zum Zeitpunkt des Screenings der Spender und nach Isolation und Expansion der Positivfraktion über 14 Tage. Die Werte wurden mit dem intrazellulären FACS zum Nachweis von IFN γ -Produktion nach Stimulation mit einzelnen Antigenen bzw. mit dem Antigen-Mix ermittelt. Hexon, LMP2a, BZLF1 und pp65: n=6; EBNA1 und Antigen-Mix: n=7. Δ IFN γ ⁺ T-Zellen: Die Negativkontrolle wurde abgezogen. In der Grafik finden sich jeweils die Mittelwerte aller Messungen. Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM (Standardfehler des Mittelwerts).

Eine Zusammenfassung über die Isolierung Virus-spezifischer T-Zellen im GMP-Reinraumlabor am Beispiel von Spender 5 ist in Abbildung 14 zu sehen. Im Screening zeigten sowohl die CD4⁺ also auch die CD8⁺ T-Zellen des ausgewählten Spenders eine IFN γ -Produktion nach Stimulation mit allen fünf Antigenen. Auch die Stimulation mit dem Antigen-Mix induzierte eine ausreichend hohe IFN γ -Produktion (Abbildung 14A). In Abbildung 14D wird deutlich, dass die IFN γ -produzierenden T-Zellen in ihrer relativen Frequenz zueinander unterschiedlich stark vertreten waren, wobei unter den CD4⁺ T-Zellen die Hexon-spezifischen und unter den CD8⁺ T-Zellen die BZLF1-spezifischen T-Zellen dominierten. Insgesamt ergab sich hier jedoch ein relativ ausgewogenes Muster.

Für die simultane Isolierung Antigen-spezifischer T-Zellen wurden zunächst Spender-PBMCs aus Leukapheresat isoliert und über Nacht im Brutschrank gelagert. Am nächsten Tag folgten die Stimulation von 1×10^9 PBMCs mit einem Mix aus Hexon, EBNA1, LMP2a, BZLF1 und pp65 sowie die Isolierung IFN γ -produzierender T-Zellen mittels *IFN γ Capture System* über magnetische Anreicherung am CliniMACS Prodigy®. In der dabei erhaltenen Positivfraktion waren 35% der CD4⁺ und 78% der CD8⁺ T-Zellen IFN γ -positiv. Die Zellzahl der gesamten Positivfraktion lag bei 287.000. Bei der anschließenden Expansion von 50.000 Zellen der Positivfraktion konnte eine 5.762-fache Expansionsrate erzielt werden (Abbildung 14C). Bei der Analyse der expandierten Positivfraktion mittels intrazellulärem FACS zum Nachweis von IFN γ waren wie beim Screening spezifische CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen gegen alle fünf Antigene nachweisbar (Abbildung 14B).

In Abbildung 14D ist dargestellt, wie sich die relativen Frequenzen der einzelnen Spezifitäten vor und nach der Isolierung zueinander verhielten. Wie bereits im Screening dominierten hier bei den CD4⁺ T-Zellen die Hexon- und unter den CD8⁺ T-Zellen die BZLF1-spezifischen T-Zellen. Diese Dominanz ist nach der Isolierung und Expansion sogar noch deutlicher ausgeprägt. Wichtig ist dabei, dass in beiden Fällen weiterhin alle fünf Spezifitäten vertreten sind, wenn auch in niedrigerer relativer Frequenz.

Zusammengefasst konnte in diesem Beispiel gezeigt werden, dass die simultane Isolierung Virus-spezifischer T-Zellen gegen mehrere Antigene prinzipiell möglich ist. Die Anreicherung der weniger stark vertretenen Spezifitäten war trotz der Dominanz einzelner Spezifitäten erfolgreich.

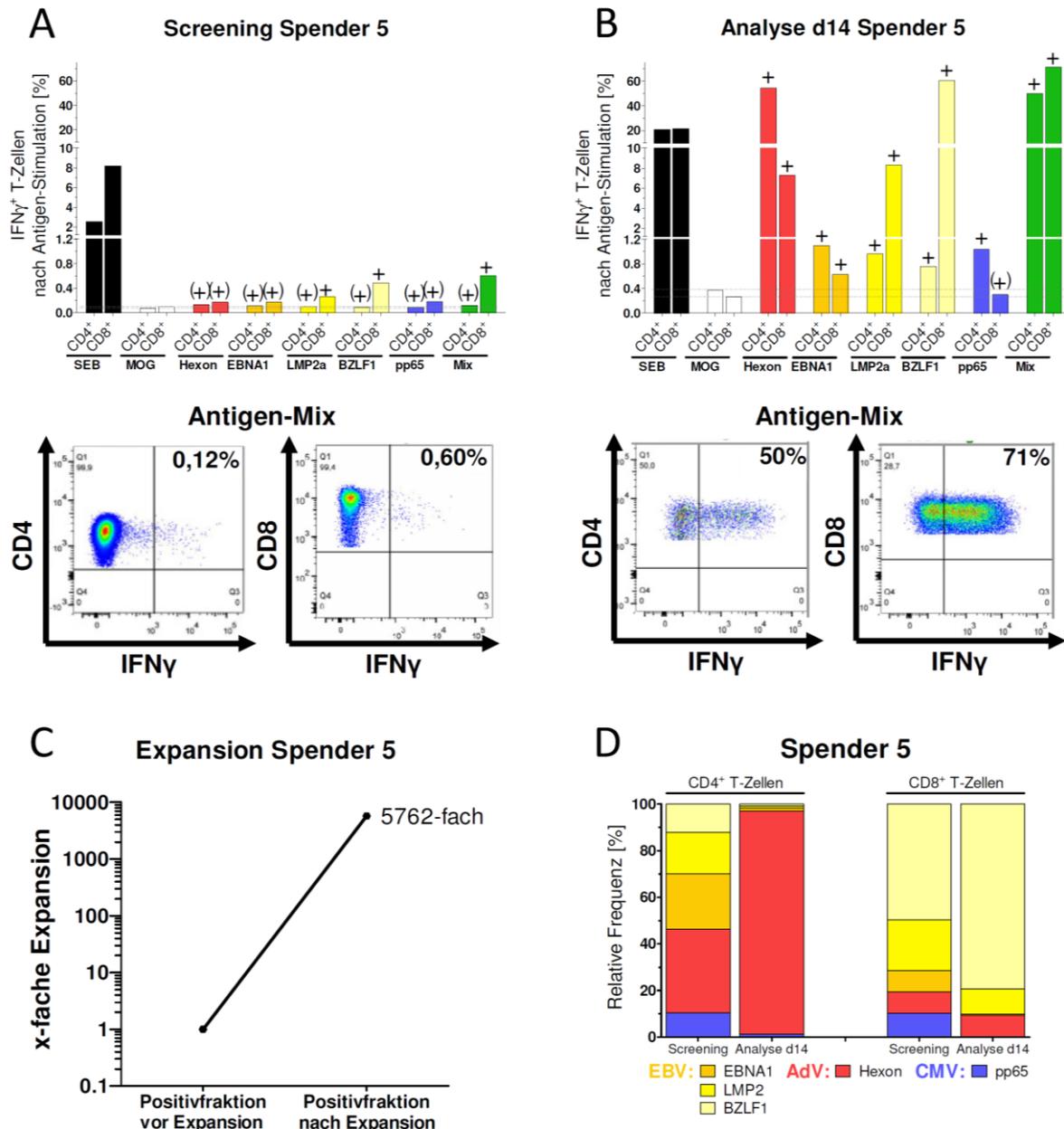


Abbildung 14: Zusammenfassung der Gewinnung Virus-spezifischer T-Zellen im GMP-Labor am Beispiel von Spender 5

(A) Screening des gesunden Spenders. Nach der Isolierung von PBMCs aus Leukapheresat des Spenders wurde ein intrazelluläres FACS zum Nachweis von IFN γ -Produktion nach Antigen-Stimulation durchgeführt. Dargestellt sind die Frequenzen IFN γ -produzierender T-Zellen nach Stimulation mit den verschiedenen Antigenen, der Negativkontrolle (MOG) und der Positivkontrolle (SEB). Darunter die dazugehörigen FACS-Plots nach Stimulation mit dem Mix der einzelnen Antigene. (B) Analyse der expandierten Positivfraktion am Tag 14. Nach der 14-tägigen Kultivierung und Expansion der Virus-spezifischen T-Zellen wurde ein intrazelluläres FACS zum Nachweis von IFN γ -Produktion nach Antigen-Stimulation durchgeführt. Dargestellt sind die Frequenzen IFN γ -produzierender T-Zellen nach Stimulation mit den verschiedenen Antigenen, der Negativkontrolle (MOG) und der Positivkontrolle (SEB). Darunter die dazugehörigen FACS-Plots nach Stimulation mit dem Mix der einzelnen Antigene. Kennzeichnung über den Balken in (A) und (B): „-“: Frequenz gleich hoch oder niedriger als die der Negativkontrolle; „(+)-“: Frequenz höher, jedoch nicht doppelt so hoch wie die der Negativkontrolle; „+“: Frequenz doppelt so hoch wie die der Negativkontrolle. (C) Ergebnis der Kultivierung und Expansion der isolierten Virus-spezifischen T-Zellen. (D) Vergleich der relativen Frequenzen Antigen-spezifischer T-Zellen vor und nach Isolation und Expansion über 14 Tage. Für die Darstellung wurden die Ergebnisse aus (A) und (B) verwendet, wobei die Negativkontrollen jeweils von den entsprechenden Werten abgezogen wurden.

Insgesamt wurden im GMP-Reinraum sieben Isolationen Virus-spezifischer T-Zellen durchgeführt. Das Auswahlkriterium war dabei, dass die Spender mindestens gegen zwei der drei Viren eine IFN γ -basierte Immunantwort im Screening vorwiesen. In Abbildung 15 sind die Ergebnisse der absoluten Frequenzen IFN γ -produzierender T-Zellen beim Screening und nach Isolation und Expansion dargestellt. Der einzige Fall einer nicht vollständig erfolgreichen Anreicherung trat bei Spender 3 auf. Hier war es bei der Isolation mit allen fünf Antigenen nicht gelungen, CMV-spezifische T-Zellen anzureichern. In allen anderen Fällen wurde mindestens eine der beiden T-Zell-Subpopulationen pro Antigen erfolgreich angereichert. Anhand der Ergebnisse aus dem Screening der Spender wird ersichtlich, dass die Frequenz der IFN γ -Produktion für eine erfolgreiche Isolation, nicht wie initial angenommen doppelt so hoch sein muss wie die der Negativkontrolle, da auch in solchen Fällen eine Anreicherung möglich war (zum Beispiel Abbildung 15; Spender 5; Hexon, EBNA1, LMP2a, BZLF1, pp65). In manchen Fällen war die Isolierung sogar erfolgreich, obwohl das Screening negativ ausfiel (zum Beispiel Abbildung 15; Spender 6; EBNA1, LMP2a, BZLF1). Andererseits war die Anreicherung, wie bereits oben beschrieben, in einem Fall auch bei positiv ausgefallenem Screening nicht erfolgreich (Abbildung 15; Spender 3b; pp65). Eine Übersicht hierüber liefert auch Tabelle 10.

Zusammengefasst hat sich die hier gewählte Screening-Methode leider nicht als ausreichend prädiagnostisch erwiesen. Eine erfolgreiche Isolation Virus-spezifischer T-Zellen gegen alle Antigene war zu 86% (6/7) möglich. Dabei konnten unter den CD4⁺ T-Zellen 91% (20/22) und unter den CD8⁺ T-Zellen 85% (22/26) der im Screening als positiv eingestuft Spezifitäten erfolgreich angereichert werden.

Tabelle 10: Erhaltung der einzelnen Spezifitäten nach Isolation und Expansion

Kennzeichnung der Ergebnisse „-“: Frequenz gleich hoch oder niedriger als die der Negativkontrolle; „(+“): Frequenz höher, jedoch nicht doppelt so hoch wie die der Negativkontrolle; „+“: Frequenz doppelt so hoch wie die der Negativkontrolle.

		CD4 ⁺ T-Zellen					CD8 ⁺ T-Zellen				
		Hexon	EBNA1	LMP2a	BZLF1	pp65	Hexon	EBNA1	LMP2a	BZLF1	pp65
Spender 1	Screening	+	+			-	+	+			(+)
	Analyse d14	+	+			(+)	(+)	+			(+)
Spender 2	Screening	+	-	-	-	-	+	(+)	-	-	(+)
	Analyse d14	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+
Spender 3a	Screening		(+)	+	+			(+)	+	+	
	Analyse d14		+	-	+			-	+	+	
Spender 3b	Screening	+	(+)	+	+	(+)	+	(+)	+	+	+
	Analyse d14	+	(+)	(+)	+	-	(+)	-	-	+	-
Spender 4	Screening	(+)	(+)	(+)	-	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+
	Analyse d14	+	(+)	+	(+)	+	(+)	(+)	(+)	+	+
Spender 5	Screening	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+	(+)
	Analyse d14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)
Spender 6	Screening	(+)	-	-	-	+	(+)	-	-	-	+
	Analyse d14	+	+	(+)	+	+	(+)	(+)	+	+	+

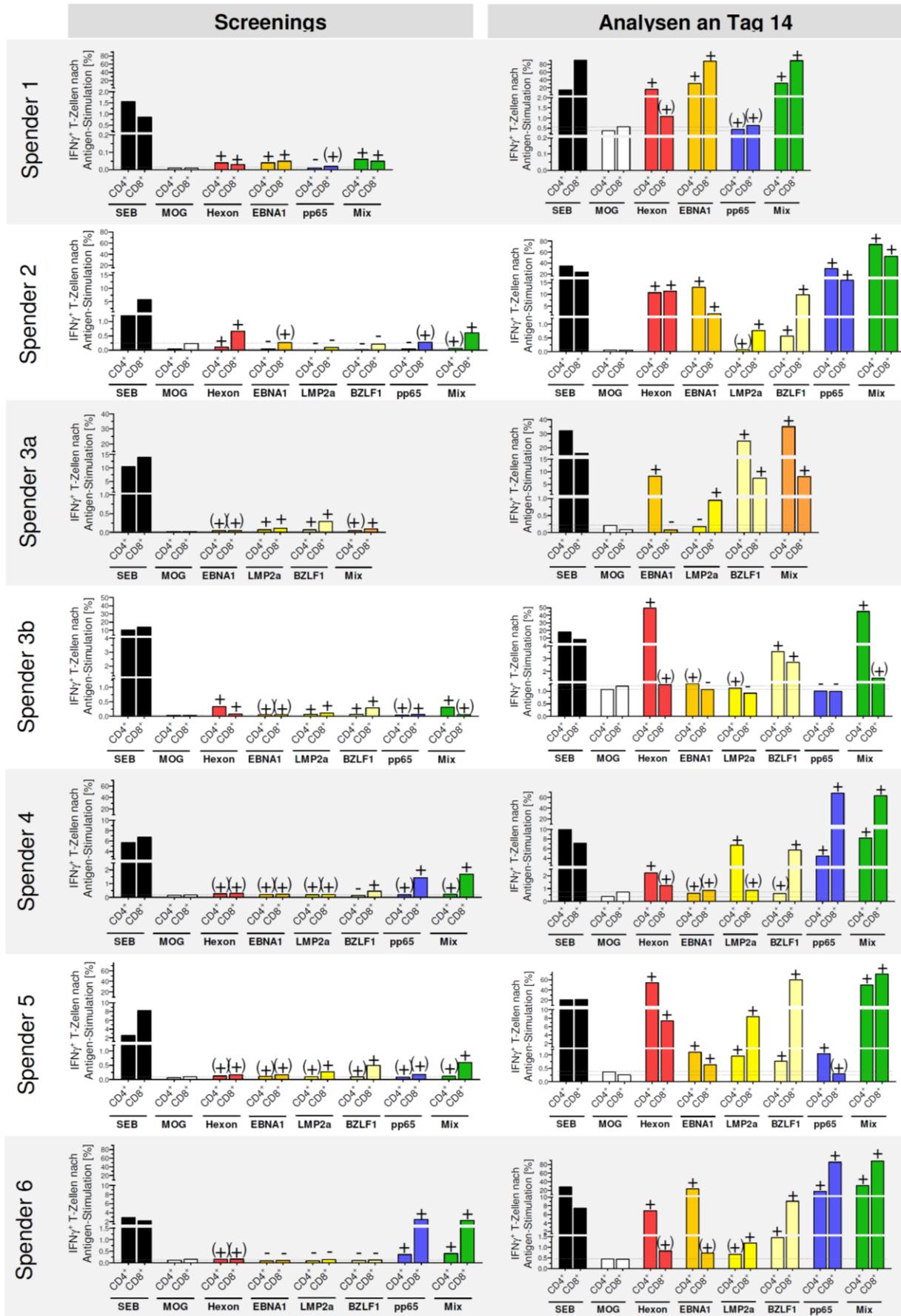


Abbildung 15: Absolute Frequenzen IFN γ -produzierender T-Zellen zum Zeitpunkt des Screenings und nach Isolation und 14-tägiger Expansion Virus-spezifischer T-Zellen (vorige Seite)

Linke Spalte: Screenings der gesunden Spender. Nach der Isolierung von PBMCs aus Vollblut oder Leukapheresat des Spenders wurde ein intrazelluläres FACS zum Nachweis von IFN γ -Produktion nach Antigen-Stimulation durchgeführt. Rechte Spalte: Analyse der expandierten Positivfraktion am Tag 14. Nach der 14-tägigen Kultivierung und Expansion der Virus-spezifischen T-Zellen wurde ein intrazelluläres FACS zum Nachweis von IFN γ -Produktion nach Antigen-Stimulation durchgeführt.

Dargestellt sind die absoluten Frequenzen IFN γ -produzierender T-Zellen nach Stimulation mit den verschiedenen Antigenen, der Negativkontrolle (MOG) und der Positivkontrolle (SEB). Kennzeichnung über den Balken: „-“: Frequenz gleich hoch oder niedriger als die der Negativkontrolle; „(+“: Frequenz höher, jedoch nicht doppelt so hoch wie die der Negativkontrolle; „+“: Frequenz doppelt so hoch wie die der Negativkontrolle.

Wie sich die einzelnen Spezifitäten in ihrer relativen Frequenz zueinander verhalten, ist in Abbildung 16 illustriert. Hier ist zu sehen, dass nicht in jedem Fall die beim Screening dominierende Spezifität auch nach der Isolation und 14-tägigen Expansion ihre Dominanz behält (zum Beispiel Hexon-spezifische T-Zellen bei Spender 2 und pp65-spezifische T-Zellen bei Spender 6; Abbildung 16A). Daraus lässt sich schließen, dass eine geplante Anreicherung verschiedener Spezifitäten auch bei einer stark ausgeprägten Dominanz einer einzelnen Spezifität möglich ist.

Interessant ist, dass sich die relativen Frequenzen der drei EBV-Antigene bei Spender 3 in beiden Isolationen relativ ähnlich verhalten. Dieser Umstand könnte darauf hindeuten, dass die Zunahme der relativen Frequenzen einzelner Antigene neben der Höhe der Ausgangsfrequenz auch Spender- und dabei eventuell HLA-abhängig ist. Allerdings müsste man für eine eindeutige Aussage zu dieser Theorie noch deutlich mehr Anreicherungen durchführen.

Betrachtet man die relativen Frequenzen der Anreicherungen aller sechs Spender zusammengefasst (Abbildung 16B), so sind diese bei den CD4⁺ T-Zellen sowohl beim Screening als auch nach Isolation und Expansion für das AdV-Antigen Hexon am höchsten. Bei den CD8⁺ T-Zellen fanden sich die höchsten relativen Frequenzen unter den BZLF1- und pp65-spezifischen T-Zellen. Für die beiden latenten EBV-Antigene EBNA1 und LMP2a lässt sich keine Präferenz für CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen erkennen. Zusammengenommen ist die Verschiebung der relativen Frequenz jedes einzelnen Antigens zwischen Screening und Analyse am Tag 14 nicht statistisch signifikant, auch wenn sich insbesondere unter den CD8⁺ T-Zellen für Hexon eine stärkere Tendenz zur Abnahme und für BZLF1 zur Zunahme der relativen Frequenz nach Isolation und Expansion andeutet (Abbildung 16B).

Die relativen Frequenzen der einzelnen Spezifitäten waren zwar nach der Isolation und Expansion etwas verschoben, es kann jedoch keine Vorhersage darüber getroffen werden, welches Antigen dabei dominieren und dadurch die Anreicherung der anderen Spezifitäten behindern wird.

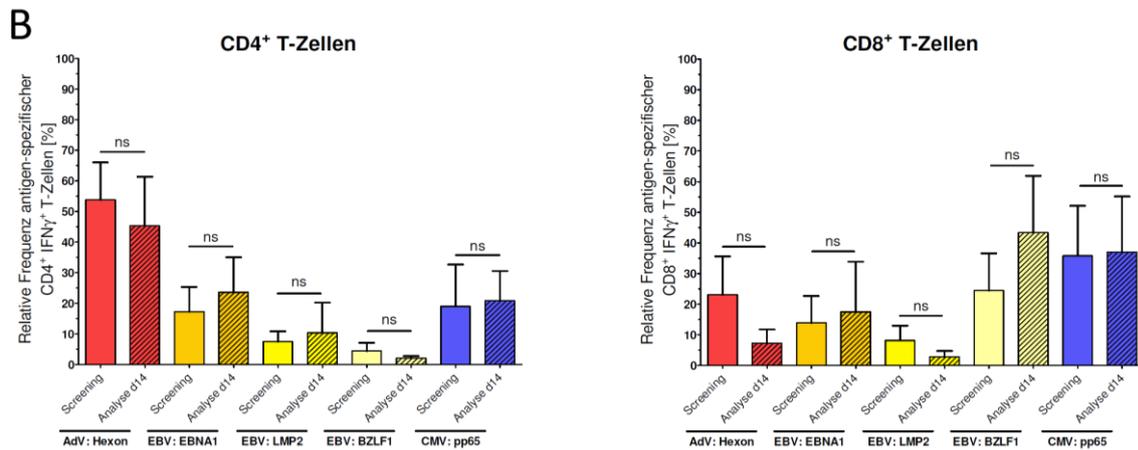
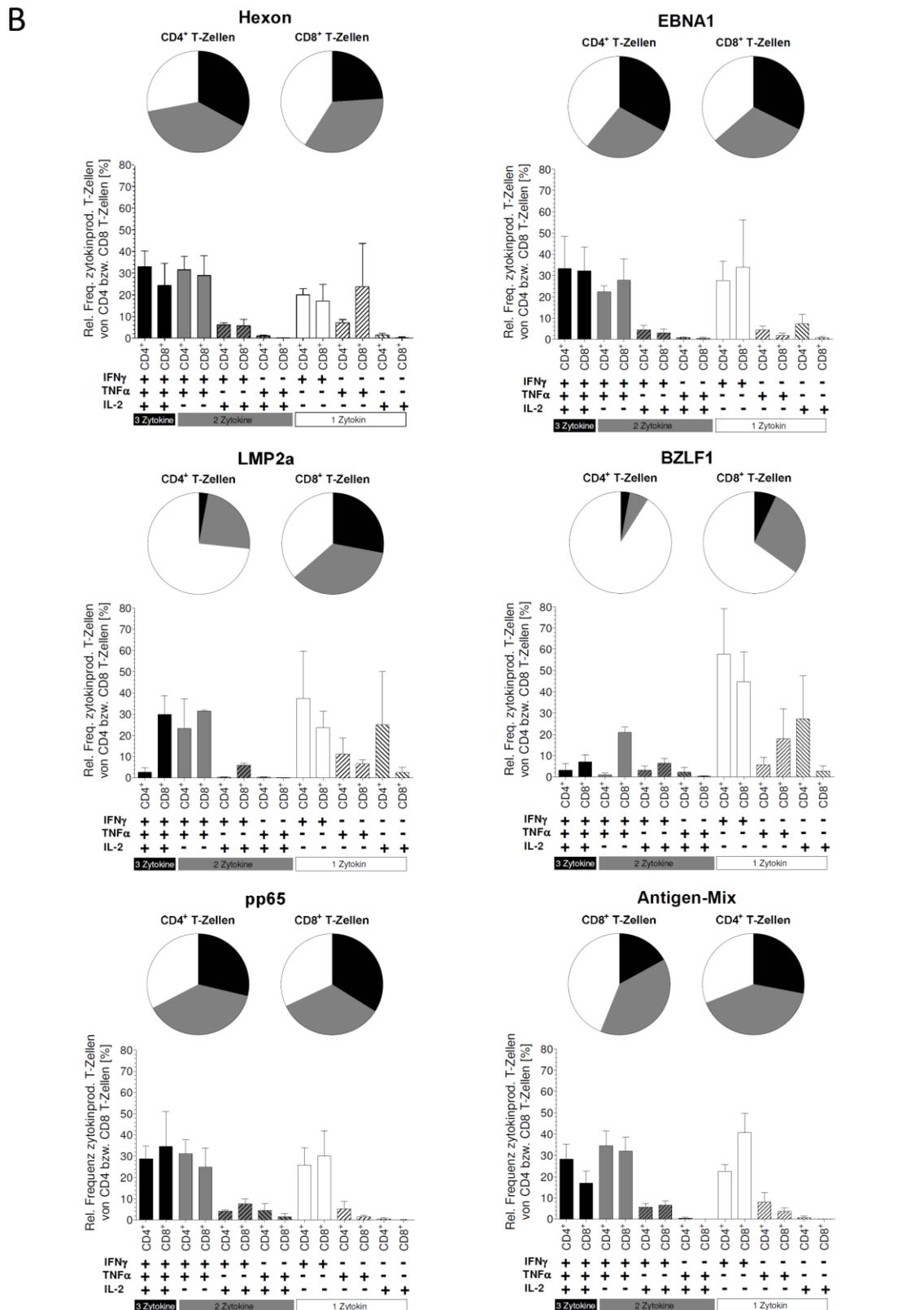
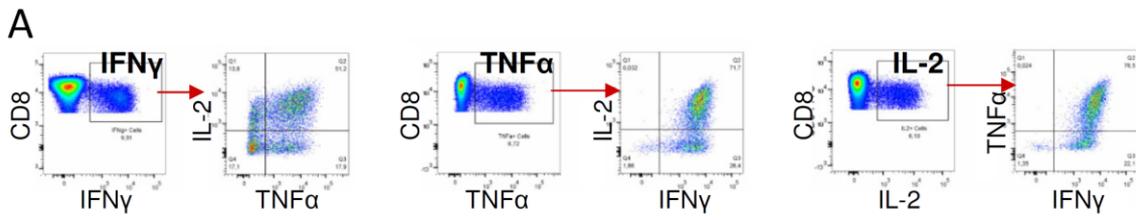


Abbildung 16: Relative Frequenzen IFN γ -produzierender T-Zellen zum Zeitpunkt des Screenings und nach Isolation und 14-tägiger Expansion Virus-spezifischer T-Zellen

Vergleich der relativen Frequenzen Antigen-spezifischer T-Zellen vor und nach Isolation und Expansion über 14 Tage. Für die Darstellung wurden die Ergebnisse aus Abbildung 15: Absolute Frequenzen IFN γ -produzierender T-Zellen zum Zeitpunkt des Screenings und nach Isolation und 14-tägiger Expansion Virus-spezifischer T-Zellen verwendet, wobei die Negativkontrollen jeweils von den entsprechenden Werten abgezogen wurden. (A) Relative Frequenzen IFN γ -produzierender T-Zellen der einzelnen Spender. (B) Entwicklung der relativen Frequenzen IFN γ -produzierender T-Zellen zum Zeitpunkt des Screenings und nach Isolation und Expansion Virus-spezifischer T-Zellen bezogen auf die einzelnen Antigene (n=6; Spender 3a ausgeschlossen, da sonst als biologisches Replikat doppelt enthalten). In der Grafik finden sich jeweils die Mittelwerte aller Messungen. Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM (Standardfehler des Mittelwerts). Für die statistische Analyse wurde der gepaarte t-Test durchgeführt: ns $p > 0,05$.

Zusammengefasst waren 86% (6/7) simultanen Isolierungen Virus-spezifischer T-Zellen erfolgreich. Einzig bei Spender 3 war die Anreicherung und Expansion der bereits im Screening nur schwach vertretenen pp65-spezifischen T-Zellen nicht möglich. Die Frequenzen Antigen-spezifischer T-Zellen im Ausgangsmaterial waren dabei mit 0,11% (Mittelwert CD4⁺ T-Zellen) und 0,66% (Mittelwert CD8⁺ T-Zellen) sehr niedrig. Trotzdem war es möglich, eine Anreicherung der Virus-spezifischen T-Zellen auf 63% (Mittelwert CD4⁺ T-Zellen) und 69% (Mittelwert CD8⁺ T-Zellen) in der Positivfraktion zu erzielen (Tabelle 9). Bei den Anreicherungen wurden durchschnittlich 1×10^9 Spender-PBMCs eingesetzt und 1.105.000 Zellen in der Positivfraktion erhalten (Tabelle 7). Während der anschließenden Expansion der Positivfraktion proliferierten die CD8⁺ T-Zellen etwas besser als die CD4⁺ T-Zellen (Abbildung 12). Ein negatives oder schwach positives Ergebnis einzelner Spezifitäten im Screening bedeutet nicht zwangsläufig, dass eine Anreicherung keinen Erfolg haben wird. Ein positives Ergebnis von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen hat in 86% (42/48) zu einer erfolgreichen Isolation und Expansion der entsprechenden Spezifität geführt (Tabelle 10, Abbildung 15 und Abbildung 16). Die Dominanz einer einzelnen Spezifität im Screening verhindert dabei nicht, dass weniger stark vertretene Spezifitäten erfolgreich isoliert werden können. Insgesamt gab es in der Verschiebung der relativen Frequenzen einzelner Spezifitäten vom Screening zur Analyse nach Isolation und Expansion keine statistisch signifikante Änderung (Abbildung 16).



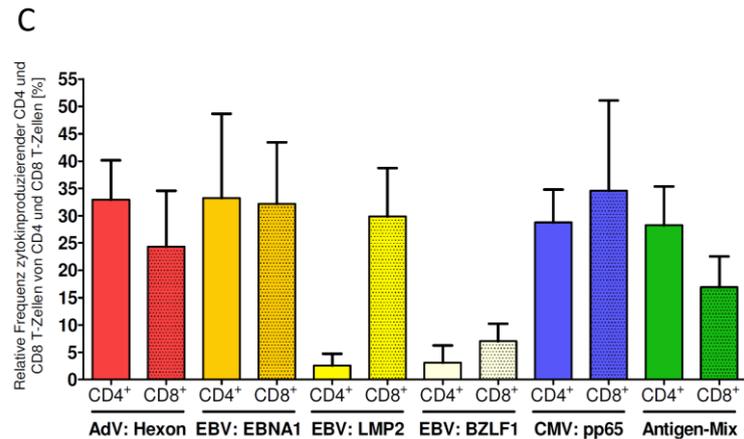


Abbildung 17: Polyfunktionalität der Virus-spezifischen T-Zellen nach Isolation und 14-tägiger Expansion

Die Polyfunktionalität der Virus-spezifischen T-Zellen wurde nach 14-tägiger Expansion der Positivfraktion mittels intrazellulärem FACS zum Nachweis von $IFN\gamma$ -, $TNF\alpha$ - und IL-2-Produktion ermittelt. N=4: Spender 2, Spender 4, Spender 5 und Spender 6. (A) Repräsentative FACS-Plots einer Messung: Spender 2 (Stimulation mit Hexon; $CD8^+$ T-Zellen). (B) Relative Frequenzen zytokinproduzierender $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ T-Zellen nach Stimulation mit den einzelnen Antigenen und dem Antigen-Mix. Die Kuchendiagramme zeigen den Mittelwert der tri-, bi- und monofunktionellen T-Zellen. In den Balkendiagrammen sind die Mittelwerte aller Messungen dargestellt, wobei die Fehlerbalken den SEM (Standardfehler des Mittelwerts) repräsentieren. (C) Übersicht nur der trifunktionellen T-Zellen aus (B) für die einzelnen Antigene und den Antigen-Mix.

5.4 Weitere Analysen der Virus-spezifischen T-Zellen

Neben der standardmäßig geplanten Analyse in Form des intrazellulären FACS zum Nachweis von $IFN\gamma$ wurden in dieser Arbeit auch weitere Untersuchungen an den angereicherten und expandierten Virus-spezifischen T-Zellen durchgeführt. Weiterführende Analysen waren bei den Zellen der Spender 2, 4, 5 und 6 aufgrund der guten Expansionsraten und der damit verbundenen hohen Zellzahl der expandierten Positivfraktion möglich. Getestet wurde hierbei auf Polyfunktionalität und Spezifität für bekannte T-Zell Epitope.

5.4.1 Polyfunktionalität der isolierten und expandierten Virus-spezifischen T-Zellen

Um die funktionelle Vielseitigkeit der Virus-spezifischen T-Zellen zu analysieren, wurde mit den isolierten und expandierten Antigen-spezifischen T-Zellen von Spender 2, 4, 5 und 6 ein intrazelluläres FACS zum Nachweis der $IFN\gamma$ -, $TNF\alpha$ - und IL-2-Produktion durchgeführt. Die Ergebnisse dazu finden sich in Abbildung 17. Neben der nach einer Anreicherung mittels *IFN γ Capture System* zu erwartenden Fähigkeit zur $IFN\gamma$ -Produktion zeigten die analysierten T-Zellen zu einem größeren Anteil ebenfalls eine Antigen-spezifische $TNF\alpha$ - und IL-2-Produktion. So waren neben Monofunktional $IFN\gamma$ -, $TNF\alpha$ - oder IL-2-produzierenden Zellen auch bi- und sogar trifunktionelle Virus-spezifische T-Zellen detektierbar. Unter den polyfunktionellen T-Zellen produzierten die meisten T-Zellen $IFN\gamma$ zusammen mit einem oder beiden anderen Zytokinen (Abbildung 17B). Die geringste Ausprägung einer Polyfunktionalität fand sich unter

LMP2a- (CD4⁺) und BZLF1-spezifischen (CD4⁺ und CD8⁺) T-Zellen. Bei allen anderen Antigenen war der Anteil polyfunktioneller T-Zellen relativ ausgeglichen (Abbildung 17B und C). Zusammengefasst zeigten die Virus-spezifischen T-Zellen aller vier getesteten Spender neben der Produktion von IFN γ auch die Fähigkeit zur Antigen-spezifischen TNF α - und IL-2-Produktion, wobei der Anteil polyfunktionaler T-Zellen im Sinne einer simultanen Sekretion von IFN γ -, TNF α - und IL-2 je nach Antigen bei CD4⁺ T-Zellen zwischen 3-33% und bei CD8⁺ T-Zellen zwischen 7-35% lag.

5.4.2 Epitopspezifität der isolierten und expandierten Virus-spezifischen T-Zellen

Die Spezifität der isolierten und expandierten T-Zellen für die bekannten HLA-bindenden Peptide aus den für die Isolation verwendeten Antigenen wurde mittels intrazellulärem FACS auf Zytokinproduktion nach Stimulation mit den entsprechenden Peptiden und einer MHC-Multimerfärbung mit Streptameren getestet. Die HLA-Typisierung der vier analysierten Spender findet sich in Tabelle 11. Für jeden Spender wurden einige der bekannten Peptide für das intrazelluläre FACS auf Zytokinproduktion und, soweit vorhanden, die entsprechenden Streptamere zusammengestellt (Tabelle 13).

Tabelle 11: HLA-Typisierung der Spender

Spender	HLA-Typ
Spender 2	A*01; A*26; B*08; B*55; C*03; C*07; DRB1*03:01; DRB1*14:01; DQB1*02:01; DQB1*05:03
Spender 4	A*02:01; A*26:01; B*27:05; B*44:02; C*02:02; C*05:01; DRB1*01:01; DRB1*16:01; DQB1*05:01; DQB1*05:02
Spender 5	A*02:05; A*25:01; B*07:02; B*50:01; C*06:02; C*07:02 DRB1*07:01; DRB1*13:02; DQB1*02:02; DQB1*06:04
Spender 6	A*02:01; A*24:02; B*40:01; B*44:02; C*03:04; C*05:01 DRB1*12:01; DRB1*13:02; DQB1*03:01; DQB1*06:04

5.4.2.1 Intrazelluläres FACS zum Nachweis der IFN γ -Produktion nach Stimulation mit Peptiden

Die Frequenzen der IFN γ -produzierenden Virus-spezifischen T-Zellen nach Stimulation mit dem zur Anreicherung verwendeten Peptid-Pool und den HLA-gematchten Peptiden wurde mittels einem intrazellulären FACS bestimmt (Abbildung 18 und Tabelle 13). Eine Antigen-spezifische Produktion von IFN γ nach Stimulation mit HLA-gematchten Peptiden konnte bei Spender 2 mit 5 von 9, bei Spender 4 mit 8 von 8, bei Spender 5 mit 3 von 10 und bei Spender 6 mit 4 von 13 getesteten Peptiden detektiert werden. Ein hoher Score in der SYFPEITHI-Datenbank für MHC-Liganden und Peptid-Motive korrelierte dabei meist mit einer hohen Frequenz in der hier

Tabelle 12: Peptide zur Negativkontrolle im intrazellulären FACS

Protein	HLA-Typ	Peptidsequenz	AS
gag p17; HIV-1	A*01	GSEELRSLY	9
RNA-Helikase DDX5; human	A*02	YLLPAIVHI	9
TEGT; human	A*24	AYVHMTVTHF	9
HB2P; human	B*07	APRTVALTA	9
MET; human	B*08	AVKLIKIDL	8
Keratin 8; human	B*44	AESMYQIKY	9
FLNA; human	DRB1	ETVITVSTKAAGKGK	15

durchgeführten Analyse, war jedoch kein Garant für ein positives Ergebnis (Tabelle 13). Bei sieben der getesteten Peptide waren die nach Stimulation mit dem ganzen Pool aus Peptiden angereicherten T-Zellen zu über 50% spezifisch für nur ein Peptid, darunter bei fünf der Peptide sogar zu über 90% (Tabelle 13). Dieser Umstand lässt darauf schließen, dass sich besonders immundominante Epitope auch bei einer Stimulation mit dem ganzen Peptid-Pool durchsetzen können. Ein Anteil Peptid-spezifischer T-Zellen an der Frequenz Peptid-Pool-spezifischer T-Zellen von 100% macht deutlich, dass eine sehr spezifische Anreicherung auch mit einem Mix vieler verschiedener Peptide möglich ist. Leider sind noch nicht alle immundominanten HLA-bindenden Peptide für jeden HLA-Typ und jedes Antigen bekannt. So muss hier weiterhin auf den Peptid-Mix aus den dem ganzen Protein umspannenden Peptiden zurückgegriffen werden, wenn man alle für den jeweiligen Spender möglichen Epitop-spezifischen T-Zellen isolieren möchte. Außerdem kann nicht abschließend geklärt werden, ob die angereicherten T-Zellen, bei denen der Anteil Peptid-spezifischer T-Zellen an der Frequenz Peptid-Pool-spezifischer T-Zellen unter 100% liegt, doch unspezifisch angereichert wurden, oder eben für ein noch unbekanntes, oder hier nicht getestetes Epitop spezifisch sind. So setzt sich zum Beispiel die Frequenz pp65-spezifischer CD8⁺ T-Zellen bei Spender 6 aus mindestens zwei verschiedenen Peptid-Spezifitäten zusammen (Abbildung 18 und Tabelle 13).

Tabelle 13: Epitopspezifität der expandierten Positivfraktion (nächste Seite)

Auflistung aller getesteter Epitope für die jeweiligen Spender unter Angabe der Proteinquelle, der HLA-Restriktion, der Anzahl der Aminosäuren (AS) und des SYFPEITHI-Scores. Die Ergebnisse aus dem intrazellulären FACS zum Nachweis von IFN γ -, TNF α - und IL-2-Produktion und der Oberflächenfärbung mit MHC-I-Streptameren sind wie folgt gekennzeichnet: „Neg“: Frequenz gleich hoch oder niedriger als die der Negativkontrolle, „(Pos.)“: Frequenz höher, jedoch nicht doppelt so hoch wie die der Negativkontrolle, „Pos“: Frequenz doppelt so hoch wie die der Negativkontrolle und „n.v.“ für Peptid bzw. Streptamer nicht vorhanden. In der vorletzten Spalte findet sich der prozentuale Anteil der Peptid-spezifischen T-Zellen an den entsprechenden PepTivator-spezifischen T-Zellen. Die letzte Spalte fasst die Ergebnisse aus der Oberflächenfärbung mit MHC-I-Streptameren zusammen (n.v.: entsprechendes Streptamer nicht verfügbar).

	Protein	HLA-Typ	Peptidsequenz	AS	SYFPEITHI-Score	Ergebnis ICS	Anteil an Peptivator-spez. T-Zellen	Ergebnis Streptamer
Spender 2	Hexon	A*01	LTDLQGNLLY	10	36	Pos.	92 %	Pos.
	EBNA1	B*08	YNLRRGTAL	9	19	Pos.	25 %	n.v.
	EBNA1	DRB1*03:01	KTSLYNLRRGTALA	14	k.A.	Neg.	0 %	n.v.
	LMP2a	A*01	ESEERPPTY	10	27	Neg.	0 %	n.v.
	BZLF1	B*08	RAKFKQLL	8	34	Pos.	104 %	Pos.
	pp65	A*01:11	YSEHPTFTSQY	11	29	Pos.	74 %	n.v.
	pp65	DRB1*03:01	KPGKISHIMLDVAFTSH	17 (15)	11	Neg.	0 %	n.v.
	pp65	DRB1*03:01	YQEFFWDANDIYRIF	15	32	Pos.	66 %	n.v.
	pp65	DRB1*03:01	HPTFTSQYRIQKLE	15	16	Neg.	0 %	n.v.
Spender 4	Hexon	A*02:01	YVLFVFDVV	10	17	(Pos.)	6 %	n.v.
	Hexon	B*44:02	NEIGVGNNF	9	26	(Pos.)	2 %	n.v.
	Hexon	B*44:02	MEINLNANLW	10	27	Neg.	0 %	n.v.
	EBNA1	DRB1*01	KTSLYNLRRGTALA	14	k.A.	(Pos.)	2 %	n.v.
	LMP2a	A*02:01	FLYALALLL	9	24	(Pos.)	18 %	Neg.
	LMP2a	A*02:01	CLGGLTMV	9	27	(Pos.)	27 %	n.v.
	pp65	A*02:01	NLVPMTATV	9	30	Pos.	100 %	Pos.
	pp65	A*02:01	MLNIPSINV	9	22	Neg.	0 %	n.v.
Spender 5	Hexon	A*02:01	YVLFVFDVV	10	0	Neg.	0 %	n.v.
	Hexon	B*07:02	EPTLLYVLF	9	19	Neg.	0 %	n.v.
	EBNA1	DRB1*07:01	KTSLYNLRRGTALA	14	k.A.	(Pos.)	13 %	n.v.
	LMP2a	A*02:01	FLYALALLL	9	k.A.	Neg.	0 %	Neg.
	LMP2a	A*02:01	CLGGLTMV	9	k.A.	(Pos.)	1 %	n.v.
	pp65	A*02:01	NLVPMTATV	9	k.A.	Neg.	0 %	(Pos.)
	pp65	A*02:01	MLNIPSINV	9	k.A.	Neg.	0 %	n.v.
	pp65	B*07:02	TPRVTTGGAM	10	19	(Pos.)	100 %	n.v.
	pp65	B*07:02	RIPHERNGFTVL	11(10)	17	Neg.	0 %	n.v.
pp65	DRB1*07:01	YQEFFWDANDIYRIF	15	22	Neg.	0 %	n.v.	
Spender 6	Hexon	A*02:01	YVLFVFDVV	10	17	Neg.	0 %	n.v.
	Hexon	B*44:02	NEIGVGNNF	9	26	Neg.	0 %	n.v.
	Hexon	B*44:02	MEINLNANLW	10	27	Neg.	0 %	n.v.
	Hexon	A*24:02	TYFSLNKKF	9	23	n.v.		Neg.
	EBNA1	DRB1*12/*13	KTSLYNLRRGTALA	14	k.A.	Neg.	0 %	n.v.
	LMP2a	A*02:01	FLYALALLL	9	24	Neg.	0 %	Pos.
	LMP2a	A*02:01	CLGGLTMV	9	27	Neg.	0 %	n.v.
	LMP2a	A*24:02	TYGPFVFMCL	9	24	(Pos.)	14 %	n.v.
	LMP2a	A*24:02	PYLFWLAAI	9	22	n.v.		Neg.
	pp65	A*02:01	NLVPMTATV	9	30	Pos.	94 %	Pos.
	pp65	A*02:01	MLNIPSINV	9	22	Neg.	0 %	n.v.
	pp65	A*24:02	QYDPVAALFL	10	21	Pos.	1 %	Pos.
	pp65	DRB1*03:01	KPGKISHIMLDVAFTSH	17	k.A.	Neg.	0 %	n.v.
	pp65	DRB1*03:01	YQEFFWDANDIYRIF	15	k.A.	Neg.	0 %	n.v.
pp65	DRB1*03:01	HPTFTSQYRIQKLE	15	k.A.	(Pos.)	0,3 %	n.v.	

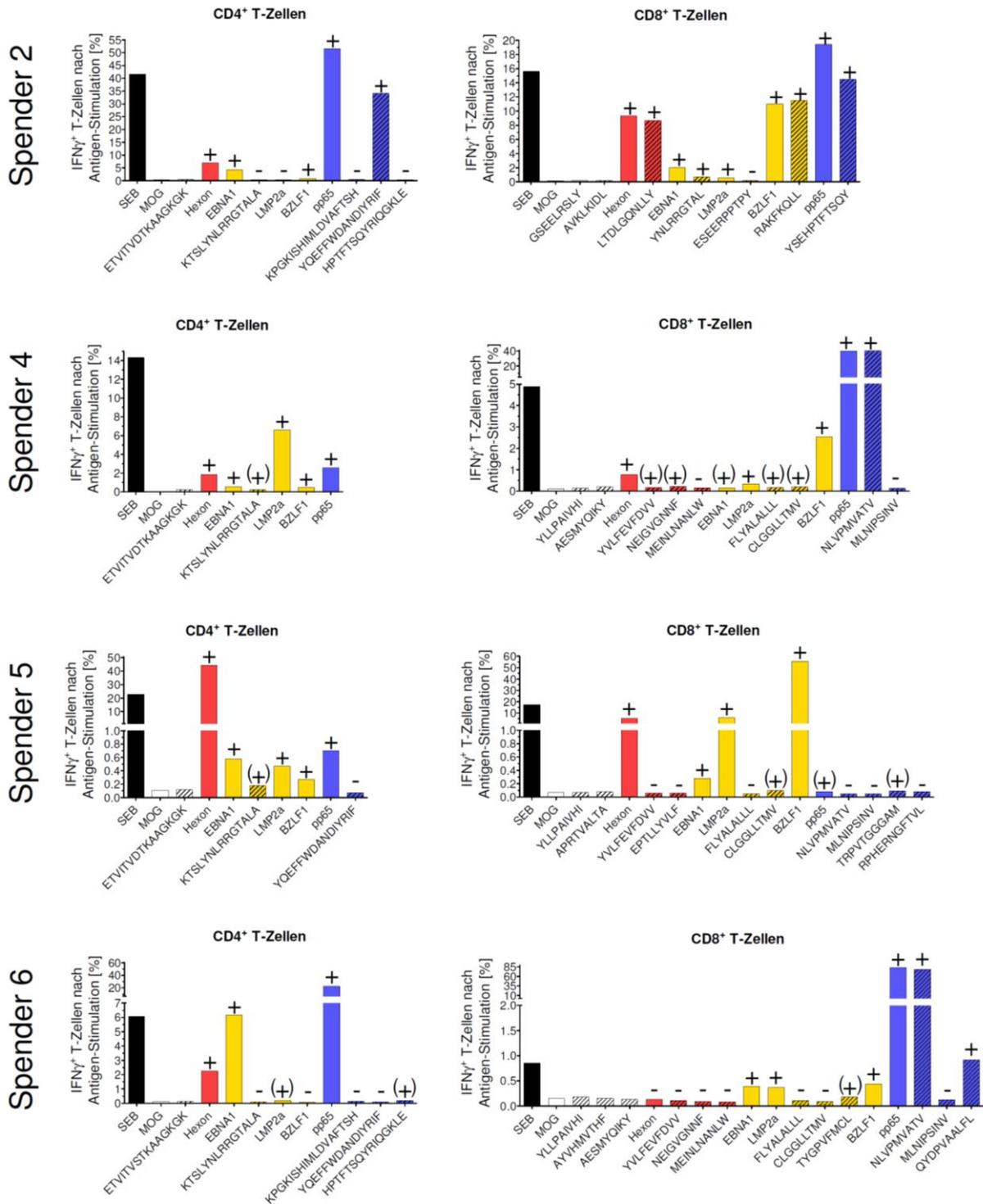


Abbildung 18: Absolute Frequenzen PepTivator- und Peptid-spezifischer T-Zellen nach Isolation und 14-tägiger Expansion

Analyse der expandierten Positivfraktion am Tag 14. Nach der 14-tägigen Kultivierung und Expansion der Virus-spezifischen T-Zellen wurde ein intrazelluläres FACS zum Nachweis von IFN γ -, TNF α - und IL-2-Produktion nach Stimulation mit den PepTivatoren (Name des Proteins) bzw. Peptiden (AS-Sequenz; schraffierte Balken) aus Tabelle 13 durchgeführt. Dargestellt sind die Frequenzen IFN γ -produzierender T-Zellen nach Stimulation mit den verschiedenen Antigenen: Negativkontrolle (MOG), PepTivator, entsprechendes Peptid (siehe Tabelle 13) und Positivkontrolle (SEB). Kennzeichnung über den Balken: „-“: Frequenz gleichhoch oder niedriger als die der Negativkontrolle; „(+)-“: Frequenz höher, jedoch nicht doppelt so hoch wie die der Negativkontrolle; „+“: Frequenz doppelt so hoch wie die der Negativkontrolle (Vergleiche dazu auch Tabelle 13).

5.4.2.2 Oberflächenfärbung mit MHC-I-Streptameren

Neben dem intrazellulären FACS auf Zytokinproduktion nach Stimulation mit Peptiden wurde die Epitop-Spezifität der isolierten und expandierten Vius-spezifischen CD8⁺ T-Zellen auch in einer Oberflächenfärbung mit MHC-I-Streptameren analysiert. Die Ergebnisse dieser Analyse mit Streptameren sind in Abbildung 19 und Tabelle 13 zusammengefasst. Für Spender 2 konnten die Ergebnisse hierbei mit beiden getesteten Streptameren (Hexon-LTDGQNLLY und BZLF1-RAKFQLL) bestätigt werden. Bei Spender 4 konnten für das im intrazellulären FACS mit einer sehr niedrigen Frequenz positive LMP2a Peptid FLYALALLL in der Streptamer-Färbung keine spezifischen CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden. Die hohe Frequenz pp65-spezifischer CD8⁺ T-Zellen gegen NLVPMVATV wurde jedoch bestätigt. Für Spender 5 standen nur zwei Streptamere zur Verfügung, für deren Epitope in der intrazellulären FACS-Färbung keine spezifischen CD8⁺ T-Zellen detektierbar waren. Für das LMP2a-Peptid FLYALALLL wurde dies in der Streptamer-Färbung bestätigt. Mit dem pp65-Peptid NLVPMVATV konnte hier im Gegensatz zum intrazellulären FACS eine sehr niedrige Frequenz Epitop-spezifischer CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden. Für Spender 6 gab es zwei MHC-I-Streptamere, deren Epitope in intrazellulären FACS mit Peptiden nicht getestet werden konnten. Allerdings war das Ergebnis für diese beiden Epitope in der Streptamer-Färbung negativ. Gegen das LMP2a-FLYALALLL Peptid wurden im intrazellulären FACS keine, in der Streptamer-Färbung jedoch eine niedrige Frequenz spezifischer CD8⁺ T-Zellen detektiert. Das positive Ergebnis für die beiden pp65-Epitope NLVPMVATV und QYDPVAALFL konnte in der Oberflächenfärbung mit Streptameren bestätigt werden.

Zusammengefasst konnten die Ergebnisse aus der intrazellulären FACS-Färbung nach Stimulation mit Peptiden in der Oberflächenfärbung mit MHC-I-Streptameren bei hohen Frequenzen Epitop-spezifischer CD8⁺ T-Zellen ausnahmslos bestätigt werden. Für niedrige Frequenzen wichen die Ergebnisse der beiden Nachweismethoden zum Teil etwas voneinander ab (Tabelle 13). Da es leider erst sehr wenige MHC-II-Streptamere und auch nicht alle bekannten MHC-I-Epitope als Streptamer gibt, konnten in dieser Analyse nicht alle im intrazellulären FACS auf Zytokinproduktion nach Stimulation mit Peptiden getesteten Epitope auch in einer Streptamer-Färbung getestet werden.

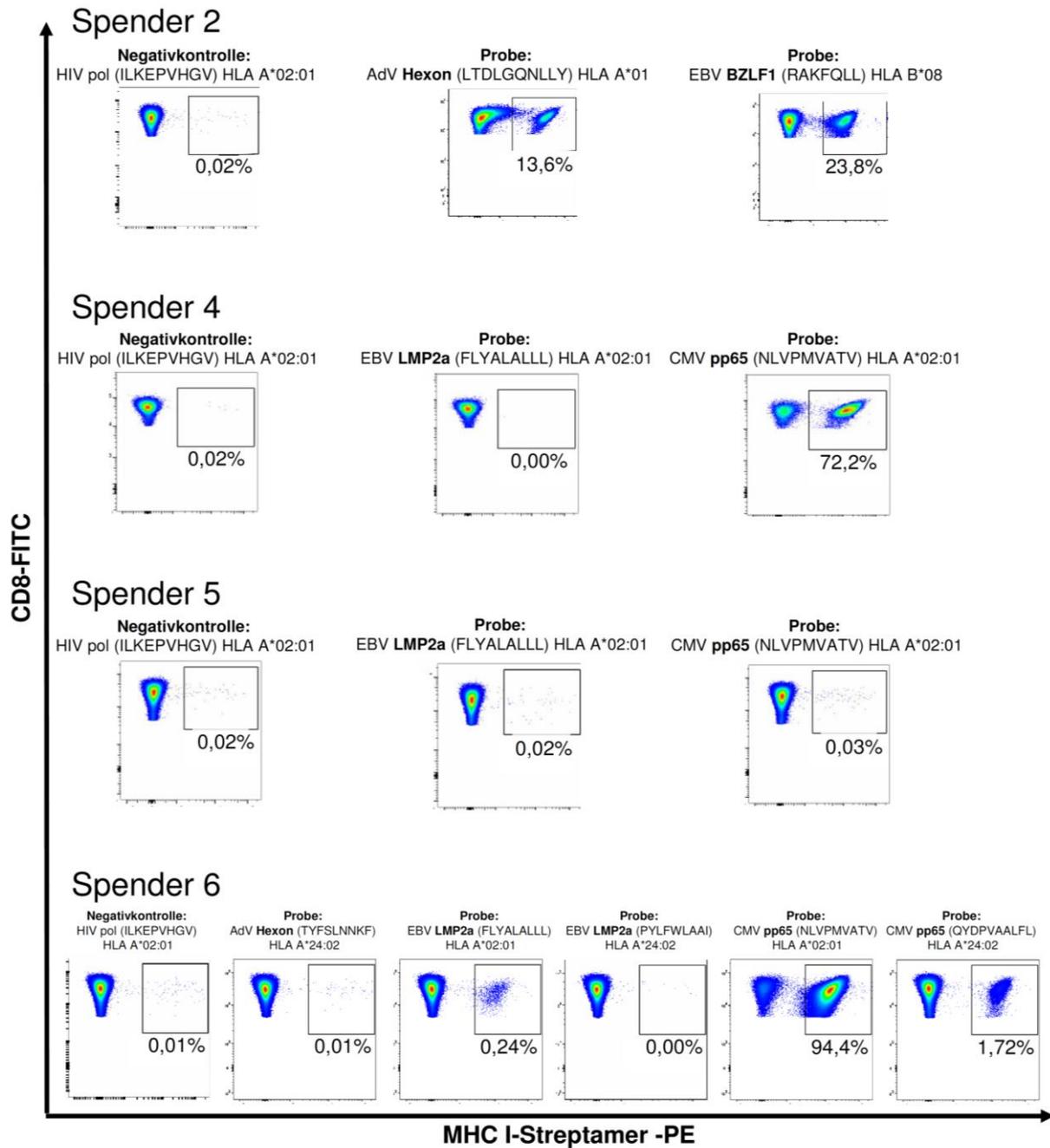


Abbildung 19: Streptamerfärbung Virus-spezifischer T-Zellen nach Isolation und 14-tägiger Expansion

Analyse der expandierten Positivfraktion am Tag 14. Nach der 14-tägigen Kultivierung und Expansion der Virus-spezifischen T-Zellen wurde eine Oberflächenfärbung mit MHC-I-Streptameren durchgeführt. Dazu wurden für die vier Spender die jeweiligen HLA-gematchten Streptamere aus Tabelle 13 verwendet. Dargestellt sind die FACS-Plots der CD8⁺ T-Zellen, aufgetragen gegen MHC-I-Streptamer-Färbung. Zu den Ergebnissen der Messung siehe auch Tabelle 13.

5.5 Vergleich verschiedener EBV-Antigene im Screening

Im Gegensatz zu AdV und CMV, für deren hier ausgewählten Antigene Hexon (AdV) und pp65 (CMV) sehr viele Erfahrungswerte vorliegen, ist es im Fall der EBV-Antigene etwas schwerer, eine Auswahl zu treffen. Daher wurden in dieser Arbeit sowohl die beiden latenten EBV-Antigene EBNA1 und LMP2a, als auch das lytische Antigen BZLF1 verwendet. Um das Problem der Entscheidung zwischen den verschiedenen EBV-Antigenen zu umgehen, wurde von der AG Stevanović (*Interfaculty Institute for Cell Biology, Department of Immunology, Universität Tübingen*) ein Mix von immundominanten Peptiden mit jeweils definierter HLA-Restriktion zusammengestellt, welcher nahezu alle HLA-Typen abdeckt. Dieser Peptid-Mix ist inzwischen auch kommerziell von der Firma Miltenyi erhältlich: Der Consensus-Mix besteht aus 43 Peptiden einer Länge von 8-22 Aminosäuren. Mit dem Peptid-Mix werden 13 verschiedene latente und lytische EBV-Antigene (u.a. EBNA1, LMP2a und BZLF1) abgedeckt. Die Mischung von 32 MHC-Klasse-I- und 11 MHC-Klasse-II-Peptiden erlaubt eine Stimulation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen.

Um zu testen, ob der neue Consensus-Peptid-Mix in Zukunft die drei bisher verwendeten Peptid-Pools bei der T-Zell-Stimulation für eine Anreicherung EBV-spezifischer T-Zellen ersetzen kann, wurden die drei Peptid-Pools EBNA1, LMP2a und BZLF1 in einer intrazellulären FACS-Färbung auf IFN γ -Produktion mit dem Consensus-Mix verglichen. Die Ergebnisse dieser Analyse in Abbildung 20 zeigen sowohl unter den CD4⁺ als auch unter CD8⁺ T-Zellen die höchste Frequenz IFN γ -produzierender T-Zellen nach Stimulation mit dem Consensus-Mix. Der Consensus-Mix kann damit als Alternative für die Stimulation EBV-spezifischer T-Zellen in Betracht gezogen werden und ist inzwischen für den Einsatz im GMP-Reinraumlabor auch in GMP-zertifizierter Qualität verfügbar.

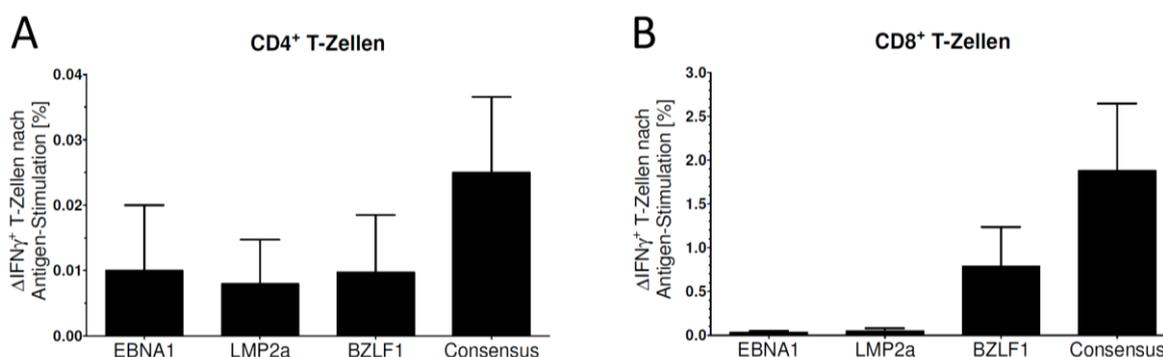


Abbildung 20: Vergleich verschiedener EBV-Antigene

Vergleich von vier verschiedenen Peptid-Pools: EBNA1, LMP2a, BZLF1 und Consensus im intrazellulären FACS zum Nachweis von IFN γ -Produktion. Nach der Isolierung von PBMCs aus Vollblut oder Leukapheresat von gesunden Spendern (n=4) wurde spätestens nach 24 Stunden ein intrazelluläres FACS zum Nachweis von IFN γ -Produktion nach Stimulation mit dem jeweiligen Antigen durchgeführt. Δ IFN γ ⁺ T-Zellen: Die Negativkontrolle wurde bereits abgezogen. In der Grafik finden sich jeweils die Mittelwerte aller Messungen. Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM (Standardfehler des Mittelwerts). (A) CD4⁺ T-Zellen. (B) CD8⁺ T-Zellen.

6 Diskussion

Bei therapieresistenten viralen Infektionen nach allogener HSZT hat sich inzwischen der adoptive T-Zelltransfer Virus-spezifischer T-Zellen auch in der klinischen Anwendung bewährt (siehe dazu auch Kapitel 2.4.2 Adoptiver T-Zelltransfer in der klinischen Anwendung). Allerdings liegen hier die meisten Erfahrungen für den Einsatz Virus-spezifischer T-Zellen gegen einzelne Viren vor. Im Bereich der sogenannten „multivirus-spezifischen“ T-Zellen gibt es bislang nur zwei klinisch erprobte Protokolle, welche noch sehr zeitintensiv in der Herstellung sind^{100,128}. Die Herstellung Virus-spezifischer T-Zellen bleibt jedoch bisher auf wenige klinische Zentren beschränkt, ist kostenintensiv und je nach Protokoll sehr zeitaufwendig. Die vorliegende Arbeit sollte der Analyse eines für den Einsatz in der Klinik geeigneten GMP-konformen und zeitsparenden Protokolls zur simultanen Isolation „multivirus-spezifischer“ T-Zellen dienen. Meiner Meinung nach eignet sich hierfür als Grundprinzip für die Isolierung Antigen-spezifischer T-Zellen die Verwendung der *IFN γ -Catch*-Technik nach *ex vivo* Stimulation mit viralen Antigenen sehr gut. Diese Form der direkten Isolation ermöglicht eine Anreicherung Virus-spezifischer T-Zellen in weniger als 30 Stunden, das T-Zellprodukt enthält danach polyklonale CD4⁺ und CD8⁺ funktionelle T-Zellen und die benötigten Reagenzien sind in GMP-Qualität erhältlich.

6.1 Antigenauswahl und Screening der Spender

Nachdem mit dem CSA die Isolationsmethode feststand, mussten nun geeignete virale Antigene zur Stimulation der Virus-spezifischen T-Zellen gefunden werden. Hierbei wurde bewusst auf die Verwendung von transduzierten B-LCLs, antigengepulste DCs oder andere APCs verzichtet, da die Generierung von APCs im Allgemeinen zeitaufwendig ist, zusätzlich Spender-PBMCs erforderlich sind und eine Verwendung genetisch veränderter Zellen aus regulatorischer Sicht äußerst problematisch ist. Eine geeignete Methode zur Stimulation Virus-spezifischer T-Zellen ist die Verwendung von rekombinant hergestellten Antigenen. So fiel die Wahl auf die in zertifizierter GMP-Qualität erhältlichen Peptid-Pools „PepTivator“ der Firma Miltenyi. Diese Peptid-Pools bestehen aus 15-mer-Peptiden, welche mit 11 Aminosäuren Überlappung das gesamte Protein umspannen. Die gewählten Antigene sollten sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen stimulieren und eine hohe Immunogenität aufweisen. Als CMV-Antigen bietet sich das als sehr immunogen bekannte Matrixprotein pp65 an^{19-23,27}. Für die Stimulation AdV-spezifischer T-Zellen eignet sich das Hexon-Protein sehr gut, da es unter den verschiedenen Spezies eine Homologie von ca. 80% besitzt⁶⁹ und sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ Hexon-spezifische T-Zellen eine ausgeprägte Kreuzreaktivität unter den Spezies aufweist^{56,70-74}. Die Wahl eines geeigneten EBV-Antigens gestaltet sich dagegen etwas schwieriger. Andere Gruppen haben bei der Behandlung von PTLD-Patienten mit EBV-spezifischen T-Zellen bereits resistente EBV-assoziierte PTLDs beobachtet^{88,115}. In einem Fall konnte die Ursache in einer Mutation des EBNA3B-Antigens gefunden werden, die eine Erkennung durch EBV-spezifische T-Zellen unmöglich machte¹²². Andere Forscher fanden Polymorphismen im ansonsten jedoch ziemlich konservierten LMP2a-Antigen¹³⁰, und für EBNA1 ist eine beeinträchtigte Präsentation der

EBNA1-Epitope über MCH-I-Moleküle beschrieben⁴⁵. Um den möglichen Immunevasions-Strategien des EBV am besten entgegenzutreten, wurden drei verschiedene EBV-Antigene ausgewählt: Das in allen Latenzstadien exprimierte sehr immunogene EBNA1, das etwas weniger immundominante LMP2a und das lytische EBV-Antigen BZLF1. Die Rolle BZLF1-spezifischer T-Zellen in der Therapie der PTLD ist allerdings bislang noch nicht abschließend geklärt. Es ist zwar bekannt, dass EBV-assoziierte Lymphome auch wenige lytisch infizierte Zellen beinhalten¹³¹ und diese auch eine wichtige Rolle in der Entstehung einer PTLD spielen¹³²⁻¹³⁴. Wie effektiv BZLF1-spezifische T-Zellen in der Immuntherapie einer EBV-assoziierten PTLD sind, muss jedoch noch genauer in klinischen Studien untersucht werden.

Im Screening der möglichen Spender mittels intrazellulärem FACS konnte mit allen fünf Antigenen eine IFN γ -basierte Immunantwort von sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen ausgelöst werden (Abbildung 6A). Am häufigsten waren dabei unter den CD4⁺ T-Zellen Immunantworten gegen Hexon und LMP2a (je 61% der Spender) und unter CD8⁺ T-Zellen gegen EBNA1 und pp65 (je 56% der Spender) zu finden. Die pp65-spezifischen T-Zellen produzierten im Durchschnitt am meisten INF γ , was sich durch die allgemein bekannte stark ausgeprägte Immunogenität dieses CMV-Antigens erklären lässt (Abbildung 6B)^{19-23,27}. Sollten die T-Zellen eines CMV-seropositiven Spenders nicht auf die Stimulation mit pp65 reagieren, so könnte in Zukunft in solchen Fällen über eine zusätzliche Testung mit dem IE-1-Antigen nachgedacht werden, welches neben pp65 als Hauptziel in der CMV-spezifischen T-Zell-Immunantwort gilt¹⁹⁻²². Die über CD8⁺ T-Zellen vermittelte Immunantwort gegen CMV wird zwar von pp65-spezifischen T-Zellen dominiert²³ und ist auch häufiger gegen pp65 als gegen IE-1 gerichtet^{23,27}, es wurde jedoch beschrieben, dass sich die relative Dominanz pp65- und IE-1-spezifischer T-Zellen von Spender zu Spender unterscheiden kann²⁶. Dass sich gegen IE-1 seltener T-Zellvermittelte Immunantworten finden, könnte daran liegen, dass pp65 die Prozessierung von IE-1-Proteinen direkt inhibiert²⁴. Die Beobachtung anderer Forscher, dass die Immunantwort gegen AdV von CD4⁺ T-Zellen dominiert wird^{68,135}, konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden, da sich im Screening gesunder Spender kein nennenswerter Unterschied in der von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen produzierten Menge IFN γ zeigte. Die beschriebene Prädominanz CD4⁺ T-Zellen in der AdV-spezifischen Immunantwort könnte ihren Ursprung in der AdV-vermittelten Herabregulierung von MHC-Klasse-I-Molekülen auf infizierten Zellen und einer damit verbundenen erschwerten Erkennung AdV-infizierter Zellen über CD8⁺ T-Zellen haben^{136,137}. Bei der Stimulation der Spender-PBMCs mit dem Mix aus allen fünf Antigenen zeigte sich im Vergleich zur separaten Stimulation mit einzelnen Antigenen eine nur wenig beeinträchtigte Antigen-spezifische INF γ -Produktion (Abbildung 7). Die Differenz in der produzierten Menge an INF γ war nur bei den CD8⁺ T-Zellen leicht statistisch signifikant ($P=0,0289$) und im Fall der CD4⁺ T-Zellen lag keine Signifikanz vor. Somit kann hier von einer nur gering ausgeprägten Konkurrenz der Antigene untereinander ausgegangen werden.

6.2 Simultane Isolierung Virus-spezifischer T-Zellen gegen mehrere Antigene

Für die simultane Isolierung Virus-spezifischer T-Zellen gegen mehrere Antigene wurde das Prinzip des CSA mit magnetischer Anreicherung angewendet. Diese Methode erlaubt die Isolierung spezifischer T-Zellen basierend auf ihrer Funktionalität, da hier nur IFN γ -produzierende T-Zellen angereichert werden. Die kurzzeitige Stimulation der T-Zellen nutzt dabei deren konstitutive Eigenschaft, nach spezifischer Stimulation durch Antigene vorübergehend IFN γ zu produzieren. Die Ausschüttung von IFN γ ist dabei reversibel (Abbildung 8) und sollte daher aus regulatorischer Sicht nicht als substantielle Manipulation des Zellprodukts angesehen werden sowie im Patienten bei der Infusion keinen „Zytokinsturm“ (überschießende Zytokinproduktion) auslösen.

Bei der simultanen Isolierung Virus-spezifischer T-Zellen gegen mehrere Antigene war es uns möglich, aus sehr geringen Ausgangsfrequenzen (Mittelwerte: 0,11% CD4⁺ IFN γ ⁺ T-Zellen und 0,66% CD8⁺ IFN γ ⁺ T-Zellen; Tabelle 9) Antigen-spezifische T-Zellen gegen alle drei Viren anzureichern. Die Reinheit der isolierten T-Zellen lag mit 63% CD4⁺ IFN γ ⁺ T-Zellen und 69% CD8⁺ IFN γ ⁺ T-Zellen (Mittelwerte; Tabelle 9) in dem Bereich bisher beschriebener Isolationen „mono-spezifischer“ T-Zellen^{110,111,119,120,124,125}. Wenn die Dosis der applizierten T-Zellen niedrig gehalten wird, ist durch die wenigen enthaltenen unspezifischen T-Zellen auch bei *third-party* Spendern die Gefahr einer GvHD sehr gering, was die bisherigen Erfahrungen mit adoptivem T-Zelltransfer „mono-spezifischer“ T-Zellen in der Tübinger Universitäts-Kinderklinik so bestätigen^{110,120,124,125}.

Bei der Anreicherung war es möglich, sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen zu isolieren (Mittelwerte: 39% CD4⁺ T-Zellen und 49% CD8⁺ T-Zellen; Tabelle 8). Die zur Stimulation verwendeten Peptid-Pools enthalten ursprünglich 15-mer-Peptide und sind daher für die direkte Bindung an MHC-I-Moleküle zu lang und für eine Prozessierung der Peptide in den APCs die kurze Stimulationsdauer von nur sechs Stunden eigentlich zu knapp. Allerdings scheinen die Peptid-Pools genügend passende Peptid-Bruchstücke zu enthalten, um auch CD8⁺ T-Zellen in ausreichendem Maße zu stimulieren (siehe hierzu auch die Ergebnisse aus dem Screening; Abbildung 6).

Für eine erfolgreiche zytotoxische CD8⁺ T-Zell-Immunantwort und die Ausbildung eines langanhaltenden Virus-spezifischen immunologischen Gedächtnisses gegen AdV, EBV und CMV spielen CD4⁺ T-Helferzellen eine wichtige Rolle^{68,83,138-142}. Virus-spezifische CD4⁺ T-Zellen können außerdem auch selbst zytotoxische Eigenschaften besitzen. So wurde zum Beispiel in der Immunantwort gegen AdV beschrieben, dass die AdV-spezifische Zytotoxizität sogar von CD4⁺ T-Zellen dominiert wird¹³⁵. Dies könnte damit zusammenhängen, dass die Erkennung AdV-infizierter Zielzellen durch CD8⁺ T-Zellen durch die Downregulation von MHC-I-Molekülen auf deren Oberfläche erschwert wird^{136,137}. Auch gegen CMV-infizierte Zellen wurden zytotoxische CD4⁺ T-Zellen beschrieben^{143,144}. Gegen die drei verwendeten EBV-Antigene EBNA1¹⁴⁵, LMP2a^{146,147} und BZLF1^{46,148} wurden ebenfalls EBV-spezifische zytotoxische CD4⁺ T-Zellen

gefunden. Die Tatsache, dass sich eine EBV-assoziierte PTLD aus EBV-infizierten B-Zellen, die ja MHC-II-Moleküle exprimieren, entwickelt, macht die Rolle der EBV-spezifischen zytotoxische CD4⁺ T-Zellen noch interessanter.

Im Gegensatz zur Isolation mittels MHC-Multimeren, welche nur für bestimmte HLA-restringierte Epitope verfügbar und weitestgehend auf MHC-Klasse-I-Multimere beschränkt sind, bietet das Prinzip des in dieser Arbeit verwendeten CSA die Möglichkeit, unabhängig vom HLA-Typ des Spenders polyklonale CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellpopulationen zu isolieren. Ein weiterer Vorteil der Isolation mittels CSA liegt darin, dass hiermit ausschließlich funktionelle (IFN γ -produzierende) T-Zellen angereichert werden. Allerdings müssen die T-Zellen dafür zuvor mit viralen Antigenen stimuliert werden, was bei der Isolation mit MHC-Multimeren nicht notwendig ist. Der Zeitaufwand für die Anreicherung Virus-spezifischer T-Zellen ist bei diesen beiden Methoden zur direkten Isolation verhältnismäßig gering. Eine weitere Alternative zur Isolation Antigen-spezifischer T-Zellen ist die *in vitro* Stimulation und Expansion Virus-spezifischer T-Zellen. In den bislang veröffentlichten Studien über den klinischen Einsatz „multivirus-spezifischer“ T-Zellen wurden zur Stimulation Virus-spezifischer T-Zellen mit viralen Vektoren transduzierte B-LCLs¹⁰⁰ oder DCs, bei denen eine Nucleofektion mit für virale Antigene codierenden DNA-Plasmiden durchgeführt wurde¹²⁸, verwendet. Der Einsatz gentechnisch veränderter Zellen erschwert eine behördliche Zulassung der Zelltherapie jedoch extrem. Durch die Expansion *ex vivo* verringert sich zwar die *in vitro* nachgewiesene Alloreaktivität der Antigen-spezifischen T-Zellen⁸⁹, was jedoch nicht zwingend mit einem erhöhten Risiko für eine GvHD im Patienten einhergeht⁹⁰. Des Weiteren wird darüber diskutiert, ob die Proliferation direkt isolierter und applizierter T-Zellen unter physiologischen Bedingungen einen effizienteren immunologischen Schutz bietet als bereits zuvor exzessiv *in vitro* expandierte Zellen. Eine direkte Isolation Virus-spezifischer T-Zellen mittels CSA oder MHC-Multimeren ist also im Gegensatz zur *in vitro* Stimulation und Expansion Virus-spezifischer T-Zellen in einem wesentlich kürzeren Zeitraum und ohne die Verwendung gentechnisch veränderter Zellen durchführbar. Der CSA hat dabei gegenüber den MHC-Multimeren den Vorteil, dass hierbei unabhängig vom HLA-Typ des Spenders polyklonale CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellpopulationen isoliert werden können.

6.3 Expansion Virus-spezifischer T-Zellen

Die an die Isolation der Virus-spezifischen T-Zellen anschließende Expansion über 14 Tage wurde in Gegenwart von bestrahlten autologen PBMCs der Negativfraktion (Verhältnis 100:1), anti-CD3/CD28 Beads (Verhältnis 1:1) und den Zytokinen IL-2 (50 U/ml), IL-7 (10 ng/ml) und IL-15 (10 ng/ml) durchgeführt. Mit diesem Expansionsprotokoll war es möglich, einen sehr kleinen Anteil der Positivfraktion (durchschnittlich $4,98 \times 10^4$ Zellen; Tabelle 7) so zu expandieren, dass eine umfassendere Analyse der unterschiedlichen Spezifitäten der T-Zellen möglich wurde. Die Expansionsrate der Antigen-spezifischen T-Zellen mit diesem Protokoll lag im Mittel bei einer 2.768-fachen Expansion (Min.: 449-fach, Max.: 7.367-fach; Tabelle 7). Während der Expansion verschob sich das Verhältnis von CD4⁺ zu CD8⁺ T-Zellen allerdings leicht: Zu Beginn machten die CD4⁺ T-Zellen 39% und die CD8⁺ T-Zellen 49% der CD3⁺ T-

Zellen aus, nach der Expansion waren nur noch 24% der CD3⁺ T-Zellen CD4-positiv und der Anteil der CD8⁺ T-Zellen war auf 55% angestiegen (Tabelle 8 und Abbildung 12).

Das Expansionsprotokoll begünstigt also die Proliferation von CD8⁺ T-Zellen anscheinend stärker als die der CD4⁺ T-Zellen. Gründe hierfür könnten unterschiedlich ausgeprägte proliferationsfördernde Einflüsse der zugegebenen Zytokine auf die Expansion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sein. Die Rolle von IL-2 als proliferationsfördernder Faktor für antigenspezifische T-Zellen ist wohl bekannt und wird alternativ auch als „*T-cell growth factor*“ bezeichnet¹⁴⁹⁻¹⁵⁵. IL-7 scheint besonders für die Resistenz gegen aktivierungsinduzierten Zelltod und für die Ausbildung und das Überleben von T-Gedächtniszellen von Bedeutung zu sein^{152,155-160}. Die Rolle als proliferationsförderndes Zytokin ist allerdings noch umstritten. Es gibt jedoch einige Hinweise darauf, dass IL-7 besonders zur Proliferation von CD4⁺ T-Gedächtniszellen beiträgt^{155,159}. Hier soll IL-7 in der *ex vivo* Expansion von Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen dem IL-2 sogar überlegen sein¹⁶¹. IL-15 inhibiert wie IL-7 den aktivierungsinduzierten Zelltod, jedoch in geringerem Ausmaß wie IL-7¹⁵². Dafür spielt IL-15 in der Unterstützung der T-Zell-Proliferation eine wichtigere Rolle als IL-7^{152,162,163}, wobei IL-15 die Proliferation von T-Zellen über andere zelluläre Mechanismen als IL-2 reguliert¹⁵³. Der Einfluss auf die Proliferation von CD8⁺ T-Zellen ist dabei deutlich prominenter ausgeprägt als der auf CD4⁺ T-Zellen^{162,163}.

Die Zugabe von IL-2 und IL-15 wirkt sich somit vor allem proliferationsfördernd aus, die Zugabe von IL-7 dient dabei mehr der Inhibierung des aktivierungsinduzierten Zelltods und der Unterstützung der Proliferation von CD4⁺ T-Zellen. Die stärker ausgeprägte Proliferation von CD8⁺ T-Zellen bei der Expansion der isolierten Virus-spezifischen T-Zellen kann somit daran liegen, dass IL-15 einen größeren Effekt auf die Proliferation von CD8⁺ T-Zellen besitzt, welcher durch die Zugabe von IL-7 als proliferationsfördernder Faktor für CD4⁺ T-Zellen nicht ausgeglichen werden konnte.

6.4 Analysen der expandierten Virus-spezifischen T-Zellen

Spezifitäten der T-Zellen nach Stimulation mit einzelnen Antigenen

Als Standardmethode für die Analyse der einzelnen Spezifitäten Virus-spezifischer T-Zellen nach der Expansion wurde wie beim Screening ein intrazelluläres FACS zum Nachweis von IFN γ -Produktion nach Stimulation mit den einzelnen Antigenen gewählt. Nach der 14-tägigen Expansion zeigten hierbei durchschnittlich 40% der CD4⁺ T-Zellen und 55% der CD8⁺ T-Zellen eine Antigen-spezifische IFN γ -Produktion nach Stimulation mit dem Mix aus allen Antigenen (Tabelle 9). Eine simultane Isolation Virus-spezifischer T-Zellen gegen mehrere Antigene war bis auf eine Ausnahme (Spender 3b, pp65-spezifische T-Zellen; Abbildung 15 und Abbildung 16) mindestens für CD4⁺ oder für CD8⁺ T-Zellen erfolgreich. Daher ist es nicht prinzipiell möglich, mit der gewählten Screening-Methode eine 100%-ige Aussage über den Erfolg einer geplanten Isolation vorherzusagen. So war bei Spender 3b die Anreicherung pp65-spezifischer T-Zellen trotz leicht positiv ausgefallenem Screening nicht möglich. Die Kriterien für ein positives Screeningergebnis zu verschärfen, würde jedoch dazu führen, dass noch mehr Ergebnisse aus dem Screening als negativ eingestuft werden, obwohl eine Anreicherung der entsprechenden

Spezifität möglich wäre. Als Beispiel dafür kann Spender 6 herangezogen werden, bei dem es möglich war, EBV-spezifische T-Zellen trotz negativ ausgefallenem Screening zu isolieren. Die Ergebnisse liegen bei dieser Methode wegen der niedrigen Frequenz Virus-spezifischer T-Zellen zu nahe an der Nachweisgrenze. Die direkte *ex vivo* Analyse wurde hier trotz der niedrigen Frequenzen im peripheren Blut zirkulierender Virus-spezifischer T-Zellen ursprünglich deshalb ausgewählt, weil die Anreicherung der T-Zellen später ebenfalls direkt *ex vivo* erfolgt. Eine Möglichkeit, die Sensitivität und Spezifität zu erhöhen, wäre, die Spender-PBMCs vor dem Screening zunächst für einige Tage unter Zugabe von viralen Antigenen zu expandieren und somit die Frequenz der Virus-spezifischen T-Zellen zu erhöhen, auch wenn dieses Vorgehen dann nicht mehr direkt mit der Situation bei der Isolation der T-Zellen vergleichbar wäre und somit erst gesondert validiert werden müssten.

Bei der Analyse der relativen Frequenzen der einzelnen Spezifitäten fällt auf, dass unter den CD4⁺ T-Zellen sowohl beim Screening als auch bei der Analyse die Hexon-spezifischen T-Zellen und unter den CD8⁺ T-Zellen BZLF1- und pp65-spezifische T-Zellen dominieren (Abbildung 16). Zu Beginn stellte sich die Frage, ob eine dominierende Spezifität die Isolation anderer Spezifitäten behindern könnte. Diese Annahme konnte nicht bestätigt werden. Die Verteilung der einzelnen Spezifitäten blieb in ihrer relativen Frequenz zueinander sogar so ähnlich, dass sich für die Verschiebung der relativen Frequenzen vom Screening zur Analyse keine statistisch signifikante Änderung ergab (Abbildung 16). Trotzdem zeichnet sich unter den CD8⁺ T-Zellen die Tendenz ab, dass die relative Frequenz Hexon-spezifischer T-Zellen eher ab- und die der BZLF1-spezifischen T-Zellen eher zunimmt. Die absolute Zellzahl oder die relative Frequenz einzelner Spezifitäten im T-Zellprodukt scheint jedoch ohnehin eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. Bisher konnte im klinischen Einsatz Virus-spezifischer T-Zellen gegen einzelne Viren kein Zusammenhang zwischen der verabreichten T-Zell-Dosis und deren Wirksamkeit gefunden werden. So war zum Beispiel im adoptiven Transfer über CSA angereicherter EBNA1-spezifischer T-Zellen in der Behandlung einer PTLD und ausgeprägter EBV-Virämie sogar eine Dosis von nur 148 T-Zellen/kg Körpergewicht ausreichend, den Patienten sowohl von der PTLD als auch der Virämie komplett zu heilen¹²⁰. In Mausexperimenten konnte zudem gezeigt werden, dass eine einzelne adoptiv-transferierte CD8⁺ T-Zelle in verschiedene Effektor- und Gedächtnis-Subpopulationen ausdifferenzieren und einen ausreichenden immunologischen Schutz ausbilden kann¹⁶⁴⁻¹⁶⁶. So scheint wohl weniger die Quantität als die Qualität der T-Zellen von Bedeutung. Die Qualität der Antigen-spezifischen T-Zellen für den adoptiven T-Zelltransfer könnte hierbei in Zukunft mehr durch die Avidität der Virus-spezifischen T-Zellen und deren Expansions- und Selbsterneuerungspotential definiert werden.

Polyfunktionalität der T-Zellen

Die Polyfunktionalität der Virus-spezifischen T-Zellen wurde mittels intrazellulärem FACS zum Nachweis von IFN γ -, TNF α - und IL-2-Produktion nach Stimulation mit den einzelnen Antigenen ermittelt (Abbildung 17). Dabei zeigten die angereicherten Virus-spezifischen T-Zellen neben der nach der Isolation, basierend auf ihrer Fähigkeit IFN γ zu produzieren, zu erwartenden Antigen-spezifischen IFN γ -Produktion, auch eine Antigen-spezifische TNF α - und IL-2-

Produktion. Unter den polyfunktionellen T-Zellen produzierten die meisten T-Zellen IFN γ zusammen mit einem oder beiden anderen T_H1-Zytokinen. Diese Hierarchie im Zytokinexpressions-Profil Virus-spezifischer T-Zellen wurde auch von anderen Forschern beschrieben und damit in Zusammenhang gebracht, dass eine funktionale Ausdifferenzierung mit der gesteigerten Fähigkeit zur synchronen Produktion mehrerer Zytokine und darunter insbesondere der IL-2-Produktion einhergeht¹⁶⁷. Die Polyfunktionalität Antigen-spezifischer T-Zellen wird ebenfalls mit einer gesteigerten Antigen-Sensitivität und besserer Kontrolle viraler Infektionen in Zusammenhang gebracht¹⁶⁸⁻¹⁷¹. Dabei gilt die Produktion der typischen T_H1-Zytokine IFN γ -, TNF α - und IL-2 auch als Merkmal hoch-aviden T-Zellen, die im Gegensatz zu weniger aviden T-Zellen virus-infizierte Zellen besser kontrollieren können^{167,172}.

Epitopspezifität der T-Zellen

Bei der Anreicherung Virus-spezifischer T-Zellen nach Stimulation mit einem ganzen Pool aus viralen Peptiden können im Gegensatz zur Stimulation mit einzelnen HLA-gematchten Peptiden polyklonale CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen stimuliert und isoliert werden. Ein Peptid-Pool, welcher das gesamte virale Protein in Form von sich überlappenden Peptiden abdeckt, enthält zudem auch bisher unbekannte HLA-bindende Peptid-Motive. Allerdings enthält ein solcher Peptid-Pool für die einzelnen Spender jeweils unzählige unbrauchbare Peptide, was eine Stimulation durch die wenigen immundominanten Epitope eventuell behindern könnte. Um diese Fragen zu adressieren, wurden zwei verschiedene Methoden zur Überprüfung der Epitopspezifität der isolierten Virus-spezifischen T-Zellen angewendet: das intrazelluläre FACS zum Nachweis auf IFN γ -Produktion nach Stimulation mit HLA-gematchten Peptiden und eine Färbung mit MHC-Multimeren (Streptamere). Beim intrazellulären FACS wurden für jeden Spender einige bekannte immundominante HLA-bindende Peptid-Motive aus der SYFPEITHI-Datenbank ausgewählt und im Vergleich zu den ganzen Peptid-Pools getestet (Tabelle 13). Bei jedem getesteten Spender konnten so einige immundominante Epitope bestätigt werden. Dabei waren bei sieben Peptiden über 50% der mit dem Peptid-Pool angereicherten T-Zellen spezifisch für nur ein immundominantes Epitop, darunter bei fünf Peptiden sogar 90 – 100%. Also werden auch bei einer Anreicherung unter Verwendung eines Peptid-Pools die besonders immundominanten Epitope gut erkannt. Wurden mit dem getesteten Peptid keine oder nur wenig spezifische T-Zellen detektiert, so muss dieser Umstand nicht bedeuten, dass die T-Zellen hier unspezifisch angereichert wurden, sondern es könnte sich hier durchaus um spezifische T-Zellen gegen bisher unbekannte Epitope handeln. Dies macht gleichzeitig deutlich, dass bei einer Isolation, basierend auf einer Stimulation nur mit einzelnen Peptiden, eventuell weniger spezifische T-Zellen angereichert werden als mit dem ganzen Peptid-Pool. Will man also möglichst polyklonale Virus-spezifische T-Zellen gegen alle möglichen Epitope anreichern, eignet sich der Peptid-Pool sehr gut. Bei hohen Frequenzen Epitop-spezifischer T-Zellen konnte das Ergebnis aus dem intrazellulären FACS mit den vorhandenen Streptameren bestätigt werden. Bei sehr geringen Frequenzen nahe der Nachweisgrenze gab es allerdings kleine Abweichungen zwischen der Streptamer-Färbung und dem Ergebnis aus dem intrazellulären FACS. In der Streptamer-Färbung lagen die absoluten Frequenzen spezifischer T-Zellen jeweils deutlich über denen im

intrazellulären FACS. Dies ist dem Umstand geschuldet, dass bei der Oberflächenfärbung mit Streptameren alle T-Zellen mit Peptid-spezifischem T-Zell-Rezeptor erfasst werden, im intrazellulären FACS nur die funktionellen spezifischen T-Zellen. Das bedeutet gleichzeitig, dass nicht alle T-Zellen, die im intrazellulären FACS nach der Expansion (Tabelle 9) kein INF γ produzieren, unspezifisch sind, sondern sicher zum Teil zwar durchaus Antigen-spezifisch sein können, im Moment der Analyse nur gerade aber kein INF γ produzieren.

6.5 Neue EBV-Antigene für die Isolierung EBV-spezifischer T-Zellen

Wie bereits beschrieben, ist die Auswahl eines geeigneten Antigens für die Stimulation EBV-spezifischer T-Zellen aufgrund der Gefahr einer Resistenzentwicklung und verschiedener *Immune-Escape*-Mechanismen der EBV-assoziierten PTLD nicht ganz einfach, weswegen hier der Einsatz polyklonaler CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen gegen mehrere Antigene favorisiert wurde. Zu Beginn dieser Arbeit standen für die Stimulation EBV-spezifischer T-Zellen drei GMP-zertifizierte Peptid-Pools zur Verfügung: EBNA1, LMP2a und BZLF1. Inzwischen gibt es jedoch einen in GMP-zertifizierter Qualität erhältlichen Mix von immundominanten Peptiden mit jeweils definierter HLA-Restriktion, welcher nahezu alle HLA-Typen abdeckt: Der Consensus-Mix (Firma Miltenyi) besteht aus 43 Peptiden einer Länge von 8-22 Aminosäuren, deckt 13 verschiedene latente und lytische EBV-Antigene (u.a. EBNA1, LMP2a und BZLF1) ab und besteht aus 32 MHC-Klasse-I- und 11 MHC-Klasse-II-Peptiden. Es sollte hiermit also ebenfalls möglich sein, polyklonale CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen gegen mehrere Epitope zu stimulieren, ohne drei Peptid-Pools verwenden zu müssen. Die Ergebnisse aus dem ersten Vergleich der drei Peptid-Pools mit dem Consensus-Mix im intrazellulären FACS auf IFN γ -Produktion sind vielversprechend (Abbildung 20). Hier löste der Consensus-Mix sowohl unter den CD4⁺ als auch den CD8⁺ T-Zellen die stärkste IFN γ -Produktion aus. Auch wenn der Consensus-Mix sicher nicht für jeden HLA-Typ jedes immundominante EBV-Epitop enthält, kann dieser als Ersatz für die einzelnen Peptid-Pools in Betracht gezogen werden.

6.6 Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte ein standardisiertes GMP-Protokoll zur simultanen *ex vivo* Isolation Antigen-spezifischer T-Zellen gegen mehrere Viren zur Therapie und gleichzeitiger Prophylaxe multipler Infektionen nach allogener HSZT entwickelt und charakterisiert werden. Die Anreicherung polyklonaler CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen gegen mehrere Viren aus sehr geringen Ausgangsfrequenzen in weniger als 30 Stunden war dabei auch in Anwesenheit sehr immundominanter einzelner Spezifitäten erfolgreich. In einigen Fällen war es bereits möglich, deren klinische Wirksamkeit im Rahmen von sogenannten „individuellen Heilversuchen“ nachzuweisen (Feucht J, Hartl L et al. Manuskript in Vorbereitung). Leider hat sich die verwendete Screening-Methode als nicht ausreichend prädikativ erwiesen und sollte daher Gegenstand weiterer Optimierung sein.

Im Gegensatz zu Protokollen, die eine *ex vivo*-Expansion der Virus-spezifischen T-Zellen einschließen, ist die Zellzahl der Positivfraktion hier deutlich geringer. Die Erfahrungen aus den bisher veröffentlichten klinischen Anwendungen des adoptiven T-Zelltransfers zeigen jedoch, dass dessen Wirksamkeit nicht dosisabhängig ist und dass beim adoptiven Transfer über CSA angereicherter EBNA1-spezifischer T-Zellen sogar eine Dosis von nur 148 T-Zellen/kg Körpergewicht ausreichen kann, um beim Patienten ein komplettes Ansprechen zu erzielen¹²⁰. Neben der höheren Zellzahl des T-Zellprodukts kann die Alloreaktivität der T-Zellen durch eine vorangegangene Expansion *ex vivo* vermindert werden⁸⁹. Allerdings konnte gezeigt werden, dass eine *in vitro* festgestellte Alloreaktivität im Patienten nicht automatisch eine GvHD auslöst⁹⁰ und es liegen inzwischen auch für direkt applizierte Virus-spezifische T-Zellen einige klinische Erfahrungswerte vor, die deren Sicherheit auch in Bezug auf die mögliche Entwicklung einer GvHD bestätigen^{110,111,119,120,124,125}. Die direkte Isolation Virus-spezifischer T-Zellen in sehr kurzer Zeit ist auch unter Verwendung von MHC-Multimeren unter GMP-Bedingungen (mit Streptameren) möglich¹¹². Bei dieser Methode werden die bei der Isolation auf der Zelloberfläche haftenden Streptamere nach der Anreicherungsprozedur komplett von der Zelloberfläche entfernt. Die Isolation mittels MHC-Multimeren ist momentan jedoch leider auf MHC-Klasse-I-Epitope und damit auf die Anreicherung von CD8⁺ T-Zellen beschränkt und außerdem nicht nur auf funktionelle T-Zellen fokussiert.

Mögliche neue Methoden zur Generierung Virus-spezifischer T-Zellen könnten die im Feld der Krebs-Immuntherapie bereits eingesetzten Antigen-spezifischen chimären Antigenrezeptoren (CARs) oder transgene T-Zellrezeptoren einschließen. Ein weiterer Fokus in der Verbesserung des adoptiven T-Zelltransfers könnte auf der Entwicklung neuer Protokolle beruhen, die die Selektion bestimmter T-Zell-Subpopulationen miteinschließt. Hier könnten zum Beispiel die sogenannten „stem cell memory T cells“ (T_{SCM} cells), welche stammzellähnliche Eigenschaften wie eine ausgeprägte Kapazität zu proliferieren oder die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen und in alle anderen T-Zell-Subpopulationen ausdifferenzieren können, ein mögliches Target darstellen¹⁷³. Um die Virus-spezifischen T-Zellen trotz langwieriger Herstellungsprozesse schneller verfügbar zu machen, gibt es bereits Ansätze, mögliche Stammzellspender direkt auch auf die Eignung als T-Zellspender zu testen¹⁷⁴ oder sogar fertig angereicherte Virus-spezifische T-Zellen in *third-party*-Banken zu bevorraten^{116,121}. Der prophylaktische Einsatz Virus-spezifischer T-Zellen war in vorangegangenen Studien meist erfolgreich^{87,88,100,107,108,111}, im Gegensatz zu EBV- und CMV-spezifischen T-Zellen war die Rekonstitution AdV-spezifischer T-Zellen jedoch an eine zum Zeitpunkt der Therapie aktive AdV-Infektion gebunden, was den prophylaktischen Einsatz AdV-spezifischer T-Zellen einschränken könnte¹⁰⁰. Um den adoptiven T-Zelltransfer irgendwann auch als Ergänzung zur bereits vorhandenen pharmakologischen Therapie standardmäßig anwenden zu können, fehlen zurzeit jedoch klinische Phase-III-Studien, die einen direkten Wirksamkeitsvergleich zur Standardtherapie erlauben.

7 Abkürzungsverzeichnis

ACTS	PepMix™ Actin
AdV	Adenovirus
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i>
AS	Aminosäure
B-LCL	<i>B-Lymphoblastoid Cell Line</i>
CAR	Chimärer Antigenrezeptor
CCS	<i>Cytokine Capture System</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CMV	Cytomegalievirus
CSA	<i>Cytokine Sekretion Assay</i>
DC	<i>Dendritic Cell</i> (Dendritische Zelle)
DLI	<i>Donor Lymphocyte Infusion</i>
E-Antigen	<i>Early-Antigen</i>
EBNA1	<i>EBV nuclear antigen 1</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISpot	<i>Enzyme Linked Immuno Spot Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GMP	<i>Good Manufacturing Practice</i>
GvHD	<i>Graft-versus-Host-Disease</i>
HA	Human-Albumin
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HSCT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
ICS	<i>Intracellular Cytokine Staining</i>

IE-Antigen	<i>Immediate Early-Antigen</i>
IFN γ	Interferon- γ
IL-15	Interleukin-15
IL-2	Interleukin-2
IL-7	Interleukin-7
IM	Infektiöse Mononukleose
L-Antigen	<i>Late-Antigen</i>
LMP2a	<i>Latent Membrane Protein 2a</i>
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
MBP	<i>Myelin Basic Protein</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MOG	<i>Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein</i>
MW	Mittelwert
NK Zelle	Natürliche Killerzelle
PB	<i>Pacific Blue</i>
PBMC	<i>Peripheral-Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PE	Phycoerythrin
pp65	Phosphoprotein 65
PTLD	<i>Post-Transplantation Lymphoproliferative Disorder</i>
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SEB	<i>Staphylococcal Enterotoxin B</i>
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> (Standardfehler des Mittelwerts)
SOP	<i>Standard Operating Procedure</i>
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
T _{SCM} cells	<i>Stem cell memory T cells</i>

8 Anhang

8.1 Akademischer Lebenslauf

Lena Hartl, geb. Joachim

Geburtsdatum: 01.12.1985 in Herrenberg
 Sept.1992 – Juni 2005: Waldorfschule Reutlingen
 Juni 2005: Allgemeine Hochschulreife

Studium

Okt. 2005 – April 2010: Pharmaziestudium an der Eberhard Karls Universität Tübingen
 Aug. 2007: Erstes Staatsexamen
 März 2010: Zweites Staatsexamen
 Juni 2011: Drittes Staatsexamen

Tätigkeiten als Hilfwissenschaftlerin:

Arbeitskreis Prof. Heide (Pharmazeutische Biologie):
 Praktikumsbetreuung Molekularbiologie
 Arbeitskreis Prof. Wahl (Pharmazeutische Technologie):
 Praktikumsbetreuung Arzneiformenlehre und feste Arzneiformen

Famulatur: Südapotheke Reutlingen und Sonnenapotheke Reutlingen

Praktisches Jahr

Mai – Okt. 2010: Universitätsapotheke Tübingen
 Nov. 2010 – April 2011: Apotheke an der Friedrichstraße Tübingen

Promotion

Seit Juni 2011: Uniklinikum Tübingen, Kinderklinik
 Thema: „*Charakterisierung von Virus-spezifischen T-Zellen gegen CMV, EBV und AdV nach GMP-konformer, simultaner Isolierung zur adoptiven Immuntherapie*“

Tätigkeiten als Hilfwissenschaftlerin:

Institut für Pharmakologie und Toxikologie:
 Tutorin für Praxisorientiertes Lernen (POL)

8.2 Veröffentlichungen

Adoptive T-cell transfer for refractory viral infections with cytomegalovirus, Epstein-Barr virus or adenovirus after allogeneic stem cell transplantation.

Feucht J, **Joachim L**, Lang P, Feuchtinger T.

Klin Padiatr. 2013 May;225(3):164-9.

Differential expression of T_{HELPER} 1 cytokines upon antigen stimulation predicts ex vivo proliferative potential and cytokine production of virus-specific T cells following re-stimulation.

Feucht J, Leibold J, Halder A, Kayser S, **Hartl L**, Rammensee HG, Handgretinger R, Feuchtinger T

Transpl Infect Dis. 2014;16(5):713-723

Adoptive T-cell therapy with hexon-specific T_{HELPER}-1 cells as a treatment for refractory adenovirus infection after HSCT

Feucht J, Opherk K, Lang P, Kayser S, **Hartl L**, Bethge W, Matthes-Martin S, Bader P, Albert MH, Maecker-Kolhoff B, Greil J, Einsele H, Schlegel PG, Schuster FR, Kremens B, Rossig C, Gruhn B, Handgretinger R, Feuchtinger T.

Blood. 2015

9 Danksagung

Mein Dank gilt:

Tobias Feuchtinger für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu dürfen. Für das in mich gesetzte Vertrauen und die gute Betreuung in inhaltlichen und methodischen Fragen.

Hans-Georg Rammensee, dass er mich als Doktorandin in die große Familie der Nachwuchs-Immunologen aufgenommen und dafür gesorgt hat, dass man als Doktorand im Netzwerk des SFB 685 immer gut aufgehoben ist.

Der ganzen AG Feuchtinger (Simone, Cristina, Judith, Manon, Marie-Luise, Sylvia, Roksana und Sarah) für die kollegiale und fachliche Unterstützung während meiner Jahre im Labor. Ganz besonders Marie und unserer Labor-Nachbarin Ursula für die vielen aufbauenden Worte wenn es mal nicht so rund lief!

Dem Reinraum-Team Christiane, Adelheid und Michael für die Organisation und Durchführung der Isolationen Virus-spezifischer T-Zellen für die Patienten.

Stefan Stevanović und seiner AG für die Beratung in allen Fragen rund um die Peptide und natürlich für die vielen großzügigen „Peptid-Spenden“ für meine Arbeit.

Dem SFB 685 für die Finanzierung und die Möglichkeit, im Graduiertenkolleg stets auch über den eigenen Tellerrand hinweg andere Projekte kennenzulernen und das tolle Netzwerk, in das man hier eingebunden wird.

Meiner Familie und meinen Freunden, die mir während meines Studiums und der Doktorarbeit immer zur Seite standen und mich auch gerne von meinen „Labor-Sorgen“ abgelenkt haben!

Ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Dominik, der einfach immer für mich da ist!

10 Literaturverzeichnis

1. Bahceci E, Epperson D, Douek DC, Melenhorst JJ, Childs RC, Barrett AJ. Early reconstitution of the T-cell repertoire after non-myeloablative peripheral blood stem cell transplantation is from post-thymic T-cell expansion and is unaffected by graft-versus-host disease or mixed chimaerism. *Br J Haematol.* 2003;122(6):934-943.
2. Small TN, Papadopoulos EB, Boulad F, et al. Comparison of immune reconstitution after unrelated and related T-cell-depleted bone marrow transplantation: effect of patient age and donor leukocyte infusions. *Blood.* 1999;93(2):467-480.
3. Federmann B, Hagele M, Pfeiffer M, et al. Immune reconstitution after haploidentical hematopoietic cell transplantation: impact of reduced intensity conditioning and CD3/CD19 depleted grafts. *Leukemia.* 2011;25(1):121-129.
4. Gratwohl A, Brand R, Frassoni F, et al. Cause of death after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in early leukaemias: an EBMT analysis of lethal infectious complications and changes over calendar time. *Bone Marrow Transplant.* 2005;36(9):757-769.
5. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, et al. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: a global perspective. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009;15(10):1143-1238.
6. Kano Y, Shiohara T. Current understanding of cytomegalovirus infection in immunocompetent individuals. *J Dermatol Sci.* 2000;22(3):196-204.
7. Quinnan GV, Jr., Kirmani N, Rook AH, et al. Cytotoxic t cells in cytomegalovirus infection: HLA-restricted T-lymphocyte and non-T-lymphocyte cytotoxic responses correlate with recovery from cytomegalovirus infection in bone-marrow-transplant recipients. *N Engl J Med.* 1982;307(1):7-13.
8. Reusser P, Riddell SR, Meyers JD, Greenberg PD. Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood.* 1991;78(5):1373-1380.
9. Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 2002;34(8):1094-1097.
10. Heinemann MH. Characteristics of cytomegalovirus retinitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med.* 1992;92(2A):12S-16S.
11. Ljungman P, Biron P, Bosi A, et al. Cytomegalovirus interstitial pneumonia in autologous bone marrow transplant recipients. Infectious Disease Working Party of the European Group for Bone Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1994;13(2):209-212.
12. Heurlin N, Brattstrom C, Lonnqvist B, Westman L, Lidman C, Andersson J. Aetiology of pulmonary diseases in immunocompromised patients. *Eur Respir J.* 1991;4(1):10-18.
13. Hackman RC, Wolford JL, Gleaves CA, et al. Recognition and rapid diagnosis of upper gastrointestinal cytomegalovirus infection in marrow transplant recipients. A comparison of seven virologic methods. *Transplantation.* 1994;57(2):231-237.
14. Kaplan CS, Petersen EA, Icenogle TB, et al. Gastrointestinal cytomegalovirus infection in heart and heart-lung transplant recipients. *Arch Intern Med.* 1989;149(9):2095-2100.
15. Hebart H, Einsele H. Specific infectious complications after stem cell transplantation. *Support Care Cancer.* 2004;12(2):80-85.

16. Bollard CM, Kuehnle I, Leen A, Rooney CM, Heslop HE. Adoptive immunotherapy for posttransplantation viral infections. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2004;10(3):143-155.
17. Trincado DE, Rawlinson WD. Congenital and perinatal infections with cytomegalovirus. *J Paediatr Child Health.* 2001;37(2):187-192.
18. Alford CA, Stagno S, Pass RF, Britt WJ. Congenital and perinatal cytomegalovirus infections. *Rev Infect Dis.* 1990;12 Suppl 7:S745-753.
19. McLaughlin-Taylor E, Pande H, Forman SJ, et al. Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8+ virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Med Virol.* 1994;43(1):103-110.
20. Gibson L, Piccinini G, Lilleri D, et al. Human cytomegalovirus proteins pp65 and immediate early protein 1 are common targets for CD8+ T cell responses in children with congenital or postnatal human cytomegalovirus infection. *J Immunol.* 2004;172(4):2256-2264.
21. Khan N, Cobbold M, Keenan R, Moss PA. Comparative analysis of CD8+ T cell responses against human cytomegalovirus proteins pp65 and immediate early 1 shows similarities in precursor frequency, oligoclonality, and phenotype. *J Infect Dis.* 2002;185(8):1025-1034.
22. Borysiewicz LK, Hickling JK, Graham S, et al. Human cytomegalovirus-specific cytotoxic T cells. Relative frequency of stage-specific CTL recognizing the 72-kD immediate early protein and glycoprotein B expressed by recombinant vaccinia viruses. *J Exp Med.* 1988;168(3):919-931.
23. Wills MR, Carmichael AJ, Mynard K, et al. 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.* 1996;70(11):7569-7579.
24. Gilbert MJ, Riddell SR, Plachter B, Greenberg PD. Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product. *Nature.* 1996;383(6602):720-722.
25. Gilbert MJ, Riddell SR, Li CR, Greenberg PD. Selective interference with class I major histocompatibility complex presentation of the major immediate-early protein following infection with human cytomegalovirus. *J Virol.* 1993;67(6):3461-3469.
26. Kern F, Surel IP, Faulhaber N, et al. Target structures of the CD8(+)-T-cell response to human cytomegalovirus: the 72-kilodalton major immediate-early protein revisited. *J Virol.* 1999;73(10):8179-8184.
27. Gyulai Z, Endresz V, Burian K, et al. 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.* 2000;181(5):1537-1546.
28. Reddehase MJ. Antigens and immunoevasins: opponents in cytomegalovirus immune surveillance. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(11):831-844.
29. Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet.* 1964;1(7335):702-703.
30. Wolf H, Zur Hausen H, Klein G, Becker V, Henle G, Henle W. Attempts to detect virus-specific DNA sequences in human tumors. III. Epstein-Barr viral DNA in non-lymphoid nasopharyngeal carcinoma cells. *Med Microbiol Immunol.* 1975;161(1):15-21.
31. Miller G, Shope T, Coope D, et al. Lymphoma in cotton-top marmosets after inoculation with Epstein-Barr virus: tumor incidence, histologic spectrum antibody responses,

- demonstration of viral DNA, and characterization of viruses. *J Exp Med.* 1977;145(4):948-967.
32. Hsu JL, Glaser SL. Epstein-barr virus-associated malignancies: epidemiologic patterns and etiologic implications. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2000;34(1):27-53.
 33. Rowe M, Young LS, Cadwallader K, Petti L, Kieff E, Rickinson AB. Distinction between Epstein-Barr virus type A (EBNA 2A) and type B (EBNA 2B) isolates extends to the EBNA 3 family of nuclear proteins. *J Virol.* 1989;63(3):1031-1039.
 34. Dambaugh T, Hennessy K, Chamnankit L, Kieff E. U2 region of Epstein-Barr virus DNA may encode Epstein-Barr nuclear antigen 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81(23):7632-7636.
 35. Wraitham MN, Stewart JP, Janjua NJ, et al. Antigenic and sequence variation in the C-terminal unique domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-1. *Virology.* 1995;208(2):521-530.
 36. Bhatia K, Raj A, Guitierrez MI, et al. Variation in the sequence of Epstein Barr virus nuclear antigen 1 in normal peripheral blood lymphocytes and in Burkitt's lymphomas. *Oncogene.* 1996;13(1):177-181.
 37. Habeshaw G, Yao QY, Bell AI, Morton D, Rickinson AB. Epstein-barr virus nuclear antigen 1 sequences in endemic and sporadic Burkitt's lymphoma reflect virus strains prevalent in different geographic areas. *J Virol.* 1999;73(2):965-975.
 38. Crawford DH, Macsween KF, Higgins CD, et al. A cohort study among university students: identification of risk factors for Epstein-Barr virus seroconversion and infectious mononucleosis. *Clin Infect Dis.* 2006;43(3):276-282.
 39. Hislop AD, Taylor GS, Sauce D, Rickinson AB. Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:587-617.
 40. Rickinson AB, Long HM, Palendira U, Munz C, Hislop AD. Cellular immune controls over Epstein-Barr virus infection: new lessons from the clinic and the laboratory. *Trends Immunol.* 2014;35(4):159-169.
 41. Thorley-Lawson DA, Allday MJ. The curious case of the tumour virus: 50 years of Burkitt's lymphoma. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(12):913-924.
 42. Leen AM, Heslop HE. Cytotoxic T lymphocytes as immune-therapy in haematological practice. *Br J Haematol.* 2008;143(2):169-179.
 43. Leen A, Meij P, Redchenko I, et al. Differential immunogenicity of Epstein-Barr virus latent-cycle proteins for human CD4(+) T-helper 1 responses. *J Virol.* 2001;75(18):8649-8659.
 44. Ning RJ, Xu XQ, Chan KH, Chiang AK. Long-term carriers generate Epstein-Barr virus (EBV)-specific CD4(+) and CD8(+) polyfunctional T-cell responses which show immunodominance hierarchies of EBV proteins. *Immunology.* 2011;134(2):161-171.
 45. Levitskaya J, Sharipo A, Leonchiks A, Ciechanover A, Masucci MG. 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.* 1997;94(23):12616-12621.
 46. Long HM, Leese AM, Chagoury OL, et al. Cytotoxic CD4+ T cell responses to EBV contrast with CD8 responses in breadth of lytic cycle antigen choice and in lytic cycle recognition. *J Immunol.* 2011;187(1):92-101.

47. Pudney VA, Leese AM, Rickinson AB, Hislop AD. CD8+ immunodominance among Epstein-Barr virus lytic cycle antigens directly reflects the efficiency of antigen presentation in lytically infected cells. *J Exp Med.* 2005;201(3):349-360.
48. Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, Ward TG. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1953;84(3):570-573.
49. Enders JF, Bell JA, Dingle JH, et al. Adenoviruses: group name proposed for new respiratory-tract viruses. *Science.* 1956;124(3212):119-120.
50. Huang GH, Xu WB. [Recent advance in new types of human adenovirus]. *Bing Du Xue Bao.* 2013;29(3):342-348.
51. Hale GA, Heslop HE, Krance RA, et al. Adenovirus infection after pediatric bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1999;23(3):277-282.
52. Ghebremedhin B. Human adenovirus: Viral pathogen with increasing importance. *Eur J Microbiol Immunol (Bp).* 2014;4(1):26-33.
53. Walls T, Shankar AG, Shingadia D. Adenovirus: an increasingly important pathogen in paediatric bone marrow transplant patients. *Lancet Infect Dis.* 2003;3(2):79-86.
54. Hierholzer JC. Adenoviruses in the immunocompromised host. *Clin Microbiol Rev.* 1992;5(3):262-274.
55. Gray GC, McCarthy T, Lebeck MG, et al. Genotype prevalence and risk factors for severe clinical adenovirus infection, United States 2004-2006. *Clin Infect Dis.* 2007;45(9):1120-1131.
56. Flomenberg P, Piaskowski V, Truitt RL, Casper JT. Characterization of human proliferative T cell responses to adenovirus. *J Infect Dis.* 1995;171(5):1090-1096.
57. Kampmann B, Cubitt D, Walls T, et al. Improved outcome for children with disseminated adenoviral infection following allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol.* 2005;130(4):595-603.
58. de Mezerville MH, Tellier R, Richardson S, Hebert D, Doyle J, Allen U. Adenoviral infections in pediatric transplant recipients: a hospital-based study. *Pediatr Infect Dis J.* 2006;25(9):815-818.
59. Tebruegge M, Curtis N. Adenovirus: an overview for pediatric infectious diseases specialists. *Pediatr Infect Dis J.* 2012;31(6):626-627.
60. Flomenberg P, Babbitt J, Drobyski WR, et al. Increasing incidence of adenovirus disease in bone marrow transplant recipients. *J Infect Dis.* 1994;169(4):775-781.
61. van Tol MJ, Kroes AC, Schinkel J, et al. Adenovirus infection in paediatric stem cell transplant recipients: increased risk in young children with a delayed immune recovery. *Bone Marrow Transplant.* 2005;36(1):39-50.
62. Howard DS, Phillips IG, Reece DE, et al. Adenovirus infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 1999;29(6):1494-1501.
63. Hoffman JA, Shah AJ, Ross LA, Kapoor N. Adenoviral infections and a prospective trial of cidofovir in pediatric hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2001;7(7):388-394.
64. Ljungman P, Ribaud P, Eyrich M, et al. Cidofovir for adenovirus infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a survey by the Infectious Diseases Working Party

- of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2003;31(6):481-486.
65. Yusuf U, Hale GA, Carr J, et al. Cidofovir for the treatment of adenoviral infection in pediatric hematopoietic stem cell transplant patients. *Transplantation.* 2006;81(10):1398-1404.
66. Heemskerk B, Lankester AC, van Vreeswijk T, et al. Immune reconstitution and clearance of human adenovirus viremia in pediatric stem-cell recipients. *J Infect Dis.* 2005;191(4):520-530.
67. Feuchtinger T, Richard C, Pfeiffer M, et al. Adenoviral infections after transplantation of positive selected stem cells from haploidentical donors in children: an update. *Klin Padiatr.* 2005;217(6):339-344.
68. Zandvliet ML, Falkenburg JH, van Liempt E, et al. Combined CD8+ and CD4+ adenovirus hexon-specific T cells associated with viral clearance after stem cell transplantation as treatment for adenovirus infection. *Haematologica.* 2010;95(11):1943-1951.
69. Crawford-Miksza L, Schnurr DP. Analysis of 15 adenovirus hexon proteins reveals the location and structure of seven hypervariable regions containing serotype-specific residues. *J Virol.* 1996;70(3):1836-1844.
70. Smith CA, Woodruff LS, Rooney C, Kitchingman GR. Extensive cross-reactivity of adenovirus-specific cytotoxic T cells. *Hum Gene Ther.* 1998;9(10):1419-1427.
71. Olive M, Eisenlohr L, Flomenberg N, Hsu S, Flomenberg P. The adenovirus capsid protein hexon contains a highly conserved human CD4+ T-cell epitope. *Hum Gene Ther.* 2002;13(10):1167-1178.
72. Leen AM, Sili U, Vanin EF, et al. Conserved CTL epitopes on the adenovirus hexon protein expand subgroup cross-reactive and subgroup-specific CD8+ T cells. *Blood.* 2004;104(8):2432-2440.
73. Heemskerk B, Veltrop-Duits LA, van Vreeswijk T, et al. Extensive cross-reactivity of CD4+ adenovirus-specific T cells: implications for immunotherapy and gene therapy. *J Virol.* 2003;77(11):6562-6566.
74. Hutnick NA, Carnathan D, Demers K, Makedonas G, Ertl HC, Betts MR. Adenovirus-specific human T cells are pervasive, polyfunctional, and cross-reactive. *Vaccine.* 2010;28(8):1932-1941.
75. Kolb HJ, Mittermuller J, Clemm C, et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood.* 1990;76(12):2462-2465.
76. Papadopoulos EB, Ladanyi M, Emanuel D, et al. Infusions of donor leukocytes to treat Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders after allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med.* 1994;330(17):1185-1191.
77. Ciceri F, Bonini C, Markt S, et al. Antitumor effects of HSV-TK-engineered donor lymphocytes after allogeneic stem-cell transplantation. *Blood.* 2007;109(11):4698-4707.
78. Straathof KC, Pule MA, Yotnda P, et al. An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. *Blood.* 2005;105(11):4247-4254.
79. Andre-Schmutz I, Le Deist F, Hacein-Bey-Abina S, et al. Immune reconstitution without graft-versus-host disease after haemopoietic stem-cell transplantation: a phase 1/2 study. *Lancet.* 2002;360(9327):130-137.

80. Solomon SR, Mielke S, Savani BN, et al. Selective depletion of alloreactive donor lymphocytes: a novel method to reduce the severity of graft-versus-host disease in older patients undergoing matched sibling donor stem cell transplantation. *Blood*. 2005;106(3):1123-1129.
81. Amrolia PJ, Muccioli-Casadei G, Huls H, et al. Adoptive immunotherapy with allodepleted donor T-cells improves immune reconstitution after haploidentical stem cell transplantation. *Blood*. 2006;108(6):1797-1808.
82. Riddell SR, Greenberg PD. The use of anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies to clone and expand human antigen-specific T cells. *J Immunol Methods*. 1990;128(2):189-201.
83. Riddell SR, Watanabe KS, Goodrich JM, Li CR, Agha ME, Greenberg PD. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science*. 1992;257(5067):238-241.
84. Einsele H, Roosnek E, Rufer N, et al. Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood*. 2002;99(11):3916-3922.
85. Peggs K, Verfuert S, Mackinnon S. 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*. 2001;97(4):994-1000.
86. Rooney CM, Smith CA, Ng CY, et al. Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation. *Lancet*. 1995;345(8941):9-13.
87. Rooney CM, Smith CA, Ng CY, et al. Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood*. 1998;92(5):1549-1555.
88. Heslop HE, Slobod KS, Pule MA, et al. Long-term outcome of EBV-specific T-cell infusions to prevent or treat EBV-related lymphoproliferative disease in transplant recipients. *Blood*. 2010;115(5):925-935.
89. Rauser G, Einsele H, Sinzger C, et al. Rapid generation of combined CMV-specific CD4+ and CD8+ T-cell lines for adoptive transfer into recipients of allogeneic stem cell transplants. *Blood*. 2004;103(9):3565-3572.
90. Melenhorst JJ, Leen AM, Bollard CM, et al. Allogeneic virus-specific T cells with HLA alloreactivity do not produce GVHD in human subjects. *Blood*. 2010;116(22):4700-4702.
91. Tan R, Xu X, Ogg GS, et al. Rapid death of adoptively transferred T cells in acquired immunodeficiency syndrome. *Blood*. 1999;93(5):1506-1510.
92. Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, et al. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science*. 1996. 274: 94-96. *J Immunol*. 2011;187(1):7-9.
93. Gutgemann I, Fahrner AM, Altman JD, Davis MM, Chien YH. Induction of rapid T cell activation and tolerance by systemic presentation of an orally administered antigen. *Immunity*. 1998;8(6):667-673.
94. Keenan RD, Ainsworth J, Khan N, et al. Purification of cytomegalovirus-specific CD8 T cells from peripheral blood using HLA-peptide tetramers. *Br J Haematol*. 2001;115(2):428-434.
95. Knabel M, Franz TJ, Schiemann M, et al. Reversible MHC multimer staining for functional isolation of T-cell populations and effective adoptive transfer. *Nat Med*. 2002;8(6):631-637.

96. Manz R, Assenmacher M, Pfluger E, Miltenyi S, Radbruch A. Analysis and sorting of live cells according to secreted molecules, relocated to a cell-surface affinity matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(6):1921-1925.
97. Brosterhus H, Brings S, Leyendeckers H, et al. Enrichment and detection of live antigen-specific CD4(+) and CD8(+) T cells based on cytokine secretion. *Eur J Immunol*. 1999;29(12):4053-4059.
98. Wolfl M, Kuball J, Ho WY, et al. Activation-induced expression of CD137 permits detection, isolation, and expansion of the full repertoire of CD8+ T cells responding to antigen without requiring knowledge of epitope specificities. *Blood*. 2007;110(1):201-210.
99. Frentsch M, Arbach O, Kirchhoff D, et al. Direct access to CD4+ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression. *Nat Med*. 2005;11(10):1118-1124.
100. Leen AM, Myers GD, Sili U, et al. Monoculture-derived T lymphocytes specific for multiple viruses expand and produce clinically relevant effects in immunocompromised individuals. *Nat Med*. 2006;12(10):1160-1166.
101. Fujita Y, Leen AM, Sun J, et al. Exploiting cytokine secretion to rapidly produce multivirus-specific T cells for adoptive immunotherapy. *J Immunother*. 2008;31(7):665-674.
102. Gerdemann U, Vera JF, Rooney CM, Leen AM. Generation of multivirus-specific T cells to prevent/treat viral infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *J Vis Exp*. 2011(51).
103. Zandvliet ML, van Liempt E, Jedema I, et al. Simultaneous isolation of CD8(+) and CD4(+) T cells specific for multiple viruses for broad antiviral immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation. *J Immunother*. 2011;34(3):307-319.
104. Khanna N, Stuehler C, Conrad B, et al. Generation of a multipathogen-specific T-cell product for adoptive immunotherapy based on activation-dependent expression of CD154. *Blood*. 2011;118(4):1121-1131.
105. Walter EA, Greenberg PD, Gilbert MJ, et al. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med*. 1995;333(16):1038-1044.
106. Peggs KS, Verfuert S, Pizzey A, et al. Adoptive cellular therapy for early cytomegalovirus infection after allogeneic stem-cell transplantation with virus-specific T-cell lines. *Lancet*. 2003;362(9393):1375-1377.
107. Perruccio K, Tosti A, Burchielli E, et al. Transferring functional immune responses to pathogens after haploidentical hematopoietic transplantation. *Blood*. 2005;106(13):4397-4406.
108. Blyth E, Clancy L, Simms R, et al. Donor-derived CMV-specific T cells reduce the requirement for CMV-directed pharmacotherapy after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2013;121(18):3745-3758.
109. Cobbold M, Khan N, Pourgheysari B, et al. Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific CTL to stem cell transplant patients after selection by HLA-peptide tetramers. *J Exp Med*. 2005;202(3):379-386.
110. Feuchtinger T, Opherck K, Bethge WA, et al. Adoptive transfer of pp65-specific T cells for the treatment of chemorefractory cytomegalovirus disease or reactivation after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation. *Blood*. 2010;116(20):4360-4367.

111. Peggs KS, Thomson K, Samuel E, et al. Directly selected cytomegalovirus-reactive donor T cells confer rapid and safe systemic reconstitution of virus-specific immunity following stem cell transplantation. *Clin Infect Dis*. 2011;52(1):49-57.
112. Schmitt A, Tonn T, Busch DH, et al. Adoptive transfer and selective reconstitution of streptamer-selected cytomegalovirus-specific CD8+ T cells leads to virus clearance in patients after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Transfusion*. 2011;51(3):591-599.
113. Meij P, Jedema I, Zandvliet ML, et al. Effective treatment of refractory CMV reactivation after allogeneic stem cell transplantation with in vitro-generated CMV pp65-specific CD8+ T-cell lines. *J Immunother*. 2012;35(8):621-628.
114. Uhlin M, Gertow J, Uzunel M, et al. Rapid salvage treatment with virus-specific T cells for therapy-resistant disease. *Clin Infect Dis*. 2012;55(8):1064-1073.
115. Doubrovina E, Oflaz-Sozmen B, Prockop SE, et al. Adoptive immunotherapy with unselected or EBV-specific T cells for biopsy-proven EBV+ lymphomas after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2012;119(11):2644-2656.
116. Haque T, Wilkie GM, Taylor C, et al. Treatment of Epstein-Barr-virus-positive post-transplantation lymphoproliferative disease with partly HLA-matched allogeneic cytotoxic T cells. *Lancet*. 2002;360(9331):436-442.
117. Haque T, Wilkie GM, Jones MM, et al. Allogeneic cytotoxic T-cell therapy for EBV-positive posttransplantation lymphoproliferative disease: results of a phase 2 multicenter clinical trial. *Blood*. 2007;110(4):1123-1131.
118. Uhlin M, Okas M, Gertow J, Uzunel M, Brismar TB, Mattsson J. A novel haplo-identical adoptive CTL therapy as a treatment for EBV-associated lymphoma after stem cell transplantation. *Cancer Immunol Immunother*. 2010;59(3):473-477.
119. Moosmann A, Bigalke I, Tischer J, et al. Effective and long-term control of EBV PTLD after transfer of peptide-selected T cells. *Blood*. 2010;115(14):2960-2970.
120. Icheva V, Kayser S, Wolff D, et al. Adoptive transfer of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 1-specific T cells as treatment for EBV reactivation and lymphoproliferative disorders after allogeneic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol*. 2013;31(1):39-48.
121. Gallot G, Vollant S, Saiagh S, et al. T-cell therapy using a bank of EBV-specific cytotoxic T cells: lessons from a phase I/II feasibility and safety study. *J Immunother*. 2014;37(3):170-179.
122. Gottschalk S, Ng CY, Perez M, et al. An Epstein-Barr virus deletion mutant associated with fatal lymphoproliferative disease unresponsive to therapy with virus-specific CTLs. *Blood*. 2001;97(4):835-843.
123. Hromas R, Cornetta K, Srouf E, Blanke C, Broun ER. Donor leukocyte infusion as therapy of life-threatening adenoviral infections after T-cell-depleted bone marrow transplantation. *Blood*. 1994;84(5):1689-1690.
124. Feuchtinger T, Matthes-Martin S, Richard C, et al. Safe adoptive transfer of virus-specific T-cell immunity for the treatment of systemic adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2006;134(1):64-76.
125. Feucht J, Opherk K, Lang P, et al. Adoptive T-cell therapy with hexon-specific T_HELPER-1 cells as a treatment for refractory adenovirus infection after HSCT. *Blood*. 2015.

126. Qasim W, Derniame S, Gilmour K, et al. Third-party virus-specific T cells eradicate adenoviraemia but trigger bystander graft-versus-host disease. *Br J Haematol.* 2011;154(1):150-153.
127. Geyeregger R, Freimuller C, Stemberger J, et al. First-in-man clinical results with good manufacturing practice (GMP)-compliant polypeptide-expanded adenovirus-specific T cells after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *J Immunother.* 2014;37(4):245-249.
128. Gerdemann U, Katari UL, Papadopoulou A, et al. Safety and clinical efficacy of rapidly-generated trivirus-directed T cells as treatment for adenovirus, EBV, and CMV infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *Mol Ther.* 2013;21(11):2113-2121.
129. Feucht J, Leibold J, Halder A, et al. Differential expression of T_H1 cytokines upon antigen stimulation predicts ex vivo proliferative potential and cytokine production of virus-specific T cells following re-stimulation. *Transpl Infect Dis.* 2014;16(5):713-723.
130. Busson P, Edwards RH, Tursz T, Raab-Traub N. Sequence polymorphism in the Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP)-2 gene. *J Gen Virol.* 1995;76 (Pt 1):139-145.
131. Montone KT, Hodinka RL, Salhany KE, Lavi E, Rostami A, Tomaszewski JE. Identification of Epstein-Barr virus lytic activity in post-transplantation lymphoproliferative disease. *Mod Pathol.* 1996;9(6):621-630.
132. Hong GK, Gulley ML, Feng WH, Delecluse HJ, Holley-Guthrie E, Kenney SC. Epstein-Barr virus lytic infection contributes to lymphoproliferative disease in a SCID mouse model. *J Virol.* 2005;79(22):13993-14003.
133. Hong GK, Kumar P, Wang L, et al. Epstein-Barr virus lytic infection is required for efficient production of the angiogenesis factor vascular endothelial growth factor in lymphoblastoid cell lines. *J Virol.* 2005;79(22):13984-13992.
134. Ma SD, Hegde S, Young KH, et al. A new model of Epstein-Barr virus infection reveals an important role for early lytic viral protein expression in the development of lymphomas. *J Virol.* 2011;85(1):165-177.
135. Chatziandreu I, Gilmour KC, McNicol AM, et al. Capture and generation of adenovirus specific T cells for adoptive immunotherapy. *Br J Haematol.* 2007;136(1):117-126.
136. Burgert HG, Kvist S. An adenovirus type 2 glycoprotein blocks cell surface expression of human histocompatibility class I antigens. *Cell.* 1985;41(3):987-997.
137. Sester M, Kobernick K, Owen D, et al. Conserved amino acids within the adenovirus 2 E3/19K protein differentially affect downregulation of MHC class I and MICA/B proteins. *J Immunol.* 2010;184(1):255-267.
138. Riddell SR, Greenberg PD. T cell therapy of human CMV and EBV infection in immunocompromised hosts. *Rev Med Virol.* 1997;7(3):181-192.
139. Sun JC, Williams MA, Bevan MJ. CD4⁺ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8⁺ T cells after acute infection. *Nat Immunol.* 2004;5(9):927-933.
140. Hamilton SE, Wolkers MC, Schoenberger SP, Jameson SC. The generation of protective memory-like CD8⁺ T cells during homeostatic proliferation requires CD4⁺ T cells. *Nat Immunol.* 2006;7(5):475-481.
141. Swain SL, McKinstry KK, Strutt TM. Expanding roles for CD4(+) T cells in immunity to viruses. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(2):136-148.

142. Hammoud B, Schmueck M, Fischer AM, et al. HCMV-specific T-cell therapy: do not forget supply of help. *J Immunother.* 2013;36(2):93-101.
143. van Leeuwen EM, Remmerswaal EB, Heemskerk MH, ten Berge IJ, van Lier RA. Strong selection of virus-specific cytotoxic CD4+ T-cell clones during primary human cytomegalovirus infection. *Blood.* 2006;108(9):3121-3127.
144. Casazza JP, Betts MR, Price DA, et al. Acquisition of direct antiviral effector functions by CMV-specific CD4+ T lymphocytes with cellular maturation. *J Exp Med.* 2006;203(13):2865-2877.
145. Paludan C, Bickham K, Nikiforow S, et al. Epstein-Barr nuclear antigen 1-specific CD4(+) Th1 cells kill Burkitt's lymphoma cells. *J Immunol.* 2002;169(3):1593-1603.
146. Haigh TA, Lin X, Jia H, et al. EBV latent membrane proteins (LMPs) 1 and 2 as immunotherapeutic targets: LMP-specific CD4+ cytotoxic T cell recognition of EBV-transformed B cell lines. *J Immunol.* 2008;180(3):1643-1654.
147. Su Z, Peluso MV, Raffegerst SH, Schendel DJ, Roskrow MA. The generation of LMP2a-specific cytotoxic T lymphocytes for the treatment of patients with Epstein-Barr virus-positive Hodgkin disease. *Eur J Immunol.* 2001;31(3):947-958.
148. Adhikary D, Behrends U, Moosmann A, Witter K, Bornkamm GW, Mautner J. Control of Epstein-Barr virus infection in vitro by T helper cells specific for virion glycoproteins. *J Exp Med.* 2006;203(4):995-1006.
149. Morgan DA, Ruscetti FW, Gallo R. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science.* 1976;193(4257):1007-1008.
150. Gillis S, Baker PE, Ruscetti FW, Smith KA. Long-term culture of human antigen-specific cytotoxic T-cell lines. *J Exp Med.* 1978;148(4):1093-1098.
151. Gillis S, Smith KA. Long term culture of tumour-specific cytotoxic T cells. *Nature.* 1977;268(5616):154-156.
152. Vella AT, Dow S, Potter TA, Kappler J, Marrack P. Cytokine-induced survival of activated T cells in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(7):3810-3815.
153. Cornish GH, Sinclair LV, Cantrell DA. Differential regulation of T-cell growth by IL-2 and IL-15. *Blood.* 2006;108(2):600-608.
154. Akbar AN, Borthwick NJ, Wickremasinghe RG, et al. Interleukin-2 receptor common gamma-chain signaling cytokines regulate activated T cell apoptosis in response to growth factor withdrawal: selective induction of anti-apoptotic (bcl-2, bcl-xL) but not pro-apoptotic (bax, bcl-xS) gene expression. *Eur J Immunol.* 1996;26(2):294-299.
155. Jaleco S, Swainson L, Dardalhon V, Burjanadze M, Kinet S, Taylor N. Homeostasis of naive and memory CD4+ T cells: IL-2 and IL-7 differentially regulate the balance between proliferation and Fas-mediated apoptosis. *J Immunol.* 2003;171(1):61-68.
156. Schluns KS, Kieper WC, Jameson SC, Lefrancois L. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol.* 2000;1(5):426-432.
157. Kondrack RM, Harbertson J, Tan JT, McBreen ME, Surh CD, Bradley LM. Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells. *J Exp Med.* 2003;198(12):1797-1806.
158. Kaech SM, Tan JT, Wherry EJ, Konieczny BT, Surh CD, Ahmed R. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol.* 2003;4(12):1191-1198.

159. Lenz DC, Kurz SK, Lemmens E, et al. IL-7 regulates basal homeostatic proliferation of antiviral CD4+T cell memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(25):9357-9362.
160. Seddon B, Tomlinson P, Zamoyska R. Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells. *Nat Immunol*. 2003;4(7):680-686.
161. Caserta S, Alessi P, Basso V, Mondino A. IL-7 is superior to IL-2 for ex vivo expansion of tumour-specific CD4(+) T cells. *Eur J Immunol*. 2010;40(2):470-479.
162. Schluns KS, Williams K, Ma A, Zheng XX, Lefrancois L. Cutting edge: requirement for IL-15 in the generation of primary and memory antigen-specific CD8 T cells. *J Immunol*. 2002;168(10):4827-4831.
163. Becker TC, Wherry EJ, Boone D, et al. Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *J Exp Med*. 2002;195(12):1541-1548.
164. Stemberger C, Huster KM, Koffler M, et al. A single naive CD8+ T cell precursor can develop into diverse effector and memory subsets. *Immunity*. 2007;27(6):985-997.
165. Stemberger C, Graef P, Odendahl M, et al. Lowest numbers of primary CD8(+) T cells can reconstitute protective immunity upon adoptive immunotherapy. *Blood*. 2014;124(4):628-637.
166. Graef P, Buchholz VR, Stemberger C, et al. Serial transfer of single-cell-derived immunocompetence reveals stemness of CD8(+) central memory T cells. *Immunity*. 2014;41(1):116-126.
167. La Gruta NL, Turner SJ, Doherty PC. Hierarchies in cytokine expression profiles for acute and resolving influenza virus-specific CD8+ T cell responses: correlation of cytokine profile and TCR avidity. *J Immunol*. 2004;172(9):5553-5560.
168. Almeida JR, Sauce D, Price DA, et al. Antigen sensitivity is a major determinant of CD8+ T-cell polyfunctionality and HIV-suppressive activity. *Blood*. 2009;113(25):6351-6360.
169. Wilde S, Schendel DJ. High-quality and high-avidity T cell clones specific for tumor-associated antigens and how to find them. *Oncoimmunology*. 2012;1(9):1643-1644.
170. Wilde S, Sommermeyer D, Leisegang M, et al. Human antitumor CD8+ T cells producing Th1 polycytokines show superior antigen sensitivity and tumor recognition. *J Immunol*. 2012;189(2):598-605.
171. Hombrink P, Raz Y, Kester MG, et al. Mixed functional characteristics correlating with TCR-ligand koff -rate of MHC-tetramer reactive T cells within the naive T-cell repertoire. *Eur J Immunol*. 2013;43(11):3038-3050.
172. Derby M, Alexander-Miller M, Tse R, Berzofsky J. High-avidity CTL exploit two complementary mechanisms to provide better protection against viral infection than low-avidity CTL. *J Immunol*. 2001;166(3):1690-1697.
173. Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, et al. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med*. 2011;17(10):1290-1297.
174. Eiz-Vesper B, Maecker-Kolhoff B, Blasczyk R. Adoptive T-cell immunotherapy from third-party donors: characterization of donors and set up of a T-cell donor registry. *Front Immunol*. 2012;3:410.