

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Zentrum der Kinder- und Jugendmedizin
Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
Direktor: Prof. Dr. Thomas Klingebiel

Schwerpunkt Stammzelltransplantation und Immunologie
Leiter: Prof. Dr. Peter Bader

**Generierung CMV-spezifischer T-Zellen
aus mononukleären Zellen
von CMV-seronegativen Spendern**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Hannah Marie Fraser
aus Starnberg

Frankfurt am Main, 2019

Dekan/in:	Prof. Dr. Josef M. Pfeilschifter
Referent/in:	Prof. Dr. Peter Bader
Korreferent/in:	Prof. Dr. Holger Rabenau
Tag der mündlichen Prüfung:	18.11.2019

*„Es geht nicht um das, was wir tun oder wie viel wir tun.
Sondern darum, wie viel Liebe wir in das Tun legen.“*

Agnes Gonxha Bojaxhiu

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	7
1.1 Pädiatrische Onkologie	7
1.1.1 Leukämie	8
1.2 Stammzelltransplantation	10
1.2.1 Allogene Stammzelltransplantation	11
1.2.2 Transplantat-bezogene Spender-Empfänger-Reaktionen.....	13
1.2.3 Weitere mögliche Komplikationen einer Stammzelltransplantation....	14
1.3 Familie der Herpesviren.....	16
1.3.1 Das Zytomegalievirus.....	17
1.3.2 Zytomegalievirus nach Stammzelltransplantation und dessen Therapie	18
1.3.3 Immunreaktion nach Infektion mit CMV	19
1.4 Zelluläre Immuntherapie	21
1.4.1 Virusspezifische T-Zellen.....	21
1.4.2 Zytokin-induzierte Killerzellen.....	23
2. Zielsetzung	26
3. Material und Methoden.....	27
3.1 Spenderzellen	27
3.2 Material.....	27
3.2.1 Geräte.....	27
3.2.2 Verbrauchsmaterialien	28
3.2.3 Chemikalien, Medien, Puffer und Lösungen.....	29
3.2.4 Antikörper, Chemokine und Zellkulturen	30

3.3. Isolierung und Selektion von Zellen.....	31
3.3.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut mittels Ficoll- Paque	31
3.3.2 Monozytenselektion mittels Adhärenzmethode	32
3.3.3. Zellselektion mittels MACS® Microbeads	33
3.4. Differenzierung von Monozyten zu reifen dendritischen Zellen	35
3.4.1 DC-Differenzierung (abgeändertes Protokoll n. Obermaier et al ⁴⁵ .)... 35	
3.4.2 DC-Differenzierung (abgeändertes Protokoll nach Wölfl et al. ⁴⁶)	36
3.5 Generierung CMV-spezifischer T-Zellen.....	37
3.6. Generierung Zytokin-induzierter Killerzellen.....	40
3.7. Analyse der hergestellten Zellkulturen	41
3.7.1 Durchflusszytometrie.....	41
4. Ergebnisse	43
4.1 Vergleich der Selektions-Methoden von Antigen-präsentierenden Zellen aus PBMCs.....	43
4.2 Analyse zur Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen.....	45
4.3 Generierung CMV-spezifischer Zellen	48
4.3.1 Koinkubation von Monozyten und PBMCs.....	48
4.3.1.1. Monozyten generiert durch Adhärenzmethode	48
4.3.2.2 Monozyten generiert durch Microbeads.....	49
4.3.2 Koinkubation von DCs und PBMCs	50
4.3.3 Generierung CMV-spezifischer Zellen	51
5. Diskussion	54
5.1 Generierung CMV-spezifischer T-Zellen aus seronegativen Material.....	55
5.2 Erzielte Ergebnisse im Vergleich zum Protokoll nach Wölfl et al ⁴⁶	57
5.3 Nachweis Methoden von CMV-spezifischen Zellen.....	59
5.3.1 Analyse mittels Durchflusszytometrie.....	59
5.3.2 Weitere Methoden für den Nachweis CMV-spezifischer Zellen.....	59

5.3.2.1 Nachweis mittels infizierter Fibroblasten.....	60
5.3.2.2 Elispots.....	60
5.4 Literaturvergleich und klinische Anwendung von CMV-spezif. Zellen.....	61
5.4.1 Verwendung von naiven T-Zellen aus Nabelschnurblut	61
5.4.2 CMV-Impfung vor Selektion von virusspezifischen T-Zellen bei seronegativen Spendern	62
5.4.3. Neuer CMV-Impfstoff bei aktiver CMV-Infektion	63
5.4.4. „Off-the-shelf“-Virus-spezifische T-Zellen	63
5.5 Kosten und Nutzen Abwägung der Ergebnisse für die klinische Anwendung.....	64
6 Zusammenfassung.....	66
7 Summary	68
8 References	70
A Abbildungsverzeichnis	i
B Tabellenverzeichnis.....	ii
C Abkürzungsverzeichnis.....	iii
D Lebenslauf.....	vi
F Danksagung	vii
E Schriftliche Erklärung	viii

1 Einleitung

1.1 Pädiatrische Onkologie

Die Statistik zeigt, dass das Risiko an einem Malignom zu erkranken mit dem Alter steigt. So zeigen sich maligne Erkrankungen häufig im höheren Alter und ihnen sind etwa 25% aller Todesfälle zuzuschreiben².

Maligne Erkrankungen sind, im Gegensatz zu dem Erwachsenenalter, im Kindesalter äußerst selten. Sie betreffen etwa 2% aller Kinder bei einer Inzidenz von 5-14:100.000 der Kinder vor Vollendung des 15. Lebensjahres¹. Im Gegensatz zu den Erwachsenen, bei denen vorrangig Karzinome diagnostiziert werden, stehen in der Pädiatrie maligne hämatopoetische Erkrankungen und Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS), wie das Astrozytom im Vordergrund³.

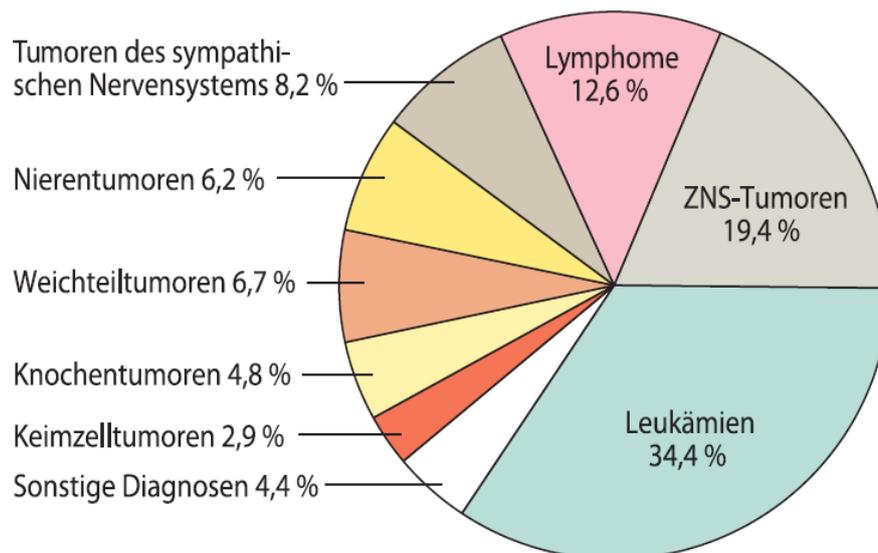


Abbildung 1: Relative Häufigkeit maligner Erkrankungen bei Kindern unter dem 15. Lebensjahr. Die Leukämie zeigt sich mit 34,4% als häufigste maligne Erkrankung im Kindes- und Jugendalter (Bildquelle: Basiswissen Pädiatrie 2010, Kröner C, Koletzko B.)¹

1.1.1 Leukämie

Als Leukämien bezeichnet man maligne, neoplastische Erkrankungen des Blutes oder des blutbildenden Systems. Pathogenetisch liegt eine Mutation einer hämatopoetischen Vorläuferzelle vor, die zu einer ungehemmten klonalen Proliferation der Zelle führt. Die Proliferation führt zur Verdrängung des gesunden Knochenmarks und zur Ausschwemmung neoplastischer Zellen in die Blutbahn. Die Klassifikation der Leukämien erfolgt nach dem Ursprung der entarteten Zelle und der Geschwindigkeit des Krankheitsverlaufs. So ergeben sich vier Arten der Leukämie:

- Akute lymphoblastische Leukämie (ALL)
- Akute myeloische Leukämie (AML)
- Chronische lymphatische Leukämie (CLL)
- Chronische myeloische Leukämie (CML)²

Jährlich erkranken etwa 4-5 von 100.000 Kinder an einer Leukämie. Das heißt, dass durchschnittlich ca. 600 Kinder und Jugendliche pro Jahr betroffen sind³. Laut dem Annual Report (2017) des Kinderkrebsregisters sind Leukämien mit einem Anteil von 30,3% die häufigsten malignen Erkrankungen im Kindes- und Jugendalter⁴. Hierbei führend ist die akute lymphoblastische Leukämie (ALL), die 80% aller Leukämien im Kindesalter ausmacht. Mit einer Inzidenz von 3,3 von 100.000 Kindern unter 15 Jahren pro Jahr ist die ALL die häufigste Krebserkrankung im Kindesalter⁵.

Das typische Erkrankungsalter liegt bei 2-4 Jahren, mit einem Median von 4 Jahren und 9 Monaten. Das männliche Geschlecht ist 20% häufiger betroffen als das Weibliche⁴⁵.

Die ALL ist eine akut lebensbedrohliche Erkrankung, die durch eine ungehemmte Proliferation einer frühen lymphatischen Vorläuferzelle (Blaste) im Knochenmark charakterisiert ist. Durch die rasche Proliferation der unreifen Blasten kommt es zu einer Verdrängung des umgebenden Knochenmarks mit der Folge einer Panzytopenie. Diese zeichnet sich durch Anämie, Thrombozytopenie und Granulozytopenie mit den entsprechenden Symptomen wie Abgeschlagenheit, vermehrte Blutungsneigung und erhöhte Infektanfälligkeit ab.

Ohne sofortige Therapie kann die Erkrankung innerhalb weniger Wochen bis Monate zum Tode führen².

Die Therapie der ALL besteht aus einem mehrphasigen Konzept, das sich anhand von Therapieprotokollen sowie des Risikoprofils des Patienten zusammensetzt.

Die Therapieansätze folgen alle dem vierphasigen Konzept beginnend mit der Induktionstherapie mittels hochdosierter Chemotherapeutika (4-6 Wochen), um eine massive Reduktion der Tumorzellzahl zu erreichen.

Nach Erreichen der kompletten Remission (CR) folgen die Konsolidierungs- und Reinduktionstherapie, die der Aufrechterhaltung der CR dienen und die vollständige Eliminierung aller Tumorzellen sicherstellen, um ein Rezidiv zu verhindern.

Die letzte Phase der Behandlung bezeichnet man als Erhaltungstherapie (24 Monate)⁶.

Kommt es zum Ausbleiben einer CR oder zu einem Rezidiv innerhalb der ersten sechs Monate nach Behandlungsbeginn sollte eine allogene Stammzelltransplantation als weitere Therapieoption angestrebt werden.

1.2 Stammzelltransplantation

Als Stammzelltransplantation (SZT) versteht man die Übertragung von körpereigenen oder fremden hämatopoetischen Stammzellen an einen erkrankten Patienten.

Die Indikation einer SZT kann nicht nur bei malignen, hämatologischen Erkrankungen gestellt werden, sondern auch bei soliden Tumoren (Neuroblastom, Medulloblastom, Ewing Sarkom) und benignen Erkrankungen wie Hämoglobinopathien (z.B. β -Thalassämia major, Sichelzellanämie), Knochenmarksinsuffizienzen (z.B. schwere aplastische Anämie, Blackfan-Diamond-Fanconi-Anämie) oder Immundefekten (SCID, Wiskott-Aldrich-Syndrom)³.

Die Gewinnung der Stammzellen kann durch eine operative Extraktion aus dem Knochenmark des Beckenkamms (Knochenmarktransplantation) erfolgen. Da diese Methode mit einem stationären Aufenthalt, einer Vollnarkose sowie einem schmerzhaften operativen Eingriff, ggf. auftretenden Komplikationen und Infektionen verbunden ist, wird sie nur noch selten durchgeführt⁷.

Heutzutage werden die Zellen in 80% der Fälle aus dem peripheren Blut extrahiert⁸. 5-7 Tage vor der Stammzellgewinnung erfolgt die Gabe von GCSF („*granulocyte colony-stimulating factor*“) oder GMCSF („*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*“), um die Stammzellen zur Proliferation anzuregen und die Mobilisierung in das periphere Blut zu gewährleisten. Nach einem adäquaten Anstieg der CD34⁺ Stammzellen (*CD* = „*cluster of differentiation*“) können sie über eine Leukapherese aus dem peripheren Blut extrahiert werden⁹.

Eine weitere Möglichkeit zur Gewinnung von Stammzellen besteht unmittelbar nach einer Entbindung aus dem Nabelschnurblut¹⁰.

Der zeitliche Verlauf einer Transplantation gliedert sich in die Phasen der Konditionierung, Transplantation und Aplasie.

Die Konditionierungsbehandlung dauert bis zu 7 Tage und setzt sich aus einer myeloablativen Therapie zusammen. Diese besteht aus einer Kombination aus

hochdosierten Chemotherapeutika und je nach Erkrankung optional einer Ganzkörperbestrahlung oder Gabe von Antilymphozytenglobulin (ATG). Sie dient der Zerstörung residualer Tumor- oder Leukämiezellen und der Transplantattoleranz durch Eliminierung des bestehenden Immunsystems⁹.

Anschließend erfolgt die intravenöse Gabe der Stammzellen, die via Homing-Rezeptoren den Weg zum Knochenmark finden, um sich dort zu teilen und zu Progenitorzellen zu differenzieren.

In diesem Zeitraum kommt es zur aplastischen Phase. Insgesamt benötigen die Stammzellen ca. 12-21 Tage bis eine adäquate Leukozytenzahl $>1000/\mu\text{l}$ bzw. eine Granulozytenzahl $>500/\mu\text{l}$ erreicht wird. Während dieser Phase kommt es durch das fehlende Immunsystem zu Nebenwirkungen der Konditionierungstherapie. Diese können sich als Mukositis, Anämie, Thrombozytopenie, Neutropenie, Infektionen bis hin zur Sepsis darstellen. Da die Patienten in dieser Zeit höchst anfällig für Blutungen, Anämien und opportunistische Infektionen sind, müssen intensive Überwachungen in speziell eingerichteten Zimmern (Schleusenzimmer) sowie supportive Therapien mittels Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentraten durchgeführt werden.

Die größten Gefahren in diesem Zeitraum sind systemische Infektionen und Rezidive der Grunderkrankung³.

1.2.1 Allogene Stammzelltransplantation

Die SZT wird nach der Herkunft der Stammzellen in zwei Subklassen unterteilt:

- Allogene SZT: Familien- oder Fremdspender
 - Haploidente SZT: HLA-Muster (*HLA* = „*human leucocyte antigens*“) entspricht nur zu 50% dem des Empfängers (bspw. bei Spende durch Elternteile)
- Autologe SZT: körpereigene Stammzellen des Empfängers

Durch eine allogene SZT wird das maligne oder defekte hämatopoetische System durch die Übertragung von gesunden, histokompatiblen Stammzellen eines Fremd- oder Familienspenders ersetzt.

Laut dem Jahresbericht des „Deutschen Registers für Stammzelltransplantationen“ wurden 78,1% aller allogenen SZT im Jahre 2015 aufgrund einer malignen hämatologischen Grunderkrankung, insbesondere Leukämien, durchgeführt (AML 45%, Myelodysplastischen Syndrom (MDS) 14,1%, ALL 10,8%, Myeloproliferative Neoplasien (MPN) 4,8%, chronisch-lymphastischen Leukämie (CLL) 1,8%, chronisch-myeloische Leukämie (CML) 1,6%), gefolgt von lymphoproliferativen Erkrankungen (15,1%) und nicht-malignen Erkrankungen (5,4%)¹¹.

Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche allogene Transplantation mit möglichst geringen Transplantat-induzierten Komplikationen wie bspw. Graft-versus-host-disease (GvHD) ist die höchstmögliche Übereinstimmung der Histokompatibilität. Diese ergibt sich im Wesentlichen aus der Übereinstimmung der „human leucocyte antigens“ (HLA) des Spenders und Empfängers.

HLA-Moleküle werden in zwei Subgruppen aufgeteilt

- HLA-Klasse-I (HLA-A, HLA-B, HLA-C): befinden sich auf allen kernhaltigen Körperzellen und präsentieren Proteine an CD8⁺-zytotoxischen T-Zellen
- HLA-Klasse II (HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ): befinden sich auf Antigen-präsentierenden Zellen, B-Zellen und Makrophagen und präsentieren Antigene an CD4⁺-T-Helferzellen¹².

Für den Erfolg einer SZT sind die HLA-Moleküle HLA A, B, C, DRB1 und DQB1 mit jeweils zwei Allelen ausschlaggebend³.

Bevorzugte Spender sind HLA-identische Spender mit einer kompletten Übereinstimmung der klassischen HLA-Loci (9/10 oder 10/10 Allelen). In diesem Fall spricht man von einem „HLA-matched-donor“.

Ist diese Konstellation weder in der Familie des Empfängers, noch durch einen Fremdspender realisierbar, gibt es in Einzelfällen die Möglichkeit der haploidenten SZT, welche allerdings mit einem höheren Risiko der Transplantatabstoßung und GvHD verbunden ist.

1.2.2 Transplantat-bezogene Spender-Empfänger-Reaktionen

Ausschlaggebend für eine erfolgreiche SZT sind nicht nur Radio- und Chemotherapie im Vorfeld, sondern auch die Immunreaktionen zwischen den Zellen des Spenders und Empfängers.

Hierbei handelt es sich um den sogenannten „Graft-versus-Tumor/Leukämie-Effekt“ (GvT / GvL), bei dem reife, ausdifferenzierte Immunzellen des Spenders die restlich verbliebenen Leukämie- oder Tumorzellen als fremd erkennen und diese angreifen. Dieser Effekt besteht nur bei einer allogenen SZT und erzielt deutlich höhere Heilungsraten als eine autologe SZT⁹.

Richtet sich die oben genannte Immunreaktion der Spenderlymphozyten gegen den Empfänger, so kommt es zu einer „Graft-versus-Host-disease“ (GvHD). Hierbei handelt es sich um eine Komplikation nach einer SZT, da die Spenderzellen nicht nur die Leukämie-/Tumorzellen als fremd erkennen, sondern auch die gesunden Zellen des Empfängers. Dieser Effekt kommt vor allem bei einer Spender/Empfänger-Konstellation mit einem hohen HLA-mismatch zum Tragen, aber auch bei Patienten mit HLA-identen Spendern und einer adäquaten Immunsuppression (Inzidenz: 10-40%)³.

Die akute GvHD zeigt sich bei 27-83% der Patienten innerhalb der ersten 100 Tage nach SZT und hat trotz immunsuppressiver Therapie eine Letalität von bis zu 50%³. Sie kann sich z.B. durch ein Erythem der Haut, ausgeprägte blutig-schleimige Diarrhoe mit irreparabler Zerstörung der Mukosa und einer Lebersynthesestörung äußern.

Die Therapie der GvHD besteht darin die Spenderlymphozyten in ihrer Aktivität zu hemmen und die Schädigung des Empfängergewebes zu minimieren. Hierzu verstärkt man die Immunsuppression des Patienten mittels Kortisons und Tumor-Nekrose-Faktor-alpha-Blocker (TNF).

Die Erhöhung der Immunsuppression führt zu einer weiteren Schwächung des Immunsystems und die Gefahr der Infektionen durch Viren, Pilze und Bakterien steigt.

1.2.3 Weitere mögliche Komplikationen einer SZT

Die Komplikationen nach einer SZT können in frühe und späte Komplikationen eingeteilt werden.

Zu den frühen Komplikationen gehört u.a. die Transplantatabstoßung (3-5% der Fälle) und das leukämische Rezidiv³.

Das Rezidiv gehört zu den häufigsten Todesursachen nach einer erfolgreichen SZT. Bei 10-30% der Empfänger überleben vereinzelt Blasten die hochdosierte Chemotherapie und können auch nach einer SZT proliferieren und somit zu einem leukämischen Rezidiv mit Anstieg der Blasten im Knochenmark >5% und einer Ausschwemmung von Vorläuferzellen ins periphere Blut führen³.

Die häufigsten Komplikationen nach SZT sind unmittelbar zusammenhängend mit der Organtoxizität der Dosisescalation von Zytostatika in Kombination mit der Ganzkörperbestrahlung während der Konditionierungstherapie. Hierbei stehen orale sowie gastrale Mukosiden im Vordergrund, allerdings kann jedes Organ durch organspezifische Nebenwirkungen der Zytostatika betroffen sein⁹.

Cyclophosphamid	Hämorrhagische Zystitis, Kardiotoxizität
Etoposid	Hypotension, allergische Reaktion, Fieber, Hautschäden
Busulfan	Veno-occlusive disease (Leber), Krampfanfälle, interstitielle Lungenfibrose
Thiotepa	Mukositis, Erythem
Melphalan	Mukositis, Erythem
Carboplatin	Niereninsuffizienz, Ototoxizität
Fludarabin	Myelosuppression ¹³

Tabelle 1: Unerwünschte Nebenwirkungen bestimmter Chemotherapeutika (Quelle: Pädiatrie, 2013, Speer³)

Nach einer Stammzelltransplantation kommt es zu einer aplastischen Phase von ca. 12-21 Tagen, in denen keine adäquate Anzahl an Leukozyten und Granulozyten im Blutkreislauf vorhanden sind. Durch die vorrangige Neutropenie und Zerstörung der Haut- und Schleimhautbarrieren, kommt es in der aplastischen Phase insbesondere zu bakteriellen Infektionen. Diese können Fieber mit unklarem Focus auslösen und sollten so schnell wie möglich durch eine empirische Kombinationstherapie verschiedener Antibiotika behandelt werden³.

Nach der Einnistung der Stammzellen in das Knochenmark kommt es zur Phase der „Immunrekonstruktion“, in der reife T- und B-Zellen heranreifen. Bis eine adäquate Anzahl an Zellen vorhanden ist dauert es ca. ein Jahr. In diesem Zeitraum ist der Patient besonders anfällig gegenüber viralen Erregern, die vor allem durch endogene Reaktivierung zu schwerwiegenden Infektionen führen können³. Bei der Kombination seropositivem SZ-Spender/seronegativem Empfänger oder seronegativem SZ-Spender/seropositivem Empfänger ist die Reaktivierungsgefahr besonders hoch.

Virale Infektionen sind eine der gefürchtetsten Komplikationen, denn 17-20% der Todesfälle nach einer erfolgreichen SZT sind durch Viren zu verzeichnen¹⁴. Die häufigsten und gefährlichsten Viren sind Herpes- und Adenoviren (AdV). Zu den späten Komplikationen zählen eine ganze Reihe von Langzeitfolgen der Konditionierungstherapie wie Gonadeninsuffizienz, Wachstumsstörungen und Organschädigung wie bspw. Lungenfibrose, Katarakt und Hypothyreose.

Zusätzlich zu der Gefahr durch Viren kommt es bei Patienten nach SZT als Spätkomplikation zu Zweitmalignomen. Bei 1,5-5% der Fälle können sich es hierbei nach 5-15 Jahren zu soliden Tumoren (3-5%³) oder Zweitleukämien entwickeln^{3,9}. Im ersten Jahr nach Therapieabschluss kann es auch zu EBV-assoziierten Lymphomen kommen³.

1.3 Familie der Herpesviren

Die Familie der humanen Herpesviren (*Herpesviridae*, *HHV*) beinhaltet eine Vielzahl an umhüllten Viren mit einem Genom bestehend aus doppelsträngiger, linearen DNA. Herpesviren haben eine Größe von ca. 150 – 200nm und bestehen aus einem ikosaedrischen Nukleocapsid, das das Genom umhüllt sowie einer Hüllmembran¹⁵.

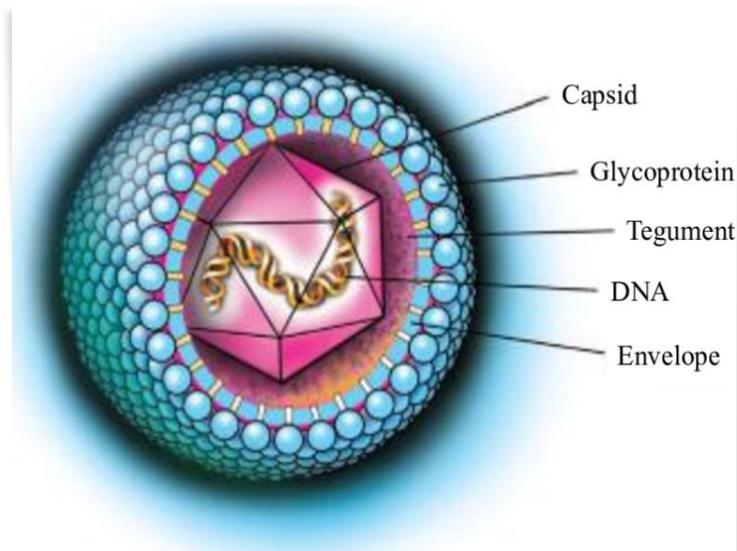


Abbildung 9: Schematische Darstellung eines Herpesvirus,
Quelle: www.researchgate.net

Alle Viren, die dieser Klasse angehören, zeigen nach einer akuten Infektion eine lebenslange Persistenz in den infizierten Wirtszellen. Bei einer immun-kompromittierenden Erkrankung oder bei Zustand nach SZT kann es zu einer Reaktivierung des Virus kommen¹⁶.

Heutzutage unterscheidet man zwischen acht Herpesviren und teilt sie nach ihrer Pathogenität, infizierten Wirtszelle und Vermehrungseigenschaften in drei Subfamilien (α, β, γ) ein. Zu den Alpha-Herpesviren gehören das Herpes-simplex-Virus 1 und 2 (HHV 1 und 2) sowie das Varizella-Zostervirus (HHV 3, VZV), welches als Auslöser von Windpocken und Morbus Zoster („Gürtelrose“) gilt. Diese Subfamilie hat sehr kurze Replikationszeiten und persistieren in den Ganglienzellen¹⁶.

Das Zytomegalievirus (HHV 5, CMV) wird wegen seiner langsamen Replikationszeit zu den Beta-Herpesviren gezählt und befällt vor allem Granulozyten und Lymphozyten.

Die Primärinfektion von Immunkompetenten verläuft meist asymptomatisch. Allerdings ist das CMV ein gefürchteter Erreger bei pränatalen Infektionen und im Rahmen einer Immunsuppression, da es zu einer generalisierten Infektion des Organismus kommen kann. Trotz einer adäquaten Behandlung gibt es bei CMV eine hohe Rate an Todesfällen¹⁵.

Gamma-Herpesviren persistieren in B- und T-Lymphozyten und werden vertreten durch das Epstein-Barr-Virus (HHV 4, EBV) sowie dem Kaposi-Sarkom-assoziierten-Herpesvirus (HHV 8). Bei Infektion mit EBV kommt es zum Krankheitsbild der „infektiösen Mononukleose“, die sich durch eine Pharyngitis, generalisierte Lymphknotenschwellung und Hepatomegalie sowie atypische mononukleäre T-Lymphozyten im Blutbild auszeichnet. Das Virus zeigt ein onkogenes Potenzial und ist assoziiert mit dem Nasopharynxkarzinom, Burkitt-Lymphom sowie transplantationsassoziierten B-Zell Lymphom und Hodgkin-Lymphomen¹⁵.

1.3.1 Das Zytomegalievirus

Das CMV ist ein weltweit verbreitetes Virus mit einer Durchseuchungsrate von 40 – 90% der Bevölkerung in Deutschland¹⁵ und über 90% in den Ländern der 3. Welt, sowie in Risikogruppen (AIDS-Patienten, Prostituierte, Homosexuelle). Mit zunehmendem Alter steigt die Durchseuchungsrate².

Die Übertragung des Virus erfolgt über einen Austausch von Speichel und anderen Körperflüssigkeiten wie bspw. Sperma, aber auch diaplazentär, durch Fremdbluttransfusionen und allogener Stammzelltransplantation. Das Virus vermehrt sich besonders in Monozyten, Epithel- und Endothelzellen und ruft ein Mononukleose-ähnliches Krankheitsbild mit CMV-spezifischen elektromikroskopisch sichtbaren Eulenaugen hervor. CMV persistiert lebenslang vor allem in Zellen der myeloischen Zellreihe wie Granulozyten und Lymphozyten sowie in den Speicheldrüsen¹⁶.

Klinisch zeigt sich die Primärinfektion bei Immunkompetenten zu 90% asymptomatisch. Bei 10% der Infizierten kommt es nach 2-6 Wochen zu einem Mononukleose-ähnlichem Krankheitsbild mit Kopfschmerzen, Myalgien, Arthralgien, Lymphknotenschwellung und Hepatitis.

Bei intrauteriner Infektion (0,2-0,4% aller Neugeborenen³) kommt es in 7-15% der Fälle, vor allem bei einer Primärinfektion in der Frühschwangerschaft, zu einer schweren, generalisierten Zytomegalie mit ZNS-Verkalkungen, Mikrozephalus, Chorioretinitis, Hepatosplenomegalie und Thrombozytopenie des Neugeborenen¹⁷. Die Letalität liegt bei konnataler Infektion bei 30%³.

1.3.2 Zytomegalievirus nach Stammzelltransplantation und dessen Therapie

Das CMV ist, neben EBV und dem AdV, aufgrund der schwerwiegenden Krankheitsbilder und der hohen Mortalitätsrate einer der gefürchtetsten Viren nach einer SZT. Durch die verminderte Anzahl virus-spezifischer T-Zellen kann es zu einer CMV-Reaktivierung oder einer Primärinfektion kommen. Das Risiko einer Reaktivierung ist bei einer CMV+ Patient/CMV- Spender-Konstellation am höchsten.

CMV führt bei immunsupprimierten Patienten, je nach Virusmenge, zu schwerwiegenden Krankheitsverläufen, welche zu Hepatitiden, Chorioretinitiden, gastrointestinale Ulzerationen, Colitiden mit Schmerzen, Durchfälle und Enzephalitis führen können. Die interstitielle CMV-assoziierte Pneumonie ist die häufigste Todesursache bei CMV-Infektionen und nach einer SZT¹⁵.

Diagnostisch wird das Virus serologisch durch die Bestimmung von IgM und IgG-Antikörpern nachgewiesen. Durch das Vorkommen verschiedener Antikörper in bestimmten Phasen der Infektion kann man zwischen Primärinfektion, persistierender Infektion und Reaktivierung unterscheiden.

Zusätzlich kann ein Immunfluoreszenznachweis des pp65-Antigens in den Leukozyten, sowie eine Polymerase-Ketten-Reaktion („polymerase chain

reaction“, PCR) und der direkte Nachweis durch Virusisolierung erfolgen¹⁶.

Die medikamentöse Therapie des CMV setzt sich aus Polymeraseinhibitoren wie z.B. Ganciclovir, Valganciclovir und Foscarnet zusammen.

Aufgrund der hohen organtoxischen Nebenwirkungen dieser Medikamente wie z.B. Schädigung des Knochenmarks, Anämien, Neutro- und Thrombopenien, Fieber, Exantheme und Übelkeit sowie Nephrotoxizität¹³ sollte die Gabe nur bei „lebens- oder augenlichtbedrohender CMV-Infektion bei HIV-Infizierten (*HIV* = „*human immunodeficiency virus*“) oder immunsupprimierten Patienten“ erfolgen¹⁸.

Darüber hinaus kann man Hyperimmunglobuline als passive Impfung bei Immunsuppression verabreichen¹⁶.

1.3.3 Immunreaktion nach Infektion mit CMV

Das humane Immunsystem wird eingeteilt in ein erworbenes und ein angeborenes Immunsystem. Das angeborene System beinhaltet das unspezifische, humorale Komplementsystem sowie Akute-Phase-Proteine und Lysozyme. Hierzu gehören auch zelluläre Bestandteile wie natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Granulozyten sowie Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen. Letztere zählen zu den Antigen-präsentierenden Zellen (APCs), die an ihrer Oberfläche Antigene der Erreger an Zellen des erworbenen Immunsystem, wie B- und T-Lymphozyten, präsentieren können und somit eine Aktivierungskaskade auslösen¹². APCs sind an spezifischen Immunantworten, allergischen Reaktionen und Transplantatabstoßungen sowie Eliminierung von Tumorzellen beteiligt und damit ein sehr wichtiger Bestandteil des menschlichen Immunsystems¹³.

Die Zellen des unspezifischen, angeborenen Immunsystems können ohne vorherige Aktivierung bei Erkennung eines Eindringlings sofort reagieren bspw. über Freisetzung von Lysozym und Zytokinen sowie Phagozytose¹².

Die Zellen des erworbenen und des angeborenen Systems arbeiten bei der Erregerabwehr eng zusammen. Über „major histocompatibility complex“-Moleküle (MHC) und dem T-Zell-Rezeptor (TCR) kommunizieren T-Lymphozyten

mit APCs und können jedoch auch direkt virusinfizierte Zellen erkennen. APCs tragen MHC-II-Moleküle, die bspw. Viruspartikel als Antigene an ihrer Oberfläche präsentieren.

Eine Identifizierung des MHC-II-Antigen-Komplexes von CD4⁺-T-Helferzellen führt zur Aktivierung und Sekretion von Zytokinen bspw. IL-2 (Interleukin), die sie selbst, aber auch umgebende Zellen, wie T- und B-Zellen, Makrophagen und Granulozyten aktivieren. Es tritt eine massive Immunkaskade in Kraft.

Trägt eine körperfremde Zelle bspw. eine Tumorzelle oder eine virusinfizierte Zelle ein Antigen auf ihrer Oberfläche, welches über eine MHC-I-Moleküle präsentiert wird, kommt es zur Erkennung des Komplexes durch CD8⁺-zytotoxischen T-Zellen. Diese werden durch den direkten Kontakt, aber auch durch den Zytokinsturm der Immunkaskade aktiviert und töten ihre Zielzelle über lysierende Enzyme oder treiben die Zellen in die Apoptose¹³.

1.4 Zelluläre Immuntherapie

Die zelluläre Immuntherapie ist, neben der medikamentösen Immuntherapie bestehend aus Tumor/Leukämie-spezifischen Antikörpern, ein wichtiges Therapiekonzept bei der Rekonstitution des Immunsystems und der Bekämpfung von viralen Erregern. Sie wird darüber hinaus auch zur Bekämpfung von Tumoren oder bei Rezidiven eingesetzt^{19,20}.

Die ersten Zelltherapien führte man mit Spenderlymphozyten („*donor lymphocyte infusions*“, *DLI*) durch. Hierbei transfundierte man dem Empfänger unmanipulierte, unstimulierte Spenderlymphozyten, die gegen Malignomzellen agieren sollten. Mehrere Studien haben gezeigt, dass die Gabe von DLI zu einer Erhöhung der Überlebensrate und zu einer CR führen kann, die auf den GvL-Effekt zurückzuführen sind²¹⁻²³. Zusätzlich können DLI gegen eine Reaktivierung von viralen Infektion angewandt werden²⁴.

Die häufigste Komplikation nach DLI ist eine akute GvHD (Grad 2-4 in 34% bis 47% der Fälle) oder chronische GvHD (33% bis 61% der Fälle)²⁵. Dies ist aber nicht immer negativ behaftet, denn es wurde gezeigt, dass die GvHD mit dem GvL-Effekt korreliert²⁶.

Weitere Formen der adoptiven Immuntherapie sind die Gabe von NK-Zellen, tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) und tumorspezifischen T-Zellen bei drohenden Rezidiv²⁷, Virus-spezifische T-Zellen (VST), Zytokin-induzierten Killer Zellen (CIK-Zellen) und genetisch modifizierten T-Zellen mittels chimären Antigenrezeptoren (CAR)²⁸.

1.4.1 Virusspezifische T-Zellen

VST zeigten sich in den letzten 20 Jahren als wichtiger Bestandteil der adoptiven Immuntherapie. Die Infusion von VST soll einer unkontrollierbaren Virusreplikation im immunsupprimierten Patienten vorbeugen oder bei einer Reaktivierung/Erstinfektion als therapeutische Alternative zu der organotoxischen, medikamentösen Therapie zur Verfügung stehen.

In den frühen 90iger Jahren wurden VST erstmals von Riddel et al. bei 14 stammzelltransplantierten Patienten eingesetzt, die an einer CMV-Infektion nach SZT erkrankt waren.²⁹ Die ersten Versuche VST zu expandieren, erfolgten mittels CMV-infizierten Fibroblasten oder CMV-Lysaten. Diese Methoden stellten sich als äußerst herausfordernd da und waren sehr zeitaufwändig³⁰. Heutzutage können VST mittels Peptid-HLA Multimeren und „Interferon- γ -Capture Assay“ (INF) selektioniert und ex vivo stimuliert werden.

Die Selektion mittels HLA/MHC-Multimeren ist HLA-spezifisch und erfolgt über die HLA-Peptid-Interaktion. Somit kann eine Selektion von CD4⁺-T-Helferzellen (MHC II), aber auch CD8⁺-virusspezifische zytotoxische T-Zellen (MHC I) erfolgen.

Antigen-spezifische T-Zellen sind in der Lage Zytokine wie z.B. INF- γ zu sekretieren. Auf dieser Eigenschaft beruht der „INF- γ -Capture Assay“. Durch eine 12-16 stündige Inkubation eines bestimmten Antigens bspw. CMV-pp65 Protein kommt es bei den VST zu einer Sekretion von INF- γ . Diese Zellen werden von „labeling cells“, die einen magnetisierten anti-INF- γ -Antikörper tragen, detektiert und gebunden. Danach erfolgt eine magnetische Selektion mit anti-INF- γ -Microbeads und die Selektion von VST. Hierbei werden alle Zellen, die auf das Peptid reagieren, selektiert.

Im Gegensatz zu der Selektion durch HLA-Multimere ist das „INF- γ -Capture Assay“ HLA-unspezifisch und kann VST bei Spendern mit jedem beliebigen HLA-Typ selektieren. Es besteht auch keine HLA-Abhängigkeit/Spezifität und somit können sowohl virusspezifische CD8⁺-Zellen als auch CD4⁺-T-Zellen extrahiert werden.

In klinischen Studien zeigte sich nach Infusion der VST ein sehr hohes Ansprechen, mit einer signifikanten Reduktion bis hin zu einer nicht mehr nachzuweisenden Viruslast sowohl bei CMV als auch bei EBV^{31–33}. Ein Vorteil der VST ist, dass im Gegensatz zu DLI, die allogene Reaktivität geringer ist³⁴.

Nach Infusion der VST kommt es zu einem starken Anstieg von virusspezifischen Effektorzellen. Schmitt et al. zeigte einen dramatischen Anstieg der in-vivo CMV-spezifischen T-Zellen von 0,0% auf 27,1% nach Transfusion von CMV-spezifischen Effektorzellen³³. Somit ist es möglich durch VST das Immunsystem

gegen Viren zu rekonstruieren und die Abwehr gegen CMV, EBV. etc. zu stärken. Ein gravierendes Problem zeigt sich bei Spendern mit einem seronegativen Virusstatus. Ein seropositiver Empfänger, der die Stammzellen eines seronegativen Spenders erhält, hat ein mehrfach erhöhtes Risiko an einer CMV-Reaktivierung zu erkranken. Durch die fehlende Interaktion zwischen T-Zellen und dem Virus bei seronegativen Spendern sind keine VST extrahierbar. Somit ist die Selektion von VST bis dato nur bei seropositiven Spendern möglich, was bei seropositiven Empfängern zu therapierefraktären Virusverläufen führen kann³⁰.

1.4.2 Zytokin-induzierte Killerzellen

Bei CIK-Zellen handelt es sich um eine heterogene Lymphozytenpopulation, die erstmals im Jahre 1991 von Schmidt-Wolf et al. beschrieben wurden³⁵.

CIK-Zellen sind Lymphozyten, die aus peripherem Blut selektioniert und durch eine ex-vivo Stimulation mit IFN-Gamma, Anti-CD3 Antikörper und verschiedensten Interleukinen (IL) aktiviert werden¹⁹.

Die heterogene Gruppe der CIK-Zellen besteht zum größten Teil aus klassischen T-Zellen ($CD3^+CD56^-$) und doppelt positiven T-NK-Zellen ($CD3^+CD56^+$), sowie einem geringeren Anteil von $CD3^-CD56^+$ -NK-Zellen³⁶. Es konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der $CD3^+CD56^+$ -Zellen von $CD3^+CD56^-$ -T-Zellen abstammen und im Laufe der Expansion das CD56-Molekül erwerben und an ihrer Oberfläche exprimieren³⁷.

CIK-Zellen tragen auf ihrer Oberfläche mehrere Rezeptoren. Hierzu gehört der funktionelle TCR, bestehend aus dem leukozytentypischen CD3-Komplex, T-Zell-Antigen-Rezeptor und ζ -Proteinen, der der Signaltransduktion nach Antigenerkennung dient. Der TCR erkennt neben dem präsentierten Antigen auch den MHC auf bestimmten Zellen.

MHC-Moleküle sind Oberflächenmoleküle, die sich in zwei Gruppen, MHC-I- und MHC-II-Moleküle, unterteilen lassen. MHC-I-Moleküle befinden sich auf allen kernhaltigen Körperzellen und dienen der Präsentation von in Körperzellen produzierten Antigenen an $CD8^+$ -T-Zellen. MHC-II-Moleküle hingegen findet man

nur auf APCs (dendritische Zellen, aktivierte Makrophagen, B-Zellen) und werden ausschließlich von CD4⁺-T-Zellen erkannt. Somit ist die Antigenerkennung und die darauffolgende Aktivierung von T-Zellen MHC-restringiert¹².

In Untersuchungen von Pievani et. al. wurde gezeigt, dass CIK-Zellen nicht nur T-Zell-Marker wie bspw. CD3- und CD8-Komplex tragen, sondern nach der Stimulation mit IL-2 auch einige Rezeptoren von natürlichen Killerzellen (NK) auf ihrer Oberfläche aufzeigen.

Hervorzuheben ist der NKG2D-Rezeptor (*natural killer group 2, member D*), der in hoher Konzentration auf CIK-Zellen zu finden ist. Er dient der Erkennung von Liganden wie den MHC-Klasse-I-ähnlichen Molekülen MIC (*MHC-class-I-related-chain-antigen*)-A und

MIC-B und UL16-Bindeproteinen (*unique-long-16-binding protein*, ULBP), die auf virusinfizierten Zellen und Tumorzellen hochreguliert werden. Kommt es zu einem Erkennen eines Antigens durch den NKG2D-Rezeptor, so kommt es zu einer Aktivierung der Effektorzelle und zu einer Ausschüttung von Perforin und somit zur Lyse der Zielzelle³⁸. Die Zytotoxizität der CIK-Zellen erfolgt hauptsächlich über den NKG2D-Rezeptor und ist somit MHC-unrestringiert.

Neben dem NKG2D zeigten sich auch noch andere NK-Rezeptoren an der Oberfläche von CIK-Zellen, wie NKp46, NKp40, NKp44 und DNAM-1, die allerdings weniger stark bis schwach vertreten sind.

Eine wichtige Rolle in der Erkennung und Bindung der Zielzelle spielt das LFA-1-Molekül (*lymphocyte function-associated antigen-1*), das auf Tumorzellen die ICAM 1-3 (*intercellular adhesion molecules*) erkennt und eine Verbindung der beiden Zellen herstellt, um dann die Lyse der Zelle einzuleiten³⁶.

Zusammenfassend wird die Zytotoxizität von CIK-Zellen über den MHC-unabhängigen NKD2G-Rezeptor reguliert, wobei die TCR-vermittelte Zytotoxizität auch erhalten bleibt. So kommt es zu einer dualen Spezifität der CIK-Zellen, die sowohl virusinfizierte Zellen, aber auch Tumor- oder Leukämiezellen erkennen und lysieren kann.

Die Forschungsgruppe um Rettinger et al. entwickelte ein modifiziertes Protokoll, in dem IL-2 durch das IL-15 ersetzt wurde. Es zeigte sich, dass die Toxizität der

CIK-Therapie erhöht wurde und die geringe Alloreaktivität geringgehalten werden konnte. Zusätzlich konnte der Expansionszeitraum des ursprünglichen Protokolls von 21 Tage auf 10 Tage reduziert werden³⁹⁻⁴¹.

Erste klinische Phase I/II Studien wurden im Jahre 2007 von Introna et al. durchgeführt. In dieser Studie behandelte die Forschungsgruppe 11 Patienten, die ein Rezidiv ihrer malignen hämatologischen Grunderkrankung nach einer SZT erlitten, mit CIK-Zellen.

Drei der elf Patienten erreichten eine volle Remission. Insgesamt zeigte sich eine gute Verträglichkeit der CIK-Zellen ohne schwere Nebenwirkungen oder Anzeichen einer schweren akuten GvHD⁴².

Eine weitere Forschungsgruppe um Laport et al. behandelte 18 Patienten, die ebenfalls an einem Rezidiv ihrer malignen Grunderkrankung nach SZT litten. Hierbei konnten 56% (10/18) der Patienten durch die Anwendung von CIK-Zellen in eine komplette Remission überführt werden. Es zeigte sich nur bei zwei Patienten eine akute GvHD Grad I-II und ein Fall von chronischer GvHD⁴³.

Weitere Phase I/II-Studien bspw. von Linn et al. bestätigen einen Überlebensvorteil und die gute Verträglichkeit von CIK-Zellen⁴⁴.

2. Zielsetzung

Patienten die, aufgrund ihrer Grunderkrankung, eine Stammzelltransplantation durchlaufen mussten, haben ein hohes Risiko an einer Virusinfektion oder an einem Rezidiv zu erkranken. Um das Risiko einer Transplantatabstoßung zu verhindern, wird der Patient mittels Kortisons oder Leukozytenantikörpern immunsupprimiert, welches das Risiko an einer schwerwiegenden Infektion zu erkranken, nochmals erhöht.

Als Therapie kann man heutzutage adoptive Zelltherapien bspw. mittels VSTs des seropositiven Spenders anwenden, um eine lebensbedrohliche Infektion zu heilen oder gar vorzubeugen.

Diese Möglichkeit besteht allerdings nur bei Patienten, die einen seropositiven Spender aufweisen. Bei seronegativen Spendern ist diese Form von Therapie nicht möglich.

Ziel dieser Dissertation war es daher, seropositiven Patienten eine virusspezifische Zelltherapie bei Infektion mit CMV zu ermöglichen, obwohl keine VST des seronegativen Spenders vorhanden sind. Die in vitro herangezüchteten VST sollen das fehlende Immunsystem in der Phase der Aplasie ersetzen und somit einen ausreichenden Schutz gegen mögliche virale Infektionen oder auch als Therapie bei bestehenden CMV-Infektionen ermöglichen.

Folgende Fragestellungen sollten durch diese Dissertation adressiert und bearbeitet werden:

- Besteht die Möglichkeit aus seronegativen T-Zellen VST herzustellen?
- Welches Protokoll führt zur Generierung CMV-spezifischer T-Zellen?
- Welche Antigen-präsentierenden Zellen werden benötigt, um das pp65-Antigen an naive T-Zellen zu präsentieren?
- Welches Koinkubationsverhältnis (APC:T-Zellen) wird benötigt, um CMV-spezifische T-Zellen zu generieren?
- Ist es möglich aus in-vitro hergestellten CMV-spezifischen Zellen, CMV-spezifische CIK-Zellen herzustellen?

3. Material und Methoden

3.1 Spenderzellen

Die Auswahl der Spender erfolgte nach Untersuchung von HLA-Merkmalen und des CMV-Status. Aufgrund des verwendeten spezifischen Nachweisantikörpers (A0201) kamen für diese Arbeit nur CMV-seronegative Spender des HLA-Typs *A0201 in Betracht. Die Ermittlung des CMV-Status erfolgte mittels IgG-Antikörper-Nachweis durch das Institut für medizinische Virologie am Universitätsklinikum Frankfurt.

Die Blutentnahme zur Gewinnung von Spenderzellen erfolgte nach Aufklärung über mögliche Risiken, schriftlicher Einverständniserklärung des Spenders und nach positivem Votum der Ethikkommission.

3.2 Material

3.2.1 Geräte

Tabelle 2: Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Sterile Werkbank "HERA safe"	Thermo ELECTRO Corp.
Inkubator "HeraCell 240i"	Thermo Scientific
Kameramikroskop Digital Sight DS-U1	Nikon
Durchlichtmikroskop "CKX41"	Olympus
Fluoreszenzmikroskop "IX71"	Olympus
Kühlschrank 3-8°C	Liebherr
Gefrierschrank -20°C "ProfiLine"	Liebherr
Gefrierschrank -80°C "HERA freeze"	Heraeus
Stickstofftank 151 - 180°C	Cryotherm
Wasserbad SA20	Preiss Daimler GmbH
Vortex "VORTEX GENIE 2"	Scientific Industries
Zellcounter	Beckmann Coulter
Durchflusszytometer, FACSCanto Diva	Becton Dickinson

Fluorometer VICTOR 3TM 1420 Multilabel Counter time-resolved	Perkin Elmer
OctoMACS™ Separator	Miltenyi Bitech GmbH
Multipette Eppendorf Stream	Eppendorf
Pipette Eppendorf Research (10-1000µl)	Eppendorf
Zentrifuge "ROTINA 46"	Hettich Zentrifugen
Zentrifuge "HERAEUS MULTIFUGE 3SR+ Centrifuge"	Thermo Scientific

3.2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Costar® Stripette (1, 5, 10, 25ml)	Corning Incorporated
Pipettenspitze Filter Tip steril (10, 100, 200, 1000µl)	Starlab Group
Zellkulturflasche (25cm ² , 75cm ²)	Corning Incorporated
Cellstar® Falcon (15ml, 50ml)	Greiner Bio-One GmbH
6-Well-Platte FALCON® (Flachboden)	Becton Dickinson
12-Well-Platte Nunclon Delta Surface (Rundboden)	Thermo Fischer Scientific
48-Well-Platte FALCON® (Flachboden)	Becton Dickinson
96-Well Platte FALCON® (Flachboden)	Becton Dickinson
96-Well Platte Nunclon Delta Surface (U-Boden)	Thermo Fischer Scientific
Zellschaber	Sarstedt
BD Plastikpak Spritze 1mL	Becton Dickinson
S-Monovette® Lithium-Heparin (9ml)	Sarstedt
Venenverweilkanüle Multifly® Set	Sarstedt
Multipipette Combitips advanced (5ml)	Eppendorf
FACS Röhrchen (5ml)	BD Biosciences
MACS® Separationssäulen	MS Miltenyi Biotec
Einfrierröhrchen CryoTube	Thermo Fischer Scientific

3.2.3 Chemikalien, Medien, Puffer und Lösungen

Tabelle 4: Chemikalien, Medien, Puffer und Lösungen

Medien	Firma
RPMI Medium 1640(1X) + GlutaMAX™ -I	Gibco by life technol.
„RPMI Medium“: RPMI Medium 1640(1X) + GlutaMAX™ -I + 10% fetales Kälber Serum + 1% Penicillin/Streptomycin	
DC CellGro® Medium	CellGenix
„DC Medium 1“: DC CellGro Medium + 1% Humanes Serum + 1% Penicillin/Streptomycin)	
„DC Medium 2“: CellGro Medium + 5% Humanes Serum + 1% Penicillin/Streptomycin	
Lösungen	Firma
Biocoll separating Solution	Biochrom GmbH
DPBS (1X)	Gibco by life technolog.
Penicillin/Streptomycin Antibiotikum	Invitrogen
EDTA-Lösung pH 8.0 (0,5M)	AppliChem
Fetales Kälber Serum	Sigma Aldrich
Bovine Serum Albumin	PAA Lab. GmbH
Destilliertes H2O	Braum
Triton-X-100	Sigma Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich
DELFLIA Europium Solution	Perkin Elmer
BADTA Reagenz	Perkin Elmer
Rinderserum Albumin 30% Solution	PAA Lab. GmbH
Ficoll-Paque Biocoll	Biochrom GmbH
MACS CD14 Microbeads	Miltenyi Bitech GmbH
MACS CD45RA Microbeads	Miltenyi Bitech GmbH
FACS Lösungen	Firma
FACS Flow / FACS Cleans	Becton Dickinson
FACS Rinse	Becton Dickinson
FACS Shutdown Solution	Becton Dickinson
FACS CST Beads	Becton Dickinson
BD Falcon™ Round Bottom Test Tubes	Becton Dickinson

3.2.4 Antikörper, Chemokine und Zellkulturen

Tabelle 5: Antikörper, Chemokine und Zellkulturen

FACS Antikörper	Firma
MHC Dextramer HLA-A*0201-PE	Immunodex
Anti-CD45-APC/Cy7	Biolegend
Anti-CD3-PerCP	BD Biosciences
Anti-CD8-APC	BD Biosciences
Anti-CD56 V450	BD Biosciences
Anti-CD14-APC	Biolegend
Anti-CD83 - Blue Violet 421™	Biolegend
CMVpp65- FITC	Thermo Fischer Scientific
Chemokine	Firma
IL-1β	PeptoTech
rh IL-4	PeptoTech
rh IL-6	PeptoTech
rh IL-7	PeptoTech
rh IL-15	PeptoTech
rh IL-21	PeptoTech
rh GMCSF	PeptoTech
LPS	Sigma-Albrich
IFN-γ	Boehringer Ingelheim
pp65-PepTivator®	Miltenyi Bitech GmbH
PGE-2	PeptoTech
TNF-α	PeptoTech

3.3. Isolierung und Selektion von Zellen

3.3.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut mittels Ficoll-Paque

Zur Herstellung von CMV-spezifischen T-Zellen und den daraus herzustellenden CIK-Zellen dienten als Ausgangsmaterial mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (*peripheral blood mononuclear cells, PBMCs*).

Zunächst wurde jeweils ca. 30ml heparinisiertes, venöses Vollblut von gesunden HLA-A0201 CMV-seronegativen Spendern gewonnen. Zur Fraktionierung der Blutbestandteile erfolgte das Ficoll-Paque Verfahren.

Das Blut wurde zunächst im Verhältnis 1:3 mittels einer gepufferten Salzlösung (DPBS) verdünnt. In einem 50ml Falcon wurden 15ml der Separationslösung Ficoll vorgelegt und das verdünnte Blut, ohne Verwirbelung, vorsichtig überschichtet. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei 700g zeigte sich eine klare Trennung der Blutbestandteile gemäß ihrer Dichte. Die PBMCs lagerten sich aufgrund ihrer geringeren Dichte über der Ficoll-Paque Schicht an und ergaben eine dünne milchige Schicht unterhalb des Plasmas. Blutbestandteile mit einer höheren Dichte, wie bspw. Erythrozyten und Granulozyten lagerten sich am Boden des Falcons ab.

Nach vorsichtigem Abpipettieren der milchigen Interphase und Überführung in ein 50ml Falcon wurden die PBMCs zweimal mit PBS gewaschen (10min, 400g). Das durch Zentrifugation entstandene Zellpellet am Boden des Falcons wurde in 1-2ml RPMI Medium aufgenommen und die Zellzahl mittels eines elektronischen Zählgeräts (Coulter-Counter) ermittelt.

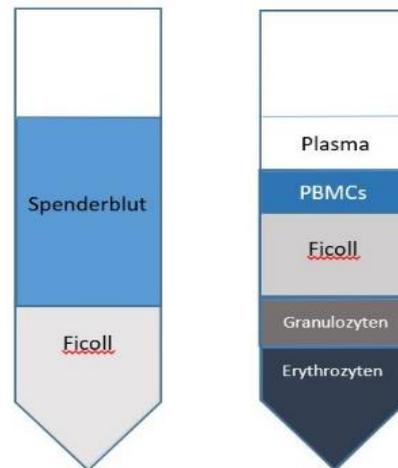


Abbildung 13: Separation der Blutbestandteile nach Ficoll
links: Falconröhrchen mit Spenderblut auf Ficoll geschichtet, rechts: Nach Zentrifugation – Auftrennung in Blutbestandteile

3.3.2 Monozytenselektion mittels Adhärenzmethode

Zur Selektion von Monozyten wurden PBMCs durch das Ficoll-Paque aus Vollblut extrahiert. Die isolierten PBMCs wurden zunächst gezählt und auf 5×10^6 Zellen pro ml eingestellt und insgesamt 10×10^6 Zellen pro Well in eine 6-Well-Platte gegeben.

Die Zellen wurden drei Stunden bei 37°C inkubiert, damit die Monozyten über Podozytenausbildung am Boden des Wells adhäreren. Die Suspension wurde danach vorsichtig abpipettiert und in eine Kulturflasche gegeben und bei 37°C zur weiteren Verwendung weiter inkubiert.

Die adhärennten Zellen wurden mit warmen PBS gewaschen und mittels Zellschaber abgelöst. Im weiteren Verlauf wurden die Zellen gezählt, in 2ml neues RPMI Medium aufgenommen und mittels CMV-pp65 Peptidpool ($1\mu\text{g}/\text{ml}$) stimuliert und 16 Stunden bei 37°C inkubiert.

Nach 16 Stunden wurde die Suspension (nicht-adhärennte Zellen) erneut abpipettiert und in ein Falcon gegeben.

Die adhärennten Zellen wurden mit kalten PBS abgespült oder mittels Zellschaber, unter mikroskopischer Kontrolle, vom Boden gelöst und in ein Falconröhrchen gegeben.

Nach einer 7-minütigen Zentrifugation der beiden Falconröhrchen bei 350U/min wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1ml RPMI Medium aufgelöst und gezählt.

3.3.3. Zellselektion mittels MACS® Microbeads

Die Anwendung von MACS® Microbeads ist eine gängige Methode zur Selektion gewünschter Zellsubpopulationen. In dieser Arbeit wurde dieses Verfahren zunächst für die Selektion von CD14⁺ Monozyten verwendet.

Im Anschluss wurden unter Anwendung von CD45RO Microbeads CD45RO⁺ Zellen in der CD14⁻ Fraktion depletiert, wodurch CD14⁻CD45RA⁺ Zellen gewonnen werden konnten.

Die mithilfe des Ficoll-Paque Verfahrens isolierten PBMCs wurden zunächst bei 300g 10 Minuten zentrifugiert. Das dabei entstandene Zellpellet wurde in 80µl Pufferlösung, bestehend aus DPBS, 0,5% Rinderserum Albumin und 2mM EDTA, resuspendiert und 20µl CD14-MACS Microbeads pro 1×10^7 Zellen hinzugefügt. Hierbei kommt es zu einer Antigen-Antikörper-Bindung zwischen den magnetischen Microbeads und den zu selektierenden Zellen.

Nach einer 15-minütigen Inkubation im Kühlschrank bei 2-8°C wurden die Zellen mit 20ml Pufferlösung pro 1×10^7 Zellen versetzt und erneut 10 Minuten bei 300g zentrifugiert.

Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 500µl Pufferlösung aufgenommen und auf die vorgefertigte Säule (MS MACS® Columns) des MACS Separator (OctoMACS™ Separator) gegeben. In den Säulen befinden sich magnetische Kügelchen, die in einem Magnetfeld eingespannt sind (OctoMACS™ Separator). Durch die magnetische Wechselwirkung zwischen den Kügelchen in der Säule und dem magnetischen Anteil der MACS® Microbeads verweilen die CD14⁺ Zellen im Magnetfeld, wohingegen die CD14⁻ Zellen durch die Säule gleiten und in einem Falcon aufgefangen werden (= negativ Fraktion).

Nach dreimaligem Waschen der Säulen mit 500µl Pufferlösung wurden die selektierten, in der Säule befindlichen Monozyten aus dem Magnetfeld entnommen und konnten über Ausüben von Druck durch den mitgelieferten Plastikpfropfen aus der Säule entfernt werden (= positiv Fraktion).

Es erfolgte eine Zählung der CD14⁺ Monozyten und eine anschließende Aufnahme in RPMI Medium.

Im Anschluss wurden die CD14⁻ PBMCs, durch das oben erläuterte Verfahren, mittels CD45RO Microbeads depletiert und es entstand eine Zellpopulation bestehend aus CD14⁻CD45RA⁺ Zellen.

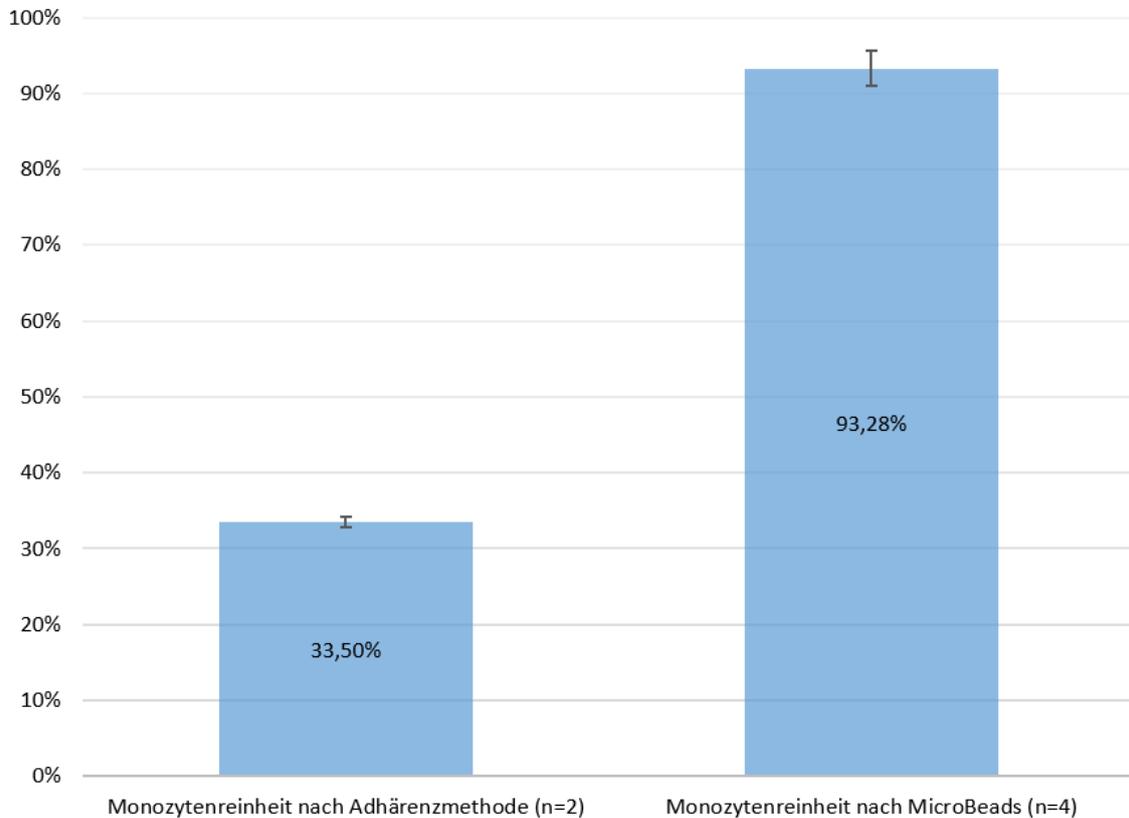


Abbildung 17: Säulendiagramm zum Vergleich der Methoden zur Monozytengewinnung bzgl. der Monozytenreinheit. Die rechte Säule zeigt eine Monozytenreinheit von 33,5% (Mittelwert, n=2) mit einer Standardabweichung von 0,71% nach Anwendung der Adhärenzmethode. In der linken Säule ist der Mittelwert der Monozytenreinheit (98,28%) mit einer Standardabweichung von 2,34% nach MicroBeads dargestellt. Hierbei wird deutlich, dass die Monozytenreinheit bei Microbeads deutlich höher ist, als bei der Adhärenzmethode.

3.4. Differenzierung von Monozyten zu reifen dendritischen Zellen

Die Herangehensweise zur Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen (DC) orientierte sich an den Methoden von Obermaier et al. und Wölfl et al., wobei kleinere Abänderungen erfolgten^{45,46}.

3.4.1 DC-Differenzierung (abgeändertes Protokoll nach Obermaier et al⁴⁵.)

Die Gewinnung der benötigten Monozyten erfolgte, wie in Abschnitt 3.3.3 beschrieben, durch die Selektion mittels MACS Microbeads aus PBMCs. Die Monozyten wurden auf eine Zellzahl von $0,5-1,5 \times 10^6$ Monozyten pro Milliliter mit RPMI Medium (+2% Humanes Serum + 100U/ml Penicillin + 100µg/ml Streptomycin) eingestellt und anschließend mit GMCSF (1000U/ml) und IL-4 (500U/ml) stimuliert. Zusätzlich wurden 1µg/ml CMV-pp65-Antigen hinzugegeben.

Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C wurden die Zellen erneut mit IL-4 (800U/ml) und GMCSF (1000U/ml), sowie zusätzlich mit IL-6 (10ng/ml), IL-1β (10ng/ml), TNF-alpha (1000U/ml) und Prostaglandin E₂ (PG E₂, 1µg/ml) stimuliert. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation bei 37°C konnten die reifen DCs geerntet werden.

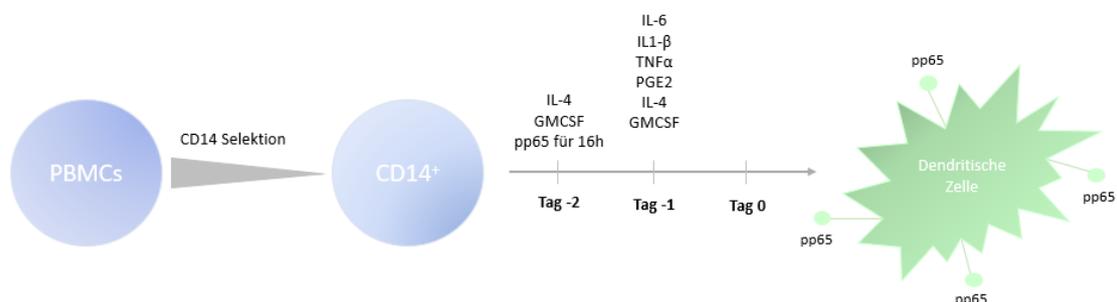


Abbildung 18: Schematische Darstellung der DC-Generierung. CD14+ Zellen wurden aus PBMCs von seronegativen Spendern selektiert. An „Tag -2“ wurden die Zellen mit CMV-pp65, IL-4 und GMCSF über 16 Stunden inkubiert und am darauffolgenden Tag mit einem Peptidpool versetzt. (Eigene Abbildung, Versuchsaufbau abgeändert nach Obermaier et al.⁴⁵)

3.4.2 DC-Differenzierung (abgeändertes Protokoll nach Wölfl et al.⁴⁶)

Die benötigten Monozyten wurden, wie in Abschnitt 3.3.3 beschrieben, durch die Selektion mittels MACS Microbeads aus PBMCs gewonnen und anschließend jeweils 2×10^6 Monozyten in 3ml DC Medium 1 aufgenommen. Das Medium wurde zuvor mit IL-4 (10ng/ml) und GMCSF (800U/ml) versetzt. Nach Überführung der Zellsuspension in eine 6-Well-Platte erfolgte eine Inkubation der Zellen für 24 Stunden bei 37°C.

Am ersten Tag nach der Selektion (DC Tag 1) wurden pro Well jeweils 1,5ml frisches DC Medium 1 mit IL-4 (10ng/ml) und GMCSF (1000U/ml) versetzt und in die Wells gegeben.

Am Tag 2 der DC-Generierung (DC Tag 2) wurden die Zellen mit kaltem PBS gelöst, gepoolt und gezählt. Je 2×10^6 Monozyten wurden in 2ml DC Medium 1 aufgenommen, dem zuvor IL-4 (10ng/ml) und GMCSF (800U/ml), IFN-gamma (100U/ml) und LPS (10ng/ml) zugesetzt wurde.

Nach der Überführung der Zellen in 6-Well-Platten, wurden diese mit 1µg/ml CMV-pp65-Antigen stimuliert.

Die Zellen wurden anschließend 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation konnten die reifen DCs geerntet werden (DC Tag 3).

In dieser Arbeit wurden die nach diesem Protokoll hergestellten reifen DCs am dritten Tag der Differenzierung (DC Tag 3) mit CD14⁻CD45RA⁺ Zellen koinkubiert, mit dem Ziel die T-Zellen zu primen.

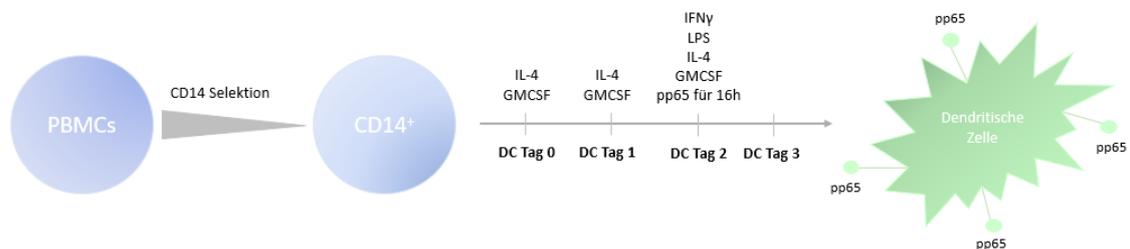


Abbildung 5: Schematische Darstellung der DC-Generierung. CD14⁺ Zellen wurden aus PBMCs von seronegativen Spendern selektiert. An „Tag 0 und 1“ wurden die Zellen mit IL-4 und GMCSF versetzt. Am zweiten Tag wurde ein Peptidpool bestehend aus IL-4, GMCSF, IFN, LPS und CMV-pp65 stimuliert und 16 Stunden inkubiert. Am „Tag 3“ konnten die reifen DCs geerntet werden und in weiteren Schritten, als APCs, verwendet werden. (Eigene Abbildung, Versuchsaufbau abgeändert nach Wölfl et al.⁴⁶)

3.5 Generierung CMV-spezifischer T-Zellen

Bei der Generierung CMV-spezifischer T-Zellen orientierte man sich in dieser Arbeit an dem Nature Protocol, von Wöfl et. al.⁴⁶ In diesem wurden T-Zellen aus CMV-seronegativen Spendern erfolgreich mit CMV-pp65 Antigen geprimt und es wurde somit eine Spezifizierung gegen CMV erreicht. Leichte Abweichungen an diesem Protokoll wurden in dieser Dissertation angewendet.

Zunächst wurde Spendern mit einem negativen CMV-Status venöses Blut entnommen und, wie in Abschnitt 3.3.1. beschrieben, durch Separation der Blutanteile, PBMCs gewonnen.

Aus den PBMCs erfolgte die Selektion der Monozyten via CD14-MACS® Microbeads (Abschnitt 3.3.3), die zu DCs differenziert wurden (Abschnitt 3.4.2).

Die restlichen PBMCs wurden bis zum zweiten Tag der DC-Generierung mit RPMI-Medium versetzt und bei 37°C gelagert. An DC Tag 2 wurden die PBMCs via CD45RO-MACS® Microbeads (Miltenyi) von terminal differenzierten Zellen depletiert und es wurde mit naiven Zellen (CD45RA⁺) weitergearbeitet.

Nach Zählung der CD45RA⁺-T-Zellen erfolgte eine Entnahme von 6×10^6 Zellen pro Well. Nach Zentrifugation (7min bei 350xg) und Abkippung des überschüssigen Mediums, wurden die Zellen in 2ml DC Medium 2 aufgenommen. Das Medium wurde zuvor mit IL-7 (5ng/ml) angereichert, bevor die Zellen in diesem bis zum nächsten Tag bei 37°C inkubiert wurden.

An DC Tag 3 erfolgte die Koinkubation (KI Tag 0) mit den DCs und den stimulierten CD45RA⁺ Zellen. Zunächst wurden die generierten DCs aus den Wells mittels DPBS und Zellschabern gelöst, gepoolt und gezählt. Die CD45RA⁺ Zellen wurden ebenfalls gezählt. $0,5 \times 10^6$ DCs und 2×10^6 CD45RA⁺ Zellen wurden in je ein 15ml Falcon überführt (Verhältnis 1:4), zentrifugiert (7min bei 350xg) und in 1ml DC Medium 2 aufgenommen. Das Medium der CD45RA⁺ Zellen wurde zuvor mit IL-24 (60ng/ml) versetzt. Es entstanden somit 4 Ansätze á 500µl in einer 48Well-Platte, die 72 Stunden bei 37°C inkubiert wurde.

Am dritten Tag der Koinkubation (KI Tag 3) kam es zur ersten Stimulation mittels IL-15 (5ng/ml) und IL-7 (5ng/ml). Zuvor wurde 500µl warmes DC Medium 2 pro Well vorgelegt. Die Platte wurde 72 Stunden bei 37°C weiter inkubiert.

Eine zweite Stimulation erfolgte am fünften Tag der Koinkubation (KI Tag 5). Dabei wurden die Zellen gelöst, in eine 12-Well-Platte überführt und mit 1ml warmes DC Medium 2 pro Well, IL-15 (5ng/ml) und IL-7 (5ng/ml) versetzt. Die Platte wurde erneut 48 Stunden bei 37°C inkubiert.

Am siebten Tag erfolgte die letzte Stimulation vor der „fluorescence-activated cell sorting“--Analyse (FACS). Die Zellen wurden gelöst und in eine 6-Well-Platte überführt. 2ml warmes DC Medium 2 pro Well wurden vorgelegt und mit IL-15 (10ng/ml) und IL-7 (10ng/ml) versetzt. Die Platte wurde 72 Stunden bei 37°C weiter inkubiert.

Eine Analyse der Zellen erfolgte an Tag 10 – 12 über Flowzytometrie (BD FACSCantoDiva). Hierzu wurden Samples der Zellen mit fluoreszierenden FACS Antikörpern versetzt (Immunodex MHC Dextramer HLA-A*0201-PE, Biolegend CD45-APC/Cy7, BD Biosciences CD3-PerCP, BD Biosciences CD8-APC, BD Biosciences CD56-V450) und ausgewertet.

Um eine höhere Zahl von CMV-spezifischen T-Zellen zu erzielen, wurde das Well mit dem höchsten Anteil an gemessenen CMV-spezifischer Zellen mit dem zuvor genannten CMV-PepTivator® nochmals restimuliert und nach 72 Stunden wiederum via FACS-Analyse ausgewertet.

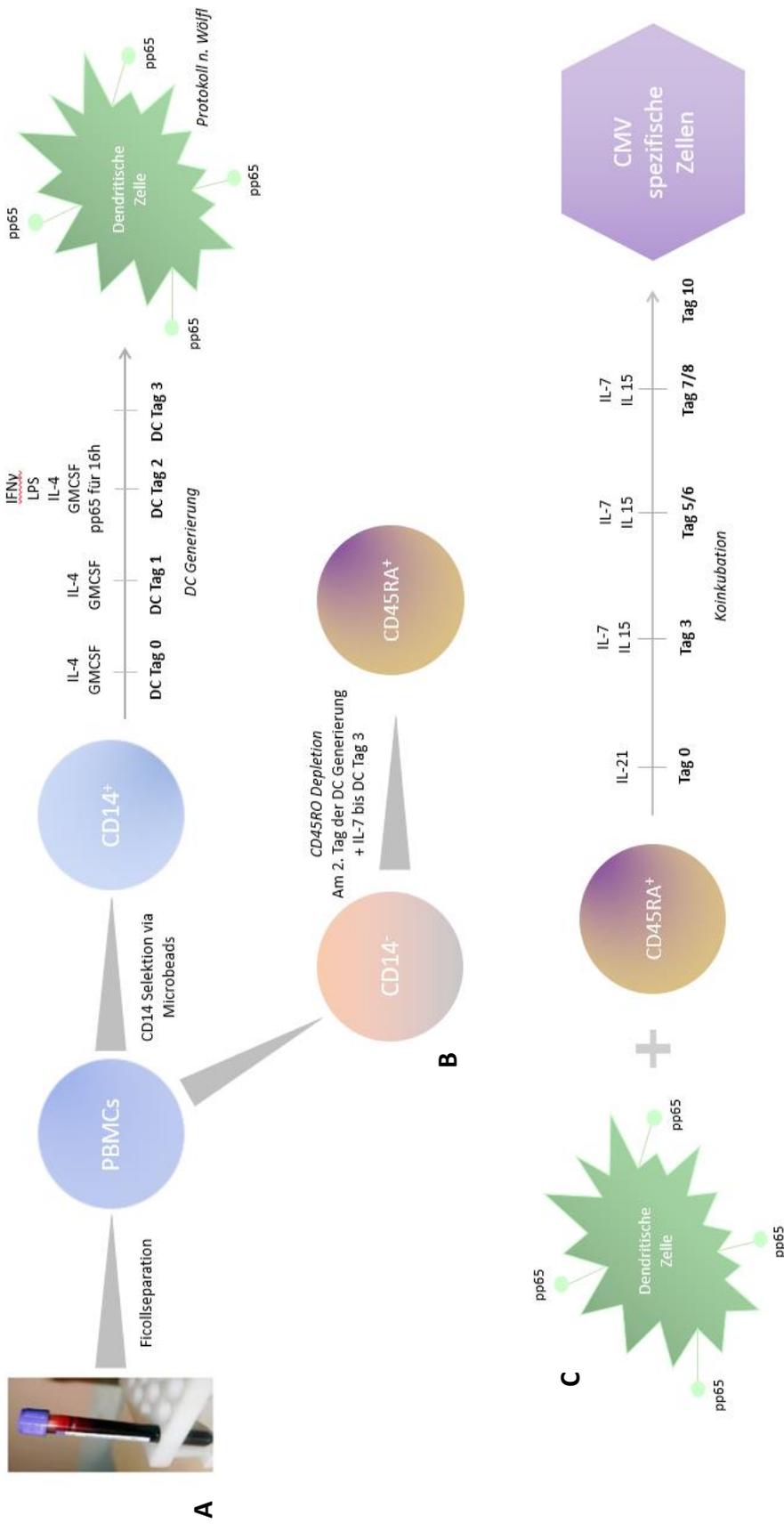


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Generierung von CMV-spezifischen T-Zellen aus seronegativem Spendermaterial. In dieser Abbildung sind drei Schritte dargestellt. Zu sehen ist die DC Generierung (A), Depletion von CD45RO Zellen (B) und die Koninkubation zwischen DCs und CD45RA⁺ Zellen (C). Das Resultat dieser Schritte führte zu CMV-spezifischen T-Zellen. (Eigene Abbildung)

3.6. Generierung Zytokin-induzierter Killerzellen

1991 wurde von Schmidt-Wolf et al.³⁵ ein Protokoll zur Generierung CIK-Zellen entwickelt. Dieses Protokoll verwendete IL-2 zur Stimulation der Zellen.

Auf diesem Protokoll aufbauend veröffentlichte Rettinger et al. 2012 eine Arbeit in der gezeigt wurde, dass CIK-Zellen, die mit IL-15 stimuliert werden, sehr viel effektiver gegen Tumorzellen sind, als Zellen, die nur mit IL-2 aktiviert wurden.

In dieser Arbeit wurden die hergestellten CIK-Zellen nach dem Protokoll von Rettinger et al.³⁹ generiert.

PBMCs wurden, wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben, durch Ficoll isoliert und mit RPMI Medium auf eine Zellzahl von $3 \times 10^6/\text{ml}$ eingestellt.

Eine Stimulation mit $\text{INF-}\gamma$ (500U/ml) erfolgte am Tag der Isolation (Tag 0). Die Zellkultur wurde 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

Am darauffolgenden Tag (Tag 1) versetzte man die Zellkultur mit IL-2 (500U/ml) und Anti-CD3 Antikörper (100ng/ml).

Eine weitere Stimulation mit IL-15 (50ng/ml) erfolgte immer am vierten und achten Tag. Vor jeder Stimulation wurde die Zellzahl mit RPMI Medium auf $1 \times 10^6/\text{ml}$ eingestellt.

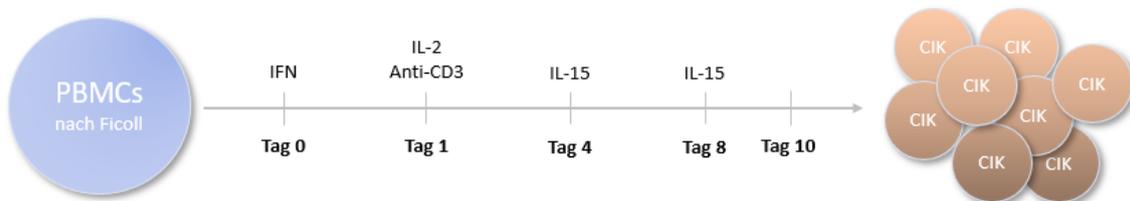


Abbildung 19: Schematische Darstellung zur Herstellung von CIK-Zellen aus seropositiven Spendern. Zunächst wurden PBMCs aus CMV-seropositiven Spendern extrahiert. Stimulation erfolgte wie in der Darstellung. (Eigene Abbildung)

3.7. Analyse der hergestellten Zellkulturen

3.7.1 Durchflusszytometrie

Es handelt sich bei der Durchflusszytometrie um eine gängige Methode zur Analyse von bestimmten Zellpopulationen.

Die Analyse via Durchflusszytometer (FACS) basiert auf der Detektion von Lichtstreuungen („light scatter“) der Zellen beim Passieren eines Laserstrahls. Die Zellen werden mittels Unterdrucks in das FACS eingezogen und dort in einen Mikrokanal geleitet. Dieser Kanal führt jede Zelle nacheinander durch einen Laserstrahl. Diese Methode ermöglicht es, dass jede Zelle einzeln analysiert wird. Somit lässt sich durch die Streuung des Lichtes auf die Größe und die Granularität jeder Zelle schließen und diese einer bestimmten Zellart zuordnen (forward/sideward scatter)^{47,48}.

Zusätzlich können die zu analysierenden Zellen mit fluoreszierenden CD-Antikörper markiert werden. Diese Antikörper gehen eine Bindung mit den CD-Molekülen auf der Oberfläche der Zellen ein, wodurch im FACS durch die Lichtstreuung der Antikörper jede einzelne Zelle einem oder mehreren Oberflächenmerkmalen zugeordnet werden kann. Bestimmte Zellpopulationen werden durch spezielle CD-Moleküle charakterisiert, somit kann man die in dieser Arbeit hergestellten Zellkulturen darüber analysieren. Die jeweiligen Oberflächenmarker sind in Tab. XY aufgelistet^{47,48}.

Um eine adäquate Einstellung der Gates zu gewährleisten wurde vor jeder Messung eine Negativkontrolle mittels ungefärbter Zellen erstellt und die Gates danach eingestellt.

In dieser Arbeit wurde die FACS Analyse zur Detektion von CMV-spezifischen T-Zellen, der Messung der Monozytenreinheit, sowie der Monozytendifferenzierung zu DCs verwendet.

Subpopulationen	Oberflächenmarker
T-Zellen	CD3+
T-Helferzellen	CD3+ CD4+
Zytotoxische T-Zellen	CD3+ CD8+
T-NK-Zellen	CD3+ CD56+
Zytotoxische T-NK-Zellen	CD3+ CD56+ CD8+
Naive Zellen	CD45RA+ CD62L+
Effektor Zellen (terminal differenziert)	CD45RO+CD62L-
NK-Zellen	CD56+ CD3-
B-Zellen	CD19+
Monozyten	CD14+
Dendritische Zellen	CD83+

Tabelle 6: Auflistung der Oberflächenmoleküle auf den jeweiligen Subpopulationen

4. Ergebnisse

4.1 Vergleich der Selektions-Methoden von Antigen-präsentierenden Zellen aus PBMCs

Nach der Isolation der Spender PBMCs wurden die darin enthaltenen Monozyten unter Anwendung zweier unterschiedlicher Methoden selektioniert. Nach der Selektion wurde mittels FACS-Analyse die Monozytenreinheit jeweils bestimmt und die Methoden und Ergebnisse miteinander verglichen. Darüber hinaus wurde die Beladung der Monozyten mit CMV-pp65-Peptid überprüft.

Bei der Monozytenselektion mittels Adhärenzmethode kam es nach einer dreistündigen Inkubation von 20×10^6 PBMCs zu einer, im Mikroskop sichtbaren, Anheftung der Monozyten am Boden der 6-Well-Platten. Nach Abschabung der Monozyten am darauffolgenden Tag konnten $0,2 \times 10^6$ Zellen gezählt werden. In der Durchflusszytometrie wurde eine Monozytenreinheit von 34% und eine CMV-pp65-Beladung von 99,6% ermittelt (n=1).

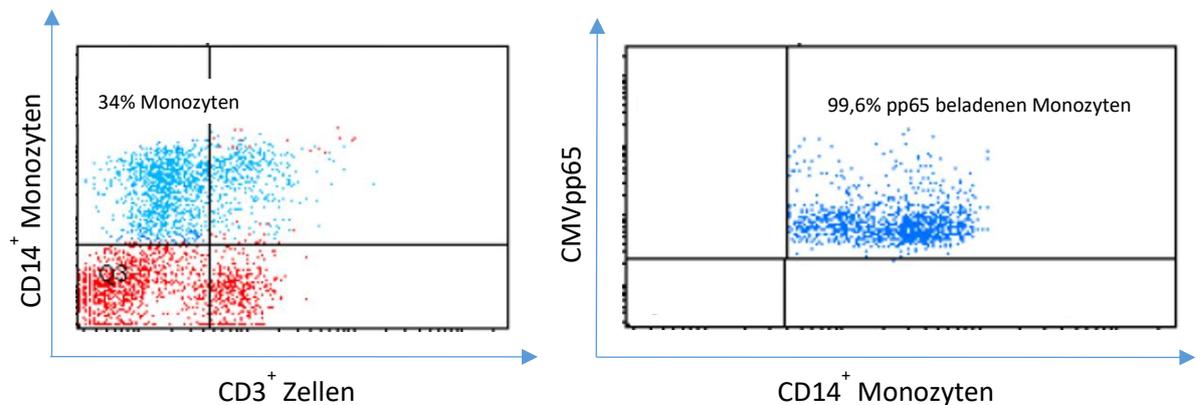


Abbildung 20: Durchflusszytometrische Untersuchung der Reinheit von Monozyten, die mittels Adhärenzmethode generiert wurden. Dargestellt sind die FACS-Plots eines repräsentativen Spenders. *Linkes Bild:* Plot zeigt Monozyten (y-Achse) in der CD3⁺-Zellpopulation. Im linken oberen Quadranten sind die CD14⁺ Monozyten zu 34% messbar. *Rechtes Bild:* Plot auf Monozyten gegatet. Hierbei zeigt sich, dass 99,6% der Monozyten mit CMVpp65 beladen.

Um die Monozytenreinheit zu verbessern, verglich man in dieser Arbeit die Adhärenzmethode mit der Zellselektion mittels Microbeads. Hierbei wurden aus $33,3 - 55 \times 10^6$ PBMCs eine Monozytenzahl von $6,0 - 7,4 \times 10^6$ (absolut) nach Anwendung des Microbeads-Protokolls ermittelt.

Die Monozytenreinheit betrug $85,9 - 95,3\%$ ($n = 4$).

Eine Untersuchung der Beladung der Monozyten mit CMVpp65 wurde hierbei nicht durchgeführt.

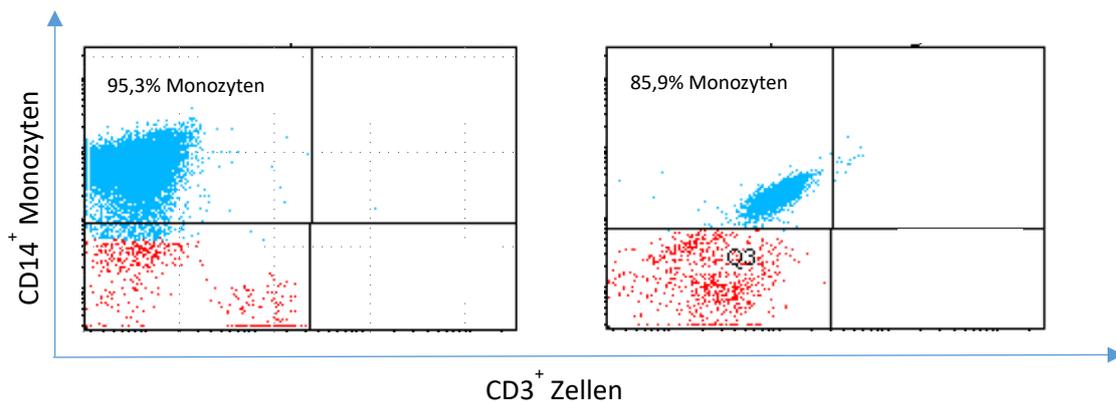


Abbildung 21: Durchflusszytometrische Untersuchung der Reinheit von Monozyten mittels Microbeads. Dargestellt sind die FACS-Plots von zwei Spendern. Plot zeigen Monozyten (y-Achse) in der CD3⁺-Zellpopulation (x-Achse). Im linken oberen Quadranten sind die CD14⁺ Monozyten zu 95,3% (links) bzw. 85,9% (rechts) messbar.

Aufgrund der signifikant höheren Monozytenreinheit bei der Selektion mittels Microbeads, im Gegensatz zu der Adhärenzmethode, wurde in dieser Arbeit ausschließlich mit der Microbeads-Methode weitergearbeitet.

4.2 Analyse zur Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen

Die Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie und mikroskopischer Kontrolle bei insgesamt 5 Spendern untersucht. Dabei wurden die zuvor isolierten und differenzierten Monozyten mittels FACS-Antikörper gegen CD14 und CD83 inkubiert. Die Zellen wurden jeweils an Tag 0 bis Tag 3 der Differenzierung mit den jeweiligen Oberflächenmarkern markiert und mittels Durchflusszytometrie detektiert.

Es konnte gezeigt werden, dass die Monozyten nach der Stimulation mit IL-4, pp65 und GMCSF an Tag 0 und 1 sowie der weiteren Stimulation mit IL-4, GMCSF, LPS, und IFN- γ an Tag 2 ihre CD14-Oberflächenmoleküle runterregulieren und zu CD83⁺ dendritischen Zellen differenzieren. In Abb. 9 sind FACS Plots der zeitlichen Abfolge der untersuchten Zellen eines repräsentativen Spenders dargestellt.

Zu beobachten ist, dass an Tag 0, direkt nach der Monozytenselektion, keine CD83⁺ Zellen und 98,2% CD14⁺ Monozyten darzustellen waren. Nach der ersten Stimulation konnten an Tag 1 40,6% CD83⁺ Zellen nachgewiesen werden. An Tag 3, nach der zweiten Stimulation mit den oben genannten Stimulantien, zeigte sich ein deutlicher Shift von Monozyten zu DCs mit einer prozentuellen Zahl von CD83⁺ DCs von 80,9%.

In den mikroskopischen Untersuchungen konnte der Shift bildlich dargestellt werden. Im Laufe der Zeit zeigte sich eine deutliche morphologische Veränderung der

Monozyten von kleinen runden Zellen zu dendritischen Zellen mit ihrer charakteristischen sternförmigen Form und Zytoplasma-Fortsätzen.

Zusammenfassend ließ sich zeigen, dass es im Laufe der Differenzierung zu einem Shift, also einer Abnahme von Monozyten und einer Zunahme von DCs, kommt. Dieser Differenzierungsshift lässt sich via FACS Plots und in der mikroskopischen Darstellung gut darzustellen (Abb. 10).

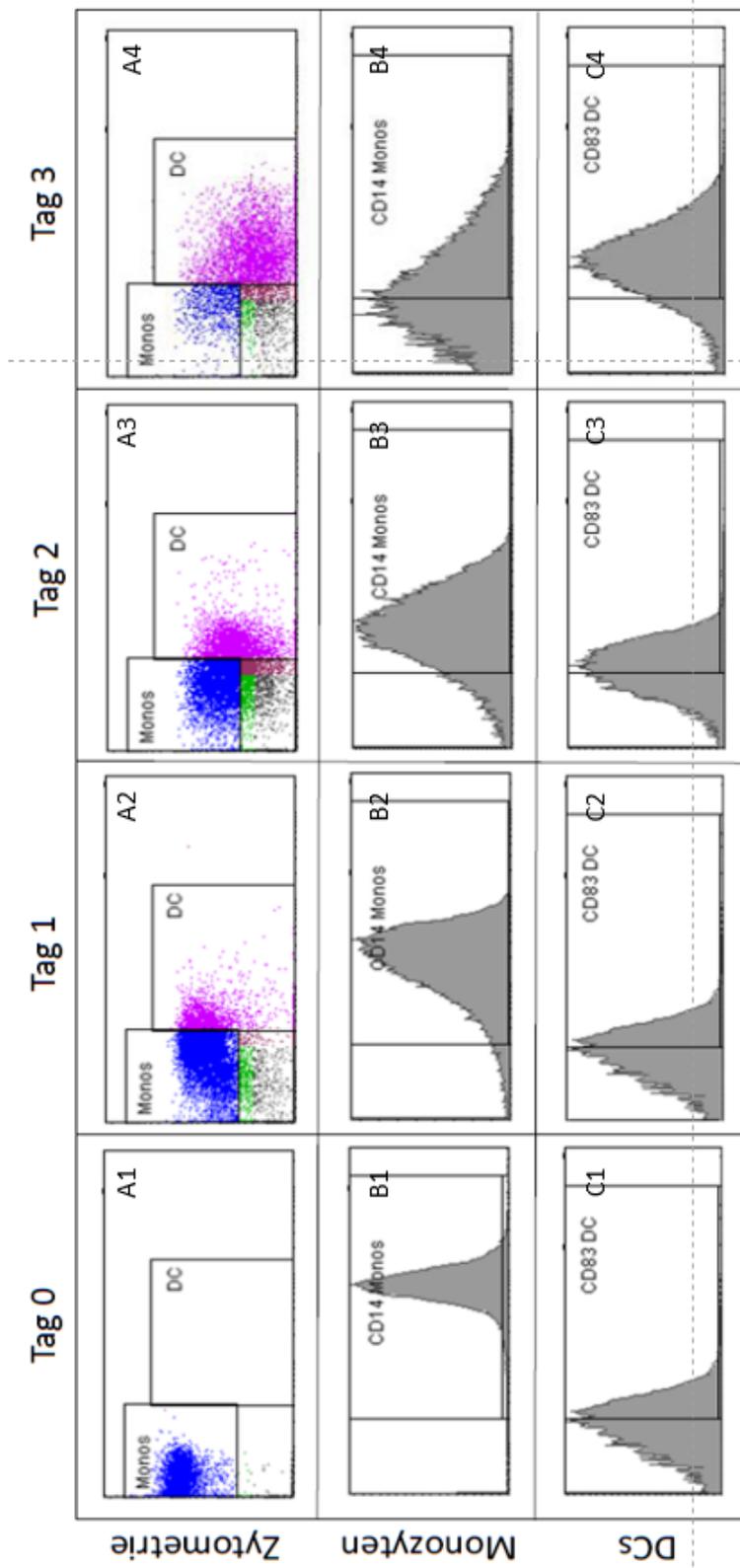


Abbildung 22: Verlaufsdarstellung des zellulären Shifts von Monozyten zu DCs. Reihe A zeigt FACS-Plots, die auf X-Achse CD14⁺ Zellen und auf der Y-Achse CD83⁺ Zellen darstellen (blau: CD14⁺ Monozyten, lila: CD83⁺ DCs, zuvor nach Negativ-Kontrolle eingestellt). Reihe B und C stellt graphisch die Abnahme von CD14⁺ Monozyten (B) [x-Achse zeigt CD14⁺ Zellen] bzw. CD83⁺ DCs (C) [y-Achse zeigt CD83⁺ Zellen] im Verlauf des Protokolls dar.

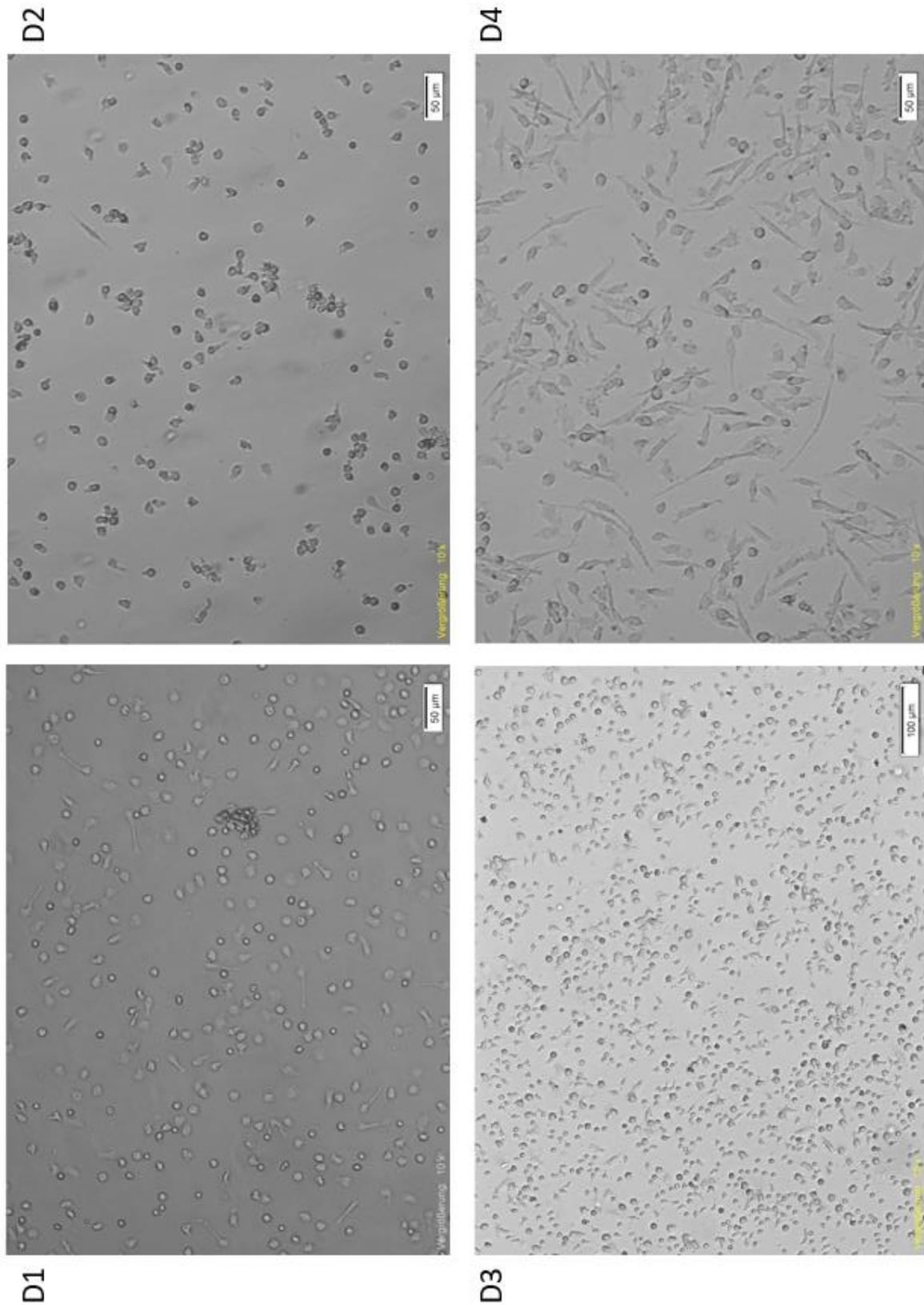


Abbildung 23: Abb. D1-4 zeigt die Mikroskopische Darstellung der morphologischen Veränderung während der Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen (Vergrößerung: D1 10x, Maßstab 50µm , D2 – 10x, Maßstab 50µm, D3 – 10x Maßstab 100µm , D4– 10x, Maßstab 50µm)

4.3 Generierung CMV-spezifischer Zellen

Innerhalb dieser Dissertation wurden mehrere Ansätze versucht, um CMV-spezifische Zellen aus Vollblut von CMV-seronegativen Spendern zu generieren. Der Grundgedanke war, dass man naive, nicht geprimte T-Zellen mit einem CMV-spezifischen Antigen in Kontakt bringt, um eine Immunkaskade auszulösen und die Zellen somit auf CMV primt, ohne, dass sie mit dem Virus jemals in Kontakt kam.

Ein wichtiger Schritt ist hierbei die Antigenpräsentation durch geeignete Zellen, wie z.B. Monozyten oder DCs. Es kommt durch diese Zellen zu einer Internalisierung des Viruspartikels, was zu einer Aktivierung der antigenpräsentierenden Zelle mit anschließender Antigenpräsentierung auf deren Oberfläche führt.

Nach Antigenpräsentation und Kontaktaufnahme mit T-Lymphozyten könnte eine Immunkaskade in Gang gesetzt werden und zur Ausbildung von CMV-spezifischen T-Lymphozyten führen. Nachfolgend werden die verschiedenen Herangehensweisen erläutert.

4.3.1 Koinkubation von Monozyten und PBMCs

4.3.1.1. Monozyten generiert durch Adhärenzmethode

Die ersten Versuchsansätze erfolgten zwischen unmanipulierten PBMCs des CMV-seronegativen Spenders und dessen zuvor, mittels Adhärenzmethode oder Microbeads, extrahierten Monozyten.

Bei diesen Versuchsansätzen wurden die Monozyten mittels Adhärenzmethode isoliert (n=2). Hierbei sollte zunächst generell herausgefunden werden, ob eine Koinkubation zwischen CMV-pp65-stimulierten Monozyten und unmanipulierten PBMCs zu einer Generierung von CMV-positiven Zellen führt.

Nach der Selektion und Inkubation der Monozyten mit CMV-pp65 an Tag 0 erfolgte die Koinkubation mit den PBMCs im Verhältnis 1:1 und 1:10 an Tag 1.

Die Suspensionen wurden an Tag 2 und Tag 4 bzw. Tag 9 mittels FACS-Analyse untersucht und es zeigten sich an allen Tagen keine CMV-spezifischen Zellen (exemplarische Darstellung der FACS-Plots der Koinkubation im Verhältnis 1:10 in Abb. 10).

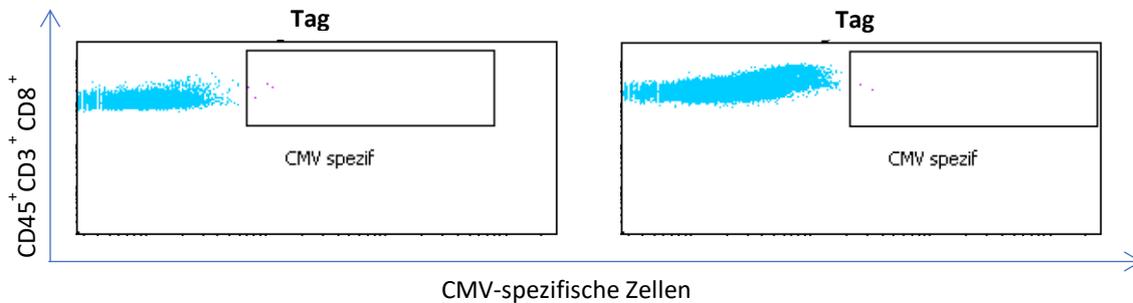


Abbildung 24: Durchflusszytometrische Untersuchung der Koinkubation zwischen APCs (generiert mittels Adhärenzmethode) und PBMCs exemplarisch an Tag 2 und 9 im Verhältnis 1:10. X-Achse zeigt die CMV-spezifischen Zellen, die im eingerahmten Feld dargestellt sind, der nach einer negativ Kontrolle eingestellt wurde. Y-zeigt die gegateten CD45⁺CD3⁺CD8⁺CD56⁻ Zellen. Hierbei zeigten sich keine CMV-spezifischen Zellen.

Da keine CMV-spezifischen Zellen (n=2) generiert werden konnten und die Monozytenreinheit bei der Adhärenzmethode nicht die gewünschten Ergebnisse erzielt hatte (s. 3.1.), wurde die Adhärenzmethode durch die Selektion mittels Microbeads ersetzt, um das Verhältnis zwischen PBMCs und Monozyten noch genauer einstellen zu können und somit eine mögliche Fehlerquelle auszuschließen.

4.3.2.2 Monozyten generiert durch Microbeads

Mittels Microbeads konnte eine weitaus höhere Monozytenreinheit erzielt werden und somit das Verhältnis zwischen den Zellen besser kontrolliert und eingestellt werden.

Um zu erforschen, ob dies möglicherweise die Ursache für den Misserfolg war wurden die, für die Koinkubation verwendeten, Monozyten mittels Microbeads selektiert. Es wurden mehrere Ansätze mit unterschiedlichen Spendern (n=4) im Verhältnis Mono zu PBMCs von 1:1, 1:5, 1:10 und 2:1 angesetzt.

Eine FACS Untersuchung erfolgte an Tag 1, 5 und 12. Es zeigten sich keine CMV-spezifischen Zellen.

4.3.2 Koinkubation von DCs und PBMCs

Da die Koinkubation mit CMV-pp65 stimulierten Monozyten nicht den gewünschten Erfolg erbrachte, wurden die Monozyten nach dem Protokoll von Obermaier et al. (s. Abschnitt 3.4.1) zu DCs differenziert. Eine Koinkubation zwischen DCs und unmanipulierten PBMCs bzw. generierten CIK-Zellen des jeweiligen Spenders im Verhältnis von 1:4 wurde angesetzt (n=3). Es erfolgte eine Stimulation mit IL-15 an Tag 3, 6 und Tag 8.

Am 11. Tag der Koinkubation wurde die Zellkultur untersucht, allerdings konnten auch mit dieser Herangehensweise keine CMV-spezifischen Zellen nachgewiesen werden.

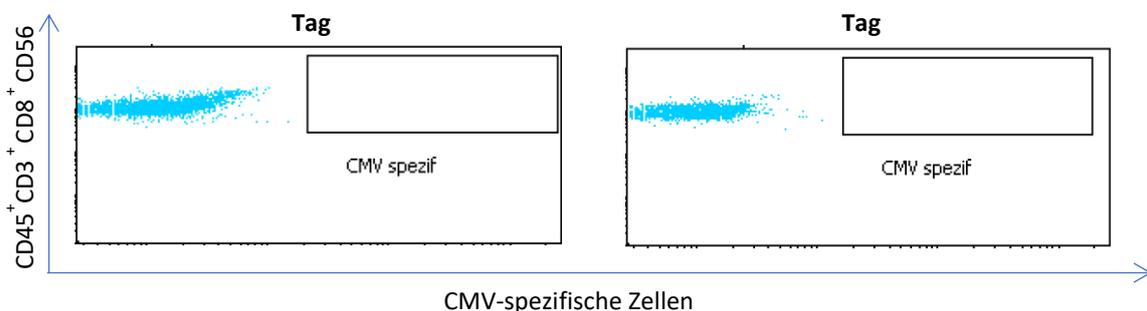


Abbildung 25: Durchflusszytometrische Untersuchung der Koinkubation zwischen APCs (generiert mittels Adhärenzmethode) und PBMCs exemplarisch an Tag 5 und 8 im Verhältnis 1:10. X-Achse zeigt die CMV-spezifischen Zellen, die im eingerahmten Feld dargestellt sind, der nach einer negativ Kontrolle eingestellt wurde. Y-zeigt die gegateten $CD45^+CD3^+CD8^+CD56^-$ Zellen. Hierbei zeigten sich keine CMV-spezifischen Zellen.

4.3.3 Generierung CMV-spezifischer Zellen

Nach mehreren negativen Versuchen CMV-spezifische T-Zellen aus naivem Spendermaterial zu generieren, orientierte man sich an dem im März 2014 erschienenen Protokoll von Woelfl et al⁴⁶.

In ihrer Arbeit stellten sie ein Protokoll zur Herstellung von reifen DCs und Stimulation und Expansion von T-Zellen vor (*ACE-CD8-Methode = antigen-specific activation and cytokine-facilitated expansion of naive, human CD8+ T cells*). Die Gruppe arbeitete nur mit reifen Peptid-beladenen DCs sowie aufbereiteten, naiven CD8+ T-Zellen. Hierbei verwendeten sie LPS und IFN- γ zur Herstellung von DCs und depletierten alle CD45RO+-T-Zellen aus dem T-Zell-Pool.

Als neuen Versuchsansatz wurde das Protokoll von Wölfel et al. als proof-of-principle mit leichten Veränderungen getestet.

Wölfel et al. verwendeten zur Generierung von DCs die in Abschnitt 3.3.2 erwähnte Adhärenzmethode, die, wie in Abschnitt 4.1 gezeigt, in dieser Arbeit keine ausreichende Monozytenreinheit erzielte. Daher wurde die Monozytenselektion in dieser Dissertation mittels CD14-MACS Microbeads Methode durchgeführt. Als weitere Unterscheidung ist anzugeben, dass eine Bestrahlung der DCs nach der Differenzierung, wie im Wölfel-Protokoll in dieser Arbeit nicht erfolgte.

Insgesamt wurden 5 Spender mittels ACE-CD8-Methode untersucht (n=5). Es wurden jeweils 5×10^5 naive T-Zellen im Verhältnis von 1:4 mit reifen, CMV-pp65-präsentierenden DCs inkubiert und der Versuchsaufbau wie in Abschnitt 3.5 beschrieben durchgeführt.

In der anschließenden Analyse der Zellen an KI Tag 10 mittels Durchflusszytometrie, wurden durchschnittlich 350.000 CD45⁺ lymphozytäre Zellen aufgenommen (n=5). Die in Abb. 13 dargestellten FACS Plots wurden auf CD45⁺CD3⁺CD8⁺Zellen gegatet und zeigen die gepimten T-Zellen. Die Gates wurden alle zuvor nach einer negativen Kontrolle eingestellt.

Zusätzlich wurde untersucht, ob die CMV-spezifischen Zellen ein CD56-Molekül an ihrer Oberfläche tragen und wieviel Prozent dieser Teil der Population ausmacht.

Bei allen 5 Spendern konnte gezeigt werden, dass CMV-spezifische Zellen, nachgewiesen werden konnten. Die Varianz der detektierten CMV-spezifischen Zellen betrug je nach Spender 0,33 – 5,7% der CD45⁺CD3⁺CD8⁺ Zellen.

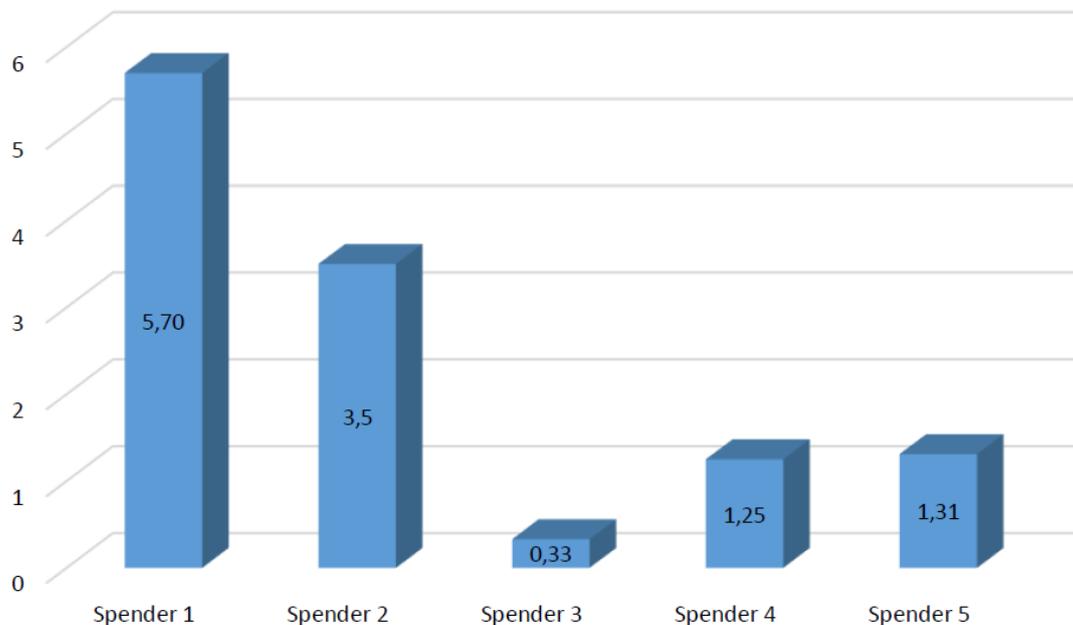


Abbildung 26: Darstellung der fünf untersuchten Spender bzgl. des prozentualen Anteils der CMV-spezifischen Zellen. Der prozentuelle Anteil der CMV-spezifischen Zellen betrug zwischen 0,33 und 5,7% der Gesamtpopulation. Der Versuchsaufbau wurde bei jedem Spender einmal durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass der überwiegende Teil der CMV-spezifischen Zellen keine CD56-Oberflächenmoleküle auf ihrer Oberfläche tragen. In 82,5 – 96,8% der CD45⁺CD3⁺CD8⁺ handelt es sich um Zellen ohne CD56-Moleküle, worunter auch die meisten CMV-spezifischen Zellen zu finden sind.

In den Abbildungen 13 sind die FACS-Abbildungen von 3 Spendern exemplarisch dargestellt. Diese drei Spender zeigten unter allen untersuchten Spendern (n=5) den höchsten prozentualen Anteil CMV-spezifischer Zellen.

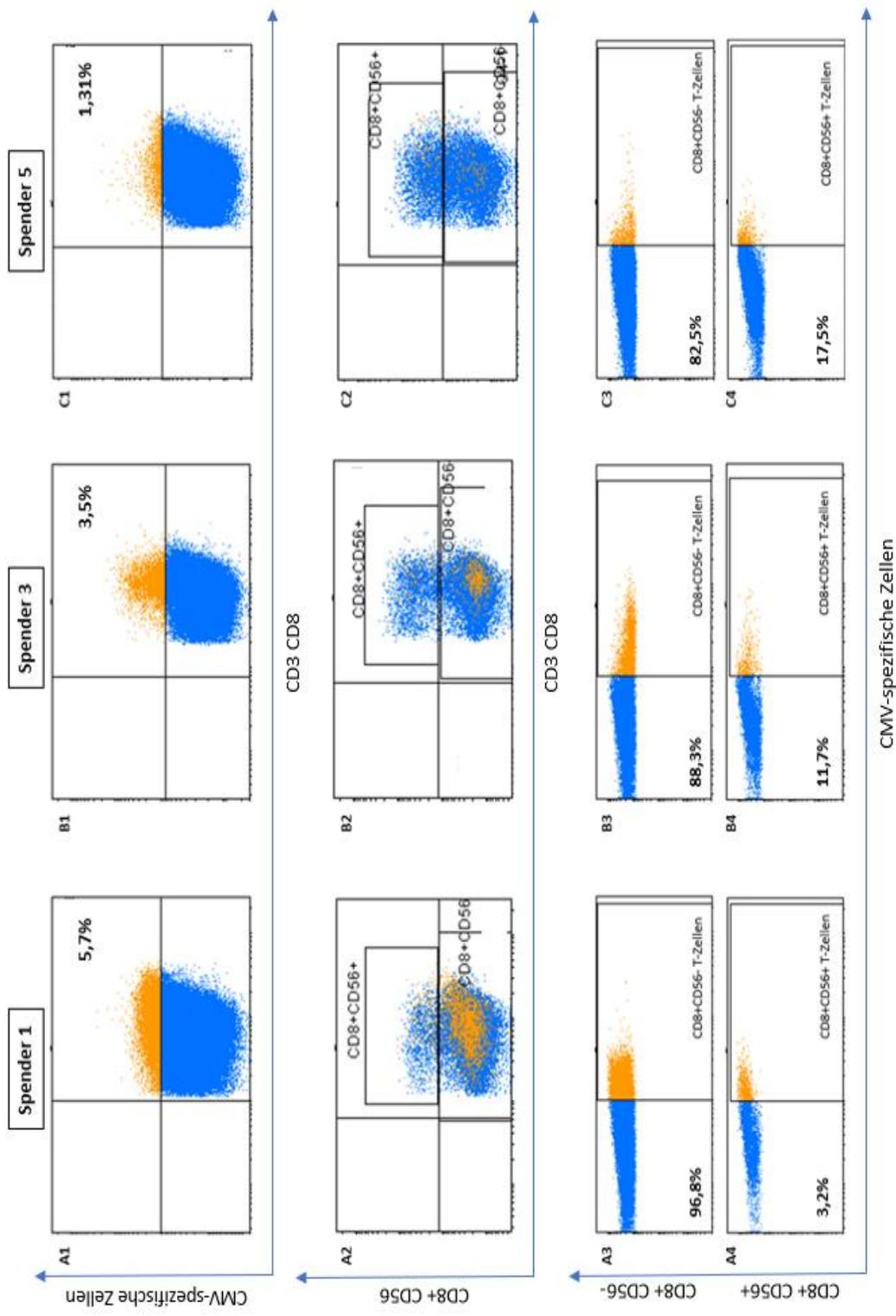


Abbildung 27: Darstellung der FACS Plots Ergebnissen zur Generierung von CMV-Spezifischen Zellen. Exemplarisch sind drei Spender zu sehen, die jeweils in Bild 1-4 unterteilt sind. In allen Bildern: gelb = CMV-spezifische Zellen, blau = CMV-negative Zellen.

Bildreihe 1 zeigt Plots, die die CMV-spezifischen Zellen der Gesamtpopulation (CD3⁺CD8⁺) darstellen. Bildreihe 2 ist auf die Gesamtpopulation gegattet und unterscheidet zwischen Zellen mit oder ohne CD56-Molekül auf der Zelloberfläche. Bildreihe 3 und 4 zeigen den prozentualen Anteil der CD56⁺ und CD56⁻ Zellen in der Population und zeigt die CMV-spezifischen Zellen in dieser Subpopulation

5. Diskussion

Die hämatogene Stammzelltransplantation zeigte sich über die letzten Jahrzehnte als effektiver Therapieansatz für viele hämatologische Erkrankungen und immundefizitäre Syndrome. Um ein Engraftment der Spenderstammzellen zu ermöglichen und eine GvHD zu vermeiden, ist eine Immunsuppression notwendig, wodurch die Gefahr an einer schwerwiegenden Infektion zu erkranken um ein Vielfaches steigt. Infektionen bspw. mit CMV oder EBV zeigen eine hohe Morbidität und Mortalität. Sie sind ein limitierender Faktor einer erfolgreichen SZT, weil die Therapie mittels Virustatika eine hohe nephro-, als auch myelotoxische Komponente aufweist und eine geringe therapeutische Breite / Therapielimitation hat.

Als Alternative zur pharmakologischen Therapie wurde die adoptive Zelltherapie entwickelt. Anfangs infundierte man den Patienten unmanipulierte Spenderlymphozyten eines seropositiven Spenders (DLI), um einer schweren, lebensbedrohenden Virusinfektion entgegenzuwirken. Aufgrund der fehlenden Manipulation der DLI kann es zu starken, teils lebensbedrohlichen GvHD Reaktionen kommen.

In den letzten Jahrzehnten wurde die adoptive Zelltherapie weiterentwickelt. Aktuelle Studien⁴⁹⁻⁵² zeigen, dass die Selektion und Expansion von virus-spezifischen T-Zellen zu einem signifikanten Rückgang der Alloreaktivität und einer Minimierung der Viruslast kommt (s. Abschnitt 5.4). Es wurde hiermit eine virusspezifische Therapie entwickelt, die sehr wenige Nebenwirkungen und eine hohe Effektivität zeigt. Dieses Verfahren ist allerdings nur bei seropositiven Spendern möglich, die VST im Blut aufweisen.

5.1 Generierung CMV-spezifischer T-Zellen aus seronegativen

Material

Eine große Herausforderung zeigt sich bei einer seronegativen Spender/seropositiven Empfänger – Konstellation, da hier keine VST als Therapie einer Virusinfektion eingesetzt werden kann.

Daher wurden in dieser Arbeit verschiedene Versuchsansätze getestet, um herauszufinden welche APC benötigt werden, welche Stimulanzen gewählt werden müssen und auch welches Verhältnis die Koinkubation zwischen naiven Zellen und APCs aufweisen muss um idealerweise CMV-spezifische Zellen zu erhalten. Ziel war es daher CMV-spezifische T-Zellen durch in-vitro Priming mittels CMV-pp65-beladene APCs aus CMV-negativen Spenderzellen herzustellen.

Um dieses Ziel zu erreichen, waren mehrere Versuchsansätze erforderlich. Der erste Schritt bestand darin, zu ermitteln, welche Zellen zur Antigenpräsentation erforderlich sind. Aus der Literatur ist bekannt, dass Monozyten, aber auch B-Zellen, DCs und Makrophagen aufgenommene Antigene präsentieren können und somit eine Immunkaskade, mit anschließender Aktivierung von T-Zellen, in Gang setzen können.

Da sich DCs und Makrophagen aus Monozyten entwickeln, entschied man sich in dieser Arbeit, CD14+ Monozyten als APCs für die ersten Versuche einzusetzen.

Wie bereits gezeigt, können Monozyten mittels Adhärenzmethode oder Microbeads aus PBMCs isoliert werden (Abschnitt 3.3.2 und 3.3.3). Um ein möglichst effektives Mischungsverhältnis zwischen PBMCs/CD45RA+ (T-)Zellen und Monozyten/DCs zu gewährleisten war es wichtig möglichst reine Monozytenpopulationen zu generieren. Dies ist mittels der magnetischen MACS MicroBeads Methode sehr gut gelungen (Abschnitt 3.3.3).

Auch die Reifung von Monozyten zu DCs konnte durchflusszytometrisch und elektronenmikroskopisch dargestellt werden. Hiermit war die Generierung der DCs erfolgreich durchgeführt worden.

Die Ermittlung des richtigen Koinkubationsverhältnis erforderte mehrere Versuchsansätze.

Es erfolgten Koinkubationen zwischen Monozyten und APCs, DCs und unmanipulierten PMBCs, sowie DCs und CIK-Zellen in unterschiedlichsten Verhältnissen. Leider führte keiner der Ansätze zu einer Generierung von CMV-spezifischen Zellen.

Unmanipulierte PBMCs sind bekanntlich eine heterogene Zellgruppe u.a. bestehend aus reifen und unreifen Lymphozyten. Somit präsentierten die APCs das verwendete CMV Antigen an eine Vielzahl von Zellen und die Annahme liegt nahe, dass dabei nur ein geringer Teil dieser Zellen naiv waren und der überwiegende Teil der Zellen bereits auf ein Antigen geprimt war.

In Anlehnung an das Protokoll von Wöfl et al.⁴⁶ wurden daraufhin alle CD45RO⁺-Zellen aus der CD14-PBMC Fraktion depletiert, um den prozentualen Anteil naiver CD45RA⁺CD45RO⁻ T-Zellen zu erhöhen.

Im Gegensatz zu den vorherigen Versuchsaufbauten, hatte dies den Vorteil, dass das Verhältnis zwischen naiven T-Zellen und ausgereiften T-Zellen zugunsten der naiven Zellen anstieg. Somit war die Wahrscheinlichkeit eventuell höher, dass die generierten dendritischen Zellen mit naiven Zellen besser und effektiver in Kontakt kommen konnten.

Anhand der durchflusszytometrischen Analyse nach der Koinkubation ist davon auszugehen, dass eine Antigenpräsentation stattgefunden hat und ein Priming der T-Zellen erfolgte (s. Abb. 13).

5.2 Erzielte Ergebnisse im Vergleich zum Protokoll nach Wöfl et al⁴⁶

Im Verlauf der verschiedenen Versuchsreihen wurde klar, dass eine reine Koinkubation zwischen CMV-pp65-präsentierenden Monozyten und naiven T-Zellen nicht zum Priming naiver T-Zellen führt und somit auch keine Aktivierung und Spezifizierung der T-Zellen gegen CMV erfolgt.

Der ausschlaggebende Faktor für eine Spezifizierung gegen Viren ist die Generierung reifer dendritischer Zellen. Es wurden zunächst DCs mittels eines Zytokin-Pools hergestellt. Nach Wöfl et al. kommt es durch eine Stimulation mittels LPS und INF γ zu einer signifikant höheren IL-2-Produktion, als durch die Stimulation mittels des Zytokin-Pools, die zu einer Aktivierung der naiven T-Zellen führt^{46,53}. Mit dieser Erkenntnis wurden die DCs in dieser Dissertation mit LPS und INF γ in Anlehnung an das Protokoll nach Wöfl et al.⁴⁶ generiert.

Einige Arbeitsgruppen zeigten, dass naive T-Zellen im peripheren Blut von Erwachsenen nur zu einem geringen Prozentsatz zu finden sind⁵⁴. Zu identifizieren sind sie über den Oberflächenmarker CD45RA, der nach Aktivierung durch Kontakt zu Antigenen verloren geht und durch CD45RO ersetzt wird⁵⁵.

Im Laufe des Alters nimmt der prozentuelle Anteil der CD45RA⁺ T-Zellen im peripheren Blut ab^{54,56,57}. Untersuchungen zeigten, dass im Nabelschnurblut noch 95%-99% der T-Zellen CD45RA⁺ an ihrer Oberfläche tragen, wohingegen es bei 100-jährigen Probanden nur noch ca. 20% sind. Hierbei gibt es unterschiedliche Entwicklungen zwischen CD4⁺ und CD8⁺ Zellen⁵⁷.

Orientierend am Wöfl-Protokoll wurden nur naive CD45RA⁺ T-Zellen, mittels Depletion von CD45RO⁺ T-Zellen für die Koinkubation verwendet.

Eine naive Zelle besitzt auf ihrer Oberfläche allerdings mehr als einen Oberflächenmarker. Naive Zellen exprimieren, neben CD45RA, auch noch CCR7 und CD62L auf ihrer Oberfläche.

Wenn man nun die Ergebnisse von Wöfl et al. und dieser Dissertation vergleicht, fällt auf, dass bei Wöfl et al. viel höhere Werte von CMV-spezifischen Zellen erzielt werden konnten (6,4 – 27,5%).

Als Depletionsmarker verwendeten Wölfl et al. nicht nur CD45RO, wie in dieser Dissertation, sondern auch CD57. Dieser Schritt wurde in dieser Dissertation nicht durchgeführt und könnte evtl. die möglichen Differenzen zwischen den prozentuellen Anteilen der CMV-positiven Zellen am Ende des Experimentes erklären.

Ein weiterer Unterschied zu Wölfl et al. liegt in der Bestrahlung der DCs mit 30 Gy, die von der Arbeitsgruppe durchgeführt wurden.

In dem Artikel ist beschrieben, dass die Bestrahlung der DC-Fraktion wichtig sei, um eine Stimulation von nicht naiven Gedächtnis- und NK-Zellen innerhalb der DC-Fraktion zu verhindern. Hierbei soll es möglicherweise durch die Hinzugabe von IL-15 (während der Koinkubation) zu einer Überpopulation der „nicht-DCs“ z.B. NK-Zellen kommen. Somit wäre das Verhältnis zwischen DCs und CD45RA⁺ Zellen inakkurat. Dies könnte ebenfalls die geringere Ausbeute an CMV-spezifischen Zellen in dieser Dissertation erklären.

Gegen diese Theorie der „Kontamination durch NK-Zellen“ spricht allerdings der, in dieser Arbeit, leicht abgeänderte Versuchsaufbau durch die Monozytenselektion mittels Microbeads. Im Gegensatz zu Wölfl et al., die die Adhärenzmethode angewendet haben.

Durch die spezifische Selektion von Monozyten aus den PBMCs entstand eine nachgewiesene Monozytenreinheit von über 90%. Somit liegt der Anteil an CD14⁻ Zellen (wie z.B. CD56⁺ NK-Zellen) bei <10%. In der darauffolgenden Generierung von DCs und durchflusszytometrischen Untersuchung konnte gezeigt werden, dass am Ende der DC-Generierung 40,6% der untersuchten Population aus DCs bestanden. Der prozentuelle Anteil von DCs wurde bei Wölfl et al. nicht angegeben.

Durch die sehr hohe Reinheit der Monozyten ist eine Überwucherung durch andere Zellen unwahrscheinlich.

5.3 Nachweis Methoden von CMV-spezifischen Zellen

5.3.1 Analyse mittels Durchflusszytometrie

Die Daten zum Nachweis CMV-spezifischer Zellen, die in dieser Arbeit erhoben wurden, wurden mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Für die Detektion von CMV-spezifische Zellen, wurden die zu untersuchenden Zellen mit einem MHC Dextramer HLA-A*0201 angefärbt.

Eine korrekte Einstellung der entsprechenden FACS-Gates erfolgte durch eine Negativkontrolle mittels ungefärbter Zellen und Einstellung der Gates nach dieser.

In den, in Abb. 13, dargestellten Grafiken sind die CMV-spezifischen Zellen nicht ganz klar von anderen, möglicherweise CMV-negativen, T-Zellen abgrenzbar. Die ermittelten Zellzahlen (prozentual) sind anhand der zuvor eingestellten Negativkontrolle erhoben worden. Es ist kritisch zu hinterfragen, ob es sich in diesem Fall überhaupt eindeutig um CMV-positive T-Zellen handelt. Um dies eindeutig zu beweisen, müsste man weitere Untersuchungen durchführen (s. Abschnitt 5.3.2).

5.3.2 Weitere Methoden für den Nachweis CMV-spezifischer Zellen

Um nachweisen zu können, ob es sich bei den in dieser Arbeit detektierten Zellen tatsächlich um CMV-positive T-Zellen handelt, gibt es noch andere Methoden, die man an die Versuche dieser Dissertation hätte anschließen können. Um diese Methoden durchzuführen, hätte man die Zellzahl der herzustellenden Zellen deutlich erhöhen müssen, um nach der Durchflusszytometrie noch Zellen für die weiteren Untersuchungen zur Verfügung zu haben. In dieser Dissertation entschied man sich anfänglich mit einer geringen Zellzahl zu arbeiten um zunächst zu testen, ob eine generelle Herstellung von CMV-spezifischen Zellen aus seronegativen Material möglich ist (proof of principle). Durch die bereits zuvor erwähnten verschiedenen Versuchsansätze konnten weiterführende Nachweise

zur Überprüfung der hergestellten Zellen aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt werden und wären für zukünftige Arbeiten denkbar.

5.3.2.1 Nachweis mittels infizierter Fibroblasten

In einigen Dissertationen und Papern wurden humane Fibroblasten mit CMV infiziert und so als Targetzellen eingesetzt, um die zytotoxische Aktivität und andere Eigenschaften von generierten CMV-spezifischen Zellen zu untersuchen⁵⁸⁻⁶⁰. Hierbei wurde bspw. auch die dual-spezifische Wirkung von CMV-spezifischen CIK-Zellen gegen leukämische Zellen und CMV gezeigt⁶¹.

In weiterführenden Experimenten könnte man daher CMV-infizierte Fibroblasten als Targetzellen für die in dieser Dissertation generierten CMV-spezifischen Zellen nutzen. Wäre während der Koinkubation zwischen den Fibroblasten und den CMV-spezifischen Zellen ein Rückgang der CMV-infizierten Fibroblasten zu verzeichnen, wäre dies eventuell eine weitere Verifizierung, dass es sich bei den generierten Zellen um CMV-spezifische Zellen handelt.

5.3.2.2 Elispots

Eine weitere Option des Nachweises von CMV-spezifischen Zellen ist die Detektion über die „Elispot“ Methode.

Dabei handelt es sich um einen „enzyme linked immuno spot assay“, wobei sezernierte Antikörper oder Zytokine der zu untersuchenden Zellen detektiert werden können. Im Fall von CMV-spezifischen Zellen handelt sich hierbei um IFN γ , welches durch Stimulation der Zellen sezerniert wird.

Das Elispot kit besitzt am Boden jedes Wells fixierte „capture antibodies“, die sekretiertes IFN γ binden. Ein farblich markierter „detection antibody“ bindet sich an das fixierte Zytokin und wird nach Anfärbung am Boden des Wells sichtbar. Somit können u.a. VST nachgewiesen werden.

In dieser Doktorarbeit wurde hierzu das T-Track CMV diagnostic ELISpot kit⁶² von der Firma Lophius verwendet, jedoch aufgrund unzureichender Auswertmöglichkeiten nicht weiter verfolgt.

5.4 Literaturvergleich und klinische Anwendung von CMV-spezifischen Zellen

Mehrere Arbeitsgruppen haben sich schon mit dem Thema der Generierung VST, CIK-Zellen oder Tumor-spezifischen-T-Zellen aus seropositivem Spendermaterial beschäftigt. Dadurch, dass hierbei eine Isolierung spezifischer T-Zellen möglich ist, kann eine Expansion durch Stimulation erfolgen und somit die Zellzahl, aber auch die Effektivität und virusspezifische Toxizität der Zellen moduliert werden^{39,51,63,61}.

Bei seronegativen Spendern ist diese Möglichkeit nicht gegeben. Dies stellt die Medizin bis heute vor eine große Herausforderung.

Es gibt einige Arbeitsgruppen, die sich dieser Herausforderung auf unterschiedlichste Art genähert haben.

5.4.1 Verwendung von naiven T-Zellen aus Nabelschnurblut

Die Arbeitsgruppe um Hanley et al. aus dem „Texas Children’s Hospital“ und „The Methodist Hospital“ aus Houston, Texas erforschte die Generierung von VST aus Nabelschnurblut⁵².

In dieser Arbeit verwendeten sie Nabelschnurblut von 10 Spendern. Im ersten Schritt isolierten sie die PBMCs mittels Ficoll und extrahierten die Monozyten mittels Adhärenzmethode. Die Monozyten wurden zu DCs generiert, mit einem CMV-pp65-Peptidpool geprimt und mit GMCSF, IL-4, IL-1 β , TNF α , IL-6 und PGE2 stimuliert.

Die Koinkubation erfolgte am sechsten Tag der DC-Generierung mit CD45RA⁺ CCR7⁺ -Zellen, die zuvor durch Microbeads aus den PBMCs selektioniert wurden, im Verhältnis von 20:1 (PBMC: DC). Stimuliert wurden die Zellen mit einem Peptidpool bestehend aus IL-7, IL-15 und IL-12 an unterschiedlichen Tagen.

Zusätzlich zu den CMV-pp65-geprimten-DCs gaben sie CMV-pp65-stimulierte Zellen einer EBV-LCL (*LCL = lymphoblastic cell line*) zu der Koinkubation hinzu, um eine zusätzliche Stimulierung der T-Zellen zu erzielen.

Am Ende des 20-tägigen Versuchs konnte die Gruppe bei 8 von 10 Spendern CMV-spezifische Zellen generieren, wobei durchschnittlich 65% (8-98%) der generierten Zellen CD8⁺-zytotoxische CMV-spezifische-T-Zellen waren.

5.4.2 CMV-Impfung vor Selektion von virusspezifischen T-Zellen bei seronegativen Spendern

Die Arbeitsgruppe um Horn et al. setzten sich etwas anders mit der Problematik aus- einander⁶⁴. Da die seronegativen Spender noch keinen Kontakt zu dem Zytomegalievirus hatten, wurde ihnen ein Impfstoff („Towne strain CMV-vaccine“) injiziert, um eine mögliche Reaktion und somit ein Priming von T-Zellen zu erzeugen. Wie schon im Jahre 1998 von Adler et al. gezeigt, konnten mit dieser Methode CD8⁺ MHC-Klasse I-restingierte zytotoxische T-Zellen nach einer Injektion des Impfstoffs detektiert und isoliert werden⁶⁵.

Durch diese Injektion wurde ein seronegativer Spender zu einer adäquaten Quelle CMV-spezifischer T-Zellen ohne mit CMV infiziert gewesen zu sein.

Horn et al. entnahmen den Spendern PBMCs und generierte CMV-pp65-geprimte DCs. Durch eine Stimulation der selektierten T-Zellen durch die CMV-pp65-beladenen DCs konnte die T-Zellkolonie erfolgreich expandiert werden.

Die Gruppe infundierte die CMV-spezifischen T-Zellen in Patienten mit einer therapie-refraktären CMV-Infektion nach SZT. Sie konnten einen Rückgang der CMV-DNA und eine Zunahme der CMV-spezifischen Zytotoxizität. Bei Patienten mit seronegativen Spendern ist durch diese Methode eine adoptiven Zelltherapie möglich.

5.4.3. Neuer CMV-Impfstoff bei aktiver CMV-Infektion

2017 publizierten Schmitt et al. von der Universitätsklinik Heidelberg eine Phase-I-Studie bei dieser sie 10 Patienten im Alter von 34 – 69 Jahren mit einer aktiven CMV-Infektion untersuchten⁶⁶. Diese Patienten erhielten einen neuen von der Arbeitsgruppe hergestellten CMV-pp65-Impfstoff. Die Patienten bekamen jeweils vier Injektionen in einem zweiwöchigen Abstand. Sie wurden untersucht und neun der zehn Probanden zeigten eine CMV-Antigenpräsentation in ihrem Blut.

Sieben der neun Patienten zeigten nach vier Impfungen einen kompletten Rückgang der messbaren CMV-Antigene, zwei Patienten zeigten eine CMV-Reaktivierung und bei einem Patienten war eine Reduktion der Viruslast, trotz fünfter Impfung, nicht möglich.

Zusätzlich zu diesem Erfolg bei 7/9 Patienten konnte gezeigt werden, dass eine bis zu 6-facher Erhöhung an CMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen und V δ 2-negative $\gamma\delta$ T-Zellen messbar war.

5.4.4. „Off-the-shelf“-Virus-spezifische T-Zellen

Da sich die Generierung von CMV-spezifischen Zellen aus seronegativem Spenderzellen als schwierig gestaltet, man den Patienten jedoch eine gleichwertige Therapie wie bei seropositiven Spendern, anbieten möchte, gibt es in den letzten Jahren eine sehr interessante Entwicklung: „off-the-shelf-VST“.

Hierbei handelt es sich um VST von seropositiven Spendern, die als „third-party“-Spender für einen Patienten mit einem seronegativen Spender zur Verfügung stehen.

Tzannou et al. haben eine VST-Bank generiert, die VST gegen EBV, AdV, CMV, BK-Virus (BKV) und dem humanen Herpesvirus 6 (HHV-6) beinhaltet⁵¹.

In einer klinischen Phase II Studie wurden 38 Patienten mit den third-party VST aus der VST-Bank behandelt. Es zeigte sich eine komplette oder partielle Remission in 92% der Patienten nach nur einer Injektion. Je nach Virus gab es unterschiedliche Erfolge: 100% für BKV (n = 16), 94% für CMV (n = 17), 71% für

AdV (n = 7), 100% für EBV (n = 2) und 67% für HHV-6 (n = 3). Es konnte ein relevanter Therapieerfolg in 31/38 Patienten mit einer Virusinfektion erzielt werden, wobei 7 Patienten mit multiplen Infektionen behandelt werden konnten.

In dieser Studie zeigten sich die „off-the-shelf-VST“ als sicher und gut verträglich, denn es kam nur bei zwei Patienten zu einer GvHD Grad I.

Solche Banken, bestehend aus third-party VST, könnten einen relevanten Einfluss auf die Therapie von CMV bei Patienten mit einem seronegativen Spender haben. T-Zellen werden unabhängig des Spender-Matchings, also ihrer HLA-Allele selektioniert, wobei es somit zu einem partiellen HLA-mismatch zwischen Spender und Empfänger kommt^{49,63}. Ein weiterer Vorteil wäre, dass die VST schnell zur Verfügung ständen, da keine individuelle Generierung der Zellen vor Ort mehr nötig wäre.

5.5 Kosten und Nutzen Abwägung der Ergebnisse für die klinische Anwendung

CMV-seropositive Patienten, die sich durch eine Transfusion von Stammzellen eines seronegativen Spenders, einer SZT unterzogen haben, haben ein stark erhöhtes Risiko an einer opportunistischen Infektion zu erkranken. Um diese Patienten zu therapieren ist die Standardbehandlung eine nephro- und myelotoxische medikamentöse Therapie. Die Generierung von in vitro gezüchteten CMV-spezifischer Zellen ist ein alternativer spezifischer Therapieansatz, der zu einem Rückgang der Viruslast in vivo führen könnte.

In dieser Dissertation dauerte die Generierung der VST aus seronegativen Spendermaterial ca. 13 Tage (3 Tage für die DC-Generierung, 10 Tage für die Inkubation zwischen CD45RA⁺-T-Zellen und CMV-pp65-geprägten-DCs).

Kommt es bei einem Patienten zu einer therapieresistenten CMV-Infektion, ist eine schnelle Behandlung der Infektion essentiell für das Outcome des Patienten.

Die mit einer 13-tägigen angesetzte Generierung der Zellen aus seronegativen Spendermaterial ist daher meist zu lang.

Hinzu kommt, dass eine sehr geringe Zellzahl CMV-spezifischer Zellen ermittelt werden konnte. Um eine effiziente Therapie zu gewährleisten, müsste man die Zellzahl CMV-spezifischer T-Zellen erhöhen und die Zeitspanne verkürzen.

Eine andere Alternative wäre eine frühzeitige Generierung der CMV-spezifischen Zellen für den Patienten, um eine prophylaktische adoptive Zelltherapie zu ermöglichen. Somit könnte eine fortschreitende CMV-Infektion gemindert oder eine de-novo Infektion oder Reaktivierung gar komplett verhindert werden.

Um eine klinische Anwendung der hier vorgestellten Ergebnisse zu ermöglichen, ist eine Umstellung der Versuchsabläufe auf „good manufacturing practice“(GMP)-Bedingungen notwendig. Hierbei müsste der Labormaßstab auf einen klinischen Maßstab angepasst werden und die Durchführbarkeit des Versuchsaufbaus überprüft werden. Darüber hinaus wäre eine Umstellung des Kulturmediums und der verwendeten Zytokine auf GMP-konforme Reagenzien erforderlich und die Kultivierung muss in einem geschlossenen System ausgeführt werden.

Dieses Upscaling ist sehr kostenintensiv und es muss zuvor in GMP-Validierungsläufen die generelle Durchführbarkeit und Effektivität der generierten Zellen getestet werden.

6 Zusammenfassung

Die positive Entwicklung der adoptiven Zelltherapie zu einer effektiven und sicheren Therapieform ist enorm wichtig für die Behandlung von Patienten mit einer opportunistischen Infektion, wie bspw. mit CMV oder EBV, nach einer Stammzelltransplantation.

Bei (CMV-)seropositiven Spendern besteht die Möglichkeit der Selektion von VST und somit eine Therapieoption für den CMV-Infizierten Empfänger. Aufgrund der nicht vorhandenen VST bei einem negativen Spender, besteht die Option einer Infusion von selektierten VSTs bei einem CMV-infizierten Empfänger nicht. Dies ist ein besonderes Problem bei seropositiven Patienten, die die Stammzellen eines seronegativen Spenders erhalten haben und bei denen die Gefahr einer Reaktivierung des Virus besonders hoch ist.

Um einen möglichen Lösungsansatz hierfür zu finden, wurde in dieser Arbeit versucht Zellen zu generieren, die eine adoptive Zelltherapie bei dem oben genannten Spender/Empfänger-Konstellation ermöglichen.

Der Forschungsansatz dahinter war, aus naiven T-Zellen des seronegativen Spenders, durch Priming mit einem CMV-spezifischen Antigen, in diesem Fall CMV-pp65, VST zu generieren. Um diese herstellen zu können wurden mehrere Versuchsabläufe getestet. Zunächst inkubierte man unmanipulierte PBMCs mit CMV-pp65-geprimten Monozyten in verschiedenen Koinkubation-Ratios. Dies führte nicht zum gewünschten Erfolg.

In dieser Arbeit erfolgte die Selektion der Monozyten via Adhärenzmethode und mittels Microbeads. Da die Monozytenreinheit nachweislich Microbeads-Methode signifikant höher war, als die Reinheit mittels der Adhärenzmethode verließ man diese und arbeitete nur noch mit Microbeads, um ein besseres Verhältnis der Koinkubation zu erzielen.

Um einen möglichen Erfolg zu erzielen wurden in einem nächsten Schritt die selektierten Monozyten zu dendritischen Zellen (DC) weiterentwickelt und wiederum mit unmanipulierten PBMCs inkubiert.

Leider konnten auch mit dieser Herangehensweise keine VST in der Zellkultur nachgewiesen werden. Weiterführend orientierte man sich in dieser Arbeit an

einem Protokoll von Wölfel et al⁴⁶. Hierbei wurden statt unmanipulierten PBMCs, nur CD45RA⁺ naive T-Zellen aus den PBMCs verwendet, die mit CMV-pp65-geprägten DCs geprint wurden.

Orientierend an dem Protokoll von Wölfel et al. entwickelten wir einen Versuchsaufbau bestehend aus DC-Generierung, CD45RA⁺-Zellselektion und Koinkubation der Zellen. Dieses 13-tägige Protokoll wurde bei 5 seronegativen Spendern durchgeführt und zeigte in der FACS Analyse CMV-spezifische T-Zellen.

Der prozentuelle Anteil der VST betrug zwischen 0,33-5,70%.

Somit konnte gezeigt werden, dass es möglich ist VST aus seronegativen Spenderzellen zu generieren und ermöglicht somit Patienten mit seronegativen Stammzellspendern, die an einer CMV-Reaktivierung/Infektion leiden, die Option der adoptiven Zelltherapie, trotz Nichtvorhandenseins von VST im Spenderblut.

7 Summary

The positive development of adoptive cell therapy into becoming an effective and safe treatment option is extremely important for patients with opportunistic infections with e.g. CMV or EBV after undergoing a stem cell transplantation.

Due to the lack of virus specific T cells (VST) in CMV-seronegative donors, it is not possible to treat the recipient with specific cells after a CMV infection, which would be possible with seropositive donors.

This fact is a major problem with seropositive recipients who have received a stem cell transplant from a seronegative donor. The risk of a CMV reactivation is extremely high.

This dissertation attempted to find an approach to find a solution for this problem and offer these patients a treatment option by developing an adoptive cell therapy for this specific donor/recipient constellation.

The research approach behind it was to prime naive T cells of a seronegative donor with a CMV-specific antigen (CMVpp65) with the intention to develop VST.

Initially unmanipulated PBMCs were incubated with CMVpp65 primed monocytes in different ratios. This simple experimental set-up did not lead to success which led to further measures which are described below.

In this thesis monocytes were selected through two methods: adherence method and selection via magnetic Microbeads. Due to the significant differentiation in monocyte purity after separation the Microbeads were preferred to assure a better ratio between antigen presenting cells (APC) and T cells.

Furthermore monocytes were developed into dendritic cells which were co-incubated with PBMCs. Unfortunately neither of these methods led to the desired result.

In order to achieve a possible success we oriented ourselves towards the „nature protocol“ of Wölfl et al.⁴⁶. Unmanipulated PBMCs were replaced by CD45RA⁺ naive T cells from PBMCs selected via Microbeads, which were co-incubated with CMV-pp65 primed DC.

We developed a 13-day protocol which contained DC generation, CD45RA⁺ cell extraction and co-incubation. This protocol was implemented in five individual seronegative participants who showed CMV-specific cells in the following FACS analysis.

The percentage of VST was between 0.33 – 5.70%.

In conclusion, it could be shown that it is possible to generate CMV-specific T cells from seronegative material. This allows an adoptive cell therapy for patients a seronegative donor a therapeutic option after a CMV reactivation/infection despite the absence of VST in donor blood.

8 References

1. Kröner C, Koletzko B. *Basiswissen Pädiatrie: Mit 163 Tabellen*. Berlin: Springer Medizin; 2010. Springer-Lehrbuch.
2. Herold G. *Innere Medizin 2017*. Köln: Herold, Gerd; 2016.
3. Speer CP, Gahr M, eds. *Pädiatrie*. 4., überarb. Aufl. Berlin: Springer; 2013. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-34269-1>.
4. Deutsches Kinderkrebsregister. Annual report.
5. Deutsches Kinderkrebsregister. Annual Report 2016.
6. Dipl.-Biol. Maria Yiallouros. Therapie: Wie sieht die Behandlung eines Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie aus?
7. Stammzellspenderdatei.
8. DKMS.
9. Hiddemann W, Bartram CR. *Die Onkologie*. 2., aktualisierte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2010. <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10359770>.
10. Andreesen R, Heimpel H, eds. *Klinische Hämatologie*. 3., überarb. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer; 2009.
11. DRST Deutsches Register für Stammzelltransplantationen. Jahresbericht 2015.
12. Horn F, Moc I. *Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium*. 6. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2015. Thieme ElectronicBook Library.
13. Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Menzel S, Ruth P. *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie, der klinischen Pharmakologie und Toxikologie ; mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie*. 10., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart: WVG Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 2013.
14. Leen AM, Heslop HE, Brenner MK. Antiviral T-cell therapy. *Immunol Rev*. 2014;258(1):12-29. doi:10.1111/imr.12138.
15. Modrow S. *Molekulare Virologie*. 3. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2010. <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10403692>.
16. Groß U. *Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie: 129 Tabellen ; nach neuer AO mit den Fächern: Mikrobiologie, Virologie, Hygiene sowie Infektiologie und Immunologie ; Medilearn Gütesiegel*. Stuttgart: Thieme; 2006. <http://dx.doi.org/10.1055/b-002-37772>.
17. Renz-Polster H. *Basislehrbuch Innere Medizin: Kompakt-greifbar-verständlich*. 5. Aufl. München: Urban & Fischer; 2012. <http://institut.elsevierelibrary.de/product/basislehrbuch-innere-medizin#.UrK-SIPgsVo>.
18. Karow T, Lang-Roth R. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie 2016: Vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden für Studium und Praxis*. 24. Aufl. Pulheim: Thomas Karow; 2015.
19. Jiang J, Wu C, Lu B. Cytokine-induced killer cells promote antitumor immunity. *J Transl Med*. 2013;11:83. doi:10.1186/1479-5876-11-83.
20. Kolb HJ, Mittermüller 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.
21. Porter DL, Collins RH, Shpilberg O, et al. Long-term follow-up of patients who achieved complete remission after donor leukocyte infusions. *Biol Blood Marrow Transplant*. 1999;5(4):253-261. doi:10.1053/bbmt.1999.v5.pm10465105.

22. Porter DL, Roth MS, McGarigle C, Ferrara JL, Antin JH. Induction of graft-versus-host disease as immunotherapy for relapsed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 1994;330(2):100-106. doi:10.1056/NEJM199401133300204.
23. Roush KS, Hillyer CD. Donor lymphocyte infusion therapy. *Transfus Med Rev*. 2002;16(2):161-176. doi:10.1053/tmrv.2002.31464.
24. 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. doi:10.1056/NEJM199404283301703.
25. Porter D, Levine JE. Graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia after donor leukocyte infusion. *Semin Hematol*. 2006;43(1):53-61. doi:10.1053/j.seminhematol.2005.09.005.
26. Frey NV, Porter DL. Graft-versus-host disease after donor leukocyte infusions: presentation and management. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2008;21(2):205-222. doi:10.1016/j.beha.2008.02.007.
27. Benjamin JE, Gill S, Negrin RS. Biology and clinical effects of natural killer cells in allogeneic transplantation. *Curr Opin Oncol*. 2010;22(2):130-137. doi:10.1097/CCO.0b013e328335a559.
28. Sakoda Y, Tamada K. Chimeric antigen receptor (CAR)-T cell therapy. *Nippon Rinsho*. 2017;75(2):281-287.
29. 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.
30. Saglio F, Hanley PJ, Bollard CM. The time is now: moving toward virus-specific T cells after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation as the standard of care. *Cytotherapy*. 2014;16(2):149-159. doi:10.1016/j.jcyt.2013.11.010.
31. 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. doi:10.1084/jem.20040613.
32. 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. doi:10.1093/cid/cis625.
33. 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. doi:10.1111/j.1537-2995.2010.02940.x.
34. 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. doi:10.1182/blood-2010-06-289991.
35. Schmidt-Wolf IG, Negrin RS, Kiem HP, Blume KG, Weissman IL. Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity. *J Exp Med*. 1991;174(1):139-149.
36. Pievani A, Borleri G, Pende D, et al. Dual-functional capability of CD3+CD56+ CIK cells, a T-cell subset that acquires NK function and retains TCR-mediated specific cytotoxicity. *Blood*. 2011;118(12):3301-3310. doi:10.1182/blood-2011-02-336321.
37. Lu PH, Negrin RS. A novel population of expanded human CD3+CD56+ cells derived from T cells with potent in vivo antitumor activity in mice with severe combined immunodeficiency. *J Immunol*. 1994;153(4):1687-1696.
38. Nausch N, Cerwenka A. NKG2D ligands in tumor immunity. *Oncogene*. 2008;27(45):5944-5958. doi:10.1038/onc.2008.272.

39. Rettinger E, Meyer V, Kreyenberg H, et al. Cytotoxic Capacity of IL-15-Stimulated Cytokine-Induced Killer Cells Against Human Acute Myeloid Leukemia and Rhabdomyosarcoma in Humanized Preclinical Mouse Models. *Front Oncol.* 2012;2:32. doi:10.3389/fonc.2012.00032.
40. Rettinger E, Bonig H, Wehner S, et al. Feasibility of IL-15-activated cytokine-induced killer cell infusions after haploidentical stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2013;48(8):1141-1143. doi:10.1038/bmt.2013.19.
41. Rettinger E, Kuçi S, Naumann I, et al. The cytotoxic potential of interleukin-15-stimulated cytokine-induced killer cells against leukemia cells. *Cytotherapy.* 2012;14(1):91-103. doi:10.3109/14653249.2011.613931.
42. Introna M, Borleri G, Conti E, et al. Repeated infusions of donor-derived cytokine-induced killer cells in patients relapsing after allogeneic stem cell transplantation: a phase I study. *Haematologica.* 2007;92(7):952-959.
43. Laport GG, Sheehan K, Baker J, et al. Adoptive Immunotherapy with Cytokine Induced Killer Cells For Patients with Relapsed Hematologic Malignancies After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011;17(11):1679-1687. doi:10.1016/j.bbmt.2011.05.012.
44. Linn Y, Niam M, Chu S, et al. The anti-tumour activity of allogeneic cytokine-induced killer cells in patients who relapse after allogeneic transplant for haematological malignancies. *Bone Marrow Transplant.* 2012;47(7):957-966. doi:10.1038/bmt.2011.202.
45. Obermaier B, Dauer M, Herten J, Schad K, Endres S, Eigler A. Development of a new protocol for 2-day generation of mature dendritic cells from human monocytes. *Biol Proced Online.* 2003;5:197-203. doi:10.1251/bpo62.
46. Wölfl M, Greenberg PD. Antigen-specific activation and cytokine-facilitated expansion of naive, human CD8+ T cells. *Nat Protoc.* 2014;9(4):950-966. doi:10.1038/nprot.2014.064.
47. BD Flow Cytometrie.
48. Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. *Der Experimentator: Immunologie.* 4., vollst. überarb. u. korr. Aufl. 2014. Berlin: Springer Spektrum; 2014. Experimentator. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-41899-0>.
49. Withers B, Blyth E, Clancy LE, et al. Long-term control of recurrent or refractory viral infections after allogeneic HSCT with third-party virus-specific T cells. *Blood Adv.* 2017;1(24):2193-2205. doi:10.1182/bloodadvances.2017010223.
50. Naik S, Nicholas SK, Martinez CA, et al. Adoptive immunotherapy for primary immunodeficiency disorders with virus-specific T lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137(5):1498-1505.e1. doi:10.1016/j.jaci.2015.12.1311.
51. Tzannou I, Papadopoulou A, Naik S, et al. Off-the-Shelf Virus-Specific T Cells to Treat BK Virus, Human Herpesvirus 6, Cytomegalovirus, Epstein-Barr Virus, and Adenovirus Infections After Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *J Clin Oncol.* 2017;35(31):3547-3557. doi:10.1200/JCO.2017.73.0655.
52. Hanley PJ, Melenhorst JJ, Nikiforow S, et al. CMV-specific T cells generated from naïve T cells recognize atypical epitopes and may be protective in vivo. *Sci Transl Med.* 2015;7(285):285ra63. doi:10.1126/scitranslmed.aaa2546.
53. Wölfl M, Schwinn S, Yoo Y, et al. Src-kinase inhibitors sensitize human cells of myeloid origin to Toll-like-receptor-induced interleukin 12 synthesis. *Blood.* 2013;122(7):1203-1213. doi:10.1182/blood-2013-03-488072.
54. Booth NJ, McQuaid AJ, Sobande T, et al. Different proliferative potential and migratory characteristics of human CD4+ regulatory T cells that express either CD45RA or CD45RO. *J Immunol.* 2010;184(8):4317-4326. doi:10.4049/jimmunol.0903781.

55. [Der Titel "#56" kann nicht dargestellt werden – Die Vorlage "Literaturverzeichnis - Internetdokument - (Standardvorlage)" beinhaltet nur Felder, welche bei diesem Titel leer sind.]
56. Yamada A, Kaneyuki T, Hara A, Rothstein DM, Yokoyama MM. CD45 isoform expression on human neonatal T cells: expression and turnover of CD45 isoforms on neonatal versus adult T cells after activation. *Cell Immunol.* 1992;142(1):114-124.
57. Cossarizza A, Ortolani C, Paganelli R, et al. CD45 isoforms expression on CD4+ and CD8+ T cells throughout life, from newborns to centenarians: implications for T cell memory. *Mech Ageing Dev.* 1996;86(3):173-195.
58. Verena Pfirrmann. Generierung, Charakterisierung und in vitro Testung von dual spezifischen Zytokin-induzierten Killer-Zellen gegen Leukämie und Cytomegalievirus.
59. Fedorova NE, Emelianova SS, Vinogradskaya GR, et al. EFFECT OF ANTI-CANCER DRUG DOXORUBICINE ON CYTOMEGALOVIRUS INFECTED HUMAN FIBROBLASTS. *Tsitologija.* 2015;57(4):260-268.
60. Tschan-Plessl A, Stern M, Schmied L, et al. Human Cytomegalovirus Infection Enhances NK Cell Activity In Vitro. *Transplant Direct.* 2016;2(7):e89. doi:10.1097/TXD.0000000000000605.
61. Pfirrmann V, Oelsner S, Rettinger E, et al. Cytomegalovirus-specific cytokine-induced killer cells: concurrent targeting of leukemia and cytomegalovirus. *Cytotherapy.* 2015;17(8):1139-1151. doi:10.1016/j.jcyt.2015.04.011.
62. Lophius EliSpots.
63. O'Reilly RJ, Prockop S, Hasan AN, Koehne G, Doubrovina E. Virus-specific T-cell banks for 'off the shelf' adoptive therapy of refractory infections. *Bone Marrow Transplant.* 2016;51(9):1163-1172. doi:10.1038/bmt.2016.17.
64. Horn B, Bao L, Dunham K, et al. Infusion of cytomegalovirus specific cytotoxic T lymphocytes from a sero-negative donor can facilitate resolution of infection and immune reconstitution. *Pediatr Infect Dis J.* 2009;28(1):65-67. doi:10.1097/INF.0b013e318182026f.
65. Adler SP, Hempfling SH, Starr SE, Plotkin SA, Riddell S. Safety and immunogenicity of the Towne strain cytomegalovirus vaccine. *Pediatr Infect Dis J.* 1998;17(3):200-206.
66. Schmitt M, Schmitt A, Wiesneth M, et al. Peptide vaccination in the presence of adjuvants in patients after hematopoietic stem cell transplantation with CD4+ T cell reconstitution elicits consistent CD8+ T cell responses. *Theranostics.* 2017;7(6):1705-1718. doi:10.7150/thno.18301.

A Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Relative Häufigkeit maligner Erkrankungen bei Kindern unter dem 15. Lebensjahr.	7
Abbildung 2	Schematische Darstellung eines Herpesvirus	7
Abbildung 3	Separation der Blutbestandteile nach Ficoll-Paque.....	31
Abbildung 4	Säulendiagramm zum Vergleich der Methoden zur Monozytengewinnung bzgl. der Monozytenreinheit.	34
Abbildung 5	Schematische Darstellung der DC-Generierung	35
Abbildung 6	Schematische Darstellung zur Herstellung von CIK-Zellen aus seropositiven Spendern.)	40
Abbildung 7	Durchflusszytometrische Untersuchung der Reinheit von Monozyten, die mittels Adhärenzmethode generiert wurden. ...	43
Abbildung 8	Durchflusszytometrische Untersuchung der Reinheit von Monozyten mittels Microbeads.....	44
Abbildung 9	Verlaufsdarstellung des zellulären Shifts von Monos zu DCs. ..	46
Abbildung 10	Abb. D1-4 zeigt die Mikroskopische Darstellung der morphologischen Veränderung während der Differenzierung von Monos zu dendritischen Zellen.....	47
Abbildung 11	Durchflusszytometrische Untersuchung der Koinkubation zwischen APCs (generiert mittels Adhärenzmethode) und PBMCs exemplarisch an Tag 2 und 9 im Verhältnis 1:10.	49
Abbildung 12	Durchflusszytometrische Untersuchung der Koinkubation zwischen APCs (generiert mittels Adhärenzmethode) und PBMCs exemplarisch an Tag 5 und 8 im Verhältnis 1:10.	50
Abbildung 13	Darstellung der fünf untersuchten Spender bzgl. des prozentualen Anteils der CMV-spezifischen Zellen.	52
Abbildung 14	Darstellung der FACS Plots Ergebnissen zur Generierung von CMV-Spezifischen Zellen.	53

B Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Unerwünschte Nebenwirkungen bestimmter Chemotherapeutika ...	14
Tabelle 2	Geräte.....	27
Tabelle 3	Verbrauchsmaterialien.....	28
Tabelle 4	Chemikalien, Medien, Puffer und Lösungen	29
Tabelle 5	Antikörper, Chemokine und Zellkulturen.....	30
Tabelle 6	Auflistung der Oberflächenmoleküle auf den jeweiligen Subpopulationen.....	42

C Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
ACE	antigen-specific activation and cytokine-facilitated expansion of naive, human CD8+ T cells
AdV	Adenovirus
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APC	Antigen-präsentierende Zellen, antigen presenting cells
ATG	Antilymphozytenglobulin
BKV	BK-Virus
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAR	chimeric antigen receptor
CD	cluster of differentiation
CIK	cytotoxic induced killer cells
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
cm ²	Quadratcentimeter
CML	chronisch myeloische Leukämie
CMV	Zytomegalievirus
CR	complete remission
DC	dendritische Zellen, dendritic cells
DLI	donor leukocyte infusion
(D)PBS	phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
DQB, DRB	Subtypen einer HLA
EBV	Epstein-Barr-Virus
e.g.	For example

FACS	fluorescence-activated cell sorting
g (m-, μ -, n-, p-)	Gramm (milli-, mikro-, nano-, piko-)
GCSF	granulocyte-colony stimulating factor
GMCSF	Ggranulocyte-monocyte colony stimulating factor
GvHD	graft versus host disease
GvL	graft versus leukemia
GvT	graft versus tumor
Gy	Gray
HHV	humanes Herpesvirus
HIV	human immunodeficiency virus
HLA	humanes Leukozytenantigen
HSA	humanes Serumalbumin
ICAM	intercellular adhesion molecule
IL	Interleukin
INF	Interferon
LCL	lymphoblastic cell line
LFA	lymphocyte function-associated antigen
LPS	Lipopolysaccharid
lt.	laut
MHC	major histocompatibility complex
MIC	MHC-class-I-related-chain-antigen
ml	Milliliter
NK	natürliche Killerzellen
PB	Pacific Blue
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PCR	Polymerasekettenreaktion, polymerase chain reaction
PerCP	Peridinin-Chlorophyll
PG	Prostaglandin

RMPI	Zellkulturmedium des <u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute
SCID	severe combined immunodeficiency
SZT	Stammzelltransplantation
TCR	T-cell receptor
TIL	tumorinfiltrierende Lymphozyten
TNF	Tumornekrosefaktor
ULBP	UL-binding protein
VST	virusspezifische T-Zellen
VZV	Varizella-Zoster-Virus
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

D Lebenslauf



BERUFLICHE ERFAHRUNGEN

- Juli 2017 – heute* Assistenzärztin in der Facharztausbildung im Fachbereich Anästhesie im Hospital zum heiligen Geist, Frankfurt a.M.
- Aug 2015 – März 2016* Studentische Aushilfskraft in der Notaufnahme, Krankenhaus Sachsenhausen, Frankfurt a.M.
- 2012 – 2015* Studentische Aushilfskraft in den Hochtaunuskliniken, Bad Homburg v.d.H.

STUDIUM UND SCHULISCHE AUSBILDUNG

- Oktober 2010 – Mai 2017* Medizinstudium, Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main
- Mai 2017* Dritter Abschnitt der ÄP (mündliches Staatsexamen)
- Mai 2016 – April 2017* Praktisches Jahr (PJ)
- April 2016* Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Staatsexamen)
- April 2014 – April 2015* Labortätigkeit zur Promotion zu Thema: „Generierung CMV-spezifischer T-Zelle aus mononukleären Zellen von CMV-seronegativem Spendern“
- August 2012* Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Physikum)
- 1999 – 2010* Kurt-Schumacher-Schule, Karben
- *Juli 2010:* Abitur
 - *2007 – 2008:* North High School, Bakersfield CA, USA
- 1999 – 2001* Selzerbach Grundschule, Karben
- 1996 – 1999* Leverstock Green Preschool, Hemel Hempstead, England

F Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde am Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin (Schwerpunkt Stammzelltransplantation) im Universitätsklinikum Frankfurt a.M. unter der Leitung von Prof. Dr. med. Peter Bader erstellt. Bei ihm möchte ich mich ganz herzlich bedanken für die Möglichkeit an diesem äußerst spannendem Thema, welches mir persönlich sehr am Herzen lag, forschen zu dürfen. Vielen Dank für das Vertrauen und die motivierenden Worte, die Sie mir entgegengebracht haben.

Der größte Dank geht an Dr. Verena Pfirrmann, die mir zu jeder Minute dieser Arbeit zur Seite stand. Sie stand stets für Fragen und Anregungen zur Verfügung und hatte immer einen Plan oder eine Lösung für jegliches Problem! Verena, ohne Dich wäre die Vollendung dieser Arbeit um einiges schwerer geworden! Danke für deine starken Nerven!

Weiterhin möchte ich dem gesamten Laborteam danken, das mich mit Materialien versorgt hat, wenn es mal eng wurde und ein offenes Ohr hatte, wenn der Versuch mal nicht so erfolgreich war.

Mein herzlichster Dank geht an meine Familie und Freunde, die mich in jeder Lebenslage unterstützen.

Diese Doktorarbeit widme ich meiner Oma Elfriede und meinem Onkel Jim Eyherabide.

E Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel:

Generierung CMV-spezifischer T-Zellen aus mononukleären Zellen von CMV-seronegativen Spendern

in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Peter Bader mit Unterstützung durch Dr. Verena Pfirrmann ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht*. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)

*) im Falle des Nichtzutreffens entfernen