

Biologie

**Genmodifizierte Varicella-Zoster-Virus spezifische
T-Zellen als Effektorzellen tumorspezifischer Immunität**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Silke Landmeier

aus Ankum

2005

Erster Gutachter:

Prof. Dr. C. Klämbt

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. H. Jürgens

Tag der Disputation:

1. September 2005

Tag der Promotion:

28. Oktober 2005

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
1 Zusammenfassung.....	7
2 Einleitung.....	9
2.1 Spezifische Immunität.....	9
2.2 T-Zell-Rezeptor (TCR).....	10
2.3 Antigen-präsentierende Zellen.....	11
2.4 CD4+ und CD8+ T-Zellen.....	11
2.5 Immuntherapie.....	14
2.6 Chimäre Rezeptoren.....	15
2.7 B-Vorläufer ALL.....	17
2.8 Neuroblastom.....	18
2.9 Immuntherapie mit virus-spezifischen T-Zellen.....	18
2.10 Varicella-Zoster-Virus.....	19
3 Zielsetzung.....	21
4 Ergebnisse.....	22
4.1 Generierung VZV-spezifischer T-Zellkulturen.....	22
4.1.1 Proliferation VZV-spezifischer T-Zellen.....	22
4.1.1.1 Verschiedene Antigene.....	22
4.1.1.2 Verschiedene Kulturmedien.....	23
4.1.2 Expansion VZV-spezifischer Zellen.....	24
4.1.2.1 Verschiedene Antigene.....	24
4.1.2.2 Verschiedene Kulturmedien.....	26
4.1.2.3 VZV-spezifische Kulturen expandieren zu großen Zellzahlen.....	26
4.1.2.4 PBMCs seronegativer Spender proliferieren nicht mit VZV-Lysat.....	27
4.1.2.5 Nach Impfung proliferieren PBMCs spezifisch und sezernieren IFN- γ 28	
4.2 Nachweis der Spezifität für bestimmte VZV-Antigene.....	29

4.2.1.1	Konstruktion der retroviralen Vektoren MSCV-gE & MSCV-gI	29
4.2.1.2	Herstellung stabiler Produktionszelllinien	30
4.2.1.3	Herstellung von LCL	30
4.2.1.4	Herstellung aktivierter CD40B-Zellen	31
4.2.1.5	Retrovirale Transduktion mit MSCV-gE & -gI	32
4.2.2	Generierung Vaccinia-infizierter B-Zellen	33
4.2.2.1	Infektion mit Vaccinia-Virus-Rekombinanten	34
4.2.2.2	VZV-CTL zeigen Spezifität für die VZV-Antigene IE62 und gE	34
4.2.2.3	Die Virusspezifität wird über MHC-II vermittelt	35
4.3	Immunphänotypisierung der VZV-spezifischen Zelllinien	36
4.3.1	EIA-stimulierte Zellpopulationen setzen sich zusammen aus CD3+- T-Zellen und CD56+-NK-Zellen	36
4.3.2	VZV-Lysat stimuliert CD4+-dominierte T-Zellkulturen	37
4.3.3	Expandierte VZV-CTL zeigen einen CD25+, CD27-, CD28+ Phänotyp	39
4.4	Retroviral transduzierte VZV-CTL exprimieren chimäre Rezeptoren auf der Zelloberfläche	41
4.4.1	Ermittlung des optimalen Transduktionszeitpunktes	41
4.4.2	Transduktion mit 14.G2a ζ , 14.G2aCD28 ζ und CD19 ζ	42
4.4.3	Transduzierte und nicht-transduzierte VZV-CTL unterscheiden sich nicht im Phänotyp	42
4.4.4	Transduzierte und nicht-transduzierte VZV-CTL unterscheiden sich kaum in ihrem Expansionsverhalten	43
4.5	Transduzierte VZV-CTL lysieren spezifisch Tumorzellen	44
4.5.1	Chrom-Freisetzungsversuche	44
4.5.2	Langzeit-Koinkubationsversuch	46
4.5.3	Zielzelllyse über den chRec ist MHC-unabhängig	47
4.6	Über welchen Mechanismus lysieren CD4+ VZV-CTL ihre Zielzellen?	49
4.6.1	VZV-CTL exprimieren kein Perforin	49
4.6.2	Tumorzellen exprimieren kein Fas	49
4.6.3	VZV-CTL nutzen Granulysin als Killing-Mechanismus	50
4.7	VZV-CTL sezernieren IFN-γ und IL-4, aber kaum IL-10	52
4.7.1	Intrazelluläre IL-2 Färbung	52

4.7.2	IFN- γ ELISA	53
4.7.3	IL-4-ELISA	54
4.7.4	IL-10-ELISA	54
4.8	VZV-CTL haben keine supprimierende Eigenschaften	55
4.9	Restimulierbarkeit über den nativen oder chimären Rezeptor	57
4.9.1	Proliferation im ^3H -Thymidin-Assay	58
4.9.2	Zähl assay	58
5	Diskussion	60
5.1	Generierung VZV-spezifischer T-Zellen	61
5.2	CD4+ Phänotyp VZV-spezifischer T-Zellen	62
5.3	Virusspezifität der CTL	63
5.4	Phänotypische Charakterisierung VZV-spezifischer T-Zellen	64
5.5	Zytokinsekretion CD4+ VZV-CTL	66
5.6	Tumorspezifische Effektorfunktionen VZV-spezifischer CTL	68
5.7	Mechanismus der Zielzellyse CD4+ VZV-CTL	70
5.8	Bedeutung der Kostimulation für VZV-CTL	72
5.9	Restimulierbarkeit VZV-spezifischer CTL über den chRec	73
5.10	Klinische Anwendbarkeit VZV-spezifischer CTL	74
5.11	Risiken der therapeutischen Anwendung	76
6	Material und Methoden	79
6.1	Material	79
6.1.1	Kunststoffmaterialien	79
6.1.2	Geräte	80
6.1.3	Kommerzielle Kits	81
6.1.4	Antikörper und Zytokine	81
6.1.5	Materialien für die Zellkultur	82
6.1.6	Materialien für Molekularbiologie und Immunologie	83
6.2	Medien	83
6.3	Puffer und Lösungen	84

6.4	Zelllinien.....	85
6.5	Molekularbiologie.....	86
6.5.1	<i>Escherichia coli</i> K12 Stämme	86
6.5.2	Präparation z-kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	86
6.5.3	Transformation z-kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	87
6.5.4	Isolierung von Plasmid DNA	87
6.5.5	Restriktionsverdau von DNA.....	87
6.5.6	DNA Ligation	87
6.6	RNA-Isolierung aus Zelllinie.....	88
6.7	Reverse Transkription in cDNA	88
6.8	Isolierung endotoxin-freier Plasmid-DNA	88
6.8.1	Gelelektrophorese	89
6.8.2	Isolierung der DNA aus Agarosegelen.....	89
6.9	Oligonukleotid-Primer	89
6.9.1	Polymerase Chain Reaction (PCR).....	89
6.9.2	Vektoren.....	90
6.10	Zellkultur	91
6.10.1	Kultivierung von Suspensions- und adhärenenten Zellen	91
6.10.2	Splitten von Suspensionszellen.....	91
6.10.3	Splitten adhärenenten Zellen	91
6.10.4	Kryokonservierung eukaryontischer Zellen	92
6.10.5	Auftauen eukaryontischer Zellen	92
6.10.6	Zellzahlbestimmung.....	92
6.11	Transfektion und Transduktion	93
6.11.1	Transfektion von Phoenix-Zellen	93
6.11.2	Generierung stabiler PG13-Produktionszelllinien	93
6.11.3	Retrovirale Transduktion humaner Zellen	94
6.11.3.1	Beschichtung von Kunststoffplatten mit Retronectin.....	94
6.11.3.2	Retrovirale Transduktion von VZV-CTL.....	94
6.12	Kultivierung spezifischer Zellen	96
6.12.1	Isolierung von PBMCs über Gradientenzentrifugation.....	96

6.12.2	Herstellung des VZV-Lysates	96
6.12.2.1	Kultivierung der MRC-5 Zellen	96
6.12.2.2	Infektion der MRC-5 mit VZV	96
6.12.2.3	Antigenpräparation	97
6.12.3	Gewinnung autologen Serums	97
6.12.4	Generierung VZV-spezifischer T-Zellen	97
6.12.5	Generierung EBV-spezifischer T-Zellen	98
6.12.6	Generierung von CD40B-Zellen	98
6.12.6.1	Kultivierung der NIH3T3 tCD40L	98
6.12.6.2	Stimulation der CD40B-Zellen	99
6.13	Funktionsanalysen	99
6.13.1	Untersuchungen der Zytotoxizität	99
6.13.1.1	Chrom-Freisetzungsversuch	99
6.13.1.2	Langzeitkoinkubationsversuch	100
6.13.2	ELISA [Interleukin-4, Interleukin-10, Interferon- γ]	100
6.13.2.1	Koinkubationsansatz für ELISA	101
6.13.3	ELISPOT	101
6.13.3.1	Vaccinia-Virus-Produktion	102
6.13.3.2	Vaccinia-Virus-Titration	102
6.13.3.3	Vaccinia-Virus-Infektion humaner Zellen	103
6.13.3.4	Durchführung des ELISPOT	103
6.13.4	Proliferationsassay	104
6.13.4.1	Koinkubationsansatz für die antigenspezifische Proliferation	104
6.13.4.2	Koinkubationsansatz zur Reexpansion	104
6.13.4.3	Analyse der Proliferation über Färbung mit CFSE	105
6.13.4.4	Stimulation der Proliferation über den chimären Rezeptor	105
6.14	Antikörperfärbungen	105
6.14.1	Oberflächenfärbungen	105
6.14.1.1	Immunphänotypisierung	105
6.14.1.2	Ermittlung der Transduktionseffizienz	106
6.14.2	Intrazelluläre Perforin-Färbung	106
6.14.3	Intrazelluläre Granulysin-Färbung	106
6.14.4	Intrazelluläre IFN- γ Färbung	107

6.14.5	Intrazelluläre IL-2 Färbung	107
6.15	Magnetische Zell Separation (MACS).....	107
6.16	CD3/CD28 Aktivierung von PBMCs	108
6.17	Analyse supprimierender Eigenschaften.....	108
Abkürzungen	109
Literaturverzeichnis	112
Anhang	122
Ich bedanke mich herzlich bei.....	124
Lebenslauf.....	125

1 Zusammenfassung

Die zelluläre Immuntherapie ist eine vielversprechende Ergänzung bei der Behandlung von Tumorerkrankungen. Eine Möglichkeit der Immuntherapie ist die Transfusion von T-Lymphozyten, die durch genetische Modifikation tumorspezifische chimäre T-Zell-Rezeptoren (chRec) exprimieren. Die klinische Anwendbarkeit so modifizierter Zellen wird zur Zeit noch durch eine rasche funktionelle Inaktivierung *in vivo* begrenzt. Die Stimulation über den chRec scheint nicht auszureichen, um die Proliferation und Aktivierung der Zellen anzuregen und damit die Persistenz der verabreichten Lymphozyten zu gewährleisten. Um die funktionelle Inaktivierung der Zellen zu umgehen, könnte die natürliche Spezifität der gentechnisch veränderten T-Zellen für ein virales Immunogen genutzt werden, um die Zellen über ihren nativen T-Zell-Rezeptor (TCR) zu aktivieren.

Die Immunität gegen das Varicella-Zoster-Virus (VZV), welches bei Primärinfektion zu Windpocken führt und latent im Körper persistiert, wird über zytotoxische T-Zellen vermittelt. Darüber hinaus ist die VZV-spezifische Immunität durch einen Impfstoff gezielt aktivierbar, so dass sich VZV gut als Modell für die gezielte Reaktivierung genmodifizierter T-Zellen eignet. Ziele der vorliegenden Arbeit waren daher die Generierung und Charakterisierung VZV-spezifischer T-Zellen zur Untersuchung ihrer tumor- und virusspezifischen Funktionalität nach Transduktion mit chimären Rezeptoren.

Die Expansion CD3⁺/CD4⁺ VZV-spezifischer T-Zellen aus dem Blut seropositiver Spender wurde durch die wöchentliche Stimulation mit VZV-Lysat in Anwesenheit antigenpräsentierender Zellen (APC) erreicht. T-Zellen aus dem Blut VZV-seronegativer Spender konnten mit dieser Methode nicht expandiert werden. Die Spezifität der Zellen für definierte VZV-Antigene wurde durch den Nachweis spezifischer Interferon- γ Sekretion unter Stimulation mit VZV-Antigen exprimierenden B-Zellen bestätigt.

Um den Zellen Tumorspezifität zu verleihen, wurden sie retroviral mit den Genen für verschiedene chimäre Rezeptoren transduziert. Als Rezeptoren wurden 14.G2a ζ , 14.G2aCD28 ζ und CD19 ζ verwendet. 14.G2a ζ und 14.G2aCD28 ζ weisen dabei Spezifität für das auf Neuroblastomzellen in hoher Dichte exprimierte Gangliosidantigen G_{D2} auf. CD19 ζ richtet sich gegen das auf akuten lymphatischen Leukämien (ALL) hoch exprimierte CD19-

Antigen. Die transduzierten T-Zellen zeigten spezifisch zytotoxische Eigenschaften gegen antigenpositive Tumorzellen. Nicht-transduzierte Kontrollzellen waren nicht in der Lage, Tumorzellen zu erkennen und zu lysieren. Nach Koinkubation mit antigenpositiven Tumorzellen oder APC und VZV-Lysat sezernierten die Zellen spezifisch die Zytokine IFN- γ und IL-4.

Der Mechanismus der Zytolyse durch CD4⁺ T-Zellen ist nicht einheitlich und wurde für die VZV-spezifischen T-Zellen gezielt untersucht. Während verbreitete Mechanismen wie Perforin und die Interaktion über Fas/FasLigand ausgeschlossen werden konnten, wurde Granulysin als Mediator für die Tumorzelllyse identifiziert. Granulysin wird aus intrazellulären Granula sezerniert und führt zur Apoptose der Zielzelle.

Bezüglich ihres Phänotyps zeigten die generierten VZV-spezifischen CD4⁺ T-Zellkulturen ein klares aktiviertes Profil, indem sie im Lauf der Stimulationen CD25 und CD69 hochregulierten. Weitere Oberflächenmerkmale, wie der Verlust von CD45RA und CD27 sowie die Expression von CD45RO charakterisieren die Zellen als Effektor-Memory-Population.

Unter der Hypothese, dass die VZV-spezifischen T-Zellen über ihren nativen VZV-Rezeptor, nicht aber über den chRec reaktiviert werden können, wurden die Zellen im direkten Vergleich mit Tumorzellen oder APC und VZV-Lysat stimuliert. Dabei bestätigte sich, dass die Aktivierung über den chRec nicht ausreichte, um die Zellen zur Proliferation anzuregen. Die Stimulation über VZV-Lysat hingegen konnte eine potente Proliferation der Zellen induzieren. VZV-spezifische T-Zellen, die neben ihrer Virusspezifität auch tumorantigen-gerichtete chimäre Rezeptoren exprimieren, stellen daher ein geeignetes Modell für eine Immuntherapie im Kindesalter dar.

2 Einleitung

2.1 Spezifische Immunität

Das Immunsystem schützt den Menschen vor Infektionen mit Bakterien oder Viren. In diesem komplexen System bietet neben der angeborenen Immunität, die einen ersten Schutzwall gegen viele Infektionen darstellt, vor allem die adaptive oder erworbene spezifische Immunität einen langfristigen und effizienten Schutz gegen Krankheitserreger. Immunzellen wie Makrophagen oder natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind im Rahmen der angeborenen Immunität in der Lage, eindringende Mikroorganismen anhand gemeinsamer und konstanter Oberflächenstrukturen zu erkennen, zu binden und zu zerstören. Sie können infektiöse Erreger jedoch nicht immer vollständig beseitigen und erkennen nicht alle Krankheitserreger. Im Laufe der Evolution haben sich daher die Lymphozyten des adaptiven Immunsystems zu einem wirksamen Abwehrmechanismus entwickelt, der auch gegenüber einer späteren erneuten Infektion mit demselben Mikroorganismus einen erhöhten Schutz bietet. Jeder Lymphozyt zeichnet sich durch seine eigene Spezifität für ein Antigen aus, die im Rahmen der Unterscheidung zwischen Fremd und Selbst selektioniert wird. Entscheidend für das Erkennen des Antigens ist dabei die Struktur des zelleigenen spezifischen Rezeptors. Antigene liegen membrangebunden auf der Zelloberfläche oder in löslicher Form im Körper vor. Solange Lymphozyten ihrem Antigen noch nicht begegnet sind, zirkulieren sie als naive Zellen durch den Körper und die lymphatischen Organe. Treffen die Lymphozyten aber auf ein Antigen, das an ihren Rezeptor bindet, werden sie aktiviert, um zu proliferieren und zu Effektorzellen zu differenzieren. Effektorzellen haben nur eine begrenzte Lebensdauer und gehen in Apoptose, wenn das Antigen nicht mehr vorhanden ist. Zur Sicherung des immunologischen Gedächtnisses bleiben aber einige leicht reaktivierbare Gedächtniszellen zurück und sorgen im Fall einer erneuten Infektion mit dem Erreger für eine schnelle Immunantwort.

Lymphozyten lassen sich in B-Zellen und T-Zellen unterscheiden. Wie alle Blutzellen stammen beide von pluripotenten Stammzellen im Knochenmark ab. Einige B-Zellen entwickeln sich nach Antigenkontakt zu Plasmazellen, die für die Produktion spezifischer Antikörper zuständig sind. Jede B-Zelle sezerniert dabei die lösliche Form ihres Antigenrezeptors als Antikörper und markiert damit Pathogene oder Proteine, die dann von Phagozyten unschädlich gemacht werden. Bakterielle Toxine und einige Viren werden alleine durch die blockierende Wirkung der sezernierten Antikörper inaktiviert (Neutralisation), da

die Bindung des Antikörpers z.B. das Andocken der Viren an die Zellen verhindert. Eine weitere wichtige Funktion der B-Zellen ist die Präsentationprozessierter Proteine auf der Zelloberfläche. Im Rahmen des normalen Stoffwechsels zellulärer Proteine werden diese im Proteasom endogen zu kurzen Peptidfragmenten abgebaut und mit membranständigen Haupthistokompatibilitätsmolekülen (MHC)- Klasse-I Molekülen an die Oberfläche der Zelle transportiert. Ist eine Zelle durch eine Virusinfektion verändert, werden auch Virusproteine prozessiert und präsentiert und sind damit dem Immunsystem zugänglich. Exogen von Makrophagen oder B-Zellen aufgenommene Proteine hingegen werden auf der Zelloberfläche über MHC-Klasse-II Moleküle präsentiert. Diese Präsentation über MHC-Komplexe erlaubt die gezielte Erkennung durch T-Zellen. Die Spezifität der T-Zellen wird über einen antigenspezifischen Rezeptor, den T-Zell-Rezeptor vermittelt.

2.2 T-Zell-Rezeptor (TCR)

Der TCR gehört zur Immunglobulin-Superfamilie und bildet zusammen mit dem sogenannten CD3-Komplex, der für die Signaltransduktion innerhalb der Zelle notwendig ist, den TCR-Rezeptorkomplex. Dieser besteht aus zwei Polypeptidmolekülen: der α -Kette und der β -Kette, die über eine Disulfidbrücke ein Homodimer ausbilden. Jede Kette setzt sich aus einer aminoterminalen hypervariablen Region zusammen, die die Bindungsstelle für das fremde Epitop bildet, und einer carboxyterminalen konstanten Region, welche die Ketten in der Zytoplasmamembran verankert. Alternativ zur α - und β -Kette kann der TCR bei den sogenannten $\gamma\delta$ T-Zellen auch aus einer γ -Kette und einer δ -Kette bestehen. $\gamma\delta$ -T-Zellen stellen im peripheren Blut nur einen geringen Anteil der zirkulierenden T-Zellen (2%). Für humane $\gamma\delta$ -T-Zellen ist bislang nur wenig über die genaue Natur und Funktion antigenspezifischer $\gamma\delta$ -Zellen bekannt. Sie bieten offenbar einen eher unspezifischen Schutz bei Infektionen, da sie z.B. phosphorylierte bakterielle Metabolite erkennen und durch zytotoxische Mechanismen und Zytokinsekretion eliminieren (Chen & Letvin, 2003).

Alle T-Zell-Rezeptoren haben eine sehr kurze zytoplasmatische Domäne, die für die Signaltransduktion nicht ausreicht. Nachdem die T-Zelle mit dem MHC/Peptid-Komplex eine Bindung eingegangen ist, erfolgt die intrazelluläre Signalweiterleitung daher über den CD3-Komplex, der nicht-kovalent mit dem T-Zell-Rezeptor assoziiert ist (Malissen *et al.*, 1995). Der CD3-Komplex setzt sich wiederum zusammen aus den Transmembranproteinen CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ und CD3 ζ , wobei die ζ -Ketten über eine Disulfidbrücke ein Homodimer

ausbilden, dessen größter Anteil im Zytoplasma liegt. Die zytoplasmatischen Domänen der CD3-Proteine enthalten sogenannte ITAMs („immunreceptor tyrosine based activation motifs“), die nach der Stimulation des Rezeptors mit zytoplasmatischen Tyrosinkinase assoziieren und über eine Phosphorylierungskaskade das Signal in die Zelle weiterleiten. Die ersten Schritte der Kaskade beinhalten die konstitutiv mit den zytoplasmatischen Domänen der Korezeptoren CD4 und CD8 verbundene Tyrosinkinase Lck und die zytoplasmatisch vorliegende Kinase Fyn. Beide sorgen für die Phosphorylierung der CD3 ζ - und CD3 ϵ Ketten, die daraufhin die zytosolische Tyrosinkinase ZAP-70 (ζ -assoziiertes Protein 70) aktivieren. Verschiedene weitere Phosphorylierungsereignisse sorgen schließlich für die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1, NFAT (nuclear factor of activated T cells) und NF κ B, die zusammen die Transkription spezifischer Gene anschalten, die zur Proliferation, Differenzierung und Effektorfunktionen der T-Zelle führen.

2.3 Antigen-präsentierende Zellen

Für die Erkennung einer infizierten Zelle sind gemäß der „Zwei-Signal-Hypothese“ verschiedene unabhängige Signale notwendig - zum einen die Bindung des MHC/Peptid-Komplexes mit dem TCR und zum anderen zusätzliche Wechselwirkungen mit der antigenpräsentierenden Zelle (APC). Als APC können grundsätzlich verschiedene Zellen fungieren. Typische und effiziente APC sind neben Dendritischen Zellen (DC) auch aktivierte B-Zellen oder Makrophagen. Diesen Zelltypen gemeinsam ist neben der Expression von MHC-Klasse I und II auch die Expression kostimulatorischer Moleküle wie B7.1 und B7.2. Sie sorgen für das notwendige zweite Signal neben der MHC/Peptidbindung über den TCR und binden an spezifische Rezeptoren wie CD28 auf der Oberfläche der T-Zelle. Bleibt das zweite Signal aus, kommt es zur Apoptose (Ruud & Todd, 1996). Erst durch die vollständige Wechselwirkung zwischen der APC und der entsprechenden T-Zelle kommt es also zu einer ausreichenden Aktivierung der T-Zelle.

2.4 CD4+ und CD8+ T-Zellen

T-Lymphozyten werden in verschiedene Subpopulationen - CD4+ und CD8+ T-Zellen - unterteilt, die Peptidfragmente entweder über MHC-Klasse I oder II erkennen. CD8+ T-Zellen werden durch Peptide im Kontext der MHC-I Präsentation aktiviert, während CD4+ T-Zellen MHC-II restringiert stimuliert werden. APC exprimieren beide Klassen von MHC und sind daher befähigt, sowohl CD4+ als auch CD8+ T-Zellen effizient zu aktivieren. Funktionell unterscheiden sich CD4+ und CD8+ T-Zellen in Hinsicht auf Zytotoxizität und

Zytokinsekretion. CD8⁺ T-Zellen stellen den Hauptteil aller zytotoxischen Lymphozyten und sorgen über verschiedene Mechanismen für die gezielte Zerstörung erkannter Zellen. So sezernieren sie z.B. die Zielzellmembran permeabilisierende Proteine wie Perforin, gefolgt von der Ausschleusung zytolytischer Enzyme wie Granzym A oder B. Alternativ binden sie über FasLigand (FasL) an das auf der Zielzelle exprimierte Fas und induzieren so Apoptose. CD8⁺ T-Zellen schütten darüber hinaus Zytokine wie Interferon- γ (IFN- γ) aus und rekrutieren damit weitere Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems.

CD4⁺ T-Zellen differenzieren sich in verschiedene Subpopulationen. Die klassischen CD4⁺ T-Zellen unterteilen sich in T_{H1} und T_{H2}-Helferzellen. T_{H1} sezernieren neben Interleukin-2 (IL-2) und IFN- γ auch TNF- β und GM-CSF. IL-2 ist ein wichtiges Zytokin für die Aktivierung von T-Zellen, da es für den Eintritt in die S-Pase des Zellzyklus sorgt und damit die Proliferation der Zellen gewährleistet. Die Transkription von IFN- γ beginnt direkt als Konsequenz der Antigenerkennung und steigert die Phagozytose der Makrophagen, stimuliert die Differenzierung naiver T-Zellen zu T_{H1}-Zellen und sorgt durch eine vermehrte Expression der MHC-Moleküle zu einer Verstärkung der zellulären und humoralen Immunantwort. IFN- γ hat weiterhin eine wichtige Rolle bei der Steigerung der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen und der Entstehung und Reifung zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen. T_{H2}-Helferzellen sezernieren vor allem IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10. IL-4 dient als Wachstums- und Differenzierungsfaktor der B-Zellen, fördert aber auch autokrin die Proliferation der T_{H2}-Zellen. IL-10 wirkt regulatorisch auf die T_{H1}-Antwort, indem es die IFN- γ Sekretion inhibiert und damit die Immunantwort begrenzt. Erst seit kurzem wird eine weitere Population CD4⁺ T-Zellen unterschieden, die regulatorischen T-Zellen (T_{reg}). Sie weisen einen CD4⁺/CD25⁺ Phänotyp auf und exprimieren den Transkriptionsfaktor Foxp3 (Hori *et al*, 2003). Funktionell zeichnen sie sich dadurch aus, dass sie supprimierend auf andere T-Zellen wirken und damit Autoimmunerkrankungen unterdrücken (Wraith *et al*, 2004). Vor dem Hintergrund einer Immuntherapie wird den regulatorischen T-Zellen eine Rolle für die spezifische Kontrolle der T-Zellproliferation zugesprochen. So kann z.B. die Expansion von T_{reg} in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie Multipler Sklerose oder Diabetes zu einem Rückgang der autoreaktiven T-Zellen führen.

Eine Besonderheit unter den CD4⁺ T-Zellen stellen CD4⁺ zytotoxische Lymphozyten (CD4⁺ CTL) dar, die vor allem im Bereich der Virusimmunität zu finden sind. Nachdem in den

letzten zwei Jahrzehnten auch lytische Eigenschaften für CD4⁺ T-Zellen beschrieben wurden (Huang *et al*, 1992), galten diese lange als *in vitro* Artefakte, da alle Experimente ausschließlich an Zelllinien oder T-Zellklonen vorgenommen wurden. Die *in vivo* Existenz CD4⁺ CTL wurde jedoch kürzlich durch die Isolierung CD4⁺ T-Zellen mit zytolytischen Eigenschaften direkt aus dem Blut belegt (Appay *et al*, 2002; Zaunders *et al*, 2004). Die physiologische Rolle CD4⁺ CTL ist bislang nicht eindeutig geklärt. Es wird postuliert, dass CD4⁺ CTL, die ihre Zielzellen MHC-II restringiert lysieren, eine Rolle bei der Erkennung virusinfizierter MHC-II exprimierender Zellen spielen, da Viren wie HIV, EBV oder CMV einer Immunantwort durch CD8⁺ CTL dadurch entgehen, dass sie MHC-I Moleküle auf den infizierten Zellen herunterregulieren (Appay, 2004). Als zytotoxische Mechanismen für CD4⁺ CTL *in vitro* wurden sowohl Perforin (Lowin *et al*, 1994; Norris & Rosenberg, 2001), die Interaktion über Fas-FasLigand (Stalder *et al*, 1994) aber auch die Sekretion von Granulysin durch EBV-spezifische CD4⁺ CTL nachgewiesen (Sun *et al*, 2002). Granulysin wird von NK-Zellen und aktivierten CTL exprimiert (Obata-Onai *et al*, 2002). Es wird wie das Amoebapor-Protein und NK-Lysin zur Familie der Saposin-ähnlichen Proteine (SALIP) gezählt und vermittelt die Zielzellyse wahrscheinlich über Ladungswechselwirkungen mit der Membran, die dadurch permeabilisiert wird. Die Permeabilisierung führt zu einer Ca²⁺ Ausschüttung in der Zielzelle, gefolgt von einer intrazellulären Depolarisation der Mitochondrien, was wiederum über Cytochrom C die Apoptose einleitet (Clayberger & Krensky, 2003). Da Granulysin auch gegen Varicella-Zoster-Virus (VZV) infizierte Zellen wirkt, indem es die virale Replikation inhibiert, wird ihm zudem antivirale Aktivität zugesprochen (Hata *et al*, 2001).

Der Phänotyp CD4⁺ CTL weist daraufhin, dass die Zellen eine Subpopulation antigenerfahrener oder Gedächtnis-T-Zellen sind, die interessanterweise bei verschiedenen Virusinfektionen unterschiedliche Differenzierungsphänotypen zeigen (Appay, 2004). Typischerweise verlieren CD4⁺ CTL gegen Ende ihrer Differenzierung die Expression der Oberflächenmarker CD27 und CD28. Die Präsenz dieser hochdifferenzierten CD4⁺ CTL scheint mit einer chronischen Aktivierung bei latenten Infektionen wie EBV und CMV zu korrelieren. Wie für CD8⁺ CTL bereits beschrieben, stellt die Immunaktivierung einen starken Stimulus für die Ausdifferenzierung der Zellen dar (Papagno *et al*, 2004; Gamadia *et al*, 2004).

2.5 Immuntherapie

Die spezifischen Wirkungen des Immunsystems macht sich die Immuntherapie zunutze, indem sie die potenten Effektorfunktionen gezielt gegen Tumorzellen richtet. Eine Möglichkeit der Immuntherapie stellt die systemische Gabe monoklonaler tumorspezifischer Antikörper dar. Trotz einiger vielversprechender Erfolge - wie dem CD20-spezifischen Antikörper Rituximab in der Behandlung CD20+ B-Zell-Lymphome - wird die Zerstörung der Tumorzellen hier aber durch oft sehr schwache Effektorfunktionen der verabreichten Antikörper begrenzt, die für eine langfristig wirksame Therapie nicht ausreichen. Mit der zellulären Immuntherapie bietet sich die Möglichkeit, speziell expandierte, stimulierte oder gentechnisch veränderte Lymphozyten einzusetzen.

Die Impfung (Vakzinierung) von Patienten zielt darauf ab, eine natürliche Immunität gegen den Tumor hervorzurufen. Dabei bieten sich verschiedene Wege, die unterschiedlichen Bereiche des Immunsystems *in vivo* zu aktivieren. Möglichkeiten bestehen u.a. in der Gabe Tumorpeptid beladener APC, die das Immunogen MHC-abhängig präsentieren und damit dem Immunsystem zugänglich machen. Als APC wurden Dendritische Zellen (DC) oder aktivierte CD40B-Zellen eingesetzt (Lapointe *et al*, 2003;Coughlin *et al*, 2003). In der Behandlung des Neuroblastoms, eines häufigen soliden Tumors im Kindesalter, konnte durch mit Tumor-RNA beladene DC eine gute Verträglichkeit und eine Immunantwort erreicht werden - ohne jedoch eine komplette Tumorremission zu bewirken (Caruso *et al*, 2005). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen klinische Studien, in denen mit dem IL-2-Gen-transduzierte Neuroblastomzellen verabreicht wurden (Rousseau *et al*, 2002;Bowman *et al*, 1998).

Im Gegensatz zur Vakzinierung werden im Rahmen der adoptiven T-Zell-Therapie antigen-spezifische Zellen *ex vivo* generiert und anschließend übertragen. Die Generierung dieser Effektorzellen ist *in vitro* durch verschiedenste Kulturbedingungen, wie die Koinkubation mit Peptid-beladenen (Meidenbauer *et al*, 2003;Fonteneau *et al*, 2001) oder viral transduzierten APC (Coughlin *et al*, 2004) als Stimulatorzellen möglich. Die bislang besten klinischen Erfolge mit adoptivem T-Zell-Transfer wurden aber durch die Übertragung virusspezifischer T-Zellen erreicht. Die Reaktivierung latent persistierender Herpesviren wie Epstein-Barr-Virus (EBV) oder Cytomegalievirus (CMV) ist nach einer Knochenmark- oder Organtransplantation beim immunsupprimierten Patienten die Ursache vielfältiger Komplikationen. Die Immunantwort, die die Virusinfektion beim gesunden Menschen

kontrolliert, konnte durch die Gabe *in vitro* generierter EBV-spezifischer CTL (EBV-CTL) oder CMV-spezifischer CTL (CMV-CTL) rekonstituiert werden (Rooney *et al.*, 1995; Rooney, 2003; Riddell *et al.*, 1991). Da EBV mit der Entstehung verschiedener Tumorerkrankungen wie dem Burkitt-Lymphom, der Hodgkin-Krankheit, dem niedrig differenzierten Nasopharynxkarzinom oder transplantationsassoziierten Lymphomen in Verbindung gebracht wird (Rickinson *et al.*, 1996), wurden die virusspezifischen CTL auch gegen Tumorzellen gerichtet. Erste Therapieversuche dieser EBV-assoziierten Erkrankungen durch den adoptiven Transfer von EBV-CTL zeigten vielversprechende klinische Erfolge (Rooney *et al.*, 1995; Gottschalk *et al.*, 2005). So konnte erst kürzlich für EBV-positive Hodgkin-Tumore gezeigt werden, dass die transfundierten CTL *in vivo* expandieren, funktionell aktiv sind und eine Antitumor-Wirkung vermitteln. Durch Genmarkierungsstudien wurde darüber hinaus nachgewiesen, dass die transfundierten Zellen persistieren, in Gedächtniszellen differenzieren können und auch ins Tumorgewebe selbst wandern (Bollard *et al.*, 2004). Leider sind aber nur wenige Tumore so strikt virus-assoziiert, dass die Behandlung maligner Zellen mit Hilfe virusspezifischer T-Zellen Erfolg versprechen könnte.

Neben der Expansion natürlich vorkommender tumorspezifischer Zellen stellt die genetische Modifikation von T-Zellen eine vielversprechende Alternative dar. So können diese mit einem zweiten TCR ausgestattet werden, der sie befähigt, ein Tumorantigen zu erkennen. Der zweite, aus einem tumorantigen-spezifischen Klon gewonnene TCR wird über retroviralen Gentransfer in die Zellen eingebracht und basiert auf der MHC-abhängigen Erkennung des Antigens. *In vitro* zeigten sich die genmodifizierten Zellen funktionell und im Mausmodell konnte neben einem therapeutischen Effekt auch die Differenzierung der Zellen in einen Gedächtnisphänotyp nachgewiesen werden (Xue *et al.*, 2005). Die Erkennung von Tumorzellen über natürliche oder klonierte $\alpha\beta$ T-Zell-Rezeptoren ist durch vielfältige Resistenzmechanismen limitiert. So entkommen Tumorzellen der Erkennung durch das Immunsystem, z.B. indem sie die Expression der MHC-Moleküle herunterregulieren. Sogenannte chimäre Rezeptoren sind in der Lage, diese Resistenzmechanismen zu umgehen.

2.6 Chimäre Rezeptoren

Durch die Expression chimärer Rezeptoren werden autologe Lymphozyten unabhängig von ihrer natürlichen Spezifität zur Erkennung eines Tumorantigens befähigt. Voraussetzung dafür ist das Vorhandensein eines tumorspezifischen monoklonalen Antikörpers, dessen variablen Domänen mit den Signaltransduktionswegen des nativen TCR fusioniert werden. Die

Verbindung mit dem zytoplasmatischen Anteil der ζ -Untereinheit des TCR gewährt dann Zugang zu den intrazellulären Signaltransduktionswegen der T-Zelle und kombiniert damit die spezifische Antigenerkennung monoklonaler Antikörper mit den wirksamen Effektorfunktionen der T-Zelle (Eshhar *et al*, 1993). Chimäre Rezeptoren bestehen aus einem signaltransduzierenden Molekül und einem Einzelkettenantikörper, der gegen ein geeignetes Tumorantigen gerichtet ist. Die variable leichte Kette (V_L) und die variable schwere Kette (V_H) von Antikörpern werden über einen Linker (Oligopeptid) miteinander verbunden und bilden ein sogenanntes scFv („single chain fragment variable“). Die zur Signaltransduktion benötigte Domäne wird in Form der CD3 ζ -Kette (Letourneur & Klausner, 1991; Irving & Weiss, 1991) des TCR-Komplexes oder der γ -Kette eingebaut. Zwischen der Transmembrandomäne des Signalmoleküls und dem extrazellulären Bereich des scFv wird eine humane Immunglobulin-„hinge“-Domäne (Moritz & Groner, 1995) eingefügt, die den Abstand zur Zytoplasmamembran und die Beweglichkeit des scFv vergrößert. Zusätzlich wird eine humane Immunglobulin-„leader“-Sequenz als Signalpeptid eingefügt, das während des Transports zur Zytoplasmamembran abgespalten wird. Abbildung 2-1 zeigt den Vergleich zwischen nativem und chimärem T-Zellrezeptor-Komplex.

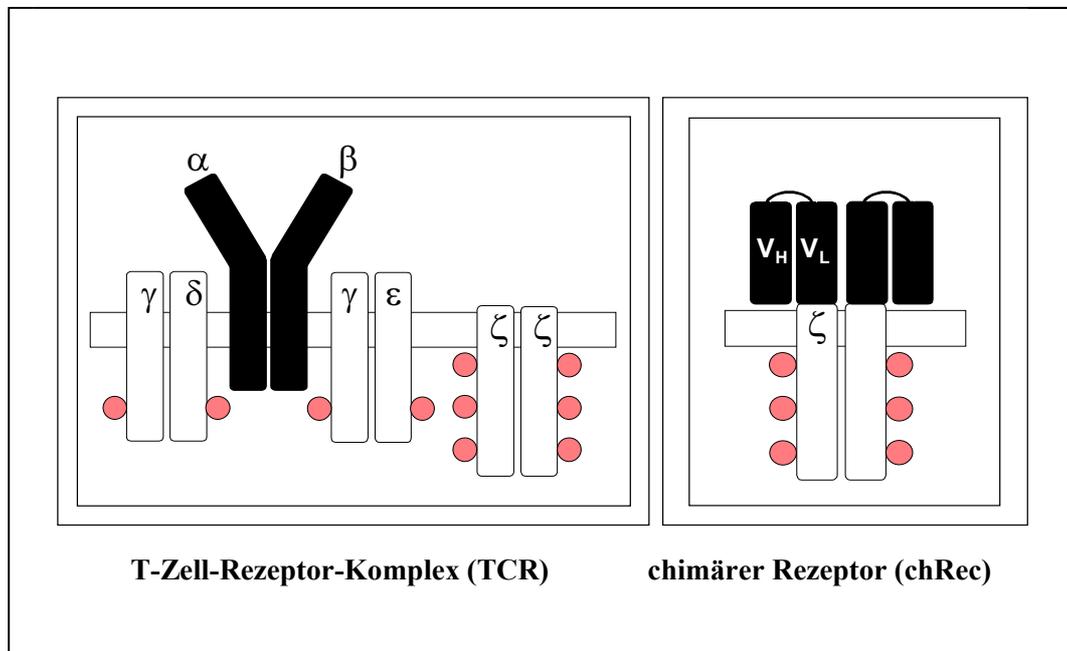


Abb. 2-1: Schematische Darstellung des nativen T-Zell-Rezeptor-Komplexes (TCR) und dem chimären Rezeptor (chRec). Die einzelnen Untereinheiten des TCR bestehen aus der α -Kette (α) und der β -Kette (β), die für die Antigenerkennung sorgen. Der CD3-Komplex besteht aus der γ -Kette (γ), der δ -Kette (δ) sowie der ϵ -Kette (ϵ). Für die Signaltransduktion verantwortlich ist die ζ -Kette (ζ) des CD3-Komplexes. In Folge der Aktivierung der T-Zelle kommt es zu einer Phosphorylierungskaskade über die ITAMs (Immunoreceptor Tyrosine-based activation Motif) (rot) der ζ -Kette, resultierend in einer Aktivierung der T-Zelle. Der chRec wiederum besteht aus der variablen leichten (V_L) und schweren (V_H) Kette eines tumorspezifischen monoklonalen Antikörpers fusioniert mit der CD3- ζ -Kette.

Durch die Kombination der hochwirksamen Mechanismen der Zielzellzerstörung durch T-Zellen und den Fähigkeiten monoklonaler Antikörper, Antigene ohne Präsentation durch APC zu erkennen, werden Resistenzmechanismen der Tumorzellen wirkungsvoll umgangen. Der adoptive Transfer chRec modifizierter Zellen zeigte *in vitro* und im Mausmodell eine signifikante Antitumor-Aktivität (Brentjens *et al*, 2003; Geiger *et al*, 1999; Hwu *et al*, 1995; Gyobu *et al*, 2004; Haynes *et al*, 2002; Teng *et al*, 2004). In ersten klinischen Studien konnten diese Ergebnisse jedoch nicht bestätigt werden (Walker *et al*, 2000). Die modifizierten Zellen verloren nach kurzer Zeit ihre Funktionalität und waren nicht in der Lage, *in vivo* zu expandieren (Mitsuyasu *et al*, 2000). Die Aktivierung der transfundierten Zellen durch Tumorantigen allein scheint nicht auszureichen, um die Zellen zur Proliferation anzuregen und damit eine langfristige Immunität gegen den Tumor zu vermitteln.

Eine mögliche Erklärung für die ineffektive Proliferation der Zellen ist das Fehlen kostimulatorischer Moleküle auf der Oberfläche der Tumorzellen. Durch die zusätzliche Expression kostimulatorischer Moleküle wie z.B. CD28 im chRec wurde daher in den letzten Jahren versucht, diesen Funktionalitätsverlust zu kompensieren. Durch die Erkennung über den chRec sollte damit neben dem ersten Signal über die ζ -Kette des TCR auch das notwendige zweite Signal über eine kostimulatorische Domäne weitergeleitet werden. *In vitro* konnte so tatsächlich eine effizientere T-Zellaktivierung bezüglich der Zytokinsekretion und Proliferation polyklonaler T-Zellen erreicht werden (Hombach *et al*, 2001; Alvarez-Vallina & Russell, 1999; Finney *et al*, 1998; Maher *et al*, 2002). *In vivo* konnte die Überlegenheit chimärer Rezeptoren mit kostimulatorischen Molekülen bislang aber ausschließlich im Mausmodell nachgewiesen werden (Friedmann-Morvinski *et al*, 2005).

2.7 B-Vorläufer ALL

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist die häufigste maligne Erkrankung des Kindesalters. Jährlich erkranken ca. 500 Kinder in Deutschland an einer ALL. Obwohl in den letzten Jahrzehnten durch die Optimierung der Kombinationschemotherapie gute Therapieerfolge erzielt werden konnten, kommt es bei 20-30% der Kinder zu einem Rezidiv (Moorman *et al*, 2005). Auch durch eine allogene Knochenmarktransplantation (KMT) ist für die Hälfte dieser Kinder das Fortschreiten der Erkrankung nicht aufzuhalten (Miano *et al*, 2005). Aufgrund ihrer zellulären Abstammung von unreifen Zellen der B-Zellreihe sind ALL-Blasten gekennzeichnet durch die Oberflächenexpression des B-Zellmarkers CD19. Rezidive nach einer KMT gehen in der Regel von einem CD19+ leukämischen Zellklon aus, während

normale hämatopoetische Stammzellen CD19 nicht exprimieren (Hotfilder *et al*, 2002; Vormoor *et al*, 1998). CD19 erlaubt daher die gezielte Erkennung leukämischer Blasten z.B. durch CD19-spezifische chimäre Rezeptoren. *In vitro* wurden CD19-spezifische chRec generiert, in T-Zellen exprimiert und funktionell analysiert (Brentjens *et al*, 2003; Cooper *et al*, 2002; Cheadle *et al*, 2003). Es zeigte sich, dass sowohl maligne Blasten der B-Vorläufer-ALL, als auch CD19⁺ Lymphomzellen durch die genmodifizierten T-Zellen spezifisch erkannt und lysiert werden können (Rischer *et al*, 2004; Rossig C. *et al*, 2005).

2.8 Neuroblastom

Jährlich erkranken in Deutschland ca. 150 Kinder am Neuroblastom, einem der häufigsten embryonalen Tumore im Säuglings- bis Kleinkindalter (deutsches Kinderkrebsregister, Mainz). Die Heilungserfolge sind für bei der Diagnose bereits metastasierte Tumore und bei Rezidiven sehr ungünstig. Obwohl die Immunogenität des Neuroblastoms gering ist, da kostimulatorische und HLA- Moleküle nicht exprimiert werden (Corrias *et al*, 2004), wird aber selektiv das für neuroektodermale Tumore typische Gangliosid-Antigen G_{D2} in hoher Dichte auf der Oberfläche exprimiert. Diese Unterscheidung zu gesundem Gewebe erlaubt die spezifische Erkennung malignen Gewebes z.B. durch den monoklonalen Antikörper 14.G2a. Immuntherapeutische Ansätze mit der systemischen Gabe von 14.G2a auch in Kombination mit Hochdosis IL-2 führten aber zu keiner Verbesserung der Prognose, obwohl die G_{D2}-Expression stabil blieb (Kramer *et al*, 2001). Die Fusion der Antigenerkennungsdomänen des 14.G2a mit der CD3 ζ -Kette zu einem chimären Rezeptor 14.G2a ζ hingegen zeigte *in vitro* eine spezifische Antigenerkennung, Zytokinsekretion und zytolytische Effektorfunktionen transduzierter polyklonaler T-Zellen (Rossig *et al*, 2001).

2.9 Immuntherapie mit virus-spezifischen T-Zellen

Eine mögliche Verbesserung der adoptiven T-Zell-Therapie mit chimären Rezeptoren wäre der Einsatz virusspezifischer T-Zellen, die *in vivo* über ihren nativen TCR reaktivierbar wären und damit einhergehend über den chimären Rezeptor auch tumorspezifische Effektorfunktionen ausführen könnten. Dabei bieten sich vor allem Herpesvirus-spezifische T-Zellen, wie z.B. EBV- oder VZV-spezifische T-Zellen an. Da Untersuchungen transgener Mäuse daraufhin deuteten, dass die Signaltransduktionsfähigkeit chimärer Rezeptoren abhängig vom Aktivierungszustand der transduzierten Zelle ist (Brocker & Karjalainen, 1995; Brocker, 2000), wurden EBV-CTL auf ihre Fähigkeit untersucht, die funktionelle Inaktivierung chRec transduzierter Zellen durch die gezielte Stimulation über den nativen

Rezeptor zu umgehen. Die Transduktion *in vitro* generierter EBV-spezifischer CTL mit 14.G2a ζ bestätigte, dass die Proliferationsfähigkeit der Zellen auch hier nicht alleine über den chRec vermittelt werden konnte. Die Aktivierung über den nativen TCR hingegen resultierte aber in einer spezifischen Proliferation der modifizierten EBV-CTL. Die bispezifischen Zellen waren in der Lage, sowohl EBV-infizierte Zellen als auch antigenpositive Tumorzellen zu erkennen und effizient zu lysieren (Rossig *et al*, 2002). Eine Anwendung EBV-spezifischer T-Zellen im Rahmen einer Tumormimmuntherapie im Kindesalter erscheint für Deutschland jedoch schwierig, da die Durchseuchung mit EBV im frühen Kindesalter nur sehr gering ist. Darüber hinaus existiert gegen EBV keine Vakzine, mit der es möglich wäre, EBV-spezifische T-Zellen *in vivo* zu aktivieren. Eine Alternative könnten VZV-spezifische T-Zellen darstellen.

2.10 Varicella-Zoster-Virus

Das Varicella-Zoster-Virus (VZV) gehört zur Familie der humanen α -Herpesviren und führt bei Primärinfektion zu Windpocken. Durch die lebenslange Persistenz in den sensorischen Ganglien seines Wirtes kann es in Folge einer Reaktivierung in einen Herpes Zoster resultieren. Bislang fand die Primärinfektion meist im Säuglings- bis Kleinkindalter statt, so dass bereits im Alter von 4 Jahren 90% der Kinder in Deutschland seropositiv für VZV waren. Um die z.T. schweren Komplikationen der Windpockenerkrankung zu verhindern, wird aber seit 2004 die routinemäßige Varicella-Vakzinierung im ersten Lebensjahr von der deutschen Impfkommision empfohlen. Die Vakzinierung wird mit einem Lebendimpfstoff, der bereits seit 1975 zugelassen ist, durchgeführt und gut vertragen.

Während der primären Infektion mit VZV sorgt zunächst die unspezifische angeborene Immunität mit NK-Zellen und der Sekretion von IFN- α für eine limitierte Ausbreitung des Virus. So zeigt z.B. Granulysin als Produkt unspezifischer NK-Zellen eine potente zytolytische Aktivität gegen VZV-infizierte Zellen (Hata *et al*, 2001). Trotzdem ist die angeborene Immunität nicht ausreichend, um Symptome der Infektion zu verhindern. Erst die erworbene T-Zell vermittelte Immunität sorgt für die vollständige Erholung des Wirtes von der VZV-Infektion. Die T-Zell vermittelte Immunität ist gekennzeichnet durch MHC-I abhängige CD8⁺ T-Lymphozyten wie auch durch MHC-II restringierte CD4⁺ T-Zellen mit Spezifität für verschiedene VZV-Antigene und der Sekretion typischer T_{H1}-Zytokine wie IL-2, IFN- γ oder IL-10 und IL-12. Die induzierten T-Zellen erkennen dabei typischerweise VZV-

Glykoproteine wie z.B. gC, gE, gH oder gI und regulatorische Proteine wie IE62. Die Glykoproteine sind im Laufe der Infektion für das Anheften des Virus an die Wirtszellen sowie die Penetration der Zellmembranen verantwortlich und daher sehr immunogen. Das Immediate-Early Protein 62 (IE62) ist als Tegumentprotein und viraler Transaktivator (Kinchington *et al*, 1992) ebenfalls ein wichtiges immunogenes Protein, welches von den T-Zellen spezifisch erkannt wird. VZV-spezifische zytotoxische T-Zellen (VZV-CTL) sind in der Lage, infizierte Zellen MHC-I-abhängig (CD8⁺ CTL) oder MHC-II-restringiert (CD4⁺ CTL) zu lysieren (Hayward *et al*, 1986; Huang *et al*, 1992; Arvin *et al*, 1991). VZV-spezifische Antikörper werden während der Infektion produziert und zeigen neutralisierende Aktivität oder vermitteln Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (antibody dependent cell mediated cytotoxicity = ADCC). Ihr Beitrag zur vollständigen Bekämpfung der Infektion scheint aber limitiert, da der Transfer hochtitriger anti-VZV Antikörper bei immunsupprimierten Kindern den Verlauf der Erkrankung nicht verändert (Camitta *et al*, 1994). Gedächtnis-T-Zellen, die ein breites Spektrum an VZV-Proteinen erkennen, sind auch Jahre nach Primärinfektion noch nachweisbar. Diese adaptive Immunität korreliert mit einem erhöhten Schutz gegen eine Reinfektion und Reaktivierung von VZV. Bei Reexposition oder einer Boosterdosis der VZV-Vakzine sind nachweislich erhöhte Antikörpertiter und eine Reaktivierung der VZV-spezifischen T-Zell-Immunität festzustellen (Watson *et al*, 1995a; Watson *et al*, 1995b).

3 Zielsetzung

Die klinische Anwendbarkeit autologer T-Lymphozyten, die durch genetische Modifikation tumorspezifische chimäre T-Zell-Rezeptoren exprimieren, ist zur Zeit noch begrenzt durch die rasche funktionelle Inaktivierung der transfundierten Zellen. Vor allem scheint die Stimulation über die chimären Rezeptoren nicht auszureichen, um die Proliferation der Zellen anzuregen und damit die Persistenz der verabreichten Lymphozyten zu gewährleisten. In der vorliegenden Arbeit sollte daher ein Modell entwickelt werden, mit der die Funktionalität der Zellen erhalten und verstärkt werden kann. Die natürliche Spezifität für ein virales Immunogen könnte die funktionelle Inaktivierung der Zellen umgehen, indem die modifizierten Zellen durch die Begegnung mit ihrem viralen Antigen reaktiviert werden und damit auch ihre tumorspezifischen Effektorfunktionen induziert werden.

Die Immunität gegen latent persistierendes Varicella-Zoster-Virus (VZV) soll als Modell für die gezielte Reaktivierung genmodifizierter Lymphozyten untersucht werden. Dabei bildet die Generierung und Charakterisierung VZV-spezifischer T-Lymphozyten die Grundlage für die Untersuchung der tumor- und virusspezifischen Funktionalität nach Transduktion mit chimären Rezeptoren.

Folgende Aufgaben mussten dafür gelöst werden:

- Herstellung und Optimierung eines *in vitro*-Kultivierungssystems zur Generierung VZV-spezifischer T-Lymphozyten
- Nachweis der Virusspezifität der Zellen durch geeignete Zielzellen
- Transduktion der generierten Zellen mit tumorspezifischen chimären Rezeptoren
- Charakterisierung der spezifischen Effektorfunktionen Proliferation, Zytokinsekretion und Zytotoxizität transduzierter und nicht-transduzierter Zellen im Vergleich

4 Ergebnisse

Zu Beginn dieser Arbeiten war bereits bekannt, dass mit chimären Rezeptoren modifizierte EBV-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten (EBV-CTL) in der Lage sind, Tumorzellen zu erkennen und lysieren, während ihre Fähigkeit zur virusspezifischen Proliferation erhalten bleibt (Rossig *et al*, 2002). Aufgrund der geringen Durchseuchung mit EBV im Kleinkindalter und nur seltenen endogenen Reaktivierungen erscheint eine klinische Umsetzung mit EBV-CTL als tumorspezifischen Effektorzellen bei Erkrankungen von Kindern in Deutschland aber schwierig. Im Gegensatz dazu ist die Durchseuchung mit VZV bereits im Kleinkindalter sehr hoch und die T-Zell-vermittelte Immunantwort gegen VZV wird durch endogene Reaktivierungen und Reexpositionen ständig erneuert. Daher sollten in der vorliegenden Arbeit VZV-spezifische T-Lymphozyten expandiert, charakterisiert und auf ihr Potential hinsichtlich einer Tumormimmuntherapie mit chimären Rezeptoren untersucht werden.

4.1 Generierung VZV-spezifischer T-Zellkulturen

Die Grundlage der vorliegenden Arbeit bildet die Generierung und Expansion VZV-spezifischer T-Lymphozyten. Zu Beginn wurden zunächst verschiedene Kultivierungsparameter für eine antigenspezifische kurzzeitige Proliferation ausgetestet und optimiert, bevor die Bedingungen für eine längerfristige Expansion in großen Zellzahlen bestimmt wurden.

4.1.1 Proliferation VZV-spezifischer T-Zellen

4.1.1.1 Verschiedene Antigene

Für die Generierung VZV-spezifischer T-Zellen wurden frisch isolierte periphere Blutzellen (PBMCs) VZV-seropositiver Spender mit verschiedenen VZV-Antigenen stimuliert. Dabei wurden sowohl das Komplement-Bindungs-Reaktions-Antigen (KBR) der Firma Virion/Serion (Würzburg), ein VZV-Glykoprotein-Mix (EIA) der Firma Virion/Serion und ein in Zusammenarbeit mit der Medizinischen Virologie hergestelltes Lysat VZV-infizierter Fibroblasten (VZV-Lysat) ausgetestet. Das KBR-Antigen wird von der Firma Virion/Serion für die Analyse des VZV-Serostatus vertrieben und in der Diagnostik routinemäßig als stimulierendes Antigen eingesetzt. Der Glykoprotein-Mix EIA wird ebenfalls für die Bestimmung des Serostatus eingesetzt und stellt eine säulenchromatographisch aufgereinigte Suspension aus VZV-infizierten Zellen dar. Im Gegensatz dazu wurde bei der Herstellung des

VZV-Lysats keine Aufreinigung der infizierten Fibroblasten durchgeführt, so dass in der Suspension ein größeres Spektrum potenziell immunogener Proteine vorhanden war. Als Parameter für die spezifische Zellstimulation wurde die Proliferation von PBMCs im ^3H -Thymidin-Assay für 4 Spender analysiert. Durch Koinkubation mit ^3H -markiertem Thymidin kann die Proliferationsrate der Zellen anhand des inkorporierten Thymidins detektiert werden. Wie in Abb. 4-1 dargestellt, ergab sich für die verschiedenen Antigene nach Stimulation eine vergleichbare Proliferation der Zellen. In dieser kurzzeitigen Proliferation mit einer Stimulationsdauer von 5-7 Tagen erwies sich kein Antigen als überlegen. Mit den Kontroll-Lysaten, die entweder von der Firma Virion/Serion zur Verfügung standen oder durch die Herstellung des Lysates nicht-infizierter Fibroblasten generiert wurden, zeigte sich keine spezifische Zellproliferation.

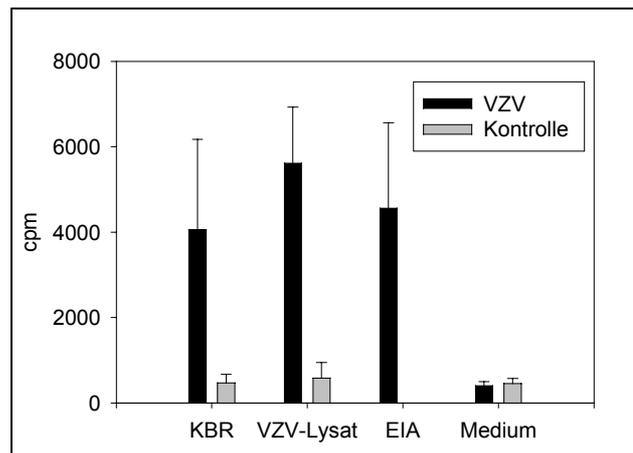


Abb. 4-1: Antigen-spezifische Proliferation von PBMCs eines seropositiven Spenders nach Zugabe verschiedener Antigene. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von vier. Die Proliferation der Zellen als Antwort auf die Stimulation wurde durch die Inkorporation ^3H -markierten Thymidins in Counts pro Minute (cpm) analysiert. Für alle mit VZV-Antigenen [KBR = Komplement-Bindungs-Reagenz der Firma Virion/Serion; Lysat = Lysat aus VZV-Impfstamm OKA infizierten Fibroblasten; EIA = VZV-Glykoproteinmix der Firma Virion/Serion] inkubierten T-Zellen zeigte sich eine spezifische Proliferation. Für die Inkubation mit Kontroll-Antigenen zeigten die Zellen keine Proliferation. Für EIA stand kein Kontrollantigen zur Verfügung.

4.1.1.2 Verschiedene Kulturmedien

Da die Kultivierung humaner Zellen je nach Zellart optimierte Kulturbedingungen erfordert, wurde die Proliferation zunächst in verschiedenen Kulturmedien mit unterschiedlichen Serumkonzentrationen analysiert. Als stimulierendes Antigen wurde dabei für 3 Linien aus dem Blut gesunder Spender das KBR-Antigen eingesetzt. In AIM-V/Hyclone (A/H) Medium proliferierten die Zellen in hohem Maße, wobei die Serumkonzentration keinen signifikanten

Einfluss auf die Proliferation zeigte. Um den Verbrauch an autologem Serum zu minimieren und eine unspezifische Hintergrundproliferation gering zu halten, wurde daher in den folgenden Experimenten AIM-V/Hyclone mit 1-2% autologem Serum als Kulturmedium eingesetzt.

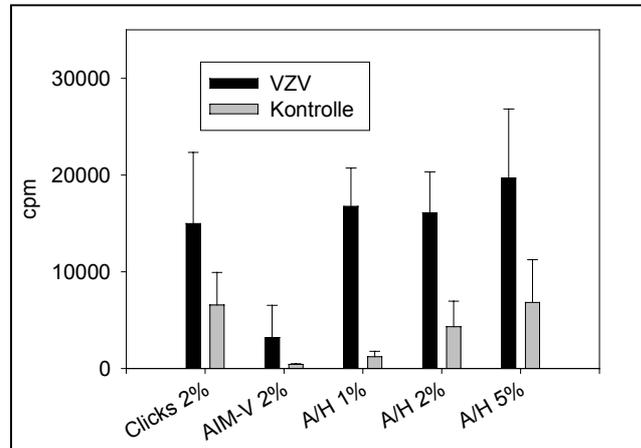


Abb. 4-2: Verschiedene Kulturmedien zur Stimulation der T-Zellen. PBMCs seropositiver Spender wurden in verschiedenen Kulturmedien [Clicks, AIM-V oder einem Gemisch aus AIM-V und Hyclone (A/H)] mit unterschiedlichen Konzentrationen autologen Serums mit VZV-Antigen koinkubiert und im ^3H -Thymidin-Assay analysiert. Dargestellt ist ein Experiment von drei. Die optimale Proliferation der Zellen bei geringer unspezifischer Proliferation zeigte sich in A/H 1%-2% autologen Serums. Balken kennzeichnen die Standardabweichung der ermittelten Dreifachwerte.

4.1.2 Expansion VZV-spezifischer Zellen

4.1.2.1 Verschiedene Antigene

Für die langfristige Expansion VZV-spezifischer Zellen wurden die PBMCs VZV-seropositiver Spender nach initialer Stimulation mit VZV-Antigen (Lysat, KBR oder EIA) wöchentlich mit einem Feedmix aus autologen PBMCs, VZV-Antigen und IL-2 restimuliert. Dabei wurden wiederum verschiedene Kulturmedien verglichen. In der langfristigen Stimulation der Zellen stellte das VZV-Lysat aus den infizierten Fibroblasten den besten Stimulus dar, um die Zellen zu expandieren. Wie in Abb. 4-3 gezeigt, expandierten die Zellen von zwei verschiedenen Spendern mit Lysat, bei einem Spender aber auch mit dem Glykoprotein-Mix und autologen PBMCs. Für die Stimulation mit Kontroll-Antigen ergab sich für keinen Spender eine adäquate Zellproliferation. Für alle folgenden Experimente wurden VZV-CTL über autologe PBMCs als APC mit VZV-Lysat stimuliert.

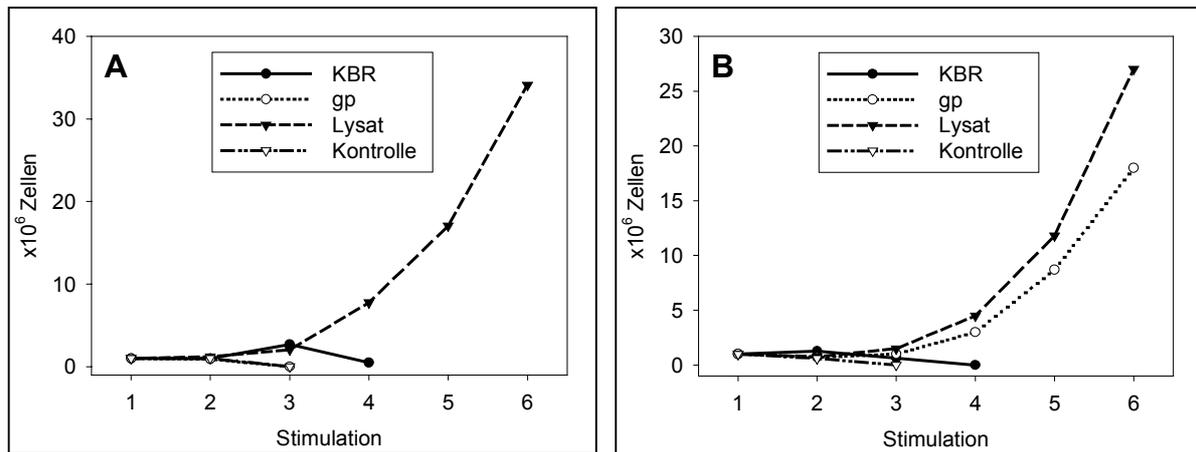


Abb. 4-3: Expansion VZV-spezifischer T-Zellen mit verschiedenen VZV-Antigenen. PBMCs seropositiver Spender wurden in Anwesenheit bestrahlter autologer PBMCs und der Zugabe verschiedener VZV-Antigene [KBR-Antigen, VZV-Glykoprotein-Mix (gp), VZV-Lysat oder Kontroll-Antigen] wöchentlich stimuliert und expandiert. Dargestellt sind zwei Spender A & B. A zeigte die beste Expansion durch die Inkubation mit VZV-Lysat, Spender B hingegen zeigte eine gute Expansion durch Zugabe von VZV-Lysat oder den Glykoprotein-Mix. Weder durch das KBR-Antigen noch durch Kontroll-Antigen wurde eine Expansion VZV-spezifischer Zellen erreicht.

Um die Herstellung des VZV-Lysates möglichst vergleichbar zu gestalten, wurden zu Beginn dieser Arbeiten Fibroblasten in größerer Menge infiziert und in Aliquots weggefroren. Das VZV-Lysat wurde dann je nach Bedarf hergestellt und ebenfalls in Aliquots a 250µl bei -80°C gelagert. Für jede Stimulation wurde ein frisches Aliquot aufgetaut. Weiterhin wurde jede Charge neuen Lysates im ³H-Thymidin-Assay auf seine Stimulationsfähigkeit - auch im Vergleich mit der letzten Charge - getestet. Eine typische Titration ist in Abb. 4-4 dargestellt.

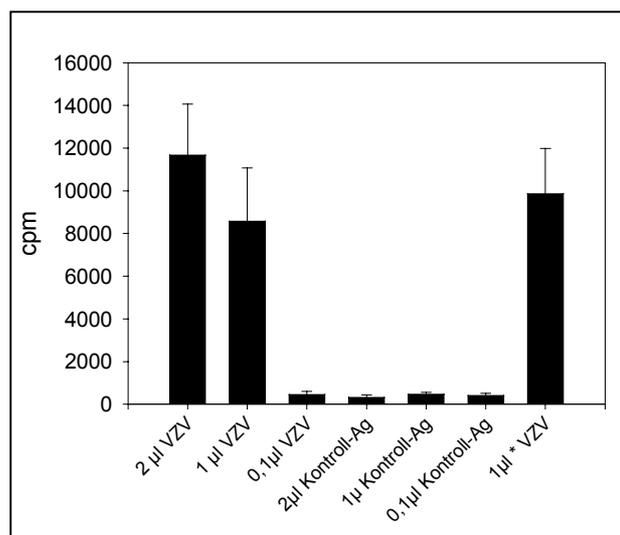


Abb. 4-4: Titration neuen Antigens im Vergleich mit Kontroll-Antigen oder der alten Charge des VZV-Lysats. 10⁵PBMCs seropositiver Spender wurden bei jeder Charge neuen Antigens mit den angegebenen Mengen VZV-Lysats oder Kontroll-Lysats für 5 Tage koinkubiert und die Proliferation durch den Einbau ³H-markierten Thymidins in Counts pro Minute [cpm] dokumentiert. * kennzeichnet VZV-Lysat aus einer vorangegangenen Charge.

4.1.2.2 Verschiedene Kulturmedien

Die Expansion der VZV-spezifischen Zellen wurde darüber hinaus in verschiedenen Kulturmedien optimiert. Für die Kultivierung EBV-spezifischer CTL werden die Linien üblicherweise in Clicks-Medium mit 10% FCS stimuliert, so dass hier neben AIM-V/Hyclone und Hyclone-Medium auch Clicks mit verschiedenen Serumkonzentrationen getestet wurde. Obwohl in der kurzfristigen initialen Proliferation AIM-V/Hyclone das beste Medium darstellte, gingen die Zellen hier nach 2 bis 3 Stimulationen in Apoptose. RPMI-Medium der Firma Hyclone (Hyclone) ermöglichte -in Abb. 4-5 dargestellt- die besten Expansionsraten. Nach Optimierung der Kultivierungsbedingungen wurden alle Zelllinien in Hyclone-Medium mit 1-2% autologem Serum mit dem Lysat VZV-infizierter Fibroblasten generiert.

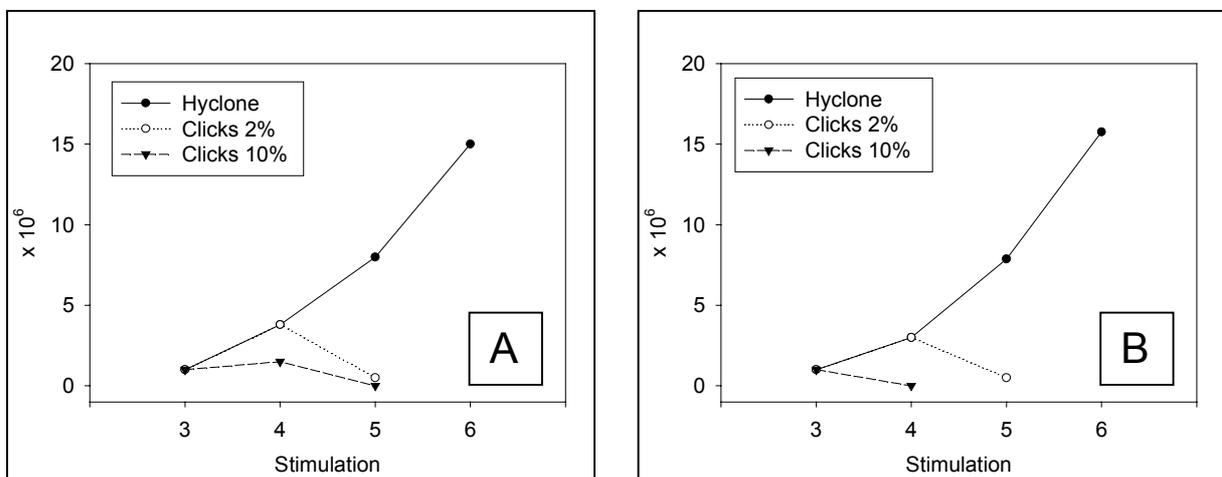


Abb. 4-5: Stimulation VZV-spezifischer T-Zellen in verschiedenen Kulturmedien. VZV-CTL der Spender A und B wurden in entweder RPMI-Medium der Firma Hyclone (Hyclone) mit 2% autologem Serum oder Clicks-Medium mit 2% oder 10% Serum kultiviert und die Expansion durch wöchentliche Ermittlung der Zellzahl bestimmt. Tote Zellen wurden durch Trypan-Blue Färbung ausgeschlossen. Es zeigt eine klare Expansion der Zellen in Hyclone Medium, während die Zellen in Clicks in Apoptose gehen.

4.1.2.3 VZV-spezifische Kulturen expandieren zu großen Zellzahlen

Durch wöchentliche Restimulation wurden Kulturen erfolgreich auch in großer Zellzahl expandiert und bis zu 12 mal stimuliert. Üblicherweise verdoppelten bis verdreifachten sich die Zellen dabei jede Woche, so dass nach es nach der 6.Stimulation zu einer 55-fachen (55+/- 29) Expansion der Zellen kam. Die Expansion wurde für 7 verschiedene Spender reproduziert und wird in Abb. 4-6 exemplarisch für 2 Spender dargestellt. Nach erfolgreicher Optimierung der Kultivierungsbedingungen wurden die Zellen üblicherweise nach 5-7 Stimulationen für funktionelle Versuche eingesetzt.

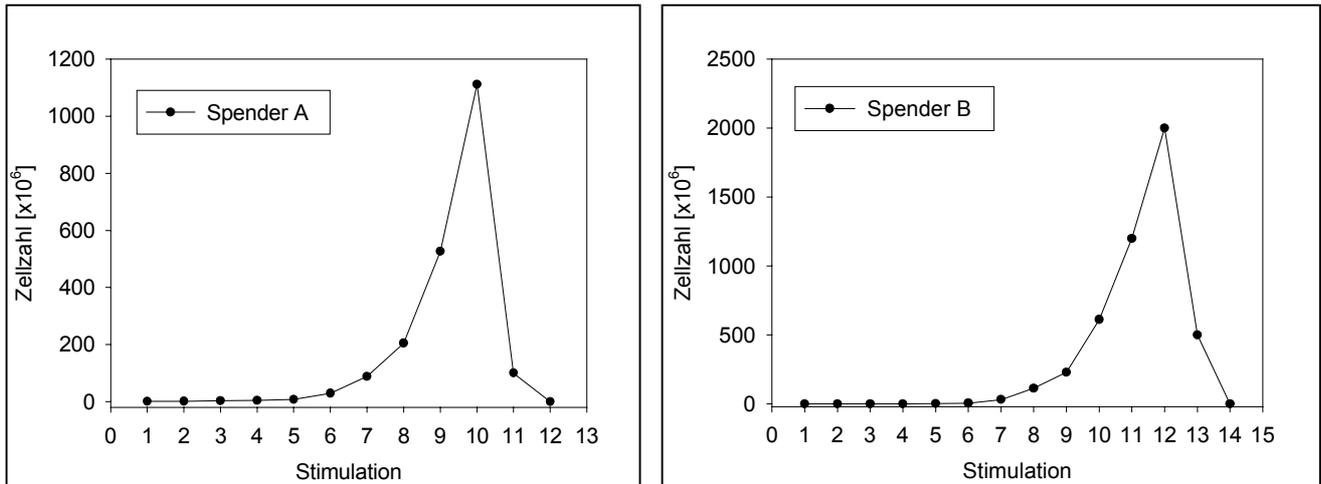


Abb. 4-6: Expansion VZV-spezifischer T-Zellen. Durch die wöchentliche Stimulation mit VZV-Lysat und PBMCs wurden Linien für insgesamt 7 Spender- hier gezeigt Spender A und B – generiert. Die Expansion wurde dokumentiert durch die wöchentliche Zellzahlbestimmung und Zellzahlen bis zu 2×10^{10} erreicht, defekte Zellen wurden durch eine Trypan-Blue-Färbung ausgeschlossen.

4.1.2.4 PBMCs seronegativer Spender proliferieren nicht mit VZV-Lysat

Die spezifische Proliferation VZV-Antigen erkennender Zellen setzt voraus, dass durch eine bereits durchgemachte VZV-Infektion oder -Impfung Gedächtnis-T-Zellen persistieren, die im Falle einer erneuten Infektion für eine schnelle Immunantwort sorgen. Im Blut VZV-seronegativer Spender fehlen diese Gedächtniszellen. Um nachzuweisen, dass ausschließlich VZV-spezifische Zellen durch die Inkubation mit VZV-Antigen proliferieren, wurden daher PBMCs aus dem Blut von 4 VZV-seronegativen Spendern isoliert und mit VZV-Lysat koinkubiert. Die Proliferation der Zellen wurde im ³H-Thymidin-Assay überprüft, wobei sich zeigte, dass die Zellen nicht spezifisch proliferierten, da es - im Gegensatz zur mitgeführten Positivkontrolle - keine Unterschiede zwischen den VZV-Lysat-stimulierten Zellen, dem Kontroll-Lysat und der Mediumkontrolle gab (Abb. 4-7).

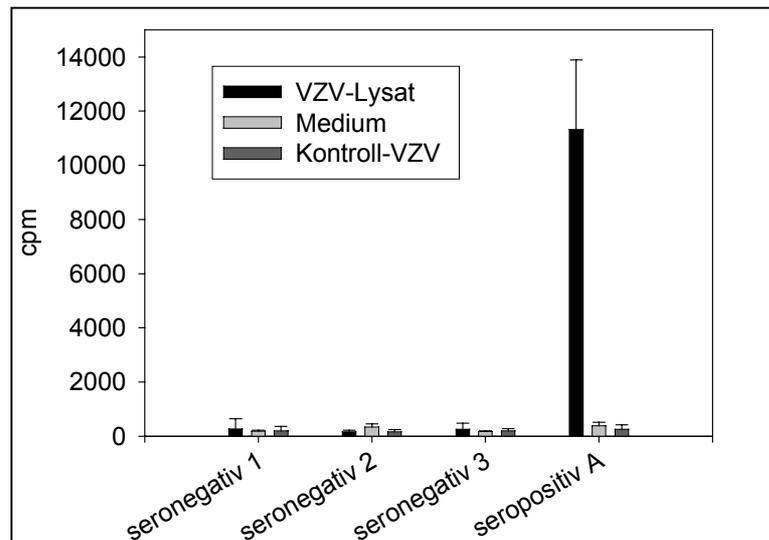


Abb. 4-7: PBMCs seronegativer Spender proliferieren nicht nach Stimulation mit VZV-Lysat. 10^5 PBMCs seronegativer gesunder Spender wurden für 6 Tage mit VZV-Lysat, Kontroll-Antigen oder nur in Medium inkubiert und die spezifische Proliferation durch den Einbau radioaktiv markierten ^3H -Thymidins in Counts pro Minute [cpm] quantifiziert. Dargestellt sind drei von vier getesteten seronegativen Spendern. Zur Kontrolle wurden PBMCs eines seropositiven Spenders mitgetestet. Für keinen der seronegativen Spender zeigte sich – im Gegensatz zur Positivkontrolle – eine spezifische Proliferation. Balken zeigen die Standardabweichung der ermittelten Dreifachwerte.

4.1.2.5 Nach Impfung proliferieren PBMCs spezifisch und sezernieren $\text{IFN-}\gamma$

Drei der VZV-seronegativen Spender ließen sich gegen VZV impfen und standen 6 Wochen nach der Impfung für eine erneute Blutspende zur Verfügung. Mit den frisch isolierten PBMCs dieser Spender wurde ein ^3H -Thymidin-Assay durchgeführt und die $\text{IFN-}\gamma$ Sekretion der PBMCs vor und nach der Impfung als Antwort auf die Stimulation mit VZV-Lysat im ELISA analysiert. Abb. 4-8 dokumentiert dabei die Zunahme der Proliferationsrate der stimulierten Zellen. Diese wurde spezifisch für die Stimulation mit VZV-Lysat, nicht jedoch für die Stimulation mit Kontroll-Lysat erreicht. Analog dazu erbrachte die Stimulation der Zellen mit VZV-Lysat eine spezifische $\text{IFN-}\gamma$ Sekretion erst nach der Impfung (Abb. 4-8).

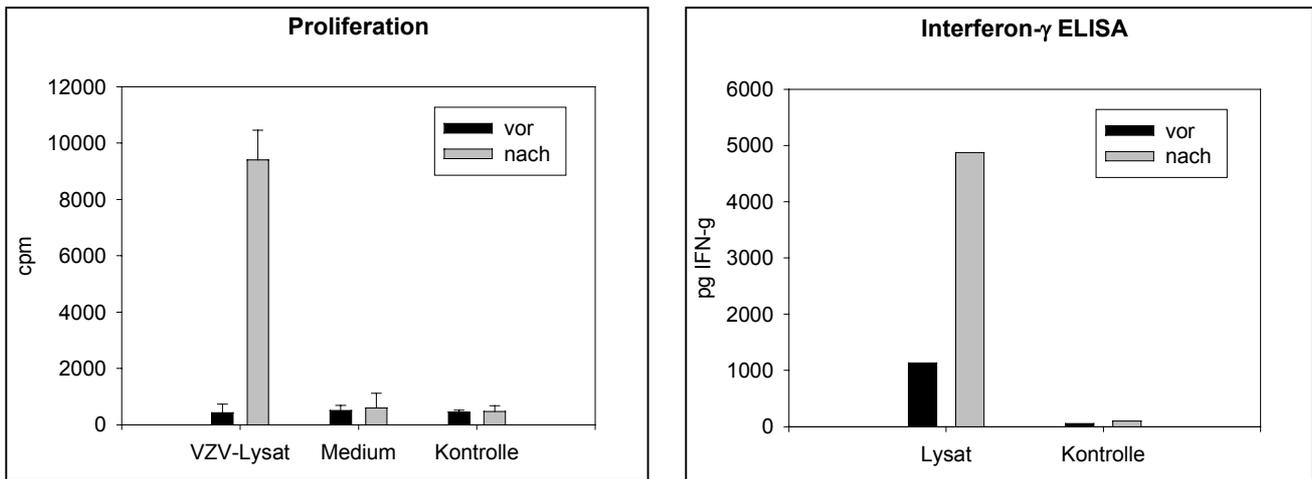


Abb. 4-8: PBMCs serokonvertierter Spender proliferieren spezifisch erst nach VZV-Impfung und sezernieren IFN- γ nach Koinkubation mit VZV-Lysat. 10^5 PBMCs desselben Spenders wurden vor und nach VZV-Impfung mit VZV-Lysat stimuliert. Die Proliferation wurde durch den Einbau ^3H -markierten Thymidins quantifiziert, die IFN- γ Sekretion wurde im ELISA determiniert. Gezeigt ist ein repräsentativer Spender von dreien. Dabei zeigen PBMCs eine spezifische Proliferation und IFN- γ Sekretion erst nach VZV-Impfung. Balken zeigen die Standardabweichung der ermittelten Dreifachwerte.

4.2 Nachweis der Spezifität für bestimmte VZV-Antigene

Um die Spezifität der generierten T-Zelllinien für ausgesuchte VZV-Antigene zu untersuchen, mussten zunächst geeignete Zielzellen erzeugt werden. Daher wurden in dieser Arbeit die VZV-Glykoproteine gE und gI in den retroviralen Vektor MSCV-IRES-GFP subkloniert und für die Transduktion antigen-präsentierender B-Zellen verwendet. Als B-Zellen wurden EBV-LCL (durch EBV immortalisierte B-Zelllinien) oder CD40-aktivierte B-Zellen (CD40-Zellen) generiert.

4.2.1.1 Konstruktion der retroviralen Vektoren MSCV-gE & MSCV-gI

Als retroviraler Vektor wurde der replikationsdefekte Vektor MSCV-IRES-GFP ausgewählt. Durch die im Vektor enthaltenen Long Terminal Repeats (LTR), in denen Promotor- und Enhancer-Sequenzen kodiert sind, und das Verpackungssignal Ψ kann das transkribierte virale Genom in das zelluläre Genom integrieren (Mann et al., 1983). Deletiert und durch das Transgen ersetzt sind hingegen die Gene *gag*, *env* und *pol* für die viralen Strukturproteine. Erst durch die Verpackungszelllinie werden die für die Verpackung notwendigen Virusproteine wieder zur Verfügung gestellt, so dass ein replikativer Zyklus stattfinden kann. MSCV-IRES-GFP (6825 bp) enthält zudem ein internes Ribosomeneintrittssignal (IRES), das durch die Insertion eines Transgens stromabwärts des IRES die Expression des Transgens und des GFP unter Kontrolle eines einzelnen Promoters ermöglicht (Pelletier et al., 1988). Die Expression des Transgens kann somit mit der GFP-Expression direkt korreliert werden. Für

die Subklonierung aus den Vektoren pCR3.1-gE und pCR3.1-gI (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von AM Arvin, Stanford) wurden alle Vektoren mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Xho*I geschnitten und nach Aufreinigung der Fragmente miteinander ligiert. Für gE (1735bp) und gI (929bp) ergaben sich nach Ligation die Vektoren MSCV-I-gE (8560bp) und MSCV-I-gI (7754bp). Die Karten der konstruierten Vektoren sind im Anhang dargestellt. Für beide Konstrukte wurde eine Endotoxin-freie Plasmid-Präparation durchgeführt. Die aufgereinigten Plasmide wurden dann für die Transfektion von Phoenix-eco Zellen eingesetzt.

4.2.1.2 Herstellung stabiler Produktionszelllinien

Für die Generierung stabiler Produktionszelllinien wurde zunächst eine transiente Transfektion von Phoenix-eco Zellen (Pear et al., 1993; Kinsella et al., 1996) vorgenommen. Phoenix eco enthält alle für die Replikation, Verpackung und Infektion notwendigen viralen Proteine und zeigt ein ecotropes Wirtsspektrum, d.h. es infiziert ausschließlich murine Zellen. Die Überprüfung der Transfektionseffizienz mit Hilfe der GFP-Expression im Durchflusszytometer ergab bis zu 95% GFP positive Zellen, so dass mit den Überständen die stabile Produktionszelllinie PG13 transduziert werden konnte. Die Produktionszelllinie für das Gibbon Virus (GALV) stammt von der murinen Linie TK-/NIH3T3 ab und integriert das Virion stabil in ihr Genom, wodurch eine konstitutive Expression des Fremdgens gewährleistet wird. Nach wiederholter Koinkubation mit virushaltigem Überstand ergab die durchflußzytometrische Kontrolle der generierten Linie eine Transduktionseffizienz von >95%. Die generierten Produktionszelllinien geben durch Inkubation bei 32°C Viruspartikel in den Überstand ab, der genutzt werden kann, um die Fremdgene z.B. in B-Zellen zu exprimieren. In dieser Arbeit wurden LCL und CD40B-Zellen mit dem Virusüberstand von PG13 MSCV-I-gE und -gI inkubiert, um die VZV-Antigene zu exprimieren.

4.2.1.3 Herstellung von LCL

Die Infektion humaner PBMCs mit EBV-haltigem Überstand der Krallenaffen-Linie B95.8 führt zur Infektion und Immortalisierung naiver B-Zellen mit Entstehung stabiler, schnell proliferierender Zelllinien. Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten LCL wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Cliona Rooney, Houston, USA.

4.2.1.4 Herstellung aktivierter CD40B-Zellen

Humane B-Zellen lassen sich *in vivo* von T-Zellen über deren konstitutiv exprimierten CD40Liganden (CD40L; synonym CD154) effektiv aktivieren. Diese Tatsache nutzt man für die Generierung aktivierter CD40B-Zellen *in vitro*. Unserer Arbeitsgruppe stand die stabil mit dem humanen CD40L transduzierte Zelllinie NIH3T3 tCD40L (freundliche Gabe von Michael Bergwelt-Baildon, Köln) zur Verfügung. Durch wöchentlich zweimalige Stimulation konnten aktivierte CD40B-Zellen in großer Zahl kultiviert werden. Die initiale Stimulation wurde mit frisch isolierten PBMCs verschiedener Spender unter Zugabe des T-Zell-Suppressivums Cyclosporin A (CsA) und dem B-Zell-Wachstumsfaktor Interleukin-4 (IL-4) vorgenommen und führte zur Proliferation der enthaltenen B-Zellen. Zwischen den einzelnen Stimulationen verdoppelte bis verdreifachte sich die Zellzahl und die generierten Zellen zeigten ein flockiges, kugeliges Erscheinungsbild, sehr ähnlich der Morphologie EBV-immortalisierter LCL. Aktivierte CD40B-Zellen eignen sich als professionelle antigen-präsentierende Zellen (APC) gut als antigenspezifische Zielzellen, da sie neben den typischen B-Zell-Oberflächenantigenen CD19 und CD20 auch kostimulatorische Moleküle wie CD80 oder CD86 in hohem Maße exprimieren. Die Expression dieser Oberflächenmarker wurde für alle kultivierten CD40B-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt und ist in Abb. 4-9 exemplarisch für einen Spender dargestellt.

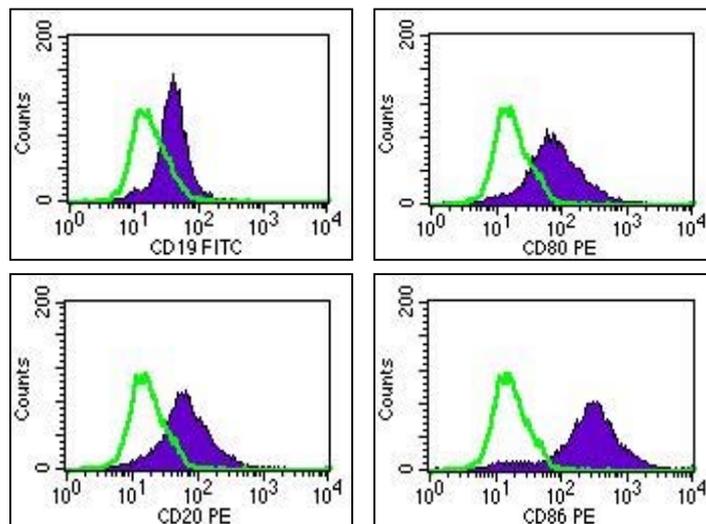


Abb. 4-9: Expression spezifischer Oberflächenmarker in CD40B-Zellen. Durchfluss-zytometrisch wurde die Expression der B-Zell- Marker CD19 und CD20 sowie die Expression der kostimulatorischen Aktivierungs-marker CD80 und CD86 analysiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Spender von fünf. Charakteristisch für CD40B-Zellen ist die starke Expression aller Marker (Violett) im Gegensatz zu den mitgeführten Isokontrollen (grün).

4.2.1.5 Retrovirale Transduktion mit MSCV-gE & -gI

Für die Expression der VZV-Proteine in den LCL und CD40B-Zellen wurden diese wiederholt mit retrovirushaltigem Überstand der neu generierten Produktionszelllinien PG13 MSCV-I-gE oder PG13 MSCV-I-gI inkubiert. Die Transduktionseffizienzen wurden anschliessend durchflusszytometrisch bestimmt. Um zu kontrollieren, ob sich LCL und CD40B-Zellen retroviral transduzieren lassen, wurden die Zellen zudem mit Überstand der - bereits in der Arbeitsgruppe hergestellten - Linie PG13 SFG/EGFP transduziert. Wie in Abb. 4-10 zu erkennen, ergab sich dabei nur eine äußerst schwache Transduktion mit EGFP, für die Expression der VZV-Glykoproteine konnte weder in LCL noch in CD40B-Zellen ein positives Signal für GFP als Maß der VZV-Antigenexpression detektiert werden.

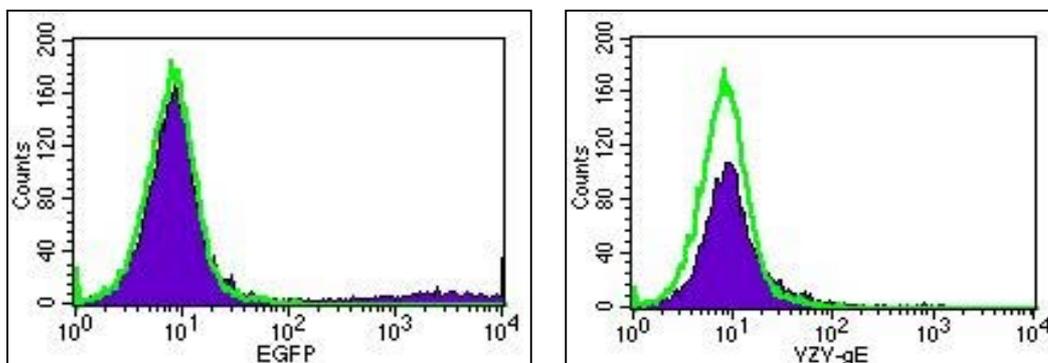


Abb. 4-10: Expression der Transgene EGFP und gE-GFP in retroviral transduzierten CD40B-Zellen. CD40B-Zellen wurden retroviral mit entweder SFG/EGFP oder MSCV-gE-GFP transduziert und dessen Expression durchflusszytometrisch anhand der GFP-Expression (violett) im Vergleich mit der jeweiligen Isokontrolle (grün) analysiert. Weder für SFG/EGFP noch für MSCV-gE-GFP (VZV-gE) konnte eine ausreichende Transduktionseffizienz erreicht werden.

Da das Transgen im MSCV-I-GFP stromaufwärts des GFP-Reportergens liegt und von demselben Promoter reguliert wird, wird angenommen, dass die Expression des Transgens mit der Expression des GFP gleichzusetzen ist. Um auszuschliessen, dass lediglich die GFP-Expression in den transduzierten Zellen schwach ausfällt, das Transgen aber gut exprimiert wird, wurde aus den transduzierten LCL RNA extrahiert und revers in cDNA transkribiert. Über eine PCR sollte dann nachgewiesen werden, ob das Transgen in den transduzierten Zellen vorhanden ist. Trotz positiver Signale für das Kontrollgen GAP-DH konnte auch durch diese Methode keine spezifische RNA nachgewiesen werden.

4.2.2 Generierung Vaccinia-infizierter B-Zellen

Alternativ zur Expression retroviral transduzierter Gene können Fremdgene auch durch die Infektion mit Vaccinia-Virus-Rekombinanten zur Expression gebracht werden. Dazu wurden LCL oder CD40B-Zellen mit Vaccinia-Virus-Rekombinanten infiziert, die für VZV-Antigene kodieren. Als Antigene wurden das Immediate-Early-Protein 62 (IE62) und Glykoprotein E (gE) ausgewählt. Diese Antigene gehören zu den immunogensten und am besten charakterisierten VZV-Proteinen. Durch die Infektion mit den Vaccinia-Virus-Rekombinanten Vac-IE62 und Vac-gE (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von John Hay, Stanford) wurden die VZV-Proteine in den B-Zellen zur Expression gebracht. Für den Nachweis der VZV-Spezifität wurden die Linien dann mit VZV-Antigen exprimierenden Zielzellen koinkubiert und im IFN- γ -ELISPOT analysiert. IFN- γ wird nach der Aktivierung von naiven T-Zellen, CD4⁺ T_{H1}-Helferzellen, CD8⁺ T-Lymphozyten sowie NK-Zellen produziert. Die Sekretion dieses Zytokins kann in einem IFN- γ spezifischen ELISPOT nach gezielter Aktivierung auf Zellebene nachgewiesen werden und dient daher hier als Nachweis der Virusspezifität der generierten VZV-CTL. Der Versuchsaufbau wird in Abb. 4-11 als Übersicht dargestellt.

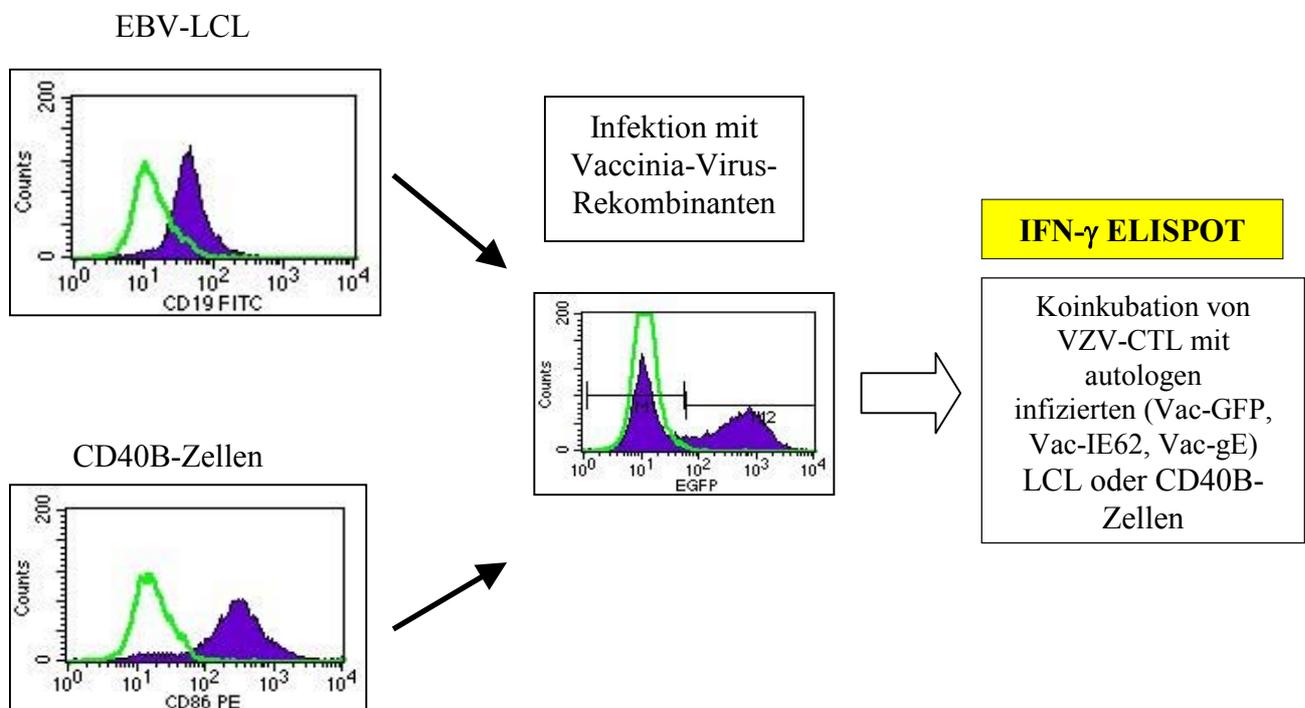


Abb. 4-11: Versuchsaufbau für den Nachweis der VZV-Virusspezifität der generierten Zellen mittels IFN- γ ELISPOT. Durch die Infektion von EBV-LCL oder CD40B-Zellen mit Vaccinia-Virus-Rekombinanten werden die VZV-Antigene gE oder IE62 exprimiert. Der Nachweis der Virusspezifität erfolgt anschließend durch die Koinkubation der infizierten B-Zellen mit VZV-CTL.

4.2.2.1 Infektion mit Vaccinia-Virus-Rekombinanten

Für eine effiziente Expression der VZV-Immunogene in den B-Zellen wurden die Infektion der B-Zellen mit einer „multiplicity of infection“ (MOI) von 5 durchgeführt. Als Indikator der Proteinexpression wurden neben der Infektion mit Vac-IE62 und Vac-gE auch eine Infektion mit Vac-GFP als Reporter gen durchgeführt. Die erfolgreiche Expression von GFP in den LCL und CD40B-Zellen nach einer Infektionszeit von 6h ist in Abb. 4-12 dargestellt. Für infizierte LCL ergaben sich 16% GFP-positiven Zellen, für infizierte CD40B-Zellen 40% GFP-positiven Zellen im Vergleich mit der Kontrolle nicht infizierter Zellen.

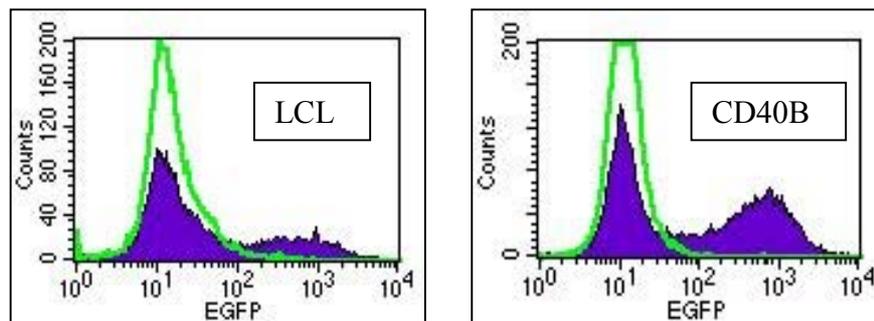


Abb. 4-12: Expression der Fremdgene in LCL und CD40B-Zellen nach Infektion mit Vaccinia-Virus-Rekombinanten. Die Expression des Fremdgens (violett) – in diesem Fall GFP – wurde durchflusszytometrisch im Vergleich mit nicht infizierten B-Zellen (grün) analysiert. Für LCL zeigt sich die Expression von GFP in 16% der Zellen, in CD40B-Zellen exprimierten 40% GFP.

4.2.2.2 VZV-CTL zeigen Spezifität für die VZV-Antigene IE62 und gE

Nach erfolgreicher Infektion der B-Zellen mit den Vaccinia-Virus-Rekombinanten wurden diese mit VZV-CTL im ELISPOT koinkubiert. Obwohl die VZV-CTL zuvor zwei Wochen nicht stimuliert worden waren, um ihren Aktivierungsstatus herabzusetzen, zeigte sich eine IFN- γ Antwort auch auf GFP-infizierte B-Zellen. Durch die Koinkubation mit IE62- oder -gE exprimierenden APC konnte diese aber gesteigert werden (Abb. 4-13). Zwischen transduzierten und nicht-transduzierten VZV-CTL zeigte sich dabei kein Unterschied. Damit konnte gezeigt werden, dass die mit VZV-Lysat stimulierten Zelllinien Zellen mit Spezifität für verschiedene VZV-Immunogene enthalten und sich nicht auf ein einzelnes Antigen beschränken.

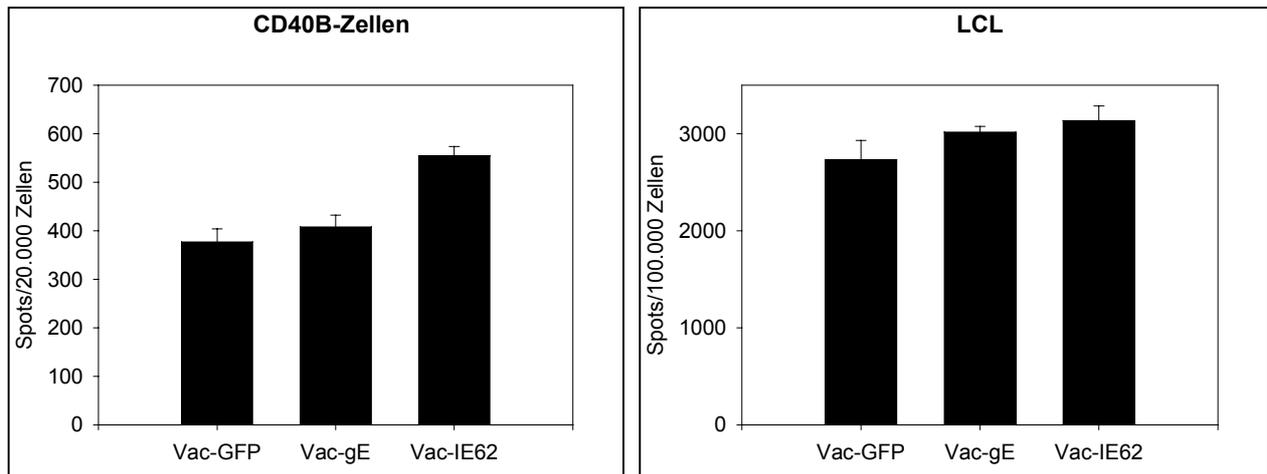


Abb. 4-13: IFN- γ ELISPOT zum Nachweis der Spezifität der generierten T-Zellen für die VZV-Antigen gE und IE62. VZV-CTL wurden mit Vaccinia-infizierten B-Zellen (LCL oder CD40B-Zellen) für 16h koinkubiert, die spezifische IFN- γ Sekretion wurde anschließend im ELISPOT nach Angaben der Hersteller bestimmt. Dargestellt ist das Ergebnis der Koinkubation von VZV-CTL des Spenders B mit infizierten autologen LCL. Trotz einer Hintergrund IFN- γ Sekretion auch nach Inkubation mit GFP-exprimierenden LCL (Vac-GFP), nimmt die Sekretion nach Inkubation mit gE- oder IE62-exprimierenden LCL (Vac-gE und Vac-IE62) zu.

4.2.2.3 Die Virusspezifität wird über MHC-II vermittelt

Blockierungsexperimente im IFN- γ ELISPOT konnten darüber hinaus zeigen, dass die Erkennung der VZV-Antigene MHC-II restringiert abläuft. So wurde die Sekretion von IFN- γ durch die Zugabe eines blockierenden MHC-II Antikörpers stark herabgesetzt, die Inkubation mit α -MHC-I führte hingegen zu keiner Reduktion der spezifischen IFN- γ Sekretion (Abb. 4-14).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass Subpopulationen der generierten Zellen Spezifität für die untersuchten VZV-Antigene IE62 und gE aufweisen und die Erkennung der viralen Antigene über MHC-II vermittelt wird.

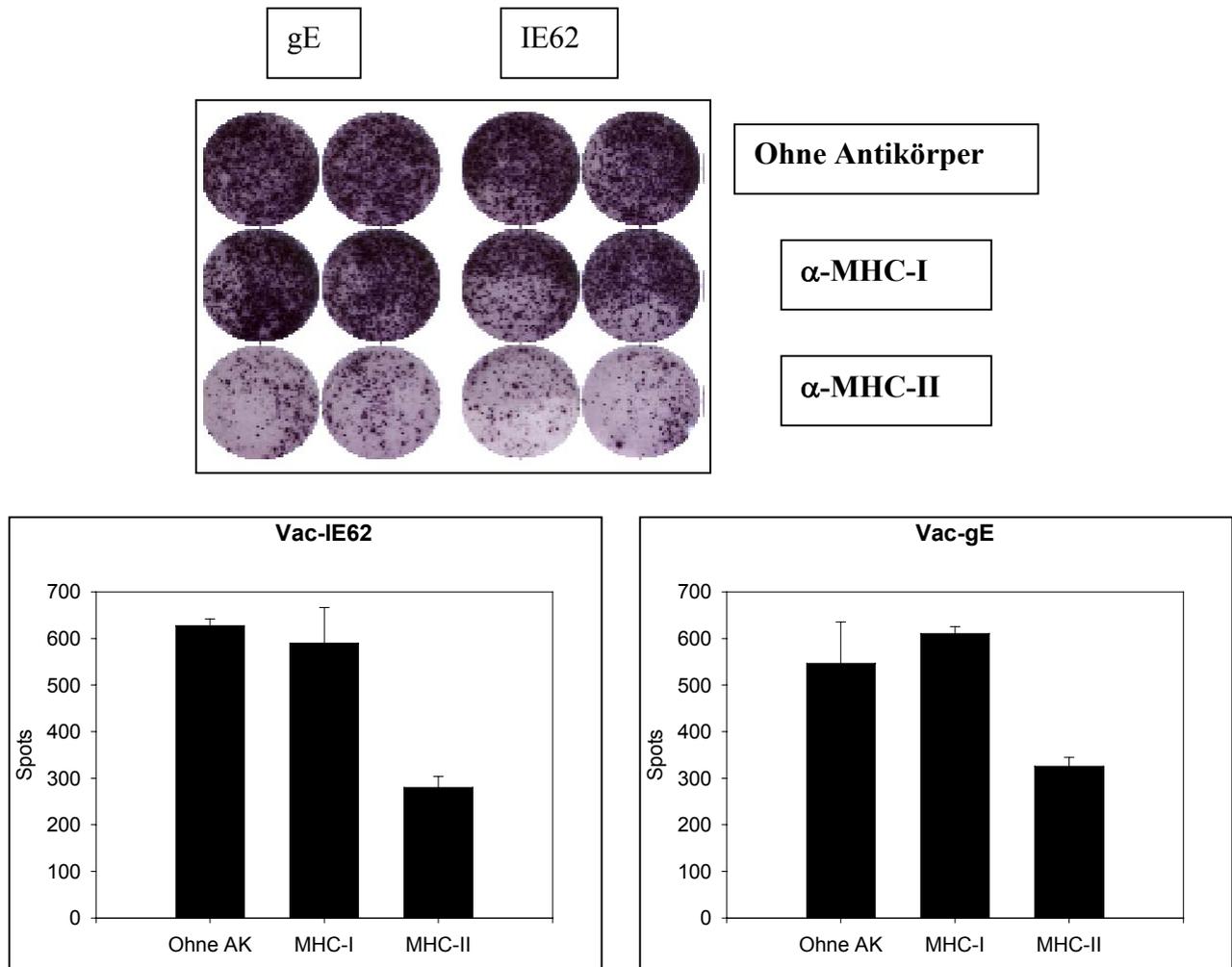


Abb. 4-14: MHC-II Abhängigkeit der IFN- γ Sekretion nach Inkubation mit VZV-Antigen-exprimierenden B-Zellen. VZV-spezifische T-Zellen wurden mit Vaccinia-gE oder -IE62 infizierten LCL und in Anwesenheit blockierender Antikörper gegen MHC-I und MHC-II koinkubiert, die spezifische IFN- γ Sekretion wurde im ELISPOT nach Angaben der Hersteller quantifiziert. Ohne Antikörper und in Anwesenheit von α -MHC-I-Antikörper zeigte sich keine Reduktion der Zytokinsekretion, durch die Zugabe von MHC-II hingegen wurde die Menge an IFN- γ inhibiert.

4.3 Immunphänotypisierung der VZV-spezifischen Zelllinien

Für die phänotypische Charakterisierung der erfolgreich expandierten VZV-spezifischen Kulturen wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf die Expression typischer Oberflächenantigene untersucht. Dabei wurden zunächst die T-Zell-Marker CD3, CD4 und CD8 sowie das NK-Zell-Oberflächenantigen CD56 analysiert.

4.3.1 EIA-stimulierte Zellpopulationen setzen sich zusammen aus CD3⁺-T-Zellen und CD56⁺-NK-Zellen

Nach Stimulation mit dem Glykoprotein-Mix EIA zeigte sich eine Mischpopulation aus CD3⁺-T-Zellen und CD56⁺-NK-Zellen. Dabei stellten CD8⁺-T-Lymphozyten einen Anteil von rund 14%. Der Anteil an CD4⁺-T-Zellen betrug 20%. Eine typische Färbung ist in Abb. 4-15

gezeigt. Ein großer Anteil der Kulturen bestand aus CD56+ NK-Zellen, die sich dadurch auszeichnen, dass sie Zielzellen antigenunabhängig lysieren. Die weitere Analyse EIA stimulierter Lymphozyten mit einem so hohen Anteil an NK-Zellen wurde in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt, da die gezielte Reaktivierung antigenspezifischer Lymphozyten über ihren nativen TCR untersucht werden sollte.

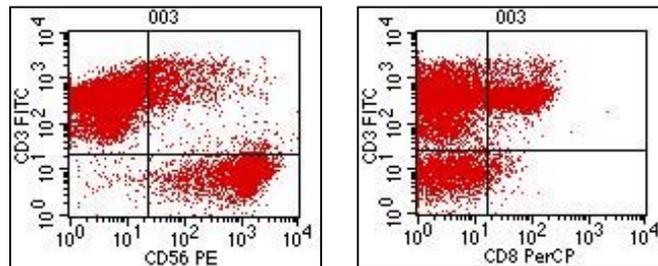


Abb. 4-15: Phänotypisierung EIA-stimulierter Zellkulturen. Die Expression der Oberflächenantigene CD3, CD8 sowie CD56 wurden durchflusszytometrisch bestimmt. Neben einem großen Anteil von CD56+ NK-Zellen bestand der Hauptanteil der Kulturen aus CD3+ T-Zellen.

4.3.2 VZV-Lysat stimuliert CD4+-dominierte T-Zellkulturen

Im Gegensatz zur Stimulation mit EIA ergab sich für das VZV-Lysat ein CD4+-dominierter Phänotyp. Wie in Abb. 4-16 dargestellt, zeigte sich für alle expandierten Kulturen eine Mischpopulation aus hauptsächlich CD4+-T-Zellen (bis zu 97%) mit einer gewissen Variabilität zwischen den einzelnen Spendern. CD56+ NK-Zellen waren ebenfalls nur in geringem Umfang (2-10%) vorhanden. Für einen Spender (A) ergab sich ein relativ großer Anteil an TCR- $\gamma\delta$ + T-Zellen. Zusammenfassend stellt Tabelle 4-II die typischen Phänotypen der T-Zell-Kulturen verschiedenen Spender dar.

Tabelle 4-II: Phänotypen generierter VZV-CTL Linien.

	A	B	C	D	E
CD3+	98%	99%	99%	99%	98%
CD3+/CD4+	50-70%	93-97%	90-95%	91%	95%
CD3+/CD8+	12-20%	2-6%	2-7%	3%	2%
CD3-/CD56+	1-2%	1%	1%	1%	1%
CD3+/ $\gamma\delta$ +	30-60%	n.b.	1- 7%	0- 5%	n.b.

n.b. = nicht bestimmt

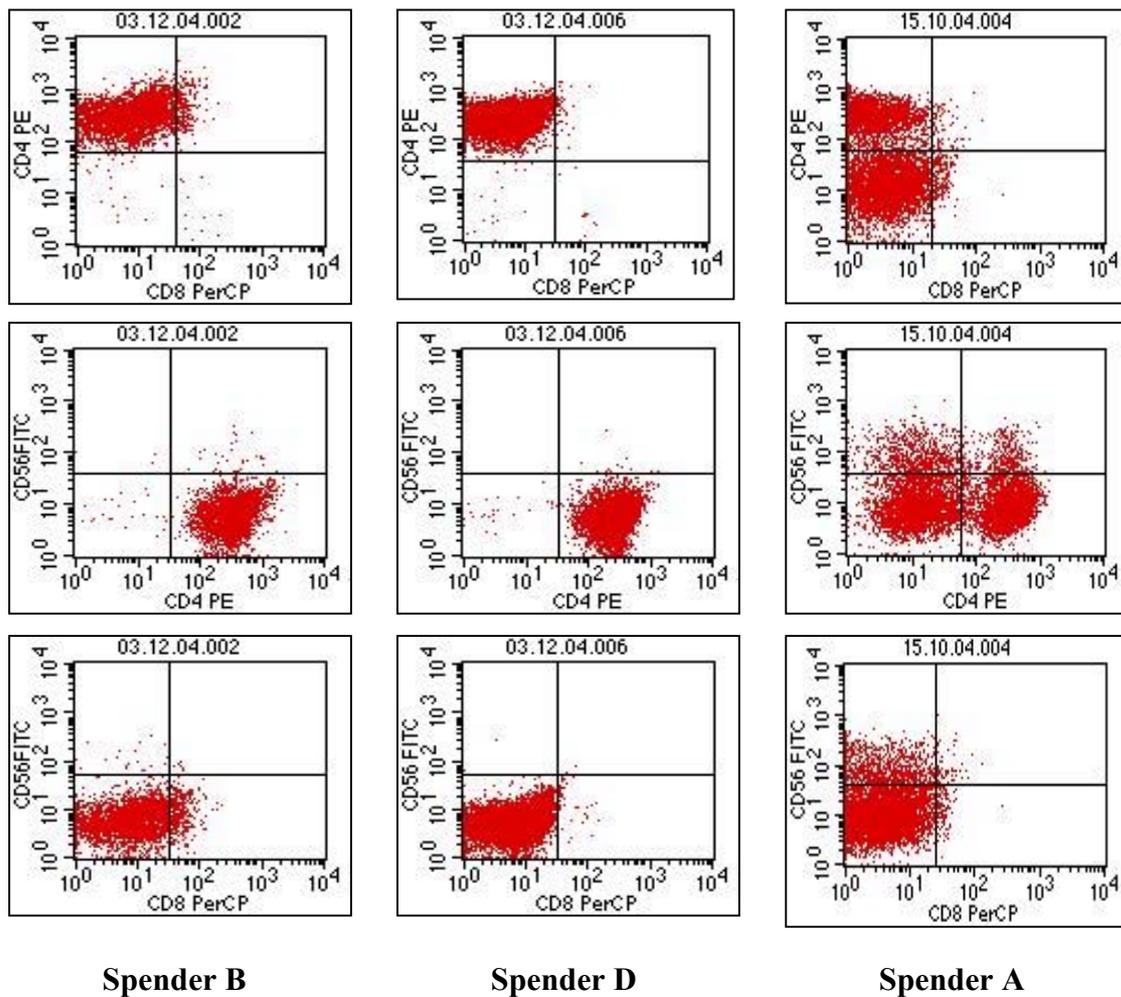


Abb. 4-16: Phänotypisierung VZV-spezifischer T-Zellkulturen. Die mittels VZV-Lysat stimulierten Zelllinien wurden durchflusszytometrisch auf die Expression der Oberflächenmarker CD4 (-PE), CD8 (-PerCP) sowie CD56 (-FITC) untersucht. Für die Spender B und D sind repräsentative Messungen dargestellt. Sie zeigen einen CD4+ dominierten Phänotyp. Für Spender A wurden die CD4-/CD8- Populationen als TCR $\gamma\delta$ -T-Zellen identifiziert.

Im Laufe der Expansion wurde die Entwicklung des zellulären Phänotyps durch wöchentliche Analyse der Oberflächenmarker CD3, CD4, CD8, CD56 und TCR $\gamma\delta$ dokumentiert. Dabei zeigte sich – in Abb. 4-17 für 2 Spender exemplarisch dargestellt - eine klare Entwicklung hin zum CD3+/CD4+ Phänotyp, begleitet von einer Abnahme der CD8+ und CD56+ Populationen. Für einen Spender (Abb. 4-17 B) konnte auch hier eine deutliche Zunahme TCR $\gamma\delta$ -positiver Zellen nachgewiesen werden. Für alle anderen Spender (Abb. 4-17 A) ergab sich spätestens bis zur 5. Stimulation eine fast reine CD4+ Kultur durch die Differenzierung und Selektion der Zellen.

B

A

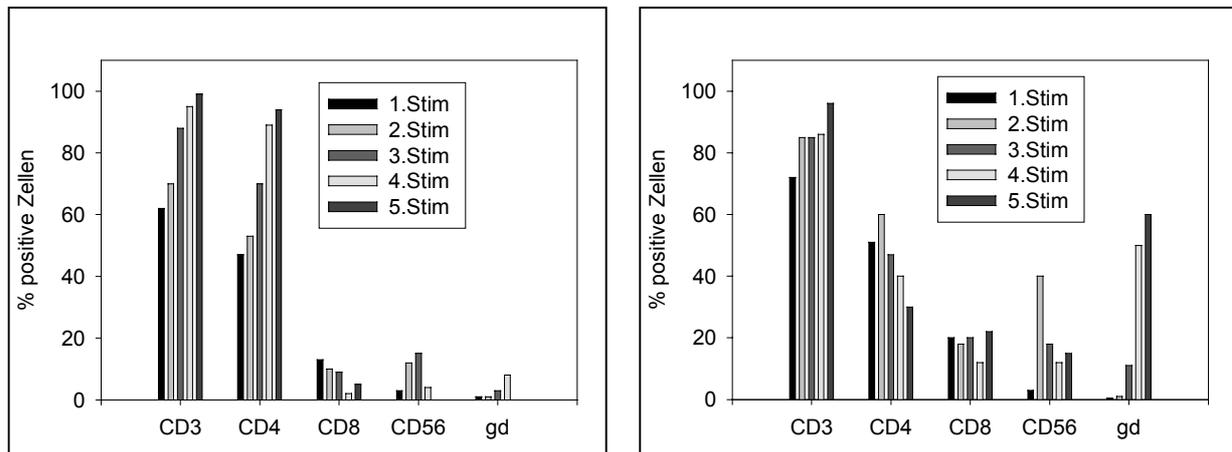


Abb. 4-17: Entwicklung zum CD3+/CD4+ Phänotyp im zeitlichen Verlauf. Dargestellt ist die Zunahme CD3+/CD4+ T-Zellen im Verlauf der ersten fünf Stimulationen in Prozent positiver Zellen. Analysiert wurden die Zellen durch die wöchentliche durchflusszytometrische Analyse anhand der Oberflächenmarker CD3, CD4, CD8, CD56 sowie $\gamma\delta$ -T-Zellen. Es zeigt sich eine prozentuale Zunahme CD3+/CD4+ Zellen für 3 verschiedene Spender, hier repräsentativ dargestellt für Spender B. Für Spender A zeigte sich wiederum die stete Zunahme $\gamma\delta$ + T-Zellen.

4.3.3 Expandierte VZV-CTL zeigen einen CD25+, CD27-, CD28+ Phänotyp

Die Differenzierung naiver T-Zellen zu spezifischen Effektor- oder Gedächtniszellen lässt sich durch die Expression verschiedener Oberflächenmarker gut dokumentieren. Um die Population der generierten VZV-CTL im Rahmen der T-Zell-Differenzierung einzuordnen, wurde daher die Oberflächenexpression der Differenzierungsantigene CD25, CD27, CD28, CD45RA, CD45RO durchflusszytometrisch analysiert.

CD25 wird üblicherweise auf aktivierten T- und B-Zellen exprimiert. Funktionell ist CD25 als α -Kette des IL-2-Rezeptors in der Lage mit der γ -Kette des IL-2R zu assoziieren. CD27 ist ein Glykoprotein und ein Mediator der Lymphozyten-Differenzierung und Expansion. CD27 wird üblicherweise auf naiven T-Zellen exprimiert, im Laufe der Differenzierung auf aktivierten, ausdifferenzierten T-Zellen dann aber herunterreguliert. CD28 wird als kostimulatorischer Rezeptor auf TCR- $\alpha\beta$ sowie TCR- $\gamma\delta$ T-Zellen exprimiert. Durch Bindung an seine Liganden CD80 und CD86 wird ein zweites, für die Aktivierung der T-Zelle essentielles, Signal in die Zelle weitergegeben, so dass eine vollständige Aktivierung stattfindet. CD28 gilt daher auch als typischer Aktivierungsmarker für CD8+ und CD4+ T-Zellen. CD45 wiederum kennzeichnet eine Tyrosin-Phosphatase, welche in verschiedene Subtypen klassifiziert wird. CD45RA wird auf naiven T-Zellen vom CD4+ oder CD8+-Phänotyp exprimiert, CD45RO dagegen ist in der frühen T-Zell-Differenzierung nur in geringer Dichte präsent und gilt als typischer Oberflächenmarker der Gedächtnis-T-Zellen. Durch Aktivierung naiver T-Zellen kommt es zunächst zur einer vermehrten Expression an CD45RO, bevor CD45RA

herunterreguliert wird. Als früher Aktivierungsmarker gilt CD69, der auf aktivierten T-, B- und NK-Zellen sowie Makrophagen in hohem Maße exprimiert wird.

Wie in Abb. 4-18 dargestellt, fand sich für die VZV-spezifischen T-Zellen eine klare Differenzierung der Zellen von einem CD25-/CD27+/CD28±/CD45RO± Phänotyp zu einer CD25+/CD27-/CD28+/CD45RO+/CD69+ Population mit aktiviertem Profil. Aufgezeigt ist neben der Auftragung positiv gefärbter Zellen in der FACS-Analyse im Vergleich der einzelnen Stimulationen auch die Darstellung der Einzelfärbungen nach der 5. Stimulation. Mit der Aktivierung der Zellen einhergehend wurde die Expression von CD25, CD28 sowie CD45RO und CD69 hochreguliert. Die generierten VZV-CTL sind daher einem Effektor-Memory-Phänotyp zuzuordnen.

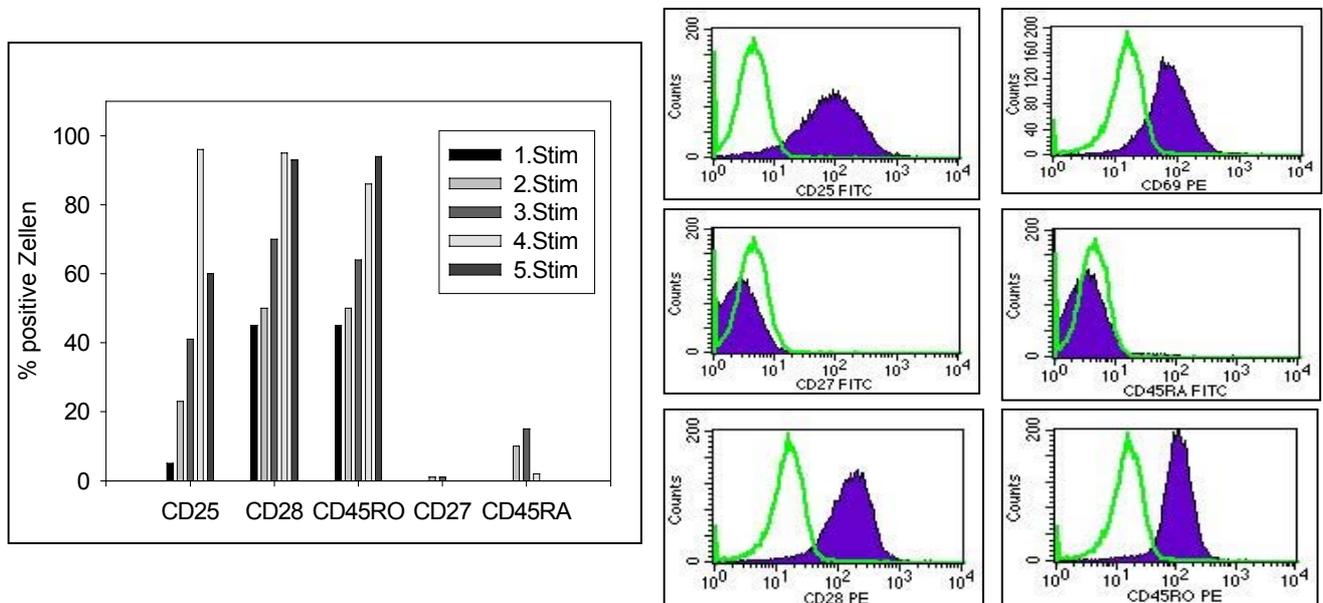


Abb.4-18: Entwicklung des Differenzierungs-Phänotyps VZV-spezifischer CTL durch die wöchentliche Stimulation. Dargestellt ist die Zunahme der Expression der Oberflächenmarker CD25, CD28 sowie CD45RO. Untersucht wurde die Expression der CD-Antigen in der durchflusszytometrischen Färbung mittels CD25-, CD27-, CD28, und CD45-spezifischer Antikörper, aufgetragen nach % positiver Zellen (links). Nach der 5.Stimulation war grundsätzlich der differenzierte Phäntyp der VZV-CTL erreicht, dargestellt rechts für einen repräsentativen Spender für die untersuchten Oberflächenantigene CD25, CD27, CD28, CD45RA und CD45RO. Der Shift der gefärbten Zellen (violett) im Vergleich mit der Isotypkontrolle (grün) zeigt dabei einen CD25+/CD69+/CD27-/CD45RA- sowie CD28+ und CD45RO+ Phänotyp.

4.4 Retroviral transduzierte VZV-CTL exprimieren chimäre Rezeptoren auf der Zelloberfläche

Die Transduktion polyklonaler T-Zellen mit chimären Rezeptoren führt durch die stabile Expression der Rezeptoren zu tumorspezifischen Effektorfunktionen. In dieser Arbeit wurden VZV-CTL mit verschiedenen tumorspezifischen chimären Rezeptoren transduziert und die Rezeptoren stabil zur Expression gebracht. Dabei handelt es sich um 14.G2a ζ , 14.G2aCD28 ζ und CD19 ζ . 14.G2a ζ wurde als Fusion des tumorspezifischen monoklonalen Antikörpers 14.G2a (Frost *et al*, 1997) mit der ζ -Kette des TCR in kloniert und bereits *in vitro* in polyklonalen PBMCs (Rossig *et al*, 2001) und EBV-CTL (Rossig *et al*, 2002) erfolgreich exprimiert. 14.G2aCD28 ζ ist die modifizierte Form des 14.G2a ζ , ergänzt durch die zytoplasmatische und Transmembrandomäne des Kostimulators CD28. Mit Hilfe des CD28 soll die Effektivität der Signaltransduktion in den transduzierten Zellen verstärkt werden. Beide Rezeptoren erkennen spezifisch das Gangliosidantigen G_{D2} auf der Oberfläche von z.B. Neuroblastomen. Gegen CD19, in hohem Maße exprimiert auf der Oberfläche maligner B-Zellen, richtet sich der chRec CD19 ζ . Er kombiniert die tumorspezifischen Eigenschaften des Hybridomantikörpers FMC63 (Zola H, 1991) mit der ζ -Kette des CD3 Komplexes.

Um VZV-CTL erfolgreich mit den chimären Rezeptoren auszustatten und eine gute Transduktionseffizienz zu gewährleisten, wurde zunächst der optimale Transduktionszeitpunkt für eine maximale Expressionsrate des Transgens gesucht.

4.4.1 Ermittlung des optimalen Transduktionszeitpunktes

Die retrovirale Transduktion erfordert die Proliferation der betreffenden Zellen zum Zeitpunkt der Transduktion. Daher wurden die Zellen prästimuliert und zu verschiedenen Stimulationszeitpunkten mit SFG/EGFP als Reportergen transduziert. Wie in Tabelle 4-IV zusammengefasst, zeigte sich, dass VZV-CTL die stärkste Proliferation (3,5x) nach der 3. Stimulation bei einer guten Transduktionseffizienz (28-45%) zeigten. Für alle folgenden Experimente wurden die VZV-CTL daher einen Tag nach der dritten Stimulation transduziert.

Tabelle 4-IV: Proliferation und Transduktionseffizienzen nach 1.-5- Stimulation:

Stimulation	Proliferationsrate	Transduktionseffizienz
1.	1,2x	-
2.	1,8x	26%
3.	3,5x	28-45%
4.	2,35x	16-44%
5.	2,4x	34-35%

4.4.2 Transduktion mit 14.G2a ζ , 14.G2aCD28 ζ und CD19 ζ

Für die Transduktion verschiedener VZV-CTL Linien mit dem chimären Rezeptor 14.G2a ζ wurde eine Transduktionseffizienz von bis zu 71% [46 \pm 13%] erreicht. Diese wurde durch die Oberflächenfärbung mit dem 14.G2a-spezifischen Antiidiotyp-Antikörper 1A7 ermittelt. Für die Transduktion mit 14.G2aCD28 ζ war sogar eine Effizienz von bis zu 86% [55 \pm 15%] nachweisbar. In Abb. 4-19 dargestellt ist ein Beispiel einer transduzierten VZV-CTL-Linie nach Antikörperfärbung mit 1A7. Die stabile Expression der chimären Rezeptoren auch nach längerfristiger Kultivierung der Zellen wurde durch eine wiederholte Färbung der Zellen mit 1A7 bestätigt.

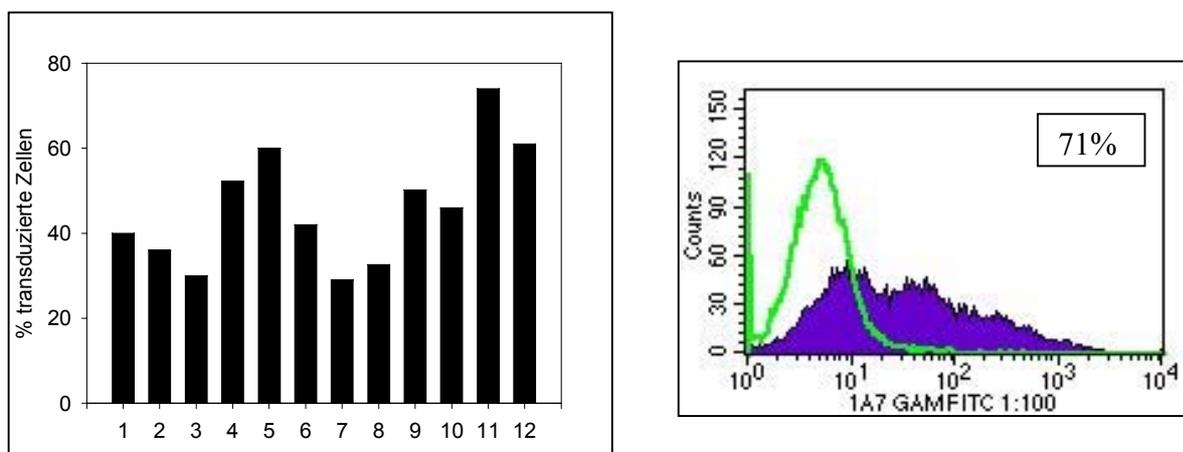


Abb. 4-19: Transduktionseffizienzen VZV-spezifischer CTL nach retroviralem Transfer von 14.G2a ζ . Gezeigt sind typische Transduktionseffizienzen für verschiedene Zelllinien (1-12). Die Effizienz der Transduktion wurde quantifiziert durch die durchflusszytometrische Analyse transduzierter CTL nach Färbung mit dem 14.G2a-spezifischen Antiidiotyp-Antikörper 1A7. Die maximal erreichte Effizienz wurde mit 71% 1A7-positiver Zellen (violett) im Vergleich mit der Isotypkontrolle (grün) erreicht (rechts).

Für die Untersuchung der Transduktionseffizienz CD19 ζ modifizierter Zellen stand ein anti-Maus-Fab-Cy5 Antikörper zur Verfügung, mit dem eine Oberflächenexpression von 39% und 45% auf zwei CD19 ζ -transduzierten Zelllinien ermittelt wurde.

4.4.3 Transduzierte und nicht-transduzierte VZV-CTL unterscheiden sich nicht im Phänotyp

Um auszuschließen, dass durch das Einbringen des chRec eine Veränderung der Zellen induziert wird, wurden transduzierte und nicht-transduzierte Zellen durchflusszytometrisch hinsichtlich der Expression von CD3, CD4, CD8 und CD56 verglichen. Wie Tabelle 4-V darstellt, ergab sich kein Unterschied in der Expression der verschiedenen Oberflächenmarker.

Tabelle 4-V: Vergleich der Immunphänotypen transduzierter und nicht-transduzierter VZV-CTL

Spender	Oberflächenmarker	nicht-transduzierte positive Zellen	transduzierte Zellen positive Zellen
A	CD3+/CD4+	67%	70%
	CD3+/CD8+	13%	20%
	CD3-/CD56+	2%	2%
B	CD3+/CD4+	97%	93%
	CD3+/CD8+	2,5%	6%
	CD3-/CD56+	0,5%	0,5%
D	CD3+/CD4+	90%	89%
	CD3+/CD8+	8%	9%
	CD3-/CD56+	2%	2%

4.4.4 Transduzierte und nicht-transduzierte VZV-CTL unterscheiden sich kaum in ihrem Expansionsverhalten

Um sicherzustellen, dass die retrovirale Transduktion zudem keinen Einfluss auf das Expansionsverhalten der Zellen nimmt, wurde die Expansion 14.G2aζ-, 14.G2aCD28ζ- und nicht-transduzierter CTL verglichen. Dabei zeigte sich, dass die transduzierten Zellen lediglich kurz nach der Transduktion etwas schlechter proliferierten, etwa 10 Tage nach der Transduktion aber wieder die übliche zwei- bis dreifache Expansion pro Woche erreichten. Sie waren damit vergleichbar mit den nicht-transduzierten CTL, so dass davon auszugehen ist, dass die Transduktion keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der CTL nach Stimulation über den nativen TCR ausübt. 14.G2aCD28ζ-transduzierte VZV-CTL expandierten geringfügig besser als 14.G2aζ-transduzierte. Weiterhin verblieben die 14.G2aCD28ζ-transduzierten CTL trotz fehlender Stimulation länger in einem aktivierten Zustand (CD25+/CD69+).

4.5 Transduzierte VZV-CTL lysieren spezifisch Tumorzellen

Eine typische Effektorfunktion aktivierter T-Zellen ist ihre Zytotoxizität. Um die Funktionalität der transduzierten Lymphozyten besonders in Hinsicht auf eine spezifische Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen zu untersuchen, wurden transduzierte und nicht-transduzierte Zellen in verschiedenen Ansätzen verglichen.

4.5.1 Chrom-Freisetzungsversuche

Im klassischen $^{51}\text{Chrom}$ -Assay werden Zielzellen wie z.B. Tumorzellen durch die Inkorporation radioaktiven Chroms markiert und anschließend durch Koinkubation mit Effektorzellen lysiert. Das aus den markierten Zellen ins Medium freigesetzte Chrom kann dann als Maß der Zielzellyse anerkannt werden und bietet so eine Möglichkeit, die Zytotoxizität von Zellpopulationen zu quantifizieren. Nicht-transduzierte und 14.G2a ζ -, 14.G2aCD28 ζ - oder CD19 ζ -transduzierte Effektorzellen wurden mit verschiedenen Tumorzelllinien koinkubiert und die spezifische Zielzellyse bestimmt (Die Arbeiten mit 14.G2aCD28 ζ wurden dabei in Zusammenarbeit mit Verena Niggemeier durchgeführt). Trotz des CD4+ dominierten Phänotyps der Kulturen ergab sich eine spezifische Zytotoxizität transduzierter Zellen gegen antigenpositive Tumorzelllinien. Wie in Abb. 4-19 gezeigt, wurden die Neuroblastom-Zelllinien Lan-1 und JF ausschließlich von 14.G2a ζ - oder 14.G2aCD28 ζ -transduzierten VZV-CTL lysiert. Nicht-transduzierte Zellen zeigten keine zytotoxische Aktivität. Weiterhin wurde auch K-562, eine Zelllinie, die typischerweise von NK-Zellen erkannt wird, nicht lysiert. Für CD19 ζ modifizierte VZV-CTL fand sich ebenfalls eine spezifische Lyse der CD19+ Zelllinie Reh sowie CD19+ LCL ohne Hintergrund durch nicht-transduzierte Zellen oder gegen K-562. Lediglich für einige Linien eines einzelnen Spenders konnte keine spezifische Zytotoxizität gegenüber antigen-positiven Tumorzellen nachgewiesen werden. Für alle anderen Spender konnte die spezifische Lyse antigenpositiver Tumorzellen wiederholt reproduziert werden. Der Nachweis der zytotoxischen Eigenschaften generierter Linien erfolgte üblicherweise mit fünf bis sechsmal stimulierten CTL. Die lytischen Fähigkeiten blieben aber auch nach wiederholter Stimulation erhalten, was sich daran zeigte, dass auch zehn- oder elfmal stimulierte VZV-CTL weiterhin eine spezifische Zytotoxizität aufwiesen.

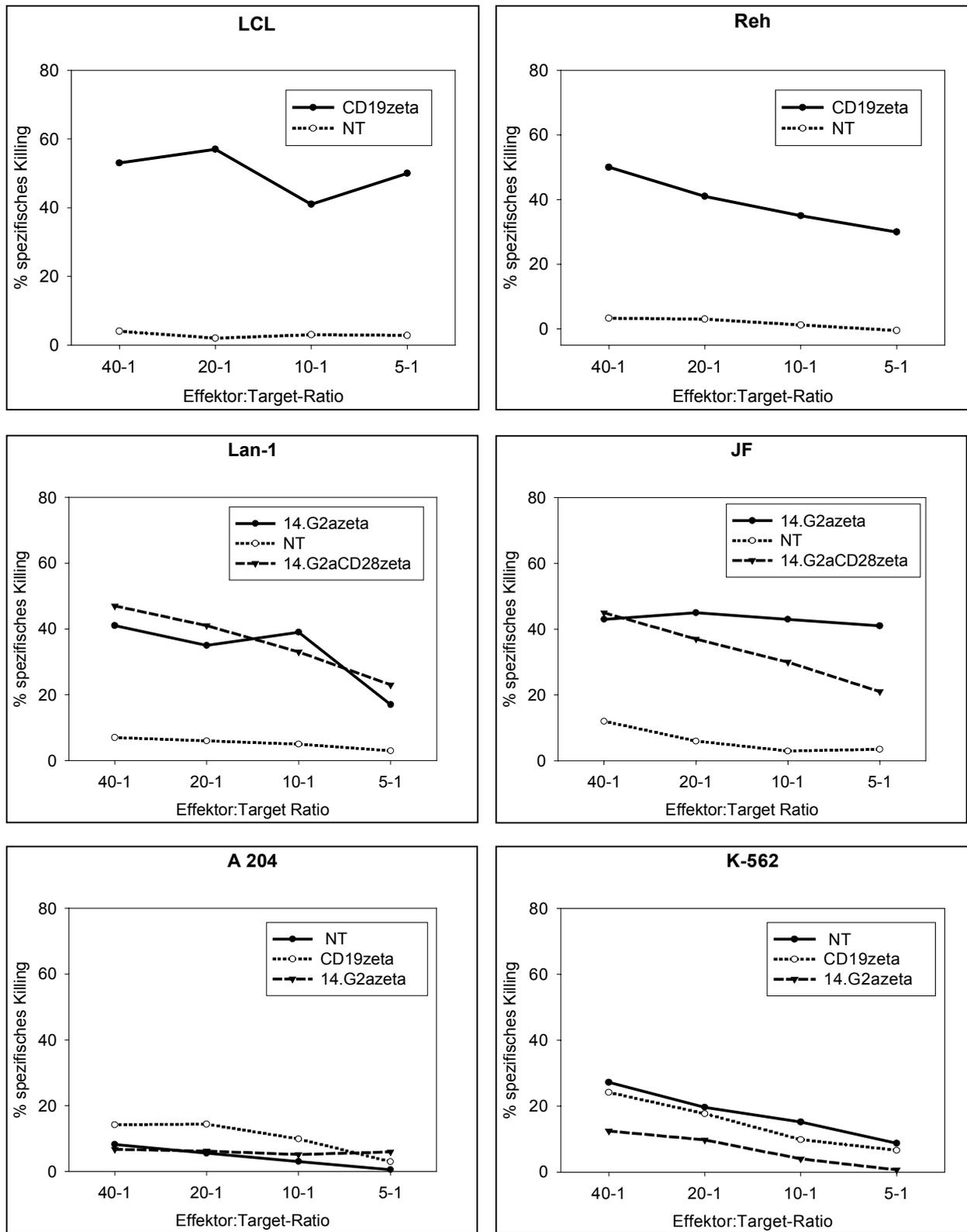


Abb. 4-19: Analyse der zytotoxischen Eigenschaften VZV-spezifischer T-Zellen im ⁵¹Chrom-Release-Assay. Nach Markierung der Tumorzellen mit ⁵¹Chrom wurden diese für 4h mit VZV-CTL in Effektor:Target Ratios von 40:1 bis 5:1 kokultiviert. Als Tumorzellen wurden G_{D2}⁺ Linien Lan-1 und JF, als CD19⁺ Linien LCL und Reh eingesetzt. A204 ist als Rhabdomyosarkom G_{D2}⁻ und CD19⁻, K-562 fehlt die Expression von MHC-I und -II und stellt damit ein typisches NK-Zelltarget dar. Transduzierte VZV-CTL sind in der Lage – im Gegensatz zu nicht-transduzierten VZV-CTL – antigenpositive Tumorzellen spezifisch zu lysieren.

Tab. 4-VI: Zytotoxizität der transduzierten VZV-CTL gegen verschiedene Tumorzelllinien bei einer Effektor:Target-Ratio von 40:1.

CD19-positive Tumorzellen

Transgen	Tumortarget	spez. Killing Spender A	spez. Killing Spender C	spez. Killing Spender D
CD19ζ	Reh	55%	47%	50%
NT	Reh	5%	7%	2%
CD19ζ	LCL	65%	n.b.	n.b.
NT	LCL	20%	n.b.	n.b.
CD19ζ	Raji	n.b.	n.b.	n.b.
NT	Raji	n.b.	n.b.	n.b.

n.b. = nicht bestimmt

G_{D2}-positive Tumorzellen

Transgen	Tumortarget	spez. Killing Spender A	spez. Killing Spender B	spez. Killing Spender C	spez. Killing Spender D
14.G2aζ	Lan-1	50%	10%	41%	43%
14.G2aCD28ζ	Lan-1	n.b.	n.b.	46%	46%
NT	Lan-1	8%	0-5%	4%	3%
14.G2aζ	JF	45%	2%	32%	33%
14.G2aCD28ζ	JF	n.b.	n.b.	45%	35%
NT	JF	12%	2%	3%	2%

n.b. = nicht bestimmt

4.5.2 Langzeit-Koinkubationsversuch

Im klassischen Chrom-Freisetzungsversuch werden Effektor- und Zielzellen lediglich für 4h miteinander koinkubiert, bevor die Freisetzung des Chroms ins Medium detektiert wird. Um die zytotoxischen Effektorfunktionen auch für einen längeren Zeitraum zu dokumentieren, wurden transduzierte und nicht-transduzierte VZV-CTL mit antigenpositiven oder –negativen Tumorzelllinien koinkubiert und die Vitalität der Tumorzellen durchflusszytometrisch nach 24h, 48h, 72h und einer Woche jeweils nach Anfärbung mit einem spezifischen Antikörper analysiert. Wie in Abb. 4-20 dargestellt, zeigte sich eine deutliche Abnahme vitaler Tumorzellen durch die Koinkubation mit transduzierten VZV-CTL. In der Inkubation mit nicht-transduzierten VZV-CTL überwuchsen die Tumorzellen die Kulturen. Dies unterstützt die Annahme, dass die generierten Kulturen in der Lage sind, effizient Tumorzellen zu erkennen und kontrollieren.

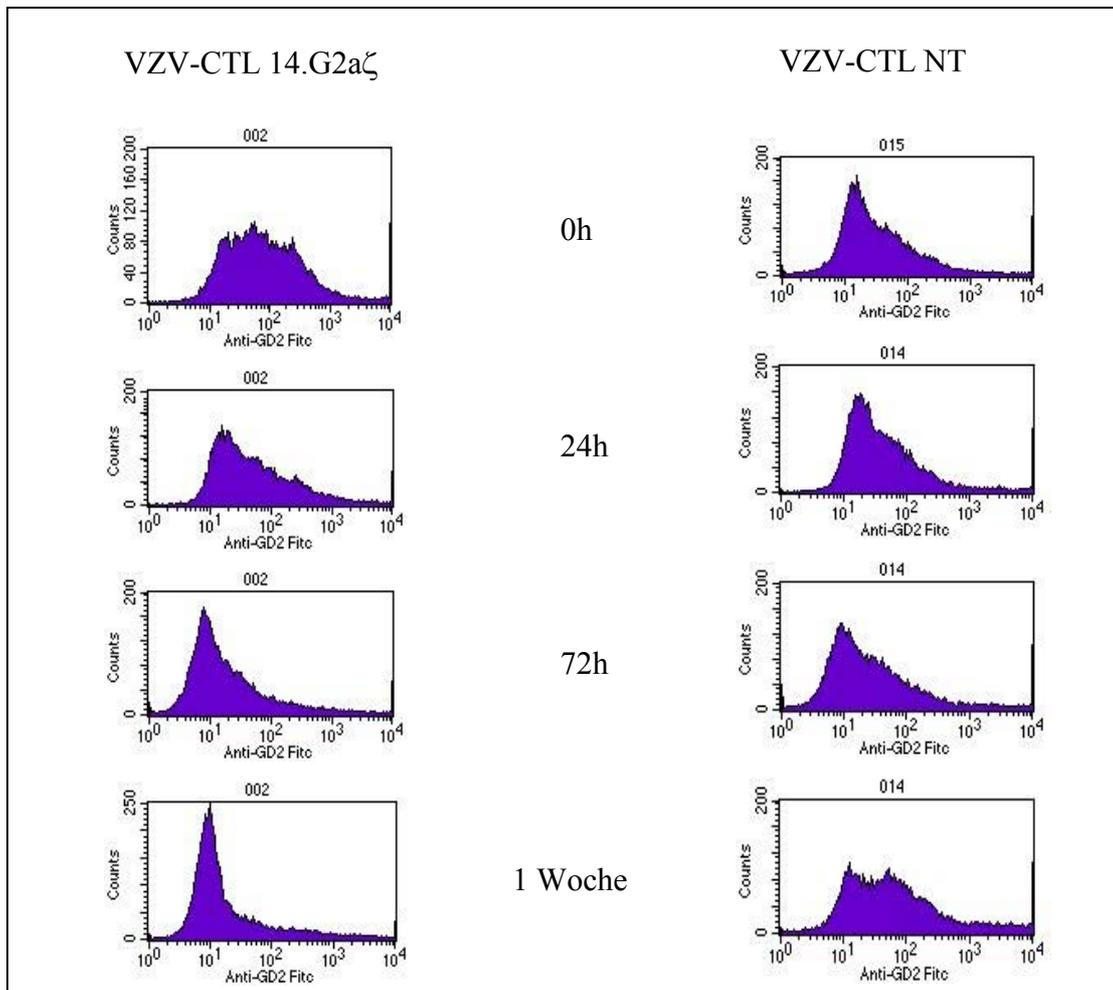


Abb. 4-20: Untersuchung der Zytotoxizität VZV-spezifischer CTL in der Langzeitkoinkubation. Nach Koinkubation antigenpositiver Tumorzellen mit 14.G2a ζ -transduzierten oder nicht-transduzierten (NT) VZV-CTL wurde mittels FACS-Analyse die Vitalität der Tumorzellen bestimmt. Die Messung erfolgte nach 0h, 24h, 48h, 72h und einer Woche mittels eines G_{D2}-spezifischen Antikörpers. Ausschließlich 14.G2a ζ -transduzierte CTL waren in der Lage, G_{D2}⁺ Tumorzellen zu lysieren. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von drei.

4.5.3 Zielzellyse über den chRec ist MHC-unabhängig

Die Antigenerkennung chimärer Rezeptoren basiert auf der Bindung der tumorantigen-spezifischen Anteile monoklonaler Antikörper und ist damit unabhängig von der Antigenpräsentation durch MHC/Peptid-Komplexe der Zielzellen. In Blockierungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass auch die antigenspezifische Lyse der Tumorzellen durch VZV-CTL MHC-unabhängig funktioniert. Dazu wurden die Zielzellen im Chrom-Assay mit blockierenden Antikörpern gegen MHC-I, MHC-II, G_{D2} (1A7) oder CD19 vorinkubiert und die Lyse dieser Zellen mit nicht behandelten Zielzellen verglichen. Um das Maß der Inhibition zu beurteilen, wurde die maximale Lyse der Zielzellen durch VZV-CTL ohne den Zusatz eines Antikörpers dabei auf 100% gesetzt und mit den Antikörperkoinkubationen verglichen. Wie in Abb. 4-21 gezeigt, wurde die Lyse der Zielzellen durch die Inkubation mit MHC-I oder MHC-II Antikörpern nicht reduziert. Durch Inkubation mit 1A7 oder CD19 hingegen war eine deutliche Inhibition der Zielzellyse für

14.G2aζ oder CD19ζ-transduzierte VZV-CTL zu beobachten. Die Antigenerkennung funktioniert demnach auch in VZV-CTL unabhängig von einer Präsentation durch MHC-Moleküle und spezifisch für die einzelnen Antigene.

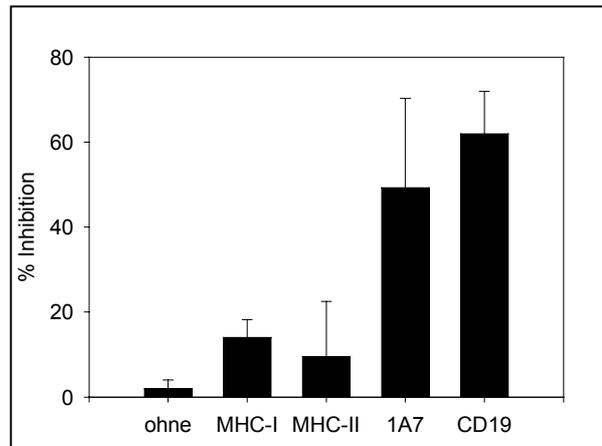


Abb. 4-21: Blockierung der spezifischen Zytotoxizität durch Zugabe G_{D2}-spezifischer Antikörper. Vor Koinkubation von VZV-CTL und Tumorzellen wurde im ⁵¹Cr-Release-Assay eine Inkubation der Tumorzellen mit entweder α-MHC-I, α-MHC-II, 1A7 oder α-CD19 Antikörper durchgeführt. Eine Inhibition der Zielzellyse wurde ausschließlich mit der Zugabe von 1A7 zu 14.G2aζ- oder CD19-spezifischem Antikörper bei CD19ζ-transduzierten VZV-CTL erreicht.

Wie in Abb. 4-22 zusammenfassend dargestellt, sind die generierten VZV-CTL in der Lage, sowohl MHC-vermittelt VZV-exprimierende Zellen, als auch MHC-unabhängig antigenpositive Tumorzellen spezifisch zu erkennen.

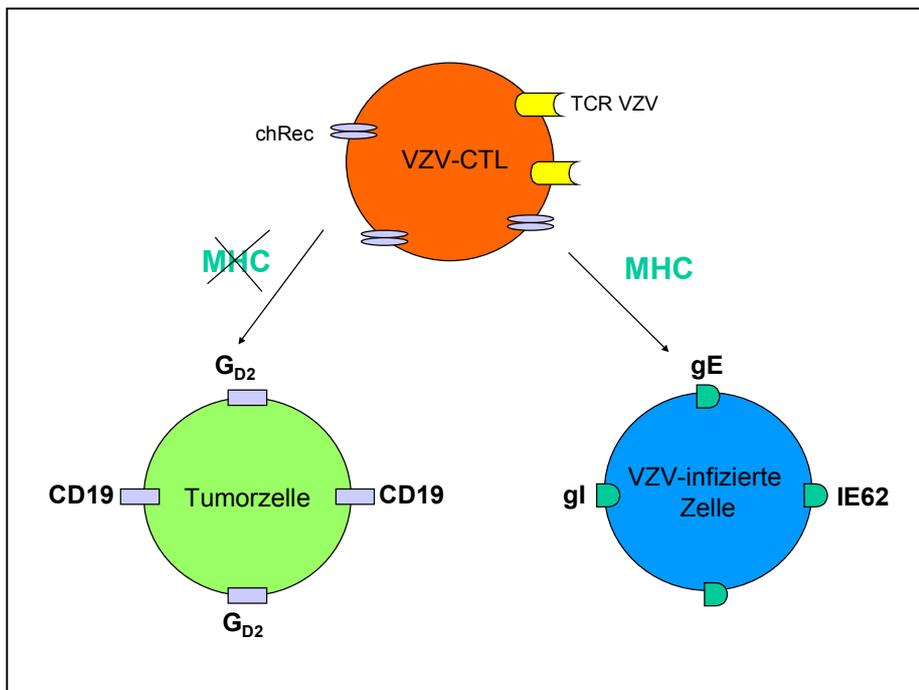


Abb. 4-22: Schematische Darstellung der Bispezifität chRec modifizierter VZV-spezifischer CTL. Die dargestellten VZV-CTL (orange) sind in der Lage, zum einen MHC-abhängig VZV-infizierte Zellen (blau) zu erkennen. Darüber hinaus sind sie durch die Expression chRec dazu befähigt, MHC-unabhängig antigenpositive Tumorzellen (grün) zu erkennen und lysieren.

4.6 Über welchen Mechanismus lysieren CD4+ VZV-CTL ihre Zielzellen?

Als typische Mechanismen, über die Zielzellen lysiert werden, sind sowohl für CD8+ CTL als auch für CD4+ CTL der Perforin/Granzym-Weg oder die Interaktion über Fas-FasL bekannt. Wie in 2.4 bereits dargestellt, wurde für CD4+, zytolytisch aktive Zellen bislang hauptsächlich Perforin/Granzym als verantwortlicher Mechanismus diskutiert, für einige CD4+-CTL konnte aber auch die Interaktion über Fas/FasL nachgewiesen werden. Um die generierten VZV-CTL hinsichtlich ihrer Funktionalität näher zu charakterisieren, wurde der Mechanismus der Zielzelllyse ermittelt.

4.6.1 VZV-CTL exprimieren kein Perforin

Mit Hilfe einer intrazellulären Färbung gegen das permeabilisierende Protein Perforin wurde untersucht, ob der Perforin/Granzym-Weg den verantwortlichen Mechanismus für die Zytotoxizität der Zellen darstellt. Wie in Abb. 4-23 dargestellt, konnte für die VZV-CTL kein intrazelluläres Perforin nachgewiesen werden. Eine Lyse der Zellen mittels Perforin und der zytotoxischen Granula Granzym A oder B konnte somit ausgeschlossen werden.

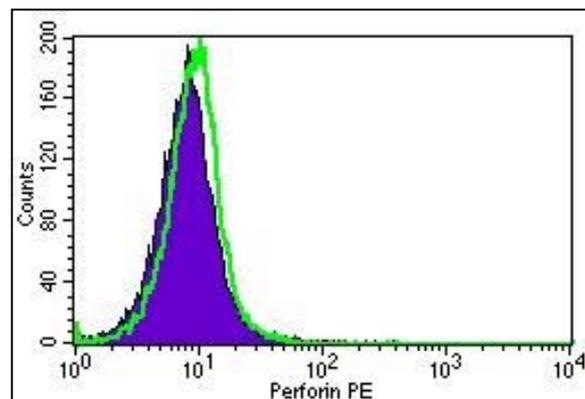


Abb. 4-23: Intrazelluläre Färbung VZV-spezifischer T-Zellen hinsichtlich der Expression von Perforin. VZV-CTL von fünf verschiedenen Spendern wurden mittels einer intrazellulären Färbung auf die Expression des zytolytischen Proteins Perforin untersucht. Keine der getesteten Linien zeigte eine Expression an Perforin (violett), verglichen mit der Isotypkontrolle (grün), hier gezeigt für Spender B.

4.6.2 Tumorzellen exprimieren kein Fas

Die Induktion von Apoptose über Fas/FasL erfordert die Interaktion Fas-positiver Zielzellen mit dem FasL, der konstitutiv auf der Oberfläche von aktivierten T-Zellen exprimiert wird. Durch die Oberflächenfärbung der im Chrom-Assay verwendeten Tumorzelllinien zeigte sich, dass auch dieser Mechanismus für die beobachtete Tumorzelllyse nicht verantwortlich sein kann, da keine der getesteten Linien Fas (CD95) exprimierte (Abb. 4-24).

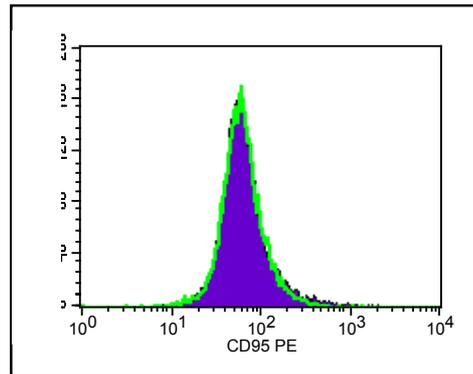


Abb. 4-24. Oberflächenfärbung hinsichtlich der Expression von Fas (CD95). Alle im Zytotoxizitäts-Assay eingesetzten Tumorzelllinien wurden auf ihre CD95-Expression durchflusszytometrisch untersucht. Wie hier für Lan-1 gezeigt, konnte auf keiner der Linien die Expression von CD95 nachgewiesen werden.

4.6.3 VZV-CTL nutzen Granulysin als Killing-Mechanismus

Alternativ zur Expression von Perforin wurde Granulysin als möglicher Mechanismus einer zytolytischen Aktivität beschrieben (Stenger *et al*, 1998). Granulysin erwies sich als antiviraler Mediator gegen Varicella-Zoster-Virus infizierte Fibroblasten (Hata *et al*, 2001). Darüber hinaus wurde die Sekretion von Granulysin als verantwortlicher Mechanismus der Zytolyse EBV-spezifischer CD4⁺ CTL beschrieben (Sun *et al*, 2002). Wir untersuchten daher die generierten VZV-CTL auf die Expression von Granulysin. Zunächst konnte durch Blockierungsexperimente mit Brefeldin A (BFA) und Concanamycin A (ConA) bestätigt werden, dass die Zytolyse der Zielzellen über Granula-Exozytose vermittelt wurde. Wie in Abb. 4-25 gezeigt, wurde die spezifische Lyse der Zielzellen durch die Inkubation mit dem intrazellulären Sekretionshemmer BFA um 44% herabgesetzt. Durch Con A wird die Exozytose-vermittelte Zytolyse inhibiert. Die Koinkubation der VZV-CTL im Chrom-Assay mit ConA erbrachte eine starke Inhibition (66%) der Tumorzelllyse durch die Zugabe von Con A.

Neben den Blockierungsexperimenten wurden die Zellen mit einem spezifischen Antikörper gegen Granulysin (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Alan M. Krensky, Stanford, USA) durchflusszytometrisch analysiert. Dabei zeigte sich in der intrazellulären Färbung, dass die Zellen Granulysin in hohem Maße exprimierten. Wie in Abb. 4-26 gezeigt, enthält dabei auch die CD4⁺ Population Granulysin.

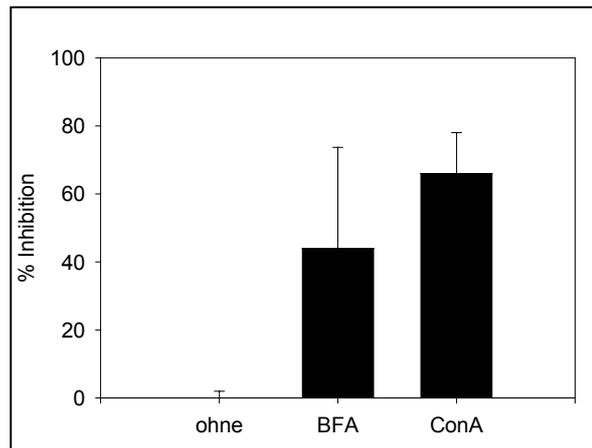


Abb. 4-25: Blockierung der spezifischen Zytotoxizität durch Brefeldin A (BFA) oder Concanamycin A (Con A). Die spezifische Lyse ⁵¹Cr-markierter Tumorzellen wurde analysiert im Vergleich mit BFA- oder Con A präinkubierten Tumorzellen. Die Inhibition der Zytolyse wurde anschließend im Vergleich mit Ansätzen ohne Zusätze verglichen. Dargestellt ist die prozentuale Inhibition der Lyse. Durch die Zugabe von BFA wurde die Zellyse um 44% reduziert, durch die Addition von Con A hingegen eine 65%-ige Inhibition erreicht.

Die Inhibition der Tumorzellyse durch Zugabe des α -Granulysin-Antikörpers im Chrom-Assay bestätigte Granulysin als mitverantwortlichen Mechanismus für die zytotoxischen Eigenschaften der generierten VZV-CTL (Abb. 4-27). Obschon die Blockierung über den α -Granulysin-Antikörper nicht zu einer kompletten Inhibition der Zytolyse führt, wird die Lyse der Zielzellen dennoch um 34% reduziert. Dies erklärt sich möglicherweise durch ein unzureichendes blockierendes Potential des eingesetzten Antikörpers.

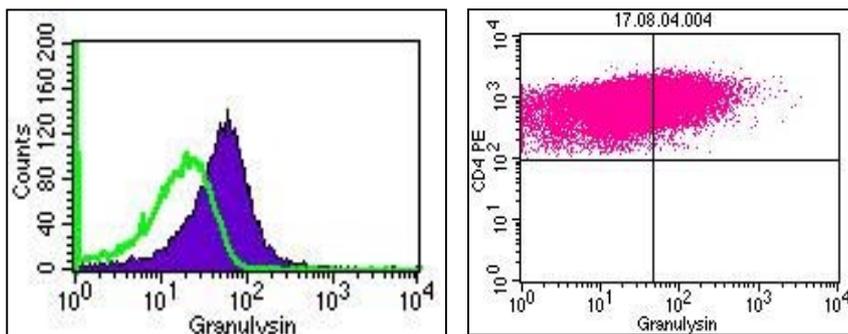


Abb. 4-26: Intrazelluläre Färbung VZV-spezifischer T-Zellen mit dem Granulysin-spezifischen Antikörper DH4. Nach Färbung des Oberflächenantigens CD4 (PE-markiert) wurden die CTL permeabilisiert und intrazelluläres Granulysin detektiert. Im Histogramm (links) zeigt sich ein klarer Shift der Granulysin-positiven Zellen (violett) im Vergleich mit der Isokontrolle (grün). Im DotBlot zeigt sich zusätzlich, dass Granulysin von den CD4+ T-Zellen exprimiert wird (rechts, oberer rechter Quadrant).

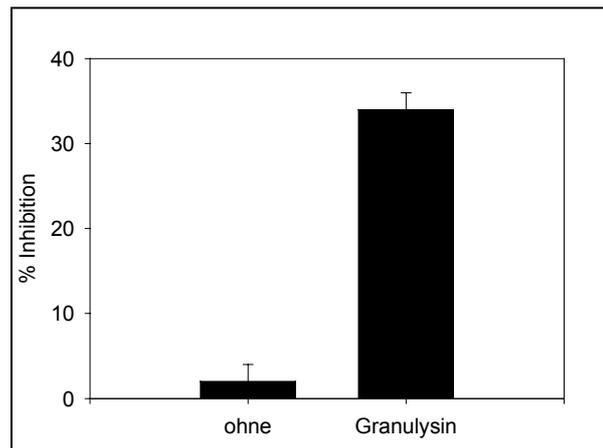


Abb. 4-27: Blockierung der spezifischen Zytotoxizität durch die Zugabe des anti-Granulysin-Antikörpers DH4. Tumorzellen wurden im Standard-4h-Chrom-Release-Assay durch die Zugabe von a-Granulysin-Antikörper präinkubiert und anschließend mit VZV-CTL koinkubiert. Die Inhibition des spezifischen Killings wurde verglichen mit Ansätzen ohne Antikörperzugabe. Dabei zeigt sich eine Reduktion von 34%.

4.7 VZV-CTL sezernieren IFN- γ und IL-4, aber kaum IL-10

Neben der Zytotoxizität beruht eine wesentliche Funktion aktivierter T-Zellen in der spezifischen Sekretion von Zytokinen. Für CD4⁺ T-Zellen werden verschiedene Subpopulationen T_{H1}, T_{H2} und T_{H0} unterschieden, die sich anhand ihres Zytokinprofils differenzieren lassen. T_{H1} sezernieren üblicherweise IL-2, IFN- γ , TNF- β sowie GM-CSF. T_{H2} hingegen zeichnen sich durch IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 als typische Zytokine aus. T_{H0} sezernieren Zytokine beider Typen. Für CD4⁺ zytotoxische T-Lymphozyten wurden bislang verschiedene Zytokinprofile beschrieben. So wurden EBV-spezifische CD4⁺ Klone charakterisiert, die sowohl IFN- γ wie auch IL-4 sezernierten (T_{H0}), aber auch CD4⁺ T-Zellen, die entweder IFN- γ oder IL-4 exprimierten (Sun *et al*, 2002). Die Analyse des Zytokinprofils für die generierten VZV-CTL im Rahmen der Interaktion mit Tumorzellen wurde entweder durch eine intrazelluläre Färbung (IL-2) oder im ELISA (IL-4, IL-10) bestimmt.

4.7.1 Intrazelluläre IL-2 Färbung

Nach Stimulation der VZV-CTL über PBMCs und Lysat wurden die Zellen permeabilisiert und die Sekretion translatierten Interleukins durch Zugabe von Brefeldin A inhibiert. Neben einer Färbung gegen den Aktivierungsmarker CD69 wurden die Zellen mit anti-IL-2 Antikörper koinkubiert und die Sekretion an IL-2 durchflusszytometrisch analysiert. Wie in Abb. 4-27 gezeigt, konnte für die VZV-CTL aber trotz einer Aktivierung, erkennbar durch die Expression des CD69, wiederholt keine intrazelluläre IL-2 Sekretion beobachtet werden.

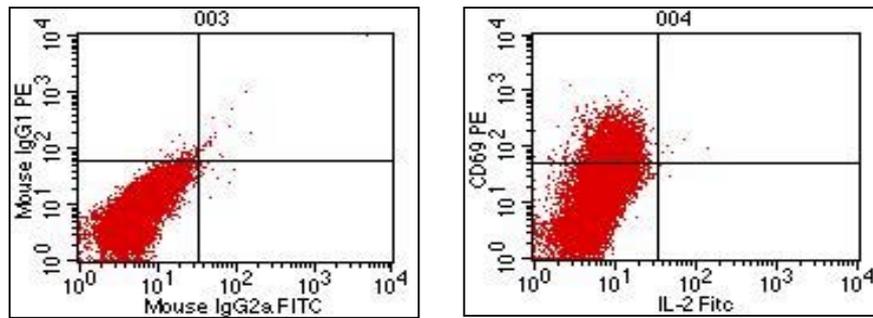


Abb. 4-28: Intrazelluläre IL-2 Färbung VZV-spezifischer CTL nach VZV-spezifischer Stimulation. VZV-CTL wurden nach Koinkubation mit PBMCs und VZV-Lysat permeabilisiert, die Sekretion produzierter Zytokine durch Brefeldin A inhibiert und anschließend eine Färbung gegen den Aktivierungsmarker CD69 sowie IL-2 durchgeführt. Dabei zeigte sich – im Vergleich mit der Isotypkontrolle (links) – zwar eine Aktivierung der Zellen (CD69+), jedoch keine IL-2 Sekretion (rechts/ rechter oberer Quadrant).

4.7.2 IFN- γ ELISA

Für den Nachweis der IFN- γ Sekretion stimulierter Zellen wurden VZV-CTL für zwei bis drei Wochen nicht restimuliert, um ihren Aktivierungsstatus herabzusetzen. Anschließend wurden sie mit Tumorzellen oder PBMCs und VZV-Lysat koinkubiert. Die IFN- γ Sekretion ins Medium wurde mit Hilfe eines ELISA quantifiziert. Für nicht-transduzierte Zellen zeigte sich dabei eine spezifische IFN- γ Sekretion nach Stimulation mit PBMCs und VZV-Lysat, nicht aber für Stimulationen mit Tumorzellen. Wie in Abb. 4-27 gezeigt, konnte im Gegensatz dazu für die 14.G2a ζ transduzierten Zellen eine deutliche IFN- γ Sekretion nach Stimulation mit antigenpositiven Tumorzellen nachgewiesen werden. Für antigen-negative Tumorzellen oder ohne Stimulation (Medium) konnte keine Zytokinsekretion beobachtet werden.

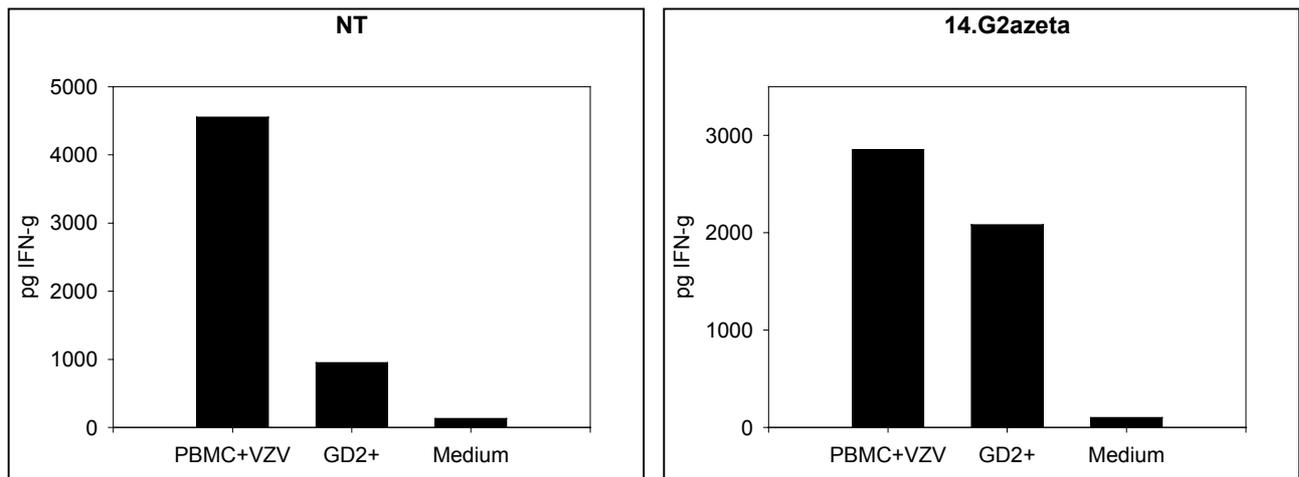


Abb. 4-27: IFN- γ ELISA zum Nachweis der spezifischen IFN- γ Sekretion 14.G2a ζ -transduzierter und nicht-transduzierter VZV-CTL als Antwort auf Tumorzellen oder VZV-Stimulation. VZV-CTL wurden – wie im Methodenteil beschrieben – mit PBMCs und VZV-Lysat oder Tumorzellen koinkubiert und die Sekretion an IFN- γ im ELISA quantifiziert. Dargestellt ist der Mittelwert der ermittelten Dreifachwerte. Es zeigte sich eine duale Spezifität für transduzierte CTL. Aufgetragen sind picogramm (pg) IFN- γ pro 10^6 VZV-CTL.

4.7.3 IL-4-ELISA

Die Sekretion von IL-4 wurde in einem IFN- γ ELISA nach Koinkubation mit Tumorzellen oder PBMCs mit Lysat determiniert. Dabei zeigte sich, in Abb. 4-29 dargestellt, dass CD19 ζ -transduzierte VZV-CTL antigenspezifisch und in hohem Maße IL-4 sezernierten. Für die CD19-negativen Tumorzellen JF und A204 lag die IL-4 Sekretion sowohl für transduzierte als auch für nicht-transduzierte VZV-CTL auf gleichem Niveau wie die Mediumkontrolle. Unerwarteterweise ergab sich eine unspezifische Zytokinsekretion aber auch sowohl für nicht-transduzierte wie auch für transduzierte VZV-CTL allein durch die Stimulation mit PBMCs in Abwesenheit von VZV-Lysat, die aber durch die Zugabe von VZV-Lysat gesteigert werden konnte. Die duale Spezifität der transduzierten Zellen für ihr natives Antigen (PBMCs und VZV-Lysat) und das chRec-Antigen (CD19) konnte aber bestätigt werden.

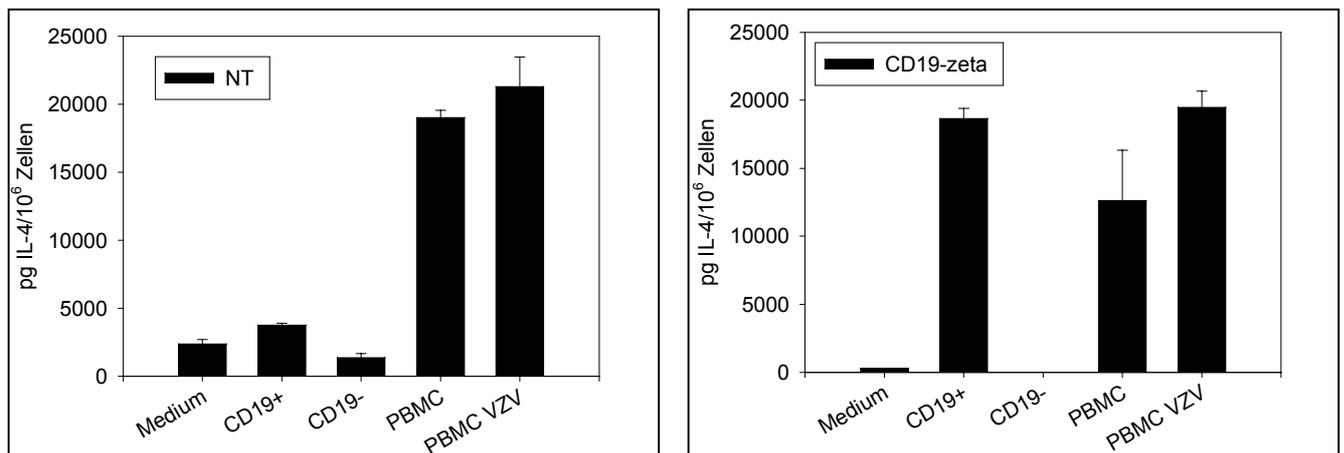


Abb. 4-29: IL-4 ELISA CD19 ζ - oder nicht-transduzierter VZV-CTL nach Koinkubation mit Tumorzellen oder PBMCs mit VZV-Lysat. VZV-CTL wurden – wie im Methodenteil beschrieben – mit CD19+ Tumorzellen (Reh) oder –negativen (A 204 und JF) Tumorzellen oder nur in Medium koinkubiert und anschließend die IL-4 Sekretion quantifiziert. Dargestellt ist die Sekretion von IL-4 in pg/10⁶ VZV-CTL. Es zeigte sich eine spezifische Sekretion für PBMCs und VZV.Lysat sowohl für transduzierte als auch für nicht-transduzierte CTL, eine IL-4 Antwort für CD19+ Tumorzellen hingegen wurde ausschließlich für CD19 ζ -transduzierte VZV-CTL beobachtet. Gezeigt ist ein repräsentativer Spender von drei.

4.7.4 IL-10-ELISA

Als typisches supprimierendes Zytokin bewirkt IL-10 in Zellkulturen die Inhibition der IFN- γ oder IL-2 Produktion. Um diese supprimierende Wirkung auszuschließen, wurde im ELISA die Sekretion an IL-10 nach spezifischer Stimulation über PBMCs und Lysat oder Tumorzellen untersucht. Wie in Abb. 4-30 abgebildet, sezernierten VZV-CTL nur sehr geringe Mengen an IL-10. Dabei zeigte sich auch kein spezifischer Unterschied zwischen transduzierten und nicht-transduzierten Zellen als Antwort auf die Stimulation mit antigenpositiven Tumorzellen.

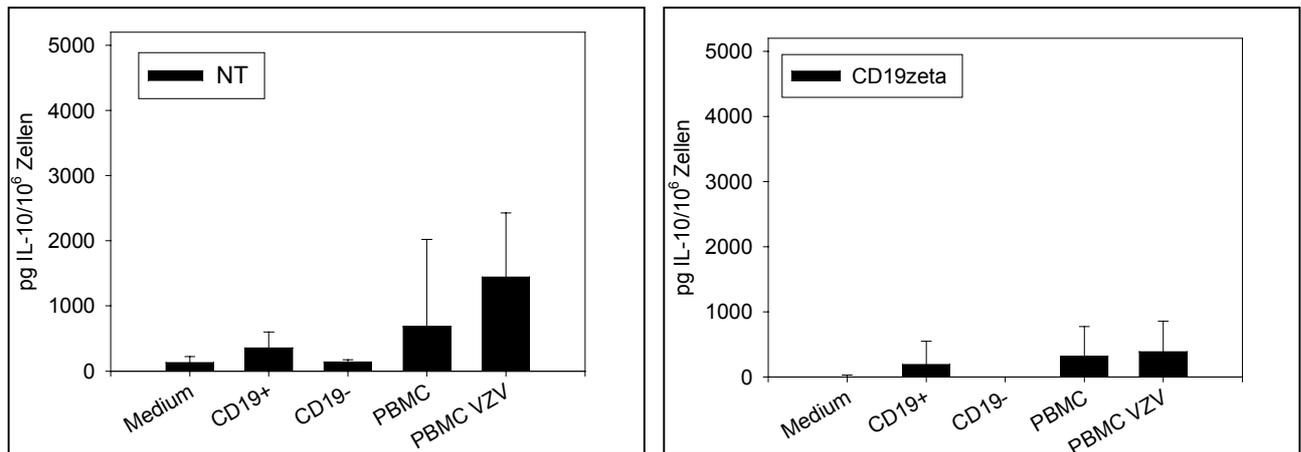


Abb. 4-30: IL-10 ELISA CD19 ζ -transduzierter und nicht-transduzierter VZV-CTL nach Koinkubation mit Tumorzellen oder PBMCs und VZV-Lysat. VZV-CTL wurden – wie im Methodenteil beschrieben – mit CD19+ (Reh), CD19–negativen (A204) Tumorzellen oder nur in Medium koinkubiert und anschließend die IL-10 Sekretion quantifiziert. Dargestellt ist die Sekretion von IL-10 in pg/10⁶ VZV-CTL für ein repräsentatives Experiment von drei. Es zeigte nur eine geringe IL-10 Sekretion für alle Ansätze.

4.8 VZV-CTL haben keine supprimierende Eigenschaften

Regulatorische T-Zellen (T_{reg}) stellen eine gut charakterisierte Subpopulation CD4⁺-T-Zellen dar. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Toleranz des Immunsystems, indem sie supprimierende Funktionen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* übernehmen (Sakaguchi, 2005). Charakteristisch für regulatorische T-Zellen ist ein CD4⁺/CD25⁺ Phänotyp sowie die Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 (Fontenot *et al.*, 2003). Bei der Immunphänotypisierung der VZV-CTL zeigten die Zellen zwar ebenfalls einen CD4⁺/CD25⁺ Phänotyp auf, mit dem Nachweis der Zytotoxizität zeigte sich aber bereits ein funktioneller Unterschied zwischen VZV-CTL und T_{reg}. Um auszuschliessen, dass die Zellen einen regulatorischen Einfluss haben, wurden die VZV-CTL neben der Expression von Foxp3 auf eventuelle supprimierende Eigenschaften untersucht. Für den Nachweis des T_{reg}-Markers Foxp3 wurde aus VZV-CTL Linien nach RNA-Isolation die cDNA synthetisiert und anschließend in einer RT-PCR mit Foxp3-spezifischen Primern die Expression von Foxp3 überprüft. Dabei zeigte sich für keine der VZV-CTL Linien eine Expression von Foxp3, lediglich für die Positivkontrollen mit GAPDH konnte DNA amplifiziert werden. In einem funktionellen Experiment wurden autologe PBMCs durch Stimulation über CD3/CD28 aktiviert und mit stimulierten VZV-CTL koinkubiert. Als Kontrolle wurden die aktivierten PBMCs ohne VZV-CTL kultiviert. Nach einem Zeitraum von 3 Tagen wurde durch Zugabe von ³H-Thymidin die Proliferation der Zellen analysiert. Dabei zeigte sich (Abb. 4-31), dass die Proliferation der aktivierten PBMCs durch die Inkubation mit VZV-CTL nicht inhibiert wird. In den Koinkubationsansätzen zeigte sich sogar eine bessere Proliferation, die sich darin

begründet, dass auch die – kurz vorher stimulierten - VZV-CTL weiter proliferierten. Entscheidend für die Funktionalität ist aber die Tatsache, dass die VZV-CTL nicht zu einer Suppression der PBMCs führen.

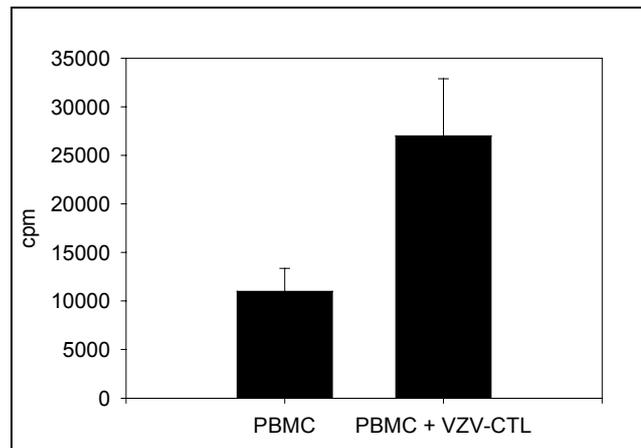


Abb. 4-31: Analyse supprimierender Eigenschaften VZV-spezifischer CTL. Die Proliferation unspezifisch über CD3/CD28 aktivierter PBMCs wurde alleine (PBMC) oder in Anwesenheit von VZV-CTL (PBMC + VZV-CTL) im ^3H -Thymidin-Assay untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Proliferation durch die Koinkubation mit den VZV-CTL nicht reduziert wurde. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von zwei.

Die Untersuchung der Proliferation im Thymidin-Assay ermöglicht ausschließlich die Analyse der gesamten Population. Um die Proliferationsfähigkeit einzelner Subpopulationen differenzieren zu können, wurden daher frisch isolierte PBMCs mit Hilfe von CD8+ Beads magnetisch in eine CD8+ und eine CD8- Fraktion separiert und die CD8+ Population anschließend über CD3/CD28 stimuliert. Sowohl die CD8+ PBMCs als auch die CD4+ VZV-CTL wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE inkubiert, um die Proliferation der Zellen zu dokumentieren. Nach Koinkubation der Populationen für 3 Tage konnte dann durchflusszytometrisch die distinkte Proliferation der verschiedenen Zellen analysiert werden. Wie in Abb. 4-32 gezeigt, proliferierten sowohl die CD4+ VZV-CTL als auch die CD8+ aktivierten T-Zellen in der Kultur. Supprimierende Eigenschaften sind den hier charakterisierten VZV-CTL daher nicht zuzuschreiben.

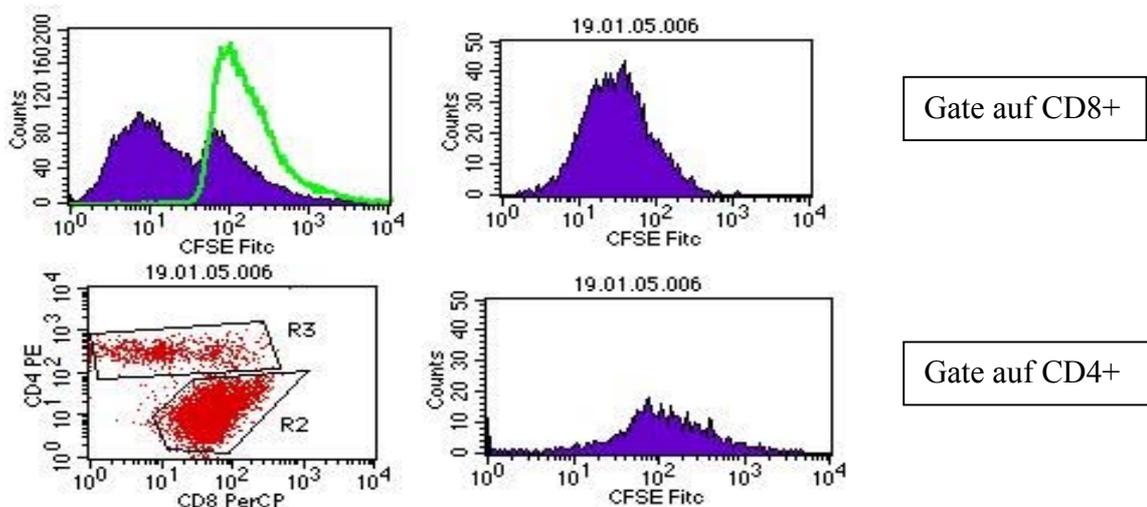


Abb. 4-32: Analyse der supprimierenden Eigenschaften VZV-spezifischer CTL im CFSE-Assay. CD3/CD28 aktivierte PBMCs wurden vor der Koinkubation mit VZV-CTL durch MACS in eine CD8⁺ und eine CD8⁻ Fraktion separiert und anschließend mit CFSE markiert, um die Proliferation einzelner Populationen zu verfolgen. CFSE wird bei Zellteilung in die Tochterzellen weitergegeben, und verliert damit proportional an Fluoreszenzintensität. Nach einer Koinkubation von 3 Tagen wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. CD4⁺ VZV-CTL proliferierten dabei ebenso wie CD8⁺ PBMCs, erkennbar an dem Shift beider Populationen nach links. Für die Analyse der VZV-CTL wurden ausschließlich CD4⁺ CFSE⁺ Zellen (Gate auf CD4⁺) analysiert, für die PBMCs ausschließlich CD8⁺ T-Zellen (Gate auf CD8⁺).

4.9 Restimulierbarkeit über den nativen oder chimären Rezeptor

Ziel der Verwendung virusspezifischer T-Zellen als Effektorzellen chRec-vermittelter Antitumorimmunität ist eine effiziente Reaktivierbarkeit über den nativen Rezeptor, durch die die Defizite der chRec-abhängigen Aktivierung umgangen werden sollen. Die Proliferationsfähigkeit der VZV-CTL in Bezug auf ihre Fähigkeit zur Proliferation nach Stimulation über den nativen oder chimären Rezeptor wurde in zwei verschiedenen Ansätzen untersucht. Zum einen wurden transduzierte und nicht-transduzierte VZV-CTL für mindestens zwei bis drei Wochen nicht restimuliert, sondern lediglich mit frischem Medium versorgt, um anschließend im ³H-Thymidin-Assay auf ihre Proliferationsfähigkeit nach Stimulation mit Tumorzellen oder PBMCs mit VZV-Lysat getestet zu werden. Zum anderen wurden VZV-CTL in einem Zähl assay entweder mit Tumorzellen oder wiederum mit PBMCs und Lysat restimuliert und die Proliferation der Zellen durch wöchentliche Quantifizierung der Zellzahlen ermittelt.

4.9.1 Proliferation im ^3H -Thymidin-Assay

Wie Abb. 4-33 dargestellt, wurden weder nicht-transduzierte noch CD19 ζ -transduzierte VZV-CTL durch die CD19 $^+$ Tumorzelllinie Reh zur Proliferation angeregt. Durch Stimulation mit PBMCs und Lysat hingegen ergab sich eine potente Aktivierung der Zellen. Dieselben Ergebnisse wurden für 14.G2a ζ -transduzierte VZV-CTL beobachtet.

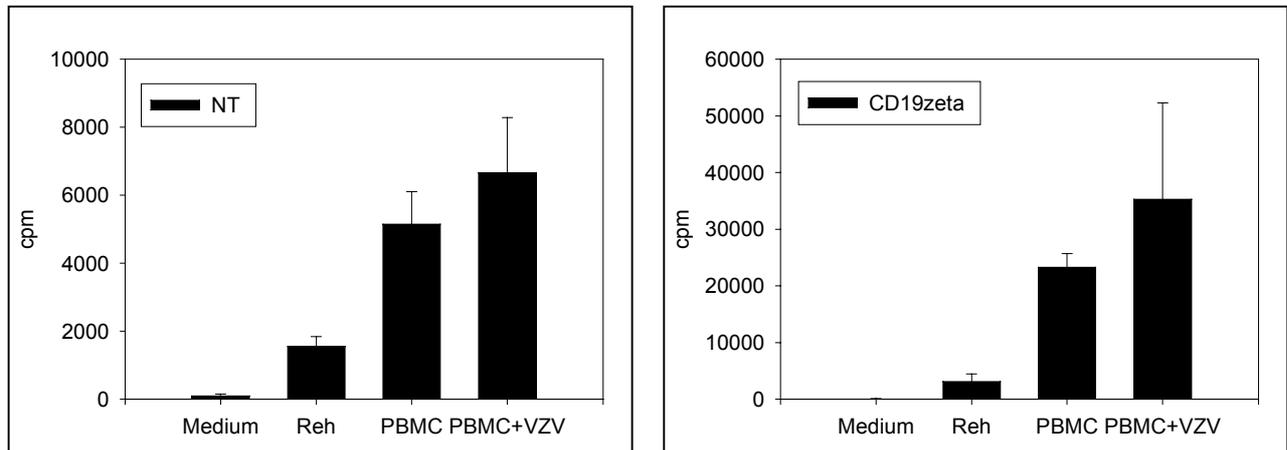
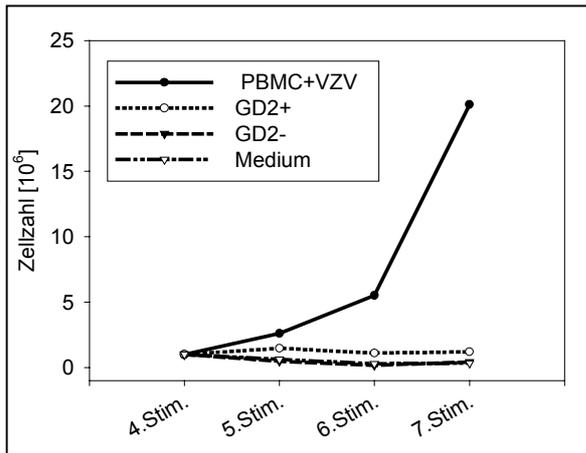


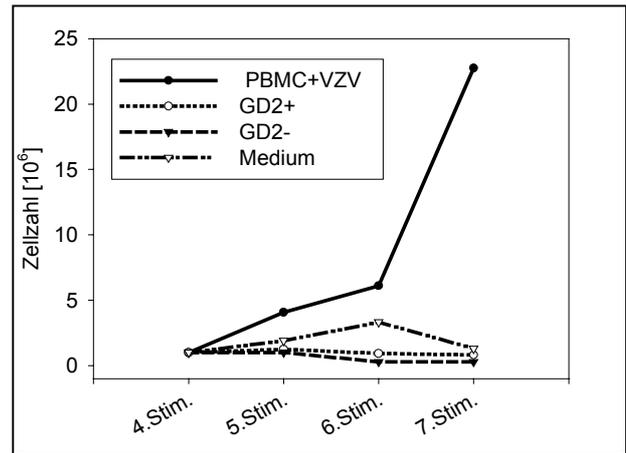
Abb. 4-33: Restimulierbarkeit VZV-spezifischer CTL im ^3H -Thymidin-Assay. Zwei Wochen nicht restimulierte VZV-CTL-Kulturen wurden mit Tumorzellen oder PBMCs und VZV-Lysat koinkubiert und die spezifische Proliferation durch die Inkorporation ^3H -Thymidins in counts pro Minute [cpm] analysiert. Weder für CD19 ζ -transduzierte noch für nicht-transduzierte zeigte sich dabei eine spezifische Proliferation nach Stimulation mit Tumorzellen, wohingegen PBMCs und VZV-Lysat eine Proliferation in beiden Populationen induzierte. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von sechs. Balken zeigen die Standardabweichung der ermittelten Dreifachwerte.

4.9.2 Zähllassay

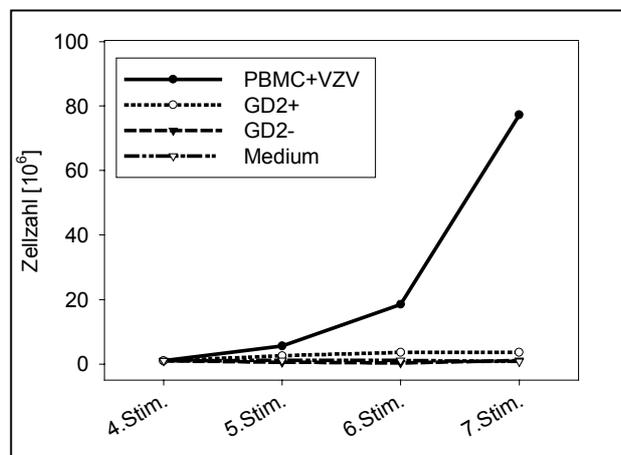
Die Analyse der Proliferation im ^3H -Thymidin-Assay deckt einen Zeitraum von nur ca. 16h, also von der Zugabe des markierten Thymidins bis zur Zellernte, ab. Um die Proliferation über einen längeren Zeitraum zu bestimmen, wurden die VZV-CTL daher mit Tumorzellen koinkubiert und wöchentlich gezählt (Diese Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Verena Niggemeier durchgeführt). Als Tumorzellen wurden dabei antigenpositive und -negative Zellen eingesetzt. Parallel wurden die CTL mit den üblichen Bedingungen stimuliert. Wie in Abb. 4-34 gezeigt, wurden die CTL ausschließlich über die Stimulation mit PBMCs und Lysat zu einer potenten Proliferation angeregt. Weder 14.G2a ζ noch 14.G2aCD28 ζ -transduzierte VZV-CTL waren in der Lage, in Anwesenheit G $_{D2}^+$ Tumorzellen zu proliferieren. Die Stimulation mit den Tumorzellen führte nach spätestens drei Stimulationen in Apoptose. Dies unterstützt die Hypothese, dass die generierten Zellen über ihren nativen TCR zur Proliferation aktiviert werden können, eine Aktivierung über den chRec aber nicht ausreicht.



NT



14.G2aζ



14.G2aCD28ζ

Abb. 4-34: Zähllassay zur Untersuchung der Restimulierbarkeit VZV-spezifischer CTL. 1×10^6 VZV-CTL wurden wöchentlich mit entweder G_{D2+} oder G_{D2-} Tumorzellen, in Medium oder mit PBMCs und VZV-Lysat restimuliert. Die Proliferation der Zellen wurde dann durch die Ermittlung der Zellzahl bestimmt, tote Zellen wurden durch Trypan-Blue Färbung ausgeschlossen. Weder 14.G2aζ- noch 14.G2aCD28ζ- oder nicht-transduzierte VZV-CTL waren in der Lage, durch die Stimulation mit Tumorzellen zu proliferieren. Die Stimulation mittels PBMCs und Lysat hingegen führte zu einer spezifischen Expansion der Zellen. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von vier.

5 Diskussion

Vielversprechende Erfolge durch adoptive Tumormimmuntherapien wurden in den letzten Jahren mit der Gabe virusspezifischer T-Zellen bei virus-assoziierten Erkrankungen erzielt (Gottschalk *et al*, 2005). Da viele Tumorerkrankungen aber nicht viral bedingt sind, limitiert die fehlende Expression viraler Antigene den Einsatz virusspezifischer T-Zellen. Selektiv auf Tumorzellen exprimierte Antigene können entweder von natürlich vorkommenden T-Zellen oder durch genetisch modifizierte T-Zellen erkannt werden. Obwohl die Ausstattung von T-Zellen mit tumorspezifischen chimären Rezeptoren die gezielte Erkennung antigenpositiver Tumorzellen erlaubt, wird ihre Funktionalität durch die *in vivo* erfolgende Inaktivierung der Zellen begrenzt. Sie sind zwar in der Lage, Tumorzellen zu erkennen und zu lysieren, aber das Potential zu einer klonalen Proliferation nach Stimulation über den chimären Rezeptor fehlt (Rossig *et al*, 2002; Rossig *et al*, 2001). Daher wurden in den letzten Jahren Modelle entwickelt, die doppelt spezifische T-Zellen als mögliche Effektorzellen sehen. Da die Immunität gegen Viruserkrankungen über spezifische T-Zellen vermittelt wird, wurden z.B. EBV-spezifische T-Zellen expandiert und mit chRec transduziert (Rossig *et al*, 2002). Es zeigte sich, dass die doppelt spezifischen T-Zellen Tumorzellen erkennen und darüber hinaus über ihren nativen Rezeptor zur Proliferation angeregt werden können (Rossig *et al*, 2005). Da aber nicht bekannt ist, wie häufig EBV-Reaktivierungen stattfinden, und eine Impfung gegen EBV nicht zur Verfügung steht, kann die Aktivierung EBV-spezifischer T-Zellen, die chRec exprimieren, nicht gezielt induziert werden.

Um zu untersuchen, ob sich die Inaktivierung chRec modifizierter T-Zellen durch den Einsatz alternativer bispezifischer T-Zellen umgehen lässt, wurden in der vorliegenden Arbeit VZV-spezifische T-Zellen generiert und charakterisiert. VZV ist als Modell interessant, da die spezifische VZV-Immunität, die vor allem durch T-Zellen vermittelt wird, durch eine Lebendvakzine spezifisch reaktiviert werden kann. Die Durchseuchung mit VZV ist – im Gegensatz zu EBV – in Deutschland bereits im Kindesalter durch die starke Infektiosität des Virus sehr hoch. Darüber hinaus wird die Impfung gegen VZV seit Juli 2004 von der ständigen Impfkommission des Robert-Koch-Instituts empfohlen, da es immer wieder zu Komplikationen im Krankheitsverlauf der Windpocken kommt. Die Impfung mit einer Lebendvakzine aus dem Impfstamm OKA wird gut vertragen und etabliert ebenso wie der Wildtyp-Stamm eine persistierende Latenz in Ganglienzellen. Auch zur Impfung bereits

seropositiver Spender gibt es Untersuchungen, die belegen, dass diese gut vertragen wurde und das Zoster-Risiko minimierte. Die Steigerung der spezifischen VZV-Antwort wurde dabei durch die Sekretion von IFN- γ im ELISPOT dokumentiert. PBMCs der Spender wurden mit Lysat VZV-infizierter Fibroblasten koinkubiert und die Zytokinantwort analysiert (Levin *et al*, 2003). Zudem konnte gezeigt werden, dass eine VZV-Impfung auch bei Kindern mit einer ALL gut vertragen wurde und bei einer Serokonversionsrate von 94% zu einem starken Anstieg der VZV-spezifischen T-Zellantwort führte (Leung *et al*, 2004). Die Persistenz der VZV-spezifischen Immunität nach Impfung während einer Chemotherapie wurde ebenfalls bei Kindern mit Leukämie untersucht. Es zeigte sich eine spezifische T-Zell-Antwort, die vergleichbar war mit der Immunität von Kindern, die eine Varizellen-Infektion durchgemacht hatten (Oitani, 1999). VZV-spezifische T-Zellen, die neben ihrer Virusspezifität auch tumorantigen-gerichtete chimäre Rezeptoren exprimieren, stellen daher ein geeignetes Modell für eine Immuntherapie im Kindesalter dar.

5.1 Generierung VZV-spezifischer T-Zellen

Als Voraussetzung für den Einsatz VZV-spezifischer T-Zellen im Rahmen einer Immuntherapie musste zunächst ein Protokoll entwickelt werden, um die Zellen effektiv und zu großen Zellzahlen zu expandieren. Optimierungsversuche ergaben, dass das Lysat VZV-infizierter Fibroblasten gegenüber der Verwendung einzelner VZV-Peptide eine effizientere Expansion virus-spezifischer Zellen induzierte. Das VZV-Lysat enthält verschiedenste Antigene des VZV-Impfstammes und beschränkt sich damit nicht auf ein Protein oder Peptid. Es wird also ein breites Spektrum VZV-spezifischer T-Zellen aktiviert. Die Bestätigung, dass ausschließlich VZV-spezifische T-Zellen durch das Lysat zur Proliferation gebracht wurden, erbrachten Versuche mit frisch isolierten PBMCs seronegativer Spender. Hier konnte weder eine Proliferation (^3H -Thymidin-Assay) noch eine IFN- γ Sekretion (ELISA) nachgewiesen werden. Erst nach VZV-Impfung der Spender wurde unter denselben Stimulationsbedingungen eine spezifische Proliferation und IFN- γ Sekretion nach Inkubation mit VZV-Lysat dokumentiert (4.1.2.5).

PBMCs von seropositiven Spendern, die wöchentlich mit autologen bestrahlten PBMCs und VZV-Lysat in Anwesenheit von IL-2 stimuliert wurden, konnten bis zu 12 mal stimuliert werden und erreichten Zellzahlen bis zu 2×10^{10} (4.1.2.3). Diese Zellzahl wäre für eine klinische Anwendung ausreichend. Im Unterschied zu bislang veröffentlichten Ergebnissen konnten in dieser Arbeit zum ersten Mal VZV-spezifische T-Zellen über einen längeren

Zeitraum als 4 Wochen expandiert werden. Unsere Daten bestätigen publizierte Erfahrungen, die die Expansion VZV-spezifischer T-Zellklone durch initiale Stimulation mit VZV-Lysat und anschließende Reexpansion mit Feederzellen und VZV-Lysat beschreiben (Huang *et al*, 1992).

5.2 CD4+ Phänotyp VZV-spezifischer T-Zellen

Von entscheidender Bedeutung ist die Frage, ob die expandierten T-Zellen die im Rahmen der VZV-Infektion relevanten T-Zellpopulationen repräsentieren. Da die exogenen VZV-Peptide nach der Prozessierung MHC-II abhängig präsentiert werden, führte die Stimulation mit antigenpräsentierenden Zellen und VZV-Lysat zu einem CD4+ dominierten Phänotyp. CD4+ T-Zellen nehmen in der Immunität vielfältige Funktionen wahr. Sie übernehmen neben der klassischen Helferfunktion durch die Sekretion spezifischer Zytokine auch zytolytische Funktionen oder kontrollieren und supprimieren andere T-Zellen. Entscheidend für ihre Verwendung als tumorspezifische Effektorzellen ist ihre Fähigkeit zur Zielzelllyse und Sekretion aktivierender Zytokine. Tatsächlich konnte den in dieser Arbeit generierten VZV-CTL zytolytische Eigenschaften nachgewiesen werden (4.5). Blockierungsexperimente im IFN- γ ELISPOT bestätigten, dass die Erkennung VZV-Antigen exprimierender Zielzellen darüber hinaus von der effizienten Präsentation der Antigene über MHC-II abhing (4.2.2.3). Dies stimmt überein mit den Beobachtungen von Diaz *et al.*, dass VZV-spezifische T-Zellkulturen einen hauptsächlich CD4+ Phänotyp und MHC-II abhängige zytolytische Eigenschaften aufweisen (Diaz *et al*, 1989). Bestätigt wurde die Existenz VZV-spezifischer CD4+ CTL durch die Beschreibung CD4+ CTL Klone mit Spezifität für die Glykoproteine I und IV, die eine ebenfalls MHC-II restringierte Zytotoxizität gegen gI und gIV-exprimierende B-Zellen aufwiesen (Huang *et al*, 1992).

Interessanterweise konnte zudem gezeigt werden, dass die Stimulation VZV-spezifischer Kulturen mit einem CD8+ Phänotyp nur in CD4+ depletierten Kulturen möglich scheint. Ohne eine Depletion der CD4+ T-Zellen zu Beginn der Kultivierung präsentierten 86,6% der generierten Zellen einen CD4+ Phänotyp, ohne CD4+ T-Zellen hingegen konnten CD8+ T-Zellen mit Spezifität u.a. für IE62 generiert werden (Arvin *et al*, 1991). Für einige VZV-Antigene wie IE62 und gpI wurden sowohl CD4+ CTL als auch CD8+ CTL beschrieben (Arvin *et al*, 1991). Unter der Beobachtung, dass während der akuten Phase der primären VZV-Infektion die CD4+ Population im peripheren Blut initial ansteigt, wird den CD4+ CTL sogar bei der ersten Immunantwort und der Kontrolle der VZV-Infektion eine wichtige

Bedeutung zugeschrieben (Diaz *et al.*, 1989). Eine physiologische Bedeutung dieser Subpopulation geht aus diesen Daten allerdings nicht hervor, so dass zytotoxische CD4⁺ T-Zellen lange als *in vitro* Artefakte angesehen wurden. Mittlerweile wurden sie aber im Kontext verschiedener Erkrankungen beschrieben und ihre *in vivo* Existenz durch frisch isolierte CD4⁺ T-Zellen mit zytotoxischem Potential belegt (Appay *et al.*, 2002). Neben Virusinfektionen wie EBV, CMV oder HIV (Appay *et al.*, 2002; Tazume *et al.*, 2004; Zaunders *et al.*, 2004) sind dies Rheumatische Erkrankungen (Duftner *et al.*, 2003) oder B-Zell-Leukämien (Porakishvili *et al.*, 2004). Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit MHC-II Tetramere, ist die Charakterisierung CD4⁺ CTL noch begrenzt, so dass über eine physiologische Bedeutung bislang nur spekuliert werden kann. Denkbar wäre aber eine Rolle bei der Erkennung virusinfizierter Zellen über MHC-II Moleküle. Virus-infizierte Zellen regulieren oft die Expression von MHC-I Molekülen herunter, um der Erkennung durch CD8⁺ CTL zu entgehen. In diesem Fall könnten antigenspezifische CD4⁺ CTL weiterhin eine effektive Erkennung und Lyse infizierter Zellen gewährleisten.

Interessanterweise zeigte sich bei einem Spender die Expansion TCR $\gamma\delta$ ⁺ T-Zellen (4.3.2). Diese sind im Gegensatz zu TCR $\alpha\beta$ ⁺ T-Lymphozyten in der Lage, ohne vorheriges Priming polyklonal zu expandieren (Morita *et al.*, 1995). Im Unterschied zu $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten erfordert zudem die Erkennung von Antigen keine MHC-Bindung, so dass ein breites Spektrum von Protein- und Nicht-Protein-Antigenen erkannt wird (Schild *et al.*, 1994; Burk *et al.*, 1995; Morita *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 1995). Im Einzelnen ist aber nicht bekannt, wie $\gamma\delta$ -T-Zellen stimuliert werden. Die spenderabhängige Expansion von vornehmlich TCR $\gamma\delta$ -T-Zellen könnte möglicherweise durch den individuellen Infektionsstatus und genetische bedingte Unterschiede der Antigenpräsentation erklärt werden.

5.3 Virusspezifität der CTL

Um die Spezifität der generierten T-Zellen für definierte VZV-Antigene zu bestimmen, wurden immunogene VZV-Antigene in B-Zellen exprimiert und mit den T-Zellen koinkubiert. Im Einzelnen erfolgte der Nachweis über mit Vaccinia-Virus-Rekombinanten infizierte LCL, die auch von Diaz *et al.* für die Untersuchung VZV-spezifischer T-Zellen eingesetzt wurden (Diaz *et al.*, 1989). Da IE62 und gE mit die häufigsten Immunogene darstellen, wurden sie in der vorliegenden Arbeit ausgewählt. Obwohl bereits durch die Koinkubation allein mit LCL oder LCL-Vac-GFP eine IFN- γ Sekretion ausgelöst wurde,

zeigte sich für die VZV-gE oder VZV-IE62 exprimierenden LCL eine Steigerung der Zytokinsekretion (4.2.2.2). In Ergänzung der Daten zu den seronegativen Spendern ist daher davon auszugehen, dass die generierten CTL-Kulturen VZV-Spezifität besitzen und Subpopulationen Spezifitäten für gE und IE62. Die unspezifische IFN- γ Sekretion bei der Koinkubation mit LCL ist dadurch erklärbar, dass LCL einen sehr potenten unspezifischen Stimulus für T-Zellen darstellen. Unerwarteterweise war diese unspezifische IFN- γ Sekretion sogar größer als die Zytokinsekretion nach der Blockierung mit α -MHC-II Antikörper. Eine EBV-Spezifität der generierten Kulturen, die diese IFN- γ Antwort erklären könnte, konnte ausgeschlossen werden, da EBV-Antigen-präsentierende LCL ausschließlich von CD19 ζ -transduzierten, nicht aber von nicht-transduzierten VZV-CTL lysiert wurden (4.5.1).

Unerwarteterweise konnte in den Restimulationsversuchen und der Zytokinanalyse oftmals auch bereits durch die Koinkubation mit PBMCs in Abwesenheit von VZV-Lysat eine Antwort erreicht werden. Die Zugabe des VZV-Lysats zu den PBMCs konnte diese unspezifische Immunantwort aber grundsätzlich steigern. Die Zugabe von Lysat ohne die Anwesenheit antigenpräsentierender PBMCs hingegen konnte weder eine Zytokinsekretion noch Proliferation induzieren. Diese unspezifische Stimulation der VZV-CTL erklärt sich möglicherweise durch die Anwesenheit antigen-präsentierender Zellen innerhalb der PBMCs, die zu einem unspezifischen Stimulus der CTL führen. Da PBMCs vielfältige Stimuli präsentieren, werden sie häufig als Feederzellen für CTL eingesetzt. Da eine Expansion der VZV-spezifischen CTL aber allein in Anwesenheit von PBMCs nicht möglich war, scheint dieser Effekt nur kurzfristig zu wirken. Erst durch die zusätzliche Gabe von VZV-Lysat wurde die maximale T-Zellantwort erreicht. Da außerdem im Gegensatz zu der tumorantigen-spezifischen Stimulation nicht-transduzierte und transduzierte VZV-CTL nach Kontakt mit VZV-Antigen exprimierenden B-Zellen spezifisch IFN- γ sezernierten, kann davon ausgegangen werden, dass die Expression des chRec die natürliche Spezifität der Zellen nicht beeinflusst und die generierten Zellen doppelte Spezifität aufweisen.

5.4 Phänotypische Charakterisierung VZV-spezifischer T-Zellen

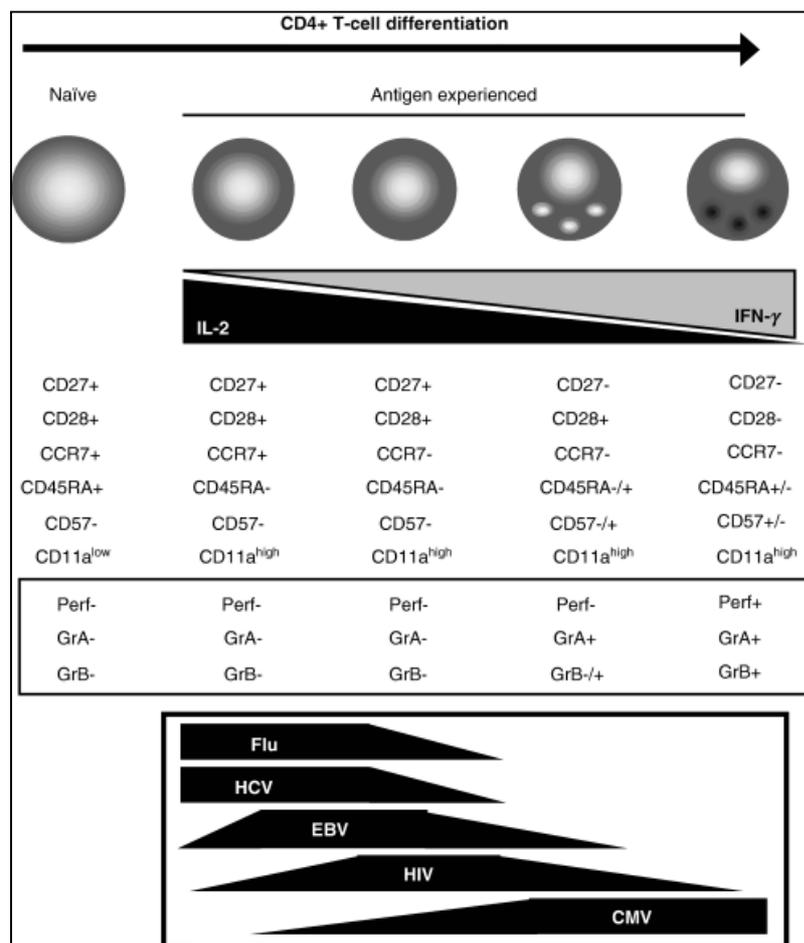
Um die generierten VZV-CTL näher zu charakterisieren und mit anderen virus-spezifischen CD4⁺ CTL zu vergleichen, wurden die Zellen hinsichtlich der Expression verschiedener Oberflächenmarker untersucht. Die Zellen wiesen eine hohe Expression des IL-2 Rezeptors CD25 auf (4.3.3). Die Hochregulation von CD25 unterstreicht die Annahme, dass die Zellen

durch die Stimulationsbedingungen effizient aktiviert wurden. Diese Beobachtung wird unterstützt von Ito *et al.*, die ebenfalls die verstärkte Expression des CD25 sowohl auf CD4⁺ als auch auf CD8⁺ T-Zellen beobachten konnten, nachdem PBMCs seropositiver Spender für 6 Tage mit VZV-Antigen stimuliert worden waren (Ito *et al.*, 1992).

Obwohl die generierten Linien den für regulatorische T-Zellen (T_{reg}) typischen CD4⁺/CD25⁺ Phänotyp zeigten, konnte durch funktionelle Analysen ausgeschlossen werden, dass die Zellen supprimierende Eigenschaften besitzen. Für T_{reg} wurden die Suppression der Proliferation koinkubierter T-Zellen sowie die Sekretion von IL-10 als wichtigste Charakteristika beschrieben (Chakraborty *et al.*, 2004). VZV-CTL hingegen waren nicht in der Lage, die Proliferation autologer unspezifisch aktivierter PBMCs zu inhibieren (4.8) oder IL-10 zu sezernieren (4.7.4). Darüber hinaus wurde über eine RT-PCR die Expression des für die supprimierenden Eigenschaften der T_{reg} erforderlichen Transkriptionsfaktors Foxp3 (Fontenot *et al.*, 2003) ausgeschlossen. Da T_{reg} nachweislich in der Lage sind, die Anti-Tumor-Antwort des Immunsystems zu unterdrücken und damit ein Tumorwachstum begünstigen (Wang *et al.*, 2004), ist das Fehlen der supprimierenden Eigenschaften für die VZV-CTL vor dem Hintergrund einer T-Zell-vermittelten Immuntherapie von Vorteil.

CD4⁺ CTL Populationen, die im Kontext verschiedener – vor allem chronischer oder latenter – Virusinfektionen isoliert wurden, weisen unterschiedliche Differenzierungsphänotypen auf. Differenzierungsgrad und Antigenerfahrung der T-Zellen entsprechen eines von Appay entwickelten Modells anhand der Oberflächenexpression von CD27 und CD45RA kategorisiert werden (Appay, 2004). Eine Übersicht über die Differenzierungsstadien verschiedener virus-spezifischer CD4⁺ CTL gibt Abb. 5-1. Der Verlust von CD27 wird allgemein als Anzeichen für die Ausdifferenzierung der Zellen in terminale Effektorzellen angesehen, so dass auch für die VZV-CTL davon auszugehen ist, dass sie im Rahmen der wiederholten Stimulation ausgeprägte Differenzierungsvorgänge durchlaufen haben. Im Gegensatz zu frisch isolierten EBV- oder HIV-spezifischen CD4⁺ CTL, die weder CD27 noch CD28 exprimieren, weisen VZV-CTL aber weiterhin eine deutliche Expression von CD28 auf (4.3.3). Die Persistenz von CD28 auch unter fortgeschrittener Differenzierung ist möglicherweise durch Einflüsse des Kultursystems zu erklären. So wurde auch für EBV-spezifische CTL unter wiederholter *in vitro* Stimulation ein CD27⁻/CD28⁺ Phänotyp beschrieben (Rooney *et al.*, persönliche Mitteilung; eigene Beobachtungen). Diese *in vitro*

expandierten T-Zellen wurden erfolgreich zur therapeutischen Rekonstitution der EBV-Immunität *in vivo* verwendet (Rooney *et al*, 1995). Diese Erfahrung belegt, dass CD4⁺/CD27⁻/CD28⁺ T-Zellen alle Voraussetzungen einer langlebigen Effektor-Memory-Population erfüllen. Darüber hinaus wird ein weiteres phänotypisches Merkmal – die Expression von CD45RO bei Fehlen von CD45RA – von den VZV-CTL ausgeprägt (4.3.3). Eine Einordnung VZV-spezifischer CTL in das Differenzierungsmuster [Abb. 5-1] würde sich daher an EBV-CTL orientieren und die Zellen als Effektor-Memory-T-Zellen charakterisieren.



Nach Appay, 2004

Abb. 5-1: Die phänotypische Entwicklung CD4⁺ T-Zellen im Laufe der T-Zelldifferenzierung. Charakterisiert werden die T-Zellen anhand der Expression verschiedener Oberflächenmarker sowie Perforin und Granzymen. Unterschiedliche virus-spezifische CTL werden im Laufe der Differenzierung zugeordnet. So zeigen EBV- und HIV-spezifische CTL einen weniger ausdifferenzierten Phänotyp als CMV-spezifische CTL.

5.5 Zytokinsekretion CD4+ VZV-CTL

Im Rahmen primärer Immunantworten differenzieren naive CD4+ T-Zellen in verschiedene T-Helfer-Subsets. T_{H1}-Zellen produzieren Typ1-Zytokine (IFN- γ), T_{H2}-Zellen synthetisieren Typ2-Zytokine (IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10) und T_{H0}-Zellen sind durch die Produktion beider Zytokintypen gekennzeichnet (Abbas *et al*, 1996). Das Zytokinprofil der in dieser Arbeit generierten VZV-CTL entspricht dem T_{H0}-Typ. Während IFN- γ als stimulatorisches Zytokin bekannt ist, besitzt IL-4 supprimierende Eigenschaften. Im Rahmen der Charakterisierung CD4+ CTL wurde dieses Paradigma jedoch schon oft modifiziert und erweitert. Von Vergelli *et al*. wurden z.B. autoreaktive T-Zell-Klone mit Spezifität für das Myelin-bindende Protein (MBP) beschrieben, die IFN- γ und IL-4 koexprimierten. Die Autoren beobachteten weiterhin eine MHC-II restringierte Zytotoxizität CD4+ T-Zellen, die entweder über Fas/FasL oder Perforin vermittelt wurde (Vergelli *et al*, 1997). Im Unterschied zum Maussystem - in dem die Fas/FasL abhängige Zytolyse mit einem T_{H1}-Profil und die Perforin-vermittelte Zytotoxizität mit einem T_{H2}-Profil assoziiert wird (Hahn *et al*, 1995) – sahen sie für die humanen Zellen keine Abhängigkeit des Lysemechanismus vom Zytokinspektrum der Zellen (Vergelli *et al*, 1997). Unsere Beobachtung mit VZV-CTL unterstützt diese Annahme, da sie neben ihrem unüblichen Zytokinspektrum ihre Zielzellen weder über Fas/FasL noch über Perforin lysieren (4.6).

Ein T_{H0}-Profil (IFN- γ + und IL-4+) wurde darüber hinaus auch für EBV-reaktive CD4+ CTL beschrieben, die entsprechend eines in klinischen Studien mit Erfolg angewandten Protokolls generiert wurden (Sun *et al*, 2002). Für diese – wie die VZV-CTL ebenfalls Granulysin exprimierenden – Zellen zeigten sich diverse Zytokinprofile. Für einen Klon konnten IFN- γ und IL-4 sezernierende Zellen dokumentiert werden, die keine Koexpression beider Zytokine aufwiesen. Die Autoren vermuten daher, dass innerhalb der T-Zellkulturen einzelne Subpopulationen existieren, die entweder IFN- γ oder IL-4 exprimieren (Sun *et al*, 2002). Diese Möglichkeit kann auch für VZV-CTL nicht ausgeschlossen werden, da die Quantifizierung der IL-4 Sekretion im ELISA erfolgte, in dem die Sekretion der Zytokine nur für die Gesamtpopulation, nicht aber für einzelne Zellen nachgewiesen werden kann. Für eine weitere Zelllinie EBV-spezifischer CTL wurde hingegen eine Koexpression beider Zytokine in derselben Zelle beobachtet, so dass auch diese Bifunktionalität möglich scheint. Eventuell stellt die Produktion von IL-4 sogar einen Vorteil dar. Vor dem Hintergrund einer immuntherapeutischen Anwendung wären die generierten VZV-CTL in der Lage, nicht nur

die T-Zell-vermittelte Immunität, sondern auch eine begleitende Aktivierung von B-Zellen zu induzieren. Dies könnte *in vivo* eine noch umfassendere Immunantwort auf den Tumor bedeuten. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass IL-4 auch das Wachstum und die Differenzierung von T-Zellen begünstigen kann (Paul, 1991; Seder *et al*, 1992), so dass auch eine autokrine Aktivierung der T-Zellen denkbar ist. In klinischen Erfahrungen mit der Transfusion CMV-spezifischer T-Lymphozyten zeigte sich, dass zusätzlich Transfusion von CD4⁺ T-Zellen ohne die Effektivität der CD8⁺ CTL verbesserte (Walter *et al*, 1995). Die in dieser Arbeit generierten VZV-CTL haben neben ihrem direkten zytotoxischen Potenzial sowohl T_{H1}- (IFN- γ) wie auch T_{H2}-Eigenschaften (IL-4) und können sowohl Helferfunktionen wie auch zytolytische Effektorfunktionen induzieren.

5.6 Tumorspezifische Effektorfunktionen VZV-spezifischer CTL

Um die generierten VZV-CTL zu befähigen, neben ihrer natürlichen Spezifität auch Tumorzellen zu erkennen, wurden die T-Zelllinien retroviral mit Genen für chimäre Rezeptoren transduziert. Mit dem verwendeten retroviralen Produktionssystem und unter Optimierung der Transduktionsbedingungen wurden Transduktionseffizienzen erreicht, die den in der Literatur berichteten Erfahrungen zum Gentransfer in humane T-Zellen gleichwertig oder überlegen waren (Kasid *et al*, 1990; Bunnell *et al*, 1995). Die Integration retroviral übertragener Gene erfordert die proliferative Aktivität der Zielzelle. In der Tat erwies sich der Tag nach der 3. Stimulation als optimaler Transduktionszeitpunkt (4.4.2), vergleichbar mit EBV-spezifischen CTL (Rossig *et al*, 2002). Die erfolgreiche Transduktion der VZV-CTL und die Expression der chimären Rezeptoren auf der Zelloberfläche konnte durch die durchflusszytometrische Analyse der Zellen mit spezifischen Antikörpern dokumentiert werden. Dabei wurden Effizienzen von bis zu 71% für 14.G2a ζ und bis zu 86% für 14.G2aCD28 ζ erreicht, die stabil auch nach weiterer Stimulation der Zellen *in vitro* nach bis zu 50 Tagen nachgewiesen werden konnte. Diese hohen Transduktionsraten würden eine therapeutische Verwendung der modifizierten CTL ohne weitere Selektion erlauben. Für die Stabilität der retroviralen Transduktion virus-spezifischer CTL spricht zudem die Tatsache, dass retroviral mit einem Reportergen markierte EBV-CTL auch Jahre nach Transfusion noch *in vivo* nachweisbar waren (Bollard *et al*, 2004; Heslop & Rooney, 1997).

Die Voraussetzung für den Einsatz chRec transduzierter T-Zellen im Rahmen einer Immuntherapie ist eine spezifische Erkennung antigen-positiver Tumorzellen über den chRec. Daher sollte sich die Auswahl des Tumorantigens auf Strukturen beschränken, die in

gesundem Normalgewebe fehlen oder nur in sehr geringer Dichte exprimiert werden. Ein vielversprechendes Zielantigen ist das Gangliosidantigen G_{D2} , das als Derivat embryonalen Neuroektoderms auf Neuroblastomzellen hoch exprimiert wird (Schengrund *et al*, 1985). Da G_{D2} fast ausschließlich auf malignen Zellen, nicht aber in Normalgewebe exprimiert wird (Schulz *et al*, 1984), erlaubt es eine tumorgerichtete Spezifität durch die chimären Rezeptoren 14.G2a ζ und 14.G2aCD28 ζ . CD19 ist ein Membranglykoprotein, welches auf B-Zellen in allen Reifungsgraden bis zur terminalen Differenzierung zur Plasmazelle exprimiert wird. Vor allem auf ALL-Blasten und B-Zell-Lymphomen wird CD19 in hohem Maße stabil exprimiert (Uckun *et al*, 1988). Hotfilder *et al*. konnten zudem zeigen, dass auch die Ausgangspopulation bestimmter ALL durch die Expression von CD19 gekennzeichnet ist (Hotfilder *et al*, 2002). Durch den Einsatz des chRec CD19 ζ würde demnach auch die leukämische Stammzelle eliminiert. In den letzten Jahren wurden verschiedene chimäre Rezeptoren in T-Zellen, die unspezifisch über CD3 und CD28 aktiviert wurden, exprimiert (Roessig *et al*, 2002; Brentjens *et al*, 2003; Cooper *et al*, 2003; Imai *et al*, 2004). Für alle transduzierten T-Zellen zeigte sich eine spezifische Zytotoxizität gegen CD19+ Tumorzelllinien sowie eine potente Zytokinsekretion. Alternativ wurden kürzlich aber auch virus-spezifische T-Zellen mit einem CD19-spezifischen chRec transduziert. Unter der Annahme, die genmodifizierten T-Zellen über ihren nativen TCR zu stimulieren, wurden Influenza-Virus-spezifische T-Zellen mit Spezifität für das Influenza-Antigen MP-1 generiert und anschließend transduziert. Die *in vivo* Aktivierung der T-Zellen erforderte dann den zusätzlichen Transfer T-Zell-Antigen präsentierender Zellen (T-APC). In der *in vivo* Analyse im NOD/SCID-Modell zeigte sich für die MP1/CD19-spezifischen CTL eine signifikante Tumorreduktion für die Mäuse, die neben den CTL auch T-APC erhalten hatten (Cooper *et al*, 2005). Im Unterschied zu den in dieser Arbeit charakterisierten VZV-CTL wurden CTL generiert, die lediglich Spezifität für ein Antigen aufweisen. Zum anderen wurde anstelle einer – wie für VZV bereits etablierten und gut vertragenen – Lebendvaccine der Transfer einer zweiten *ex vivo* expandierten Population notwendig, um die Zellen gezielt zu aktivieren. Die Arbeit unterstützt aber die Möglichkeit bispezifische T-Zellen zu nutzen, die MHC-abhängig über ihre natürliche Spezifität aktivierbar sind und zusätzlich MHC-unabhängig über chRec in der Lage sind, Tumorzellen zu erkennen und lysieren.

Alle in dieser Arbeit transduzierten VZV-CTL waren in der Lage, antigenpositive Tumorzellen spezifisch über den chRec zu erkennen, zu lysieren und Zytokine zu sezernieren.

Nicht-transduzierte VZV-CTL hingegen zeigten lediglich eine VZV-spezifische Zytokinsekretion, aber keine Lyse koinkubierter Tumorzellen (4.5). Weiterhin wurden die Tumorzellen nicht nur in 4h-Chrom-Release-Assays effizient lysiert, sondern auch in Kokultivierungsansätzen innerhalb von 3-7 Tagen nahezu komplett eliminiert (4.5.2). Auch die Sekretion von IFN- γ oder IL-4 als Antwort auf eine Koinkubation mit antigenpositiven und -negativen Tumorzellen beschränkte sich auf die transduzierten Zellen, die nur in Anwesenheit antigenpositiver Linien eine spezifische Zytokinsekretion zeigten (4.7).

5.7 Mechanismus der Zielzellyse CD4+ VZV-CTL

Der Mechanismus, über den CD4+ T-Zellen ihre Zielzellen lysieren, ist nicht einheitlich. Um den verantwortlichen Mechanismus für CD4+ VZV-spezifische CTL zu ermitteln, wurden die Zellen zunächst auf die Expression von Perforin untersucht. Perforin ist der meist genutzte Weg von CD8+ Lymphozyten für eine gezielte Zellyse. Auch in einigen CD4+ CTL konnte Perforin nachgewiesen werden. So zeigten z.B. CMV-spezifische CD4+ CTL (Tazume *et al*, 2004) und EBV-spezifische CD4+ CTL (Khanolkar *et al*, 2001; Sun *et al*, 1999; Su *et al*, 2001) eine deutliche Expression von Perforin. Interessanterweise exprimierte aber keine der in dieser Arbeit generierten VZV-spezifischen T-Zell-Linien Perforin, so dass Perforin als zytolytischer Mechanismus nicht in Frage kam (4.6.1). Für andere CD4+ CTL wurde die Interaktion über Fas/FasL beschrieben. Neben der Expression an Perforin konnte z.B. für CMV-CTL nachgewiesen werden, dass auch Fas/FasL-Interaktion einen wichtigen Beitrag zur Induktion der Apoptose leistet (Tazume *et al*, 2004). Auch im Fall von EBV- oder HSV-spezifischen CD4+ CTL wurde der Fas-Weg als wichtiger Faktor für die Zytolyse identifiziert (Vergelli *et al*, 1997; Lewinsohn *et al*, 1998). Um den Beitrag der Fas/FasL-Interaktion für VZV-CTL zu dokumentieren, wurden alle Tumorzelllinien auf ihre Expression an Fas (CD95) untersucht. Da die Tumorzellen Fas nicht exprimierten, kann auch Fas keine entscheidende Rolle bei der Tumorzytolyse spielen (4.6.2).

Im Rahmen der Charakterisierung EBV-spezifischer CD4+ CTL wurde ein weiteres Protein identifiziert, welches über Granula-Exozytose die Lyse von Zellen vermittelt: Granulysin (Sun *et al*, 2002). Granulysin ist ein Molekül, das üblicherweise von CD8+ Lymphozyten oder NK-Zellen sezerniert wird. Gerade bei der angeborenen NK-Zell-vermittelten Immunität scheint es einen wichtigen Schutz vor Virusinfektionen darzustellen. Die Zugabe rekombinanten Granulysins zu VZV-infizierten Zellkulturen inhibierte nachweislich die Replikation des Virus und führte zur Apoptose der infizierten Zellen (Hata *et al*, 2001). Durch eine

intrazelluläre Antikörperfärbung mit dem Granulysin-spezifischen Antikörper DH4 konnte hier nachgewiesen werden, dass CD4⁺ VZV-CTL Granulysin stark exprimierten. Weiterhin konnte durch Blockierungsexperimente bestätigt werden, dass Granulysin einen wichtigen Anteil an den zytotoxischen Eigenschaften der VZV-CTL hat (4.6.3). Neben der Inhibition der Zelllyse durch die Koinkubation mit ConA - einem Inhibitor von Granula-Exozytose - konnte auch durch die Zugabe des Granulysin-Antikörpers DH4 eine Reduktion der spezifischen Zelllyse beobachtet werden. Dass diese Inhibition mit 34% geringer ausfiel als die Reduktion durch die Zugabe von ConA mit 66% könnte damit zusammenhängen, dass für den eingesetzten Antikörper nicht bekannt ist, wie ausgeprägt sein blockierendes Potential ist. Blockierungsexperimente im Rahmen der Inhibition des spezifischen Killings im Chrom-Assay wurden bislang nicht beschrieben, da auch Sun *et al.* lediglich die Expression von Granulysin in den Lymphozyten nachwies (Sun *et al.*, 2002). Wie schon für CMV-spezifische CTL beschrieben, ist es denkbar, dass mehr als ein Mechanismus für eine effiziente Zielzelllyse verantwortlich sind (Tazume *et al.*, 2004). Trotzdem scheint es wahrscheinlich, dass VZV-CTL Granulysin als lytisches Agens nutzen, um Zielzellen effizient zu lysieren.

Ein Modell zum Mechanismus, über den Granulysin die Zielzellen in Apoptose bringt, wurde von Clayberger und Krensky entwickelt und ist in Abb. 5-2 dargestellt. Granulysin ist ein positiv geladenes Molekül und daher in der Lage, mit der negativ geladenen Membran der Zielzelle über Ladungswechselwirkungen zu interagieren. Durch Rotation dringt es weiter in die Membran ein und sorgt für eine Membrandisruption. In Folge dessen kommt es zu einem intrazellulären Ca²⁺ Anstieg, einem Abfall in der Kaliumkonzentration und der Depolarisation der Mitochondrienmembranen. Die Mitochondrien entlassen Cytochrom C und Apoptose induzierende Faktoren (AIP), die dann verschiedene Caspasen aktivieren. Über Endonukleasen wird dann die Apoptose eingeleitet (Clayberger & Krensky, 2003).

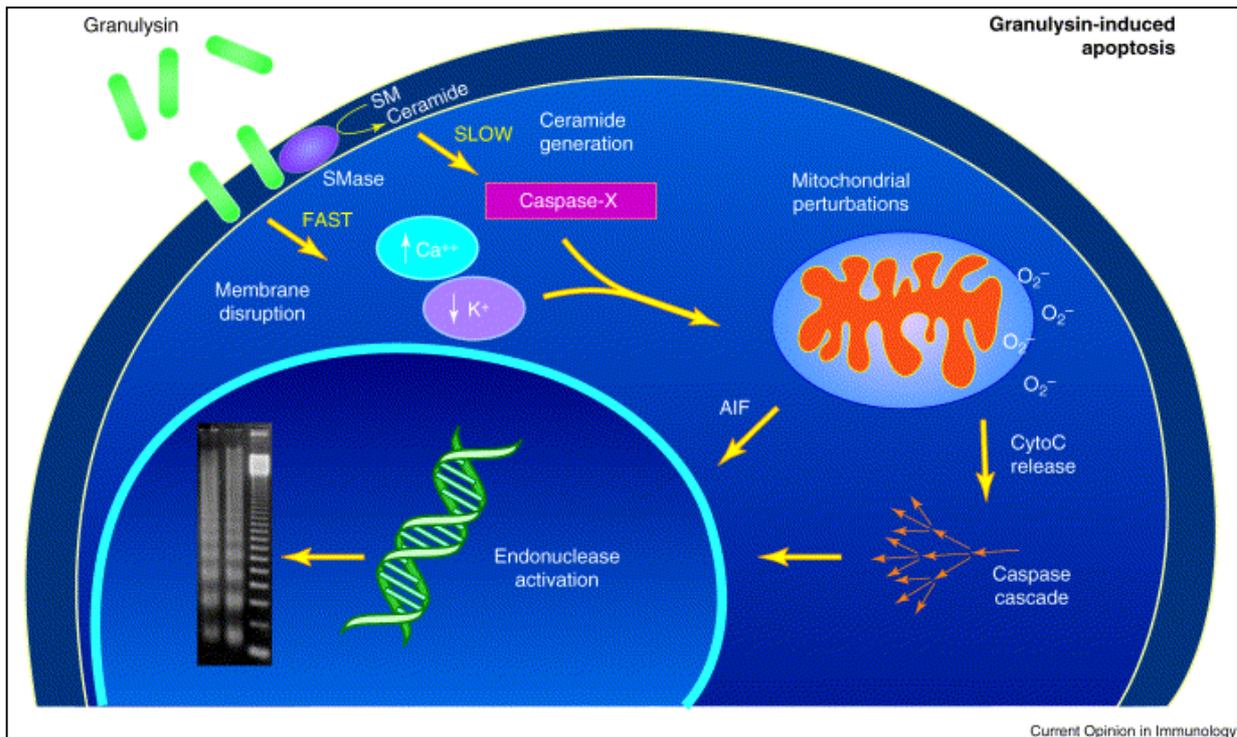


Abb. 5-2: Modell des Mechanismus der Zielzellyse durch Granulysin. Das positiv geladene Granulysin bindet durch Ladungswechselwirkungen an die Zelloberfläche und führt zu einem intrazellulären Anstieg der Ca^{2+} Konzentration sowie einem Abfall der Kalium-Konzentration. Die Mitochondrien werden geschädigt und entlassen Cytochrom C (CytoC) und Apoptose induzierenden Faktor (AIF), so dass über die Aktivierung von Caspasen und Endonukleasen die Apoptose induziert wird. [aus Clayberger & Krensky, 2003]

5.8 Bedeutung der Kostimulation für VZV-CTL

Da anzunehmen ist, dass die funktionelle Inaktivierung chRec modifizierter Zellen auf einer nicht ausreichenden Aktivierung der T-Zellen über den chRec basiert, wurden in den letzten Jahren verschiedene kostimulatorisch wirksame Moleküle in chimäre Rezeptoren integriert. Sie sollen der T-Zelle neben dem ersten Signal über den chRec das für die vollständige Aktivierung einer T-Zelle notwendige zweite Signal liefern („Zwei-Signal-Hypothese“). Das wichtigste und best untersuchte kostimulatorische Molekül ist CD28, welches auch in dieser Arbeit im chRec 14.G2aCD28 ζ integriert wurde. Für die Aktivierung polyklonaler PBMCs wurde bereits mehrfach beschrieben, dass die zusätzliche Signalwirkung durch den Einbau kostimulatorischer Moleküle zu einer spezifischen Proliferation modifizierter T-Lymphozyten über den kombinierten chRec führt (Hombach *et al*, 2001; Imai *et al*, 2004). Dennoch waren 14.G2aCD28 ζ -transduzierte VZV-CTL nicht in der Lage, nach Koinkubation mit $\text{G}_{\text{D}2}^{+}$ Tumorzellen zu proliferieren (4.9). Dieselben Beobachtungen wurden in unserer Arbeitsgruppe für EBV-spezifische CTL wiederholt beschrieben und lassen darauf schliessen, dass CD28-Kostimulation in differenzierten Effektorzellpoulationen keinen Vorteil bezüglich

der Proliferation bringen. Im Unterschied zu ausdifferenzierten CTL konnte der Nutzen von CD28 für das Priming naiver T-Zellen durch den chRec nachgewiesen werden, indem neben dem ersten Signal über den TCR auch das zweite kostimulatorische Signal intrazellulär detektierbar war (Friedmann-Morvinski *et al*, 2005). Über die Effizienz des Einbaus kostimulatorischer Moleküle in differenzierte CTL gibt es bislang keine vergleichbaren Daten. Obwohl empfohlen wird, CD28 in klinisch relevante chimäre Rezeptoren grundsätzlich einzubeziehen (Friedmann-Morvinski *et al*, 2005), würden wir dies für den Einsatz virusspezifischer CTL nicht für notwendig erachten. Kostimulatorische Moleküle, denen eher eine Rolle bei der Reaktivierung, als beim Priming naiver T-Zellen zugesprochen wird, könnten in den ausdifferenzierten VZV- oder EBV-CTL vielleicht eher zu einer Verbesserung chimärer Rezeptorstrategien führen. Mögliche Kandidaten wären 41BB (CD134) (Finney *et al*, 2004) oder OX40 (Pule *et al*, 2004).

5.9 Restimulierbarkeit VZV-spezifischer CTL über den chRec

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob chRec exprimierende VZV-spezifische T-Zellen gezielt über den nativen TCR reaktivierbar sind. Dafür wurden VZV-CTL für zwei bis drei Wochen nicht stimuliert, um ihren Aktivierungsstatus herabzusetzen. Kurz bevor die Zellen wegen fehlender Stimuli in Apoptose gingen, wurden sie dann entweder über den chRec mit Tumorzellen oder über den nativen TCR mit PBMCs und VZV-Lysat stimuliert. Dabei zeigte sich, dass die Stimulation über den chRec auch in VZV-CTL nicht ausreichte, um Proliferation zu induzieren. Durch die Koinkubation mit PBMCs und VZV-Lysat hingegen wurden die Zellen effizient zur Proliferation reaktiviert (4.9.1). Darüber hinaus konnten VZV-CTL, die wöchentlich mit antigen-positiven Tumorzellen inkubiert wurden, nicht weiter expandiert werden, während durch die Stimulation mit PBMCs und VZV-Lysat eine zwei- bis dreifache Expansion pro Woche verzeichnet werden konnte (4.9.2). Diese Ergebnisse befürworten die Möglichkeit, die funktionelle Inaktivierung chRec-modifizierter T-Zellen wirksam zu umgehen, indem die Zellen über ihren nativen TCR restimuliert werden. Dass die CTL damit einhergehend ebenfalls in der Lage sind, Tumorzellen zu lysieren, wurde dadurch bestätigt, dass chRec VZV-CTL auch nach zehn oder elf Stimulationen eine effiziente Lyse antigenpositiver Tumorzellen im Chrom-Release-Assay zeigten. Mit chRec modifizierte VZV-spezifische CTL könnten daher potente Effektorzellen einer T-Zell-vermittelten Immuntherapie darstellen.

5.10 Klinische Anwendbarkeit VZV-spezifischer CTL

Ein mögliches Therapiekonzept für den klinischen Einsatz der modifizierten VZV-spezifischen CTL wird in Abb. 5-3 vorgestellt. Zu Beginn der Therapie würden PMBCs des Patienten oder seines Knochenmarkspenders isoliert werden, um VZV-spezifische T-Zellen zu transduzieren und expandieren. Nach einer Knochenmarktransplantation würden die modifizierten CTL transfundiert, um verbliebene Tumorzellen zu eliminieren. Im Falle eines Rezidivs könnte dann durch die Vakzinierung mit dem VZV-Impfstoff eine gezielte Reaktivierung der chRec exprimierenden VZV-CTL bewirkt werden, die aufkommende Tumorzellen eliminieren würden, bevor das Rezidiv sich komplett ausbilden kann.

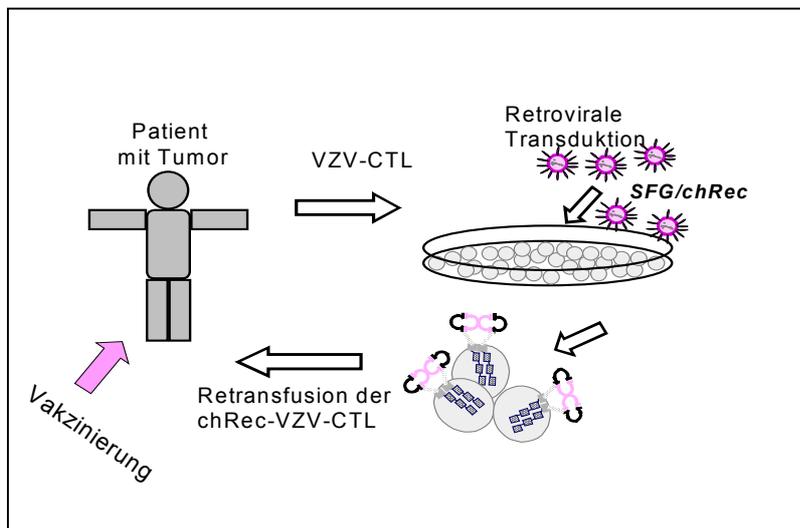


Abb. 5-3: Mögliches Therapiekonzept einer Immuntherapie mit chRec modifizierten VZV-CTL. VZV-spezifische CTL würden aus dem Blut des Patienten oder seines Knochenmarkspenders mit chRec retroviral transduziert und expandiert. Nach Retransfusion der modifizierten Zellen würde im Falle eines Rezidivs durch eine VZV-Vakzinierung die spezifische T-Zellantwort gezielt reaktiviert.

Vor einer möglichen klinischen Anwendung im Patienten sollte jedoch die Möglichkeit eines Tiermodells diskutiert werden. Denkbar wäre ein NOD/SCID-Modell [“non-obese diabetic severe combined immunodeficiency”] der Maus. In diesem System wäre es möglich, humane *in vitro* generierte VZV-CTL zu transfundieren und die *in vivo* Funktionalität der CTL durch gleichzeitige oder vorherige Injektion von Tumorzellen zu untersuchen. Als Vergleichspopulation würden Mäuse zwar Tumorzellen, aber keine CTL erhalten. Ob es jedoch möglich ist, eine adäquate Reaktivierung der modifizierten CTL durch die Vakzinierung *in vivo* zu erreichen, erscheint fraglich. Obwohl im murinen Milieu Dendritische Zellen (DC) zur Antigenpräsentation nach Verabreichen der Vakzine vorhanden sind, ist nicht sicher, ob die Interaktion zwischen den Maus-DC und den humanen T-Zellen

eine Expansion der CTL induzieren kann. Aus diesem Grund werden von Kershaw et al. murine modifizierte T-Zellen eingesetzt, um die Effektivität der chRec modifizierten CTL *in vivo* zu analysieren (Kershaw *et al.*, 2004; Haynes *et al.*, 2002). Um in der Maus einen humanen Tumor zu etablieren, müssen aber auch diese Tiere immunsupprimiert sein. Ein immunkompetentes Modell für den Einsatz chRec modifizierter CTL steht bislang nicht zur Verfügung. Die Modifikation muriner T-Zellen, welche in ihrem physiologischen Milieu zirkulieren könnten, kann für die Übertragung VZV-spezifischer CTL ins Maussystem nicht genutzt werden, da VZV als selektiv humanpathogenes Virus ausschließlich im humanen System eine T-Zellantwort auslöst. Zwar wurde in der Arbeitsgruppe von AM Arvin ein Mausmodell entwickelt, mit dem sich die VZV-Infektion und Replikation untersuchen lässt (Baiker *et al.*, 2004; Besser *et al.*, 2003; Moffat *et al.*, 2004; Moffat *et al.*, 1995), eine T-Zell-vermittelte Immunität wurde aber auch in diesem Xenograft-System nur für humane T-Zellen untersucht. Durch die Übertragung der bisherigen *in vitro* Ergebnisse ins Mausmodell wären kaum neue Erkenntnisse zu erwarten, da sowohl der Tumor als auch die T-Zellen humanen Ursprungs sein müssten. Die Maus würde lediglich ein „*in vivo* Reagenzglas“ darstellen, deren Ergebnisse nicht auf den Menschen übertragbar wären.

Bezüglich des Differenzierungsstatus adoptiv transferierter Zellen wurden kürzlich klinisch relevante neue Erkenntnisse beschrieben. Im *in vivo* Modell CD8⁺ PMEL-1-(murines Homolog zum humanen, im Melanomen überexprimierten gp100) reaktiver CTL konnten Gattinoni et al. zeigen, dass eine Differenzierung bzw. mehrfache *in vitro* Stimulation der CTL vor Transfusion eine weniger effektive Anti-Tumorantwort auslösen konnte als die Transfusion naiver oder intermediär differenzierter Effektorzellen. Die *in vitro* Zytotoxizität und Sekretion von IFN- γ korrelierten sogar negativ mit der späteren Effektivität der Zellen *in vivo* und bescheinigten den prästimulierten CTL eine geringere „Fitness“. Die Autoren begründen diese unerwarteten Ergebnisse mit dem Herunterregulieren kostimulatorischer Moleküle wie CD27 und CD28 und der Homing-Kapazität der prästimulierten T-Zellen. Weiterhin sehen sie einen früheren Eintritt der Zellen in ein proapoptisches Stadium und Seneszenz, belegt durch die Expression verschiedener proapoptischer Proteine (Gattinoni *et al.*, 2005). Obwohl unter diesen Gesichtspunkten die *ex vivo* Expansion spezifischer tumorreaktiver T-Zellen nicht sinnvoll erscheint, stellt sich das Bild für eine Immuntherapie mit virus-spezifischen CTL anders dar. Da schon klinische Studien die Wirksamkeit EBV- und CMV-spezifischer CTL für die Kontrolle der Virusreaktivierungen zeigen konnten,

scheint die Effektivität dieser Zellen durch die vorherige Stimulation *ex vivo* nicht beeinträchtigt zu sein. Die Immunität wird zudem nicht nur kurzfristig gewährleistet, sondern auch langfristig gesichert, da transfundierte, markierte EBV-CTL auch Jahre später noch nachweisbar und funktionell waren. Natürlich vorkommende tumorspezifische T-Zellen sind oftmals nicht in der Lage, die Proliferation des Tumors zu kontrollieren, virus-spezifische T-Zellen hingegen bekämpfen eine Infektion sehr potent. Daher kann davon ausgegangen werden, dass für einen immuntherapeutischen Ansatz chRec modifizierter virus-spezifischer CTL die Prästimulation und Expansion *ex vivo* keinen Verlust der *in vivo* Effektivität der Zellen mit sich bringt.

5.11 Risiken der therapeutischen Anwendung

Aufgrund der Tatsache, dass VZV-spezifische CD4⁺ CTL auch natürlicherweise vorkommen und ihre Aktivität vom Immunsystem kontrolliert reguliert wird, sind Nebenwirkungen der Therapie durch die CD4⁺ CTL selber nicht zu erwarten. Folgende Bedenken könnten aber dennoch hinsichtlich einer therapeutischen Anwendung der beschriebenen Strategie bestehen:

- (1) Kreuzreaktion der transduzierten CTL mit gesundem Gewebe
- (2) Insertionsmutagenese

(1) Ein nicht zu vernachlässigender Aspekt bei der Therapie mit CD19-spezifischen T-Zellen stellt die Expression des Antigens auch auf gesunden B-Zellen dar, die nach Therapie mit CD19-spezifischen CTL zu einem humoralen Immundefekt führen könnte. Allerdings wird CD19 weder auf Stammzellen noch auf ausgereiften Plasmazellen oder Immunglobulinen exprimiert, so dass eine langfristige Schädigung des B-Zellpools nicht zu erwarten ist. Durch die Substitution mit Immunglobulinen könnte ein temporärer B-Zelldefekt behoben werden. Da CD19 nicht in löslicher Form ins Blut sezerniert wird, ist eine kompetitive Hemmung genmodifizierter CD19-spezifischer T-Zellen nicht zu erwarten. Weiterhin wird seit einigen Jahren Rituximab, ein monoklonaler Antikörper gegen CD20, welches ebenfalls auf gesunden B-Zellen exprimiert wird, ohne schwere Nebenwirkungen gut vertragen (van der Kolk *et al*, 2002). Da die modifizierten VZV-CTL nur im Falle eines Rezidivs gezielt reaktiviert würden, sollte eine Zytotoxizität gegen gesunde B-Zellen außerhalb der Therapie nicht auftreten.

Trotz der geringen Expression von G_{D2} in normalem Gewebe wurden in der klinischen Anwendung G_{D2}-spezifischer monoklonaler Antikörper dosis-abhängige neurologische Nebenwirkungen beobachtet (Handgretinger *et al*, 1995; Murray *et al*, 1996). Die Interaktion zwischen dem Antikörper und seinem Zielantigen wird durch eine hochaffine

Wechselwirkung charakterisiert. Im Gegensatz dazu besitzt die T-Zell-vermittelte Immunität die Fähigkeit, Affinitäten zu unterscheiden. Dies bedeutet die selektive Erkennung von Zielzellen, die mindestens eine intermediäre bis hohe Expression des Zielantigens aufweisen (Alvarez-Vallina & Russell, 1999; Hombach *et al*, 2000). Dieser Sicherheitsaspekt für die transduzierten T-Zellen wird dadurch unterstrichen, dass Tumorzellen, die G_{D2} nur in niedriger Dichte exprimierten, *in vitro* nicht spezifisch lysiert wurden (Rossig *et al*, 2001). Ähnliche Erkenntnisse wurden im Kontext eines weiteren chimären Rezeptors aus unserer Arbeitsgruppe beobachtet. Die Erkennung des tumorspezifischen Antigens, in diesem Fall der fetalen Untereinheit des Acetylcholinrezeptors (fAChR), resultierte erst nach Hochregulation des fAChR in einer effizienten Tumorzelllyse (Gattenloehner *et al*, 2005). Vor allem aber wurde nach Transfusion 14.G2a ζ -transduzierter EBV-CTL erst kürzlich in klinischen Untersuchungen in den USA bei Patienten in fortgeschrittenem Stadium keine Neurotoxizität beobachtet, so dass eine neuronale Schädigung als Nebenwirkung der Therapie nicht zu erwarten ist (M.Brenner, persönliche Mitteilung). Obwohl im Serum von Neuroblastom-Patienten auch lösliches G_{D2} nachgewiesen wurde, scheint dies keine kompetitive Inhibition mit modifizierten CTL zu verursachen. In *in vitro* Experimenten mit 14.G2a ζ -transduzierten PBMCs konnte keine Reduktion der Tumorzelllyse beobachtet werden, nachdem die Tumorzellen mit physiologisch relevanten Konzentrationen an löslichem G_{D2} koinkubiert worden waren. Dies lässt vermuten, dass das Antigen trotz konkurrierendem löslichem G_{D2} vornehmlich auf der Zielzelle über den chRec erkannt wird (Rossig *et al*, 2001). Da G_{D2} darüber hinaus in jedem Stadium und auch während einer Immuntherapie stabil exprimiert wird (Kramer *et al*, 1998), stellt es ein geeignetes Antigen für eine Tumorthherapie mit chimären Rezeptoren dar.

(2) Bei der Therapie eines genetischen bedingten Immundefektes konnten durch den Einsatz retroviral transduzierter Stammzellen in der französischen Arbeitsgruppe von Alain Fischer vielversprechende Erfolge erzielt werden. Als Nebenwirkung der Gentherapie traten vor zwei Jahren jedoch in zwei der zehn behandelten Kinder Leukämien auf, deren Ursache in der Insertion des Retrovirus in die Promoterregion des LMO-2-Gens lag (Fischer *et al*, 2004). Dieses Protoonkogen spielt eine Rolle bei der Zelldifferenzierung der entarteten $\gamma\delta$ -T-Zellen und wird für die maligne Transformation und Leukämieentstehung verantwortlich gemacht. In der Folge dieser Beobachtungen wurden zunächst alle klinischen Studien, in die Retroviren involviert waren, gestoppt. Inzwischen werden aber auch in Deutschland die Studien z.T. mit

erhöhten Sicherheitsaspekten fortgeführt. Entscheidend für die Einordnung des Risikopotentials ist dabei vor allem die Art der transduzierten Zelle. Im Unterschied zur französischen Studie, in der Stammzellen verändert wurden, ist das Risiko für die Modifikation von Lymphozyten deutlich geringer einzuschätzen. Darüber hinaus hat das therapeutische Gen – in dieser Arbeit das Einbringen chimärer Rezeptoren – keine Funktion für die Differenzierung der Zelle. Daher ist nicht zu erwarten, dass das Einschleusen von chRec-Genen zu einer vermehrten Proliferation der transduzierten Zellen führt. Dies wird unterstützt von der Tatsache, dass sich weder das Expansionsverhalten noch der Phänotyp der transduzierten VZV-CTL von nicht-modifizierten T-Zellen unterscheidet.

Sollte es dennoch zu Nebenwirkungen kommen, wäre es möglich, durch den Einbau sogenannter Suizid-Gene in den retroviralen Vektor die Sicherheit zusätzlich zu erhöhen. So ist es z.B. gelungen, das Gen der Herpes-Simplex-Virus-Thymidin-Kinase (HSV-*tk*) retroviral in allogene T-Zellen zu bringen, um diese zu kontrollieren. Im Falle von Nebenwirkungen kann dann durch die Gabe von Ganciclovir Apoptose in HSV-TK+ Zellen induziert werden (Bonini *et al*, 1997). Erste klinische Studien mit HSV-TK transduzierten T-Zellen zeigten jedoch eine Immunantwort auf die TK in 25% der Fälle (Ciceri *et al*, 1999), so dass diese Option nur bei schweren neurologischen Nebenwirkungen in Erwägung gezogen werden sollte. Eine Alternative wurde kürzlich von Straathoff *et al*. entwickelt. Diese nutzt das proapoptotische Molekül Caspase 9, fusioniert an das humane FK506 bindende Protein zur gezielten Induktion von Apoptose in so transduzierten Zellen. Die einfache Gabe eines selektiven CID („chemical inducer of dimerization“) führt zur Dimerisierung einhergehend mit dem Zelltod. Durch den Einsatz dieses humanen Moleküls wird die potenzielle Immunogenität des Suizid-Gens aufgehoben (Straathof *et al*, 2005).

6 Material und Methoden

6.1 Material

6.1.1 Kunststoffmaterialien

Molekularbiologie :

Gestopfte Pipettenspitzen	<i>Biozym Diagnostik</i>
Pipettenspitzen 10-1000µl	<i>Eppendorf</i>
1,5ml Eppendorf Tubes	<i>Eppendorf</i>
PCR Tubes	<i>Eppendorf</i>
Impfösen	<i>Sarstedt</i>

Isotopenlabor:

Na ₂ ⁵¹ CrO ₄	<i>Perkin Elmer</i>
Optiphase Super Mix	<i>Wallac</i>
Sealing Tape	<i>Wallac</i>
1450 Flexible 96-well plate	<i>Wallac</i>
³ H-Thymidin	<i>Perkin Elmer</i>
96-well Platten	<i>Wallac</i>
Filtermatten	<i>Wallac</i>
Einschweissfolien	<i>Wallac</i>

Zellkultur:

Falcon 15ml	<i>Greiner Labortechnik</i>
Falcon 50ml	<i>Greiner Labortechnik</i>
T75-Gewebekulturflaschen	<i>Greiner Labortechnik</i>
6-well Platten	<i>Nunc</i>
24-well Platten	<i>Nunc</i>
48-well Platten	<i>Nunc</i>
96-well-Platten, Rund- oder Spitzboden	<i>Greiner Labortechnik</i>
Ficoll Lymphoprep	<i>Biochrom</i>
PS-Abdeckplatten	<i>Nunc</i>

Einfrierröhrchen	<i>Nunc</i>
24-well Platte, nicht beschichtet	<i>Becton & Dickinson</i>
Spritze 20ml	<i>Braun</i>
Nalgene™ Filter 0,45µm	<i>Nalge Company</i>
FACS-Röhrchen	<i>BD Falcon</i>

MACS:

CD8 ⁺ -Micro-Beads	<i>Miltenyi</i>
MACS-Mini-Säulen	<i>Miltenyi</i>
MACS Magnet	<i>Miltenyi</i>

6.1.2 Geräte

Inkubator	<i>Heraeus Instruments</i>
Laminar Flow hood	<i>Zapf Instruments</i>
Mikroskop Axiovert 25	<i>Zeiss</i>
Gel Doc 2000	<i>Biorad</i>
Sub-Cell™ GT Agarosegel- Elektrophoresesysteme	<i>Biorad</i>
Magnetblock MidiMACS Separator	<i>Miltenyi</i>
MACS MultiStand	<i>Miltenyi</i>
γ/β-Counter 1450 Microbeta Trilux	<i>Wallac</i>
Schüttler Bakterienkultur	<i>Innova New Brunswick Scientific</i>
Vortex	<i>Heidolph</i>
Wasserbad	<i>Memmert</i>
Autoklav 2540EL Tuttnauer	<i>Systec Laborsysteme</i>
Heizblock TM130-6	<i>HLC</i>
Photometer (RNA/DNA-Gehalt)	<i>Biorad</i>
Megafuge	<i>Heraeus Instruments</i>
Zentrifuge 5417R	<i>Eppendorf</i>
Isotopenlabor Zentrifuge	<i>Sigma</i>

6.1.3 Kommerzielle Kits

Z-Competent E.coli Transformation Kit	<i>Zymo Research</i>
QIAGEN Plasmid Mini Kit	<i>Qiagen</i>
QIAprep Spin Miniprep Kit	<i>Qiagen</i>
QIAquick Gel Extraction Kit	<i>Qiagen</i>
Jetquick Gel Extraction Kit	<i>Genomed</i>
EndoFree™ Plasmid Maxi Kit	<i>Qiagen</i>
Oligotex™ mRNA Mini Kit	<i>Qiagen</i>
Superscript Kit für RT-PCR	<i>Qiagen</i>
Interferon- γ -ELISA	<i>Hölzel Diagnostik</i>
IL-4 ELISA	<i>Immunotools</i>
IL-10 ELISA	<i>Immunotools</i>
ELIspot Human Interferon- γ Kit	<i>Mabtech</i>

6.1.4 Antikörper und Zytokine

Antikörper

α -CD3, α -CD4, α -CD8, α -CD56, α -CD25, α -CD69	<i>BD Pharmingen</i>
α -CD154	<i>BD Pharmingen</i>
α -IgG1	<i>BD Pharmingen</i>
Perforin-PE	<i>BD Pharmingen</i>
α -Granulysin DH4	<i>Alan M. Krensky, Stanford, USA</i>
α -IL-2	<i>BD Pharmingen</i>
α -IFN- γ	<i>BD Pharmingen</i>
OKT-3	<i>Janssen-Cilag</i>
α -CD28 für Zellstimulation	<i>Phamingen</i>
α -MHC-I	<i>DakoCytomation</i>
α -MHC-II	<i>DakoCytomation</i>
α -CD19 (Blockierung)	<i>Chemikon</i>
1A7	<i>Titan Pharamceuticals</i>
Fast-Immune Control	<i>BD Pharmingen</i>

Zytokine

rhIL-2	<i>Chiron</i>
rhIL-4	<i>Immunotools</i>

6.1.5 Materialien für die Zellkultur

Sterilfilter	<i>Nalgene</i>
Neubauer-Zählkammer	<i>Merck KGaA, Darmstadt, D</i>
RPMI 1640	<i>GIBCO</i>
Dulbecco's MEM-Medium (DMEM)	<i>Invitrogen</i>
Humanes AB-Serum	<i>Cambrex/ Takara</i>
FCS	<i>Hyclone/Perbio</i>
Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM)	<i>GIBCO</i>
L-Glutamine	<i>GIBCO</i>
PBS	<i>GIBCO</i>
Insulin	<i>Sigma</i>
Trypsin/EDTA solution	<i>Biochrom KG, Berlin, D</i>
DMEM/HAMs F12	<i>PAA Laboratories</i>
G418	<i>Sigma</i>
Retronektin TM	<i>Cambrex/ Takara</i>
CFSE	<i>Sigma</i>
CyclosporinA (CsA)	<i>Sigma</i>
Brefeldin A (BFA)	<i>Sigma und BD</i>
Concanamycin A (ConA)	<i>Sigma</i>
GeneJuice	<i>Novagen</i>
Protaminsulfat	<i>Leo Pharma</i>
Paraformaldehyd (PFA)	<i>Serva</i>
Triton-X	<i>Sigma</i>
VZV-Antigen Virion	<i>Virion/Serion</i>
VZV-Glykoprotein-Mix	<i>Virion/Serion</i>
Kristallviolett	<i>Sigma</i>

6.1.6 Materialien für Molekularbiologie und Immunologie

Agar	<i>AppliChem</i>
Hefeextrakt	<i>AppliChem</i>
Glycerin (wasserfrei)	<i>AppliChem</i>
NaCl	<i>Merck</i>
Trypton	<i>AppliChem</i>
Agarose	<i>Serva</i>
Ethidiumbromid	<i>Roth</i>
DNase H ₂ O	<i>Qiagen</i>
DNA-Laufpuffer	<i>Fermentas</i>
DNA-Standard	<i>Fermentas</i>
Tween	<i>Caesar & Loretz</i>
H ₂ SO ₄	<i>Sigma</i>
BSA	<i>Sigma</i>
Tris	<i>AppliChem</i>

6.2 Medien

Bakterienkulturen

<u>LB medium</u>	1 % (w/v)	Trypton
	0.5 % (w/v)	Hefeextrakt
	1 % (w/v)	NaCl
	1.5 % (w/v)	Agar
für Platten		
<u>SOC-Medium</u>	2 % (w/v)	Trypton
	0.5 % (w/v)	Hefeextrakt
	10mM	NaCl
	2,5mM	KCl
	10mM	MgCl ₂ x 6H ₂ O
	10mM	MgSO ₄ x 7H ₂ O
	20mM	Glucose

Zellkultur

IMDM	GIBCO üblicherweise 10%-20% FCS, 2mM L-Gln
DMEM	GIBCO üblicherweise 10% FCS, 2mM L-Gln
RPMI	GIBCO üblicherweise 10% FCS, 2mM L-Gln
CD40B-Zell Medium	500ml IMDM, 50ml humanes AB-Serum (1/2h bei 56°C hitzeinaktiviert) 5ml L-Gln 250µl Insulin
Wild-Typ Medium	500ml DMEM/HAMs 12 50ml FCS 5ml L-Gln 5ml HEPES (1M, steril)
Selektions Medium	Wild-Typ Medium + 5ml G418

6.3 Puffer und LösungenELISA

Coating Buffer	PBS, pH 7,2-7,4
HRP Streptavidin Buffer	PBS, 0,1% (v/v) Tween20; 1% (w/v) BSA
Saturation Buffer	PBS, 5% (w/v) BSA
Standard Diluent Buffer	PBS, 1% (w/v) BSA
Waschpuffer	PBS, 0,05% (v/v) Tween20

ELISPOT

Waschpuffer	PBS, pH 7,2-7,4
Diluent Buffer	PBS, 0.5% FCS

FACS:

FACS-Puffer	PBS, 2%FCS
-------------	------------

intrazelluläre Färbungen

Waschpuffer	PBS, 1% FCS
Permeabilisierungspuffer A	PBS, 0,1% Saponin, 1% FCS
Permeabilisierungspuffer B	PBS, 0,1% Saponin, 5% FCS

MACS:

MACS-Puffer	500 ml PBS, 0,5% (w/v) BSA, 2 mM EDTA
-------------	---

6.4 Zelllinien

A-204

human, Rhabdomyosarkom, adhären (Monolayer), G_{D2}- und CD19- (Giard *et al*, 1973)

Flyrd18

stammt von der humanen Fibrosarkomzelllinie HT1080 ab, Wirtsbereich vergleichbar mit amphotrop. Retroviren der stabilen Produktionzelllinie Flyrd18 (Cosset *et al*, 1995) besitzen das Hüllprotein des feline endogenen Virus RD114 und nutzen als Rezeptor auf den Wirtszellen einen Transporter neutraler Aminosäuren (Rasko *et al*, 1999). Da sie einen Tropismus für humane hämatopoetische Zellen zeigen (Kelly *et al*, 2000), können sie für die Infektion humaner T-Lymphozyten verwendet werden.

K-562

Humane CML-Linie, Suspensionszellen; MHC-I-, MHC-II-; EBV-, HBV-, HCV-, HHV-8-, (Lozzio & Lozzio, 1979; Matsuo & Drexler, 1998)

NIH3T3

adhären wachsende murine Fibroblasten-Zelllinie, (JAINCHIL.JL *et al*, 1969)

NIH3T3 tCD40L

Murine NIH3T3 stabil transfiziert mit dem humanen CD40L, (Urashima *et al*, 1995)

PG13

murine Fibroblastenzelllinie, deren Wirtsbereich vergleichbar ist mit amphotrop. PG13-Zellen (Miller *et al*, 1991) produzieren retrovirale Vektoren mit Gibbonaffen Leukämievirus (GALV)-Hülle, die die Zellen über das Phosphat-Transportprotein Glvr-1 (Pit1) (Kavanaugh *et al*, 1994a) infizieren. Da Pit1 sehr stark auf Knochenmarkzellen exprimiert wird, ist die Transduktion myeloischer und lymphatischer Zellen mit Viren dieser Zelllinie effektiver als mit Viren mit amphotroper Hülle (Bauer *et al*, 1995; Bunnell *et al*, 1995)

Phoenix-Ampho

stammt von humaner embryonaler Nierenzelllinie 293 ab, Wirtsbereich amphotrop (Fisher *et al*, 1995); Retroviren, die eine amphotrope Hülle besitzen, infizieren ihre Wirtszellen über das Phosphat-Transportprotein Ram1 (Pit2) (Kavanaugh *et al*, 1994). Da dieser Rezeptor auf

eukaryontischen Zellen sehr weit verbreitet ist, ist das Wirtsspektrum dieser Retroviren sehr groß (Cone & Mulligan, 1984) Ihr Wirtsbereich umfasst sowohl murine als auch nichtmurine (auch humane) Zellen.

Phoenix-Eco

stammt von humaner embryonaler Nierenzelllinie 293 ab, Wirtsbereich ecotrop (Fisher *et al*, 1995)

Raji

human, Burkitt's Lymphom, Suspensionszellen, G_{D2}⁻, CD20+, CD19+ (Pulvertaft, 1964)

Reh

Humane B-Vorläufer Leukämie, Suspensionszellen, CD19+, CD20+,EBV-, HBV-, HCV-, HHV-8- (Rosenfeld *et al*, 1977;Matsuo & Drexler, 1998)

Lan-1

Humane Neuroblastom-Zelllinie (Los-Angeles Neuroblastoma) (Dr. Seeger, UCLA, Los Angeles, USA)

Lan-5

Humane Neuroblastom-Zelllinie (Los-Angeles Neuroblastoma) (Dr. Seeger, UCLA, Los Angeles, USA)

6.5 Molekularbiologie

6.5.1 *Escherichia coli* K12 Stämme

	Genotyp
DH5α [Invitrogen]	F ⁻ 80dlacZM15 (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(r _k ⁻ , m _k ⁺) phoA supE44 ⁻ thi-1 gyrA96 relA1
DH10B [Invitrogen]	F ⁻ mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZM15 lacX74 recA1 endA1 ara139 (ara, leu)7697 galU galK - rpsL (Str ^R) nupG

6.5.2 Präparation z-kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

In einem 500 ml-Erlenmeyerkolben wurde 50ml SOB-Medium mit 500µl einer frischen üN *Escherichia coli*-Kultur (LB-Medium) angeimpft. Die Kultur wurde bis zu einer O.D. von

0,4-0,6 bei RT inkubiert (Rotations-Inkubator, 225 rpm) Die Bakterienkultur wurde 10min. auf Eis inkubiert und anschließend 6 min bei 3000g, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5 ml eiskaltem Waschpuffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation für 6 min bei 3000g, 4°C wurde der Überstand verworfen und das Pellet wiederum in 5 ml kaltem Kompetent-Puffer resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 20µl Aliquots bei -80°C gelagert.

6.5.3 Transformation z-kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Pro Transformations-Ansatz wurde ein Aliquot kompetenter Zellen (20µl) auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe der DNA wurde der Ansatz sorgfältig gemischt und für 15-60 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz auf eine Platte mit vorgewärmten (37°C) Selektionsmedium (Ampicillin [100µg/ml]) ausplattiert. Die Inkubation erfolgte ü/N bei 37°C.

6.5.4 Isolierung von Plasmid DNA

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte nach Angaben der Hersteller mit Hilfe der Plasmid-Mini-Kits.

6.5.5 Restriktionsverdau von DNA

Der Verdau von Plasmid-DNA erfolgte üblicherweise in einem Volumen von 20µl bei 37°C für 2h. Ein typischer Reaktionsansatz setzte sich dabei aus folgenden Reagenzien zusammen:

1-4µl Plasmid-DNA
2µl Puffer (10x)
2µl BSA (10x) [wenn für das Enzym angegeben]
1µl Restriktionsenzym I
1µl Restriktionsenzym II
ad 20µl H ₂ O

6.5.6 DNA Ligation

Insert- und Vektor-Restriktionsfragmente, die durch die Ligasereaktion miteinander verknüpft werden sollten, wurden nach der Restriktion der DNA und Inaktivierung der

Restriktionsendonukleasen in unterschiedlichen Insert/Vektor-Ratios in die Ligation eingesetzt. Die erforderliche Insert/Vektor-Ratio wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Größe Insert (kb)} \times \text{Menge Vektor (ng)} \times \text{Ratio (Insert/Vektor)}}{\text{Größe Vektor (kb)}} = \text{Menge Insert (ng)}$$

Ein typischer Reaktionsansatz für eine Ligationsreaktion mittels T4 DNA Ligase wurde üN bei 16°C inkubiert:

x µl Insert-DNA
yµl Vektor-DNA
2 µl Ligase-Puffer (10x)
2 µl T4 DNA Ligase (1000 U/µl)
ad 20 µl H ₂ O

6.6 RNA-Isolierung aus Zelllinie

Die Isolierung zellulärer RNA erfolgte nach Angaben der Hersteller mit dem Rneasy Kit. Die Qualität der RNA wurde anschliessend photometrisch bestimmt. Reine RNA weist eine O.D.₂₆₀/O.D.₂₈₀-Ratio von 1,8-2,1 auf. Die RNA wurde bei -80° gelagert.

6.7 Reverse Transkription in cDNA

Das Enzym Reverse Transkriptase nutzt eine einzelsträngige RNA-Probe als Matrize für die Synthese eines komplementären DNA-Stranges in Anwesenheit eines Primers. Zu dem Reaktionsansatz wurde 1µg RNA mit nukleasefreiem H₂O auf 10µl ergänzt. Nach Zugabe von 2µl OligodT (50µM) wurde der Reaktionsansatz 10min. bei 70°C kurz auf Eis abgekühlt und 1min. bei 8000rpm abzentrifugiert. Nach Zusatz von je 7µl Reaktionsmix (4µl 5xPuffer, 2µl 0,1M DTT, 1µl 10mM dNTPs) wurde die Proben für 2min. bei 42°C inkubiert. Der Zugabe von 1µl Reverser Transkriptase (Superscript) folgte eine weitere Inkubation bei 42°C für 60min. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

6.8 Isolierung endotoxin-freier Plasmid-DNA

Diese Methode wurde zur Isolierung von großen Mengen (bis 500 µg) hochreiner endotoxin-freier Plasmid-DNA für die Herstellung der Produktionszelllinien angewendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben mit dem EndoFree™ Plasmid Maxi Kit

6.8.1 Gelelektrophorese

Die Durchführung der Gelelektrophorese erfolgte in mit TAE-Puffer gefüllten Horizontalgelkammern. 0,8-1% Agarose wurde in TBE-Puffer in der Mikrowelle bis zum Siedepunkt erhitzt und nach Abkühlung auf ca. 50°C und der Zugabe von 1µl Ethidiumbromidlösung in einen Gelträger gegossen.. Nach der Auspolymerisierung des Gels (ca. 30min) wurden die Proben mit 5µl Gel-Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert.. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 100 bis 130 Volt für 1,5 bis 2,5 h (analytische Gele) bzw. 4 bis 5 h (präparative Gele) bzw. 5-10 V/cm. Die Analyse der DNA-Moleküle erfolgte unter UV-Licht (254 nm) mit einer CCD-Kamera.

6.8.2 Isolierung der DNA aus Agarosegelen

Die Isolation von DNA erfolgte mittels des Qiagen Kits nach Angaben der Hersteller. Die DNA wurde üblicherweise in einem Volumen von 30µl H₂O eluiert.

6.9 Oligonukleotid-Primer

Name	Sequenz	T _m
gE sense	CGG CTT ATG GGG ACA GTT AAT	69°C
gE antisense	CGG TGA TCA CCG GGT CTT	69°C
gI sense	TTC GCG ATG TTT TTA ATC CAA	63°C
gI antisense	CTT GTT CTA TTT AAC AAA CGG	63°C
Foxp3 A	AGG AVT TCV TCA AGC ACT GCC AG	
Foxp3 B	TCC GTT TCT TGC GGA ACT CC	

Primer in 5' → 3' Orientierung

6.9.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die PCR wurde üblicherweise mit der Taq DNA Polymerase der Firma Fermentas durchgeführt. Ein typischer Reaktionsansatz setzt sich dabei zusammen aus:

PCR-Puffer (10x)	0,5 µl
Taq Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl
sense Primer (25 µM)	1 µl
antisense Primer (25 µM)	1 µl
MgCl ₂	1,6µl

dNTPs	0,5µl
cDNA/DNA-Template	1 µl
bidest. H ₂ O	ad 20 µl

PCR-Protokoll:

<u>94°C Denaturierung</u>	4 min.	} 25-35Zyklen
94°C	55-60°C (abhängig vom Primerpaar)	
72°C	45 sec	
<u>72°C</u>	60 sec	
72°C	10 min.	
4°C	forever	

6.9.2 Vektoren

Rekombinante Retroviren sind effiziente Vektoren für die Übertragung von Genen in Säugetierzellen (Riviere *et al*, 2000). Als Kontrollvektor für Transduktionen wurde der Vektor SFG/EGFP eingesetzt, der das Reportergen für „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP) trägt. EGFP ist eine Variante des „Green Fluorescent Protein“ aus *Aequorea victoria* (Zhang *et al*, 1996) mit verschiedenen Punktmutationen gegenüber dem Wildtyp-Protein, das die Fluoreszenz in Säugetierzellen verstärkt. Der Vektor MSCV-IRES-GFP trägt die Nukleotidsequenz für das Reportergen „green fluorescent protein“ (GFP) aus *Aequorea victoria* (Prasher *et al*, 1992), das ebenfalls im Durchflußzytometer detektiert werden kann. Da das stromabwärts gelegene Transgen (z. B. für gE) über eine IRES-Einheit mit GFP verbunden ist, ist davon auszugehen, dass bei Expression des GFP auch das Transgen exprimiert wird.

Name	Beschreibung	Ref.
MSCV-IRES-GFP	<u>M</u> urine- <u>s</u> tem- <u>c</u> ell- <u>v</u> irus with an <u>i</u> nternal <u>r</u> ibosome <u>e</u> ntry <u>s</u> ite, fused with <u>g</u> reen- <u>f</u> luorescent- <u>p</u> rotein; Ampicillin-resistant	(Persons <i>et al</i> , 1998)
MSCV-I-gE	MSCV-IRES-GFP, welcher zusätzlich Glykoprotein E aus Varicella-Zoster-Virus enthält, subkloniert aus MSCV-I-GFP und pCR-gE; Ampicillin-resistant	diese Arbeit
MSCV-I-gI	MSCV-IRES-GFP, welcher zusätzlich Glykoprotein I aus VZV enthält,	diese Arbeit

Name	Beschreibung	Ref.
	subkloniert aus MSCV-I-GFP und pCR-gI; Ampicillin-resistent	
pCR-gE	pCR3.1 Klonierungsvektor [Invitrogen] mit dem Glykoprotein E aus VZV; Ampicillin-resistent	Arvin AM
pCR-gI	pCR3.1 Klonierungsvektor [Invitrogen] mit dem Glykoprotein I aus VZV; Ampicillin-resistent	Arvin AM
SFG/EGFP	Retroviraler Vektor zur Transduktion hämatopoetischer Zellen, enthält die LTR des moloney-murine-leukemia-virus (MMLV), fusioniert mit EGFP	(Riviere <i>et al</i> , 1995)

6.10 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Laminar Flow Hood mit ausschließlich sterilen Materialien vorgenommen.

6.10.1 Kultivierung von Suspensions- und adhärenenten Zellen

Die Kultivierung erfolgte in Gewebekulturflaschen oder Multiwell-Platten bei 37°C und 5% CO₂ im Feuchtbrutschrank. Wenn nicht anders angegeben, wurde als Kulturmedium RPMI 1640 (10% FCS, 2 mM L-Gln) verwendet. Das Kulturvolumen richtete sich nach der Größe des Zellkulturgefäßes.

6.10.2 Splitten von Suspensionszellen

Zellkulturen, deren Kulturmedium verbraucht war (pH-Indikator des Kulturmediums verfärbte sich von rot nach gelb-orange), wurden in ein Röhrchen überführt und für 5min bei 420g (RT) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in z.B. 10ml Kulturmedium resuspendiert. Für ein Splitten von z.B. 1:10 oder 1:5 wurden je 1 oder 2ml der Suspension in Zellkulturgefäße überführt und mit Medium auf das ursprüngliche Volumen (10ml) aufgefüllt.

6.10.3 Splitten adhärenenter Zellen

Das verbrauchte Kulturmedium wurde aus der Gewebekulturflasche entnommen und verworfen. Nach einmaligem Waschen mit 5ml sterilem PBS wurden 2ml Trypsin/ EDTA-Lösung zu den adhärenenten Zellen pipettiert und die Zellen anschließend für 3-5min bei 37°C

und 5% CO₂ inkubiert bis sich die Zellen abgelöst hatten. Durch Zugabe von 5-10ml FCS-haltigem Kulturmedium wurde das Trypsin inaktiviert und die Zellsuspension aus der Gewebekulturflasche in ein Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 420xg (RT) wurde das Zellpellet in einem geeigneten Volumen Kulturmedium resuspendiert und entsprechend auf die Kulturflaschen verteilt. Das ursprüngliche Volumen wurde mit Medium aufgefüllt.

6.10.4 Kryokonservierung eukaryontischer Zellen

Nach Ermittlung der Zellzahl der Kulturen wurden die Zellen 5min bei 420g (RT) zentrifugiert und der Überstand verworfen. 5-10x10⁶ Zellen wurden in 1ml Einfriermedium [50% FCS, 40% Kulturmedium, 10% DMSO] resuspendiert und in Einfrierröhrchen überführt. In einer Einfrierbox (mit Isopropanol) wurden die Zellen zunächst bei -80°C eingefroren und nach 2 Tagen wurden in flüssigen N₂ (-196°C) überführt. Die tiefgefrorenen Kulturen sind mehrere Jahre haltbar.

6.10.5 Auftauen eukaryontischer Zellen

Um konservierte Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden in einem 15ml-Röhrchen 10ml Medium vorgelegt und die Zellen rasch im Wasserbad (37°C) aufgetaut. Die aufgetauten Zellen wurden in das Röhrchen überführt und für 5min bei 420xg (RT) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5-10ml Medium resuspendiert und in einem geeigneten Zellkulturgefäß kultiviert.

6.10.6 Zellzahlbestimmung

Für die Bestimmung der Zellzahl wurde je ein Aliquot der entsprechenden Zellsuspension 1:2 mit Trypanblau verdünnt. Trypanblau färbt ausschließlich defekte Zellen an, da es intrazellulär an Proteine bindet und erst bei einer Permeabilisierung der Membranen in die Zellen gelangt. Eine Neubauer-Zählkammer wurde mit 10-20µl dieser Verdünnung befüllt und die 4 großen Quadrate des Zählgitters ausgezählt. Die Konzentration der Zellen und die entsprechende Zellzahl ergeben sich aus folgender Formel:

x = Zellzahl (Summe der 4 Quadrate)

A = Verdünnungsfaktor (2)

$$x/4 \times A \times 10.000 = \text{Zellzahl/ml}$$

6.11 Transfektion und Transduktion

6.11.1 Transfektion von Phoenix-Zellen

Für die Generierung einer stabilen Produktions-Zelllinie wurden 1,5 75 cm²-Gewebe-kulturflaschen mit 80% konfluenten Phoenix-Zellen wurde auf drei 6-Multiwell-Platten verteilt [2ml/well]. Die Platten wurden sofort und nach einer Stunde vorsichtig geschwenkt und anschliessend für 18-24h bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert bis die Phoenix-Zellen eine Konfluenz von 60-80% erreicht hatten. Für die Transfektion der Phoenix-Zellen wurde je Platte [6 wells] ein Reaktionsmix hergestellt, mit dem die Zellen inkubiert wurden. Dabei wurde zunächst das DMEM in ein Eppendorfgefäß vorgelegt, das GeneJuice-Transfektionsreagenz wurde sorgfältig resuspendiert und dem Medium zugegeben. Nach Zugabe der Plasmid-DNA wurde der Ansatz für 15-45min bei RT inkubiert.

Reaktionsansatz:

	pro well (1x)	pro Platte (6,5x)
serumfreies DMEM	ad 100 µl	ad 650 µl
GeneJuice	3 µl	19,5 µl
Plasmid-DNA	1,5 µg	9,75 µg

Nachdem den Phönix-Zellen frisches Medium [2ml DMEM (10% FCS)/well] gegeben wurde, konnte der Reaktionsansatz (100µl/well) tropfenweise und gleichmäßig auf den Zellen verteilt werden. Nach vorsichtigem Schwenken wurde die Platte für 24h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Kulturmedium der Phoenix-Zellen durch 1ml IMDM (20% FCS) pro well ersetzt. Die Platten wurden 24h bei 32°C und 5%CO₂ inkubiert. Für die anschliessende Transduktion der Produktionszelllinien PG13 wurden die Überstände der transfizierten Phoenix-Zellen abgenommen und durch einen 0,45µm-Filter filtriert, um eventuell vorhandene Zellen zu entfernen. Die filtrierten Überstände wurden à 1ml aliquotiert und bei -80°C gelagert.

6.11.2 Generierung stabiler PG13-Produktionszelllinien

Die gentechnischen Arbeiten (S2) sind nach dem Gentechnikgesetz genehmigt worden (Aktenzeichen: 64-M-1.1/01, Erweiterungsantrag: 64-M-1.16/02).

Für die Generierung stabiler Produktionszelllinien wurden PG13 aufgetaut und in DMEM (10% FCS) kultiviert. Die Zelldichte der PG13 wurde in einer 6-well-Platte so eingestellt, dass die Zellen nach Inkubation für 18-24h bei 37°C und 5% CO₂ eine Semikonfluenz (40-70%) zeigten. Um die stabile Transduktion der Zellen zu erreichen, wurde der virushaltige Überstand der Phoenix-Zellen eingesetzt. Dem filtrierten Aliquot (1ml) wurde Protaminsulfat (finale Konzentration: 4 µg/ml) zugegeben. Das Kulturmedium der PG13 wurde abgenommen und verworfen und stattdessen mit dem Virusüberstand für 12-24h bei 37°C und 5% CO₂ koinkubiert. Der retrovirushaltige Überstand wurde nun im Rhythmus von 12-24h abgenommen, verworfen und durch frisch aufgetauten Überstand mit Protaminsulfat ersetzt bis die Aliquots aufgebraucht waren. Bei starker Zellproliferation wurden die Zellen in eine 6-well-Platte gesplittet. Bei schlechter Zellmorphologie wurde der Überstand durch Kulturmedium ersetzt, und erst wieder nach 12- bis 24-stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ durch retrovirushaltigen Überstand ausgetauscht. Nach Abschluss der Transduktion wurden stabilen Produktionszelllinien in 75 cm²-Gewebekulturflaschen überführt und expandiert. Aliquots der Produktionszelllinien wurden bei -196°C eingefroren.

6.11.3 Retrovirale Transduktion humaner Zellen

6.11.3.1 Beschichtung von Kunststoffplatten mit Retronectin.

Retronectin ist ein rekombinantes Fibronectinfragment CH-296, das durch Kolo-kalisierung von Zellen und Viruspartikeln den Gentransfer verstärkt (Hanenberg *et al*, 1996). Für die Stammlösung wurde lyophilisiertes RetroNectin mit 500µl bidest. H₂O in einer Konzentration von 1mg/ml rekonstituiert. Diese Stammlösung wurde à 70µl aliquotiert und bei -20°C gelagert. Für die Transduktion wurden pro well 7µl RetroNectin-Stammlösung mit 1ml PBS verdünnt und auf ein well einer nicht für Gewebekultur beschichteten 24-well-Platte ausplattiert. Die Platte wurde mit Parafilm verschlossen und ü/N bei 4°C inkubiert.

6.11.3.2 Retrovirale Transduktion von VZV-CTL

Für die Produktion des virushaltigen Überstandes wurden stabile Produktionszelllinien eingesetzt, welche die chimären Rezeptoren 14.G2aζ oder CD19ζ exprimieren. Bei 14.G2aζ handelt es sich dabei um die humane Flyrd18-Linie, CD19ζ wird in murinen PG13 stabil exprimiert. Nach Auftauen und Kultivierung der Produktionszelllinien in Kulturmedium wurden die Zellen so gesplittet, dass sie einen Tag vor Transduktion eine Konfluenz von fast 100% aufwiesen. Um eine effiziente Virusproduktion zu gewährleisten, erfolgte in diesem

Stadium ein Mediumwechsel auf 5-6ml IMDM (20%FCS) und eine Inkubation der Zellen bei 32°C, 5%CO₂ für 24h. Der virushaltige Überstand der Zellen wurde dann abgenommen und mit einem 0,45µm Filter filtriert, um Zellen zu entfernen. PG13 und Flyrd18, die einmal Virus produziert hatten, wurden verworfen. Für die folgende Transduktion wurde der Überstand ggf. für mindestens 2h bei 14.000rpm und 4°C in einer Eppendorf-Tischzentrifuge ankonzentriert. Nach Zentrifugation wurden dann ca. 900µl des Überstandes verworfen. Nach kurzem Vortexen, 2minütiger Inkubation auf Eis und erneutem Vortexen wurde das Konzentrat dann resuspendiert und in Einfrierröhrchen überführt. Nicht benötigter Virusüberstand wurde bei -80°C gelagert. Für die Transduktion wurde dann entweder das virushaltige Medium oder das Viruskonzentrat verwendet. Nach dem Abnehmen der RetroNectin-Lösung wurde jedes well einmal mit 2ml Medium DMEM (10% FCS) gewaschen, anschliessend mit 500µl Virusüberstand überschichtet und weiter bei 32°C inkubiert. Im Falle des nicht konzentrierten Virusüberstandes wurde dieser alle 30-60min. abgenommen, verworfen und erneuert. Für die abschliessende Inkubation mit den Zellen wurde 1ml Virusüberstand eingesetzt. Im Falle des konzentrierten Virusüberstandes wurden die Zellen sofort mit 1ml des Überstandes inkubiert. VZV-CTL, welche am Tag vor der Transduktion die dritte Stimulation erhalten hatten, wurden in einer Konzentration von 2×10^6 /ml in Medium mit rhIL-2 aufgenommen und je 500µl auf der Platte mit dem Virusüberstand bei 37°C für 48h koinkubiert. Die Ernte der transduzierten Zellen erfolgte durch das Überführen der Zellen in ein 15ml-Falcon Röhrchen und anschliessende Zentrifugation (1400rpm, 5min.). Durch Resuspension in autologem Medium mit rhIL-2 [25U/ml] wurden die Zellen wieder in einer Dichte von $1-1,5 \times 10^6$ ausplattiert.

In dieser Arbeit kamen zwei verschiedene Methoden der Virusaufbereitung zum Einsatz. Entweder wurde die mit Retronektin vorbeschichtete Zellkulturplatte mit frischem Virusüberstand inkubiert, der halbstündig gewechselt wurde oder der virushaltige Überstand wurde durch Zentrifugation ankonzentriert und anschließend mit den Zellen auf die vorbeschichtete Platte gegeben und für 48h koinkubiert. Beide Methoden erbrachten vergleichbar gute Transduktionseffizienzen. Die Anreicherung des Virusüberstandes bringt zusätzlich aber einen logistischen Vorteil, indem sie es ermöglicht, den Virusüberstand einzufrieren und erst bei Gebrauch aufzutauen. Dies sorgt dafür, dass die Kultivierung der Produktionszelllinien unabhängig von der Generierung der VZV-CTL erfolgen kann und das

z.T. sehr unterschiedliche Wachstumsverhalten der Produktionszelllinien den Stimulationsrhythmus der VZV-CTL nicht verschiebt oder unterbricht.

6.12 Kultivierung spezifischer Zellen

6.12.1 Isolierung von PBMCs über Gradientenzentrifugation

Um PBMCs aus Vollblut zu isolieren, wurde das Blut zunächst in einem Verhältnis von 1:2 mit RPMI-Medium ohne Zusätze gemischt. In ein 50ml Falcon-Röhrchen wurden ca. 20ml Ficoll [Dichte:1,077] vorgelegt und mit dem Vollblut-Medium-Gemisch vorsichtig überschichtet. Durch Zentrifugation bei 1400rpm, RT und ohne Bremse erfolgte eine Separation gemäß der Dichte der Stoffe. Mit einer sterilen Transferpipette ließen sich die PBMCs, welche als Ring direkt auf dem Ficoll-Lymphoprep lagen, in ein weiteres Falcon-Röhrchen überführen. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit RPMI ohne Zusätze wurden die Zellen in RPMI (10%FCS) resuspendiert und gezählt. Üblicherweise erhält man eine Ausbeute von $2-3 \times 10^7$ PBMCs/10ml Blut. Für die weitere Verwendung wurden die PBMCs entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -80°C bzw. -196°C gelagert.

6.12.2 Herstellung des VZV-Lysates

Die Herstellung des VZV-Lysats wurde im Institut der Medizinischen Virologie, Universitätsklinikum Münster von Dr. Bodo Eing durchgeführt.

6.12.2.1 Kultivierung der MRC-5 Zellen

MRC-5 Zellen wurden bei 37°C , 5% CO_2 in MEM mit Antibiotika und 2% FCS in 175 cm^2 Gwebekulturflaschen inkubiert. Eine Flasche enthält ca. 2×10^7 Zellen. Einmal pro Woche wurden die Zellen passagiert und pro Passage per DAPI-Färbung und alle 8 Passagen per PCR auf Mykoplasmenkontamination getestet (freundlicherweise von Herrn PD Dr. med. Karsten Becker, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universitätsklinikum Münster durchgeführt)

6.12.2.2 Infektion der MRC-5 mit VZV

Konfluente MRC-5 wurden mit dem Varizellenimpfstoffpräparat Varilrix (Stamm OKA) bei einer Impfstoffdosis von 0,5 ml pro Kulturflasche [= 2000 Plaque forming units (PFU)/Flasche/ = einer M.O.I (multiplicity of infection) von 10^4 PFU/Zelle] infiziert. Nach einer Inkubation von 5-7 Tagen hatten die Zellen eine Plaque-Konfluenz von ca 50- 80% erreicht.

6.12.2.3 Antigenpräparation

Für die Antigenpräparation wurde das Medium (25ml pro Flasche) dekantiert und in ein 50ml-Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden mit 2ml PBS und sterilen Glaskügelchen (nicht Trypsin!!) abgelöst und die Suspension in das dekantierte Medium überführt. Nach Zentrifugation für 15min. bei 867xg und 4°C, wurde der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in Eppendorf-Tubes überführt und noch einmal für 2min. bei 2000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf einen kleinen Rest vorsichtig abgenommen und das Pellet bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Das Pellet (entspricht 2×10^7 infizierten Fibroblasten) wurde dann in 3,5ml sterilem PBS aufgenommen und gut resuspendiert. Die weitere Verarbeitung erfolgte in 10ml-Falcon-Röhrchen. Nach Inaktivierung der Infektiosität - durch Inkubation für 30min. bei 56°C - erfolgte eine 10minütige Behandlung im Ultraschallbad. Anschließend wurde die Suspension dreimal eingefroren (-80°C) und langsam wieder aufgetaut. Nach einer erneuten 10-minütigen Ultraschallbehandlung wurde der Debris durch Zentrifugation (10min. 867xg, 4°C) separiert. Der resultierende Überstand wurde vorsichtig abgenommen und für die Stimulation der VZV-CTL verwendet. Jede Charge wurde in einem ^3H -Thymidin-Assay separat auf ihre Qualität geprüft.

6.12.3 Gewinnung autologen Serums

Für die Kultivierung VZV-spezifischer CTL wurde Hyclone RPMI mit 2% autologem Serum als optimales Medium (autologes Medium) ermittelt. Für die Gewinnung des Serums wurde Blut in Serumröhrchen abgenommen und sofort für 10min. bei 3000rpm aus dem Vollblut separiert. Das Serum wurde aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

6.12.4 Generierung VZV-spezifischer T-Zellen

Für die Expansion VZV-spezifischer T-Zellen wurden frische PBMCs gesunder seropositiver Spender isoliert und in einer Dichte von 2×10^6 /well in autologem Medium auf einer 24-well-Platte ausgesät. Die initiale Stimulation erfolgte durch die Zugabe von 10-30µl VZV-Lysat (je nach Charge) für 1 Woche. Nach 3-tägiger Inkubation bei 37°C, 5%CO₂ erfolgte ein Mediumwechsel mit autologem Medium. Für die zweite Stimulation wurden die Zellen von der Platte abgenommen, gezählt und in einer Dichte von 1×10^6 wieder ausplattiert. Die Stimulation erfolgte durch bestrahlte (30Gy) autologe PBMCs, die entweder frisch isoliert oder

aufgetaut wurden und der Zugabe von 10-30µl VZV-Lysat. Wiederum nach 3 Tagen erfolgte ein Mediumwechsel, bei dem rhIL-2 [final 25U/ml] substituiert wurde. Durch die wöchentliche Stimulation mit autologen, bestrahlten PBMCs und VZV-Lysat wurden die Zellen in Anwesenheit von rhIL-2 expandiert.

6.12.5 Generierung EBV-spezifischer T-Zellen

Epstein-Barr-Virus (EBV) spezifische T-Zellen (EBV-CTL) wurden durch die Stimulation frisch isolierter PBMCs seropositiver Spender mit autologen LCL generiert. EBV-transformierte B-Zelllinien (LCL) wurden durch Infektion von PBMCs mit dem EBV-Stamm B95-8 im Labor von Cliona Rooney generiert und uns zur Verfügung gestellt. Die initiale Stimulation der EBV-CTL erfolgte mit 2×10^6 frisch isolierten PBMCs in einer Ratio von 40:1 in 24-well Platten. Autologe LCL wurden mit 30Gy bestrahlt und nach zweimaligem Waschen in Kulturmedium in einer Dichte von 5×10^4 /well mit den PBMCs koinkubiert. Als Kontrollen wurde je ein well ausschließlich mit PBMCs sowie ein well nur mit bestrahlten LCL ausplattiert. Die Zellen wurden für 9-12 Tage bei 37°C, 5% CO₂ kultiviert, an Tag 7 wurde 1ml Medium durch frisches Kulturmedium ersetzt. Für die zweite Stimulation wurden die Zellen mit einer Transferpipette von der Platte abgenommen und in sterilen Falcon-Röhrchen bei 1400rpm für 5min. zentrifugiert. Die Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^6 /ml in Kulturmedium resuspendiert und mit 1ml/well ausgesät. Nach Bestrahlung (30Gy) wurden autologe LCL in einer Stimulator: Effektor-Ratio von 4:1 mit $2,5 \times 10^5$ /well zugegeben und bei 37°C, 5%CO₂ inkubiert. Wenn die Zellen schlecht aussahen erfolgte nach 4 Tagen ein Mediumwechsel mit Zugabe von rhIL-2 in einer Konzentration von 50U/ml, sahen die Zellen noch gut aus, wurde rhIL-2 erst nach weiteren 3 Tagen zupipettiert. Jede folgende Stimulation erfolgte wöchentlich in einer 4:1 Ratio in Kulturmedium mit 50U rhIL-2/ml. Zweimal pro Woche wurde das Kulturmedium durch frisches ersetzt.

6.12.6 Generierung von CD40B-Zellen

6.12.6.1 Kultivierung der NIH3T3 tCD40L

NIH3T3 ist eine sehr schnell und adhärent wachsende Zelllinie, die zweimal pro Woche 1:10-1:20 gesplittet werden muss. Ihre Kultivierung findet in Selection Medium [Wild-Type-Medium substituiert mit G418] in 75cm² Gewebekulturflaschen statt. Die Zellen sollten nicht länger als 6Wochen in Kultur bleiben, daher wurden bereits in einer frühen Passage mehrere Aliquots eingefroren und bei -196°C gelagert. Das Splitten der Zellen wird durch

Trypsinierung vorgenommen. Für die Kultivierung werden die Zellen in einer Dichte von $1,5 \times 10^5$ /ml wieder ausgesät und bei 37°C , 5% CO_2 inkubiert.

6.12.6.2 Stimulation der CD40B-Zellen

Um aktivierte B-Zellen zu generieren, wurden PBMCs mit den NIH3T3 tCD40L über deren konstitutiv exprimierten humanen CD40L stimuliert. Dabei wurden die NIH3T3 tCD40L zunächst trypsinisiert, einmal mit PBS und Wild-Type-Medium gewaschen und anschliessend mit 150Gy bestrahlt. Die bestrahlten Zellen wurden dann in einer Dichte von 4×10^5 /well in 2ml Wild-Type-Medium auf einer 6-well-Platte ausgesät und bei 37°C inkubiert. Für eine Platte wurden somit $2,4 \times 10^6$ NIH3T3 benötigt. Üblicherweise wurden die Zellen am nächsten Tag, wenn sie wieder adhärent waren, für die Stimulation eingesetzt. Für die initiale Stimulation der frisch isolierten PBMCs wurden 8×10^6 PBMCs in 4ml CD40B-Cell-Medium mit rhIL-4 [10 μl /50ml Medium] sowie CsA [0,63 μl /ml Medium] resuspendiert. Nachdem den adhärennten NIH3T3 das Medium entfernt worden war, wurden die PBMCs zu den Stimulatorzellen pipettiert und für 8Tage bei 37°C , 5% CO_2 koinkubiert. Anschliessend wurden die Zellen zweimal pro Woche restimuliert. Nach Bestrahlung und Ausplattieren der NIH3T3 tCD40L am Tag vor der nächsten Stimulation, wurden die B-Zellen abgenommen, gezählt und in einer Dichte von $0,75-1 \times 10^6$ /ml wieder mit neuen bestrahlten NIH3T3 tCD40L inkubiert.

6.13 Funktionsanalysen

6.13.1 Untersuchungen der Zytotoxizität

6.13.1.1 Chrom-Freisetzungsversuch

Der Nachweis der Zytotoxizität von VZV-CTL erfolgte über die Freisetzung von radioaktivem Chrom (^{51}Cr) aus Tumortargetzellen. Dazu wurden verschiedene Tumorzelllinien mit ^{51}Cr markiert und in verschiedenen Effektor-zu-Target-Ratios mit transduzierten VZV-CTL inkubiert. ^{51}Cr bindet an intrazytoplasmatische Proteine und wird ins Medium freigesetzt, sobald die Tumorzelle lysiert wird. Die Chromfreisetzung korreliert dabei mit der Effektivität der Lyse. Um das Maß der spezifischen Lyse zu erhalten, werden zusätzlich die spontane und die maximale Lyse bestimmt. Die Spontanlyse entspricht der ^{51}Cr -Freisetzung aus Tumorzellen, die ohne Effektorzellen inkubiert wurden, die maximale Chromfreisetzung

ergibt sich durch die Zugabe eines Detergens (Triton X). Die Effizienz der Zellyse wird dann durch folgende Formel berechnet:

$$\text{Spezifische Zytolyse} = \frac{\text{Probenwert} - \text{Spontanfreisetzung}}{\text{Maximalfreisetzung} - \text{Spontanfreisetzung}}$$

Alle Versuche wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Zielzellen wurden abgenommen, zentrifugiert und das Pellet durch Ratschen in einem kleinen Volumen gelöst. Die Markierung erfolgte mit 100 μCi ^{51}Cr für 60-90 min. bei 37°C. Als Effektorzellen dienten VZV-CTL, die auf eine Dichte von jeweils $1 \times 10^6/\text{ml}$ eingestellt wurden. Die VZV-CTL wurden so in eine 96-Loch-V-Boden-Platte pipettiert, dass sich Effektor-zu-Target-Ratios (E:T-Ratio) von 40:1, 20:1, 10:1, 5:1 ergaben. Die Maximallyse wurde durch die Zugabe von 100 μl Triton X, die Spontanfreisetzung durch die Zugabe von 100 μl Kulturmedium zu den Targetzellen bestimmt. Im Isotopenlabor wurden die markierten Tumorzellen fünfmal gewaschen und auf eine Zelldichte von $2,5 \times 10^4/\text{ml}$ eingestellt. Je 100 μl [$2,5 \times 10^3$ Zellen] wurden zu den Effektorzellen pipettiert und für 4 h bei 37° und 5% CO_2 koinkubiert. Für die Analyse der ^{51}Cr -Freisetzung wurden pro Well 50 μl Überstand in eine 96-Loch-Mikrotiter-Platte überführt, mit 150 μl Opti Phase Super Mix vermischt und die Platte mit Klebefolie versiegelt. Die freigesetzte Radioaktivität wurde im Gammacounter ermittelt.

6.13.1.2 Langzeitkoinkubationsversuch

Für die Untersuchung der Zytotoxizität eines längeres Zeitraumes als 4h, wurde ein Koinkubationsansatz verfolgt. Auf einer 24-Well-Platte wurden $\text{G}_{\text{D}2}$ -positive oder -negative Tumorzellen in einer Dichte von 2×10^5 Zellen/well mit 14.G2a ζ -transduzierten oder nichttransduzierten VZV-CTL in Effektor-zu-Target-Ratios von 10:1, 4:1 und 1:1 koinkubiert. An Tag 0, 1, 2, 3 und 7 wurde durch Oberflächenfärbung des $\text{G}_{\text{D}2}$ der Anteil vitaler Tumorzellen an der Gesamtpopulation bestimmt.

6.13.2 ELISA [Interleukin-4, Interleukin-10, Interferon- γ]

Um die Zytokinsekretion der VZV-CTL als Antwort auf spezifische Stimulationen zu bestimmen, wurden ELISA für IFN- γ , Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-10 (IL-10) durchgeführt.

6.13.2.1 Koinkubationsansatz für ELISA

Um die Zytokinantwort der VZV-CTL nach spezifischer Stimulation zu testen, wurden die Zellen mit antigen-positiven und –negativen Tumorzelllinien koinkubiert. Dabei wurden alle Ansätze als Doppel- oder Dreifachbestimmungen durchgeführt. CTL wurden in einer Dichte von 5×10^4 in einem Volumen von 150 μ l autologem Medium mit rhIL-2 [25U/ml] in eine 96-well-Platte vorgelegt und mit den Tumortargets in einer Dichte von $1,5 \times 10^5$ in 100 μ l Medium zusammengegeben. Von diesem Ansatz wurden nach einer Inkubationszeit von 72h bei 37°C, 5% CO₂ je 200 μ l/well in eine neue 96-well-Platte überführt. Der Überstand wurde dann entweder direkt analysiert oder bis zur Verwendung bei –80°C gelagert.

6.13.2.1.1 IFN- γ ELISA

Für die Bestimmung des Parameters IFN- γ wurde der ELISA der Firma Hölzel, Köln nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

6.13.2.1.2 IL-4 & IL-10 ELISA

Um die Sekretion an IL-4 und IL-10 zu analysieren wurde das System der Firma Immunotools ebenfalls nach Angaben der Hersteller angewandt.

6.13.3 ELISPOT

Um die Spezifität der VZV-CTL für einige VZV-Proteine nachzuweisen, wurden VZV-CTL mit VZV-Antigen exprimierenden Targetzellen inkubiert und die spezifische IFN- γ Sekretion im ELISPOT analysiert. Der ELISPOT erlaubt so eine Aussage über die Anzahl VZV-antigen-spezifischer Zellen. Als Targetzellen wurden verschiedene Zellen eingesetzt. Zum einen waren dies autologe EBV-LCL von zwei Spendern, die durch die Infektion mit Vaccinia-Virus-Rekombinanten die VZV-Antigene IE62 oder gE exprimierten. Als Kontrolle wurden LCL mit Vaccinia-Virus-Rekombinaten infiziert, welche GFP enthielten. Alternativ wurden autologe CD40B Zellen mit den entsprechenden Vaccinia-Virus-Rekombinanten infiziert und als Targetzellen eingesetzt. Für einen Spender standen weiterhin autologe Fibroblasten zur Verfügung, welche entweder ebenfalls Vaccinia-infiziert oder mit VZV-Lysat beladen wurden. Für Blockierungsexperimente wurden die Ansätze mit den Antikörpern und den Targetzellen koinkubiert.

6.13.3.1 Vaccinia-Virus-Produktion

Die Arbeiten zum Umgang mit Vaccinia-Virus-Rekombinanten wurden genehmigt unter dem Aktenzeichen 64-M-1.13/05. Die Produktion infektiöser Vaccinia-Virus-Rekombinanten fand in humanen TK-143 Zellen statt. Die adhärent wachsenden TK-143 wurden in 75cm² Gewebekulturflaschen in DMEM (10%FCS) kultiviert. Eine Flasche wurde 1:10 auf 2-4 Flaschen gesplittet und für ca. 2 Tage bei 37°C bis zu einer Konfluenz von ca. 80% inkubiert. Das Medium wurde abgenommen und verworfen. 100µl des Vaccinia-Virus-Stocks [freundliche Gabe von John Hay, Buffalo] wurden dann zusammen mit 5ml DMEM, 10%FCS auf die Zellen gegeben und für 1h bei 37°C und gelegentlichem Schütteln inkubiert. Nach Zugabe von weiteren 10ml Medium wurden die Zellen für 36h bei 37°C kultiviert, bis die Zellen sich abrundeten und sich leicht ablösen ließen. Die Zellen wurden nun durch leichtes Schlagen der Flasche geerntet und in einem 50ml Falcon Röhrchen für 5min. bei 1400rpm zentrifugiert. Der Überstand der Zellen wurde verworfen, da das Virus strikt zellassoziiert vorliegt. Das Pellet wurde in 2ml DMEM (20%FCS) resuspendiert und dreimal für je 15min. bei -80°C eingefroren und wieder aufgetaut. 100µl Aliquots wurden in sterile Eppendorf Gefäßen bei -80°C gelagert. Folgende Vaccinia-Virus-Rekombinanten wurden in dieser Arbeit verwendet:

	Beschreibung	Referenz
VV-GFP	Vaccinia-Virus-Stamm WR, enthält als Reportergen GFP unter Kontrolle des Vaccinia-p11-Promoters	Zur Verfügung gestellt von C.Rooney, Houston
VV-gE	Vaccinia-Virus-Stamm WR, enthält Glykoprotein E aus VZV unter der Kontrolle des Vaccinia-p11-Promoters	Zur Verfügung gestellt von J.Hay, Buffalo, USA
VV-IE62	Vaccinia-Virus-Stamm WR, enthält IE62 aus VZV unter der Kontrolle des Vaccinia-p11-Promoters	Sharp et al., 1992 Zur Verfügung gestellt von J.Hay, Buffalo, USA

6.13.3.2 Vaccinia-Virus-Titration

Für die Titration der Virus-Stocks wurden humane TK-143 Zellen auf 24-well-platten in einer Dichte von 1×10^5 /well ausplattiert und für ca.24h kultiviert. In einer Verdünnungsreihe wurden je 100µl des Virusstocks in sterilen Eppendorf-Tubes zu 900µl DMEM (10%FCS) pipettiert, von dieser Verdünnung wurden wiederum 100µl in das nächste Tube überführt. Zwischen jedem Pipettierschritt wurde die Pipettenspitze gewechselt. Die Verdünnungen wurden in Vierfachansätzen bis zu einer Verdünnung von 10⁻¹⁰ angesetzt. Wenn die TK-143 fast konfluent (90%) waren, wurde das Medium entfernt und sofort durch 500µl der

Verdünnungen 10^{-4} bis 10^{-8} ersetzt. Ein well blieb zur Kontrolle immer ohne Viruszusatz. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C und gelegentlichem Schütteln wurden 2ml DMEM (10%FCS)/well auf die Zellen gegeben und diese für weitere 24-48h bei 37°C , 5% CO_2 inkubiert. Durch die Auszählung der Plaques erfolgte dann die Berechnung der Infektiosität der Virusstocks. Die Plaquebildung wurde zum einen durch mikroskopische Auszählung analysiert. Zum anderen wurden die Plaques durch Färbung mit Kristallviolett sichtbar. Die Färbung erforderte ein zweimaliges Waschen der Wells mit PBS, gefolgt von der Zugabe von $500\mu\text{l}$ -1ml 0,1%iger Kristallviolettlösung und einer Inkubation von 20min. bei RT. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Platten unter der Sterilbank getrocknet und anschliessend ausgezählt.

Die Berechnung der Infektiosität ergab sich nach folgender Formel:

$$x * y * z = \text{PFU/ml}$$

x =Mittelwert der Plaqueanzahl

y = Verdünnungsfaktor z.B. 10^6

z = Verdünnungsfaktor bei der Titration pro ml (z.B. $500\mu\text{l}$ Virusstock zugegeben = Faktor 2)

$$\text{Beispiel: } 4,3 * 10^6 * 2 = 8,6 \times 10^6 \text{ PFU/ml}$$

6.13.3.3 Vaccinia-Virus-Infektion humaner Zellen

Die Infektion humaner EBV-LCL oder CD40B-Zellen wurde mit einer MOI von 5 vorgenommen. Je nach Ansatz wurden 10^5 bis 5×10^5 Zellen infiziert. Dabei wurden die LCL oder CD40B Zellen in der entsprechenden Dichte auf einer 96-well (in $100\mu\text{l}$ für 10^5) oder 48-well Platte ($500\mu\text{l}$ für 5×10^5) ausgesät. Nach Zugabe von 5 MOI Virusstock wurden die Zellen für mindestens 1h bei 37°C inkubiert, bevor die Zellen als Targetzellen für den ELISPOT geerntet wurden.

6.13.3.4 Durchführung des ELISPOT

Die Durchführung des ELISPOT erfolgte nach Angaben der Hersteller. Dabei wurde zunächst die ELISPOT-Platte unter sterilen Bedingungen mit dem Antikörper 1-D1K beschichtet und 4°C gelagert. Nach Infektion der Targetzellen mit den entsprechenden Vaccinia-Virus-

Rekombinanten wurden die Effektorzellen gezählt und auf eine Zelldichte von 2×10^5 /ml eingestellt. Bevor Effektor- und Targetzellen koinkubiert wurden, wurde die ELISPOT-Platte mit sterilem PBS gewaschen und mit Kulturmedium für mindestens 30min. bei RT vorinkubiert. Die Effektorzellen wurden in $100 \mu\text{l}$ mit je 2×10^4 /well ausplattiert, die Effektorzellen in $150 \mu\text{l}$ in einer Dichte von ebenfalls 2×10^4 /well. Dieser Ansatz wurde üN für mindestens 16h bei 37°C , $5\% \text{CO}_2$ inkubiert. Nach Entfernen der Zellen von der Platte erfolgte dann mit Hilfe mehrere Waschschrte und Antikörperinkubationen die Detektion der Spots über das Substrat- welches entweder über HRP oder ALP funktioniert. Die Substrat-Reaktion wurde durch H_2O abgestoppt und die getrocknete Platte im Dunkeln gelagert.

6.13.4 Proliferationsassay

6.13.4.1 Koinkubationsansatz für die antigenspezifische Proliferation

Um die antigenspezifische Proliferation von T-Zellen zu analysieren, wurden frisch isolierte PBMCs gesunder Spender in einer Dichte von 10^5 /well auf eine 96-well-Rundbodenplatte pipettiert. Nach Koinkubation mit verschiedenen Konzentrationen an VZV-Lysat ($0,1 \mu\text{l}$ /well bis $10 \mu\text{l}$ /well) für 4-6 Tage bei 37°C , $5\% \text{CO}_2$ wurde durch die Zugabe radioaktiv markierten ^3H -Thymidins der Einbau des Nukleotids in die Zell-DNA als Maß der Proliferationsfähigkeit der Zellen determiniert. Je $25 \mu\text{l}$ ^3H -Thymidin ($10 \mu\text{l}/\text{ml}$ Medium) in Kulturmedium ohne Zusätze wurden pro well auf die Zellen gegeben und für weitere 16h bei 37°C kultiviert. Die Ernte der Zellen erfolgte im Isotopenlabor mit Hilfe eines Harvesters. Die Zellen werden dabei auf einen Filter gesogen und durch Zugabe von Scintillationswachs im β -Counter analysiert.

6.13.4.2 Koinkubationsansatz zur Reexpansion

Die Proliferation transduzierter Zellen lässt sich durch die Stimulation über den chRec nicht induzieren. Um die Fähigkeit zur Proliferation nach Stimulation über den nativen TCR zu untersuchen, wurden transduzierte und nicht-transduzierte VZV-CTL, die mindestens 3 Wochen nicht mehr stimuliert worden waren, als Effektorzellen eingesetzt. Diese wurden in einer Dichte von 10^5 /well in eine 96-well-Platte pipettiert und mit verschiedenen Stimulatorzellen in derselben Konzentration inkubiert. Als Stimulatorzellen wurden dabei entweder Tumorzellen, PBMCs, PBMCs mit VZV-Lysat oder VZV-Lysat alleine verwendet. Nach einer Inkubation bei 37°C , $5\% \text{CO}_2$ für 4 Tage, wurde wiederum ^3H -Thymidin zugegeben und die Proliferationsrate der Zellen bestimmt.

6.13.4.3 Analyse der Proliferation über Färbung mit CFSE

Carboxy-fluorescein diacetate-succinimidyl ester (CFSE) besteht aus einem fluoreszierenden Molekül, welches eine Succinimidyl-Estergruppe sowie zwei Acetatreste besitzt. CFSE diffundiert frei in Zellen, wo von intrazellulären Esterasen die Acetatgruppen abgespalten werden. Dadurch wird CFSE in einen membranundurchgängigen Fluoreszenzfarbstoff umgewandelt. CFSE verbleibt in der Zelle und wird ausschließlich an Tochterzellen weitergegeben. Damit halbiert sich die Fluoreszenzintensität mit jeder Zellteilung als Maß für die Proliferation. Für die Färbung von Zellen mit CFSE wurde 1µl einer 0,5M Stocklösung mit 10ml sterilem PBS vermischt. Von dieser Gebrauchslösung wurde 1ml pro 10^6 Zellen auf einmal in PBS gewaschenen PBMCs gegeben und für 10min. bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert und in FCS-haltigem-Kulturmedium resuspendiert. Nach einer Inkubation von 30min. bei 37°C wurden die Zellen zentrifugiert und in 24-well-Platten kultiviert.

6.13.4.4 Stimulation der Proliferation über den chimären Rezeptor

Durch Restimulation der transduzierten VZV-CTL mit antigen-positiven oder –negativen Tumorzelllinien wurde die Proliferationsfähigkeit der CTL nach Aktivierung über den chRec untersucht. Dabei wurden VZV-CTL in einer Dichte von 5×10^5 /well auf einer 24-well Platte ausgesät und in autologem Medium mit rhIL-2 (25U/ml) mit 5×10^5 Tumorzellen stimuliert. Als antigen-positive Zelllinie wurden Lan-1, Lan-5 oder JF, als antigen-negative Tumorzellen wurden A204 verwendet. Durch wöchentliches Zählen der Zellen und anschließende erneute Stimulation wurde die Proliferationsfähigkeit ausgewertet.

6.14 Antikörperfärbungen

Für die durchflusszytometrischen Messungen und Analysen wurde ein FACS-Calibur-Gerät und die Software Cell Quest Pro der Firma Beckton-Dickinson verwendet.

6.14.1 Oberflächenfärbungen

6.14.1.1 Immunphänotypisierung

1×10^5 - 1×10^6 Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert und einmal in 1ml FACS-Puffer (PBS, 2% FCS) gewaschen. Auf Eis wurden die Zellen in 100µl FACS-Puffer mit monoklonalen, murinen, an Fluorescein-Isothiozyant (FITC), Phycoerythrin (PE), Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex (PerCP) oder Allophycocyanin (APC) gekoppelte Antikörper

gegen die Oberflächenmarker CD3, CD4, CD8, CD27, CD28, CD45RO, CD45RA, CD56, CD69 oder TCR- $\gamma\delta$ für ca. 20min. inkubiert. Nach ein- bis zweimaligem Waschen der Zellen in FACS-Puffer erfolgte die Fixierung in 200-500 μ l 0,2% Paraformaldehyd/PBS (PFA).

6.14.1.2 Ermittlung der Transduktionseffizienz

Für die Optimierung verschiedener Experimente wurden Zellen mit dem grün-fluoreszierenden-Protein (GFP) transduziert. Um die Expression des GFP zu analysieren wurden diese Zellen pelletiert und nach einmaligem Waschen mit FACS-Puffer in 0,2% PFA fixiert. Die Fluoreszenz des GFP kann dann mit der Fluoreszenz-1 im FACS-Calibur ermittelt werden. Die Transduktionseffizienz der VZV-CTL mit dem chimären Rezeptor 14.G2a ζ hingegen wurde durch eine Antikörperfärbung mit dem murinen monoklonalen 1A7-Antikörper detektiert. Nach Waschen der Zellen in FACS-Puffer wurden die Zellen in 100 μ l Puffer resuspendiert und mit 10 μ l einer 1:100 verdünnten 1A7-Stocklösung für 20min. auf Eis inkubiert. Nach einmaligem Waschen wurden die Zellen wiederum in 100 μ l Puffer resuspendiert und 1 μ l goat-anti-mouse-APC (gam-APC) zugegeben. Nach 10minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen gewaschen, in 0,2% PFA fixiert und analysiert.

6.14.2 Intrazelluläre Perforin-Färbung

Für den Nachweis von intrazellulärem Perforin wurden VZV-CTL für 30min. in 4%igem Paraformaldehyd fixiert. Danach wurden die Zellen in Permeabilisierungspuffer (PBS, 0,1% Saponin, 1% FCS) gewaschen und für 20min. bei RT in Permeabilisierungspuffer mit 5%FCS inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in 100 μ l dieser Pufferlösung resuspendiert und entweder 20 μ l PE-markierter Anti-Perforin-Antikörper oder als Isotypkontrolle 20 μ l Anti-IgG₁-Antikörper hinzugegeben. Nach 30minütiger Inkubation bei RT wurden die Zellen in Waschpuffer (PBS, 1% FCS) gewaschen, resuspendiert und sofort analysiert.

6.14.3 Intrazelluläre Granulysin-Färbung

Analog zur intrazellulären Perforin-Färbung wurden die Zellen für die Färbung mit Granulysin in 4%igem PFA für 30min. fixiert. Nach Waschen mit Permeabilisierungspuffer (1%FCS) wurden die Zellen in Permeabilisierungspuffer (5%FCS) resuspendiert und für 20min. bei RT inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert und in 100 μ l Permeabilisierungspuffer (5%FCS) resuspendiert. Zu Isokontrollen wurden 4 μ l IgG₁-pure, zu den Proben 5 μ l α -Granulysin pipettiert und für 20min. auf Eis inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift und Resuspension in 100 μ l Permeabilisierungspuffer (5%FCS) wurde zu allen Proben 1 μ l

gam-APC hinzugegeben. Die Zellen wurden einmal gewaschen und in FACS-Puffer sofort analysiert.

6.14.4 Intrazelluläre IFN- γ Färbung

Die Bestimmung der IFN- γ -Sekretion antigenspezifischer Zellen erfolgte nach dem Protokoll des BD-intrazellulären CD4+-Kits. Zu analysierende Zellen wurden in FACS-Röhrchen überführt und einmal in FACS-Puffer gewaschen, nach Resuspension des Pellet wurden die Zellen durch Zugabe von 1ml FACS-Lysing-Solution (direkt vor Gebrauch 1:10 in H₂O verdünnt) und einer Inkubation von 10min. bei RT im Dunkeln lysiert. Zellen wurden einmal mit 2ml Waschpuffer gewaschen und das Pellet in der Restflüssigkeit resuspendiert. 500 μ l Permeabilisierungslösung (vorher 1:10 in H₂O verdünnt) wurden zugegeben und für 10min. bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem Waschen mit 3ml Waschpuffer wurden zu den Isokontrollen 20 μ l Antikörper-Mix CD4-PerCP/IgG₁-PE/ Ig_{2b}-FITC und zu den Proben 20 μ l Antikörper-Mix CD4-PerCP, CD69-PE, IFN- γ -FITC pipettiert und wiederum für 30min. bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit 3ml Waschpuffer wurden die Zellen in 200-300 μ l 1%igem PFA aufgenommen und analysiert.

6.14.5 Intrazelluläre IL-2 Färbung

Die Analyse von intrazellulärem IL-2 erfolgte analog zur intrazellulären IFN- γ Bestimmung. Als Antikörper wurden für die Isokontrollen jedoch 20 μ l Fast-Immune-Control (BD), für die Proben je 20 μ l CD69-PE und 20 μ l IL-2-FITC eingesetzt.

6.15 Magnetische Zell Separation (MACS)

Für die magnetische Zellseparation der VZV-CTL wurden 1×10^7 Zellen in 80 μ l MACS-Puffer resuspendiert. Zu den Zellen wurden 20 μ l CD8-Micro-Beads gegeben und für 15min bei 4-8°C inkubiert. Die magnetischen Micro-Beads binden über den Oberflächemarker CD8 an alle CD8+ Zellen der Suspension und erlauben so eine spätere Separation. Nach einmaligem Waschen mit MACS-Puffer wurde das Pellet in 500 μ l MACS-Puffer resuspendiert. Eine Mini-MACS-Säule wurde in einem Magnetblock befestigt und mit 3 ml MACS-Puffer äquilibriert. Danach wurde direkt die Zellsuspension auf die Säule pipettiert. Der Durchlauf wurde aufgefangen (CD8- negative Fraktion), die CD8-positive Fraktion verblieb aufgrund des Magnetfeldes in der Säule. Die Säule wurde dreimal mit jeweils 2ml MACS-Puffer gewaschen. Der Durchlauf wurde ebenfalls als CD8-negative Fraktion aufgefangen. Durch Entnahme der Säule aus dem magnetischen Feld und mit 2ml MACS-Puffer wurde die CD8-

positive Fraktion mit Hilfe des Stempels eluiert. Die Zellfraktionen wurden anschliessend weiter kultiviert.

6.16 CD3/CD28 Aktivierung von PBMCs

Für die Aktivierung humaner PBMCs wurden die Zellen unspezifisch über α -CD3 und α -CD28-Antikörper stimuliert. Dazu wurden die Antikörper mit bidest. H₂O auf eine Konzentration von 1 μ g/ml verdünnt. Jedes well einer 24-well-Platte wurde mit 500 μ l der Antikörper-Verdünnung beschichtet. Nach Inkubation von 2-4 h bei 37°C, 5% CO₂ wurde die Antikörper-Verdünnung abgenommen und verworfen. Jedes well wurde einmal mit 2ml Medium (RPMI,10% FCS) gewaschen und mit 2×10^6 frisch isolierten PBMCs für 48h bei 37°C, 5%CO₂ koinkubiert. Die aktivierten PBMCs wurden von der Platte abgenommen und anschliessend weiter kultiviert.

6.17 Analyse supprimierender Eigenschaften

Für die Untersuchung supprimierender Eigenschaften der VZV-CTL wurden VZV-CTL mit CD3/CD28 aktivierten PBMCs koinkubiert und die Proliferationsfähigkeit der Populationen untersucht. Dabei wurden zum einen die Proliferation im 3H-Thymidin-Assay untersucht, zum anderen wurden CD8⁺ PBMCs CFSE gefärbt und die Proliferation in der FACS-Analyse bestimmt. Für den ³H-Thymidin-Assay wurden PBMCs über CD3/CD28 unspezifisch aktiviert und dann in einer 2:1 Ratio mit autologen VZV-CTL koinkubiert. Eingesetzt wurden 5×10^4 PBMCs und $2,5 \times 10^4$ VZV-CTL in Dreifachansätzen. Als Kontrolle wurden die PBMCs nur mit Kulturmedium koinkubiert. Nach einer Inkubation von 3 Tagen wurden die Zellen geerntet und analysiert. Für die Unterscheidung der einzelnen Zellpopulationen eignet sich der ³H-Thymidin-Assay nicht, daher wurden die Zellen alternativ im FACS nach CFSE-Färbung analysiert. Durch die zusätzliche Färbung der Oberflächenmarker CD4 und CD8 konnten einzelne Populationen unterschieden werden. Dazu wurden PBMCs durch MACS in eine CD8⁺ und CD8⁻ Fraktion separiert. Die CD8⁺ Fraktion wurde anschliessend unspezifisch über CD3/ CD28 stimuliert. Für die Koinkubation wurden dann sowohl VZV-CTL als auch die aktivierten PBMCs mit CFSE gefärbt und mit je 2×10^5 Effektor- und Targetezellen in einer Ratio von 1:1 für 3 Tage bei 37°C, 5% CO₂ koinkubiert. Durch zusätzliche Oberflächenfärbung gegen CD4 und CD8 erfolgte dann die Analyse der Proliferation der einzelnen Populationen.

Abkürzungen

α -	anti- (Antikörper gegen)
ADCC	Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität
ALL	Akute lymphatische Leukämie
APC	Antigen-präsentierende Zellen
chRec	chimärer Rezeptor
CMV	Cytomegalie-Virus
CTL	Zytotoxische T-Zellen
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Cluster of differentiation/Oberflächenantigen
CFSE	Carboxy-fluorescein diacetate-succinimidyl ester
DC	Dendritische Zellen
gE	Glykoprotein E
gI	Glykoprotein I
CsA	Cyclosporin A
BFA	Brefeldin A
ConA	Concanamycin A
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotide
EBV	Epstein-Barr-Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzym-Linked-Immunsorbent-Assay
ELISPOT	ELISA auf Einzelzell-Niveau
FCS	Fetales Kälber Serum
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
h	Stunde(n)
IE62	Immediate Early Protein 62
IL-2	Interleukin-2
IL-4	Interleukin-4

IL-10	Interleukin-10
IFN- γ	Interferon- γ
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based activation Motif
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulphonic acid
HRP	Horseraddish Peroxidase
kb	kilo Basenpaare
kDa	kilo Dalton
KBR	Komplement-Bindungsreaktions-Antigen
KMT	Knochenmarktransplantation
L	liter
LB	Luria Bertani
M	molar – mol/L
LCL	Lymphoblastoide Zelllinien
MACS	Magnetische Zellseparation
min	Minuten
mRNA	messenger RNA
mHag	Minor-histocompatibility-complex antigen
MHC-I	Major-histocompatibility-complex-I
MHC-II	Major-histocompatibility-complex-II
MSVC	Murines Stammzell-Virus
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OD $_{\lambda}$	Optische Dichte bei Wellenlänge λ
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PBMCs	Peripheral blood mononuklear cells/ periphere mononukleäre Blutzellen
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute/ Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
scFv	Single chain fragment variable
T-APC	T-Zellantigen präsentierende Zellen
TCR	T-Zell-Rezeptor
TNF	Tumor Nekrosis Faktor

T _{reg}	Regulatorische T-Zellen
Tris	tris(hydroxymethyl)-aminoethane
U	Units
Vac-GFP	Vaccinia-Virus-Rekombinante, exprimiert GFP
Vac-gE	Vaccinia-Virus-Rekombinante, exprimiert gE
Vac-IE62	Vaccinia-Virus-Rekombinante, exprimiert IE62
VZV	Varicella-Zoster-Virus
(v/v)	volume per volume
(w/v)	weight per volume

Literaturverzeichnis

- Abbas, A.K., Murphy, K.M., & Sher, A. (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, **383**, 787-793.
- Alvarez-Vallina, L. & Russell, S.J. (1999) Efficient discrimination between different densities of target antigen by tetracycline-regulatable T bodies. *Human Gene Therapy*, **10**, 559-563.
- Appay, V. (2004) The physiological role of cytotoxic CD4+T-cells: the holy grail? *Clinical and Experimental Immunology*, **138**, 10-13.
- Appay, V., Zaunders, J.J., Papagno, L., Sutton, J., Jaramillo, A., Waters, A., Easterbrook, P., Grey, P., Smith, D., McMichael, A.J., Cooper, D.A., Rowland-Jones, S.L., & Kelleher, A.D. (2002) Characterization of CD4(+) CTLs ex vivo. *Journal of Immunology*, **168**, 5954-5958.
- Arvin, A.M., Sharp, M., Smith, S., Koropchak, C.M., Diaz, P.S., Kinchington, P., Ruyechan, W., & Hay, J. (1991) Equivalent Recognition of A Varicella-Zoster Virus Immediate Early Protein (Ie62) and Glycoprotein-I by Cytotoxic Lymphocytes-T of Either Cd4+ Or Cd8+ Phenotype. *Journal of Immunology*, **146**, 257-264.
- Baiker, A., Fabel, K., Cozzio, A., Zerboni, L., Fabel, K., Sommer, M., Uchida, N., He, D.P., Weissman, I., & Arvin, A.M. (2004) Varicella-zoster virus infection of human neural cells in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 10792-10797.
- Bauer, T.R., Miller, A.D., & Hickstein, D.D. (1995) Improved Transfer of the Leukocyte Integrin Cd18 Subunit Into Hematopoietic-Cell Lines by Using Retroviral Vectors Having A Gibbon Ape Leukemia-Virus Envelope. *Blood*, **86**, 2379-2387.
- Besser, J., Sommer, M.H., Zerboni, L., Bagowski, C.P., Ito, H., Moffat, J., Ku, C.C., & Arvin, A.M. (2003) Differentiation of varicella-zoster virus ORF47 protein kinase and IE62 protein binding domains and their contributions to replication in human skin xenografts in the SCID-hu mouse. *Journal of Virology*, **77**, 5964-5974.
- Bollard, C.M., Straathof, K.C.M., Huls, M.H., Leen, A., Lacuesta, K., Davis, A., Gottschalk, S., Brenner, M.K., Heslop, H.E., & Rooney, C.M. (2004) The generation and characterization of LMP2-specific CTLs for use as adoptive transfer from patients with relapsed EBV-positive Hodgkin disease. *Journal of Immunotherapy*, **27**, 317-327.
- Bonini, C., Ferrari, G., Verzeletti, S., Servida, P., Zappone, E., Ruggieri, L., Ponzoni, M., Rossini, S., Mavilio, F., Traversari, C., & Bordignon, C. (1997) HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science*, **276**, 1719-1724.
- Bowman, L.C., Grossmann, M., Rill, D., Brown, M., Zhong, W.Y., Alexander, B., Leimig, T., Coustan-Smith, E., Campana, D., Jenkins, J., Woods, D., & Brenner, M. (1998) Interleukin-2 gene-modified allogeneic tumor cells for treatment of relapsed neuroblastoma. *Human Gene Therapy*, **9**, 1303-1311.
- Brentjens, R.J., Latouche, J.B., Santos, E., Marti, F., Gong, M.C., Lyddane, C., King, P.D., Larson, S., Weiss, M., Riviere, I., & Sadelain, M. (2003) Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15. *Nature Medicine*, **9**, 279-286.
- Brocker, T. (2000) Chimeric Fv-xi or Fv-epsilon receptors are not sufficient to induce activation or cytokine production in peripheral T cells. *Blood*, **96**, 1999-2001.
- Brocker, T. & Karjalainen, K. (1995) Signals Through T-Cell Receptor-Zeta Chain Alone Are Insufficient to Prime Resting T-Lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, **181**, 1653-1659.

- Bunnell, B.A., Muul, L.M., Donahue, R.E., Blaese, R.M., & Morgan, R.A. (1995) High-Efficiency Retroviral-Mediated Gene-Transfer Into Human and Nonhuman Primate Peripheral-Blood Lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 7739-7743.
- Burk, M.R., Mori, L., & Delibero, G. (1995) Human V-Gamma-9-V-Delta-2 Cells Are Stimulated in A Cross-Reactive Fashion by A Variety of Phosphorylated Metabolites. *European Journal of Immunology*, **25**, 2052-2058.
- Camitta, B., Chusid, M.J., Starshak, R.J., & Gottschall, J.L. (1994) Use of Irradiated Lymphocytes from Immune Donors for Treatment of Disseminated Varicella. *Journal of Pediatrics*, **124**, 593-596.
- Caruso, D.A., Orme, L.M., Amor, G.M., Neale, A.M., Radcliff, F.J., Downie, P., Tang, M.L.K., & Ashley, D.M. (2005) Results of a Phase I study utilizing monocyte-derived dendritic cells pulsed with tumor RNA in children with stage 4 neuroblastoma. *Cancer*, **103**, 1280-1291.
- Chakraborty, N.G., Chattopadhyay, S., Mehrotra, S., Chhabra, A., & Mukherji, B. (2004) Regulatory T-cell response and tumor vaccine-induced cytotoxic T lymphocytes in human melanoma. *Human Immunology*, **65**, 794-802.
- Cheadle, E.J., Armstrong, A., Radford, J., Gilham, D.E., & Hawkins, R.E. (2003) Destruction of CD19(+) lymphomas by T cells expressing a chimeric receptor. *British Journal of Cancer*, **88**, S37.
- Chen, Z.W. & Letvin, N.L. (2003) Adaptive immune response of V gamma 2V delta 2 T cells: a new paradigm. *Trends in Immunology*, **24**, 213-219.
- Ciceri, F., Bonini, C., Markt, S., Zappone, E., Servida, P., Rossini, S., Bernardi, M., Pescarollo, A., Bregni, M., Corradini, P., Traversari, C., & Bordignon, C. (1999) Long term follow-up in 30 patients receiving HSV-TK transduced donor lymphocytes after allo-BMT. *Blood*, **94**, 668A.
- Clayberger, C. & Krensky, A.M. (2003) Granulysin. *Current Opinion in Immunology*, **15**, 560-565.
- Cone, R.D. & Mulligan, R.C. (1984) High-Efficiency Gene-Transfer Into Mammalian-Cells - Generation of Helper-Free Recombinant Retrovirus with Broad Mammalian Host Range. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*, **81**, 6349-6353.
- Cooper, L.J.N., Al Kadhimi, Z., Serrano, L.M., Pfeiffer, T., Olivares, S., Castro, A., Chang, W.C., Gonzalez, S., Smith, D., Forman, S.J., & Jensen, M.C. (2005) Enhanced antilymphoma efficacy of CD19-redirected influenza MP1-specific CTLs by cotransfer of T cells modified to present influenza MP1. *Blood*, **105**, 1622-1631.
- Cooper, L.J.N., Topp, M.S., Raubitschek, A., Popplewell, L., Forman, S.J., & Jensen, M.C. (2002) Human cytolytic T-cell clones genetically modified to be CD19-specific can target B-lineage leukemia cells independent of adhesion molecule expression. *Blood*, **100**, 34A-35A.
- Cooper, L.J.N., Topp, M.S., Serrano, L.M., Gonzalez, S., Chang, W.C., Naranjo, A., Wright, C., Popplewell, L., Raubitschek, A., Forman, S.J., & Jensen, M.C. (2003) T-cell clones can be rendered specific for CD19: toward the selective augmentation of the graft-versus-B-lineage leukemia effect. *Blood*, **101**, 1637-1644.
- Corrias, M.V., Faulkner, L.B., Pistorio, A., Rosanda, C., Callea, F., Lo Piceolo, M.S., Scaruffi, P., Marchi, C., Lacitignola, L., Occhino, M., Gambini, C., Tonini, G.P., Haupt, R., De Bernardi, B., Pistoia, V., & Garaventa, A. (2004) Detection of neuroblastoma cells in bone marrow and peripheral blood by different techniques: Accuracy and relationship with clinical features of patients. *Clinical Cancer Research*, **10**, 7978-7985.
- Cosset, F.L., Takeuchi, Y., Battini, J.L., Weiss, R.A., & Collins, M.K.L. (1995) High-Titer Packaging Cells Producing Recombinant Retroviruses Resistant to Human Serum. *Journal of Virology*, **69**, 7430-7436.
- Coughlin, C.M., Grupp, S.A., & Vonderheide, R.H. (2003) RNA-transfected CD40-activated B cells generate functional T cell responses against viral and tumor antigen targets: Implications for cellular immunotherapy in pediatric patients. *Pediatric Research*, **53**, 279A.

- Coughlin, C.M., Vance, B.A., Grupp, S.A., & Vonderheide, R.H. (2004) RNA-transfected CD40-activated B cells induce functional T-cell responses against viral and tumor antigen targets: implications for pediatric immunotherapy. *Blood*, **103**, 2046-2054.
- Diaz, P.S., Smith, S., Hunter, E., & Arvin, A.M. (1989) Lymphocyte-T Cyto-Toxicity with Natural Varicella-Zoster Virus-Infection and After Immunization with Live Attenuated Varicella Vaccine. *Journal of Immunology*, **142**, 636-641.
- Duftner, C., Goldberger, C., Falkenbach, A., Wurzner, R., Falkensammer, B., Pfeiffer, K.P., Maerker-Hermann, E., & Schirmer, M. (2003) Prevalence, clinical relevance and characterization of circulating cytotoxic CD4(+)CD28(-) T cells in ankylosing spondylitis. *Arthritis Research & Therapy*, **5**, R292-R300.
- Eshhar, Z., Waks, T., Gross, G., & Schindler, D.G. (1993) Specific Activation and Targeting of Cytotoxic Lymphocytes Through Chimeric Single Chains Consisting of Antibody-Binding Domains and the Gamma-Subunit Or Zeta-Subunit of the Immunoglobulin and T-Cell Receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**, 720-724.
- Finney, H.M., Akbar, A.N., & Lawson, A.D.G. (2004) Activation of resting human primary T cells with chimeric receptors: Costimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD137 in series with signals from the TCR zeta chain. *Journal of Immunology*, **172**, 104-113.
- Finney, H.M., Lawson, A.D.G., Bebbington, C.R., & Weir, A.N.C. (1998) Chimeric receptors providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product. *Journal of Immunology*, **161**, 2791-2797.
- Fischer, A., Abina, S.H.B., Thrasher, A., von Kalle, C., & Cavazzana-Calvo, M. (2004) LMO2 and gene therapy for severe combined immunodeficiency. *New England Journal of Medicine*, **350**, 2526.
- Fisher, J., Kinsella, T.M., & Nolan, G. (1995) Novel episomal vectors rapidly and stably produce high-titer recombinant retrovirus. *Blood*, **86**, 1633.
- Fonteneau, J.F., Larsson, M., Somersan, S., Sanders, C., Munz, C., Kwok, W.W., Bhardwaj, N., & Jotereau, F. (2001) Generation of high quantities of viral and tumor-specific human CD4+and CD8+T-cell clones using peptide pulsed mature dendritic cells. *Journal of Immunological Methods*, **258**, 111-126.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A., & Rudensky, A.Y. (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Nature Immunology*, **4**, 330-336.
- Friedmann-Morvinski, D., Bendavid, A., Waks, T., Schindler, D., & Eshhar, Z. (2005) Redirected primary T cells harboring a chimeric receptor require costimulation for their antigen-specific activation. *Blood*, **105**, 3087-3093.
- Frost, J.D., Hank, J.A., Reaman, G.H., Friedrich, S., Seeger, R.C., Gan, J., Anderson, P.M., Ettinger, L.J., Cairo, M.S., Blazar, B.R., Krailo, M.D., Matthay, K.K., Reisfeld, R.A., & Sondel, P.M. (1997) A phase I/IB trial of murine monoclonal anti-GD2 antibody 14.G2a plus interleukin-2 in children with refractory neuroblastoma - A report of the Children's Cancer Group. *Cancer*, **80**, 317-333.
- Gamadia, L.E., van Leeuwen, E.M.M., Remmerswaal, E.B.M., Yong, S.L., Surachno, S., Dillen, P.M.E.W., ten Berge, I.J.M., & van Lier, R.A.W. (2004) The size and phenotype of virus-specific T cell populations is determined by repetitive antigenic stimulation and environmental cytokines. *Journal of Immunology*, **172**, 6107-6114.
- Gattenloehner, Marx, Markfort, Pscherer, Landmeier, Juergens, Müller-Hermelink, Matthews, Beeson, Vincent, & Rossig (2005) Rhabdomyosarcoma lysis by T cells expressing a human autoantibody-based chimeric receptor targeting the fetal acetylcholine receptor. *Cancer Research*, eingereicht
- Gattinoni, L., Klebanoff, C.A., Palmer, D.C., Wrzesinski, C., Kerstann, K., Yu, Z.Y., Finkelstein, S.E., Theoret, M.R., Rosenberg, S.A., & Restifo, N.P. (2005) Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8(+) T cells. *Journal of Clinical Investigation*, **115**, 1616-1626.

- Geiger, T.L., Leitenberg, D., & Flavell, R.A. (1999) The TCR zeta-chain immunoreceptor tyrosine-based activation motifs are sufficient for the activation and differentiation of primary T lymphocytes. *Journal of Immunology*, **162**, 5931-5939.
- Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H., & Parks, W.P. (1973) In-Vitro Cultivation of Human Tumors - Establishment of Cell Lines Derived from A Series of Solid Tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, **51**, 1417-1423.
- Gottschalk, S., Heslop, H.E., & Rooney, C.M. (2005) Adoptive immunotherapy for EBV-associated malignancies. *Leukemia & Lymphoma*, **46**, 1-10.
- Gyobu, H., Tsuji, T., Suzuki, Y., Ohkuri, T., Chamoto, K., Kuroki, M., Miyoshi, H., Kawarada, Y., Katoh, H., Takeshima, T., & Nishimura, T. (2004) Generation and targeting of human tumor-specific Tc1 and Th1 cells transduced with a lentivirus containing a chimeric immunoglobulin T-cell receptor. *Cancer Research*, **64**, 1490-1495.
- Hahn, S., Gehri, R., & Erb, P. (1995) Mechanism and Biological Significance of Cd4-Mediated Cytotoxicity. *Immunological Reviews*, **146**, 57-79.
- Handgretinger, R., Anderson, K., Lang, P., Dopfer, R., Klingebiel, T., Schrappe, M., Reuland, P., Gillies, S.D., Reisfeld, R.A., & Niethammer, D. (1995) A Phase-I Study of Human Mouse Chimeric Antiganglioside Gd2 Antibody Ch14.18 in Patients with Neuroblastoma. *European Journal of Cancer*, **31A**, 261-267.
- Hanenberg, H., Xiao, X.L., Dilloo, D., Hashino, K., Kato, I., & Williams, D.A. (1996) Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. *Nature Medicine*, **2**, 876-882.
- Hata, A., Zerboni, L., Sommer, M., Kaspar, A.A., Clayberger, C., Krensky, A.M., & Arvin, A.M. (2001) Granulysin blocks replication of varicella-zoster virus and triggers apoptosis of infected cells. *Viral Immunology*, **14**, 125-133.
- Haynes, N.M., Trapani, J.A., Teng, M.W.L., Jackson, J.T., Cerruti, L., Jane, S.M., Kershaw, M.H., Smyth, M.J., & Darcy, P.K. (2002) Rejection of syngeneic colon carcinoma by CTLs expressing single-chain antibody receptors codelivering CD28 costimulation. *Journal of Immunology*, **169**, 5780-5786.
- Hayward, A., Vafai, A., Gelb, L., & Levin, M. (1986) Expression of Vzv Antigens on Ebv Transformed B Lymphoblasts and Their Specific Lysis by T-Cells. *Federation Proceedings*, **45**, 979.
- Heslop, H.E. & Rooney, C.M. (1997) Adoptive cellular immunotherapy for EBV lymphoproliferative diseases. *Immunological Reviews*, **157**, 217-222.
- Hombach, A., Heuser, C., Gerken, M., Fischer, B., Lewalter, K., Diehl, V., Pohl, C., & Abken, H. (2000) T cell activation by recombinant Fc epsilon RI gamma-chain immune receptors: an extracellular spacer domain impairs antigen-dependent T cell activation but not antigen recognition. *Gene Therapy*, **7**, 1067-1075.
- Hombach, A., Sent, D., Schneider, C., Heuser, C., Koch, D., Pohl, C., Seliger, B., & Abken, H. (2001) T-cell activation by recombinant receptors: CD28 costimulation is required for interleukin 2 secretion and receptor-mediated T-cell proliferation but does not affect receptor-mediated target cell lysis. *Cancer Research*, **61**, 1976-1982.
- Hombach, A., Wiczarkowicz, A., Marquardt, T., Heuser, C., Usai, L., Pohl, C., Seliger, B., & Abken, H. (2001) Tumor-specific T cell activation by recombinant immunoreceptors: CD3 zeta signaling and CD28 costimulation are simultaneously required for efficient IL-2 secretion and can be integrated into one combined CD28/CD3 zeta signaling receptor molecule. *Journal of Immunology*, **167**, 6123-6131.
- Hori, S., Nomura, T., & Sakaguchi, S. (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, **299**, 1057-1061.

- Hotfilder,M., Rottgers,S., Rosemann,A., Jurgens,H., Harbott,J., & Vormoor,J. (2002) Immature CD34(+)CD19(-) progenitor/stem cells in TEL/AML1-positive acute lymphoblastic leukemia are genetically and functionally normal. *Blood*, **100**, 640-646.
- Huang,Z., Vafai,A., Lee,J., Mahalingam,R., & Hayward,A.R. (1992) Specific Lysis of Targets Expressing Varicella-Zoster Virus Gpi Or Gpiv by Cd4+ Human T-Cell Clones. *Journal of Virology*, **66**, 2664-2669.
- Hwu,P., Yang,J.C., Cowherd,R., Treisman,J., Shafer,G.E., Eshhar,Z., & Rosenberg,S.A. (1995) In-Vivo Antitumor-Activity of T-Cells Redirected with Chimeric Antibody T-Cell Receptor Genes. *Cancer Research*, **55**, 3369-3373.
- Imai,C., Mihara,K., Andreansky,M., Nicholson,I.C., Pui,C.H., Geiger,T.L., & Campana,D. (2004) Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, **18**, 676-684.
- Irving,B.A. & Weiss,A. (1991) The Cytoplasmic Domain of the T-Cell Receptor Zeta-Chain Is Sufficient to Couple to Receptor-Associated Signal Transduction Pathways. *Cell*, **64**, 891-901.
- Ito,M., Nakano,T., Kamiya,T., Kitamura,K., Komada,Y., Ihara,T., Kamiya,H., & Sakurai,M. (1992) Activation of Lymphocytes by Varicella-Zoster Virus (Vzv) - Expression of Interleukin-2 Receptors on Lymphocytes Cultured with Vzv Antigen. *Journal of Infectious Diseases*, **165**, 158-161.
- JAINCHIL,JL, Aaronson,S.A., & Todaro,G.J. (1969) Murine Sarcoma and Leukemia Viruses - Assay Using Clonal Lines of Contact-Inhibited Mouse Cells. *Journal of Virology*, **4**, 549-&.
- Kasid,A., Morecki,S., Aebersold,P., Cornetta,K., Culver,K., Freeman,S., Director,E., Lotze,M.T., Blaese,R.M., Anderson,W.F., & Rosenberg,S.A. (1990) Human-Gene Transfer - Characterization of Human Tumor-Infiltrating Lymphocytes As Vehicles for Retroviral-Mediated Gene-Transfer in Man. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **87**, 473-477.
- Kavanaugh,M.P., Miller,D.G., Zhang,W.B., Law,W., Kozak,S.L., Kabat,D., & Miller,A.D. (1994) Cell-Surface Receptors for Gibbon Ape Leukemia-Virus and Amphotropic Murine Retrovirus Are Inducible Sodium-Dependent Phosphate Symporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 7071-7075.
- Kelly,P.F., Vandergriff,J., Nathwani,A., Nienhuis,A.W., & Vanin,E.F. (2000) Highly efficient gene transfer into cord blood nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency repopulating cells by oncoretroviral vector particles pseudotyped with the feline endogenous retrovirus (RD114) envelope protein. *Blood*, **96**, 1206-1214.
- Kershaw,M.H., Jackson,J.T., Haynes,N.M., Teng,M.W.L., Moeller,M., Hayakawa,Y., Street,S.E., Cameron,R., Tanner,J.E., Trapani,J.A., Smyth,M.J., & Darcy,P.K. (2004) Gene-engineered T cells as a superior adjuvant therapy for metastatic cancer. *Journal of Immunology*, **173**, 2143-2150.
- Khanolkar,A., Yagita,H., & Cannon,M.J. (2001) Preferential utilization of the perforin/granzyme pathway for lysis of Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cells by virus-specific CD4(+) T cells. *Virology*, **287**, 79-88.
- Kinchington,P.R., Houglan,J.K., Arvin,A.M., Ruyechan,W.T., & Hay,J. (1992) The Varicella-Zoster Virus Immediate-Early Protein Ie62 Is A Major Component of Virus-Particles. *Journal of Virology*, **66**, 359-366.
- Kramer,K., Gerald,W.L., Kushner,B.H., Larson,S.M., Hameed,M., & Cheung,N.K.V. (1998) Disialoganglioside G(D2) loss following monoclonal antibody therapy is rare in neuroblastoma. *Clinical Cancer Research*, **4**, 2135-2139.
- Kramer,K., Gerald,W.L., Kushner,B.H., Larson,S.M., Hameed,M., & Cheung,N.K.V. (2001) Disialoganglioside G(D2) loss following monoclonal antibody therapy is rare in neuroblastoma. *Medical and Pediatric Oncology*, **36**, 194-196.

- Lapointe,R., Bellemare-Pelletier,A., Housseau,F., Thibodeau,J., & Hwu,P. (2003) CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. *Cancer Research*, **63**, 2836-2843.
- Letourneur,F. & Klausner,R.D. (1991) T-Cell and Basophil Activation Through the Cytoplasmic Tail of T-Cell-Receptor Zeta-Family Proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**, 8905-8909.
- Leung,T.F., Li,C.K., Hung,E.C.W., Chan,P.K.S., Mo,C.W., Wong,R.P.O., & Chik,K.W. (2004) Immunogenicity of a two-dose regime of varicella vaccine in children with cancers. *European Journal of Haematology*, **72**, 353-357.
- Levin,M.J., Smith,J.G., Kaufhold,R.M., Barber,D., Hayward,A.R., Chan,C.Y., Chan,I.S.F., Li,D.J.J., Wang,W., Keller,P.M., Shaw,A., Silber,J.L., Schlienger,K., Chalikonda,I., Vessey,S.J.R., & Caulfield,M.J. (2003) Decline in Varicella-Zoster Virus (VZV)-specific cell-mediated immunity with increasing age and boosting with a high-dose VZV vaccine. *Journal of Infectious Diseases*, **188**, 1336-1344.
- Lewinsohn,D.M., Bement,T.T., Xu,J.C., Lynch,D.H., Grabstein,K.H., Reed,S.G., & Alderson,M.R. (1998) Human purified protein derivative-specific CD4(+) T cells use both CD95-dependent and CD95-independent cytolytic mechanisms. *Journal of Immunology*, **160**, 2374-2379.
- Lowin,B., Hahne,M., Mattmann,C., & Tschopp,J. (1994) Cytolytic T-Cell Cytotoxicity Is Mediated Through Perforin and Fas Lytic Pathways. *Nature*, **370**, 650-652.
- Lozzio,B.B. & Lozzio,C.B. (1979) Absence of Erythrocytic Components in the Original K562 Cell-Line. *International Journal of Cancer*, **24**, 513.
- Maher,J., Brentjens,R.J., Gunset,G., Riviere,I., & Sadelain,M. (2002) Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCR zeta/CD28 receptor. *Nature Biotechnology*, **20**, 70-75.
- Malissen,B., Ku,G., Hermans,M., Vivier,E., & Malissen,M. (1995) Genetic dissection of the transducing subunits of the T-cell antigen receptor. *Receptor Activation by Antigens, Cytokines, Hormones, and Growth Factors*, **766**, 173-181.
- Matsuo,Y. & Drexler,H.G. (1998) Establishment and characterization of human B cell precursor leukemia cell lines. *Leukemia Research*, **22**, 567-579.
- Meidenbauer,N., Marienhagen,J., Laumer,M., Vogl,S., Heymann,J., Andreesen,R., & Mackensen,A. (2003) Survival and tumor localization of adoptively transferred Melan-A-specific T cells in melanoma patients. *Journal of Immunology*, **170**, 2161-2169.
- Miano,M., Cancedda,R., Hartmann,O., Cornish,J., Locatelli,F., Egeler,R.M., Slavin,S., Veys,P., Ortega,J., Peters,C., Wynn,R.F., Iori,A.P., Fagioli,F., Ljungmann,P., Niethammer,D., Bordigoni,P., & Dini,G. (2005) Survey on haematopoietic stem cell transplantation for children in Europe. *Bone Marrow Transplantation*, **35**, S3-S8.
- Miller,A.D., Garcia,J.V., Vonsuhr,N., Lynch,C.M., Wilson,C., & Eiden,M.V. (1991) Construction and Properties of Retrovirus Packaging Cells Based on Gibbon Ape Leukemia-Virus. *Journal of Virology*, **65**, 2220-2224.
- Mitsuyasu,R.T., Anton,P.A., Deeks,S.G., Scadden,D.T., Connick,E., Downs,M.T., Bakker,A., Roberts,M.R., June,C.H., Jalali,S., Lin,A.A., Pennathur-Das,R., & Hege,K.M. (2000) Prolonged survival and tissue trafficking following adoptive transfer of CD4 zeta gene-modified autologous CD4(+) and CD8(+) T cells in human immunodeficiency virus-infected subjects. *Blood*, **96**, 785-793.
- Moffat,J., Mo,C.J., Cheng,J.J., Sommer,M., Zerboni,L., Stamatis,S., & Arvin,A.M. (2004) Functions of the C-terminal domain of varicella-zoster virus glycoprotein E in viral replication in vitro and skin and T-cell tropism in vivo. *Journal of Virology*, **78**, 12406-12415.

- Moffat, J.F., Stein, M.D., Kaneshima, H., & Arvin, A.M. (1995) Tropism of Varicella-Zoster Virus for Human Cd4(+) and Cd8(+) T-Lymphocytes and Epidermal-Cells in Scid-Hu Mice. *Journal of Virology*, **69**, 5236-5242.
- Moorman, A.V., Raimondi, S.C., Pui, C.H., Baruchel, A., Biondi, A., Carroll, A.J., Forestier, E., Gaynon, P.S., Harbott, J., Harms, D.O., Heerema, N., Pieters, R., Schrappe, M., Silverman, L.B., Vilmer, E., & Harrison, C.J. (2005) No prognostic effect of additional chromosomal abnormalities in children with acute lymphoblastic leukemia and 11q23 abnormalities. *Leukemia*, **19**, 557-563.
- Morita, C.T., Beckman, E.M., Bukowski, J.F., Tanaka, Y., Band, H., Bloom, B.R., Golan, D.E., & Brenner, M.B. (1995) Direct Presentation of Nonpeptide Prenyl Pyrophosphate Antigens to Human Gamma-Delta T-Cells. *Immunity*, **3**, 495-507.
- Moritz, D. & Groner, B. (1995) A Spacer Region Between the Single-Chain Antibody-Chain and the Cd3 Zeta-Chain Domain of Chimeric T-Cell Receptor Components Is Required for Efficient Ligand-Binding and Signaling Activity. *Gene Therapy*, **2**, 539-546.
- Murray, J.L., Kleinerman, E.S., Jia, S.F., Rosenblum, M.G., Eton, O., Buzaid, A., Legha, S., Ross, M.I., Thompson, L., Mujoo, K., Rieger, P.T., Saleh, M., Khazaeli, M.B., & VadhanRaj, S. (1996) Phase Ia/Ib trial of anti-GD2 chimeric monoclonal antibody 14.18 (ch14.18) and recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF) in metastatic melanoma. *Journal of Immunotherapy*, **19**, 206-217.
- Norris, P.J. & Rosenberg, E.S. (2001) Cellular immune response to human immunodeficiency virus. *Aids*, **15**, S16-S21.
- Obata-Onai, A., Hashimoto, S., Onai, N., Kurachi, M., Nagai, S., Shizuno, K., Nagahata, T., & Mathushima, K. (2002) Comprehensive gene expression analysis of human NK cells and CD8(+) T lymphocytes. *International Immunology*, **14**, 1085-1098.
- Oitani, K. (1999) Expression of interleukin-2 receptor, CD25, on CD4 lymphocytes in response to varicella-zoster virus antigen among patients with malignancies immunized with live attenuated varicella vaccine. *Pediatrics International*, **41**, 32-36.
- Papagno, L., Spina, C.A., Marchant, A., Salio, M., Rufer, N., Little, S., Dong, T., Chesney, G., Waters, A., Easterbrook, P., Dunbar, P.R., Shepherd, D., Cerundolo, V., Emery, V., Griffiths, P., Conlon, C., McMichael, A.J., Richman, D.D., Rowland-Jones, S.L., & Appay, V. (2004) Immune activation and CD8(+) T-cell differentiation towards senescence in HIV-1 infection. *Plos Biology*, **2**, 173-185.
- Paul, W.E. (1991) Interleukin-4 Production by Fc-Epsilon-R+-Cells. *Skin Pharmacology*, **4**, 8-14.
- Persons, D.A., Allay, J.A., Riberdy, J.M., Wersto, R.P., Donahue, R.E., Sorrentino, B.P., & Nienhuis, A.W. (1998) Use of the green fluorescent protein as a marker to identify and track genetically modified hematopoietic cells. *Nature Medicine*, **4**, 1201-1205.
- Porakishvili, N., Kardava, L., Jewell, A.P., Yong, K., Glennie, M.J., Akbar, A., & Lydyard, P.M. (2004) Cytotoxic CD4(+) T cells in patients with B cell chronic lymphocytic leukemia kill via a perforin-mediated pathway. *Haematologica*, **89**, 435-443.
- Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G., & Cormier, M.J. (1992) Primary Structure of the Aequorea-Victoria Green-Fluorescent Protein. *Gene*, **111**, 229-233.
- Pule, M.A., Straathof, K.C., Dotti, G., Heslop, H.E., Rooney, C.M., & Brenner, M.K. (2004) Three-module signaling endo-domain artificial T-cell receptor which transmits CD28, OX40 and CD3-xi signals enhances IL-2 release and proliferative response in transduced primary T-cells. *Blood*, **104**, 484A.
- Pulvertaft, R.J.V. (1964) Cytology of Burkitts Tumour (African Lymphoma). *Lancet*, **1**, 238-&

- Rasko, J.E.J., Battini, J.L., Gottschalk, R.J., Mazo, I., & Miller, A.D. (1999) The RD114 simian type D retrovirus receptor is a neutral amino acid transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 2129-2134.
- Rickinson, A.B., Lee, S.P., & Steven, N.M. (1996) Cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus. *Current Opinion in Immunology*, **8**, 492-497.
- Riddell, S.R., Reusser, P., & Greenberg, P.D. (1991) Cytotoxic T-Cells Specific for Cytomegalovirus - A Potential Therapy for Immunocompromised Patients. *Reviews of Infectious Diseases*, **13**, S966-S973.
- Rischer, M., Pscherer, S., Duwe, S., Vormoor, J., Jurgens, H., & Rossig, C. (2004) Human gamma delta T cells as mediators of chimaeric-receptor redirected anti-tumour immunity. *British Journal of Haematology*, **126**, 583-592.
- Riviere, I., Brose, K., & Mulligan, R.C. (1995) Effects of Retroviral Vector Design on Expression of Human Adenosine-Deaminase in Murine Bone-Marrow Transplant Recipients Engrafted with Genetically-Modified Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 6733-6737.
- Riviere, I., Gallardo, H.F., Hagani, A.B., & Sadelain, M. (2000) Retroviral-mediated gene transfer in primary murine and human T-lymphocytes. *Molecular Biotechnology*, **15**, 133-142.
- Roessig, C., Scherer, S.P., Baer, A., Vormoor, J., Rooney, C.M., Brenner, M.K., & Juergens, H. (2002) Targeting CD19 with genetically modified EBV-specific human T lymphocytes. *Annals of Hematology*, **81**, S42-S43.
- Rooney, C.M. (2003) New insights into EBV-associated post-transplant lymphoproliferative disease. *Lancet*, **361**, 192-193.
- Rooney, C.M., Smith, C.A., Ng, C.Y.C., Loftin, S., Li, C.F., Krance, R.A., Brenner, M.K., & Heslop, H.E. (1995) Use of Gene-Modified Virus-Specific T-Lymphocytes to Control Epstein-Barr-Virus-Related Lymphoproliferation. *Lancet*, **345**, 9-13.
- Rosenfeld, C., Goutner, A., Choquet, C., Venuat, A.M., Kayibanda, B., Pico, J.L., & Greaves, M.F. (1977) Phenotypic Characterization of A Unique Non-T, Non-B Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Line. *Nature*, **267**, 841-843.
- Rossig C., Bär A., Pscherer S., Altvater B., Pule M., Rooney C., Brenner M., Jürgens H., & Vormoor J. (2005) Target antigen expression on a professional antigen-presenting cell induces superior proliferative anti-tumor T cell responses via chimeric T cell receptors. *Journal of Immunotherapy*, (in press).
- Rossig, C., Bollard, C.M., Nuchtern, J.G., Merchant, D.A., & Brenner, M.K. (2001) Targeting of G(D2)-positive tumor cells by human T lymphocytes engineered to express chimeric T-cell receptor genes. *International Journal of Cancer*, **94**, 228-236.
- Rossig, C., Bollard, C.M., Nuchtern, J.G., Rooney, C.M., & Brenner, M.K. (2002) Epstein-Barr virus-specific human T lymphocytes expressing antitumor chimeric T-cell receptors: potential for improved immunotherapy. *Blood*, **99**, 2009-2016.
- Rousseau, R., Biagi, E., Yvon, E., Mei, Z.Y., Inman, S., Rill, D., Heslop, H., Popat, U., Gee, A., Krance, R., Carrum, G., Alcoser, P., Rodgers, S., Kuehnle, I., Margolin, J., & Brenner, M. (2002) Treatment of high-risk acute leukemia with an autologous vaccine expressing transgenic IL-2 and CD40L. *Blood*, **100**, 867A-868A.
- Ruud, C.O. & Todd, R.M. (1996) Artfactual hypercalcemia in association with a IgM Kappa monoclonal protein. *Blood*, **88**, 3597.
- Sakaguchi, S. (2005) Naturally arising Foxp3-expressing CD25(+) CD4(+) regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature Immunology*, **6**, 345-352.

- Schengrund,C.L., Repman,M.A., & Shochat,S.J. (1985) Ganglioside Composition of Human Neuroblastomas - Correlation with Prognosis - A Pediatric Oncology Group-Study. *Cancer*, **56**, 2640-2646.
- Schild,H., Mavaddat,N., Litzenberger,C., Ehrich,E.W., Davis,M.M., Bluestone,J.A., Matis,L., Draper,R.K., & Chien,Y.H. (1994) The Nature of Major Histocompatibility Complex Recognition by Gamma-Delta-T-Cells. *Cell*, **76**, 29-37.
- Schulz,G., Cheresch,D.A., Varki,N.M., Yu,A., Staffileno,L.K., & Reisfeld,R.A. (1984) Detection of Ganglioside Gd2 in Tumor-Tissues and Sera of Neuro-Blastoma Patients. *Cancer Research*, **44**, 5914-5920.
- Seder,R.A., Paul,W.E., Davis,M.M., & Destgroth,B.F. (1992) The Presence of Interleukin-4 During Invitro Priming Determines the Lymphokine-Producing Potential of Cd4+ T-Cells from T-Cell Receptor Transgenic Mice. *Journal of Experimental Medicine*, **176**, 1091-1098.
- Stalder,T., Hahn,S.H., & Erb,P. (1994) Fas Antigen Is the Major Target Molecule for Cd4+ T-Cell-Mediated Cytotoxicity. *Journal of Immunology*, **152**, 1127-1133.
- Stenger,S., Hanson,D.A., Teitelbaum,R., Dewan,P., Niazi,K.R., Froelich,C.J., Ganz,T., Thoma-Uszynski,S., Melian,A., Bogdan,C., Porcelli,S.A., Bloom,B.R., Krensky,A.M., & Modlin,R.L. (1998) An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science*, **282**, 121-125.
- Straathof,K.C., Pule,M.A., Yotnda,P., Dotti,G., Vanin,E.F., Brenner,M.K., Heslop,H.E., Spencer,D.M., & Rooney,C.M. (2005) An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. *Blood*, **105**, 4247-4254.
- Su,Z., Peluso,M., Raffegerst,S., Schendel,D., & Roskrow,M. (2001) Dendritic cells transfected with LMP2a RNA induce CD4+ LMP2a-specific CTLs which kill via a Fas-independent mechanism. *Blood*, **98**, 234A.
- Sun,Q., Burton,R.L., & Lucas,K.G. (2002) Cytokine production and cytolytic mechanism of CD4(+) cytotoxic T lymphocytes in ex vivo expanded therapeutic Epstein-Barr virus-specific T-cell cultures. *Blood*, **99**, 3302-3309.
- Sun,Q., Pollok,K.E., Burton,R.L., Dai,L.J., Britt,W., Emanuel,D.J., & Lucas,K.G. (1999) Simultaneous ex vivo expansion of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes using B-lymphoblastoid cell lines expressing cytomegalovirus pp65. *Blood*, **94**, 3242-3250.
- Tanaka,Y., Morita,C.T., Tanaka,Y., Nieves,E., Brenner,M.B., & Bloom,B.R. (1995) Natural and Synthetic Nonpeptide Antigens Recognized by Human Gamma-Delta T-Cells. *Nature*, **375**, 155-158.
- Tazume,K., Hagihara,M., Gansuud,B., Higuchi,A., Ueda,Y., Hirabayashi,K., Hojo,M., Tanabe,A., Okamoto,A., Kato,S., & Hotta,T. (2004) Induction of cytomegalovirus-specific CD4(+) cytotoxic T lymphocytes from seropositive or negative healthy subjects or stem cell transplant recipients. *Experimental Hematology*, **32**, 95-103.
- Teng,M.W.L., Kershaw,M.H., Moeller,M., Smyth,M.J., & Darcy,P.K. (2004) Immunotherapy of cancer using systemically delivered gene-modified human T lymphocytes. *Human Gene Therapy*, **15**, 699-708.
- Uckun,F.M., Jaszcz,W., Ambrus,J.L., Fauci,A.S., Gajlpeczalska,K., Song,C.W., Wick,M.R., Myers,D.E., Waddick,K., & Ledbetter,J.A. (1988) Detailed Studies on Expression and Function of Cd19 Surface Determinant by Using B43 Monoclonal-Antibody and the Clinical Potential of Anti-Cd19 Immunotoxins. *Blood*, **71**, 13-29.
- Urashima,M., Chauhan,D., Uchiyama,H., Freeman,G.J., & Anderson,K.C. (1995) Cd40 Ligand Triggered Interleukin-6 Secretion in Multiple-Myeloma. *Blood*, **85**, 1903-1912.
- van der Kolk,D.M., Vellenga,E., Scheffer,G.L., Muller,M., Bates,S.E., Scheper,R.J., & de Vries,E.G.E. (2002) Expression and activity of breast cancer resistance protein (BCRP) in de novo and relapsed acute myeloid leukemia. *Blood*, **99**, 3763-3770.

- Vergelli, M., Hemmer, B., Muraro, P.A., Tranquill, L., Biddison, W.E., Sarin, A., McFarland, H.F., & Martin, R. (1997) Human autoreactive CD4(+) T cell clones use perforin- or Fas/Fas ligand-mediated pathways for target cell lysis. *Journal of Immunology*, **158**, 2756-2761.
- Vormoor, J., Baersch, G., Baumann, M., Ritter, J., & Jurgens, H. (1998) Flow cytometric identification of candidate normal stem cell populations in CD45-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*, **100**, 501-508.
- Walker, R.E., Bechtel, C.M., Natarajan, V., Baseler, M., Hege, K.M., Metcalf, J.A., Stevens, R., Hazen, A., Blaese, R.M., Chen, C.C., Leitman, S.F., Palensky, J., Wittes, J., Davey, R.T., Falloon, J., Polis, M.A., Kovacs, J.A., Broad, D.F., Levine, B.L., Roberts, M.R., Masur, H., & Lane, H.C. (2000) Long-term in vivo survival of receptor-modified syngeneic T cells in patients with human immunodeficiency virus infection. *Blood*, **96**, 467-474.
- Walter, E.A., Greenberg, P.D., Gilbert, M.J., Finch, R.J., Watanabe, K.S., Thomas, E.D., & Riddell, S.R. (1995) Reconstitution of Cellular-Immunity Against Cytomegalovirus in Recipients of Allogeneic Bone-Marrow by Transfer of T-Cell Clones from the Donor. *New England Journal of Medicine*, **333**, 1038-1044.
- Wang, H.Y., Lee, D.A., Peng, G.Y., Guo, Z., Li, Y.C., Kiniwa, Y., Shevach, E.M., & Wang, R.F. (2004) Tumor-specific human CD4(+) regulatory T cells and their ligands: Implications for immunotherapy. *Immunity*, **20**, 107-118.
- Watson, B., Boardman, C., Laufer, D., Piercy, S., Tustin, N., Olaleye, D., Cnaan, A., & Starr, S.E. (1995a) Humoral and Cell-Mediated Immune-Responses in Healthy-Children After One Or 2 Doses of Varicella Vaccine. *Clinical Infectious Diseases*, **20**, 316-319.
- Watson, B., Rothstein, E., Bernstein, H., Arbeter, A., Arvin, A., Chartrand, S., Clements, D., Kumar, M.L., Reisinger, K., Blatter, M., Starr, S.E., Staehle, B., Ngai, A., & White, C.J. (1995b) Safety and Cellular and Humoral Immune-Responses of A Booster Dose of Varicella Vaccine 6 Years After Primary Immunization. *Journal of Infectious Diseases*, **172**, 217-219.
- Wraith, D.C., Nicolson, K.S., & Whitley, N.T. (2004) Regulatory CD4(+) T cells and the control of autoimmune disease. *Current Opinion in Immunology*, **16**, 695-701.
- Xue, S., Gillmore, R., Downs, A., Tsallios, A., Holler, A., Gao, L., Wong, V., Morris, E., & Stauss, H.J. (2005) Exploiting T cell receptor genes for cancer immunotherapy. *Clinical and Experimental Immunology*, **139**, 167-172.
- Zaunders, J.J., Dyer, W.B., Wang, B., Munier, M.L., Miranda-Saksena, M., Newton, R., Moore, J., Mackay, C.R., Cooper, D.A., Saksena, N.K., & Kelleher, A.D. (2004) Identification of circulating antigen-specific CD4(+) T lymphocytes with a CCR5(+), cytotoxic phenotype in an HIV-1 long-term nonprogressor and in CMV infection. *Blood*, **103**, 2238-2247.
- Zhang, G.H., Gurtu, V., & Kain, S.R. (1996) An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **227**, 707-711.
- Zola, H.M.P.B.T.W.H.Y.H.K.Y. (1991) Preparation and characterization of a chimeric CD19 monoclonal antibody. *Immunol Cell Biol.*, **63**, 411-422.

Anhang

Vektor: MSCV-gE-I-GFP

Größe: 8560bp

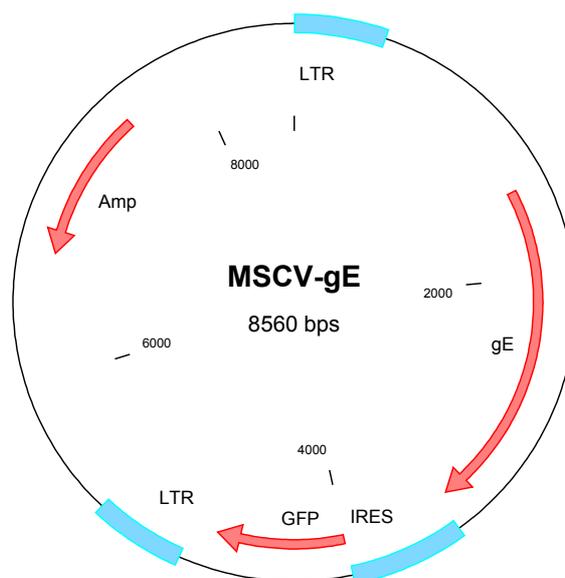
Backbone: MSCV-I-GFP: 6825bp

VZV-gE (1735bp) subkloniert aus pCR3.1-gE (AM Arvin) über *Bam*HI und *Xho*I

Resistenz: Ampicillin

Enthält interne Ribosomen-Eintrittssignale (IRES)

sowie das Grün-Fluoreszierende Protein (GFP)



Vektor: MSCV-gI-I-GFP

Größe: 7754bp

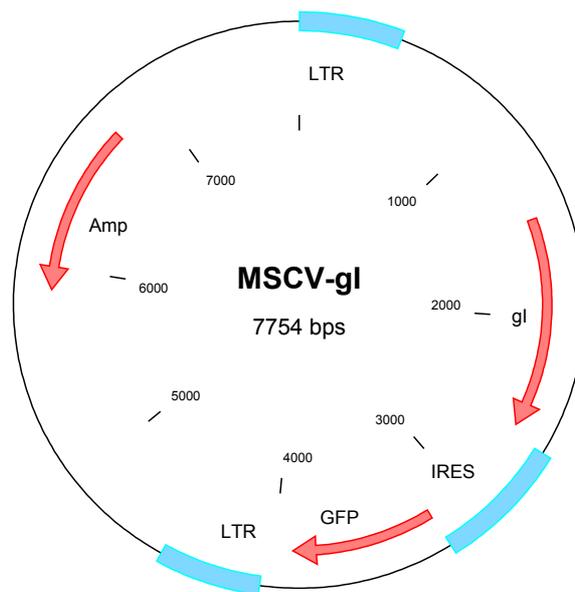
Backbone: MSCV-I-GFP (6825)

VZV-gI (929bp) subkloniert aus pCR3.1-gI (AM Arvin) über *Bam*HI und *Xho*I

Resistenz: Ampicillin

Enthält interne Ribosomen-Eintrittssignale (IRES)

sowie das Grün-Fluoreszierende Protein (GFP)



Ich bedanke mich herzlich bei

...allen, die mich in der gesamten Zeit dieser Arbeit unterstützt haben!

...Prof. Dr. Jürgens für die Möglichkeit, diese interessante Themenstellung in seiner Klinik anzufertigen, die Betreuung der Arbeit und die Übernahme des Zweitgutachtens.

...Prof. Dr. Klämbt, für die Übernahme des Erstgutachtens und stete Diskussionsbereitschaft.

...Dr. Claudia Rössig für ihre fachliche Unterstützung und ihre unglaubliche Motivationsfähigkeit.

...Dr. Bodo Eing für die Herstellung des VZV-Lysats und die „virologische“ Betreuung dieser Arbeit

... allen lieben Kolleginnen und Kollegen in der Pädiatrischen Hämatologie & Onkologie und dem KMT-Zentrum für das angenehme Arbeitsklima und die gute Unterstützung bei allen kleinen und größeren Problemen.

...Bianca, Sibylle und Susanne für uneingeschränkte Motivation und Hilfe.

...allen Blutspendern, ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

...meinen Eltern, die immer für mich da sind und mich bedingungslos unterstützt haben.

...Dirk, für mehr als ihm an dieser Stelle lieb ist.

Lebenslauf

Name: Silke Landmeier
 Adresse: Friedrich-Ebert-Str. 136
 48153 Münster

Geburtstag: 14.11.1976
 Geburtsort: Ankum
 Nationalität: deutsch

<u>Datum</u>	<u>Institution</u>	<u>Abschluss</u>
1983-1987	Mariengrundschule Münster-Roxel	
1987-1996	Schillergymnasium Münster	Abitur (Note 1,6)
1996-2002	Studium Diplom-Biologie an der Universität Osnabrück	Diplom- Biologin (Note 1,6)
1999	Arbeit als wissenschaftliche Hilfskraft bei PD Dr. H. Jung im Rahmen des Projektes: „Mutagenesestudien des Na ⁺ /Prolin-Symporters PutP aus <i>E. coli</i> “	
April 2001	Diplomprüfungen in den Fächern Biochemie (Note 1,3) Tierphysiologie (Note 1,3) Mikrobiologie (Note 2,0)	
April 2002	Abgabe der Diplomarbeit mit dem Thema: „Charakterisierung von Komponenten des geißelspezifischen TypIII-Protein-Transport-Systems aus <i>E. coli</i> “	(Note 1,7)
Seit Juli 2002	Promotion an der Universitätsklinik Münster/ Abteilung Pädiatrische Hämatologie und Onkologie Zum Thema: „Genmodifizierte Varicella-Zoster-Virus- spezifische T-Zellen als Effektorzellen tumorspezifischer Immunität“	
September 2002	Beginn des Promotionstudienganges Biologie an der Westfälischen-Wilheims-Universität Münster	

