

Institut für molekulare Immunologie des Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit (GSF) und der Klinischen Kooperationsgruppe Hämatopoetische Zelltransplantation unter der Leitung von Prof. Dr. med. Hans-Jochem Kolb

**Simultane Expansion zytotoxischer T-Lymphozyten
gerichtet gegen Adeno-und Epstein-Barr-Virus Epitope,
zur Therapie von opportunistischen Infektionen nach
allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation
(HSCT).**

Sybille Susanne Regn, geb. Martin

**Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigten Dissertation.**

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr A.Gierl

Prüfer der Dissertation:

1. Hon.-Prof. Dr. R. Balling, Technische Universität Braunschweig
2. Univ.-Prof. Dr. J. Buchner
3. Univ.-Prof. Dr. K. Pfeffer

Die Dissertation wurde am 15.11.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Chemie
am 06.03.2002 angenommen.

Für Stefan

Bevor ich beginne.....,

möchte ich mich bei all denen bedanken, die mir während der Zeit dieser Arbeit unterstützend und verständnisvoll zur Seite standen .

Aber mein wirklich größter und innigster Dank gilt Frau Dr. Marie Roskrow, die mich nicht nur als wissenschaftliche Betreuerin in herausragender Weise unterrichtet und unterwiesen hat, sondern mich während der gesamten Periode meiner Arbeit ständig in freundschaftlicher, sowie professioneller Weise motiviert und angetrieben hat. Sie war mein Motor, meine Kraftquelle und meine tägliche Freude und Ansporn. Ohne sie wäre ich niemals bis zu diesem Punkt gelangt. Sie hat es brillant verstanden, die kompliziertesten wissenschaftlichen Zusammenhänge in einer verständlichen und faszinierenden Weise zu präsentieren, die mich die Geister rufen ließ, die ich nicht mehr loslassen kann...

Besonders herzlich möchte ich mich bei Frau Professor Dolores Schendel bedanken, für ihre große Hilfe und Unterstützung bei der Verfassung und Veröffentlichung unseres „Papers“ und für die stete Diskussionsbereitschaft und wertvolle Hilfestellung während der Niederschrift meiner Arbeit. Ihre stets konstruktiven und fruchtbaren Vorschläge waren von unschätzbarem Wert für mich und haben mir sehr bei der Fertigstellung dieser Arbeit weitergeholfen. Ohne Ihr „unbürokratisches“ Einspringen als Betreuerin hätte diese Arbeit nicht so gelingen können.

Bei Herrn Professor Kolb möchte ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für viele freundschaftliche und aufmunternde Gesten bedanken. Durch ihn bekam ich Einblick in die klinische Seite der KMT und seine Kompetenz und sein Engagement im Dienste der Patienten haben mich tief beeindruckt und berührt.

Besondere Anerkennung gebührt Frau Dr. Heike Pohla, die viel Mühe und Zeit in das Korrekturlesen dieser Arbeit investiert hat. Mit detektivischem Spürsinn hat sie dieser Arbeit zu einem besseren Deutsch verholfen und dies war außerordentlich hilfreich.

Herrn Professor Balling sei gedankt für die bereitwillige Übernahme der „Doktorvaterschaft“, trotz seines beruflichen Wechsels an die GBF in Braunschweig.

Bei Herrn Professor Pfeffer möchte ich mich besonders für die konstruktiv kritische Beurteilung und Beratung bei der Niederschrift dieser Arbeit bedanken. Die viele Zeit und Mühe, die er mit dem Manuskript dieser Fassung verbracht hat, war besonders wertvoll für die Fertigstellung dieser Dissertation.

Das nächste riesige Dankeschön gilt Silke Raffegerst, ohne ihre Hilfe wäre so manche graphische Darstellung, geschweige denn unsere Veröffentlichung niemals so schnell zustande gekommen. Ich danke Ihr außerdem für Ihre niemals ermüdende Hilfsbereitschaft, Unterstützung und liebevolle Freundschaft.

Insbesondere erwähnen möchte ich auch die anderen MCPs, Zheny Su, Mario Peluso und Daniel Müller wegen der beispiellosen und innigen Gemeinschaft, die wir nicht nur während der Arbeit miteinander hatten und haben und die sehr zu dem Erfolg den unsere Gruppe hatte beigetragen hat.

Xiao Chen, Florian Hötzl, Peter Raasch, Monika Franz und Gela Goldemund sei ganz herzlich gedankt, für das Aufrechterhalten eines entspannten Arbeitsklimas- und besonders Karin Oettrich möchte ich für viele gute Ratschläge, Hilfestellungen und wertvolle Gespräche danken.

Herrn Dr. Josef Mysliwitz danke ich recht herzlich für die viele Hilfe und Geduld, die er uns am FACS-Gerät erwiesen hat, und das er auch immer noch lächelte, selbst wenn wir das fünfte Mal am Tag zu ihm kamen mit dem Satz: Du Josef, ich hab´ da ein Problem?!

Außerdem möchte ich mich bei all den netten Kollegen des 3.Stocks bedanken, die uns auch immer wieder bei brenzligen Situationen zur Seite standen.

Elfriede Nößners „magischen Blutes“ verdanke ich einige meiner schönsten Ergebnisse und dafür sei ihr besonders herzlich gedankt-

Sylvia Donhauser, die gute Seele des Instituts verdient eine ganz besondere Danksagung und die bekommt sie in einem gesonderten Format!!!

Diese Arbeit hätte mir niemals so viel Freude bereitet und soviel Einsatz gefordert, wenn ich nicht die liebevolle und geduldige Unterstützung meines Mannes Stefan gehabt hätte, der sehr viele einsame Stunden während dieser Zeit verbracht hat.

Ich widme daher ihm diese Arbeit und Dankeschön ist nicht das richtige Wort um auszudrücken wie viel mir seine Unterstützung und vor allem seine stetige Zuhörbereitschaft während dieser Zeit bedeutet haben!!

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungen	10
Einleitung	12
Hämatopoetische Stammzellendifferenzierung.....	13
Dendritische Zellen	14
Aktivierung von T-Lymphozyten	22
Molekulare Grundlagen der T-Zellvermittelnden Zytotoxizität.....	23
Das HLA-System.....	24
Antigenpräsentation über MHC-I/ MHC-II-Transportroute	26
Historische Entwicklung der Knochen- und Stammzelltransplantation	28
Erste Klinische Versuche	30
Indikation für eine „Hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSCT)“	32
Vorbereitungsmaßnahmen bei einer allogenen HSCT	33
Die Rekonstitution des Immunsystems post HSCT	34
Wiederaufbau der T- Zell Immunität.....	34
Wiederaufbau der B- Zell Immunität	36
Faktoren, die eine Restauration des Immunsystem beeinträchtigen.....	38
Opportunistische Infektionen	40
Adoptive Immuntherapie für Virusassoziierte Erkrankungen.....	41
Epstein-Barr Virus (EBV)	45
Latente Infektion.....	46
Immunreaktionen gegen EBV und Fluchtmechanismen des Virus.....	47
Adenoviren (AdV).....	50
Bindung und Internalisation des AdV	51
Adenovirale Immunevasions- Mechanismen	52
Immunreaktionen gegen Adenovirus.....	53
Ziele der Arbeit.....	54

Material und Methoden **55**

Geräte	55
Verbrauchsmaterialien.....	56
Zellkulturmedien und Reagenzien.....	56
Zusätze von Zellkulturmedien.....	57
Zytokine.....	57
Chemikalien.....	57
Antikörper (Maus anti Human)	58
Zelllinien.....	60
Viren.....	60
Extraktion von Mononukleären Zellen des Peripheren Blutes (PBL)	61
Zählen von Zellen.....	62
Kryokonservierung von Zellen.....	62
Auftauen von Zellen	63
Kultur von adhärennten Zelllinien.....	63
Kultur von dendritischen Zellen (DCs)	64
Phänotypische Analyse von DCs.....	64
Färbung mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern	65
Durchfußzytometrische-Analyse	66
Zytospin.....	66
Bestimmung der endocytotischen Kapazität von DCs (FITC-Dextran).....	66
Gewinnung von B95-8 – Kulturüberständen.....	67
EBV-transformierte B-Zell linien (LCL).....	68
Infektion von DCs mit dem Adenovirus Typ 5	69
Adenovirale Infektion von DCs mit Lipofectamin.....	69
Wildtypviren.....	70
Bestimmung und Blockieren der CD51-Expression auf dendritischen Zellen.....	71
Detektion der Expression des Coxsackie- und Adenovirusrezeptors „CAR“ auf DCs und LCLs.....	72
Kokultur von LCLs auf huCD40L-exprimierenden Mausfibroblasten (L-CD40L).....	72

Adenovirale Infektion von LCL	73
Gemischte Lymphocyten Reaktion (MLR = mixed lymphocyte reaction).....	73
Autologe MLR.....	75
Immunphäotypisierung proliferierender T-Zellen	75
Generierung und Expansion AdV-spezifischer ZTL.....	75
Generierung und Expansion AdV/EBV -spezifischer ZTL.....	76
Vorbereitung der Zielzellen für den Zytotoxizitäts-Assay	77
Standard Chromfreisetzung Test (chromium-51 release assays)	78
Messung der spezifischen Zytotoxizität	79
MHC-Inhibitions assay.....	80
Immunphäotypisierung von ZTL	80
Statistische Auswertung der beobachteten Ergebnisse.....	81
Berechnung der Multiplicity of Infection (MOI).....	82

Ergebnisse **83**

Teil I: Die <i>in vitro</i> Generierung AdV-spezifischer CTL	83
Generierung von Dendritischen Zellen unter verschiedenen Kulturbedingungen	85
Immunphäotypisierung unreifer und reifer DCs.....	88
Prozentuale Verteilung der DC-Oberflächenmarker	89
Dotplot-Analysen von DC-Kulturen unterschiedlicher Kulturbedingungen	90
Testsysteme zur Überprüfung der Funktionalität von DCs	91
Untersuchung der Aufnahmekapazität von FITC-Dextran über den Mannoserezeptor	92
Aufnahmekapazität des Adenovirus	93
Immunhistologische Darstellung AdV-GFP ⁺ -DCs.....	94
Vergleich der immunstimulatorischen Kapazität von DCs	96
Vergleich des Einflusses der Kulturbedingungen auf die DCs	97
Infektion von DCs mit rekombinantem Adenovirus Typ 5	98
Vergleich der Infektionskapazität unreifer DCs \pm Lipofectamin	99
Vergleich der Infektionskapazität unreifer und reifer DCs	100
Oberflächenprofil AdV-GFP-transfizierter DCs	101
Fluoreszenzanalyse AdV-GFP-transfizierter DCs.....	102
Der Effekt von TNF- α auf die Expression von CD51 auf DCs	104

Dosisabhängige Inhibierung der CD51-Expression durch TNF- α	105
Einfluß der CD51-Expression auf die adenovirale Infektion von DCs	106
Der Effekt von TNF- α auf die Expression von $\alpha\beta$ 1-Integrinrezeptoren und „CAR“ auf DCs.....	107
Überprüfung der immunstimulatorischen Kapazität von Adenovirus infizierte und reife DC in MLR-Assays	110
Allogene MLR.....	111
Immunphäotypisierung der allo genen T-Zellen	112
Autologe MLR.....	113
Immunphäotypisierung der proliferierenden autologen T-Zellen.....	114
<i>In vitro</i> Expansion AdV-spezifischer ZTL.....	115
Bestimmung der spezifischen Zytotoxizität von AdV-ZTL-Linien	117
MHC-Abhängigkeit der AdV-spezifischen Zytotoxizität	118
Oberflächenprofil AdV-spezifischer ZTL-Linien	119
Kreuzreaktivität AdV-spezifischer ZTL	121
MHC-Inhibierung kreuzreaktiver AdV ⁺ ZTL.....	122
Teil II: Die <i>in vitro</i> Generierung AdV- und EBV spezifischer ZTL	123
AdV-infektion von B-LCLs.....	124
Durchflußzytometrische Analyse AdV-infizierter B-LCLs.....	124
Viabilität AdV-infizierter B-LCLs	125
Kokultivierung von LCLs auf CD40 Ligand-exprimierenden Monolayern	128
Analyse der CD51-Expression und der Infektionskapazität durch AdV nach Kokultivierung der B-LCLs auf CD40L-exprimierenden Monolayern	130
Expression von CD49f vor und nach Cokultivierung	132
Immunstimulatorische Kapazität AdV- infizierter LCLs	133
Allogene MLR.....	133
Immunphäotypisierung der allo genen T-Zellen	134
Autologe MLR.....	135
Phäotypisierung der autologen T-Zellen	136
Simultane <i>in vitro</i> Expansion AdV- und EBV-spezifischer ZTL.....	136
Bestimmung der zytotoxischen Aktivität AdV/EBV-spezifischer ZTL.....	137
MHC-Abhängigkeit der AdV-und EBV-spezifischen Cytotoxizität.....	138

Immunphänotypisierung „bispezifischer“ ZTL-Linien	139
Bestimmung der zytotoxischen Aktivität „monospezifischer“ EBV-spezifischer ZTL	140
Immunphänotypisierung „monospezifischer“ LCL-ZTL-Linien.....	141
Analyse der Kreuzreaktivität „bispezifischer ZTL.....	142

Diskussion	144
-------------------------	------------

Zusammenfassung.....	160
-----------------------------	------------

Literaturverzeichnis.....	162
----------------------------------	------------

Anhang

Publikationsliste	181
-------------------------	-----

Curriculum vitae.....	182
-----------------------	-----

ABKÜRZUNGEN

AdV-	Adenovirus
AIDS-	Acquired Immunodeficiency syndrom (erworbenes Immunschwäche Syndrom)
APC-	Antigen presenting cell (Antigenpräsentierende Zelle)
CAR-	Coxsackie und Adenovirus Rezeptor
CD-	Cluster of Differentiation (Differenzierungscluster)
CM-	Complete Medium (komplettes Medium)
CMA-	Concanamycin A
CMV-	Cytomegalie Virus
ZTL-	Zytotoxische T Lymphozyten
DC-	Dendritic cell (dendritische Zelle)
DLI-	Donor Lymphozyte Infusion (Spenderlymphozyteninfusion)
EBV-	Epstein Barr-Virus
EGTA	Ethylen-Glycol-bis(β -Aminoethylether)-N'-Tetraacetic acid
FACS-	Fluorescence-activated cell sorter (Durchflußzytometer)
Fc-	Fragment crystallizable (kristallisierbares Fragment)
FCS-	Fetal calf serum (Fötales Kälberserum)
GFP-	Greenfluorent Protein (grünfluoreszierendes Protein)
GM-CSF-	Granulocyte and Macrophages colonie stimulating factor (Granulozyten Makrophagen-koloniestimulierender Faktor)
GVHD-	Graft versus Host Disease (Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion)
Gy-	Gray
HIV-	Human Immunodeficiency Virus (humanes Immunschwäche Virus)
HLA-	Human Leucocyte Antigen (humanes Leukozytenantigen)
HSCT-	Hematopoetic Stemcell Transplantation (Hämatopoetische Stammzelltransplantation)
HSV-	Herpes Simplex Virus
HVGD-	Host versus Graft Disease (Wirt- gegen -Transplantat- Reaktion)
IFN-	Interferon
IL-	Interleukin
KMT-	Knochenmarktransplantation
LAK-	Lymphokinaktivierte Killerzellen

LCL-	Lymphoblastoide B-Zelllinie
mAK-	Monoklonaler Antikörper
MHC-	Majorhistocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MLR-	Mixed Lymphocyte Reaction (gemischte Lymphozyten Reaktion)
MOI-	Multiplicity of Infection (Infektiöse Partikel pro Zelle)
NK-	Natural killer cells (Natürliche Killerzellen)
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PBMNCs-	Peripheral Blood Mononuclear Cells (Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PfU-	Plaquesforming Units (Lysierte Einheiten, die aufgrund des zytopathischen Effektes Löcher im Rasen einer infizierten Zellkultur bilden)
Rpm-	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
SCT-	Stemcell Transplantation (Stammzelltransplantation)
SFM-	Serumfreies Medium
SOT-	Solid Organ Transplantation (Organtransplantation)
TBI-	Total body Irradiation (Ganzkörperbestrahlung)
TNF-	Tumor Nekrose Faktor

MAßE UND EINHEITEN

IU-	Internationale Units
mg-	Milligramm
ng-	Nanogramm
µg-	Mikrogramm
ml-	Milliliter
µl-	Mikroliter

EINLEITUNG

Zur Therapie maligner Erkrankungen, zu denen solide Tumore, sowie die vielen unterschiedlichen Formen von Leukämien und Lymphomen zählen, haben sich in den vergangenen Jahrzehnten diverse Strategien etabliert. Dabei beinhalten die meisten konventionellen Therapien zunächst die chirurgische Entfernung des Primärtumors. Im Falle des Auftretens von Metastasen kann der Patient jedoch einem höchst aggressiven Behandlungsschema, bestehend aus Chemotherapie oder Strahlentherapie, oder aus einer Kombination von beiden ausgesetzt werden, wobei alle sich teilenden Zellen des Körpers betroffen werden. Dazu gehören nicht nur die malignen Tumorzellen, sondern auch gesunde Zellen, wie das Knochenmark, die Haarfollikelzellen, Zellen der Schleimhäute, sowie die Keimzellen.

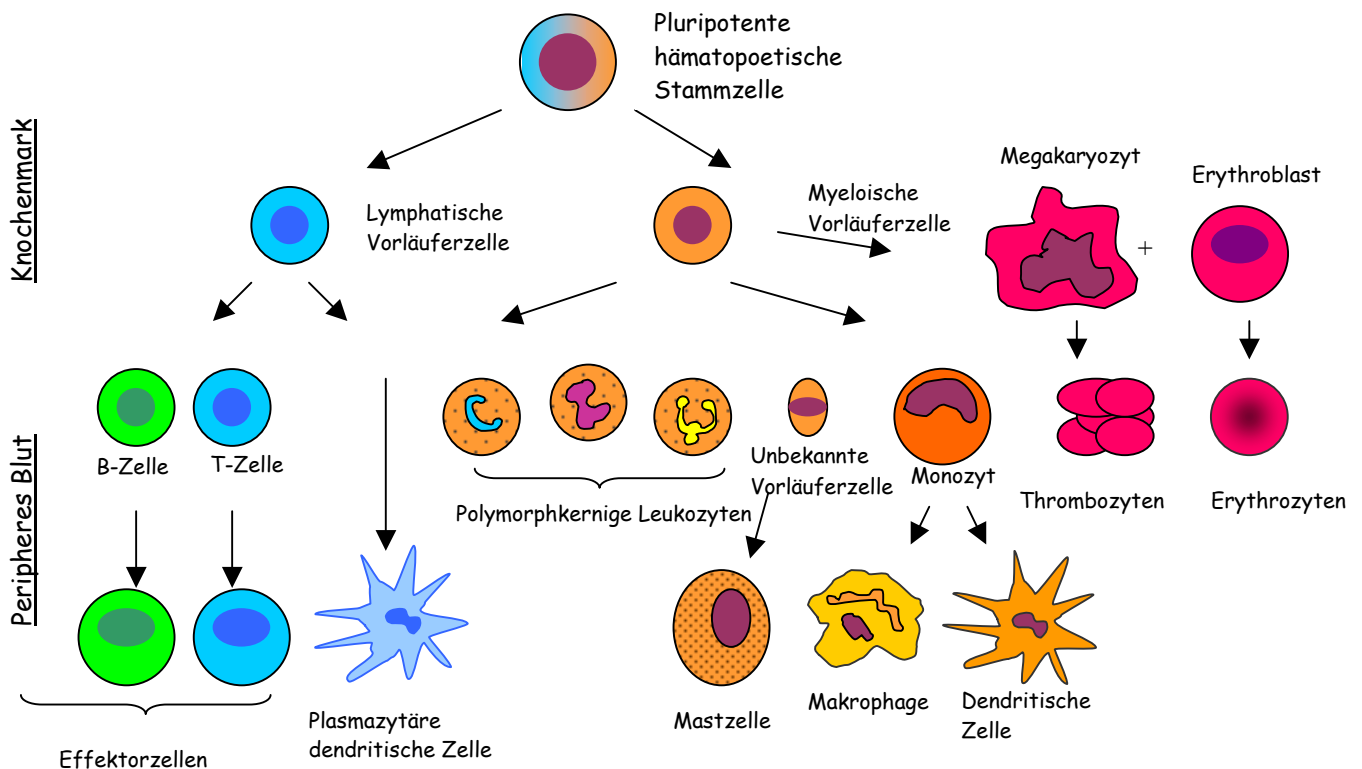
Der myelosuppressive Nebeneffekt der Chemotherapie hat darüber hinaus eine vorübergehende Immunschwäche zur Folge (Johnson 2000), wobei der Körper besonders anfällig wird für mikrobielle Infektionen. In einer nachfolgenden Erholungsphase kann sich aber das angegriffene Immunsystem des Patienten allmählich wieder regenerieren und erhält seine Fähigkeit auf Infekte zu reagieren zurück.

Im Fall von Leukämien, in dem die Zellen des hämatopoetischen Systems bösartig entartet sind, können die konventionellen Therapien oft keinen dauerhaften Heilungserfolg bewirken.

In diesen besonders schweren Fällen zu denen u.a. die akute lymphatische Leukämie (ALL), die akute myeloische Leukämie (AML), die chronische myeloische Leukämie (CML) oder auch der Morbus Hodgkin gehören, stellt die allogene Knochenmark- oder Stammzelltransplantation die Therapie der Wahl dar (Lowenberg *et al.* 1999, Kolb 1998)

Auch für andere unheilbare Erkrankungen des hämatopoetischen Systems, sowie für manche metastasierende Tumoren kann eine Knochenmarktransplantation die einzige Hoffnung auf ein Langzeitüberleben bedeuten, wenn sich alle konventionellen Therapien als erfolglos erwiesen haben (Schaefer *et al.* 1991, Begemann 1999). Das Knochenmark ist als Ort der Hämatopoese von besonderer Bedeutung, da alle zellulären Bestandteile des Blutes von einer pluripotenten, hämatopoetischen Stammzelle des Knochenmarks abstammen (Abbildung 1).

Abbildung 1: Hämatopoetische Stammzellendifferenzierung



Differenzierung von Blutzellen.

Aus der pluripotenten Blutstammzelle leiten sich zwei spezialisierte Typen von Stammzellen, die lymphatische Vorläuferzelle, aus der sich die B und T-Lymphozyten und die plasmazytären dendritischen Zellen entwickeln, und die myeloische Vorläuferzelle, aus der sämtliche anderen Leukozyten hervorgehen ab. Dieses Schema ist stark vereinfacht dargestellt und berücksichtigt nicht die unterschiedlichen Entwicklungswege der B- und T-Lymphozyten. B-Lymphozyten reifen bereits im Knochenmark heran, während T-Lymphozyten im Thymus ausdifferenziert werden. (Schema vereinfacht, nach Janeway 1997)

Dieses Schema der Blutbildung wurde bereits 1909 durch den russischen Arzt Maximow als Hypothese während einer Vorlesung an der Berliner Charité entwickelt und in der *folia haematologica* publiziert (Maximov A. 1909). Der Nachweis, daß eine blutbildende Stammzelle tatsächlich in der Lage ist, alle Blutzellen zu generieren gelang erst 60 Jahre später mit Hilfe von *in vitro* Experimenten in funktionellen Testsystemen (Messner *et al.* 1973, 1980). Diese Stammzellen wurden im Knochenmark nachgewiesen und stellen einen Anteil von 1-3% der kernhaltigen Zellen dar. Es wird angenommen, daß wenige, vielleicht einige 100-1000 der sehr unreifen Stammzellen ausreichen, um die gesamte Blutbildung eines Menschen ein Leben lang zu gewährleisten.

Der Grund dafür liegt in der hohen Potenz dieser Zellen zur Teilung, Vermehrung und Differenzierung. Auch die Entwicklung der Immunzellen leitet sich von pluripotenten

hämatopoetischen Stammzellen ab, die während der Embryonalentwicklung in der fötalen Leber gebildet und später ständig aus dem Knochenmark nachgeliefert werden.

Während die Vorläufer der T-Lymphozyten aus dem Knochenmark auswandern und im Thymus heranreifen, findet die Reifung und Ausdifferenzierung der B-Zellen auch im Knochenmark statt. Das Immunsystem des Menschen und der höheren Vertebraten zeichnet sich durch das Zusammenspiel der angeborenen Immunantwort und der erworbenen Immunantwort aus. Die Aufgabe des Immunsystems ist die Abwehr und Beseitigung eindringender Pathogene. Die angeborene Immunität ist unspezifisch und vermittelt die erste Verteidigungslinie gegenüber eindringenden Pathogenen. Dagegen arbeitet die adaptive Immunität über ein System antigenspezifischer Rezeptoren, welche die Spezifität und das Gedächtnis des Immunsystems gewährleisten. Grundlage dafür ist die klonale Selektionstheorie, die postuliert, daß alle Lymphozyten über ein definiertes Rezeptorpotential verfügen, welches in der Lage ist, spezifische Antigene von Pathogenen zu erkennen. Jeder Rezeptor ist spezifisch für ein Epitop eines gegebenen Antigens.

Nach dieser Hypothese, bewirkt die Rezeptorspezifität einer einzelnen B- oder T-Zelle durch Erkennung des entsprechenden Antigens, eine Proliferation dieser Zellen zu einem Pool klonaler Zellen, die spezifisch auf das Antigen reagieren. Das Ziel ist zum einen die Generierung von Effektorzellen zur Eliminierung des Pathogens und zum anderen die Differenzierung von Gedächtniszellen, die einen lebenslangen Schutz des Körpers gegen Reinfektion mit dem gleichen Pathogen gewährleisten. Die Komponenten der adaptiven Immunität beinhalten neben den T- und B-Lymphozyten auch die sogenannten antigenpräsentierenden Zellen, oder kurz APCs („Antigen presenting cells“).

Diese spezialisierten Zellen fungieren als Vermittler zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunität.

Obwohl alle Zellen des Körpers die Kapazität aufweisen Antigene auf ihren Oberflächen zu exprimieren, ist nur eine gewisse Gruppe von hämatopoetischen Zellen in der Lage als „professionelle“ APCs zu fungieren, um effektiv T-Lymphozyten zu aktivieren und eine Immunantwort zu induzieren. Zu diesen Zelltypen gehören Makrophagen, aktivierte B-Lymphozyten und die dendritischen Zellen (DC), die sich in Langerhans'sche Zellen, interstitielle DCs und lymphoide bzw. plasmazytäre DCs unterteilen lassen. Die dendritischen Zellen sind die potentesten APCs, die man kennt und entwickeln sich ebenfalls aus CD34⁺ myeloischen Vorläuferzellen des Knochenmarks (Abbildung 2). Im peripheren Blut beträgt der Anteil an DCs ca. 0,1 – 0,5 % aller Leukozyten (Fearnley *et al.* 1997) und deshalb wurde die Rolle der DCs in immunologischen Prozessen erst relativ spät erkannt. Nach ihrer

Migration aus dem Knochenmark differenzieren sie sich im peripheren Blut zu unreifen DCs und wandern in die angrenzenden Organe, wo sie Antigene aufnehmen. Im Zuge der Antigenaufnahme erfolgt die Aktivierung und Reifung der DCs und folglich die Migration durch die afferenten Lymphgefäße in die T-Zell reichen Regionen der sekundären lymphatischen Organe (Banchereau *et al.* 1998). Diese Prozesse werden im wesentlichen durch das Zusammenspiel von Chemokinen und Zytokinen und deren Rezeptoren auf den DCs gesteuert. Aufgrund des Fehlens von spezifischen Oberflächenmarkern, die eindeutig unreife DC Vorläuferzellen charakterisieren, ist die Unterscheidung der beiden myeloischen Subpopulationen noch immer nicht komplett definiert. Ein Unterschied besteht darin, daß sie in unterschiedlichen Geweben des Körpers vorkommen. Die Langerhans'schen Zellen befinden sich vornehmlich in der Haut, während die interstitiellen DCs in allen Organen vorkommen um dort Antigene aufzunehmen. Beide Populationen dirigieren $CD4^+$ T-Lymphozyten vornehmlich in Richtung sogenannter T-Helfer 1 (TH1)- Antworten (Arpinati *et al.* 2000, Cella *et al.* 1996). Die dritte Population, die lymphoiden oder plasmazytären ($CD123^+$ und $CD8^+$) DCs kommen im Blut und in den Tonsillen vor und zeigen eine starke Abhängigkeit von dem Zytokin Interleukin-3 (Banchereau *et al.* 2000, Galibert *et al.* 2001). Sie dirigieren $CD4^+$ T-Zellen in Richtung T-Helfer 2 (TH2)- Aktivität und werden daher auch als DC2 (Kuwana *et al.* 2001, Arpinati *et al.* 2000) bezeichnet. Damit ist ihre Rolle stark mit dem humoralen Arm der adaptiven Immunität verknüpft. In Abbildung 2 werden die verschiedenen DC-Subpopulationen und ihre Entwicklung in Abhängigkeit des peripheren Zytokin-Milieus dargestellt.

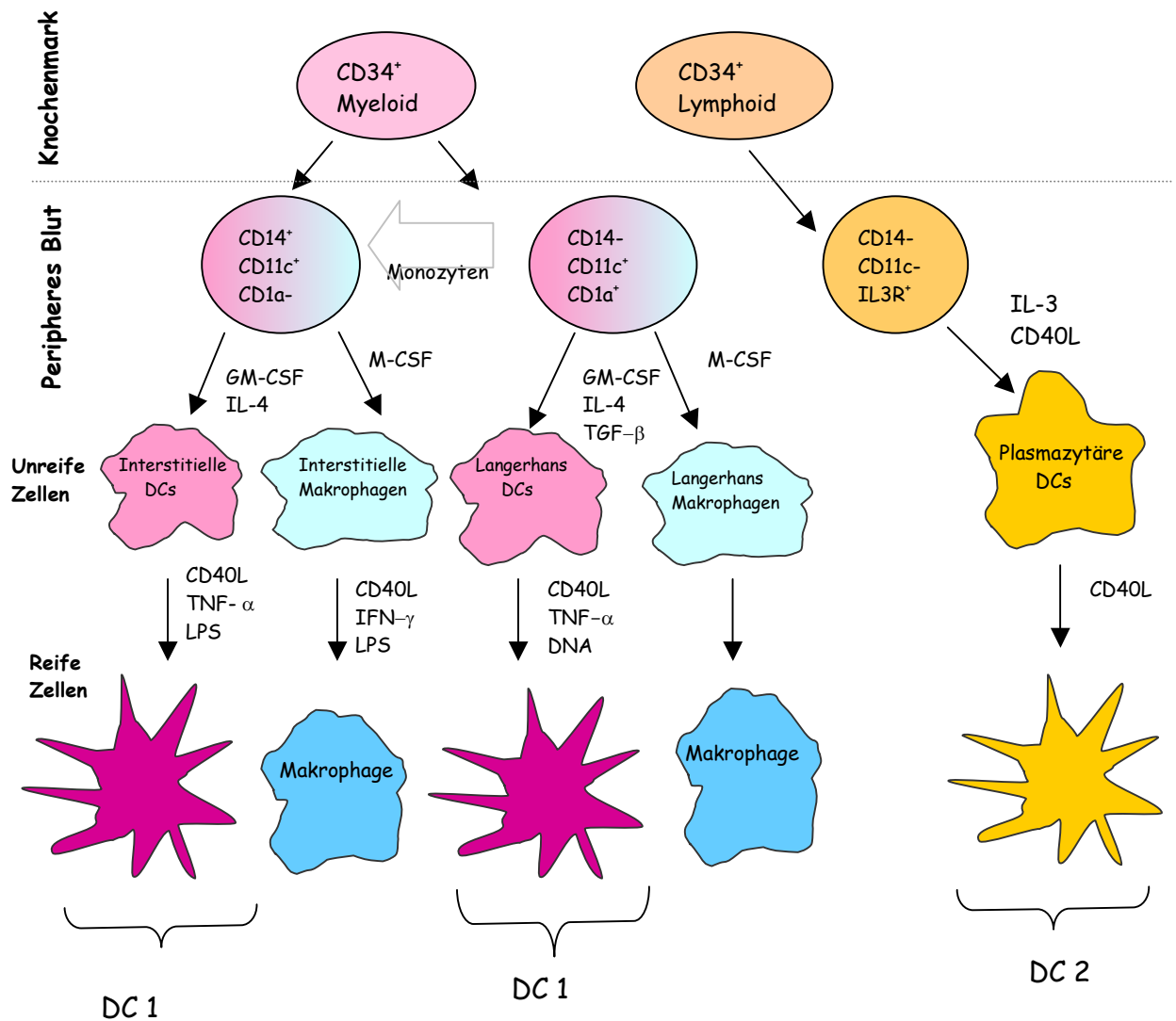


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Differenzierung verschiedener Subpopulationen von dendritischen Zellen, aus einer CD34⁺ Vorläuferzelle, in Abhängigkeit des umgebenden Zytokin-Mikro-Milieus

(nach Banchereau *et al.* 2000).

DCs spielen eine zentrale Rolle bei der Antigenpräsentation. Hochaffine antigenbindende Rezeptoren, wie den Mannoserezeptor und die Fc γ und Fc ϵ -Rezeptoren erlauben eine Antigenaufnahme von derartiger Effizienz, daß es der Zelle gestattet Antigen sogar im pico oder nanomolaren Bereich zu präsentieren, während andere APCs erst bei einer Antigenkonzentration im mikromolaren Bereich eine effiziente Antigenpräsentation leisten können.

DCs sind die einzigen APCs, die in der Lage sind primäre Immunantworten hervorzurufen und sogar naive CD8⁺ zytotoxische T-Zellen zu stimulieren (Bell *et al.* 1999, Banchereau *et al.* 1998). *In vitro* Studien haben deutlich demonstrieren können, daß DCs, die entweder genetisch modifiziert wurden um spezifische Antigene zu exprimieren (Brossart *et al.* 1997, Song *et al.* 1997), mit Peptiden oder mit Tumorantigenen (Ashley *et al.* 1997, Boczkowski *et al.* 1998, Nair *et al.* 1998) beladen oder mit tumorspezifischer RNA (Nair *et al.* 1998, Su *et al.* 2001) gepulst wurden, in der Lage waren hoch effizient antigenspezifische ZTL-Antworten hervorzurufen.

Experimentelle Ergebnisse von Studien an Tiermodellen (Zitvogel *et al.* 1996), sowie erste klinische Studien (Nestlé *et al.* 1998, Murphy *et al.* 1996, Tjoa *et al.* 1998, Hsu *et al.* 1996) unterstützen die Hypothese, daß Individuen, die mit Tumorpeptid-beladenen DCs vacciniert wurden, eine tumorspezifische humorale und zelluläre Antwort hervorrufen konnten. Dies führte zum Rückgang der Tumorlast und dem Aufbau einer schützenden Immunität gegenüber neuem Tumorwachstum *in vivo*. DCs zirkulieren im peripheren Blut und sind aufgrund ihrer hohen Mobilität in sämtlichen Geweben des Körpers zu finden. Da sie in nur geringen Mengen im peripheren Blut vorhanden sind, kann eine direkte Manipulation dieser Zellen *in vitro* nicht vorgenommen werden, doch haben sich mittlerweile Methoden etabliert, die ein relativ einfaches Anreichern dieser Zellen aus dem peripheren Blut ermöglicht. Durch die Kombination von GM-CSF und Interleukin-4 (IL-4) lassen sich ausreichende Mengen an unreifen DCs aus monozytären Vorläuferzellen des peripheren Blutes differenzieren, deren weitere Entwicklung zu reifen DCs durch Kombination mit TNF α , GMCSF und IL-1 β erreicht werden kann. Morphologisch sind DCs charakterisiert als bizarr aussehende, unregelmäßig geformte Zellen mit großen Zellkörpern und langen zytoplasmatischen Ausläufern (Dendriten), die sich wie feine Schleierfäden vom Zellkörper abheben. Im unreifen Zustand zeigen DCs deutlich verkürzte Fortsätze (Dendriten), doch im ausgereiften Stadium werden die zytoplasmatischen Ausläufer länger und nehmen dadurch die eher charakteristische Struktur an.

Die Antigenaufnahme erfolgt normalerweise in der Peripherie und veranlaßt dann die DCs zu den sekundären lymphoiden Organen zu wandern, wo sie das Antigen den T-Zellen präsentieren.

Folgende Mechanismen der Antigenaufnahme sind charakteristisch für DCs:

1. Makropinozytose,
2. Rezeptor vermittelnde Endozytose über den Mannoserezeptor: Der Mannoserezeptor entläßt seinen Ligand bei saurem PH in endosomale Kompartimente und wird dann wieder zurück gewonnen.
3. Rezeptor vermittelnde Endozytose über FcRII- Rezeptoren. Damit ist die DC u.a. in der Lage Antikörper-Antigenkomplexe zu binden und aufzunehmen.
4. Phagozytotische Aufnahme von apoptotischen (Albert *et al.* 1998) und nekrotischen Zellfragmenten (Galucci *et al.* 1999), sowie ganzen Zellen über CD36 und $\alpha v \beta 3$ und $\alpha 5 \beta 1$ Integrine.
5. Aufnahme von Viren, Bakterien (auch Mykobakterien) und intrazelluläre Parasiten, wie *Leishmania major*.
6. Aufnahme von Peptidgeladenen Hitzeschockproteine gp96 und Hsp 70 (Bell 1998).

Wenn das antigene Protein in den endozytotischen Apparat der Zelle eintritt, wird es bei Makrophagen zunächst in lysosomale Vesikel geschleust, wo es in Peptidfragmente zerlegt wird, die daraufhin auf wenige MHC-Klasse-II-Moleküle geladen werden (Banchereau und Steinman 1998). Bei DCs dagegen werden riesige Mengen an MHC-Klasse-II-Moleküle produziert, die in zahlreichen spezialisierten MHC-Klasse-II-reichen Kompartimenten, den MIIC-Vesikeln auf ihre Beladung mit Peptidantigenen warten. Sie kommen nur in unreifen DCs vor und stellen späte endosomale Strukturen dar, die zusätzlich über die notwendige Ausrüstung an HLA-DM-Molekülen verfügen, die dabei helfen das Peptid auf die Bindungsfurche der MHC-II Moleküle zu laden. Der Antigenaufnahme folgt dann die Reife der DCs und die MIIC-Vesikel entlassen ihre Peptidbeladenen MHC-II-Komplexe an die Zelloberfläche. Diese Oberflächenkomplexe bleiben über mehrere Tage stabil. Darüber hinaus kommt es während der Reifung zur Hochregulierung der für die T-Zellaktivierung entscheidenden Adhäsions- und Kostimulatorischen Molekülen, wie CD54 (ICAM-1), CD11a (LFA-1), CD11c, CD86 (B7-2) und CD40, sowie zur Produktion von Interleukin-12 (IL-12). Dieses Zytokin hat eine positive immunstimulatorische Funktion und wirkt sowohl auf NK-Zellen, als auch auf B- und T-Zellen. So ausgerüstet erfüllen DCs alle Voraussetzungen um effektiv $CD4^+$ T-Zellen zu stimulieren. Sie sind allerdings auch in der Lage direkt zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen zu stimulieren, die unmittelbar infizierte Zellen, Tumorzellen

oder allogene Transplantate angreifen können. Dabei müssen DCs das Antigen über einen bisher ungeklärten Vorgang an den endosomalen Vesikeln vorbeischleusen, um es über das Proteasom zu prozessieren und über die TAP-Transporter- MHC-I-Exportroute den CD8⁺ T-Zellen zu präsentieren. Dabei können sie auch selbst von dem Virus infiziert werden (z.B. Influenza Virus) oder sie sind in der Lage Peptide von nicht replizierenden Mikroben oder sterbenden infizierten Zellen aufzunehmen und die Antigene über den MHC-I-Weg den CD8⁺ T-Zellen präsentieren (Banchereau und Steinman 1998, Albert *et al.* 1998). Aufgrund der hohen Dichte an sowohl MHC-I, als auch MHC-II Molekülen und der Bereitstellung kostimulatorischer Signale ist ein einzige reife DC in der Lage 100 bis 3000 T-Zellen zu aktivieren. Dies macht sie in der Tat zu der professionellsten antigenpräsentierenden Zelle, die der Körper kennt (Banchereau und Steinman 1998, Bell *et al.* 1999)

In Abbildung 3 werden in vereinfachter Form die Veränderungen dargestellt, die während der Reifedifferenzierung dendritischer Zellen erfolgen.

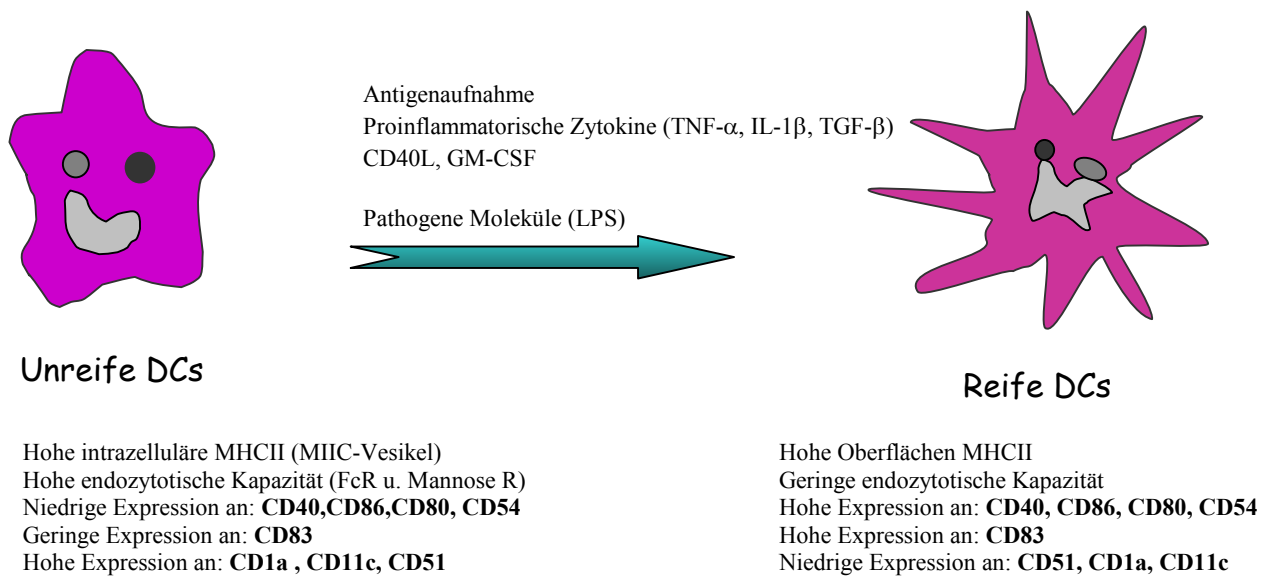


Abbildung 3: Eigenschaften, die sich während der Reife von DCs ändern

Unreife DCs haben die Kapazität Antigen über mehrere Mechanismen aufzunehmen: Phagozytose, Macropinozytose oder rezeptorvermittelte Phagozytose. Ein Beispiel für phagozytotische Moleküle, die reifestimulierend wirken zu können ist LPS und Zytokine mit diesen Eigenschaften sind TNF-α, GM-CSF u. IL-1β, sowie T-Zell-Liganden, wie CD40L. (nach Banchereau und Steinmann 1998)

Bei der antigenspezifischen Immunantwort unterscheidet man zwei verschiedene Formen:

1. *Die* humorale Immunität wird repräsentiert durch B-Lymphozyten, die auf antigene Stimulation mit der Sezernierung löslicher Antikörper reagieren.
2. *T-Lymphozyten* spielen die Hauptrolle in der zellvermittelnden Immunität und erkennen Antigen in Form von Peptidfragmenten, die ihnen auf MHC-Molekülen von APCs präsentiert werden. Nach ihrer Bildung im Knochenmark wandern die T-Vorläuferzellen in den Thymus, wo sie zu funktionellen naiven T-Zellen heranreifen. Dort werden sie einem äußerst strengen Ausleseverfahren unterzogen. Nur T-Zellen, die in der Lage sind Selbst- MHC- Moleküle zu erkennen (positive Selektion) und Selbst- MHC -Moleküle, die Selbst-Peptide präsentieren zu ignorieren (negative Selektion, da T-Zellen die diese Komplexe nicht ignorieren eliminiert werden) überleben. Damit übernimmt der T-Zellarm der adaptiven Immunität die Hauptrolle bei der Aufrechterhaltung der Toleranz gegen Selbst mit der gleichzeitigen Fähigkeit der Erkennung von Nichtselbst.

Funktionell lassen sich T-Lymphozyten in zwei Hauptklassen einteilen, deren zunächst offensichtlichstes Unterscheidungsmerkmal in der Expression ihrer unterschiedlichen, mit dem T-Zellrezeptor assoziierten Korezeptoren liegen. So werden T-Lymphozyten, die den $CD8^+$ Korezeptor auf ihrer Oberfläche tragen im allgemeinen als zytotoxische T-Zellen bezeichnet, während T-Zellen vom Helfertyp den $CD4^+$ Korezeptor tragen. Helfer T-Zellen sind in der Hauptsache an immunvermittelnden Funktionen beteiligt, können aber auch zytolytische Fähigkeiten ausüben. So ermöglichen $CD4^+$ T-Zellen die Aktivierung von B-Zellen und Makrophagen und sind in der Lage durch die Sekretion T-Zell stimulierender Zytokine, wie Interferon-gamma ($IFN\gamma$) und Interleukin-2 (IL-2) $CD8$ -T-Zellen bei der Zerstörung infizierter Zellen zu helfen.

$CD4^+$ Helfer-T-Lymphozyten lassen sich in mindestens zwei Klassen einordnen, in Th1 und Th2. Der Unterschied beider Subtypen läßt sich anhand der Zytokine, die sie sezernieren erkennen. Th1 T-Zellen sekretieren überwiegend $IFN-\gamma$, IL-2, IL-3 und GM-CSF und sind somit an der Stimulierung von antigenpräsentierenden Zellen, wie Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen beteiligt. Th2 T-Zellen sind charakterisiert durch die Ausschüttung an IL-4, IL-5 und IL-10 und stimulieren somit B-Zellen zur Bildung von Antikörpern. Die Entscheidung, ob sich eine naive $CD4^+$ -Zelle zu einer Th1 oder Th2 -T-Zelle differenziert, fällt allerdings erst nach erfolgtem Kontakt der Zelle mit dem Antigen. Dabei spielt die Art des Antigens, welche Zytokine durch den Erreger hervorgerufen werden oder welche Kostimulatorischen Moleküle beteiligt sind, vermutlich eine Rolle, aber die genauen Mechanismen, die schlußendlich zu dieser Entscheidung führen ist noch weitgehend

unklar. CD8⁺ T-Lymphozyten differenzieren sich weitgehend zu zytotoxischen Zellen (ZTL) Dabei sind sie darauf spezialisiert virusinfizierte Zellen oder Zellen, die mit intrazellulären bakteriellen Pathogenen infiziert sind direkt zu töten. Auch können anti-tumor Reaktionen von CD8⁺ T-Zellen vermittelt werden. Wenn naive T-Zellen durch den Parakortex eines Lymphknotens wandern, binden sie vorübergehend an jede APC, der sie begegnen. Dendritische Zellen binden T-Zellen sehr effektiv, da sie über ein weites Spektrum an Adhäsionsmolekülen verfügen, deren Liganden wiederum auf den T-Zellen exprimiert werden und mit diesen in Wechselwirkung treten. Das Zusammenwirken dieser Moleküle bringt die T-Zellen in eine Bereitschaftshaltung um nach ihrem Antigen Ausschau zu halten für das sie jeweils spezifische Rezeptoren besitzen. Außerdem kommen sie auf diese Weise mit vielen verschiedenen Zellen und ihren MHC-Peptid-Liganden zusammen, sodaß ihnen die Möglichkeit eröffnet wird mit vielen MHCs nach ihrem passenden MHC-Peptidliganden zu suchen. Für die Aktivierung von T-Zellen werden zwei unabhängige Signale benötigt:

Das erste Signal liefert die Bindung des T-Zellrezeptors an den MHC-Peptidkomplex.

Das zweite Signal kommt von den bereits erwähnten kostimulatorischen Molekülen auf professionellen APCs. Diese kostimulatorischen Moleküle, wie CD80, CD86 oder CD40 binden an ihre Liganden auf den T-Zellen, CD28 oder CD40L. Nur durch die Bereitstellung beider Signale kann es zur vollständigen Aktivierung von T-Zellen kommen, verbunden mit IL-2-Produktion, klonaler Expansion und Ausübung von Effektorfunktionen

Vollständig aktivierte T-Zellen kommen dann zur Hochregulierung von CTLA-4 (CD152), das eine höhere Affinität zu CD80 bzw. CD86 hat als CD28 und vermittelt ein Signal, das die Aktivierung der T-Zellen hemmt. Die Bindung an CD152 spielt eine wichtige Rolle bei der Begrenzung der proliferativen Antwort aktivierter T-Zellen und hat damit eine wichtige regulatorische Funktion in der Kontrolle von Immunantworten.

Die Abwesenheit von kostimulatorischen Signalen führt zur Anergie, einem Zustand, bei dem T-Zellen nicht in der Lage sind IL-2 Produktion zu leisten. Es kann dadurch weder zur klonalen Expansion noch zur Ausübung von Effektorfunktionen kommen. Darüber hinaus können anerge T-Zellen IL-10 produzieren, wodurch es zu einer T-Zell-Suppression kommen kann (Buer J. *et al.* 1998).

Abbildung 4 gibt einen schematischen Überblick über die wichtigsten Ereignisse bei der T-Zell-Aktivierung.

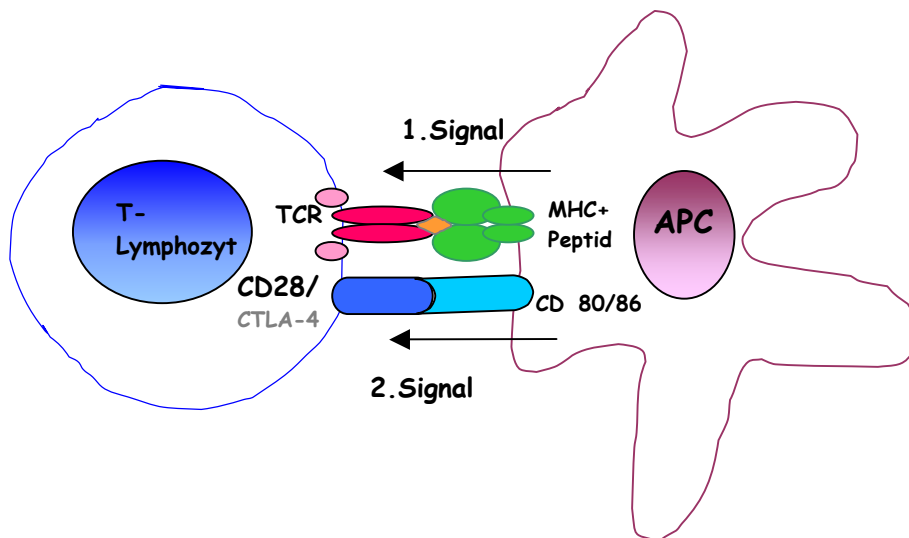


Abbildung 4. Die Aktivierung von T-Lymphozyten erfordert zwei unabhängige Signale: Die Bindung des Peptid:MHC-Komplexes durch den T-Zell-Rezeptor vermittelt ein Signal an die T-Zelle, die das Antigen erkannt hat. Zur vollständigen Aktivierung der T-Zelle ist ein zweites Signal, vermittelt von der selben antigenpräsentierenden Zelle (APC) essentiell: Dabei bindet das CD28-Molekül (und CTLA-4) an das kostimulierende Molekül CD80 oder CD86 auf der APC.

Zytotoxische T-Lymphozyten können über zwei verschiedene Mechanismen ihre Zielzellen töten (Trapani, 1998). Der eine Mechanismus liegt in der Freisetzung lytischer Granula, nach der Erkennung des Antigens auf der Zielzelle. Diese Granula beinhalten Perforine und spezielle Proteasen, die Granzyme. Der zweite Mechanismus wird über die Bindung des auf aktivierten T-Lymphozyten exprimierten FAS-Liganden an seinen Rezeptor FAS auf der Zielzelle vermittelt. In Abbildung 5 werden nochmals diese beiden Mechanismen in einem Cartoon dargestellt.

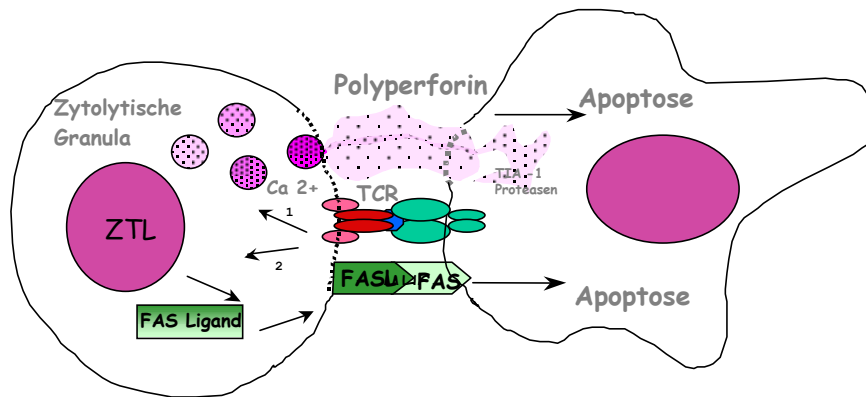


Abbildung 5: Molekulare Mechanismen der T-Zellvermittelten Zytotoxizität

Es gibt zwei Möglichkeiten, wie ZTL ihre Zielzellen töten:

Nach erfolgter Erkennung des über den MHC der Zielzelle präsentierte Antigen durch den CD3-TCR-Komplex der zytotoxischen T Zelle können zwei verschiedene Mechanismen aktiviert werden:

1: Das eine Signal bewirkt die Translokation und Sekretion von zytolytischen Granula, die Perforin, Proteasen, Granzyme B und verschiedenen andere Zytotoxine, wie TIA-1 enthalten und in einer Kalzium abhängigen Weise Apoptose in der Zielzelle auslösen.

2. Ein anderes Signal führt zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, welche die Expression des Rezeptormoleküls FAS-Ligand aktivieren. Die Interaktion zwischen FAS-Ligand und seinem Rezeptor FAS auf der Zielzelle leitet in dieser einen Signaltransduktionsweg ein, der zur Aktivierung von Caspasen und schließlich zum Tod der Zelle führt.

Das HLA-System

Die Entdeckung des menschlichen MHC (engl.= Major Histocompatibility Komplex) oder Haupthistokompatibilitätskomplexes (HLA-Antigenkomplexe nach engl. HLA- human leukocyte antigen- A), der auf den kernhaltigen Zellen des menschlichen Körpers zu finden ist, hat entscheidend zum Verständnis der T-Zellimmunität sowie der Transplantationsbiologie beigetragen. Die Aufgabe der MHC-Komplexe liegt vorwiegend in der Präsentation von Peptidfragmenten, die durch intrazelluläres Prozessieren von Pathogenen über differentielle Transportrouten an die Oberfläche gelangen. Diese MHC-Peptidkomplexe werden von den hochspezifischen Rezeptoren der T-Lymphozyten erkannt und die Bindung dieser Komplexe löst das erste Signal bei der T-Zellaktivierung aus (Sette *et al.* 1991, Janeway *et al.* 1997)

Eine weitere Aufgabe der MHC-Moleküle liegt als Teil der „thymic education“ in der Toleranzinduktion von T-Lymphozyten zur Differenzierung von Selbst gegen Nichtselbst (Ritter *et al.* 1981, Kourilsky *et al.* 1989).

Man unterscheidet zwei verschiedenen Klassen von MHC- Komplexen.

In Abbildung 6 werden die Strukturen beider Moleküle schematisch dargestellt.

Beide MHC-I- und MHC-II – Moleküle kommen auf unterschiedlichen Zelltypen vor, das sich widerspiegelt in den verschiedenen Effektorfunktionen der T-Zellen, die diese Moleküle erkennen. Während Klasse I- Moleküle auf den meisten kernhaltigen Zellen exprimiert werden, kommen Klasse-II-Moleküle nur auf antigenpräsentierenden Zellen, wie Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen, sowie den epithelialen Zellen des Thymus vor. Dementsprechend präsentieren MHC-I-Moleküle den $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen Peptide von Krankheitserregern (z.B. Viren) im Zytosol. Dabei ist auch die Menge der exprimierten Moleküle entscheidend für die Beeinflussung einer T-Zellantwort. Zellen, die wenige MHC-Moleküle exprimieren können dabei eher einer Immunantwort entgehen, als Zellen, die viele MHC-Moleküle auf ihrer Oberfläche tragen (Janeway *et al.* 1997)

Klasse II Moleküle präsentieren Peptide von endosomal aufgenommenen Krankheitserregern den $CD4^+$ T-Helferzellen. Aktivierte T-Helferzellen aktivieren dabei wiederum andere Effektorzellen des Immunsystems. Wenn z.B. $CD4^+$ T-Zellen Peptide erkennen, die an MHC-II-Moleküle auf B-Zellen gebunden sind, regen sie diese zur Antikörperproduktion an. In gleicher Weise reagieren $CD4^+$ T-Zellen mit den MHC-Peptidkomplexen auf Makrophagen, die diese zur Zerstörung des Krankheitserregers in ihren Vesikeln anregen.

Diese Aufgabenteilung der differentiellen Präsentation und Erkennung unterschiedlicher Antigene ist insofern biologisch sinnvoll, als $CD8^+$ T-Lymphozyten Zellen mit

intrazellulären Krankheitserregern direkt erkennen und töten können, da MHC-I-Moleküle Peptidfragmente dieser Pathogene auf der Oberfläche der betreffenden Zelle präsentieren. Dagegen ist für die Abwehr extrazellulärer Erreger auch der humorale Arm der Immunantwort notwendig. Durch die Präsentation von endosomal aufgenommenen Antigenen über die MHC-II Transportroute werden CD4⁺ Helferzellen aktiviert, die wiederum Zytokine und kostimulatorische Moleküle (CD40L) exprimieren und B-Zellen aktivieren, die zur Antikörperproduktion angeregt werden.

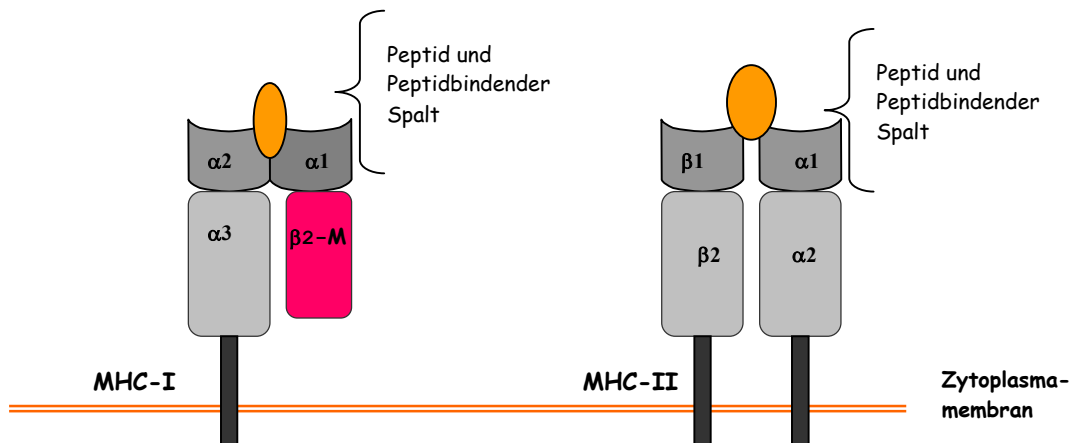


Abbildung 6:

MHC-Klasse I-Moleküle bestehen aus zwei Polypeptidketten, eine α - oder schwere Kette, die im MHC-kodiert wird und eine kleinere, nicht kovalent angelagerte Kette, (β_2 -Mikroglobulin (β_2 -M)), die nicht im MHC kodiert wird. Nur die α -Kette ist fest in der Zellmembran verankert und besteht aus drei Domänen. Die Struktur der α_1 und α_2 Domänen bilden ein Paar und schaffen an der Oberfläche des Moleküls den Peptidbindenden Spalt.

MHC-Klasse II- Moleküle bestehen aus einem nichtkovalenten Komplex zweier α und β -Ketten, die beide die Membran durchdringen. Beide Ketten haben jeweils zwei Domänen, die gemeinsam den peptidbindenden Spalt bilden (nach Janeway 1997, verändert)

Abbildung 7 zeigt ein vereinfachtes Schema der exogenen und endogenen Antigenprozessierung (nach Oldstone 1997)

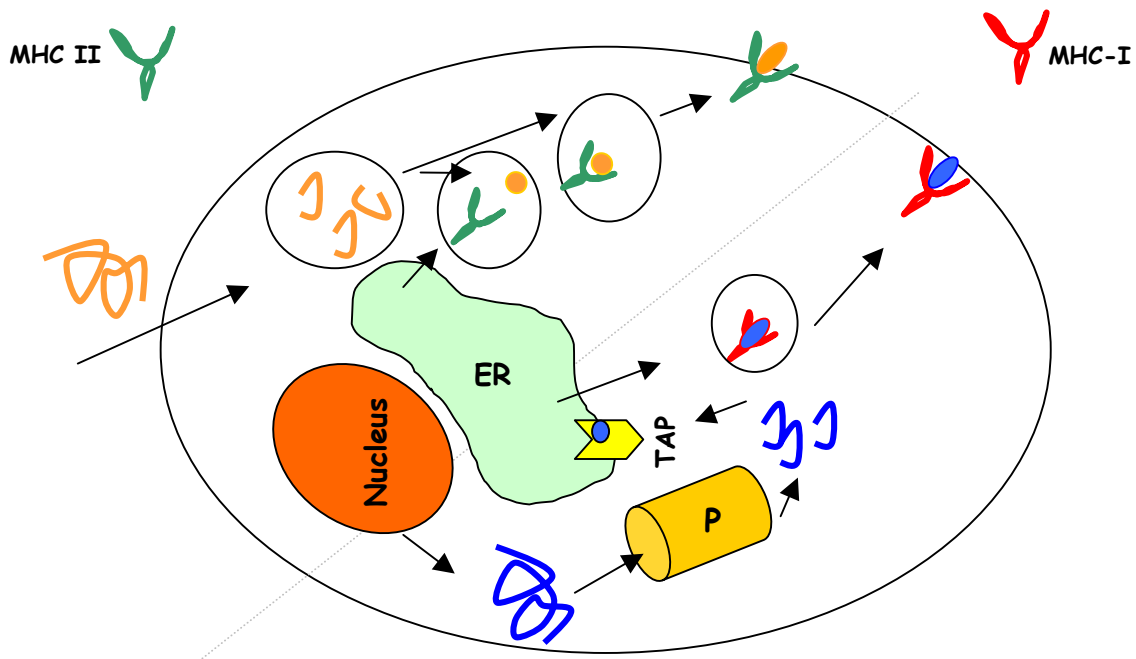


Abbildung 7: Antigenpräsentation über die MHC-I und MHC-II Transportroute.

Der Klasse I Präsentationsweg wird durch das kleine rote **Y** repräsentiert und das intrazellulär synthetisierte virale Protein wird durch das blaue Knäuel dargestellt. Das Protein wird in einem Multienzymkomplex, dem Proteasom (**P**) in kürzere Aminosäuresequenzen zerlegt und über den Mechanismus des TAP-Transportsystem (transporter associated with antigen processing) in das Lumen des Endoplasmatischen Reticulums (**ER**) geschleust. MHC-I- α Moleküle, die im Innern der ER-Membran verankert sind werden von einem Chaperon in einem partiell gefalteten Zustand gehalten bis das β 2-Mikroglobulin an die α -Kette bindet und die Dissoziation des MHC-Komplexes vom Chaperon auslöst. Es lagert sich dann an einen Komplex von weiteren Chaperonen an, der die Bindung des noch immer partiell gefalteten MHC-Moleküls an den TAP-Transporter ermöglicht. Über den TAP-Transporter wird nun ein Peptid (kleine blaue Kugel) auf das MHC-Molekül geladen, das somit in eine vollständig gefalteten stabilen Zustand übertritt, sich vom TAP-Komplex löst und an die Zelloberfläche geschleust wird, wo es bereit ist, dem T-Zellrezeptor der $CD8^{+}$ T-Lymphozyten das Peptid zu präsentieren.

Beim MHC-II Präsentationsweg wird das Protein von außen über endozytotische Mechanismen in die Zelle aufgenommen. Das MHC-II Molekül wird durch das grüne **Y** repräsentiert und das antigene Protein ist als gelbes Helix dargestellt. In endosomalen Vesikeln wird das Protein mit Hilfe saurer Proteasen in einzelne Peptidbausteine zerlegt. MHC-II Moleküle werden im ER synthetisiert und über den Golgi Apparat in späte endosomale Vesikel geschleust. Diese fusionieren mit den Vesikeln, welche die antigenen Peptidfragmente enthalten. Die beiden Ketten der MHC-II Moleküle sind aber noch in einem Komplex mit der invarianten Kette *li* (wird nicht gezeigt) verbunden, die in einem mehrstufigen Prozeß vom MHC-II-Molekül getrennt wird. Danach erfolgt Beladen der MHC-II-Moleküle mit Peptid (gelbe Kügelchen) und Transport zur Oberfläche, wo Antigenpräsentation gegenüber $CD4^{+}$ T-Zellen stattfinden kann.

Der MHC-Komplex zeichnet sich insbesondere durch seinen ausgeprägten Polymorphismus aus. Dieser äußert sich zum einen in Polygenie, d.h. viele verschiedene Genorte kodieren für mehrere MHC-I und MHC II- Gene, die Proteine mit unterschiedlichen Peptidbindungsspezifitäten kodieren und sich zum anderen in multipler Allelie äußert. Unter der multiplen Allelie versteht man, daß es für jedes Gen verschiedenen Allele gibt, die sich zum Teil nur in einer Aminosäure voneinander unterscheiden. Dies macht die MHCs zu den polymorphsten Genen, die bekannt sind. Die T-Zell-Erkennung ist entscheidend von diesem Polymorphismus abhängig, denn nur antigene Peptide, die von Selbst-MHC-Komplexen präsentiert werden, können von den hochspezifischen T-Zellrezeptoren erkannt werden und eine Immunantwort auslösen. Weder der MHC-Komplex alleine, noch das gleiche Peptid in Zusammenhang mit einem MHC-Komplex, der in seiner Peptidbindenden Furche eine Mutation in nur einer Aminosäure aufweist wird von der T-Zelle erkannt. Das zeigt deutlich, daß die T-Zell-Immunität streng MHC-abhängig ist. Transplantierte Gewebe oder Organe von Spendern mit MHC-Profilen, die sich von denen des Empfängers unterscheiden werden normalerweise immer abgestoßen und man bezeichnet diese Erscheinung als eine Host versus Graft Reaktion (HVG). Es handelt sich dabei um eine sehr wirkungsvolle und schnelle T-Zellantwort, die aus dem relativ hohen Anteil von T-Zellen innerhalb eines jeden Individuums, der auf bestimmte Nicht-Selbst- oder allogene MHC-Moleküle reagiert, resultiert. Tatsächlich hat man herausgefunden, daß ungefähr ein bis zehn Prozent aller T-Zellen eines Individuums auf eine allogene Stimulierung ansprechen. Dieses Phänomen wird als Alloreaktivität bezeichnet, da es die Erkennung von allelen Polymorphismen allogener MHC-Moleküle darstellt. Da es schwer zu erklären ist weshalb sich während der Evolution des Immunsystems ein Abwehrmechanismus gegen Gewebetransplantate hätte entwickeln sollen, wird inzwischen angenommen, daß die Alloreaktivität eine Kreuzreaktivität von T-Zellrezeptoren darstellt, die normalerweise für verschiedene fremde, von Selbst-MHC-Molekülen gebundene Proteine spezifisch sind. Diese Kreuzreaktivität resultiert teilweise daraus, daß sich das Spektrum von Peptiden, die von Nicht-Selbst-MHC-Molekülen in den transplantierten Geweben gebunden werden, von den Peptiden unterscheidet, die an die MHC-Moleküle des Empfängers binden und die T-Zellen des Empfängers sind dann gegen diese neuen Peptid:MHC-Komplexe nicht tolerant.

Im Falle einer Knochenmarktransplantation ist der umgekehrte Fall die Regel. Das Immunsystem des Empfängers wurde als Konditionierungsmaßnahme für das Anwachsen des Spendermarks durch Chemotherapie und Ganzkörperbestrahlung völlig zerstört und ist somit unfähig selbst gegen das fremde Spendermark zu reagieren. Allerdings befinden sich

immunkompetente alloreaktive T-Zellen innerhalb des Spendermarks, sodaß es in den meisten Fällen einer KMT zu einer Graft versus Host Reaction (GvH) kommt, also der Umkehrreaktion der HvG. Nur hat diese Reaktion, die mit die schlimmste Komplikation bei der Knochenmark- oder Stammzelltransplantation darstellt weitere schwere Nebenwirkungen zur Folge.

Historische Entwicklung der Knochenmark- und Stammzelltransplantation

Bereits in der Antike waren Menschen davon überzeugt, daß man durch die Infusion der „Säfte des Körpers“ Krankheiten heilen und neue Kräfte wecken könne. So erneuerte, laut der griechischen Mythologie Medea das Blut ihres alternden Jason mit Hilfe eines intravenösen Zaubertranks.

Doch wurden die ersten ernsthaften Knochenmarktransplantationen erst im 20. Jahrhundert realisiert. Die frühesten Daten von Tierexperimenten gehen in das Jahr 1922 zurück, wo der dänische Wissenschaftler Fabricious-Moeller beobachtete, daß bei Meerschweinchen, die man einer lethalen Strahlendosis aussetzte, die üblichen Symptome schwerer Strahlenschäden ausblieben, wenn man die Beine der Tiere gegen die Strahlung abschirmte.

Diese wichtige Beobachtung wurde von der restlichen wissenschaftlichen Welt völlig ignoriert und geriet in Vergessenheit. Erst 27 Jahre später griffen Jakobson und Lorenz die Beobachtungen von Fabricious-Moeller wieder auf und gingen bei ihren Experimenten noch einen Schritt weiter. Zunächst wiederholten sie die dänischen Versuche an Mäusen und Meerschweinchen, in dem sie die Milz und die Beine während der Bestrahlungen abschirmten um die Tiere vor dem lethalen Effekt der Strahlung zu schützen, im Gegensatz zu den Tieren, die nicht geschützt wurden. Der weiterführende Ansatz war der, daß man den Tieren, die man während der Bestrahlung nicht schützte, nach der Bestrahlung Milz- oder Knochenmarkzellen injizierte und damit einen protektiven Effekt erzielte. Allerdings waren den Forschern der Grund für die Radioprotektion noch nicht klar und man glaubte zunächst an einen humoralen Effekt. Erst 1956 konnte durch eine Vielzahl weiterer Untersuchungen, die sich alle mit dem bemerkenswerten biologischen Phänomen auseinandersetzten, daß nach hochdosierter Ganzkörperbestrahlung (TBI = total body irradiation) die zerstörte Hämatopoese durch Infusion von wenigen blutbildenden Vorläuferzellen aus Knochenmark oder Milz wieder ersetzt werden kann und postulierten, daß der Effekt der Radioprotektion auf die Neubesiedelung des Empfängers durch Spenderzellen zurückzuführen ist.

Deshalb führte Ford *et al.* den Begriff „radiation chimera“ ein, um den Zustand zu beschreiben, daß nach Ganzkörperbestrahlung und Gabe von Knochenmark in einem Tier die Hämatopoese von den Zellen eines anderen Tieres dauerhaft vermittelt wird. Die Chimäre der griechischen Mythologie war ein Wesen aus Löwe, Ziegenbock und Schlange und in der Medizin symbolisiert die Chimäre das Nebeneinander von Zellpopulationen verschiedener Individuen innerhalb eines Organismus.

Diese ersten experimentellen Studien konzentrierten sich zunächst ausschließlich auf den Effekt der Radioprotektion und man verfolgte zunächst nicht das Langzeitüberleben der Tiere. Parallel dazu fanden aber Barnes und Loutit 1955, daß Mäuse eines Stammes A, die nach TBI syngene Milzzellen von Mäusen des gleichen Stammes erhielten eine Langzeitüberlebensrate zeigten, während die gleichen Mäuse, die nach der TBI allogene Milzzellen von Mäusen eines Stammes B erhielten nur ca. 30 Tage weiterlebten und noch vor dem Tag 100 nach Infusion starben. Diese Beobachtungen wurden dann bald von vielen anderen Gruppen (Cohen, Vos, Van Bekkum, de Vries 1957) bestätigt. Doch das auffälligste Merkmal dieser Studien war, daß die Mäuse nicht einfach so starben, sondern sie entwickelten alle ähnliche pathophysiologische Symptome. Dazu gehörten Hautläsionen und starke Diarrhöen verbunden mit extremem Gewichtsverlust, der schließlich zum Tode der Tiere führte. Der Grund für das Auftreten sogenannter „secondary diseases“ war die Unverträglichkeitsreaktion gegenüber dem infundierten fremden Zellmaterial. Heute wissen wir, daß es sich dabei um „Graft versus Host disease“ (GvHD) handelte, eine posttransplantäre Komplikation, bei der sich immunkompetente Effektorzellen des Spenders gegen Gewebe des Empfängers richtet, und auch heute noch das Hauptproblem bei allogener KMT darstellt. Über die folgenden Jahre wurde diese These durch Experimente mit neugeborenen Mäusen weiter untermauert, denen man allogene Knochenmarkzellen verabreichte. Die Mäuse litten an „Runt disease“ (Zwergenkrankheit oder Kümmerwuchskrankheit), die gekennzeichnet ist durch Minderwuchs, starke Infektanfälligkeit, Hepato- und Splenomegalie, sowie Diarrhöen und Hautläsionen und schließlich durch eine deutlich verminderten Lebenserwartung.

Die histologischen Befunde von Runt disease und den postransplantären „secondary diseases“ zeigten die gleichen Ergebnisse und es wurde klar, daß Lymphozyten (T-Lymphozyten) des Spenders diese Krankheiten auslösten. Die Zielorgane, die dabei von den

SpenderLymphozyten angegriffen wurden, waren Darm, Leber und Haut des Empfängers. (Santos & Kole, 1958; Gowans, 1962, Medawar, 1963).

Erste klinische Versuche

Die erste Detonation einer Atombombe im Juli 1945 in New Mexiko und die damit verbundenen Konsequenzen für die Beteiligten löste ein intensives Engagement in der Erforschung der KMT aus. Die Erkenntnis, daß radioaktive Strahlung beim Menschen zu einer tödlich verlaufenden Aplasie des Knochenmarks führen kann, führte in den folgenden Jahren zu einem gesteigerten Interesse an der Pathophysiologie von Strahlenschäden am Menschen.

Und schließlich waren es die Opfer von Strahlenunfällen, die als erstes mit Knochenmarktransplantation behandelt wurden. Nach einem Reaktorunfall 1959 in Jugoslawien wurden sechs exponierte Personen von George Mathé und seinem Team in Paris behandelt. Da man zu der Zeit bereits über die genetischen Hintergründe des ABO-Blutgruppensystems auf den roten Blutkörperchen Bescheid wußte, aber wenig bekannt war über den Haupthistokompatibilitätskomplex wurden fünf der Patienten Knochenmark von Blutgruppen-identen Spendern infundiert. Es kam zu heftigen Abstoßungsreaktionen und keiner der Patienten überlebte. 1963 berichtete Mathé von einer KMT, die bei einem Patienten mit akuter Leukämie durchgeführt wurde und bei dem zum ersten Mal ein komplettes Anwachsen des Transplantates (*Engraftment*) dokumentiert werden konnte.

Der Patient lebte danach länger als ein Jahr und starb schließlich an den Folgen einer Varicella- Zosterinfektion. Schließlich stellte 1968 Mathé eine Übersicht der Ergebnisse von Knochenmarktransplantationen in 21 Patienten vor, die wenig ermutigend waren. Sechs der Patienten starben unmittelbar. Zehn der verbliebenen 15 Patienten starben an GvHD, vier verstarben an rezidivierender Leukämie und ein Patient überlebte zunächst 20 Monate und starb dann an der Folge einer Infektion (s.o.).

Aus den Beobachtungen der Tiermodelle und den vorliegenden klinischen Studien erstellte Billingham Ende der sechziger Jahre seine Liste für die grundlegenden Voraussetzungen der GvHD auf:

- das Transplantat muß immunologisch aktive Zellen enthalten.
- der Empfänger ist nicht in der Lage die transplantierten Zellen selbst an zugreifen

- der Empfänger muß Gewebeantigene exprimieren, die nicht im Transplantat des Spenders vorkommen.

Erst als die Bedeutung der Expression der Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) auf allen kernhaltigen Zellen des Säugerorganismus erkannt wurde, begann in den 70er Jahren die moderne Ära der Knochenmarktransplantation. Als Spender wurden Verwandte der Patienten ausgewählt und die erste erfolgreiche allogene Transplantation wurde von Donall Thomas 1972 am Fred Hutchinson Cancer Center in Seattle bei einem Patienten mit schwerer aplastischer Anämie durchgeführt. Bei diesem Patienten stammte das Knochenmark von einem HLA-identischen Geschwister. Danach wurden von der „Seattle Gruppe“, wie die Pioniere um Donall Thomas noch heute genannt werden, noch 37 weitere Fälle dokumentiert. Eine Vergleichstudie, die 1976 von Camitta *et al.* veröffentlicht wurde, bei der Patienten mit aplastischer Anämie entweder mit konventionellen Therapien oder mit allogener KMT behandelt wurden zeigte eine signifikant höhere Überlebensrate der Patienten, die transplantiert wurden. Seit dieser Zeit gilt die KMT als Therapie der Wahl für Patienten mit schwerer aplastischen Anämie.

Aber auch andere hämatologische Störungen und Erkrankungen sollten mit Hilfe der Transplantationstechnik behandelt werden. Besonders die bis dahin als unheilbar geltenden Leukämien standen im Mittelpunkt des Interesses. In den 70er Jahren wurden die meisten Transplantationen an Patienten durchgeführt, die sich im Endstadium ihrer Erkrankung befanden. Zu dieser Zeit wurden auch die Konditionierungstherapien zur Vorbereitung einer KMT, bestehend aus TBI oder Chemotherapie entwickelt.

Heute wird die hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSCT), wie die KMT heute genannt wird, routinemäßig für eine ganze Reihe von überwiegend als unheilbar geltenden hämatopoetischen Erkrankungen durchgeführt. Doch noch immer zählt sie als Therapieform, die mit den größten Komplikationen und den extremsten Nebenwirkungen verbunden ist. Aufgrund des ausgeprägten MHC – Polymorphismus steht diese Form der Therapie nur für ca. 30 Prozent der Bevölkerung zur Verfügung. In der westlichen Welt sinkt die Wahrscheinlichkeit einen geeigneten Fremdspender zu finden durch die kleinen Familien mit wenigen oder gar keinen Geschwistern noch zusätzlich. Obwohl seit den ersten erfolgreichen Transplantationen mittlerweile 30 Jahre vergangen sind und viele hilfreiche Modifikationen in der Planung, Konditionierung, Durchführung und schließlich der Nachsorge die durchschnittliche Heilungschance bei vielen Patienten verbessert hat, sind viele der fundamentalen Komplikationen noch immer nicht gelöst.

Indikation für eine Hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSCT)

Da man heute in der Lage ist die CD34⁺ Stammzellen mit Hilfe von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren, wie den Zytokine GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulation factor) oder G-CSF (granulocyte colony stimulation factor) im peripheren Blut anzureichern, muß die Herkunft der hämatopoetischen Stammzellen nicht mehr unbedingt das Knochenmark sein. Ein weiterer Ursprung für Stammzellen ist außerdem das Nabelschnurblut, das nach der Geburt aus der Nabelschnurvene entnommen wird. Nabelschnurblut enthält prozentual mehr Stammzellen als peripheres Blut, jedoch weniger als Knochenmark. Generell unterscheidet man zwischen allogener und autologer Transplantation. Bei der allogenen Transplantation stammt das Transplantat von einer gesunden fremden Person, während bei der autologen Transplantation dem Empfänger eigene Zellen übertragen werden, die zu einem früheren Zeitpunkt entnommen und kryokonserviert wurden. Eine zwischen allogener und autologer KMT oder HSCT liegende Möglichkeit ist die syngene Transplantation, wobei der Spender ein eineiiger Zwilling des Patienten ist, und das Transplantat somit genetisch identisch ist.

Insbesondere Patienten mit folgenden Erkrankungen profitieren von einer allogenen oder HSCT:

- angeborene Störung des Immunsystems, wie SCID (schwere kombinierte Immundefizienz)
- angeborene oder erworbene Blutbildungsstörungen, wie aplastischer Anämie
- angeborene Defekte der Hämatopoese und/oder des Immunsystems wie Fankoni Anämie, Wiskott –Aldrich - Syndrom, Osteopetrosis und Thalassaemia major.
- maligne Erkrankungen des Blutes, z.B. Leukämien und Lymphome

Das Ziel der allogenen Knochenmarktransplantation ist zum einen die Korrektur eines vorhandenen genetischen Defektes der zu einer fehlerhaften oder nicht vorhandenen Immunität geführt hat, durch die gesunden Stammzellen eines gesunden Fremdspenders (wie beim SCID-Syndrom). Zum anderen hofft man durch allogene Transplantation das erkrankte Knochenmark eines Leukämiepatienten ebenfalls durch das gesunde Mark eines Fremdspenders zu ersetzen, um eine normale Hämatopoese und ein funktionierendes Immunsystem zu generieren.

Folgende Forschungsschwerpunkte haben daher höchste Dringlichkeit:

- Die Verminderung der Toxizität der Vorbehandlung
- Verbesserung des „*Engraftment*“
- Erforschung der Toleranzinduktion mit dem Ziel Patienten transplantieren zu können, unbeachtet ihres MHC-Profiles
- Verminderung der GvHD
- Bekämpfen und Verhindern von opportunistische Infektionen
- Unterstützung der Immunrekonstruktion
- Verminderung der Spättoxizität

Vorbereitungsmaßnahmen bei einer allogenen HSCT

Jede allogene Transplantation muß durch eine Konditionierung eingeleitet werden, die zur Aufgabe hat, durch myeloablative Therapie sowohl die malignen Zellen als auch, soweit vorhanden, noch gesunde Knochenmarkzellen zu zerstören, um dem neuen gesunden Spendermark Platz zu geben. Zusätzlich soll durch eine Immunsuppression eine Transplantatabstoßung verhindert werden. Die Art der Konditionierungstherapie ist abhängig von der Art der Erkrankung und besteht in der Regel aus fraktionierter Ganzkörperbestrahlung (TBI) und hochdosierter Chemotherapie, wie Cyclophosphamid, Busulfan oder andere. Diese Schemata sind extrem belastend für den Körper und die Patienten reagieren meist mit Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe, Mukositis und hämorrhagischer Zystitis. Der Körper befindet sich in einer Phase akuter Entzündung und sämtliche epitheliale Zellen des Körpers reagieren mit der Ausschüttung von Entzündungsmediatoren. Nach der Konditionierung werden einer Bluttransfusion ähnlich das Knochenmark oder die Stammzellen transplantiert. Man benötigt dafür mindestens $1-2 \times 10^8$ mononukleäre Zellen oder 2×10^6 CD34⁺ Zellen pro Kilogramm Körpergewicht des Empfängers. Die Leukozytenzahlen fallen dann in den folgenden Tagen bis unterhalb der Nachweisgrenze ab. In dieser ca. 14-30 Tage andauernden *aplastischen Phase*, die bis zum *Engraftment* (Anwachsen) des neuen Knochenmarkes dauert, ist der Patient zahlreichen schweren Komplikationen ausgesetzt, bei denen er sich in akuter Lebensgefahr befindet (Link *et al.* 1997, Begemann 1999). Neben GvHD, gehören opportunistische Infektionen zu einer signifikanten Komplikation post HSCT. Insbesondere latente Viren der Herpesgruppe, wie Zytomegalievirus (CMV), Epstein- Barr Virus (EBV), Varicella Zoster Virus (VZV) und u.a. Herpes simplex Virus (HSV), sowie Adenoviren (AdV) die verursacht durch eine fehlende

immunologische Überwachung zur Reaktivierung und unkontrollierten Proliferation gelangen. Aber auch Pilzinfektionen, durch Candida und Aspergillus, sowie verschiedene Bakterien stellen ein ernsthaftes Problem dar.

Die Rekonstitution des Immunsystems post HSCT

Eine hämatologische Rekonstitution erfolgt relativ schnell durch Neutrophile und Thrombozyten. Doch die eigentliche Schwierigkeit besteht im Wiederaufbau eines funktionierenden spezifischen Immunsystems mit einem voll funktionsfähigen immunologischen Gedächtnis bestehend aus B- und T-Lymphozyten.

Der Immunaufbau betrifft schließlich die folgenden verschiedenen Komponenten der adaptiven Immunität:

- Wiederkehr von funktionellen B-Zellen
- T-Zellentwicklung innerhalb des Thymus
- Wiederaufbau von Effektorfunktionen, wie z.B. die Immunantworten zytotoxischer T-Zellen und Natürlicher Killerzellen (NK)
- Wiederkehr funktioneller Antigenpräsentierender Zellen

Der zeitliche Ablauf der quantitativen und funktionellen Restauration ist für die einzelnen Zellen des Immunsystems unterschiedlich. Innerhalb der ersten zwei bis drei Monate erreichen die peripheren Lymphozytenzahlen Normalwerte, während die vollständige Repopulation der lymphatischen Organe weitere Monate dauert. Die eigentliche Schwierigkeit liegt jedoch in der unzureichenden Funktionalität dieser Zellen.

Die Proliferationskapazität der peripheren Lymphozyten nach Stimulation mit Mitogenen, Antigenen oder allogenen Zellen bleibt bis zu sechs Monaten eingeschränkt. Die Produktion von IL-2 normalisiert sich nach ca. einem Jahr. Bei Patienten mit GvHD bleiben diese Lymphozyten-Funktionen jedoch längerfristig eingeschränkt. Die Zahl von NK Zellen (CD56-positive Lymphozyten) ist innerhalb der ersten Monate gesteigert und ihre Effektorfunktionen normalisieren sich bereits innerhalb der ersten 30 Tage.

Der Wiederaufbau der T-Zellimmunität

Der Thymus ist das für die Entwicklung und Selektionierung reifer naiver T-Zellen wichtigste Organ. Alle unreifen T-Zellen müssen im Thymus auf Selbst-Toleranz und MHC-Erkennung

hin ausselektiert werden. Mit zunehmenden Alter bildet sich das epitheliale Gewebe des Thymus allmählich zurück wodurch die Funktionsweise des Thymus abnimmt. Offenbar wird der Hauptpool naiver T-Lymphozyten beim Menschen bereits während der pränatalen Phase angelegt, denn schon kurz nach der Geburt führt eine Thymectomie nicht zu einer Verminderung der Immunität (Haynes *et al.* 2000, 1998). Ein thymectomierter Mensch ist daher unabhängig zu welchem Zeitpunkt sein Thymus entfernt wurde immunologisch so lange gesund, wie keine Notwendigkeit besteht den T-Zellvermittelnden Arm der Immunität zu regenerieren.

Wenn im Fall eines transplantierten Patienten das periphere Immunsystem durch die konditionierende Behandlung zerstört wird und von hämatopoetischen Zellen des Fremdspenders ersetzt wird, dann ist die Entwicklung einer neuen T-Zell Immunität von einem noch funktionierenden Thymusgewebe abhängig, indem die einwandernden Spender T-Zellen auf Toleranz gegenüber dem Empfänger selektioniert werden. Daher ist es auch sehr schwierig ältere Menschen zu transplantieren, da eine funktionierende Thymogenese fast nicht mehr möglich ist, während bei Kindern schon bald nach der Transplantation eine normale Thymogenese einsetzt (Haynes *et al.* 2000, 1998).

Nach der Transplantation (und hier muß natürlich unterschieden werden, ob es sich um ein allogenes oder autologes Volltransplantat oder ein allogenes T-Zelldepletiertes Transplantat handelt, bei letzterem dauert die Wiederherstellung entsprechend länger) ist die relative Anzahl an CD3⁺ Zellen signifikant vermindert. Innerhalb von drei Monaten werden aber in der Regel Normalwerte erreicht. Dies gilt aber weder für das Verhältnis zwischen CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen noch für deren Funktionalität. Typischerweise überwiegen in der Frühphase nach der Transplantation die CD8⁺ T-Lymphozyten gegenüber den CD4⁺ T-Lymphozyten. Den Grund dafür findet man in der Abhängigkeit CD4⁺ T-Zellen von einem funktionierenden Thymus während eine Subgruppe von CD8⁺ T-Zellen sich auch in der Peripherie, wie der Leber oder der Darmschleimhaut entwickeln können. Die Beobachtung der Relation zwischen Thymusgröße und Menge an peripheren CD4⁺ Zellen unterstützt die These, das Helfer T Zell Entwicklung von einem funktionierenden Thymusgewebe abhängt. Die Rückbildung des Thymus beginnt ein Jahr nach der Geburt und schwindet kontinuierlich mit einer Rate von drei Prozent pro Jahr.

Zwischen dem 35. und 40. Lebensjahr schreitet die Rückbildung nur noch zu ca. ein Prozent fort, wodurch auch im Alter eine geringe Thymusleistung zu beobachten ist (Jameson *et al.* 1998, Haynes *et al.* 2000, Pido-Lopez *et al.* 2001). Durch die Konditionierung vor der HSCT wird auch der Thymus schwer geschädigt und es kommt zu Funktionsstörungen des Organs,

die um so schwerwiegender wirken, je älter der Patient ist. (Davison *et al* 2000, Storek *et al.* 1995). Naive und Gedächtnis T-Zellen lassen sich anhand der Expression von Isoformen des allgemeinen Lymphozytenmarkers CD45 voneinander unterscheiden. Auf naiven T-Zellen wird die CD45RA⁺ Form exprimiert, während Gedächtnis T-Zellen CD45RO auf ihrer Oberfläche tragen. So findet man nach intensiver Chemotherapie oder Transplantation steigende Mengen an CD8⁺ CD45RO und wenige CD4⁺ CD45RO T-Zellen (Weinberg *et al.* 1995). Die allmähliche Repopulation von CD4⁺CD45RA⁺ T-Zellen läßt sich auf noch residuales Thymusepithel zurückführen, doch braucht bis zu zwei Jahren um Normalwerte zu erreichen. Neben den funktionellen Defiziten der T-Zellen nach der Transplantation ist auch eine stark verminderte Produktion der Zytokine IL-2, IL-3 und GM-CSF zu beachten. Dagegen liegt die Produktion von Interferon- γ im normalen, welches auf die rapide Regeneration von Zellen der angeborenen Immunität zurückzuführen ist. Die Anormalitäten in der IL-2, IL-3 und GM-CSF-Produktion lassen sich durch Defekte in der T-Zellentwicklung erklären, aber auch aus der Tatsache, daß es lange dauert, bis der CD4⁺ Pool wiederhergestellt ist, da diese Zellen die wichtigsten Zytokinproduzenten sind und regulierend sowohl in die T-Zell-vermittelte-, als auch in die humorale Immunität eingreifen.

Wiederaufbau der B Zell Immunität

Die normale B-Zelldifferenzierung ist begleitet von einer Reihe verschiedener Reifeschritte bei denen es zu Umordnungen der Gene für die Immunglobuline und zur Expression entwicklungspezifischer Oberflächenmarker kommt. Nach der Transplantation sind die absoluten Anzahlen reifer B-Zellen während der ersten drei Monate drastisch reduziert und erreichen nach etwa sechs bis neun Monaten einen gewissen Plateauwert. Allerdings handelt es sich dabei um noch nicht funktionsfähige B-Lymphozyten. Daher dauert es oft bis zu zwei Jahren, bis die B-Zellfunktionen wieder ausreichend hergestellt worden sind. Das für die B-Zellentwicklung wichtige Mikromilieu des Knochenmarks wurde durch die gesamte Prozedur der Transplantation natürlich mit zerstört und braucht seine Zeit bis es sich neu aufbauen und funktionieren kann (Lenarsky 1995).

Faktoren, die eine Rekonstitution des Immunsystem beeinträchtigen

In den ersten 100 Tagen nach der Therapie ist der Patient dem größten Risiko posttransplantärer Komplikationen ausgesetzt. Doch manifestiert sich das Auftreten einer GvHD meistens schon innerhalb der ersten sechs Wochen nach Transplantation (Ferrara *et al.* 1991, Ferrara 2000).

Bei der Transplantation solider Organe kann es zum Angreifen und Zerstören des implantierten Gewebes von Seiten immunologisch aktiver Zellen des Organempfängers kommen, welches als host versus graft reaction (HvGD), oder Wirt gegen Transplantat Reaktion bezeichnet wird. Bei der Knochenmarktransplantation kommt es meistens zur umgekehrten Reaktion, weil mit dem Transplantat alloreaktive T-Lymphozyten transferiert werden, die sich gegen das Gewebe des Empfängers richten. Graft versus host Disease (GvHD), übersetzt Transplantat gegen Wirt-Reaktion ist die Hauptkomplikation in Folge einer allogenen Knochenmarktransplantation. Aufgrund der kombinierten myeloablativen immunsuppressiven Vorbehandlung werden meistens die alloreaktiven T-Zellen des Empfängers zerstört und es sollte daher zu keiner (HvGD) kommen, obwohl dies in seltenen Fällen trotzdem vorkommen kann. Während bei der soliden Organtransplantation (SOT) der Patient selten sein Transplantat toleriert, muß er ein Leben lang immunsuppressive, bzw. T-Zell hemmende Medikamente einnehmen, damit es zu keiner Transplantatabstoßung kommt. SOT-Patienten sind daher lebenslang einer erhöhten Infektanfälligkeit und dem Risiko sekundärer maligner Erkrankungen ausgesetzt.

Bei der HSCT kann man, wenn sich ein stabiler Chimerismus eingestellt hat mit der Immunsuppression aufhören und nach einiger Zeit trägt sich das Transplantat selber und gewährleistet dem Patienten ein normal funktionierendes Immunsystem (Kolb, persönliche Mitteilung). Daher gilt es die schweren gesundheitlichen Belastungen, die mit einer GvHD einher gehen zu ergründen, zu behandeln und ggf. zu verhindern. Denn nur wenn es gelingt über diese Hürde der Transplantationsbiologie zu springen, wird man eine Rekonstruktion der Immunität und Toleranzinduktion verbunden mit einem stabilen Chimerismus erreichen können.

Wie bereits erwähnt handelt es sich bei der GvHD um einen immunpathophysiologischen Prozess bei dem zelluläre und humorale Interaktionen eine große Rolle spielen. Bei einer allogenen KMT, werden mit dem Knochenmark reaktive Spender Lymphozyten in den Empfänger infundiert, der durch die Konditionierung insgesamt schwer geschädigt ist. Der Körper reagiert auf die chemo-und strahlentherapeutischen Behandlungen mit der Aktivierung entzündlicher Prozesse, wobei endothel- und epitheliale Zellen zur Sekretion von

Zytokinen, wie IL-1, TNF- α und IL-6 kommen, sowie zur Hochregulation kostimulatorischer Moleküle und Adhäsionsmolekülen gelangen. Dadurch kommt es zur Antigenerkennung seitens alloreaktiver Spender T-Zellen, die fremde MHC-Moleküle erkennen. Die Folge ist eine Zerstörung des entsprechenden Gewebes. Die Hauptzielorgane einer GvHD sind die Haut, der Darm und die Leber. GvHD richtet sich aber auch gegen das lymphoide System selbst und ist dadurch charakterisiert, daß sich eine „Hypozellularität“ und lymphoide Atrophie ausbildet. Damit stellt eine GvHD *per se* eine Immunsuppression dar (Atkinson *et al.* 1990, Witherspoon 1994)

Der hohe Anteil an professionellen APCs, wie Makrophagen und DCs innerhalb dieser Zielorgane führt zu einer Verstärkung der GvHD (Ferrara 2000).

Dendritische Zellen spielen daher eine große Rolle in der Entstehung und der Etablierung akuter und chronischer GvHD. Durch ihr reichhaltiges Repertoire an Kostimulatorischen Molekülen, wie CD86, CD80 und CD40, sowie zahlreicher Adhäsionsmoleküle und Integrine und der konstitutiven Expression großer Mengen von MHC I und II Molekülen bewirken sie eine besonders starke T-Zellstimulierung, besonders auch von solchen T-Zellen, die möglicherweise von einer anderen APC nicht stimuliert werden könnten. Besonders die Haut stellt eine erste Barriere zur Etablierung primärer Infektionen dar, weil dort viele dendritische Zellen vom Langerhanstyp vorkommen, wodurch sie zur Schädigung der Haut durch T-Zellreaktionen beitragen.

Es besteht daher eine enge Korrelation zwischen GvHD und der Entwicklung von Infektionen. Außerdem stellt die GvHD den Hauptgrund für ein verzögertes *Engraftment* und eine verzögerte Immunrekonstruktion dar. Das Auftreten einer GvHD ist meistens innerhalb der ersten 60 Tage nach der Transplantation zu beobachten. Der Zeitpunkt der Entwicklung wird stark von der Ungleichartigkeit der MHC Antigene mit beeinflusst, d.h. je ungleicher Spender und Empfänger zueinander sind desto früher tritt die GvHD ein. Außerdem bestimmt die Alloantigenzusammensetzung den Typ von T-Zellen den sie stimulieren. So stimulieren Unterschiede in den MHC-II Molekülen (HLA-DR,DP,DQ) CD4⁺-T-Zellen, während Unterschiede in den MHC-I Proteinen (HLA-A,B,C) CD8⁺ T-Zellen zur Proliferation anregen. Mittlerweile hat man auch sogenannte Minor Histokompatibilitäts Antigene (miHag) entdeckt, die auch eine Rolle bei der GvHD spielen und die man entdeckt hat durch das ungewöhnliche Auftreten von GvHD bei HLA identischen Geschwister (Goulmy *et al.* 1997, Tseng *et al.* 1999, Tait *et al.* 2001). Einige dieser Peptide dieser polymorphen Proteine können an die MHC-Moleküle binden. In dieser Situation sind die MHC-Moleküle zwischen Spender und Empfänger zwar identisch, nicht aber die miHags. Dadurch kommt es zu einer

Antigenerkennung der Spender T-Zellen, die mit ihren T-Zellrezeptoren die unterschiedlichen Peptide der miHags auf den MHC-Molekülen des Empfängers erkennen. Dennoch entwickeln nicht alle Empfänger von allogenen HSCT eine GvHD, das Auftreten liegt zwischen 30 und 60%. Der Grund dafür liegt im Aufbau von Toleranzmechanismen von seiten des Empfängers gegenüber den Zellen des Spenders.

Immunologisch gibt es verschiedene Ereignisse, die zur T-Zell-Toleranz führen können.

Klonale Deletion ist ein Mechanismus der sich normalerweise im Thymus vollzieht und dessen primäre physiologische Funktion die Etablierung von Selbsttoleranz ist. Der zweite Mechanismus kann reaktive Zellen, die sich in der Peripherie aufhalten ignorieren, weil der Grad der Antigenstimulierung nicht ausreicht um eine Immunantwort zu erzeugen. Beim dritten Mechanismus wird klonale Anergie erzeugt durch die Abwesenheit kostimulatorischer Signale und beim vierten Mechanismus bewirkt die Gegenwart aktiver Suppressorzellen die Unterdrückung einer Immunantwort in Anwesenheit voll funktionsfähiger alloreaktiver Klone. Pharmakologisch induzierte immunsuppressive Maßnahmen zur Verminderung einer GvHD wie Cyclosporin A, Methotrexat oder Kortikosteroide können zwar die GvHD größtenteils eindämmen, haben aber signifikante Nebenwirkungen zur Folge. Methotrexat wirkt unspezifisch immunsupprimierend und trägt entscheidend zu einer Verzögerung der hämatopoetischen Rekonstitution bei und wirkt toxisch auf Schleimhäute und Lunge. Cyclosporin A bewirkt zwar eine spezifische Inhibition der T-Zell Proliferation, doch auch hier wird eine Verzögerung der Immunrekonstruktion, verbunden mit Nephrotoxizität und Beeinträchtigungen der Leberfunktionen bewirkt. Der wichtigste Ansatz zur Verhinderung einer GvHD war die Depletierung der T-Zellen aus dem Stammzellpräparat. Dadurch konnte das Auftreten der GvHD deutlich reduziert werden. Heutzutage sind sogar die meisten allogenen nichtverwandten Transplantationen T-Zell depletiert.

Allerdings birgt diese Vorgehensweise andere Risiken:

1. Erhöhung der Rezidivrate, weil die Alloreaktivität der Spender T-Zellen sich auch gegen residuale leukämische Zellen richtet. Man bezeichnet dies als Graft versus leukemia effect (GvL) (Kolb *et al* 1990,1995, Porter *et al.* 1999). Deshalb werden heute Leukämiepatienten zunächst mit einem T-Zelldepletierten Transplantat behandelt. Erst zu einem späteren Zeitpunkt, falls ein Rezidiv auftritt, werden dann die Lymphozyten des gleichen Spenders dem Patienten infundiert. Diese Methode, die als „Donor Lymphozyte Infusion“ (DLI) in die Geschichte der KMT eingegangen ist, wird besonders erfolgreich bei chronisch myeloischer Leukämie (CML) nach Rezidiv angewendet und führt zu einer Langzeitüberlebensrate von

über 70% (Kolb *et al.* 1990, 1995, 1998, Dazzi *et al.* 1999). Allerdings ist auch hier wieder die Gefahr der GvHD erneut gegeben.

2. Erhöhtes Auftreten von EBV-induzierten Lymphomen, die durch latent infizierte B-Lymphozyten des Spenders, und durch die Abwesenheit EBV-spezifischer T-Zellen, die diese Zellen normalerweise kontrollieren, entstehen können.

Viele derzeitige Bemühungen zielen auf die Induktion von Toleranzmechanismen ab. Dabei steht die Rolle der dendritischen Zellen im Vordergrund. Durch *ex vivo* Blockade der kostimulatorischen Moleküle durch lösliche CTLA-4 Moleküle, die mit humanen Immunglobulinen fusioniert wurden (CTLA-4-Ig) können die Empfänger APCs (im wesentlichen dendritische Zellen) den alloreaktiven T-Lymphozyten des Knochenmarkspenders zwar das erste Signal der T Zellaktivierung über die MHC:TCR Interaktion liefern, aber es kann zu keinem zweiten Signal kommen. Bindung des CTLA-4 an CD80 führt zu Anergie und es kann folglich zu keinen Effektorfunktionen seitens dieser T-Zellen kommen. Dieser experimentelle Ansatz kann spezifisch auf alloreaktive T-Lymphozyten wirken, im Gegensatz zu den bereits beschriebenen immunsuppressiven Maßnahmen, die unspezifisch das gesamte T-Zell Repertoire unterdrücken und damit zu einer Vielzahl toxischer Begleiterscheinungen beitragen. (Gribben und Guinan 1996)

Ein weiterer vielversprechender Ansatz ist die Infundierung von extrem hohen Dosen an CD34⁺ haploidentischen Stammzellen (Megadosis), um zunächst ein besseres *Engraftment* und schließlich eine Verminderung der GvHD zu erwirken (Aversa *et al.* 1998).

Opportunistische Infektionen

Die Mehrheit der Infektionen, die nach einer allogenen Transplantation auftreten sind opportunistischer Natur. Es handelt sich dabei um potentiell infektiöse Agentien, die weitverbreitet im internen und externen Milieu des Körpers persistieren und normalerweise keine Symptome verursachen. In der Abwesenheit einer funktionierenden Immunüberwachung können aber opportunistische Infektionen durch verschiedene im folgenden aufgelisteten Mechanismen entstehen:

- Endogene Invasion von normalerweise kommensalen oder saprophytischen Organismen (Bakterien, Pilze oder Parasiten)
- Reaktivierung latenter Viren (z.B. Zytomegalievirus (CMV), Epstein Barr Virus (EBV), Adenoviren u.a.)

Letzteres stellt wie bereits erwähnt das Hauptrisiko neben GvHD dar und ist entscheidend für eine verzögerte Rekonstitution des Immunsystems verantwortlich. In der Vergangenheit wurden viele verschiedene Therapiemöglichkeiten auf der Basis pharmakologischer Reagenzien zur Kontrolle von viralen Infektionen in immunsupprimierten Patienten entwickelt. Viele dieser Präparate sind den Erfolgen der intensiven HIV Forschung zu verdanken, da opportunistische Infektionen die Hauptkomplikationen bei HIV darstellen (Cowley 2001, Kaplan *et al.* 2001).

Die Wirkungsweise der meisten dieser Medikamente ist jedoch stark limitiert in der Behandlung fortgeschrittener Infektionen. Zum einen sind es die starken Nebenwirkungen, der in hoher Dosis verabreichten Medikamente und zum anderen die geringe Wirksamkeit, insbesondere bei Patienten mit bereits etablierten Infektionen.

Daher besteht die dringende Notwendigkeit alternative Therapiestrategien zu entwickeln, die auf der Basis immunkompetenter Zellen in der Lage sind nicht nur die lebensbedrohlichen Infektionen zu mindern sondern auch eine progressive Rekonstruktion der zellulären Immunität des Patienten zu fördern.

Adoptive Immuntherapie für Virusassoziierte Erkrankungen

Unter dem Begriff der adoptiven Immuntherapie versteht man die Infusion von immunkompetenten Zellen in den Körper eines immundefizienten Patienten zur Therapie oder Vorbeugung bestimmter lebensbedrohlicher Erkrankungen.

Der erste Schritt, der in diese Richtung unternommen wurde, war der Transfer immunkompetenter Spender T-Zellen gegen EBV assoziierte Komplikationen nach einer KMT. (Papadopoulos *et al.* 1994) Dabei wurden Spender-CD3⁺T-Zellen in Empfänger von allogenen Knochenmark, bei denen durch Biopsien EBV-positive Lymphome detektiert wurden, infundiert. Mit der Verabreichung unmanipulierter T-Lymphozyten waren zwei Erwartungen verbunden:

1. Die verabreichte Menge an T-Zellen sollte über einen großen Anteil an EBV-spezifischen Gedächtniszellen verfügen.
2. Diese Zellen sollten in der Lage sein, *in vivo* zu proliferieren, um maligne Zellen zu erkennen und zu zerstören.

Die erste Erwartung wurde unterstützt durch die Tatsache, daß in gesunden Individuen eine hohe Frequenz EBV-spezifischer ZTL innerhalb der T-Zellpopulationen des peripheren Blutes zu finden sind, die eine Immunantwort gegen EBV zeigen. Der Durchseuchungstitel

für EBV liegt in Europa und den USA bei über 80 Prozent und steigt in den Entwicklungsländern von Asien und Afrika auf über 95 % an.

Die zweite Erwartung wurde unterstützt durch die Ergebnisse von Tierexperimenten. Die Infusion von humanen T-Zellen in SCID-Mäuse, die zuvor mit EBV-Lymphomazellen immunisiert wurden und anschließend humane T-Zellen infundiert bekamen, zeigten kein Tumorwachstum.

Das Ergebnis der Patientenstudie war dann folgende:

Es konnte einen Rückgang der Lymphome in allen Patienten beobachtet werden, doch diese Art der Behandlung war stark assoziiert mit dem Auftreten von GvHD und opportunistischen Infektionen, die eine signifikante Mortalitätsrate zur Folge hatte.

Ein erfolgreicherer Ergebnis erzielte im gleichen Jahr die Gruppe von Robert Hromas (Hromas *et al.* 1994) an der Indiana University School of Medicine, (Indiana, USA) die einem Patienten, der nach einer T-Zell-depletierten KMT an einer schweren adenoviralen Infektion erkrankte, unmanipulierte Spender T-Zellen infundierte. Diesem Patienten konnte damit das Leben gerettet werden und glücklicherweise entwickelte sich bei ihm auch keine GvHD. Da das Risiko einer GvHD bei dieser Art von Immuntherapie, aufgrund des bereits beschriebenen signifikant hohen Anteil an alloreaktiven T-Zellen innerhalb der gesamten T-Zellpopulation sehr hoch ist, gingen andere Gruppen dazu über antigenspezifische ZTL *in vitro* zu generieren und zu expandieren, um sie dann adoptiv dem Patienten zu infundieren. Man nahm an, daß damit das Risiko einer GvHD deutlich gemindert sein müßte und man gleichzeitig zu einer schnelleren Restauration des Immunsystems beitragen könne. Die ersten Versuche dieser Art stammen von der Gruppe um Stanley Riddell und Philip Greenberg am Fred Hutchinson Cancer Research Center in Seattle, die das erste klinische Protokoll für die adoptive Immuntherapie mit CMV-spezifischen ZTL für KMT-Patienten entwickelt haben. Das Auftreten von Zytomegalievirus (CMV)- Reaktivierung nach erfolgter Knochenmark- oder Stammzelltransplantation stellt mit einer Reaktivierungsrate von über 30% die häufigste virale Komplikation dar. CMV Viremia oder Pneumonie kann bereits während der ersten 45 Tage nach der Transplantation auftreten. CMV induzierte Erkrankungen in immunsupprimierten Patienten werden in erster Linie durch das Defizit an CD8⁺ virus-spezifischen T-Lymphozyten verursacht. Die Gruppe isolierte und expandierte daher CMV-spezifische CD8⁺ T-Zellklone von gesunden Knochenmarkspendern und verabreichte diese den entsprechenden HLA- kompatiblen Empfängern. Dieser Therapieansatz war insofern erfolgreich, da keine toxischen Nebenwirkungen auftraten und sich keine GvHD von Seiten der infundierten spezifischen CD8⁺-T-Zellklone entwickelte. Darüber hinaus konnte die

antivirale Immunität in allen getesteten Patienten bis zu 12 Wochen rekonstruiert werden (McLaughlin-Taylor *et al.* 1994, Riddell *et al.* 1995).

Der Nachteil der Methode war allerdings die Kurzlebigkeit der infundierten Klone, die in der Abwesenheit CMV-spezifischer und Zytokinproduzierender CD4⁺ Helferzellen keine Langzeitprotektion gegen CMV vermitteln konnten.

Da die Reaktivierung des Epstein-Barr Virus (EBV) die zweit häufigste Komplikation, besonders bei Empfängern von T-Zell-depletierten allogenen Transplantaten darstellt, konzentrierten sich weitere Bemühungen in der Entwicklung EBV-spezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten zur Prophylaxe und Behandlung von Patienten mit EBV induzierten Lympho-proliferativen Erkrankungen. Die hohe unregulierte EBV-induzierte, B-Zell Proliferation, verursacht durch unzureichende zellvermittelnde Immunantworten gegen latente virally assoziierte Proteine führt durch die starke Immunsuppression bei Transplantationspatienten zur Entwicklung von lymphoproliferativen Lymphomen (LPD= Lympho-proliferative disease) (Shapiro *et al.* 1988, Nalesnik 1991).

Tatsächlich entwickeln bis zu 10-25% aller Fälle von Empfängern von kompatibel oder inkompatibel verwandten oder nicht verwandten T-Zell-depletierten Knochenmarkstransplantaten EBV- induzierte Lymphome (Papadopoulos *et al.* 1994, Heslop *et al.* 1994).

Diese entstehen entweder durch Reaktivierung von EBV in den Spender B-Zellen, oder können zu einem geringen Ausmaß vom Empfänger selbst (<10%) kommen. Das Auftreten von EBV tritt meistens erst in einer späteren Phase nach der Transplantation auf, d.h. 2-6 Monate nach Transplantation. Empfänger solider Organe stehen unter einem noch höheren Risiko EBV-LPD zu entwickeln, da sie medikamentös unter einer permanenten Immunsuppression leiden. Bei Stammzelltransplantationspatienten ist das Auftreten dieser Komplikation etwas reduziert. Die Gruppe von Rooney und Heslop (1994, 1995, 1997, 1998) am Baylor College of Medicine in Houston, und am St.Jude's Children's Research Hospital in Memphis, USA haben deshalb klinische Studien der Phase I/II entwickelt, um der Frage nachzugehen, ob der adoptive Transfer von EBV-spezifischen zytotoxischen T-Zellen zum Einen die Rekonstruktion der EBV-spezifischen Immunität bewirken und zum Anderen der Entstehung von EBV⁺ Lymphomen entgegenwirken kann. In den Jahren von 1993- 1999 generierte die Gruppe EBV-spezifische ZTL von Knochenmarkspendern und verabreichte sie den Patienten entweder zur Prophylaxe und/oder zur Behandlung von EBV-LPD. Die dabei generierten Linien waren in erster Linie CD8⁺ T-Zellen, erhielten aber auch einen signifikanten Anteil von CD4⁺ T-Zellen, der vermutlich entscheidend zur Persistenz der

ZTL in vivo beiträgt. Diese Studie erwies sich als äußerst erfolgreich, denn in gleicher Weise wie bei den CMV spezifischen ZTL waren keine toxischen Nebenwirkungen zu verzeichnen, kein Auftreten von GvHD und darüber hinaus konnten diese polyklonalen ZTL eine Langzeitrekonstruktion der antiviralen Immunität über mehrere Jahre vermitteln.

Interessanterweise waren diese EBV-spezifischen ZTL nicht nur prophylaktisch wirksam, indem sie die Entstehung einer LPD verhinderten, sondern auch therapeutisch von Nutzen, da sie in mehreren Fällen den Rückgang bereits etablierter Lymphome bewirkten.

Neben den Mitgliedern der Herpesgruppe von Viren, werden auch andere latente Viren in Zusammenhang gebracht mit signifikanter Morbidität und Mortalität nach allogener HSCT.

Dazu gehören Adenoviren, die ebenfalls Latenzmechanismen entwickelt haben um lebenslang in ihrem Wirtsorganismus persistieren zu können. Allerdings kann AdV im Gegensatz zu EBV nicht mit der Entwicklung von malignen Erkrankungen gebracht werden, denn transformierende Eigenschaften einiger AdV-spezifischer Antigene konnten ausschließlich in Nagetierzellen nachgewiesen werden. Im „immungesunden“ Menschen wird das Virus vermutlich durch virus-spezifische ZTL und neutralisierende Antikörper kontrolliert. Bei Transplantationspatienten, oder bei z.B. an der Immunschwäche AIDS leidenden Menschen funktioniert dieses Kontrollsystem des Körpers nicht mehr und es kommt zur erneuten Aktivierung des lytischen Infektionszyklus, dessen Auswirkungen schwere Symptome von Enzephalitis, Meningitis, Gastroenteritis, Pneumonie und /oder hämorrhagischer Urozystitis zur Folge haben können. Diese Erkrankungen führen besonders bei Patienten nach erhaltener allogener KMT oder HSCT häufig zum Tode. Das Auftreten von AdV nach allogener HSCT liegt zwischen 3 und 12%. AdV gehört zu den frühen Komplikationen nach HSCT und tritt nicht selten schon vor dem Tag 60 auf (Davison *et al.* 2000, Heslop *et al.* 1998). Anlehnend an die Ergebnisse der Studien von Heslop, Rooney und Roskrow sowie der Pionierarbeiten von Riddell und Greenberg, stellt die Entwicklung einer adoptiven Immuntherapie gegen Adenovirus ein sinnvolles Konzept zur Behandlung und Prophylaxe von adenoviralen Infekten bei Transplantationspatienten dar. Smith *et al.* haben daher bereits 1996 mit der Generierung Adenovirus-spezifischer ZTL begonnen, indem sie Adenovirus-infizierte dendritische Zellen als Stimulatorzellen verwendeten. Sie konnten zeigen, daß AdV- infizierte dendritische Zellen als hochpotente antigenpräsentierende Zellen spezifische ZTL-Antworten hervorrufen konnten. Darüber hinaus konnten sie demonstrieren, daß ZTL, die gegen einen adenoviralen Subtyp generiert waren auch autologe Zielzellen töten konnten, die mit anderen viralen Subtypen infiziert waren. (Smith *et al.* 1998).

Allerdings konnte diese Technologie noch nicht bis hin zur klinischen Anwendung geführt werden.

Auch wurde bereits der Versuch unternommen auf der Basis von B-LCL, die man mit einem immundominanten Protein des CMV-Genoms (pp65) retroviral transduzierte, „bispezifische ZTL zu stimulieren. Dieser Ansatz war experimentell sehr erfolgreich und wurde kürzlich in einem klinischen Protokoll dokumentiert und kann in einer klinischen Studie der Phase I/II-erprobt werden.(Sun *et al.* 1999, 2000, Lucas *et al.* 2000).

In vitro Modelle und *in vivo* Studien der letzten Jahre haben der Medizin neue Horizonte in der Therapiemöglichkeit bislang schwer- oder unheilbarer Erkrankungen geöffnet. Dazu gehören nicht nur Krebserkrankungen und genetische Immundefekte, sondern gerade auch virale Komplikationen als Folge ausgeprägter Immunsupprimierung, verursacht durch drastische Konditionierungsmaßnahmen zur Einleitung von Transplantationen. Aufgrund der erfolgreichen Administration allogener CMV (Ridell *et al.* 1995) oder EBV-spezifischer ZTL in KMT-Patienten und EBV-spezifischer ZTL in Hodgkin-Patienten (Roskrow *et al.* 1998) läßt dies die Vermutung zu, daß auch weitere Modelle basierend auf dieser Technologie Erfolg versprechend sein werden.

Im folgenden Abschnitt soll nun eine kurze Beschreibung der Viren erfolgen, die Gegenstand meiner Arbeit war.

Epstein-Barr Virus (EBV)

EBV gehört zu den gamma Herpesviren, die durch ein stark eingeschränktes Spektrum der Zelltypen die sie infizieren charakterisiert sind. EBV ist ein behülltes ikosaedrisches Virus, dessen Genom aus einem einzelnen linearen doppelsträngigen DNA-Molekül mit einer Größe von 172 Kilobasenpaare (kb) besteht. EBV verfügt über einen Proteinkern, der von DNA umhüllt wird, einem Nukleocapsid mit 162 Capsomeren und einem Proteintegument, das sich zwischen dem Nukleocapsid und der Hülle befindet. Die äußere Hülle weist zusätzlich die für Herpesviren charakteristischen aus Glykoproteinen bestehenden Spikes auf.

EBV verursacht ein weites Spektrum an akuten und chronischen Infektionen in gesunden und in immunsupprimierten Individuen. Die häufigste durch EBV verursachte Erkrankung ist die Infektiöse Mononukleose, welche auch als Pfeiffersches Drüsenfieber (1889 nach seinem Entdecker Emil Pfeiffer benannt) bekannt ist. Andere relevante Erkrankungen sind vor allem die malignen Erkrankungen, die durch EBV verursacht werden. Maligne Erkrankungen die durch das onkogene Potential des EBV hervorgerufen werden können, sind:

Morbus Hodgkin, Nasopharynxkarzinom, Burkitts Lymphoma und die Lymphoproliferative Erkrankung (LPD).

Infektionswege des EBV

Man unterscheidet zwei verschiedene Stadien des EBV-Generationszyklus, den latenten- und den lytischen Zyklus.

EBV infiziert epitheliale Zellen des Nasopharynx und der Nasenschleimhaut, wo es sich stark repliziert und einen lytischen Infektionszyklus ausübt. Lysierte Zellen geben dann das infektiöse Virus über Schleimhautsekrete des Mundes und der Nase ab und können es dadurch auf andere Personen übertragen. B-Lymphozyten, die das lymphatische Gewebe der infizierten oropharyngealen Schleimhaut infiltrieren werden ebenfalls infiziert, doch kommt es hier zu keinem lytischen sondern zu einem latenten Infektionsablauf.

Latente Infektion

EBV infizieren ruhende Gedächtnis B-Zellen durch die Interaktion des Haupthüllglykoproteins gp350 mit dem B-Zellassozierten C3d Komplementrezeptor CR2 bzw. CD21 (Jondal *et al.* 1976, Nemerow *et al.* 1987). Das Eintreten des Virus in die B-Zellen führt zu einer persistierenden latenten Infektion verbunden mit einer Immortalisation der Zellen mit fortdauernder Proliferation. In gesunden Individuen beträgt der Anteil an latent infizierten B-Zellen ein bis fünfzig pro einer Million. Der Anteil dieser Zellen bleibt in der Regel konstant über viele Jahre (Birx *et al.* 1986, Babcock *et al.* 1998, Cohen 2000). Während über hundert Gene während der lytischen Infektion exprimiert werden, werden beim latenten Zyklus nur elf Gene aktiviert. Dazu gehören: zwei kleine polyadenylierte RNAs (EBER-1 und EBER-2), sechs nukleare Antigene (EBNA-1, EBNA-2, EBNA3a, EBNA-3b, EBNA-LP, EBNA-3c) und drei Membranproteine (LMP1, LMP2a und LMP2b). EBV assoziierte Erkrankungen zeigen im allgemeinen nur ein eingeschränktes Muster in der Expression latenter Gene.

Man unterscheidet drei verschiedenen Typen von Latenzen:

Die erste Form (Typ I) ist gekennzeichnet durch die alleinige Expression von EBNA-1 und den EBERs, während in der zweiten Form (Typ II) EBNA-1, LMP1, LMP2a und b sowie die EBERs exprimiert werden. In der dritten Form (Typ III) werden schließlich alle latenten EBV Gene exprimiert.

Immunreaktionen gegen EBV und Immunevasions-Mechanismen des Virus

Infektion mit EBV resultiert beim Menschen in sowohl einer humoralen als auch in einer T-Zell-vermittelten Immunität. Obwohl das Auftreten von Antikörpern, die gegen Strukturproteine und die EBNA's des EBV gerichtet sind, einen wichtigen Bestandteil zur Diagnostik der Infektion liefern, trägt die zelluläre Immunantwort doch im Wesentlichen zur Kontrolle der EBV Infektion bei. Natürliche Killerzellen, CD4⁺ und CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten sind für die Kontrolle der proliferierenden EBV-infizierten B-Lymphozyten während einer primären Infektion verantwortlich (Rickinson *et al.* 1997). Bei infektiöser Mononukleose werden bis zu 40% der CD8⁺ T-Lymphozyten gegen eine replikative EBV Protein Sequenz gerichtet während zwei Prozent gegen eine latente EBV Protein Sequenz gerichtet wird (Callan *et al.* 1998). Zur Kontrolle der Infektion, greifen HLA-restringierte zytotoxische T-Lymphozyten gegen EBV ein, wobei CD8⁺ T-Zellen sowohl gegen replikative als auch latente Proteine gerichtet sind (Benninger-Doring *et al.* 1999). Die latenten Proteine, welche in den wachstumstransformierten B-Zellen exprimiert werden (EBNA-1, EBNA-2, EBNA3a, EBNA-3b, EBNA-LP, EBNA-3c und die drei Membranproteine LMP1, LMP2a und LMP2b) sind in der Hauptsache an der Induktion von ZTL-Antworten beteiligt. Allerdings herrscht innerhalb dieser Proteine eine Hierarchie der Immundominanz und der Hauptanteil der ZTL-Antworten wird gegen die immundominanten Antigene der EBNA-3 Gruppe gerichtet. Der restliche Teil der latenten Proteine wird als subdominant eingestuft und solche subdominanten ZTL-Antworten wurden gelegentlich nur bei LMP2 detektiert (Lee *et al.* 1993, 1997). Da die Proteine der EBNA-3 Gruppe nicht höher oder mit einer höheren Lebensdauer exprimiert werden, als die übrigen latenten Antigene in lymphoblastoiden Zelllinien, wurde vorgeschlagen, daß diese Immundominanz auf eine Bevorzugung im Hinblick auf die Antigenprozessierung zurückzuführen sei. Beispielsweise wird EBNA-1 nicht prozessiert, da dieses Protein über einen internen Schutzmechanismus verfügt den es vor der Prozessierung über das Proteasom schützt. EBNA-1 ist somit ein nicht immunogenes Protein (Cohen *et al.* 2000). LMP2 im Vergleich zu den EBNA-3 Proteinen ist ein subdominantes Antigen bei dem gezeigt werden konnte, daß spezifische ZTL Antworten nur in Verbindung mit verschiedenen HLA-Klasse I- Allelen stimuliert wurden (Lee *et al.* 1993, 1997). Die immundominanten Proteine der EBNA-3 Gruppe scheinen von den meisten MHC-Klasse-I Allelen als Zielantigene selektiert zu werden, trotzdem ist die Wahl der einzelnen EBNA-3 Epitope für jedes individuelle Allel unterschiedlich. Zum Beispiel zeigen Menschen mit dem HLA-Typ B8, A11 oder B27 gesteigerte ZTL Antworten gegenüber den gleichen allelspezifischen Peptidepitopen. (Burrows *et al.* 1994, Gavioli *et al.* 1993). Jedoch zeigten

einige epitopspezifische ZTL, die aus ihrem Gedächtnisstadium durch Stimulierung mit autologen LCL *in vitro* reaktiviert wurden, nur geringe, oder in manchen Fällen sogar gar keine Reaktivität gegenüber der autologen LCL als Zielzelle in Analysen der spezifischen T-Zell-vermittelten Zytotoxizität. Nur wenn die gleichen LCL-Zielzellen mit Peptiden des relevanten EBV Epitops beladen wurden, oder diese Zellen durch Manipulation (Transfektion mit einem rekombinanten Vaccinia Virus) zur Überexpression des Antigens gebracht wurden, konnten die ZTL die so manipulierte Zielzelle töten (Hill *et al.* 1995). Diese Beobachtung läßt die Annahme zu, daß einige ZTL eine höhere Dichte an spezifischen Peptid-MHC-Komplexen auf der Oberfläche der Zielzellen zur Erkennung benötigen, als normalerweise von den LCL präsentiert werden. Zwei HLA-A11 Epitope innerhalb von EBNA-3B wurden analysiert und es hat sich herausgestellt, das eines der beiden Epitope das immundominante Zielmolekül für HLA-A11 restringiertes ZTL-Gedächtnis darstellt, die in der Lage sind, im Falle einer Reaktivierung das autologe LCL-Target zu erkennen und zu töten. Das andere Epitop wurde als das Subdominante charakterisiert und induziert ZTL, die eine nur schwache Reaktivität gegenüber den autologen LCL zeigen.

Interessanterweise besitzen beide Peptide die gleiche Affinität an HLA-A11 Moleküle zu binden und die MHC-Peptidkomplexe sind auch in gleicher Weise stabil. Allerdings konnte auch gezeigt werden, wenn diese Komplexe auf der Oberfläche der LCL selbst untersucht wurden, daß das immundominante Epitop von EBNA-3B über eine längere Halbwertszeit verfügte und darüber hinaus 10fach höher vertreten war, als Komplexe, die das subdominante Peptid präsentierten (Levitsky *et al.* 1996).

Die Fähigkeit des EBV, trotz der Anwesenheit spezifischer Effektorzellen zu persistieren deutet auf komplexe Strategien hin, die das Virus entwickelt haben muß, um sich vor den Effektorfunktionen des Immunsystems zu schützen. Tatsächlich kodiert EBV ein Zytokin und einen Zytokinrezeptor, der auffällige Homologie mit dem zellulären inhibitorischen Zytokin Interleukin-10 und dessen Rezeptor aufweist. Das EBV BCRF1 Protein teilt 70% seiner Aminosäuresequenz mit IL-10 (Moore *et al.* 1991, Zdanov *et al.* 1997). Das BCRF1 Protein imitiert die Aktivität des IL-10 und inhibiert die Synthese von Interferon gamma (IFN- γ) durch mononukleäre Zellen des peripheren Blutes *in vitro* (Hsu *et al.* 1990). Ein anderes EBV Protein, das EBV BARF1 Protein fungiert als ein löslicher Rezeptor für CSF-1 (kolony-stimulating factor -1), dessen physiologische Funktion in der Aktivierung von Monozyten zur gesteigerten Expression von Interferon-alpha (IFN- α) liegt. BARF1 übt vermutlich die Rolle eines Scheinrezeptors (decoy receptor) aus, indem es die Funktion des Zytokins hemmt. Da IFN γ und IFN α die Vermehrung EBV infizierter Zellen *in vitro* inhibieren, üben die Proteine

BCRF1 und BARF1 vermutlich eine Helferfunktion bei der Fähigkeit des EBV dem Immunsystem während der akuten Phase der Infektion oder nach Reaktivierung latent infizierter Zellen zu entkommen.

Ein weiteres Protein, dem es gelingt sich von einer Immunantwort zu entziehen, ist das EBNA-1. EBNA-1 verfügt über eine interne Glycin-Alanin Sequenz von mehr als 200 Aminosäuren, die den Abbau des Proteins durch das Proteasom verhindert. Dadurch können keine EBNA-1 Peptide auf der Oberfläche von MHC-Klasse I Molekülen den zytotoxischen T-Zellen präsentiert werden.

Dieser Schutzmechanismus schützt das Antigen aber nicht gegenüber der Prozessierung über den klassischen MHC-Klasse II Weg, denn in gesunden EBV-positiven Erwachsenen können normalerweise auch EBNA-1-spezifische CD4⁺ ZTL detektiert werden (Münz *et al.* 2000). Es werden daher zwei Möglichkeiten diskutiert, wie EBNA 1-spezifische CD4⁺ ZTL entstehen. Zum einen über einen endogenen proteasomunabhängigen, alternativen MHC-II-Präsentationsweg, bei dem das Protein über einen bisher unbekanntem Mechanismus unter Mitwirken saurer Proteasen in endosomale Vesikel aufgenommen wird um schließlich auf MHC-II-Moleküle zu treffen (Lich *et al.* 2000). Eine zweite Möglichkeit wäre über den Mechanismus der sogenannten Kreuzpräsentation („*cross-presentation*“) zu erklären. Dabei können dendritische Zellen sterbende, apoptotische Zellen phagozytieren und deren Antigene zytotoxischen T-Zellen präsentieren (Albert *et al.* 1998). Dadurch könnte es durch die exogen aufgenommenen apoptotischen EBV⁺ B-Zellen auch zur exogenen Prozessierung von EBNA-1 Proteinen kommen, die dann von den dendritischen Zellen den CD4⁺T-Zellen präsentiert würden (Münz *et al.* 2000).

Darüber hinaus kodiert EBV für mindestens zwei Proteine, die Apoptose verhindern können. Das EBV Protein BHFR1 ist ein Homolog des humanen antiapoptotischen Proteins bcl-2 während LMP1 die Hochregulierung zellulärer antiapoptotischer Proteine, wie bcl-2 und A20 bewirkt. EBV infizierte Burkitt Lymphomazellen inhibieren die Expression der TAP-Transporter Gene, die wichtig sind für die Antigenpräsentation über die MHC-Klasse I Moleküle und verhindern dadurch die Erkennung dieser entarteten Zellen durch CD8⁺-T-Lymphozyten. Bisher ist allerdings noch kein Mechanismus bekannt, der inhibierend in den MHC-Klasse II- Präsentationsweg eingreift.

Adenoviren (AdV)

Adenoviren gehören zu der Familie der *Adenoviridae*, die sich in zwei Genera einteilen läßt: die der Mastadenoviren, zu denen die verschiedenen Virusspezies der Säugetiere zählen und die Aviaadenoviren der Vögel.

Die humanpathogenen Adenoviren faßt man in sechs Subgenera (A bis F) zusammen, denen über 47 virale Serotypen zugeordnet werden. Die verschiedenen Adenoviren zeichnen sich durch unterschiedliche Infektionsformen, Organotropismen und Symptome aus (Tabelle 1) und werden aufgrund dieser Merkmale in verschiedene Subgenera (A-F) eingeteilt.

Tabelle 1 Einteilung der humanen Adenoviren mit Häufung bei bestimmten

Erkrankungsbilder

Subgenus	Virustypen	Zielorgane	DNA-Homologie (im Subgenus)
A	Ad 12, 18,31	Gastrointestinalbereich	48-69%
B	Ad 3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35	Lunge, Pharynx, Bindehaut	89-94%
C	Ad 1, 2, 5, 6	Pharynx	99-100%
D	Ad 9, 11, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-47	Bindehaut	94-99%
E	Ad 4	Respirationstrakt	Nicht bekannt
F	Ad 40, 41	Gastrointestinalbereich	62-69%

Das Genom der AdV besteht aus doppelsträngiger DNA, mit einer Größe von 36-38 Kb.

Die Übertragung der Viren erfolgt gewöhnlich durch Aerosole oder kontaminierte Gegenstände und Flüssigkeiten. Adenoviren infizieren bevorzugt Epithelzellen des Pharynx, des Dünndarmes sowie die Konjunktivalzellen und replizieren sich dort.

Der Proteinsyntheseapparat der Wirtszelle wird im Laufe der Infektion fast vollständig lahmgelegt und die infizierten Zellen sterben ab.

Bindung und Internalisierung des Adenovirus

Adenoviren treten mit ihren Wirtszellen über distinkte zelluläre Rezeptoren in Kontakt. Der erste Schritt ist die Bindung des Fiberknöpfchens, einem adenoviralen Strukturprotein, welches für das Attachment verantwortlich ist, an den erst 1997 von Bergelson und Finberg charakterisierten zellulären Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor „CAR“ (Bergelson *et al.* 1997). CAR ist ein Mitglied der Immunglobulin Superfamilie, dessen physiologische Funktion bisher unbekannt ist. Nach diesem ersten Schritt, dem „Attachment“, tritt das Adenovirus mit einem weiteren Zellulären Rezeptor in Kontakt. Dabei bindet das Pentonbasisprotein über eine definierte Arginin-Glycine-Asparagin-Sequenz (RGD) an ein gleiches Sequenzmotiv, das in einer Reihe von zellulären Integrinrezeptoren vorkommt (Zanetti *et al.* 1994, Nemerow 1999). Diese Bindung gewährleistet die *Internalisation* des Virus in das Innere der Zelle. In der Zelle wird das Virus dann in Clathrinbedeckte Vesikel eingeschleust und bei einem sauren pH-Gradienten über die Zusammenarbeit mit Mikrotubuli zum Nukleus dirigiert. Das Capsid wandert dann durch die Kernporen wobei es in die nukleare Importmaschinerie eintritt. Dabei sind verschiedene Proteine, darunter das Importin- α und das hsp70 beteiligt. Das Virus verliert dabei seine Capsidhülle und die DNA wandert in den Nukleus, wo es den zellulären Proteinsyntheseapparat zur Transkription seiner eigenen virus-spezifischen Gene ausnützt (Nemerow 2000).

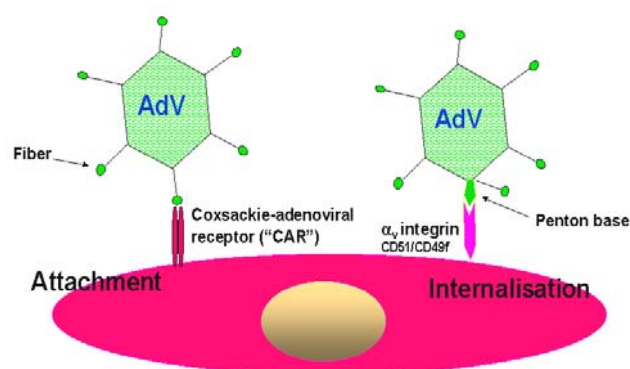


Abbildung 8: Die Bindung des Adenovirus an zwei verschiedene zelluläre Rezeptoren lösen das Infektionsgeschehen aus. Zunächst bindet das Fiberknöpfchen an den Coxsackie und Adenorezeptor auf der Wirtszelle und die Internalisation des Virus ins Zytoplasma der Zelle wird über α_5 Integrinrezeptoren vermittelt. (nach Nemerow 2000, verändert)

Adenovirale Immunevasions- Mechanismen

Wie bei den meisten anderen Viren auch, gliedert sich das virale Genom in sogenannte frühe und späte Genabschnitte, die gemäß des Generationswechsels des Virus in unterschiedlicher zeitlicher Reihenfolge transkribiert werden. Interessanterweise erfolgt die Transkription der viralen DNA nicht colinear, sondern nach dem Prinzip des Spleißens, das normalerweise nur bei Eukaryonten bekannt ist. Dabei wird nach der Transkription einer großen Vorläufer mRNA, kleinere Transkriptionseinheiten herausgeschnitten, die dann zu reifen translatierbaren Abschnitten zusammengesetzt werden, die für mehrere kleine Proteine kodieren. Tatsächlich wurde dieser Prozeß erstmals bei Adenoviren entdeckt, bevor er als regulatorischer Prozeß proteinkodierender Gene bei Eukaryonten akzeptiert wurde (Berget *et al.* 1977, Chow *et al.* 1977, Sharp P.A., 1994). Die frühen Gene, die E-Gene von denen es bei AdV vier unterschiedliche Regionen gibt, sind für die Replikation und für die Wechselwirkungen mit der Wirtszelle verantwortlich, während die sogenannten späten Gene ausnahmslos Strukturproteine kodieren, die für den Aufbau des Capsides und der Fiberdomänen verantwortlich sind.

Unter den frühen Genen sind besonders die E1 und E3-Regionen verantwortlich für die Kodierung bestimmter Proteine, die manipulierend in den Zellzyklus eingreifen, Zytokine nicht wirken lassen, zur Latenz des Virus beitragen und es außerdem dem Virus ermöglichen einer Erkennung durch CD8⁺-T-Lymphozyten zu entgehen. (Modrow *et al.* 1999)

Das E1-B Gen kodiert für ein Protein, 55K das an das zelluläre p53 bindet und damit diesen Transkriptionsfaktor ausschaltet. Das p53 ist ein Kontrollmolekül, das der Zelle Stresssignale übermittelt und sie dadurch zur Einleitung von Apoptose veranlaßt. Das E1A Protein blockiert die Wirkung von Interferon- γ , indem es den Signaltransduktionsweg inhibiert (Leonard *et al.* 1997). Das glykosylierte 19 kD-Protein vermindert die Expression von MHC-Klasse I-Proteinen auf der Zelloberfläche infizierter Zellen, indem es deren korrekte Glykolylierung im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat verhindert. Dadurch wird ein Präsentieren viraler Antigene über die MHC Klasse-I Route an CD8⁺-T-Zellen verhindert, wodurch es zu keiner spezifischen Zytotoxizität kommen kann. Ein weiteres Protein der E3-Gruppe, das 15kD, desensibilisiert die infizierten Zellen gegenüber einer durch TNF- α vermittelten Lyse. Ein weiteres E3-Polypeptid bindet sich in einem autokrinen Mechanismus an den EGF Rezeptor, welches der Zelle das Signal zur Proliferation vermittelt und damit die Vermehrung des Virus gewährleistet.

Immunreaktionen gegen Adenovirus

Bisher ist wenig bekannt über die Immunreaktionen gegen Adenovirus. Nach einer erfolgten Infektion, lassen sich neutralisierende Antikörper gegen AdV detektieren. Aufgrund der Tatsache, daß es bei Immunsupprimierten Patienten zu einer Reaktivierung des Virus kommt liegt die Vermutung nahe, daß es T-Zell spezifische Reaktionen gegen AdV geben muß. Und darauf gibt es mehrere Hinweise:

Yang konnte bereits 1995 zeigen, daß humorale Reaktionen nicht zur vollständigen Beseitigung einer adenoviralen Infektion in Mäusen führte und das eine ZTL-Antwort nötig ist um die Infektion zu beseitigen (Yang *et al.* 1995). Klinische Studien haben gezeigt, daß fatale und unkontrollierbare AdV-Infektionen nur dann auftreten, wenn Defekte in der T-Zellvermittelnden Immunität auftraten, bei gleichzeitig gut funktionierender B-Zellimmunität (Zahradnik *et al.* 1980, Shields *et al.* 1985; Koneru *et al.* 1987). Durch Donor Lymphozyten Infusion bei einem KMT-Patienten konnte eine lebensbedrohliche AdV-Infektion geheilt werden und den Patienten retten (Hromas *et al.* 1994). Darüberhinaus haben Kook *et al.* veröffentlicht, daß humane NK-Zellen nicht in der Lage sind, Ad2- oder Ad5 infizierte humane Zellen zu lysieren. Daraus läßt sich folgern, daß NK-Zellen keine schützende Immunität gegen AdV vermitteln können. Souberbielle und Russell haben herausgefunden, daß spezifische Antworten gegen AdV *in vitro* besonders gegen die späten Proteine des Virus gerichtet werden (Souberbielle *et al.* 1995) und Molinier-Frenkel *et al.* konnten demonstrieren, daß Capsidkomponenten von transferierten therapeutisch eingesetzten adenoviralen Vektoren von AdV-spezifischen ZTL *in vivo* erkannt wurden (Molinier-Frenkel *et al.* 2000)

Ziele der Arbeit

Im einleitenden Teil dieser Arbeit wurde erläutert, welche immunologischen Komponenten für eine gesunde virus-spezifische Immunität verantwortlich sind und welche Auswirkungen schwere maligne Erkrankung, sowie die allogene HSCT als Therapiewahl für die körpereigene Immunität haben. Um *in vitro* immunologische Funktionen zu modellieren, sind wir heute in der Lage, die körpereigenen Immunzellen zu isolieren und *in vitro* für therapeutische Anwendungen zu manipulieren.

Die Zielsetzung für die hier vorliegende Arbeit ist die *in vitro* Generierung virus-spezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten, die in der Lage sein sollen *in vivo* die Restauration einer fehlenden bzw. gestörten virus-spezifischen Immunität bei immunsupprimierten Patienten zu unterstützen.

Dazu wurden T-Zellen *in vitro* mit Virus-infizierten antigenpräsentierenden Zellen stimuliert und zu antiviralen zytotoxischen T-Zelllinien expandiert.

Die dabei gewählten antigenpräsentierenden Zellen waren zum einen dendritische Zellen, die für die Stimulation von AdV-spezifischen ZTL-Linien verwendet wurden, und zum anderen B-LCL, die mit Adenovirus infiziert wurden um simultan AdV- und EBV-spezifische ZTL-Linien zu generieren.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten nicht nur die Effektorfunktionen der virus-spezifischen ZTL, sondern auch die Funktionen der DCs und LCL als APCs analysiert werden. Hierbei war von besonderem Interesse inwieweit die Kulturbedingungen und schließlich die verwendeten Viren Einfluß auf die stimulatorischen Fähigkeiten dieser Zellen hatten.

MATERIAL UND METHODEN

I. GERÄTE

Gerät	Firma
Inkubationsschrank für die Zellkultur	<u>Heraeus</u>
Sterile Werkbank (Laminar Airflow)	<u>Heraeus</u>
Wasserbad	Grant
Mikroskop Axiovert	Zeiss
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
Durchflußzytometer FACS Calibur	Becton Dickinson
Bestrahlungsanlage (Gamma Cell)	
TOPCounter	Packard Dreieich
Cell Harvester	Packard Dreieich
Zentrifuge	<u>Heraeus</u>
Kühlschränke	Liebherr
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr
Gefrierschrank (-80°C)	New Brunswick
Stickstofftank für die Langzeitlagerung (-196°C)	Messer- Griesheim
Vortexer M25 Minishaker	IKA
Eismaschine	Ziegra
Neubauer Zählkammer	Brand
Mikropipetten : 0,5-2µl, 2-20µl, 20-200µl, 100-1000µl	Eppendorf
Variopette (Stepper)	Eppendorf
Multipette 4780	Eppendorf
Pipettierhilfe	IBS Integra Bioscience
SuperMACS- Magnetischer Seperator	Miltenyi

II . VERBRAUCHSMATERIALIEN

Einweg-Pipetten: 2ml, 5ml, 10ml, 25ml	Peske OHG
Sterile Einweg- Pasteurpipetten (Pastetten) 2ml	Peske OHG
Zellkulturflaschen: 25ml, 75ml, 150ml	Peske OHG
Zellkulturplatten, (24 Well und 6 Well)	Peske OHG
96 Well- Rund-und Flachbodenplatten	Peske OHG
96 Well- Spitzbodenplatten	Nunc
Sterile Serumfläschchen (60ml)	Nalgene
Pipettenspitzen (2-10µl, 10-200µl, 100-1000µl)	Peske OHG
96 Well-Unifilter Platten	Packard
96 Well-Luma-Platten	Packard
Kryoröhrchen	Nunc
Zentrifugenröhrchen (15ml und 50ml)	<u>Peske OHG</u>
Zentrifugenröhrchen aus Polystyrol (15ml)	Peske OHG
MACS-Säulen (VS/LS)	Miltenyi
FACS-Röhrchen	<u>Peske OHG</u>
Reaktionsgefäße (0,5ml, 1,5ml, 2ml)	Eppendorf

III. ZELLKULTURMEDIEN UND REAGENZIEN

RPMI 1640	ohne L-Glutamin, mit 2.0 g/L NaHCO ₃ steril filtriert (Cellconcepts, Umkirch).
X-Vivo-15	Serumfreies Medium (BioWhittaker, Maryland, USA)
OptiMEM	Serumfreies Medium (GIBCO-BRL, Karlsruhe)
PBS	Phosphate-buffered saline, ohne Calcium oder Magnesium, steril filtriert (Cellconcepts, Umkirch)
MACS buffer	PBS + 2mM EDTA + 0,2% BSA
BSA	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin) (Sigma chemicals, Deisenhofen)

IV. ZUSÄTZE VON ZELLKULTURMEDIEN

Penicillin-Streptomycin	1000 IU/ml (GIBCO-Life Technologies, Karlsruhe)
L-Glutamin	200 nM (100x) (GIBCO- Life Technologies, Karlsruhe)

V. SEREN

FCS	Fetal calf serum (Sigma, Deisenhofen)
Humanserum	(PAN Systems)

VI. ZYTOKINE

GM-CSF	Granulozyte-macrophage-colony-stimulating-factor, „Leukomax“ (Essex Pharma GmbH, München)
IL-4	Interleukin -4 (Hölzel Diagnostika, Köln).
IL-2	Interleukin -2 (Promocell, Heidelberg)
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha (Hölzel Diagnostika, Köln,)
FLT3-L	FLT3-Ligand (Promocell, Heidelberg)
IL-1 β	PAN Systems

VII. CHEMIKALIEN

Ficoll-Hypaque	spezifische Dichte = 1.078 g/ml, (Biocoll, Biochrom, Berlin)
Trypan Blue Solution	0.4 % (Sigma chemicals, Deisenhofen).
Versene	Gibco (Life Technologies Karlsruhe)
³ H-Thymidine	Amersham (Life Science, Buckinghamshire, UK).
Cr-51(Chromium)	NaCr-51, 185 mBq, (NEN Life Science, Niederlande).
DMSO	Dimethyl sulfoxide (Sigma, Deisenhofen).
Heparin	25000 IE (Essex Pharma)
TT	Tetanustoxin Fragment C (Chiron Behring GmbH, Marburg)
Triton X-100	5 % (Sigma, Deisenhofen).
	HEPES Hydroxyethyl-piperazine ethanesulfonic acid (Biochrom, Berlin).
Lipofectamine	(GIBCO-BRL, Life Technologies, Karlsruhe).
EDTA	(Sigma, Deisenhofen).

VIII. ANTIKÖRPER (Maus anti Human)

a) Antikörper zur Charakterisierung von T-Lymphozyten

Antikörper-Klon	Spezifität	Markierung	Firma/Herkunft
UCHT1	CD3	FITC, PE	DAKO
BF5	CD4	PE	Diaclone (Hölzel Diagnostika)
DK25	CD8	PE	Diaclone (Hölzel Diagnostika)
MOC-1	CD56	PE	Diaclone (Hölzel Diagnostika)
3G8	CD16	PE	Pharmingen
M-A251	CD25	FITC	DAKO

b) Antikörper zur Charakterisierung von Dendritischen Zellen

Antikörper-Klon	Spezifität	Markierung	Firma/ Herkunft
B-B5	CD1a	FITC	Diaclone (Hölzel Diagnostika)
B-ly6	CD11c	PE	Pharmingen
5C3	CD40	PE, FITC	Pharmingen
L307.4	CD80	PE, FITC	Pharmingen
2331 (FUN-1)	CD86	PE, FITC	Pharmingen
HA-58	CD54	FITC	Pharmingen
HB15e	CD83	PE	Immunotech
G46-2.6	HLA-ABC	PE, FITC	Pharmingen
CR3/43	HLA-DR	PE, FITC	Pharmingen
BA8	CD14	PE	DAKO
HD37	CD19	FITC	DAKO
TRAP1	CD40L	PE	Pharmingen

c) Antikörper gegen Integrinrezeptoren

Antikörper -Klon	Spezifität	Markierung	Firma
13C2	CD51 ($\alpha 5\beta 3$)	PE	Diaclone (Hölzel Diagnostica)
12F1-H6	CD49b($\alpha 2\beta 1$)	PE	Pharmingen
C3II.1	CD49c($\alpha 4\beta 1$)	PE	Pharmingen
IIA1	CD49e($\alpha 5\beta 1$)	PE	Pharmingen
GoH3	CD49f($\alpha 6\beta 1$)	PE	Pharmingen
RmcB	CAR	Pur	großzügiges Geschenk von Robert Finberg (Division of Infectious Disease, Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston Massachusetts)

d) Inhibierende Antikörper

Klon	Spezifität	Firma
13C2	CD51	Diaclone (Hölzel Diagnostika)
W6/32	HLA-ABC	DAKO
CR3/43	HLA-DR	DAKO

Stimulierende Antikörper

Klon	Spezifität	Firma
OKT-3	CD3	Diaclone

Isotypkontrollen und sekundäre Antikörper

Spezifität	Markierung	Firma
IgG [F(ab) ₂]-goat anti mouse	FITC	Diaclone
IgG1 κ -Isotyp	FITC	Pharmingen
IgG1 κ -Isotyp	PE	Pharmingen
IgG2a κ -Isotyp	pur	Dako

IX. ZELLINIEN

Herkunft

L-huCD40L- Mausfibroblasten	Prof. Jacques Banchereau (Baylor Institute for Immunology Research, Dallas, Texas)
Hela-Zellen	ATCC (American Type Culture Collection Rockville USA)
Humane Fibroblasten	Karin Oettrich (Labor Prof. Kolb)
B-95-8	Dr. Marie Roskrow (Labor Prof. M. Brenner)
LCLs	wurden von mir aus dem Blut freiwilliger gesunder Spender der Arbeitsgruppe und aus benachbarten Instituten, sowie von „buffycoats“ (Bayerisches Rotes Kreuz) hergestellt.
HSB2 (NK-sensitive T Zellinie)	Dr. Marie Roskrow (Labor Prof. M. Brenner)

IX. Viren

Subgenus	Virustyp	Menge infektiösen Partikeln/ml (PFU)	an	Bezeichnung	Deletion	Transgen	Herkunft
C	5	$6,3 \times 10^9$		Ad5-CMV-GFP	E1, E3	GFP	Quantum
C	5	$6,3 \times 10^9$		Ad5-CMV-GFP	E1, E3	nein	Quantum
C	5	1×10^{10}		Ad5-Wildtyp	Keine	nein	Q-Biogene
C	2	1×10^{10}		Ad2-Wildtyp	Keine	nein	QBiogene
D	11	5×10^8		Ad11-Wildtyp	keine	nein	American Type Culture Collection (ATCC) Rockville USA

Extraktion von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBL)

Das für diese Arbeit verwendete Blut wurde entweder als Vollblut (50-100 ml), aus der Armvene von gesunden freiwilligen Spendern entnommen oder stammte von käuflich erworbenen leukozytenhaltigen Präparaten („buffy coats“) des Bayerischen Roten Kreuzes. Das Blut wurde mit sterilen Einmalspritzen entnommen, denen 0.1 ml (500 IU) heparin Novo pro 10 ml Blut beigelegt war, um ein Gerinnen des Blutes zu verhindern. Das so behandelte Blut wurde unmittelbar für die entsprechenden Experimente weiterverarbeitet.

Die serologische Überprüfung aller Blutspendeproben zeigten Immunglobuline sowohl gegen AdV als auch gegen EBV. Dies wurde vom Institut für medizinische Mikrobiologie des Max von Pettenkofer Institutes, München bestätigt. Alle folgenden im Zusammenhang mit Zellseparation und Zellkultivierung beschriebenen Vorgänge wurden unter strikt sterilen Bedingungen vorgenommen. Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes wurden mittels Ficoll-Hypaque (spezifische Dichte = 1,078) Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Dabei wurde das Blut zunächst im Verhältnis 1:1 mit Dulbeccos-PBS verdünnt. In 50 ml Zentrifugenröhrchen wurden 20 ml Ficollösung vorgelegt, auf die das verdünnte Blut vorsichtig mit einer 10ml Pipette überschichtet wurde. Nach 20minütigem Zentrifugieren bei 800 g hat sich die mononukleäre Fraktion der Lymphozyten und Monozyten aufgrund ihrer geringeren Dichte deutlich von den Erythrozyten, den Granulozyten abgegrenzt. Während letztere durch das Ficoll-Hypaque hindurch zentrifugiert wurden, bilden die Mononukleären Zellen einen deutlichen Ring, der leicht aus dem Ficoll mit Hilfe einer sterilen Pasteurpipette aufgenommen werden konnte. Diese Zellen wurden dann in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und im Verhältnis 1:1 mit Dulbeccos-PBS gewaschen und 10 Minuten bei 400 g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet nach leichtem Aufschütteln in 50ml Dulbeccos-PBS aufgenommen und ein weiteres Mal 10 Minuten bei 1800 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand wieder abgesaugt, das Pellet kurz aufgeschüttelt und in 10 - 20 ml RPMI-1640 Medium aufgenommen und durch mehrmaliges auf und ab pipettieren sorgfältig durchmischt. Die Zellen wurden anschließend mit einem Hämatozytometer gezählt.

Zählen von Zellen

Die Anzahl lebender Zellen wurde durch Anfärben mit Trypanblau bestimmt. Lebende Zellen nehmen dabei den blauen Farbstoff nicht auf, während sich tote Zellen dunkelblau anfärben. Dazu wurden 10 µl der Zellsuspension 1:10 mit Trypanblau verdünnt. Das Gemisch wurde dann mehrmals durch auf und ab pipettieren gut gemischt und dann vorsichtig 10µl der Suspension in die Zählkammer eines Neubauer-Hämatozytometer gefüllt. Mit Hilfe eines inversen Mikroskops wurde die Anzahl der lebenden, ungefärbten Zellen in den vier Zählquadraten, die in 16 Einzelquadraten unterteilt sind, gezählt. Die Zellkonzentration pro ml und die Gesamtzellzahl pro Probe wurde wie folgt ermittelt:

$$\frac{\text{Gezählte Zellzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{4} \times 1 \times 10^4 = \text{Zellzahl pro ml}$$

$$\text{Zellzahl pro ml} \times \text{Ausgangsvolumen} = \text{Gesamtzellzahl}$$

Kryokonservierung von Zellen

Die Zellen wurden in einem totalen Volumen von $1-2 \times 10^7$ /ml in 1ml Einfriermedium pro Kryoröhrchen eingefroren.

Das Einfriermedium (90 % FCS und 10 % DMSO) und die Kryogefäße wurden vor dem Einfrieren auf schmelzendem Eis gekühlt. Die Zellen wurden in 50- oder 15 ml Zentrifugenröhrchen mittels Zentrifugieren pellettiert, der Überstand abgesaugt, das Pellet aufgeschüttelt und ebenfalls auf schmelzendem Eis gekühlt. Anschließend wurde das kalte Einfriermedium vorsichtig zu den Zellen gegeben, wobei durch leichtes Schütteln des Röhrchens die Zellen möglichst gleichmäßig mit dem Einfriermedium durchmischt wurden.

Aus dieser Zellsuspension, die auch weiterhin auf Eis gekühlt blieb, wurden jeweils 1ml in die zuvor ebenfalls gekühlten und beschrifteten Kryoröhrchen gefüllt. Diese wurden dann sofort in eine Spezial-Einfrierbox überführt, bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ für 24 Stunden gelagert und anschließend zur Langzeitkryokonservierung in Behälter mit flüssigen Stickstoff transferiert.

Auftauen von Zellen

Zum Auftauen von Zellen wurden 6 ml 37 °C warmes RPMI-1640 + 20 % FCS als Auftaumedium verwendet und in 15 ml-Zentrifugenröhrchen vorgelegt.

Die Kryogefäße wurden direkt aus dem Behälter mit flüssigem Stickstoff geholt und sofort für kurze Zeit in einem Wasserbad von 37 °C zum Auftauen gebracht. Dabei ist zu beachten, daß nicht der gesamte Inhalt des Gefäßes auftaut, sondern sich noch ein kleines gefrorenes Klümpchen im Innern des Gefäßes befindet.

Ein ml des Auftaumediums wurde nun vorsichtig mit einer Pasteurpipette in das Kryogefäß pipettiert und dabei auch das letzte Klümpchen zum Auftauen gebracht. Die Zellsuspension wurde dann, mit Hilfe der Pasteurpipette tropfenweise in das 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, das währenddessen kontinuierlich leicht geschüttelt wurde.

Die Zellen wurden dann zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt und dann in einem geeigneten Volumen von komplettem Medium aufgenommen und für weitere Experimente verwendet.

Kultur von adhärennten Zelllinien (L-Zellen-CD40L, Hela –Zellen, humane Fibroblasten)

Die murine Fibroblasten Zelllinie L-CD40L wurde nach bereits beschriebener Methodik aufgetaut und in 6ml kompletten RPMI-1640 Medium aufgenommen und danach in 25 cm² Zellkulturflaschen ausgelegt. Nach 24 h haben sich ca. 60 % aller Zellen auf dem Flaschenboden angeheftet. Nach weiteren 18- 24 h war der gesamte Flaschenboden mit einem zusammenhängenden Zellrasen bedeckt, man nennt dies Konfluenz. Das Passagieren dieser Zellen wurde folgendermaßen durchgeführt. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und 5 ml PBS in die Kulturflasche gegeben. Unter kreisenden Bewegungen wurde das PBS auf den Zellen verteilt um einen Wascheffekt zu erzielen. Danach wurde das PBS abgesaugt und ca. 500 µl Versene zugegeben, ein Trypsinderivat, das die Zell-Zellkontakte lösen soll. Das Versene wurde durch Klopfen und Kreisen der Kulturflaschen gut verteilt und anschließend für 5 Min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden sich ablösende Zellen im Mikroskop kontrolliert. Zum vollständigen Ablösen der Zellen mußten diese vom Flaschenboden abgeklopft werden und in ca. 5- 10 ml CM aufgenommen werden. Diese Zellsuspension wurde dann in 75 cm² Zellkulturflaschen transferriert und mit komplettem RPMI-1640 Medium auf ein Gesamtvolumen von 15 ml aufgefüllt.

Kultur von Dendritischen Zellen (DCs)

PBL wurden in serumfreien RPMI-1640 in einer Konzentration von $2,5 \times 10^6$ pro ml in 6-Well-Platten ausgesät, mit einer Gesamtzellzahl von 5×10^6 Zellen pro Plattenvertiefung. Die Platten wurden dann für zwei Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. In der Zwischenzeit hat sich eine adhärenente Zellfraktion, von einer nicht-adhärenenten Zellfraktion abgesetzt, die vorsichtig mit einer sterilen Pasteurpipette von der adhärenenten Zellschicht heruntergewaschen und für späteren Gebrauch aufgehoben wurde. Dabei mußte beachtet werden, daß das gesamte Kulturmedium mit den nicht-adhärenenten Zellen entfernt wurde. Die adhärenenten Zellen wurden weiter kultiviert unter Zugabe von 2 ml serumfreien Medium (X-VIVO-15), supplementiert mit 2 mM L-Glutamin und Penicillin-Streptomycin (100 U/ml und 100 µg/ml), sowie 800 IU/ml rekombinantem humanes GM-CSF und 500 IU/ml rekombinantem humanes IL-4. Nach sieben Tagen in Kultur wurde frisches rhGM-CSF (800 IU/ml) dem Kulturmedium zugegeben und nach 10-12 Tagen Zellkultur konnten die unreifen DCs geerntet und für weiterführende Experimente verwendet werden.

Reifestimulierung der DCs

Zur Reifestimulierung wurde den 10-12 Tage alten DC-Kulturen 200-500U huTNF-α pro ml zugegeben. Die Zellen wurden dann weitere 48-72 Stunden inkubiert, bevor sie für weitere Experimente verwendet wurden. Wichtig war, daß die Zellen in der Zellkulturplatte verblieben und nicht transferiert wurden.

Phänotypische Analyse von DCs

Zur Charakterisierung von DCs mittels direkter Immunfluoreszenz wurden die folgenden monoklonalen Antikörper verwendet, die entweder mit Fluorescein-isothiocyanate (FITC) oder Phycoerythrin (PE) direktmarkiert waren: CD1a (FITC,-oder PE-konjugiert), CD11c-PE, CD11a –FITC, CD123-PE, CD25-FITC, CD40 (FITC,-oder PE-konjugiert), CD80, CD86, (FITC,-oder PE-konjugiert), CD51-PE, HLA-ABC und HLA-DR (FITC,-oder PE-konjugiert), CD19-FITC, CD83-PE und CD14-PE

Färbung mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern

Das Anfärben der DCs mittels direkter 2-Farben-Immunfluoreszenzmarkierung wurde wie folgt durchgeführt:

- Ernten der Zellen durch sorgfältiges Abpipettieren der Zellen vom Plattenboden unter Zuhilfenahme einer Plastikpastette und transferieren in ein Zentrifugenröhrchen.
- Die Zellen wurden 2 mal mit FACS-Buffer (PBS + 2 % FCS) gewaschen.
- Aufnehmen des Pellets in einer geeigneten Menge von FACS Buffer und verteilen von jeweils 100 µl der Zellsuspension in FACS-Analyse-Teströhrchen (FACS-tubes) pro Färbung
- Zugabe von jeweils 2-3 µl des Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und des Phycoerythrin (PE)-konjugierten monoklonalen Antikörpers (mAb).
- Inkubieren der Teströhrchen im Dunkeln für 15 Minuten bei Raumtemperatur.
- Zugabe von 800 µl FACS-Buffer und zentrifugieren für 5 Min. bei 400 g.
- Verwerfen des Überstandes und erneute Zugabe von 800 µl FACS-Buffer. Zentrifugieren für 5 Min. bei 400 g
- Aufnahme des Pellets in 500 µl FACS-Buffer und Analyse der Oberflächenmarker in der Durchflußzytometrie

Durchflußzytometrische-Analyse

Der Fluoreszenzaktivierte Zellsorter (fluorescence-activated cell sorter = FACS) ist ein Gerät, daß nicht nur Zellen nach Größe und Granularität einordnen kann, sondern auch zählen und gemäß ihrer Oberflächenmarkierung auftrennen und quantifizieren kann. Monoklonale Antikörper gegen verschiedene Oberflächenproteine werden mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt, um bestimmte Zellen in einer gemischten Population detektieren zu können. Das Gemisch der markierten Zellen wird angesaugt und anschließend durch eine Kapillare gedrückt. Dadurch entsteht ein feiner Flüssigkeitsstrahl mit vereinzelt Zellen, die sich in bestimmten Abständen befinden. Dieser Flüssigkeitsstrahl passiert einen Laserstrahl, dabei kommt es an den Zellen zu einer Lichtstreuung und die Farbstoffmoleküle, die über die monoklonalen Antikörper an die Zelle gebunden sind werden zur Fluoreszenz angeregt. Empfindliche Photodetektoren messen sowohl das gestreute als auch das emittierte Licht, wobei ersteres Informationen über Größe und Granularität der Zelle liefert, die Fluoreszenz ermöglicht dagegen Aussagen über die Bindung der monoklonalen Antikörper und damit über die Expression der Oberflächenproteine auf jeder untersuchten Zelle.

Zytospin

Zytospins wurden für immunhistologische Analysen angefertigt. Dabei konnte die Morphologie der Zellen studiert und darüber hinaus die GFP-Fluoreszenz optisch sichtbar gemacht werden.

AdV-infizierte und uninfizierte DCs wurden geerntet, gewaschen, gezählt und in einer Konzentration von $0,5 - 1 \times 10^5$ /ml in PBS aufgenommen. 100 µl dieser Zellsuspension wurden in der Zytospin-Zentrifuge auf, für die Immunhistologie taugliche Objektträger übertragen. Die Zentrifugationsgeschwindigkeit betrug 300 rpm bei 3 Minuten Dauer. Nach dem Zentrifugieren wurden die Objektträger luftgetrocknet und für weitere Experimente im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

Bestimmung der endozytotischen Kapazität von DCs mittels FITC-Dextran

Die Mannoserezeptor vermittelte Endozytose stellt experimentell ein Maß für die Funktionalität von DCs dar.

Aufgrund multipler Kohlenhydratbindungsdomänen des Mannoserezeptors, sind DCs befähigt große Mengen an Glykoproteinen zu binden und zu internalisieren. Im Gegensatz zu Fc-

Rezeptoren, die zusammen mit ihren Liganden degradiert werden, entläßt der Mannoserezeptor seine Liganden bei einem endosomalen pH in endosomale Vesikel und wird dabei selbst wiederverwendet. Daher können eine große Menge von verschiedenen Liganden gebunden und aufgenommen werden, bei einer relativ niedrigen Menge an Rezeptoren.

FITC-konjugiertes Dextran (MW:70000) wurde mit serumfreien Medium zu einer Endkonzentration von 1 mg/ml verdünnt.

DCs wurden in einer Konzentration von 1×10^5 pro Test in 100 μ l X-VIVO 15 eingestellt und mit 100 μ l der FITC-Dextranlösung versetzt. Das Gesamtvolumen betrug dabei 200 μ l und wurde bei 37 °C inkubiert.

Es wurden doppelte Testansätze vorbereitet und bei einer Kinetik von von 30-180 Min. wurden die Zellen aus dem Inkubator entnommen und 2 x mit kaltem PBS gewaschen und in 500 μ l FACS-Buffer aufgenommen und die Menge an aufgenommene FITC-Dextran im FACS Gerät gemessen. Unbehandelte DCs dienten dabei als Negativkontrolle.

Gewinnung von B95-8 –Kulturüberständen

Die seit langem etablierte und gut charakterisierte B95-8 –Murmeltier- Zelllinie, eine stabile EBV-Produktionszell-Linie, war negativ für Mykoplasmen und auch nicht koinfiziert mit anderen latenten Viren außer EBV. Die Zellen wurden in kompletten RPMI 1640 zwischen 9-14 Tagen kultiviert. Die Überstände wurden abpipettiert, zentrifugiert (400g, 30min) und dann durch einen 0.45 μ M Membranporenfilter filtriert, in 1ml Portionen aliquotiert und bei – 80°C direkt eingefroren.

Die Infektiösität der Virusstocks wurde anhand von Verdünnungsreihen an PBL getestet.

Herstellung EBV-transformierter B-Zell-Linien (LCL)

PBL wurden in komplettem RPMI-1640 zu einer Konzentration von 5×10^6 Zellen pro Well in 24-Well Zellkulturplatten ausgesät. Die transformierenden Eigenschaften des EBV-haltigen B-95-8 Überstandes wurden durch limitierende Verdünnungsreihen zwischen 100 und 1000 μl an seronegativen und seropositiven Spendern getestet und eine Menge von 300- 500 μl des Überstandes wurde als ideal erachtet und zu den Zellen gegeben, und wurde dann für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 1 $\mu\text{g/ml}$ Cyclosporine A hinzugegeben. Nach 7 Tagen in Kultur wurden die Zellen mit frischem Medium versorgt und nach ca. vier Wochen waren die Zell-Linien etabliert und konnten in 25 cm^2 Zellkulturflaschen expandiert werden. Nach Expansion in 75 cm^2 Zellkulturflaschen wurden in regelmäßigen Abständen Aliquots der Zellen zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff kryokonserviert.

Infektion von DCs mit dem Adenovirus Typ5

Das E1A/E3-deletierte rekombinante Adenovirus vom Typ 5 (Ad5-CMV-GFP), modifiziert mit dem Green-fluorescence protein (GFP) als Reporter gen wurde von der Firma QBiogene käuflich erworben und für meine in vitro Versuche verwendet. Das gleiche Virus, aber als 0-Vektor (Ad5-CMV-0), ohne das GFP-Reporter gen wurde ebenfalls von der Firma QBiogene erworben und für die Stimulierung von T-Zellen und ZTL-Linien verwendet. Beide Viren wurden mit einem Titer von 6×10^9 infektiöser Partikel pro ml (Pfu/ml) bereitgestellt.

Um die Infektionskapazität des Virus zu testen wurden verschiedene Testreihen angesetzt, bei denen Dendritische Zellen mit einer Konzentration von 1×10^6 pro Test mit verschiedenen MOI (Multiplicity of infection = infektiöser Partikel pro Zelle) und zwei verschiedenen Methoden infiziert wurden:

Anfangen mit einer MOI von $10 \rightarrow 25 \rightarrow 50 \rightarrow 75 \rightarrow 100 \rightarrow 200 \rightarrow 500$, wurden bei der niedrigsten MOI 1×10^7 , dann entsprechend $\rightarrow 2.5 \times 10^7 \rightarrow 5 \times 10^7 \rightarrow 7,5 \times 10^7 \rightarrow 1 \times 10^8 \rightarrow 2 \times 10^8 \rightarrow 5 \times 10^8$ infektiöse Partikel benötigt. Der Virus wurde in der benötigten Menge an infektiösen Partikel mit 100 μ l OptiMEM verdünnt. Die DCs wurden geerntet, gewaschen und mit einer Konzentration von 1×10^6 Zellen in 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 100 μ l OptiMEM-Medium aufgenommen und mit der Virus-OptiMEM-Lösung vermischt und dann für 60 min bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Röhrchen in regelmäßigen Abständen durch Klopfen leicht geschüttelt um einen regelmäßigen Kontakt des Virus mit den Zellen zu ermöglichen. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in 2ml X-VIVO 15 unter Zugabe von 400 U/ml GM-CSF und 200 U/ml TNF- α aufgenommen und in 1 Well einer 24-Well-Platte ausgelegt. Nach 48-72 h wurden die Zellen hinsichtlich der GFP-Expression in der FACS-Analyse untersucht. Nicht infizierte und mit AdV5-CMV-0- infizierte Zellen dienten dabei als Negativkontrollen

Adenovirale Transfektion von DCs mit Lipofectamin

Das Virus wurde in der benötigten Menge an infektiösen Partikel mit 50 μ l OptiMEM in einem 1,5ml Eppendorf -Reaktionsgefäß verdünnt. In einem zweiten 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 1.25 μ g des kationischen Lipids Lipofectamin in 50 μ l OptiMem gelöst.

Anschließend wurden beide Lösungen miteinander vereinigt indem das Lipidgemisch vorsichtig mit einer Eppendorfpipette zu dem Virusgemisch gegeben wurde, um Scherkräfte zu vermeiden. Durch leichtes Klopfen gegen die Wand des Reaktionsgefäßes wurde eine Vermischung beider Lösungen erzielt. Anschließend wurde das Gemisch für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die DCs geerntet, gewaschen und mit einer Konzentration von 1×10^6 Zellen in 100 μ l OptiMEM eingestellt. Nach Ende der 15 minütigen Inkubationszeit wurden die Zellen mit dem Virus-Lipidgemisch vereinigt und für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in 2ml X-VIVO 15 unter Zugabe von 400 U/ml GMCSF und 200 U/ml TNF- α aufgenommen und in ein Well einer 24-Well- Platte transferiert. Nach 48-72 h wurden die Zellen hinsichtlich der GFP-Expression in der FACS-Analyse untersucht.

Transfektion von DCs mit Wildtypviren

Um später in Zytotoxizitätstests kontrollieren zu können, ob ZTL, die gegen das E1/E3-deletierte Virus vom Typ 5 gerichtet wurden auch adenovirale Proteine erkennen können, die von anderen viralen Subtypen stammen, wurden DCs, die als Zielzellen in den Zytotoxizitäts Assays verwendet wurden mit verschiedenen Wildtypviren infiziert. Dazu gehörten WT-Ad5, WT-Ad2 und WT-Ad11.

Alle Viren wurden in der gleichen Weise eingesetzt, wie für das deletierte Ad5-Virus beschrieben.

Bestimmung und Blockieren des CD51-Moleküls auf DCs

CD51 ist der sogenannte Vitronectinrezeptor ($\alpha v\beta 3$) und gehört zu der αv - Integrin-Familie. Integrine sind heterodimere Zelloberflächenproteine, die an Zell-Zell- und Zell-Matrix Wechselwirkungen beteiligt sind. Sie erlauben die Adhäsion zwischen Lymphozyten und antigenpräsentierenden Zellen und delegieren die Wanderung von Lymphozyten und Leukozyten ins Gewebe. Adenoviren nutzen diesen Integrinrezeptor um nach Bindung an einen weiteren zellulären Rezeptor sich in das Innere der Zelle zu internalisieren. Für eine optimale Infektionseffizienz ist daher die Expression von CD51 wichtig. Um den Einfluß von TNF- α auf die CD51 Expression zu testen wurden unreife DCs für 48-72 Stunden mit oder ohne rhTNF- α (100-500 U/ml) kultiviert und anschließend die CD51 Expression in der Durchflußzytometrie Analyse untersucht. Unreife DCs wurden dazu wie bereits beschrieben generiert und dann mit ansteigenden Konzentrationen von rhTNF- α (0, 100, 200, 500 U/ml) in 6 Well Platten für 48-72 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wie gewohnt geerntet und analysiert. Als Positivkontrollen dienten unreife DCs, die ohne TNF- α behandelt waren.

Um zu zeigen, daß CD51 tatsächlich für den Infektionsweg des Adenovirus in die Zelle eine Rolle spielt, wurden Experimente mit neutralisierenden CD51-Antikörpern durchgeführt. Dazu wurden unreife DCs in einer Konzentration von 1×10^6 pro $100 \mu\text{l}$ mit dem unkonjugierten monoklonalen Antikörper gegen CD51 (20 $\mu\text{g/ml}$) für 30 min. bei 37°C inkubiert und dann wie bereits beschrieben mit Ad5-CMV-GFP infiziert. Nicht infizierte DCs dienten als Negativkontrolle, aber nicht mit Antikörper behandelte und mit Ad5-CMV-GFP infizierte DCs als positive Kontrolle.

Detektion der Expression des Coxsackie und Adenovirusrezeptors „CAR“ auf DCs und LCL

Der humane monoklonale Antikörper für CAR, (Klon RmcB) wurde 1:1000 mit PBS verdünnt. Die Zellen (unreife und reife DCs, oder LCLs) wurden geerntet, durch Zentrifugation von ihrem Kulturmedium befreit, 2x mit FACS-Buffer gewaschen, gezählt und auf 2×10^6 /ml eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden 50 μ l in FACS-Röhrchen pipettiert und mit 50 μ l des verdünnten Antikörpers versehen und gut durchmischt. Anschließend wurden die Zellen für 60 Minuten auf Eis inkubiert und dann zwei Mal mit FACS Buffer gewaschen und wiederum in 50 μ l des gleichen Puffers aufgenommen. Die Zellen wurden dann mit einem zweiten Antikörper, dem FITC-konjugierten *goat antimouse* monoklonalen Antikörper IgG [F(ab)₂] inkubiert. Dieser sekundäre Antikörper wurde zuvor 1:200 mit PBS verdünnt und 50 μ l davon zu der Zellsuspension gegeben, die dann für weitere 30 Minuten auf Eis und im Dunkeln inkubiert wurden.

Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen gewaschen und unmittelbar in der FACS-Analyse untersucht. HeLa- Zellen dienten als positive Kontrollen, da diese Zell-Linie große Mengen von „CAR“ auf ihrer Oberfläche exprimieren, humane Fibroblasten dienten als negative Kontrolle, aufgrund der fehlenden Expression des CAR-Rezeptors.

Kokultur von LCLs auf huCD40L-exprimierenden Mausfibroblasten

Die murine Fibroblastenzell-Linie L-CD40L wurde zu 1×10^6 Zellen pro Well in 2 ml in 6 Well Platten ausgelegt. Nach ca. 4-6 Stunden waren die Zellen zu 80-90 % konfluent und wurden dann bei 65 Gy bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen, das unter kreisenden Bewegungen gleichmäßig über dem Zellrasen verteilt und dann abgesaugt wurde. LCLs wurden zu 5×10^5 /ml in komplettem Medium eingestellt und 2ml der Zellsuspension wurden auf den L-CD40L-Monolayer gegeben und für 72h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die so stimulierten LCLs wurden dann mit einer Pastette unter mehrmaligen, aber vorsichtigem auf und abpipettieren von dem Monolayer abgenommen, gewaschen und nachfolgend für weitere Experimente verwendet.

Adenovirale Infektion von LCL

LCL wurden von dem L-CD40L – Monolayer abgenommen und ohne Lipofectamin mit Adenovirus infiziert, da diese Zellen im Gegensatz zu DCs nicht die Fähigkeit besitzen

Makromoleküle zu endozytieren. Dazu wurden die Zellen in 15 ml Rörchen überführt und nach dem Waschen in einem geringen Volumen von max. 100 µl in OptiMEM aufgenommen und mit der entsprechenden Menge an Virus kombiniert. Während der zweistündigen Infektionsdauer wurden die Zellen bei 37 °C inkubiert und alle 10-15 Minuten leicht geschüttelt. Nach der Infektion wurde das Zell-Virusgemisch in 2 ml komplettem Medium aufgenommen und in ein Well einer 24-Well-Platte überführt und für 24- 48 Stunden inkubiert.

Gemischte Lymphozyten Reaktion (MLR = mixed lymphocyte reaction)

Die gemischte Lymphozytenreaktion (MLR= „mixed lymphocyte reaction“) ist ein Experiment, das ursprünglich als Modell für die Transplantatabstoßung entwickelt wurde. Bestrahlte Lymphozyten eines potentiellen Spenders (=Stimulatorzellen) wurde mit unbestrahlten Lymphozyten eines Empfängers (= Responder-T-Zellen) zusammengemischt. Sind Spender und Empfänger in ihren HLA-Antigenen unterschiedlich, dann werden die T-Zellen in der Lymphozytenkultur des Empfängers zur Proliferation angeregt, weil sie gegen diese HLA-Antigene reagieren und entwickeln sich durch die resultierende Zytokinproduktion zu Killerzellen. Die MLR kann daher als Maß für die immunstimulatorische Kapazität von APCs, wie DCs oder LCLs eingesetzt werden. In autologen und allogenen Testsystemen sollte die Kapazität AdV-infizierter DCs und LCLs untersucht werden die Proliferation von T-Zellen zu induzieren. Aus frischem Spenderblut isolierte PBL wurden zur Aufreinigung von T-Zellen verwendet. Dazu wurde das *MACS Pan T Cell Isolation Kit* der Firma Miltenyi Biotec verwendet. Nach der Isolation der PBL über den Ficoll Gradienten wurden die Zellen gewaschen und gezählt. Jeweils 1×10^7 Zellen wurden in 80µl *MACS*-Buffer aufgenommen und mit 20µl des *Hapten-Antibody-Cocktail* (enthält eine Mixtur aus monoklonalen haptenkonjugierten Antikörpern: CD11b, CD19, CD36 und CD56) vermischt und bei 6-12°C in einem Eis-Wassergemisch für 10 Minuten inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen 2 mal mit *MACS*-Buffer gewaschen und anschließend erneut in 80µl *MACS*-Buffer aufgenommen und mit 20µl der *MACS Anti-Hapten Microbeads* (enthält magnetische Teilchen, die an monoklonale anti-Hapten Antikörper gebunden sind) versetzt und gut durchmischt. Die Zellsuspension wurde dann für weitere 15 min bei 6-12°C in dem Eis-Wassergemisch inkubiert. Danach wurden die Zellen 1 mal gewaschen und in einem Volumen von 500µl *MACS*-Buffer aufgenommen.

Zur T-Zell-Depletion wurden mit feiner Stahlwolle (oder Kügelchen) gefüllte LS+/VS+-Säulen an einem Magneten (MidiMACS, VarioMACS oder SuperMACS) befestigt und mit 3

ml *MACS*-Buffer befeuchtet. Anschließend wurde die Zellsuspension auf die Säule gegeben und die durchlaufende Fraktion in einem Röhrchen gesammelt. Alle Nicht T-Zellen blieben aufgrund der Markierung mit den Antikörper-Microbeads in der Säule hängen, während die unmarkierte negative Fraktion hochangereicherte CD3⁺ T-Zellen enthielt. Um eine möglichst hohe Ausbeute an separierten T-Zellen von der Säule zu gewinnen wurde diese noch viermal mit 3 ml *MACS*-Buffer gewaschen.

Die Eluate wurden vereinigt, zentrifugiert, noch einmal mit PBS gewaschen und schließlich in einem entsprechenden Volumen von komplettem Medium aufgenommen, gezählt und für weitere Analyse weiterverwendet. Die Reinheit der T-Zellen wurde durch Markierung mit einem anti-CD3-Antikörper in der FACS-Analyse evaluiert. Für den Ansatz in der MLR wurden die T-Zellen auf 1×10^6 /ml eingestellt und pro 100 μ l in 96-Well-Rundbodenplatten gesät. Die antigenpräsentierenden Stimulatorzellen (DCs oder LCLs) wurden zunächst bestrahlt (30 gy für DCs und 45 gy für LCLs) und in verschiedenen Ratios in dreier Gruppen (Triplicates) zu den T-Zellen gegeben. Aufgrund der individuellen Unterschiede in der Reinheit der verschiedenen DC-Kulturen wurden die DCs immer sehr genau und sorgfältig auf die entsprechende Zellkonzentrationen eingestellt. Dabei wurde zunächst die Quantität der DCs im FACS evaluiert und anschließend nur die großen runden Zellen gezählt, kleine Lymphozyten wurden dabei ignoriert. Da LCLs relativ homogene Zellsuspensionskulturen darstellen war hier das Einstellen auf die jeweilige Zellzahl einfacher. Die Endkonzentration in jedem Well betrug 200 μ l. Jeweils drei Wells wurden mit T-Zellen alleine als negative Kontrolle versehen. Nach 6 Tagen in Kultur wurde 1 μ Ci von Methyl-[³H]Thymidin der Kultur zugegeben und für weitere 18 Stunden inkubiert. Nur sich replizierende T-Zellen können das Methyl-[³H]Thymidin in ihre DNA einbauen. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die [³H]Thymidin –markierten Zellen in den 96-Well-Rundbodenplatten mit Hilfe eines FilterMateTM Cell Harvester auf speziell entwickelte UniFilter-Platten transferiert und die Aufnahme des Thymidins wurde als emittierende β -Strahlung im Liquid-Scintillations-Verfahren mit Hilfe eines Packard Topcounters quantifiziert. Als Maß für die Proliferation wurden counts per minute (CPM) angegeben, welche die Menge des eingebauten Thymidins repräsentieren. Die proliferierenden T-Zellen in der MLR wurden in der FACS –Analyse phänotypisiert, dabei wurden monoklonale Antikörper, die gegen CD3, CD4, CD8 und CD56 gerichtet waren verwendet.

Autologe MLR

Unreife Dendritische Zellen sind in der Lage exogene Antigene aufzunehmen und sie den T-Zellen zu präsentieren. Um diese Fähigkeit der DCs zu testen wurden AdV-infizierte DCs oder nicht infizierte DCs in komplettem Medium resuspendiert, das 20mg/ml rekombinantes tetanus toxoid (TT) Fragment C (Chiron Behring, Marburg) enthielt oder ohne Zusatz war. Nach 24 Stunden wurden die Zellen bestrahlt (30 Gy) und in Triplikaten zu den aufgereinigten T-Zellen (1×10^5 / Well) in verschiedenen Stimulator:T-Zell Ratios in 96-Well Rundbodenplatten gegeben. Nach 5 Tagen in Kultur wurde 1 μ Ci Methyl-[³H]Thymidin der Kultur zugegeben und für weitere 18 Stunden inkubiert. Danach wurde dann wie bereits beschrieben der Einbau des Thymidins in die proliferierenden Zellen quantifiziert.

Immunphänotypisierung der autologen und allogenen T-Zellen

Zur Bestimmung der Oberflächenexpression spezifischer T-Zellmarker wurden die T-Zellen mit verschiedenen Kombinationen von FITC-oder PE-konjugierten monoklonalen Antikörpern inkubiert und anschließend in der FACS-Analyse ausgewertet. Eingesetzt wurden dazu folgende Antikörper: CD3, CD8, CD4, CD56.

Generierung und Expansion von AdV-spezifischen ZTL

AdV-infizierte DCs wurden mit autologen PBL in einem Verhältnis von 1:40 in komplettem Medium kokultiviert. Dazu wurden 2×10^6 PBL mit 5×10^4 AdV+DCs in einem Gesamtvolumen von 2 ml pro Well einer 24-Well-Zellkulturplatten ausgelegt. Nach 9-10 Tagen in Kultur wurden die Zellen geerntet und mit AdV+DCs restimuliert. Dazu wurden 2×10^6 der sich entwickelnden ZTL mit 5×10^5 AdV+DC in einer Ratio von 4:1 in 2 ml komplettem RPMI-1640 subkultiviert. Nach weiteren 7- 8 Tagen (Tag 17) in Kultur wurden die Zellen superexpandiert indem sie mit bestrahlten autologen LCLs in Anwesenheit von IL-2 (20 U/ml) restimuliert wurden. Anschließend wurden sie 3 mal die Woche mit IL-2 gefüttert und alle 7 Tage mit autologen LCLs restimuliert. Die Stimulator:ZTL-Ratio betrug dabei immer 5×10^5 : 2×10^6 . Nach 28 bis 36 Tagen in Kultur wurde jede Zell-Linie auf ihre spezifische Zytotoxizität hin getestet. Dazu diente der Standard-Chrom-Freisetzungstest.

Generierung und Expansion von AdV/EBV-spezifischen ZTL

Bestrahlte (45 Gy) AdV-infizierte LCLs wurden autologen PBL in einem Verhältnis von 1:40 in komplettem Medium kokultiviert. Dazu wurden 2×10^6 PBL mit 5×10^4 AdV+LCLs in einem Gesamtvolumen von 2 ml pro Well einer 24-Well-Zellkulturplatten ausgelegt. Nach 9-10 Tagen in Kultur wurden die Zellen geerntet und mit AdV+LCLs restimuliert. Dabei wurden 2×10^6 der sich entwickelnden ZTL mit 5×10^5 AdV+LCLs in einer Ratio von 4:1 in 2ml komplettem RPMI-1640 subkultiviert. Nach weiteren 7-8 Tagen wurden die ZTL erneut mit bestrahlten AdV+LCLs restimuliert unter Zugabe von IL-2 (20 U/ml). Anschließend wurden sie ebenfalls 3 mal die Woche mit IL-2 gefüttert.

Nach 22-23 Tagen in Kultur wurden die Zellen superexpandiert indem sie entweder mit bestrahlten autologen LCLs oder um eine verstärkte Expansion der Zelllinien zu erreichen mit allogenen bestrahlten (30 Gy) PBL und 50 ng/ml OKT3 restimuliert wurden. Die Stimulator:ZTL-Ratio betrug dabei immer $5 \times 10^5:2 \times 10^6$. Nach 42 - 50 Tagen wurde jede Zell-Linie auf ihre spezifische Zytotoxizität hin getestet.

Vorbereitung der Zielzellen für den Zytotoxizitäts-Assay

Autologe Dendritische Zellen wurden aus frischem Blut oder von eingefrorenen PBL von „buffycoats“ 14 Tage vor der Durchführung des Assays wie beschrieben generiert.

Dabei mußten die Mengen so kalkuliert werden, daß folgende Zielzellen hergestellt werden konnten:

- Nicht infizierte autologe dendritische Zellen
- Autologe, mit Ad5-CMV-0 oder GFP, oder mit den Wildtypviren (Ad5, Ad2 oder Ad11) infizierte dendritische Zellen
- allogene dendritische Zellen von HLA-nicht identischen Spendern oder von „buffycoats“ mit der Annahme nicht übereinstimmender HLA-Typen
- autologe LCL
- allogene LCL
- NK-sensitive T-Zell-Linie HSB2 (weist Mutationen in den MHC-Klasse-I Genen auf)

Standard Chromfreisetzungstest („chromium-51 release assays“) oder Test zur Überprüfung der spezifischen Zell-vermittelnden Zytotoxizität

Die ZTL wurden geerntet und in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen /ml in komplettem RPMI aufgenommen. 96 Well Spitzbodenplatten wurden von Reihe B bis D mit jeweils 100µl komplettem RPMI pro Well gefüllt. In die oberste Reihe A, wurden 200 µl der ZTL-Suspension gefüllt. Mit Hilfe einer 12-Kanal Multipette wurden dann jeweils 100 µl, angefangen bei Reihe A in die jeweils tiefer liegende Reihe pipettiert. Bei jedem Transferschritt wurden dann Zellsuspension und Medium sorgfältig durch zahlreiches Auf- und Abpipettieren durchmischt um eine gleichmäßige Verteilung zu erreichen. Bei Reihe D schließlich wurden 100 µl verworfen, da hier die Verdünnungskaskade beendet wurde. Die Reihen E und F waren für die HLA-Inhibitionsexperimente vorgesehen. In Reihe G wurden 100µl Medium und später die Chrom markierten Zielzellen für die Ermittlung der spontanen Chromfreisetzung gegeben und in Reihe H wurde schließlich das Detergenz Triton-X zugegeben, um die maximalen Freisetzung des gespeicherten Chroms zu bestimmen.

Die Zielzellen wurden geerntet, abzentrifugiert und in 50 µl komplettem RPMI resuspendiert und je nach Kalibrierungsdatum mit 30- 60 µl der verdünnten Natriumchromatlösung (^{51}Cr -Isotop; 0,1 mCi am Kalibrationstag) für 60 Minuten bei 37°C im Inkubator inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit 5 ml komplettem RPMI gewaschen und schließlich in 1ml komplettem RPMI aufgenommen, gezählt und auf 2×10^4 /ml eingestellt. Die

so eingestellten Zielzellen wurden dann zu den wie oben beschriebenen ZTL gegeben, wobei pro ZTL zu Zielzell Ratios Dreier Ansätze gewählt wurden. Anschließend wurde dieser Testansatz für vier Stunden bei 37°C inkubiert. Das während dieser Zeit an das Medium abgegebene Chrom kann als ein direktes Maß für die Lyse durch die Effektorzellen bzw. für die spontane Radioaktivitätsabgabe einer jeden Zielzelle gewertet werden.

Abbildung 1 gibt einen schematischen Überblick über die experimentelle Anordnung der ZTL und ihren Zielzellen in der Platte

	1 Target 1	2 Target 1	3 Target 1	4 Target 2	5 Target 2	6 Target 2	7 Target 3	8 Target 3	9 Target 3	10 Target 4	11 Target 4	12 Target 4
A	40:1	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
B	20:1	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
C	10:1	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
D	5:1	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
E	HLA-I Block	→	→									
F	HLA-II- Block	→	→									
G	Spontan Lyse	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
H	Maxima l Lyse	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→

Abbildung 1: Schematische Anordnung einer 96-Well-Spitzbodenplatte wie sie für die Chromfreisetzungsexperimente verwendet wurde.

Messung der spezifischen Zytotoxizität

Nach der 4stündigen Inkubationszeit wurden 50 µl des Kulturüberstandes aus jedem Well der Testplatte in die Vertiefungen einer 96 Well Luma-Platte transferiert. Die Lumaplatte ist eine spezielle, für die Messung von Chrom entwickelte Mikrotiterplatte, die mit einer festen Scintillationssubstanz gefüllt ist, die es dann erlaubt, die resultierende Gamma Strahlung im TOP-Counter zu messen. Auch hier wird die Radioaktivität für die Dauer einer Minute gemessen (CPM=Counts per minute). Als Spontanwert diente die Chromabgabe jeder Zielzelle ohne die Zugabe von ZTL (Reihe G, Abbildung) und als Maximalwert diente die Chromabgabe, die durch Triton-X- Behandlung der Zielzellen bewirkt wurde (Reihe H, Abbildung). Aus den experimentell erzielten ⁵¹Cr-Freisetzungswerten, den spontanen und maximalen ⁵¹Cr-Freisetzungswerten läßt sich nach folgender Formel der Prozentsatz der spezifischen Lyse ermitteln:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{\text{Experimentelle } ^{51}\text{Cr-Freisetzung (CPM)} - \text{Spontane } ^{51}\text{Cr-Freisetzung (CPM)}}{\text{Maximale } ^{51}\text{Cr-Freisetzung (CPM)} - \text{Spontane } ^{51}\text{Cr-Freisetzung (CPM)}}$$

MHC-Inhibitions- Assay

Um zu bestimmen ob die spezifische Zytotoxizität der T-Zellen MHC Klasse-1 oder MHC-Klasse-2 restringiert ist, wurden die autologen AdV-infizierten DCs und die autologen LCLs 30 Minuten vor Zugabe der ZTL mit 20 µg/ml der jeweiligen monoklonalen Antikörpern gegen Klasse I und Klasse II inkubiert. Dabei bindet der monoklonale Antikörper W6/32 (DAKO) an monomorphe HLA-ABC- Determinanten und inhibiert dabei deren Erkennung und der monoklonale Antikörper CR3/43 (DAKO) bindet an HLA-DR, DP und DQ und verhindert damit HLA-II restringierte Erkennung.

Immunophänotypisierung der ZTL mittels direkter Immunfluoreszenz

Zur Bestimmung der Oberflächenexpression spezifischer T-Zellmarker wurden die ZTL mit verschiedenen Kombinationen von FITC-oder PE-konjugierten monoklonalen Antikörpern inkubiert und anschließend in der FACS-Analyse ausgewertet. Eingesetzt wurden dazu folgende Antikörper: CD3, CD8, CD4, CD56, CD16, CD25, TCR $\gamma\delta$, TCR $\alpha\beta$, CD2.

Statistische Auswertung der beobachteten Ergebnisse

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden mindestens drei mal aber in den meisten Fällen bis zu 10 mal durchgeführt um eine möglichst genaue Datenerfassung mit geringstmöglicher Fehlerabweichung zu erlangen. Experimente die nur drei Mal durchgeführt wurden waren solche mit geringer Erwartung von Abweichungen innerhalb der Ergebnisse oder solche bei denen nur begrenztes Material vorhanden war, wie zum Beispiel beim Testen der Kreuzreaktivität , wo mir nur eine begrenzte Menge an Wildtypviren zur Verfügung stand.

1. Berechnung der arithmetischen Mittelwerte

Das arithmetische Mittel \bar{x} ist die Summe aller Beobachtungen geteilt durch die Anzahl dieser Beobachtungen und dient zur repräsentativ-nivellierenden Informationsverdichtung für mehrere bis zahlreiche nicht zu heterogene Daten.

$$\bar{x} = \frac{1}{n}(x_1 + x_2 + \dots + x_n) = \frac{\sum X}{n}$$

2. Berechnung der Standardabweichung

Die Standardabweichung s ist gleich der positiven Quadratwurzel aus dem Mittelwert der quadrierten Abweichungen:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}}$$

3. Evaluierung des Signifikanzniveaus und Berechnung der P -Werte

Das Signifikanzniveau von $P \leq 0,05$ wurde festgelegt. Alle Werte, die größer als 0,05 waren wurden als statistisch nicht signifikant gewertet, das heißt die Nullhypothese war abzulehnen.

Berechnung der „Multiplicity of Infection“ (MOI)

Die MOI, oder „Multiplicity of Infection“ ist die Anzahl infektiöser viraler Partikel pro Zelle. Eine MOI von 100 bedeutet demnach, daß 100 virale Partikel eine Zelle infizieren.

Die Berechnung der MOI ergibt sich aus den sogenannten „plaque forming units“, kurz PFU genannt, die den Anteil infektiöser viraler Partikel in einem gegebenen Volumen angibt. Teilt man die PFU durch die Zellzahl, dann ergibt sich die MOI.

$$\text{PFU/ Zellzahl} = \text{MOI}$$

Um auszurechnen, wie viele dieser infektiösen Partikel notwendig sind um bei einer gegebenen MOI eine bestimmte Anzahl von Zellen zu infizieren, muß man demnach die Zellzahl mit MOI multiplizieren:

$$\text{Zellzahl} \times \text{MOI} = \text{PFU}$$

ERGEBNISSE

Teil I:

Die *In vitro*- Generierung AdV-spezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten

Ein Ziel dieser Arbeit war die *in vitro* Generierung Adenovirus-spezifischer zytotoxischer T Zellen, die spezifisch genug sind um einen sicheren und effizienten adoptiven Transfer in immunsupprimierte Patienten zu erlauben. Um dieses Ziel zu erreichen, war die Etablierung hochwertiger Stimulatorzellen der zunächst wichtigste Schritt. Dabei standen zunächst drei Fragestellungen im Vordergrund:

1. Welche Antigen-präsentierenden Zellen (APC) eignen sich am besten für die Stimulation Adenovirus-spezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten?
2. Wie lassen sich diese Zellen isolieren und charakterisieren?
3. Unter welchen Kulturbedingungen kann man ein robustes und zuverlässiges System etablieren, das den Anforderungen der Zielsetzung gewachsen ist?

Unter den APCs sind DCs die leistungsfähigsten, die man kennt und als einzige in der Lage sogar naive CD8+ T Zellen zu stimulieren. Da in vorangegangenen Arbeiten aus der Gruppe von Smith *et al* (1996, 1998) die Verwendung Dendritischer Zellen zur Aktivierung Adenovirus-spezifischer ZTL bereits beschrieben wurde und diese Zellen darüber hinaus in zahlreichen Studien zur Stimulation antigenspezifischer ZTL sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ein breites Anwendungsspektrum bieten wurden auch für diese Arbeit Dendritische Zellen für die Generierung Adenovirus-spezifischer ZTLs gewählt.

Welche Anforderungen mußten an die DCs gestellt werden, um der Zellsetzung gerecht zu werden?

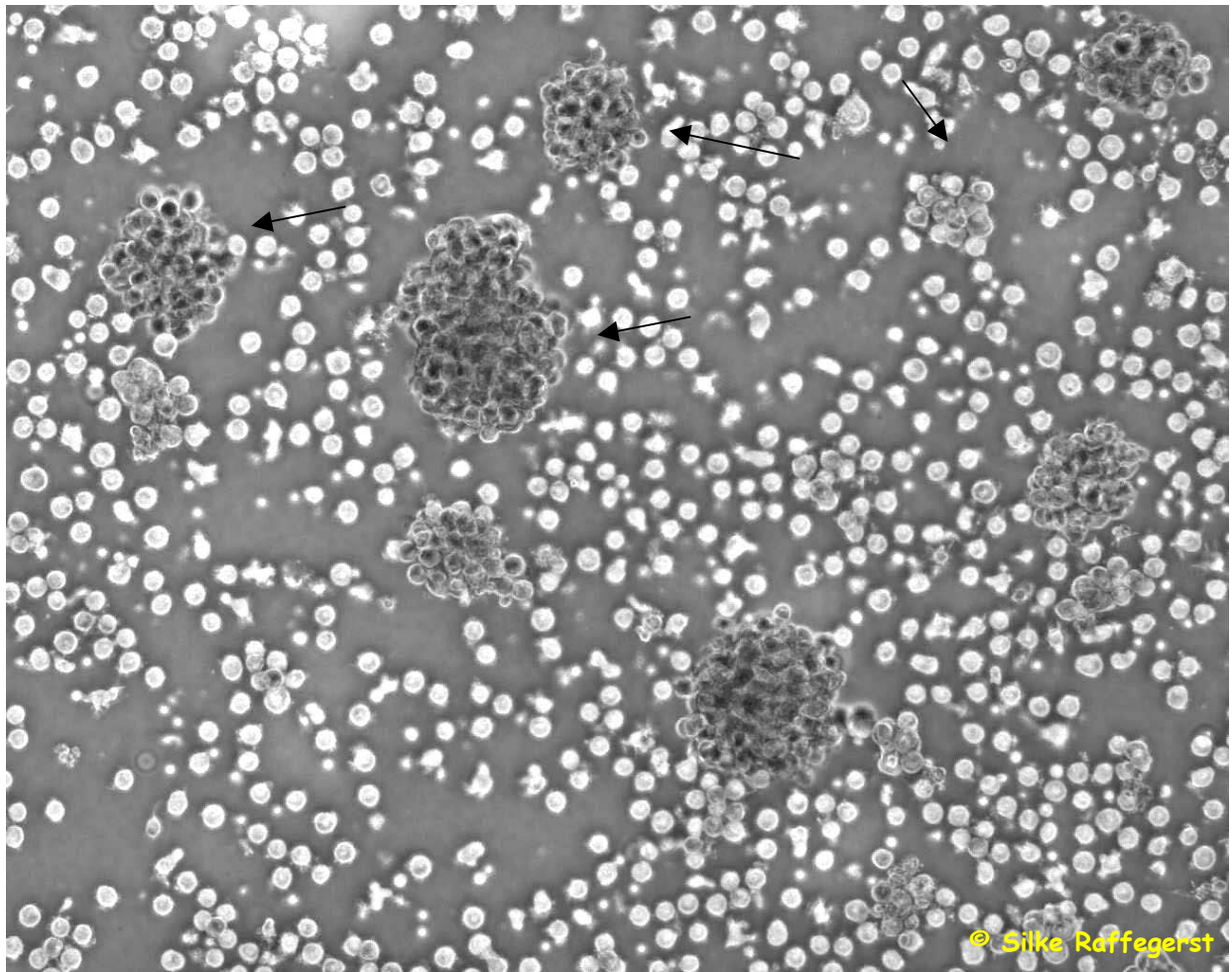
- Für die Selektion Adenovirus-spezifischer zytotoxischer T-Zelllinien aus dem Blut freiwilliger gesunder Spender oder dem begrenzten Material von „buffycoats“ waren mehrere DC-abhängige Stimulationsrunden notwendig. Dabei sollten ausreichende Mengen dieser DCs unter nicht belastenden Bedingungen für den Spender gewonnen werden können, wobei die Kulturbedingungen eingehend überprüft werden mußten.
- Die aus dem Spenderblut isolierten und kultivierten APCs mußten zunächst das für typische Oberflächenprofil aufweisen, das für die Antigenaufnahme wichtig ist und dann später als reife DCs in der Lage sein, die für die T-Zellstimulierung wichtigen Oberflächenmoleküle zu exprimieren. Die generierten DCs mußten demnach funktionelle Analysen zur Überprüfung dieser Eigenschaften bestehen.
- Die DCs mußten effizient mit einem rekombinanten Adenovirus infiziert werden können und als später reife, adenovirale Proteine exprimierende Zellen, die Fähigkeit besitzen immunstimulatorische Fähigkeiten auszubilden.
- Die Adenovirus-infizierten DCs mußten ferner die Kapazität besitzen, spezifische T-Zellantworten hervorzurufen, die alleine gegen autologe Zellen gerichtet sein würden, die adenovirale Proteine exprimieren.

Generierung von DCs unter verschiedenen Kulturbedingungen

Über 80 % der Bevölkerung in Westeuropa und in den USA haben im Verlauf ihrer Kindheit und Jugend eine AdV- und/oder EBV-Infektion erfahren. Von daher war es nicht ungewöhnlich, dass die serologische Überprüfung des gesamten von den Spendern und „buffycoats“ stammende Material sowohl für EBV als auch für AdV positiv war. Da die Reaktivierung und nicht die Neuinfektion latenter Viren die Problematik bei immunsupprimierten Patienten darstellt war es wichtig einen Stimulationsansatz zu entwickeln, der die Selektion AdV-spezifischer Gedächtnis T-Lymphozyten garantieren würde.

Leukozyten wurden aus dem frischen peripheren Blut oder aus „buffy coats“ isoliert und nach der zweistündigen Adhärenzphase in einem komplettem Medium, das mit 1000 U/ml IL-4, 800 U/ml GM-CSF supplementiert war kultiviert. Alle drei Tage wurde die Hälfte des Mediums gegen frisches, IL-4 und GM-CSF- haltiges Medium ausgetauscht, wobei die Endkonzentration von 1000 U/ml IL-4 und 800 U/ml GM-CSF beibehalten wurde. Nach sieben bis acht Tagen konnte bereits lichtmikroskopisch der typische Phänotyp unreifer DCs mit großen granulären Zellkörpern, lobulären Nuclei und feinen zytoplasmatischen Ausläufern detektiert werden. Wie in Abbildung 1 deutlich zu sehen, bilden mehrere DCs kleinere bis größere Cluster auf dem Kulturplattenboden, auf dem sie aber nur leicht anhaften. Man bezeichnet diese Zellen daher als semi-adhären, da sie keinen konfluenten Zellrasen bilden und man sie durch auf- und abpipettieren mit einer Einweg Pasteurpipette leicht von der Platte spülen kann

Abbildung 1: Unreife DCs in einer Kulturplatte: Die Zellen aggregieren und bilden sich zu kleineren und größeren Clustern zusammen (Pfeile)



Die noch unreifen DCs wurden dann nachfolgend mit Hilfe der Durchflußzytometrie durch Anfärben mit spezifischen monoklonalen Antikörpern immunphänotypisch charakterisiert. Sie waren negativ in der Expression des Monozyten und Makrophagenmarkers CD14 und des B-Zell spezifischen Antigens CD19 und zeigten niedrige bis mittlere Expression der Kostimulatorischen und Adhäsionsmoleküle Moleküle CD86, CD40 und CD54 (ICAM-1) sowie geringe bis mittlere Expression der MHC-Moleküle, HLA-ABC und HLA-DR, aber geringe oder gar keine Expression des DC-Markers für reife Zellen CD83. Das Molekül CD1a, wurde in hoher Konzentration auf den unreifen DC exprimiert, ebenso CD11c und das $\alpha 5\beta 3$ -Integrin CD51.

Aufgrund dieses Oberflächenprofils wurden die Zellen als unreif charakterisiert.

Die quantitative Auswertung der Zellpopulationen ergab je nach Spender eine Ausbeute von 25 bis 35 %.

Die Zugabe von TNF- α (200 U/ml) oder IL-1 β (20 ng/ml) in das Kulturmedium bewirkte einen Stimulus der die Zellen zu reifen DCs differenzieren ließ. Diese Zellen veränderten sich phänotypisch durch Vergrößerung des Zellkörpers und das Auswachsen längerer zytoplasmatischer Fortsätze. Außerdem konnte stärkeres Anhaften am Kulturplattenboden bemerkt werden. Wiederholung der Immunphänotypisierung zeigte eine Veränderung des Oberflächenprofils dahingehend, das nun die kostimulatorischen Moleküle CD86 und CD40, die MHC-Moleküle HLA-ABC und HLA-DR, das Adhäsionsmolekül ICAM (CD54), sowie CD83 hochreguliert wurden, während es zu einer deutlichen Verminderung in der Expression der Moleküle CD1a, CD11c sowie dem α 5 β 3-Integrin CD51 kam.

Zusätzlich wurde die Expression von CD51 untersucht, weil Adenoviren mit ihren Pentonbasenproteinen an CD51 binden und damit ihre Internalisation in die Wirtszelle forcieren.

Bei einer zweiten Methode wurde später nach der zweistündigen Adhärenzphase den Zellen serumfreies X-VIVO-15-Medium gegeben, das mit nur 500 U/ml IL-4 und 800 U/ml GM-CSF supplementiert wurde. Die so kultivierten Zellen blieben genau sieben Tage in Kultur und wurden danach ausschließlich mit 800 U/ml GM-CSF gefüttert, ohne das Medium auszutauschen. Die Zugabe von IL-4 war zu diesem Zeitpunkt nicht mehr nötig, da bereits durch die anfängliche Gabe des IL-4 der Weg zur Makrophagendifferenzierung inhibiert und der Weg zur Differenzierung von DCs vorgegeben wurde.

Nach weiteren drei Tagen (Tag +10) konnte schließlich der unreife Phänotyp der Dendritischen Zellen evaluiert werden. Immunphänotypisch konnte allerdings kein Unterschied zwischen den beiden Kulturbedingungen festgestellt werden.

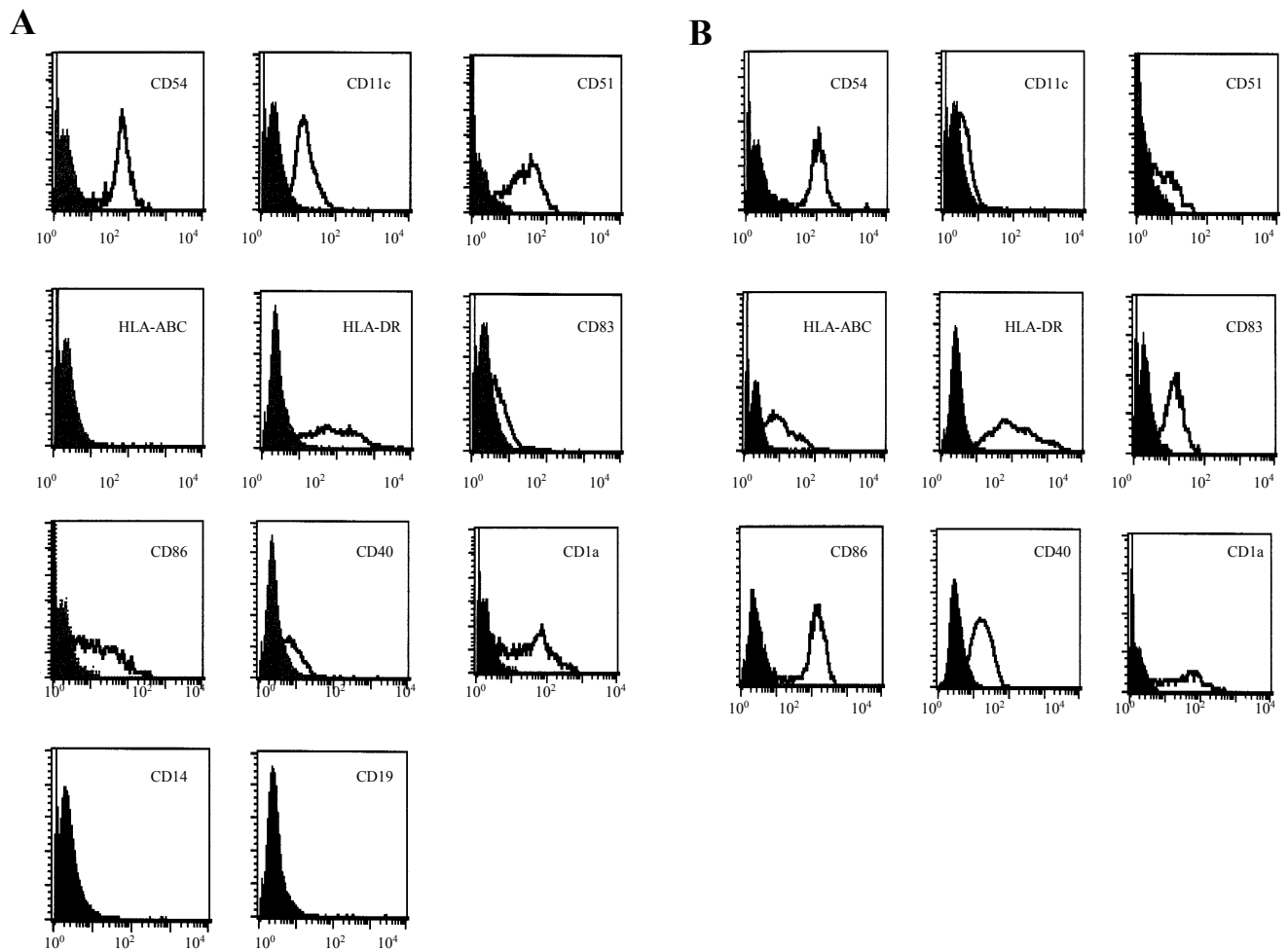
Abbildung 2A) zeigt den klassischen Phänotyp unreifer Dendritischer Zellen unbeachtet ihrer Kulturbedingungen.

Um reife Dendritische Zellen zu differenzieren wurde am Tag 10-12 dem Kulturmedium 200U/ml TNF-alpha zugesetzt und die Zellen für 72 Stunden inkubiert.

Auch hier zeigten sich die gleichen Veränderungen wie bei den in komplettem Medium kultivierten Zellen.

Abbildung 2B) zeigt den charakteristischen Phänotyp reifer Dendritischer Zellen unbeachtet ihrer Kulturbedingungen.

Abbildung 2: Immunphänotypische Analyse von dendritischen Zellen (DC)



A: Expressionsmuster von 11 Oberflächenmarkern, die am Tag 10 (serumfreie Bedingungen oder Tag 6 serumhaltige Kulturbedingungen) auf unreifen DCs exprimiert werden. Der schwarze Bereich des Histogramms zeigt die Isotypkontrolle spezifisch für jeden verwendeten Antikörper
 B: Expressionsmuster von CD54, CD11c, CD51, CD1a, CD86, CD40, CD1a, HLA-ABC und HLA-DR nach Zugabe von $\text{TNF-}\alpha$

In Abbildung 3 wird die prozentuale Verteilung dieser Oberflächenmarker auf unreifen und reifen DCs gezeigt.

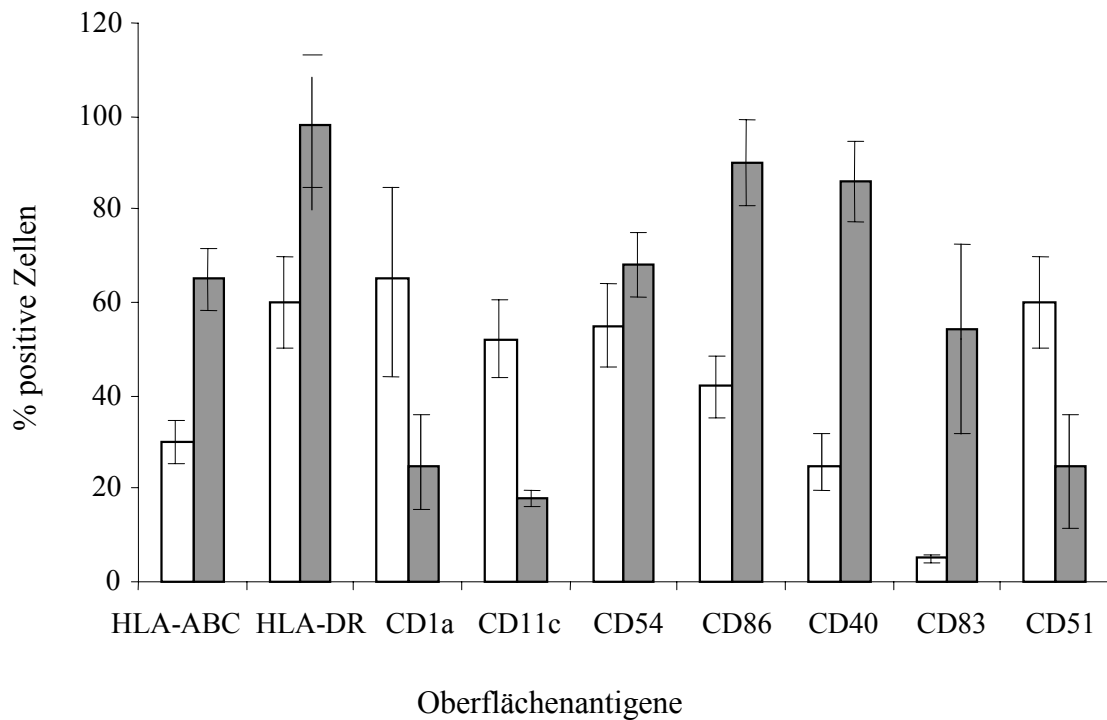


Abbildung 3: Prozentuale Verteilung der Oberflächenmarker auf reifen und unreifen DCs. Die Werte zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen von sechs repräsentativen Experimenten. Die hellen Balken repräsentieren DCs, die in serumfreiem Medium für 10-12 Tage (oder in serumhaltigen Medium für 5-7 Tage) in der Anwesenheit von IL-4 und GM-CSF kultiviert wurden. Die dunkelgrauen Balken zeigen die gleichen Zellen, die aber drei Tage länger unter Zusatz von TNF- α zur Reife stimuliert wurden.

Anhand, der in Abbildung 4 dargestellten Dotplots wird die quantitative Ausbeute der DCs, die unter den jeweiligen Kulturbedingungen erzielt wurden ersichtlich. So lag die quantitative Ausbeute an DC, die unter serumfreien Bedingungen kultiviert wurden je nach Spender (oder „buffy coat“) zwischen 55 bis 75 % deutlich höher im Gegensatz den zu DCs, die unter serumhaltigen Bedingungen kultiviert wurden.

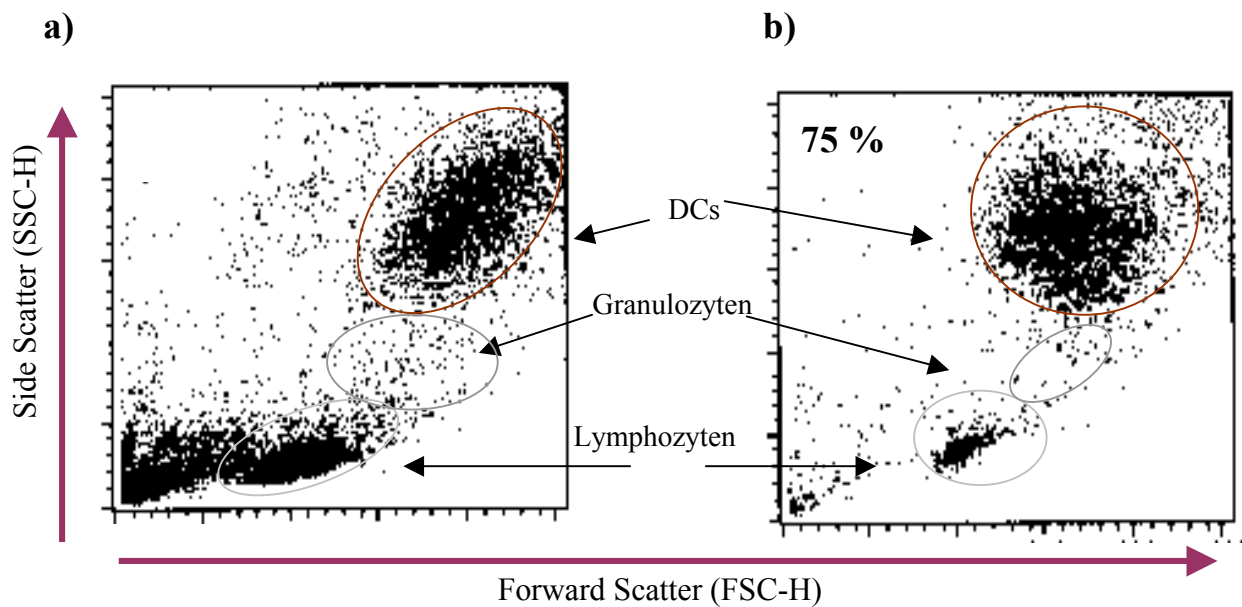


Abbildung 4: Dotplot-Analysen der DC-Kulturen

a) Dotplotanalyse einer in serumhaltigen Medium generierten DC Kultur. Die rechte obere Wolke repräsentiert die DC-Population, die 26% der Gesamt zellpopulation darstellt.

b) Dotplotanalyse einer in serumfreien Medium generierten DC Kultur. Die rechte obere Wolke repräsentiert die DC-Population, die 75% der Gesamtzellpopulation darstellt.

Der Forwards Scatter (FSC-H = Vorwärtsstreuung) gibt die Größe der Zellen an, während der Side Scatter (SSC-H = seitliche Streuung) Aussagen über die Granularität und die Verteilung der Zellen trifft.

Testsysteme zur Überprüfung der Funktionalität von DCs

a) Untersuchung der Aufnahmekapazität von FITC-Dextran über den Mannoserezeptor

Nach Beurteilung des immunologischen Profils und der quantitativen Ausbeute der DCs wurde die Funktionalität dieser Zellen in verschiedenen Testsystemen überprüft. Ein wichtiges Experiment um die natürliche Kapazität der DCs zu testen Makromoleküle über den Mannoserezeptor aufzunehmen, wurden unreife DCs unter beiden Kulturbedingungen über verschiedene Zeiträume mit FITC markiertem Dextran inkubiert. Anschließend wurde dann die Aufnahme des Dextrans anhand der MFI (mittleren Fluoreszenzintensität) in der Durchflußzytometrie ermittelt. Dabei wurde der Anstiegsfaktor der MFI ausgehend von der Eigenfluoreszenz der DCs berechnet. DCs sind große granuläre Zellen von unregelmäßiger Gestalt und unterscheiden sich daher oft in der Ausprägung ihrer Eigenfluoreszenz, sodaß sich zwischen den einzelnen DC-Populationen unterschiedlicher Spender auch unterschiedliche Werte für die Eigenfluoreszenz und damit auch in Bezug auf die tatsächlich gemessenen MFI Werte ergeben. Berechnet man aber den Anstieg der MFI gegenüber dieser Eigenfluoreszenz, lassen sich die Werte vieler Experimente miteinander vergleichen. Ein typisches Beispiel für die Aufnahmekapazität unreifer und reifer DCs ist in Abbildung 5 dargestellt. Dabei hat sich gezeigt, dass die MFI im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bei beiden Gruppen bei 30 Minuten ansteigt, einen Sättigungsgrad erreicht bis schließlich kein Dextran mehr aufgenommen werden kann. Der Anstieg der mittleren Fluoreszenzintensität wurde gegenüber der Eigenfluoreszenz korrigiert.

In Unabhängigkeit von den Kulturbedingungen der unreifen DCs lag die maximale Aufnahmekapazität des FITC-Dextrans bei 120 Minuten und zeigte eine signifikante Abnahme der Aufnahmekapazität bei 180 Minuten. Die gleichen Experimente wurden mit reifen DCs durchgeführt und wie in der Abbildung dargestellt verlief die Kurve, aufgrund der eingeschränkten Aufnahmekapazität reifer DCs deutlich flacher als bei den unreifen Zellen und zeigte auch keinen signifikanten Anstieg oder Abstieg der Aufnahmekapazität. Das typische Antigenaufnahmemuster von unreifen und reifen DCs war bei beiden Gruppen ähnlich und nicht signifikant verschieden.

Unreife Dendritische Zellen verfügen über eine höhere Kapazität über den Mannoserezeptor FITC-konfiguriertes Dextran aufzunehmen als reife DCs. Die blaue Linie zeigt über einen Zeitraum von 30 bis 180 Minuten die Fähigkeit unreifer DCs das Makromolekül FITC-Dextran aufzunehmen. Die graue Linie zeigt reife Dendritische Zellen und deren eingeschränkte Aufnahmekapazität gegenüber FITC-Dextran.

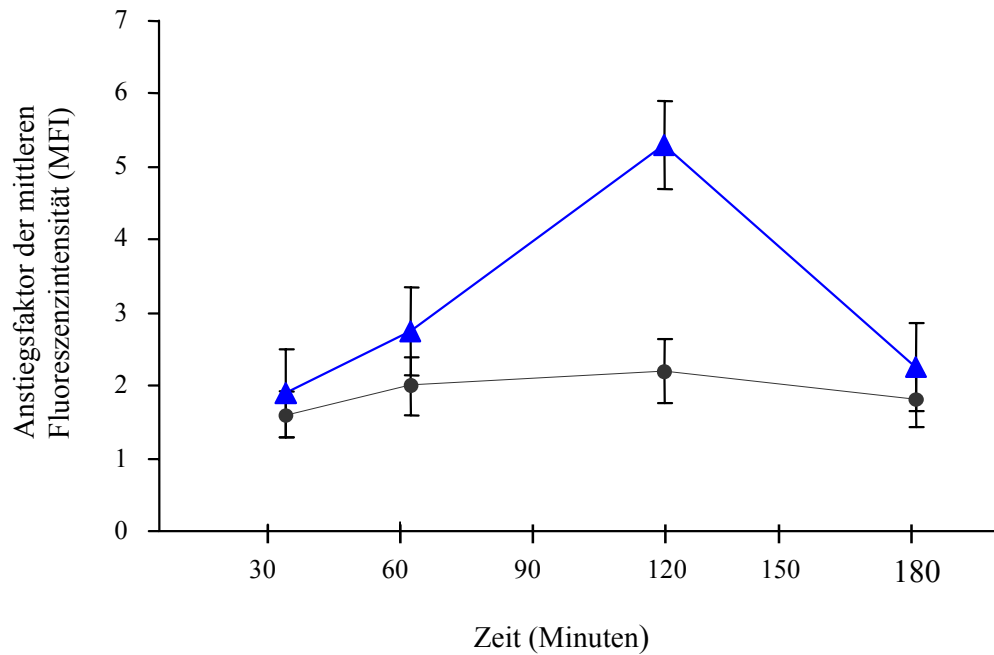


Abbildung 5: Aufnahme durch FITC-Dextran durch unreife DCs im Vergleich zu reifen DCs

b) Aufnahmekapazität des Adenovirus

Unreife DCs, die unter serumfreien bzw. serumhaltigen Bedingungen kultiviert worden waren wurden mit einem rekombinanten, E1- und E3-deletierten Ad5 Adenovirus infiziert, welches das Green Fluorescence Protein (GFP)-Reportergen unter der Kontrolle des unmittelbar frühen CMV-Promotors trägt (Ad5-CMV-GFP). Das Virus wurde in einer Konzentration von 6.3×10^9 infektiöser Partikel pro ml bereitgestellt.

Zur Herstellung der virale Vektorkonstrukte wurde ein Adenovirus vom Typ 5 des Untertypes delta L327 verwendet. Dieses Grundgerüst wurde in der E1-Region, sowie fast vollständig in der E3-Region der frühen viralen Gensegmente deletiert. Die Größe des als Vorlage dienenden Wildtypvirus betrug 35203 bp.

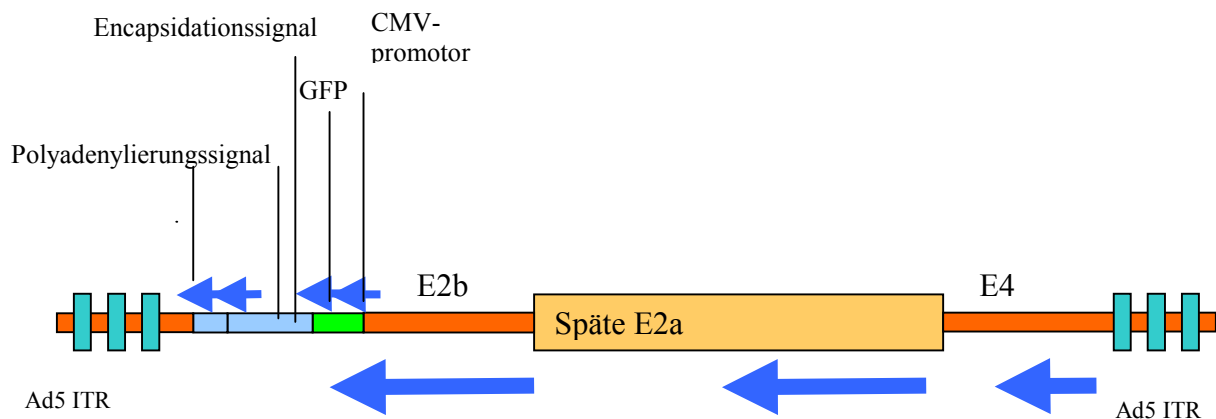


Abbildung 6: Vereinfachte Darstellung des Ad5-CMV-GFP Vektorkonstruktes

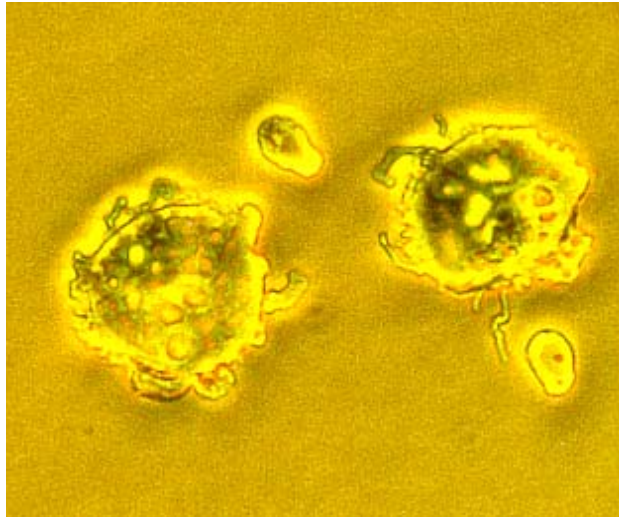
(Fa. Q-Biogene)

ITR = inverted terminal repeats

Die Infektionsexperimente wurden mit verschiedenen Konzentrationen (MOI) des Virus in An- und Abwesenheit des kationischen Lipids Lipofectamine durchgeführt. Aufgrund des starken CMV-Promotors, der dem GFP-Transgen vorgeschaltet ist, kann eine effektive Transkription dieses Gens in erfolgreich transfizierten Zellen erreicht werden. Nur Zellen, die das Virus aufgenommen haben, exprimieren GFP, daher stellt die Expressionsrate des GFP gleichzeitig ein Maß für die Infektionseffizienz des Adenovirus dar, das das Gen trägt. Die Emission des GFP kann bei einer Wellenlänge von 509 nm im Durchflußzytometer gemessen werden und verhält sich ähnlich wie der grüne Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein Isothiocyanate (FITC). Die GFP-Expression kann darüber hinaus am Fluoreszenzmikroskop optisch sichtbar gemacht werden.

Die Abbildung 7 zeigt Zytospins von in serumfreien Medium generierten dendritischen Zellen, die nach der Lipofektion mit Ad5-GFP für 48 Stunden mit TNF- α stimuliert wurden, im Vergleich zu nicht infizierten unreifen DCs.

A



B



Abbildung 7: Immunhistologische Darstellung nicht infizierter unreifer DCs (A) und einer AdV-GFP-transfizierten reifen DC (B)

- A. Mikroskopische Aufnahme eines Zytospin von nativen unreifen DCs bei 40facher Vergrößerung und einer Belichtungszeit von 0,35 Sekunden.
- B. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Zytospin von einer AdV-GFP-transfizierten DC bei 40facher Vergrößerung und einer Belichtungszeit von 240 Sekunden. Die Aufnahme wird zusätzlich optisch vergrößert dargestellt.

Die DCs, die in serumhaltigen Medium generiert worden waren zeigten bei allen getesteten Viruskonzentrationen in Anwesenheit und Abwesenheit des kationischen Lipids eine signifikant schlechtere Infektionskapazität, als DCs, die unter serumfreien Bedingungen kultiviert wurden.

So konnte bei serumfrei generierten DCs bei einer MOI von 50 in Gegenwart des Lipides eine GFP-Expressionsrate von nahezu 100% erreicht werden, während die in serumhaltigen Medium generierten DCs GFP zu nur 30-40% exprimierten.

Ein potentieller Grund für dieses unterschiedliche Infektionsverhalten liegt vermutlich an den Kulturbedingungen. Die im serumhaltigen Medium vorhandenen Proteine und die erhöhte Zytokinkonzentration haben möglicherweise einen inhibitorischen Effekt auf die Infektionskapazität des Virus.

Gleichwohl wurde auch die immunstimulatorische Kapazität der Serumhaltigen DC-Kulturen hinsichtlich ihrer Fähigkeit autologe und allogene T-Zellen zur Proliferation anzuregen, in gemischten Lymphozytenreaktionen (MLR) untersucht. Schließlich konnte zwar nachgewiesen werden, daß in serumhaltigen Medium generierten DCs die Transgenexpression niedriger war, aber es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass trotzdem die Präsentation der adenoviralen Proteine ausreicht um T-Zellen zu stimulieren. Dazu wurden diese DCs zunächst mit AdV transfiziert. Nach Ausreifung unter Zugabe von TNF- α wurden sie dann mit alloogenen oder mit autologen, aufgereinigten T-Zellen für 5 Tage inkubiert. Als Kontrolle dienten nicht infizierte DCs bzw. mit Tetanustoxoid (TT) beladene DCs. Die MLR wurde ursprünglich entwickelt um die Gewebeverträglichkeit bei Transplantationspatienten zu testen. Bestrahlte Lymphozyten eines potentiellen Spenders *S* wurden mit den Lymphozyten eines Empfängers *E* in gleichen Mengenverhältnissen miteinander für mehrere Tage inkubiert. Alloreaktive T-Zellen innerhalb der Lymphozytenpopulation von *E* wurden dann zur Proliferation angeregt, wenn deren T-Zellrezeptoren alle Varianten der fremd HLA-Allele von *S* erkennen. Die Proliferationsrate wird durch radioaktiven Einbau des Tritium markiertem Thymidin in einem β -Counter gemessen. Durch die mittlerweile hochspezialisierten und empfindlichen Methoden für die HLA-Typisierungen, wird dieser Test überwiegend angewendet um die Immunkompetenz von antigenpräsentierenden Zellen, Tumorzellen oder gentechnisch veränderten Zellen *in vitro* zu testen.

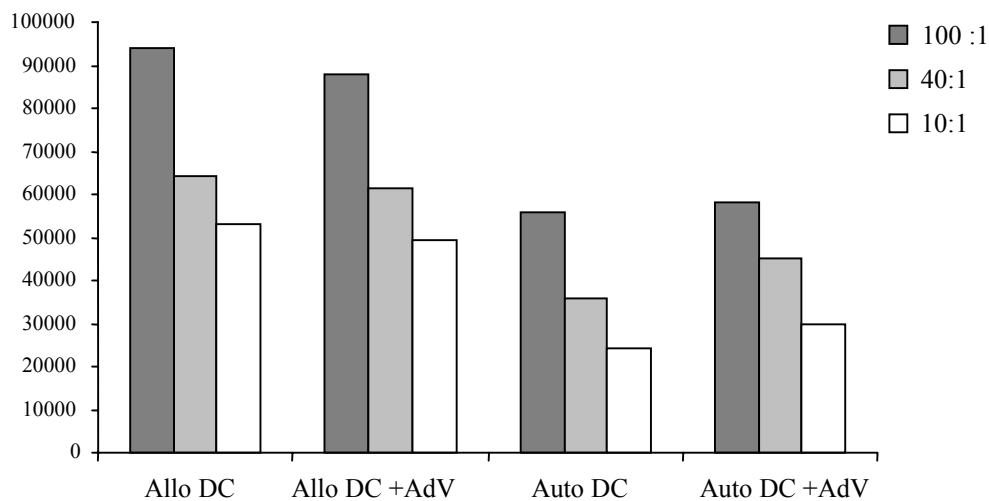


Abbildung 8: Vergleich zwischen der Immunstimulatorischen Kapazität allogener uninfizierter und infizierter in serumhaltigen Medium generierten DCs mit autologen nicht infizierten und infizierten DCs.

Die unterschiedlich gefärbten Balken stellen die unterschiedlichen T:Stimulatorzell-Ratios dar. In diesem Diagramm wird ein repräsentatives Ergebnis dargestellt.

Dabei stellte sich heraus, daß die Zellen in beiden Gruppen (allogen- sowie autolog) die Proliferation von T Zellen anregen konnten, es jedoch innerhalb des autologen Stimulationsansatzes keinen signifikanten Unterschied zwischen der Stimulationskapazität der infizierten, der uninfizierten oder der Tetanustoxoid beladenen dendritischen Zellen zu beobachten war.

Diese wichtige Beobachtung ließ sich vermutlich dadurch erklären, daß die DCs Fremdproteine aus dem serumhaltigen Medium aufnehmen und es über ihre MHC-Moleküle den T-Zellen präsentieren. Daher macht es im Falle der Immunstimulanz keinen Unterschied ob die Zellen noch zusätzlich adenovirale Proteine oder andere Fremdproteine (TT) präsentieren, da der Stimulus durch die FCS-Proteine schon stark genug ist.

Nach Abwägen der Vor- und Nachteile beider Kultursysteme fiel schließlich die Entscheidung eindeutig für die in serumfreien Medium kultivierten DCs und in Tabelle 1 ist ein Vergleich beider Gruppen nochmals zusammengefaßt. Alle weiteren Experimente wurden mit DCs durchgeführt wurden, die in serumfreien Medium generiert wurden und diese Methode ist mittlerweile weitreichend in unserem Laboratorium sowie in anderen Gruppen etabliert.

Tabelle 1: Vergleich des Einflusses der Kulturbedingungen auf die DCs

	Serumfreie DCs	Serumhaltige DCs
Phänotyp (unreif)	CD14 ⁻ , CD1a ⁺ , CD11c ⁺ , CD86 ^{low} , CD40 ^{low} , CD83 ⁻ , CD51 ⁺ , HLA-ABC ^{low} , HLA-DRI ^{low}	CD14 ⁻ , CD1a ⁺ , CD11c ⁺ , CD86 ^{low} , CD40 ^{low} , CD83 ⁻ , CD51 ⁺ , HLA-ABC ^{low} , HLA-DR ^{low}
Phänotyp (reif)	CD14 ⁻ , CD1a ^{low} , CD11c ^{low} , CD86 ^{high} , CD40 ^{high} , CD83 ⁺ , CD51 ^{low} , HLA-ABC ^{high} , HLA-DRI ^{high}	CD14 ⁻ , CD1a ^{low} , CD11c ^{low} , CD86 ^{high} , CD40 ^{high} , CD83 ⁺ , CD51 ^{low} , HLA-ABC ^{high} , HLA-DR ^{high}
Quantität (DCs mit typischer Morphologie)	55-75 %	25-35 %
Funktionalität	Hohe Aufnahmekapazität von Fitc-Dextran über einen Zeitraum von 2 Stunden	Hohe Aufnahmekapazität von Fitc-Dextran über einen Zeitraum von 2 Stunden
Infektionskapazität	Bei MOI von 50 in Anwesenheit von Lipfectamin: >95 % GFP-positive Zellen	Bei MOI von 50 in Anwesenheit von Lipfectamin: 35 % GFP-positive Zellen
Immunstimulatorische Kapazität*	Hohe allostimulatorische und autostimulatorische Kapazität in MLR, dabei signifikanter Unterschied zwischen AdV-infizierten und uninfizierten DCs bzw. TT-beladenen DCs. *)	Hohe allostimulatorische und autostimulatorische Kapazität in MLR, dabei <i>kein</i> signifikanter Unterschied zwischen AdV-infizierten und uninfizierten DCs bzw. TT-beladenen DCs
Arbeitsaufwand	Nach 10 – 12 Tagen unreife DCs	Nach 6-8 Tagen unreife DCs
Zytokinaufwand	Einmalige Gabe von 500U/ml IL-4, dann wöchentliche Gabe von 800U/ml GM-CSF	Dreimalige Zugabe von 1000U/ml IL-4 und 800U/ml GM-CSF und später zwei mal wöchentliche Zugabe von 800U/ml GM-CSF

*) Dieses Experiment wird in einem späteren Abschnitt eindeutig beschrieben.

Nachdem DCs als Antigenpräsentierende Zellen gewählt und diese auf ihre Fähigkeiten hin Antigene aufzunehmen getestet wurden und auch die Kulturbedingungen feststanden, wurde nun schrittweise die Fähigkeit dieser Zellen untersucht spezifische, gegen Adenovirus gerichtete Immunantworten hervorzurufen.

Wie bereits gezeigt werden konnte, sind DCs in der Lage Adenoviren aufzunehmen und zu prozessieren, doch bleiben dabei folgende Fragen zu beantworten:

- i. Wie effektiv ist die Infektionskapazität?
- ii. Welche Titer an Virus sind notwendig?
- iii. Wie wird das Virus von den DCs aufgenommen?
- iv. Führt die Exposition mit dem Virus zu morphologischen oder funktionellen Veränderungen, verursacht durch Toxizität?
- v. Können diese AdV-infizierten Zellen die Proliferation von T-Zellen bewirken?
- vi. Können diese AdV-infizierten DCs spezifische zytotoxische T-Zellantworten hervorrufen?

Infektion unreifer und reifer Dendritischer Zellen mit rekombinantem Adenovirus Typ 5

Adenoviren dringen bekanntermaßen über die Interaktion mit zwei unterschiedlichen zellulären Rezeptoren in die Zelle ein. Beginnend mit der Anlagerung ihres Fiberknöpfchens an den erst kürzlich charakterisierten Coxsackie- und Adenovirusrezeptor „CAR“ der die Penetration des Virus an die Zelle bewirkt, vermittelt die anschließende Bindung der Pentonbasisdomäne an α v-Integrinrezeptoren wie CD51 die Internalisation des Virus in die Zelle.

Aufgrund der bereits erwähnten natürlichen Fähigkeiten von Dendritischen Zellen durch makropinozytische Mechanismen große Mengen an Makromolekülen aufzunehmen, hat sich die Verwendung des Lipofectamins als wirksames Transfektionsreagenz bewährt um hocheffizient das Virus in die Zelle einzuschleusen. Das Virus wird dabei in einer vor der Transfektion stattfindenden Inkubationsphase in das Liposom verpackt. Die kationische Hülle des Lipids kann dann, den Gesetzen der Physik folgend, aufgrund seiner negativen Nettoladung mit der Lipid-Doppelschicht der Plasmamembran verschmelzen und in den endozytotischen Abbauweg der Zelle geschleust werden. Mit dieser Transfektionsmethode sollte die Transfektionsrate gesteigert und eine Unabhängigkeit vom rezeptorvermittelnden Infektionsweg des Adenovirus erzielt werden.

Zunächst wurden unreife DCs in steigenden Viruskonzentrationen (MOI von 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 und 2000) alleine und in Kombination mit Lipofectamin transfiziert. Wie in Abbildung 9 gezeigt wird, konnte unter Zusatz des kationischen Lipides Lipofectamins insbesondere bei niedrigen Viruskonzentrationen eine deutlich höhere Infektionsrsrate erzielt werden, als bei Verwendung des Virus alleine.

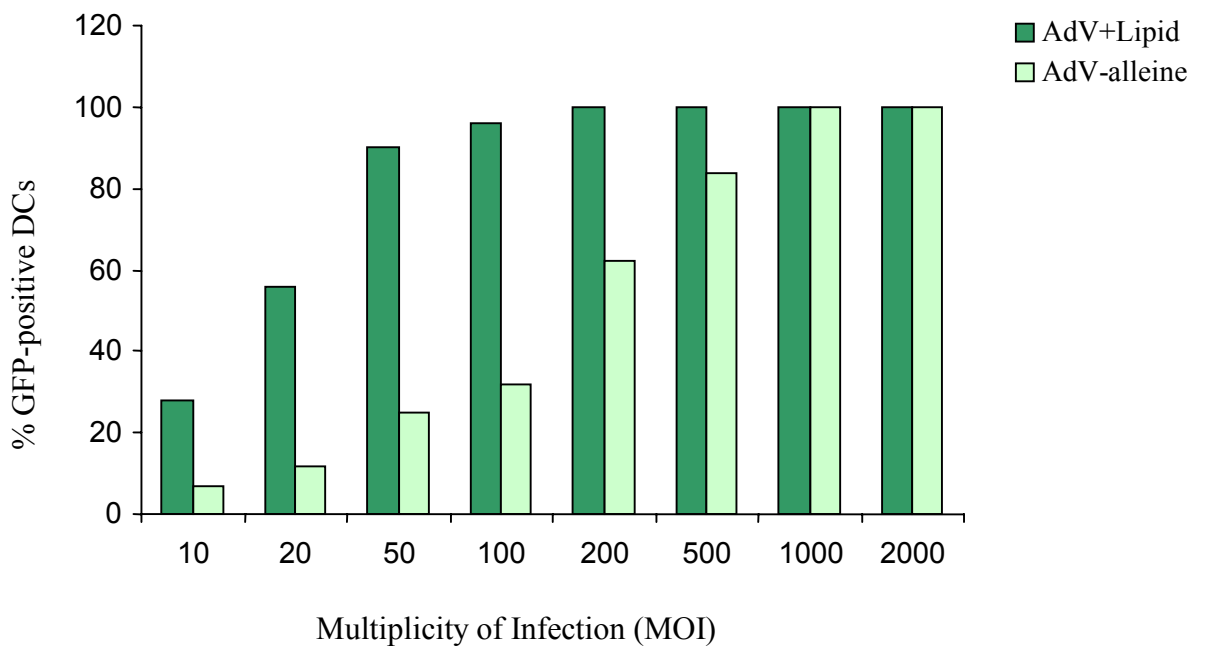


Abbildung 9: Steigerung der Infektionskapazität unreifer DCs mit AdV unter Verwendung kationischer Liposomen (in % GFP-positiver Zellen)

Die Infektionskapazität dendritischer Zellen mit Adenovirus wird gesteigert, wenn dem Infektionsgemisch das kationische Lipid Lipofectamin zugesetzt wird. Die hellgrünen Balken repräsentieren DCs, die mit Virus alleine bei verschiedener MOI infiziert wurden. Die dunkelgrünen Balken repräsentieren DCs, die unter Zugabe des kationischen Lipides Lipofectamin infiziert wurden. Auf der X-Achse sind die MOI (Multiplicity of infection) von 10 bis 2000 aufgetragen. Der Anteil GFP-exprimierender Zellen ist in Prozent auf der Y-Achse aufgetragen.

Durch die Zugabe von 200U/ml TNF- α wurden reife DCs generiert, die ebenfalls in diesen Transfektionsexperimenten eingesetzt wurden. Wie in Abbildung 11 zu sehen ist, waren unreife DCs bei einer MOI von 50 signifikant besser mit dem AdV-GFP zu infizieren, als reife DCs. Die Verwendung von Lipofectamin konnte dabei die Transfektionskapazität in beiden Gruppen noch zusätzlich steigern. Unreife DCs, die in der Gegenwart des Lipids bei einer MOI von nur 50 transfiziert wurden zeigten eine Expression des GFP von über 90 % (P<0,0001) gegenüber der Infektion mit dem Virus alleine, die nur in eine Expressionsrate von 25- 30% der GFP-positiven Zellen resultierte.

Transfektion reifer DCs unter den gleichen Bedingungen (MOI von 50 \pm Lipofectamin) war weniger effizient. Hier konnte nur eine Infektionsrate von 15 – 20 % ohne Lipofectamin gegenüber einer Infektionsrate von 35 % - 42 % wenn Lipofectamin zugefügt wurde erzielt werden. Dieses Experiment unterstützte zusätzlich den sinnvollen Einsatz des Lipofectamins zur Steigerung der Infektionskapazität.

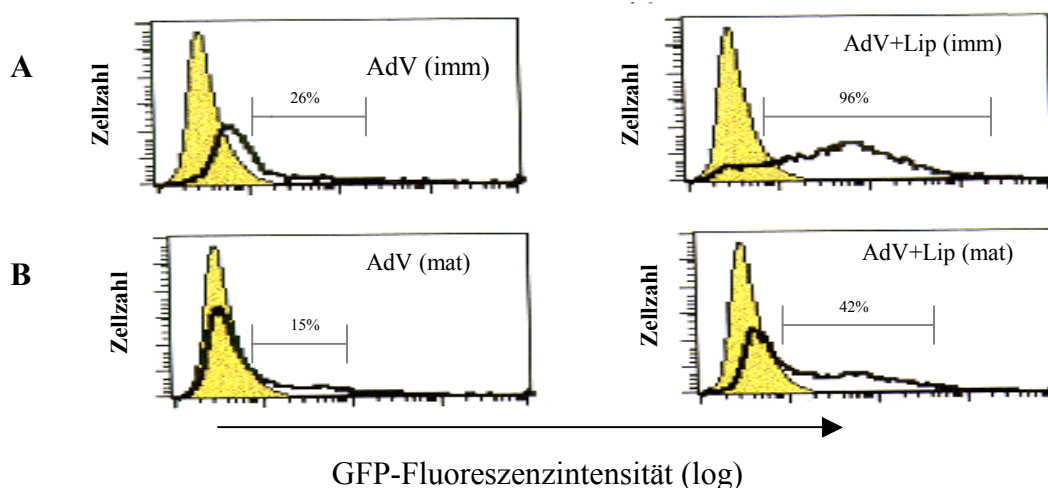


Abbildung 11: Vergleich der Infektionskapazität von unreifen und reifen DCs mit AdV bei einer MOI von 50 in Anwesenheit und Abwesenheit von Lipofectamine.

A: Das obere linke Histogramm zeigt GFP-Expression von unreifen DCs, die mit AdV alleine infiziert wurden. Das rechte Histogramm zeigt die gleichen Zellen, bei denen Lipofectamine dem Infektionsgemisch zugefügt wurde.

B: Das obere linke Histogramm zeigt GFP-Expression von reifen DCs, die mit AdV alleine infiziert wurden. Das rechte Histogramm zeigt die gleichen Zellen, bei denen Lipofectamine dem Infektionsgemisch zugefügt wurde

Beim Testen der optimalsten Infektionsrate unter Einsatz geringstmöglicher Viruskonzentrationen wurde auch die Viabilität der Zellen in Abhängigkeit von steigenden Viruskonzentrationen untersucht. Durch Anfärben der Zellen mit Trypanblau, das sich selektiv in apoptotische und nekrotische Zellen einlagert und diese blau anfärbt, konnte ermittelt werden, daß erst bei einer MOI von 500 eine Verminderung der Viabilität zu beobachten war. (*Daten werden nicht gezeigt*).

Da aber bereits bei einer MOI von nur 50 hohe Infektionsraten erzielt werden konnten, wurden keine höheren Konzentrationen an Virus verwendet. Unreife DCs, die mit einer MOI von 50 infiziert wurden zeigten keine morphologischen Veränderungen. Infizierte Zellen, die zusätzlich einem Reifestimulus in Form von TNF- α (200 U/ml) unterzogen wurden, zeigten nach weiteren 48-72 Stunden in Kultur hohe Expression der typischen Marker für reife DCs, wie CD86, CD83 und HLA-DR, bei gleichzeitig hoher Expression von GFP (Abbildung 11).

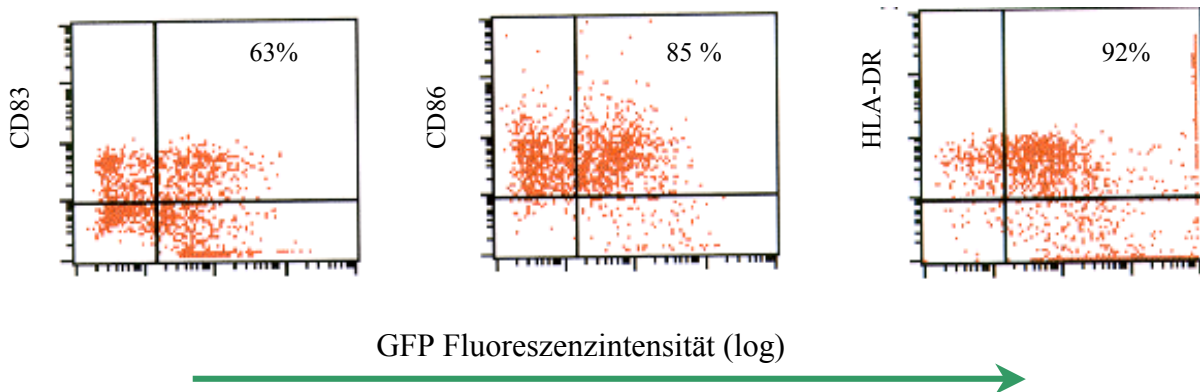
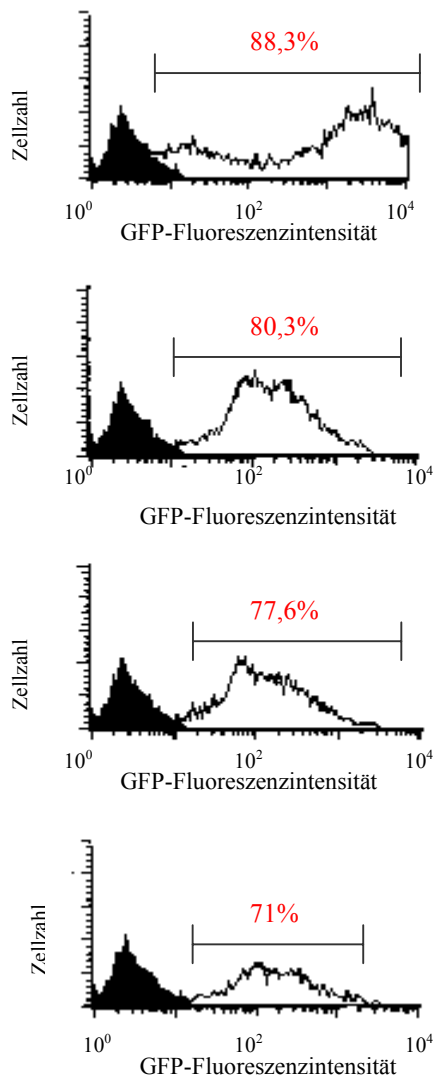


Abbildung 11: AdV-GFP-transfizierte DCs zeigen das Oberflächenprofil reifer DCs
Die Expression von CD83, CD86 und HLA-DR versus GFP-Fluoreszenz bei DCs, die mit AdV-GFP in Verbindung mit Lipofectamin transfiziert und unmittelbar mit TNF- α für 48 Stunden zur Reife stimuliert wurden. Im rechten oberen Quadranten der Dotplots ist jeweils der Prozentsatz doppelt positiver DCs gezeigt.

Die GFP-Expression konnte nach einer Transfektionsdauer von 1-2 Stunden und einer weiteren Inkubationszeit der Zellen von bereits weniger als 24 Stunden detektiert werden und erreichte nach 48 Stunden einen Plateauwert. E1- und E3- deletierte Adenoviren sind replikationsinkompetent und können, da sie nicht in das Genom der Wirtszelle integrieren, eine nur transiente Expression ihres Transgenes bewirken und werden normalerweise durch den Teilungsmodus aktiver Zellpopulationen nicht an die Tochtergenerationen weitergegeben und somit ausverdünnt. DCs haben allerdings die Eigenschaft sich nicht zu teilen, wenn sie aus ihren monozytären Vorläuferzellen differenziert worden sind. Dadurch sind sie in der Lage nach erfolgter AdV-GFP-Transfektion, das Transgen noch über einen längeren Zeitraum zu exprimieren. Wie in Abbildung 12 zu sehen ist, konnte sogar noch 21 Tage nach der Transfektion eine GFP-Expression von >70 Prozent nachgewiesen werden, wobei die Viabilität der Zellen während dieser Zeit allerdings um 20% abnahm. Diese Zellen exprimierten aber HLA-DR, sowie das kostimulatorische Molekül CD86. (*Daten werden nicht gezeigt*)

Abbildung 12: Fluoreszenzanalyse AdV-GFP-transfizierter DCs



a) Unreife DCs wurden am Tag 10 mit AdV-GFP und Lipofectamin bei einer MOI von 50 für 60 Minuten transfiziert und anschließend unter Zugabe von TNF- α und GM-CSF in Kultur genommen. Nach bereits 24 Stunden wurde die Expression des GFP (% positive Zellen) in der Durchflußzytometrie gemessen. Auf der Y-Achse sind die Zellzahlen aufgetragen und die X-Achse zeigt die Fluoreszenzintensität des GFP

b) Nach weiteren 7 Tagen in Kultur wurden die gleichen DCs, wie unter 1) beschrieben auf GFP-Expression untersucht. Am Tag 5 nach Transfektion wurden nochmals TNF- α (200U/ml) und GM-CSF (400U/ml) der Kultur zugefügt

c) GFP-Expression von DCs nach 14 Tagen in Kultur. Am Tag 10 nach Transfektion wurden weitere Gaben von TNF- α (200U/ml) und GM-CSF (400U/ml) der Kultur zugefügt

d) GFP-Expression von DCs nach 21 Tagen in Kultur. Am Tag 15 und 20 nach Transfektion wurden weitere Gaben von TNF- α (200U/ml) und GM-CSF (400U/ml) der Kultur zugefügt

Gezeigt wird jeweils die Zellzahl versus GFP-Fluoreszenz-Intensität und der Prozentsatz GFP-positiver Zellen

Der Effekt von TNF- α auf die Expression von CD51 auf DCs.

Die hier dargestellten Ergebnisse stimmen mit bereits publizierten Untersuchungen überein, bei denen gezeigt wurde, daß reife DCs in geringerem Maße mit Adenovirus infiziert werden können, als unreife DCs. Dies stimmt grundsätzlich mit der Beobachtung überein, daß DCs innerhalb einer definierten Zeitabfolge zwei aufeinander abgestimmte Entwicklungsstadien durchlaufen können, in denen sie unterschiedliche Effektorfunktionen ausüben. Am Beispiel der Aufnahme adenoviraler Partikel von DCs über den α v-Integrinrezeptor CD51 ließ sich diese Abfolge sehr schön demonstrieren. Die Expressionsrate des Integrinrezeptors CD51, der für die Internalisierung des Virus in seine Wirtszelle verantwortlich ist, wird auf unreifen DCs in großen Mengen exprimiert. In Abbildung 13 wird gezeigt, inwieweit TNF- α einen Einfluß auf die Expressionsrate des CD51 Moleküls hatte. Dabei wurde die Expression des CD51 in einer dosisabhängigen Weise (0-500 U/ml TNF- α) herunterreguliert. Ausgehend von einer Expressionsrate von durchschnittlich 52% (\pm 20%), wurde bei einer TNF- α Konzentration von 200 U/ml, der Menge, die eingesetzt wurde um die DCs zur Reife zu stimulieren, auf 11% (\pm 8 %) herunterreguliert ($p < 0.005$).

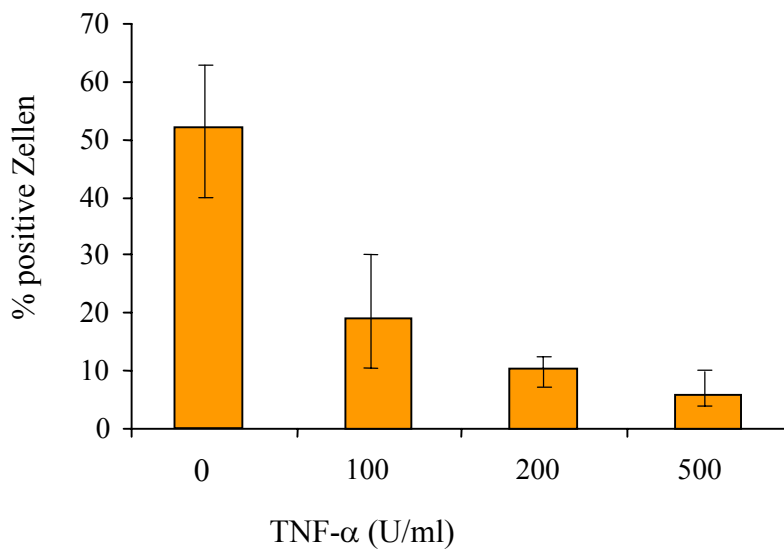
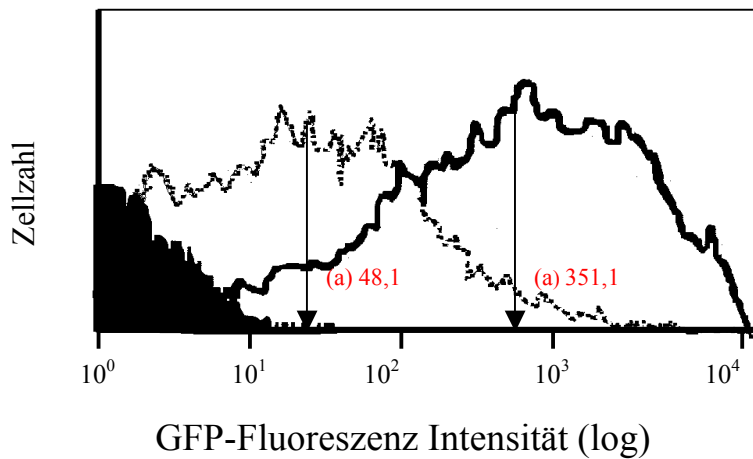


Abbildung 13: Dosisabhängige Inhibierung der CD51 Expression auf DCs durch TNF- α
 DCs wurden dabei mit ansteigenden Konzentrationen von TNF- α für 72 Stunden inkubiert und die Expression des CD51 in der Durchflußzytometrie analysiert.

Auf der X-Achse wurden die steigenden Konzentrationen (0, 100, 200, 500 U/ml) von TNF- α aufgetragen und die Werte auf der Y- Achse geben die jeweiligen Prozente an CD51-positiven Zellen an. Die Ergebnisse zeigen den arithmetischen Mittelwert und Standardabweichung von 12 unabhängigen Experimenten.

Um ferner zu bestätigen, daß CD51 tatsächlich an der Infektion der DCs mit AdV beteiligt ist, wurden Inhibitionsexperimente durchgeführt. Dazu wurde ein unkonjugierter monoklonaler Antikörper der gegen das CD51-Molekül gerichtet ist verwendet. Unreife DCs (Tag 10 - 12) wurden für 30 Minuten mit dem anti-CD51 Antikörper inkubiert und dann mit AdV-GFP (MOI von 50) in der Gegenwart von Lipofectamin transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen hinsichtlich ihrer Expression von GFP durchflußzytometrisch untersucht. Die DCs, die zuvor mit dem anti-CD51 Antikörper behandelt wurden zeigten eine signifikante Verringerung der Prozentzahl an infizierten Zellen (von einem Mittelwert von $91,7 \pm 2,5\%$ auf $48,5 \pm 5,5\%$, $p < 0,0001$) sowie eine Abnahme der Fluoreszenzintensität (FI) für GFP (von einem Mittelwert von 920,5 auf 144,4 fluoreszierende Einheiten, $p < 0,005$). Das Ergebnis dieser Versuche wird in Abbildung 15 dargestellt.



<u>Legende</u>	Bedingung	GFP-FI (Mittelwert)	GFP-FI (a) (Median)	% GFP-positive Zellen
■	Negative Kontrolle (nicht infizierte DCs)	12,3	12,3	0,1
—	DC + AdV-GFP+Lip	920,50	351,1	91,7
▨	DC+CD51-Inhibition + AdV-GFP+Lip	144,4	48,1	48,5

Abbildung 14: Einfluß der CD51 Expression auf die adenovirale Infektion von DCs
Das oben dargestellte Histogramm zeigt den Einfluß der CD51-Expression auf DCs auf die Infektions bzw Transfektionskapazität mit Adenovirus. Vor der Lipofektion wurden die DCs entweder mit einem inhibierenden monoklonalen CD51-Antikörper inkubiert oder direkt mit dem AdV-GFP/ Lipofectamingemisch infiziert. Nach 48 Stunden in Kultur wurde die Infektionsrate, als Prozent GFP-positiver Zellen, oder als der Mittelwert (MFI) und der Medianwert (a) der GFP-Fluoreszenzintensität in der Durchflußzytometrie analysiert.

Der Effekt von TNF- α auf die Expression des Coxsackie- und Adenovirusrezeptors „CAR“ und der Integrinrezeptoren CD49c und f

Nachdem nachgewiesen werden konnte, daß CD51 am adenoviralen Infektionsgeschehen beteiligt ist, wurde auch die Expression des CAR-Rezeptors und anderer potentiell durch das Virus benutzte Integrinrezeptoren, wie CD49f und CD49c auf der Oberfläche der Dendritischen Zellen untersucht.

Der CAR- Rezeptor konnte in nur 60% der untersuchten DC-Kulturen (n=11) detektiert werden und wurde von diesen Populationen zwischen 15 und 57% exprimiert. Im Gegensatz dazu wird CAR auf Hela-Zellen sehr hoch exprimiert (>86%), dagegen auf Fibroblasten überhaupt nicht. Hela-Zellen dienten daher als positive Kontrollen und Fibroblasten als negative Kontrollen (Abbildung 15). Um herauszufinden, ob die Expression von „CAR“ ebenfalls vom Reifegrad der DCs abhängig ist, wurden unreife DCs und mit TNF- α stimulierte DCs auf die Expression des CAR-Rezeptors untersucht. Die Abbildung 16 zeigt bei einer der repräsentativen Populationen, daß auf unreifen dendritischen Zellen CAR signifikant höher exprimiert war (47%) als bei reifen dendritischen Zellen (28%), die für drei Tage mit TNF- α (200U/ml) zur Reife stimuliert waren ($p < 0,04$). Der Reifegrad der DCs wurde darüber hinaus durch die gleichzeitig hohe Expression der Moleküle HLA-DR, CD86 und CD83 bestätigt (*Daten werden nicht gezeigt*).

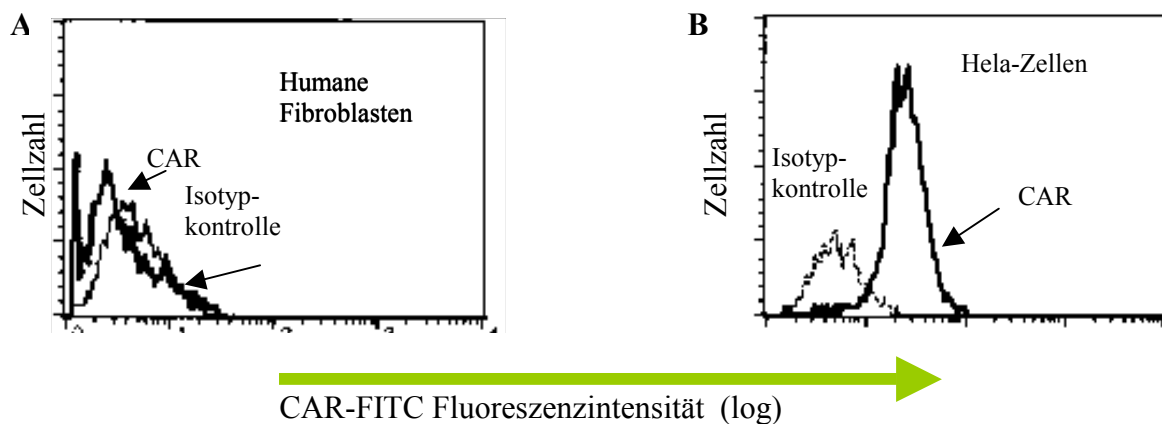


Abbildung 15: Die Expression des Coxsackie und Adenovirus-rezeptor „CAR“ auf den beiden Zelllinien Hela und der Fibroblastenzelllinie HuFib-KOE.

Der verwendete Antikörper „RmcB“ wurde mit einem sekundären Antikörper FITC-markiert und die Expression des CAR gemessen als FITC-positive Zellen durchflußzytometrisch untersucht.

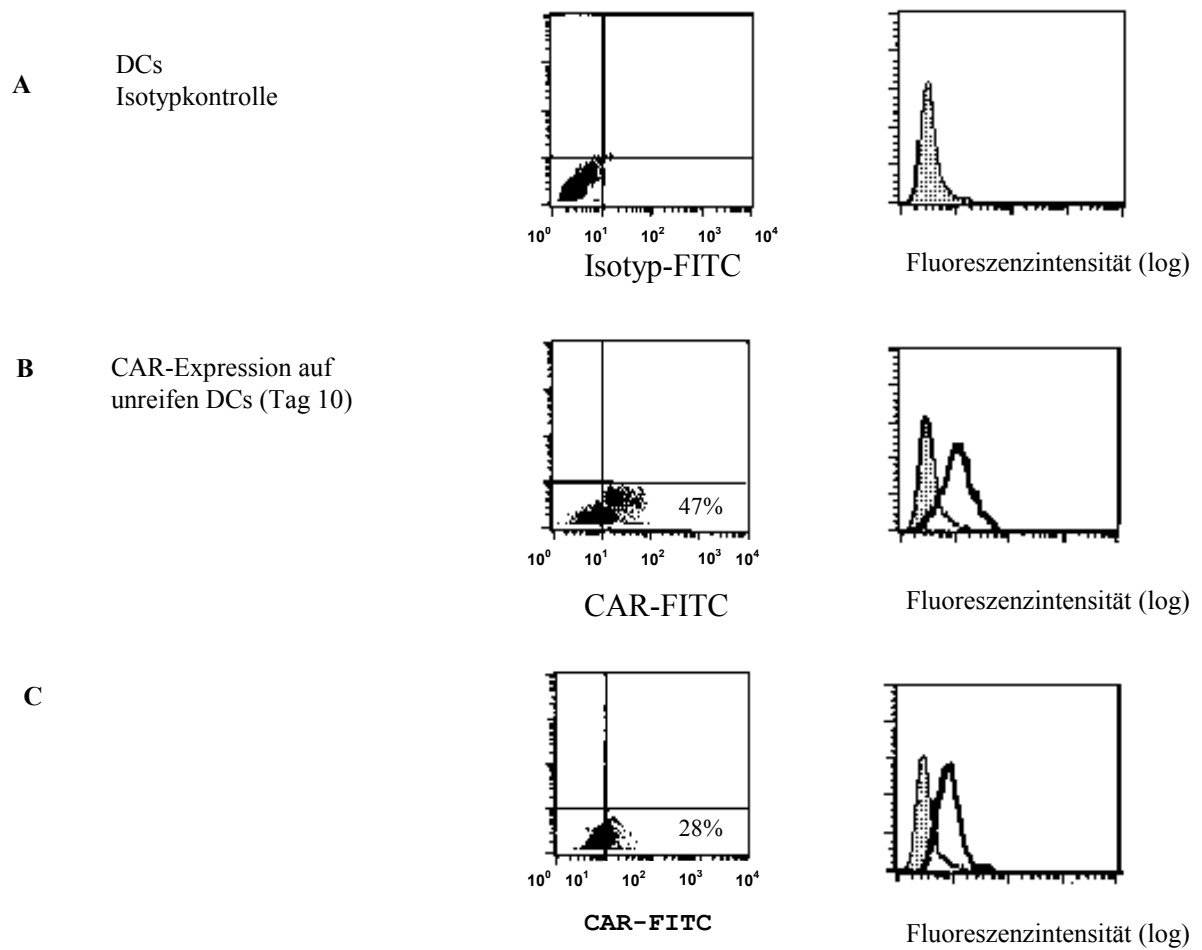


Abbildung 16. Durchflußzytometrische Analyse der Expression des Coxsackie und Adenovirusrezeptor (CAR) auf Dendritischen Zellen in Abhängigkeit von TNF- α . Auf der linken Seite wird in der Dotplotanalyse der Prozentsatz „CAR“-positiver DCs gezeigt. Die rechte Seite zeigt die Histogrammdarstellung der Fluoreszenzintensität.

Desweiteren konnte ein dosisabhängiger, negativ regulatorischer Effekt von TNF- α auch für die Oberflächenexpression der $\alpha\text{v}\beta\text{1}$ Integrinrezeptoren CD49f und CD49c auf DCs gezeigt werden. Unreife DCs (Tag 10) wurden auch hier mit steigenden Konzentrationen an TNF- α für 72 Stunden inkubiert. Abbildung 17 zeigt, daß auch die Expression dieser beiden Integrine, sowie des CAR-Rezeptors von der Menge des zugefügten TNF- α abhängt und somit ebenfalls Indikatoren für den Reifegrad der DCs darstellen.

Die beschriebenen Experimente haben klar zeigen können, daß eine bestimmte Abfolge von Ereignissen notwendig sind, um eine phänotypische Veränderung bei der Differenzierung von dendritischen Zellen zu beobachten

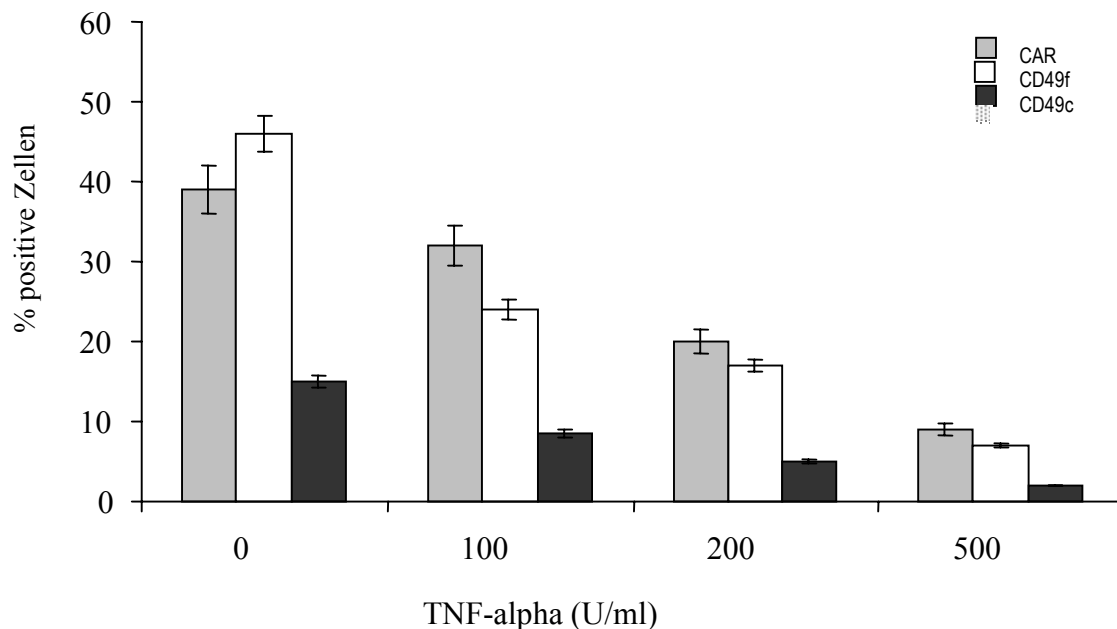


Abbildung 17: Dosisabhängige Inhibierung der Expression von CD49f, CD49c und CAR
 72 Stunden nach der Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von TNF- α wurden die Zellen durchflußzytometrisch analysiert. Die Daten repräsentieren die arithmetischen Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils sechs unterschiedlichen DC Populationen.

Adenovirus infizierte und reife DCs zur Überprüfung der immunstimulatorischen Kapazität in MLR-Assays

a) allogene MLR

Weitere Experimente sollten zeigen, dass AdV- exprimierende reife DCs in der Lage sind, allogene und autologe T-Lymphozyten zur Proliferation anzuregen. Für alle Experimente, bei denen die immunstimulatorische Kapazität der AdV+DCs getestet wurde, sowie die Experimente zur Generierung spezifischer T-Zell Antworten, wurde das E1⁻/E3⁻-deletierte Ad5-CMV-0- Virus verwendet um zu verhindern, daß spezifische T-Zellantworten möglicherweise gegen das GFP-Transgen gerichtet werden könnten anstelle gegen adenoviruspezifische Epitope. Dieses Virus unterschied sich lediglich in der Insertion des GFP-Gens und wurde mit dem gleichen Titer bereitgestellt. Um die immunstimulatorische Kapazität der AdV-infizierten DCs zu testen wurden gemischte Lymphozyten Reaktions Experimente (MLR= mixed lymphocyte reaction) durchgeführt. Wie bereits bei der Beschreibung der in serumhaltigem Medium kultivierten DCs erwähnt, diente diese Methode ursprünglich zum Nachweis von Gewebeunverträglichkeit. In dem klassischen Test werden gleiche Mengen von bestrahlten Stimulator-Lymphozyten mit unbestrahlten Responder-Lymphozyten inkubiert um eine aussagekräftige Reaktion zu erhalten. Wenn man aber DCs als Stimulatoren verwendet, reichen weniger Zellen aus um die T-Zellen zur Proliferation anzuregen.

Aus dem peripheren Blut von AdV-seropositiven, HLA-inkompatiblen Spendern wurden T-Zellen über ein negatives Zellseparationsverfahren isoliert. Dazu wurden die PBMNCs mit einer Mischung spezifischer Antikörper (CD11b, CD56, CD36, CD19), die gegen Nicht-T-Zellen gerichtet waren markiert. An diese Antikörper sind magnetische Beads gekoppelt, so dass nach Auftragen der Zellsuspension auf eine mit Stahlkügelchen gefüllte Säule, die an einen Magneten installiert wurde alle markierten Zellen in der Säule hängen blieben, während die unmarkierte negative Zellfraktion durch die Säule lief und für die weitere experimentelle Vorgehensweise gesammelt wurde. Diese von der Firma Miltenyi entwickelte Methode garantiert eine 98 %ige Reinheit an CD3-positiven T-Zellen und dies konnte auch durch Anfärben mit monoklonalen Antikörpern, die gegen CD3 gerichtet waren, in der Durchflußzytometrie bestätigt werden.

Schließlich wurden variierende Zahlen (10000, 2500, 1000) von bestrahlten infizierten und uninfizierten DCs mit 1×10^5 dieser hochreinen T-Zellen kokultiviert. Dabei ergaben sich Stimulator zu Responder Ratios von 10:1, 40:1 und 100:1.

Obwohl DCs sich nicht mehr teilende Zellen sind, wurden sie deshalb bestrahlt, weil es sich bei den DC-Kulturen niemals um reine Kulturen handelte und sie immer über einen gewissen Anteil an Lymphozyten verfügten, deren Teilung in der MLR nicht erwünscht waren. Nach sechs Tagen wurde der MLR ^3H -markiertes Thymidin für einen Zeitraum von 18 Stunden zugesetzt. Das radioaktiv markierte Thymidin baut sich nur in die DNA von teilenden Zellen ein. Die emittierende β -Strahlung kann dann nach Ernten der Zellen als cpm (Scintillationsmeßwert pro Minute) gemessen werden und stellt ein Maß für die Proliferationskapazität der Zellen dar. Die Ergebnisse dieser Experimente (n=6) wurden in Abbildung 18 zusammengefaßt.

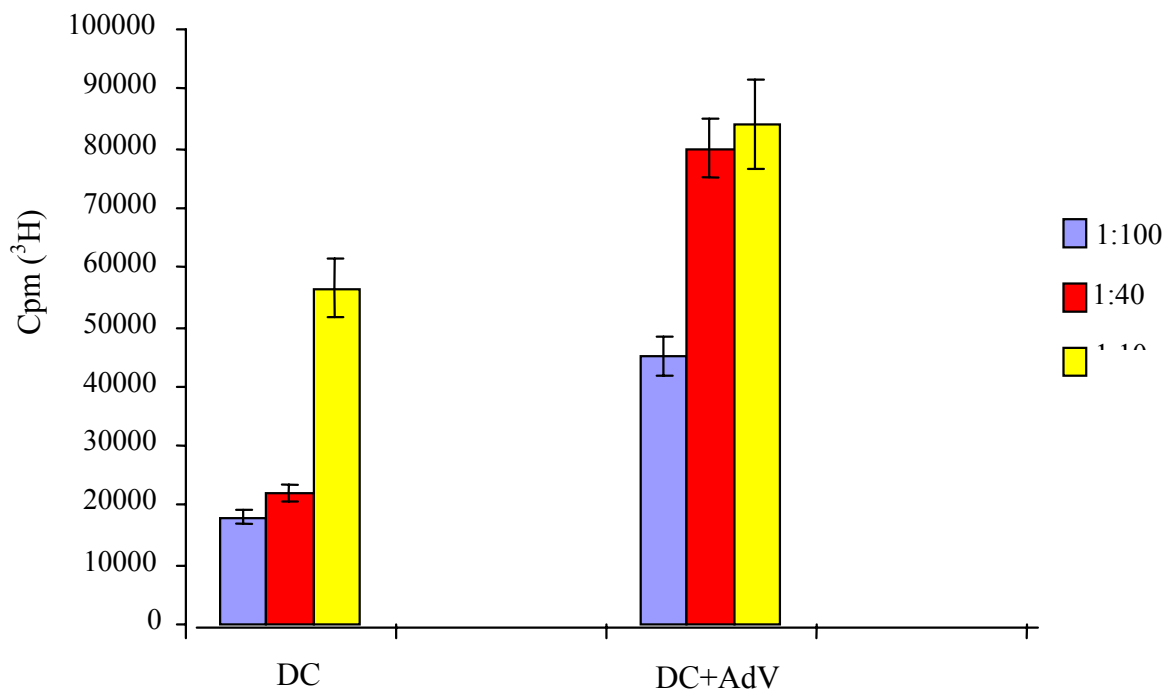


Abbildung 18: Proliferationskapazität allogener T-Zellen nach Stimulierung mit AdV-transfizierten DCs im Vergleich mit nicht transfizierten DCs

AdV-infizierte und reife DCs können effizient die Proliferation allogener T-Zellen stimulieren. Unreife DCs (Tag 10) wurden unter Zusatz von Lipofectamin mit AdV transfiziert und durch Zugabe von $\text{TNF-}\alpha$ zur Reife stimuliert. Definierte Mengen an transfizierten und nicht transfizierten reifen DCs wurden mit gereinigten allogenen T-Zellen gemischt und für sechs Tage in serumhaltigen Medium (10% FCS) inkubiert. Am Tag 6 wurde dann ^3H -Thymidin der Kultur zugegeben wobei die Aufnahme des ^3H -Thymidin in counts per minute (cpm) gemessen. Die hier dargestellten Meßwerte wurden gegenüber den Werten proliferierender T- Zellen alleine (ohne APC-stimulation) korrigiert. Die Ergebnisse repräsentieren die arithmetischen Mittelwerte und die Standardabweichung von sechs unabhängigen Experimenten

Dabei konnte gezeigt werden, daß uninfizierte reife DCs die Kapazität haben eine signifikante Proliferation von allogenen T-Zellen zu bewirken. Im Vergleich dazu hatten aber AdV-transfizierte reife DCs eine weit höhere Kapazität die Proliferation dieser T-Lymphozyten zu stimulieren und dies konnte in allen T zu DC Ratios gezeigt werden ($p < 0.005$). Parallel dazu wurde der Immunphänotyp der proliferierenden T-Lymphozyten durch Anfärben mit T-zellspezifischen Antikörpern in der Durchflußzytometrie bestimmt. Erwartungsgemäß resultierte in beiden Gruppen eine Dominanz an CD3+CD4+ T-Zellen, da vor allem CD4+T-Zellen alle Varianten der MHC-II-Moleküle auf den Dendritischen Zellen erkennen. Es bestand aber auch ein signifikant hoher Anteil an CD3+CD8+ T-Zellen und keine CD56+ NK-Zellen.

Tabelle 18-1: Phänotypische Analyse allogener T-Zellen nach Stimulation mit reifen DCs mittels direkter 2-Farben Immunfluoreszenz

Phänotyp der T-Zellen	DC+AdV	DC- uninfiziert
CD3/CD4	56,6 ± 22 %	62,5 ± 15 %
CD3/CD8	21,3 ± 9,2 %	17,1 ± 8 %
CD3/CD56	0,4 %	0,3 %

b) Autologe MLR

Als exogenes Modellantigen wurde das Tetanus Toxoid gewählt.

Die immunstimulatorische Kapazität von AdV-infizierten DCs wurden mit uninfizierten DCs hinsichtlich ihrer Kapazität Tetanus Toxoid aufzunehmen und es autologen, gereinigten T-Lymphozyten zu präsentieren verglichen.

Die Fragen, die im folgenden Experiment beantwortet werden sollten waren folgende:

- Sind DCs in der Lage das exogen aufgenommene Antigen autologen Gedächtnis T-Zellen zu präsentieren, die dadurch aktiviert und zur Proliferation angeregt werden können?
- Sind DCs, die adenovirale Proteine exprimieren, in der Lage autologe T-Zellen zu stimulieren?
- Läßt sich ein Unterschied zwischen der immunstimulatorischen Potenz beider Antigene feststellen?

Tetanus, oder der Wundstarrkrampf, ist eine akute schwere Infektionskrankheit, die verursacht wird durch das Toxin des häufig in der Erde vorkommenden Bakterienstammes *Clostridium tetani*. Da diese Krankheit sehr schwer verlaufen kann, wird von der staatlichen Impfkommision eine aktive Grundimmunisierung mit Tetanustoxoid empfohlen. Demnach kann man erwarten, daß Menschen, die gegen Tetanus geimpft wurden, auch T-Zellantworten gegen das Toxoid hervorrufen können.

Eine in der Kindheit durchlebte adenovirale Infektion führt normalerweise zu einer lebenslangen Immunität gegen Adenovirus, worauf eine hohe Frequenz an Adenovirus-spezifischen T-Lymphozyten im peripheren Blut zu erwarten ist.

Eine Immunisierung gegen Tetanustoxoid ist dagegen nur transienter Natur, da eine Auffrischungsimpfung nur ca. 10 Jahre vorhält. Die Frequenz an Tetanus-spezifischen T-Lymphozyten wird deshalb als niedriger erwartet.

Tatsächlich konnten AdV-infizierte DCs die Proliferation von autologen T-Zellen signifikant besser stimulieren als uninfizierte reife DCs, die mit Tetanus Toxoid TT beladen waren ($p < 0.0001$) oder gegenüber uninfizierten reifen DCs ohne TT ($p < 0.0001$). Demnach konnte gezeigt werden, daß DCs in der Lage sind das exogen aufgenommene, lösliche Antigen Tetanus Toxoid T-Zellen zu präsentieren und diese zur Proliferation anzuregen, aber im Vergleich dazu waren AdV-infizierte DCs dazu besser in der Lage und die Unterschiede, die in Abbildung 19 gezeigt werden, waren signifikant.

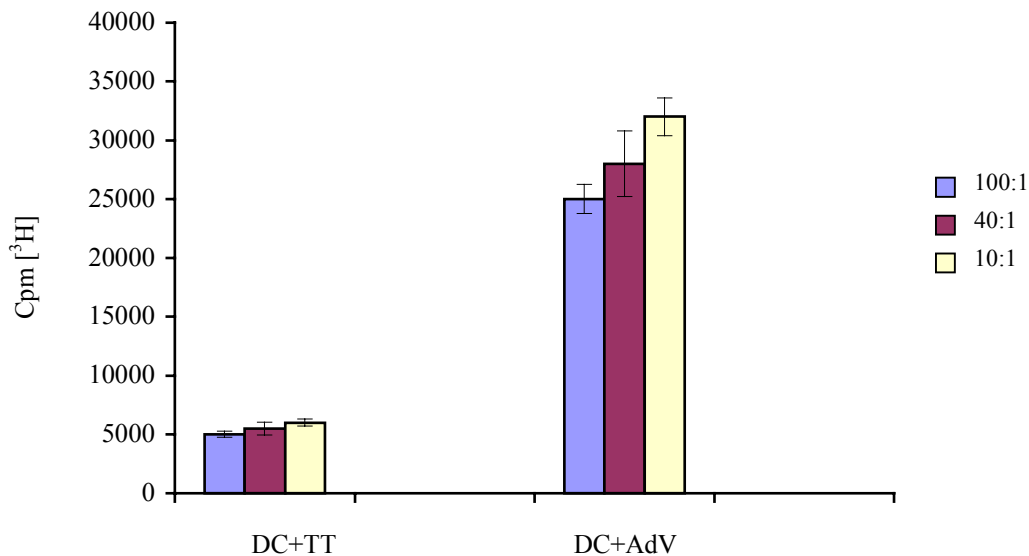


Abbildung 19: Proliferationskapazität autologer T-Zellen nach Stimulation mit AdV-infizierten DCs im Vergleich mit nativen bzw. mit TT- beladenen DCs

Transfizierte und native, mit TT beladene DCs wurden in unterschiedlichen Mengen zu gereinigten, negativ selektierten autologen T –Zellen gegeben und für 6 Tage in komplettem Medium inkubiert. Am Tag 6 wurde der Kultur [3H]-Thymidin zugegeben und nach 18 Stunden wurde die Aufnahme des [³H]-Thymidin in counts per minute (cpm) gemessen. Die hier dargestellten Meßwerte wurden gegenüber den Werten proliferierender T- Zellen alleine (ohne APC-stimulation) korrigiert. Die Ergebnisse repräsentieren die arithmetischen Mittelwerte und die Standardabweichung von 6 verschiedenen Experimenten.

Tabelle 19.1 Immunphänotypisierung proliferierender autologer T-Zellen

Phänotyp der T-Zellen	Stimulation: DC+AdV	Stimulation: DC- nicht infiziert +TT
CD3/CD4	68,3 ± 12%	66,5 ± 15%
CD3/CD8	26,2 ± 9,2%	18,6 ± 8%
CD3/CD56	0 %	0,2%

Die immunphänotypische Analyse der proliferierenden T-Lymphozyten zeigte in beiden Gruppen eine Dominanz von CD4⁺ T-Zellen und einem signifikanten Anteil an CD8⁺ T und keine CD56⁺ NK Zellen.

In vitro Expansion AdV-spezifischer ZTL

Nachdem gezeigt werden konnte, daß DCs, die adenovirale Proteine exprimieren hohe immunstimulatorische Kapazität sowohl in allogenen, als auch in autologen MLRs aufweisen, wurde desweiteren die Fähigkeit dieser Zellen untersucht, spezifische zytotoxische T-Zellantworten auszulösen. Für die Generierung AdV-spezifischer ZTL-Linien wurden schließlich nur die Spender selektiert, aus denen gute DC-Kulturen zu generieren waren, die dann auch in den MLR-Experimenten hohe immunstimulatorische Kapazität zeigten.

Zur Induktion einer adenoviruspezifischen ZTL-Antwort wurden daher ebenfalls AdV-transfizierte und reife DCs als Stimulatorzellen verwendet. Aus frischem autologen Spenderblut isolierte PBL (falls kryokonserviert unmittelbar vor dem Ansetzen der Kokultur aufgetaute autologe PBL) dienten als Responderzellen. Dabei wurden die Stimulatorzellen diesmal nicht bestrahlt, da die Lymphozyten innerhalb der DC-Population im autologen System keinen Einfluß auf die Stimulationskapazität der DCs hatten. Das Verhältnis der Stimulator zu Responderzellen betrug in der Startkultur 5×10^4 AdV+DCs zu 2×10^6 PBL. Nach zehn Tagen wurde die sich entwickelnde ZTL-Kultur zum ersten Mal mit autologen AdV⁺DCs in einer Ratio von 4:1 (ZTL:DC) und danach noch wöchentlich mit autologen LCLs (4:1) restimuliert wobei am Tag 17 niedrigdosiertes IL-2 (20 U/ml) dem Kulturmedium zugefügt wurde. Der Zeitpunkt und die Menge des zugefügten IL-2 waren entscheidend um das Auswachsen unspezifischer Effektorzellen zu verhindern, die sich zu Beginn in großen Mengen innerhalb der gesamten T-Zellpopulation in der Kultur aufhalten. Zu frühe Gabe von IL-2, dem für die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen wichtigsten Wachstumsfaktor, würde selbst die Proliferation solcher Zellen bewirken, die nur die niederaffine Form des IL-2-Rezeptors exprimieren. Diese Zellen könnten dann das Expandieren der spezifischen T-Zellklone beeinträchtigen. Würde allerdings zu hochdosiertes IL-2 zu der Kultur gegeben, könnten ebenfalls wenige unspezifische T und NK Zellen auch noch später zur Proliferation gelangen und die Spezifität der gewünschten T-Zellpopulationen herabsetzen. Das Expandieren der ZTLs durch den Antigenstimulus alleine hat sich innerhalb der ersten 17 Tage als sehr erfolgreich erwiesen und die Zugabe von 20 U/ml IL-2 in zwei bis dreitägigen Abständen hatte eine stabilisierende Wirkung auf die Zellen, die sich von da an kontinuierlich verdoppelten. Die Abbildung 20 zeigt die typische Wachstumskurve DC-AdV stimulierter ZTL-Linien.

Die Kurve zeigt deutlich, daß erst ab Tag 17 und Zugabe von IL-2 ein exponentielles Wachstum der Zellen zu beobachten war.

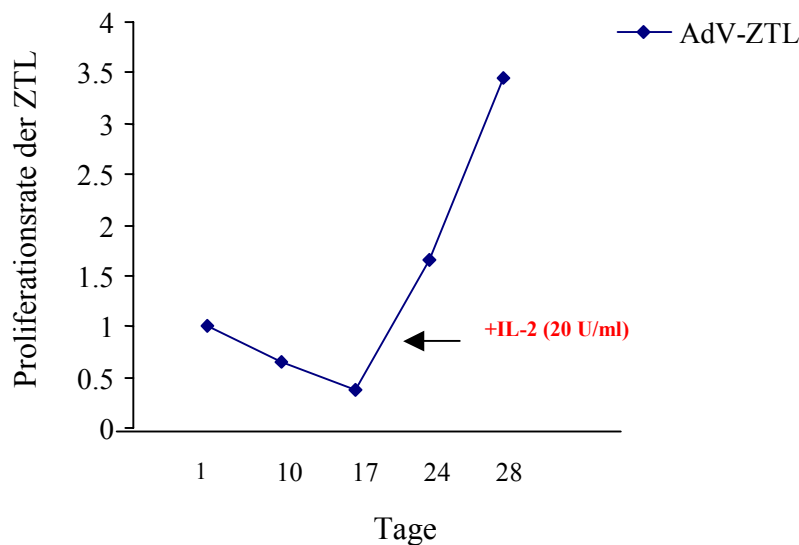


Abbildung 20: Wachstumskurve einer typischen, durch AdV⁺DCs stimulierte ZTL Linie.

Bis zum Tag 10 reduziert sich die Startkultur zunächst um die Hälfte und reduziert sich nach der ersten Restimulation noch etwas weiter bis zum Tag 17. Nach der 2. Restimulation und Zugabe von 20 U/ml rekombinantem IL-2 steigt das Wachstum exponentiell an und verdoppelt sich stetig mit einer Verdoppelungsrate von etwa 4 – 7 Tagen. Der Proliferationsindex wurde durch Zellzählung ermittelt.

Nachdem die ZTL-Linien in ausreichender Weise expandiert worden waren (nach 3 bis 4 Wochen), wurde die Spezifität der ZTL-Linien in Standard-Chromfreisetzungstests gemessen. In diesem Test wurden die Effektorzellen (ZTL) mit variierenden Ratios von ⁵¹Chrommarkierten Zielzellen (Targets) für vier Stunden inkubiert. Das Verhältnis der Effektoren zu den Targets reichte dabei von 5:1, 10:1, 20:1 bis 40:1. Dendritische Zellen wurden in allen Zytotoxizitätstests auch als Zielzellen verwendet. Die Reihe von Zielzellen, an denen die ZTL-Linien getestet wurden waren: AdV-infizierte autologe DCs, uninfizierte autologe DCs, HLA-mismatched uninfizierte und AdV-infizierte DCs, autologe und allogene LCLs, sowie die T-Zelllinie HSB-2, die aufgrund einer Mutation in den MHC-I-Genen von NK-Zellen erkannt und lysiert wird.

Die Ergebnisse von sechs verschiedenen Experimenten sind in Abbildung 21 zusammengefaßt.

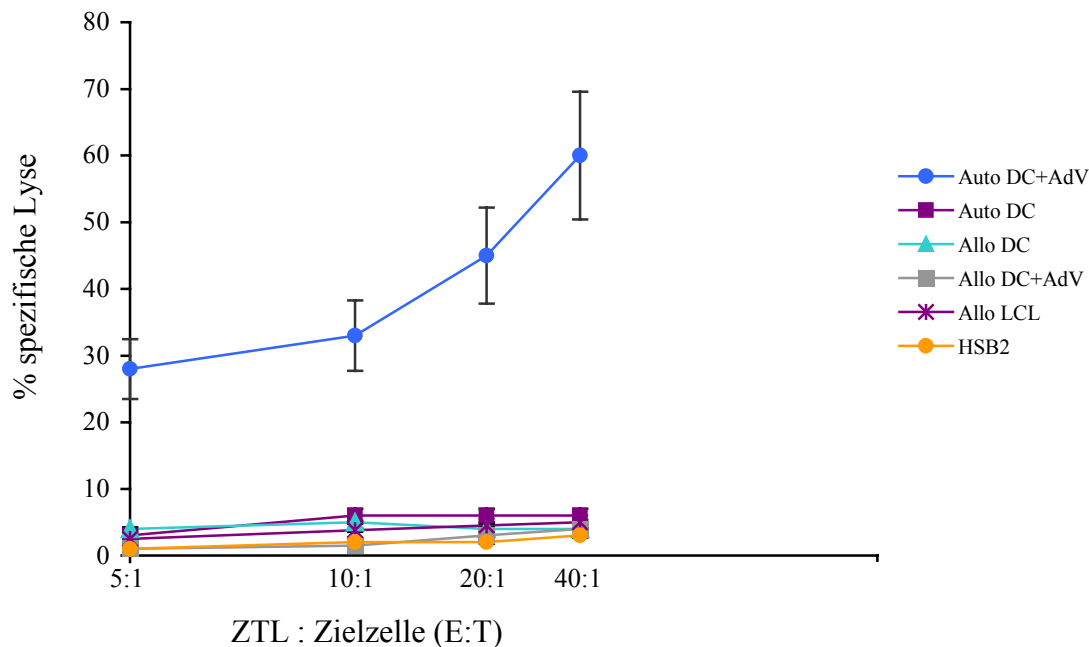


Abbildung 21: Bestimmung der zytotoxischen Kapazität AdV-spezifischer ZTL mittels ⁵¹Chromfreisetzungstests

Unreife DCs (Tag 10) wurden unter Zusatz von Lipofectamin mit AdV infiziert und durch Zugabe von TNF- α zur Reife stimuliert und mit autologen PBL kokultiviert. Die sich entwickelnden ZTL wurden dann nach mehreren Stimulationsrunden in 4 Stunden Chromfreisetzungstests auf Spezifität analysiert. Die Zielzellen (Targets) waren: autologe AdV-infizierte und uninfizierte DCs, allogene AdV-infizierte und uninfizierte DCs, allogene und autologe LCLs und die gegenüber Natürlichen Killerzellen sensitive Zelllinie HSB2. Die Verhältnisse von Effektoren (E) zu Targets (T) betrug 40:1 \rightarrow 20:1 \rightarrow 10:1 und 5:1. Die Ergebnisse repräsentieren den arithmetischen Mittelwert und die Standardabweichung von sechs Experimenten.

Die geringe Reaktivität aller AdV+DC stimulierten ZTL-Linien (n=6) gegen sämtliche Zielzellen (<10% bei der E:T Ratio von 40:1) mit Ausnahme der AdV-infizierten autologen DC ($59.3 \pm 6.6\%$ bei einer E:T Ratio von 40:1) läßt die Schlußfolgerung zu, daß diese ZTL-Linien AdV spezifisch waren. Außerdem zeigte die minimale Lyse der HSB-2 Zelllinie, daß der Anteil an MHC-unabhängiger Lyse in diesem System vernachlässigbar war.

MHC-Abhängigkeit der AdV-spezifischen Zytotoxizität

MHC-Inhibitionsexperimente konnten beweisen, daß die AdV-spezifische Lyse von MHC-abhängigen T-Effektorzellen vermittelt wurde. Dazu wurden die autologen AdV-infizierten DCs zuvor mit einem unkonjugierten Antikörper, der gegen MHC-Klasse I oder MHC-Klasse II gerichtet ist markiert. Die HLA-Oberflächenmoleküle der DCs wurden durch die Bindung der Antikörper blockiert wodurch eine spezifische Erkennung der T-Zellen inhibiert werden sollte.

Das Ergebnis dieses Experimentes war, daß die Bindung des HLA-ABC Antikörpers (W6/32) den Grad der spezifischen Lyse der AdV⁺DCs, von 54 % auf 32 % bei einer E:T Ratio von 40:1 herabsetzte, während die Zugabe des Antikörpers der gegen HLA-DR (C3/43) gerichtet war, die spezifische Lyse von 54 % auf 20 % bei einer E:T Ratio von 40:1 reduzierte.

In Abbildung 22 werden diese Inhibierungsexperimente gezeigt.

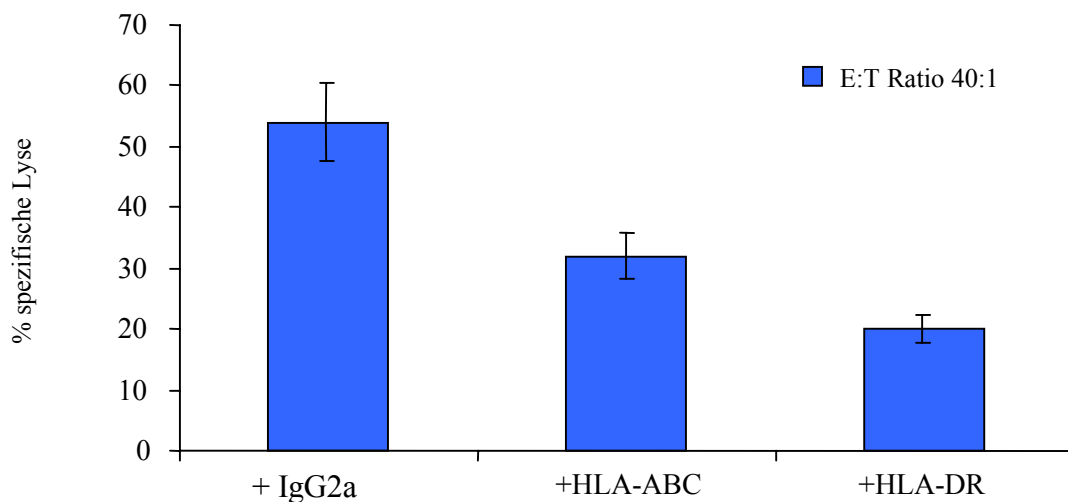


Abbildung 22: MHC-Inhibierung der AdV-spezifischen Zytotoxizität

Zur Bestimmung der MHC-abhängigkeit der AdV-spezifischen Lyse wurden die autologen AdV-infizierten DCs vor der Inkubation mit den AdV-spezifischen ZTL mit W6/32 (monoklonaler Antikörper der gegen MHC-Klasse I gerichtet ist) oder mit CR3/43 (monoklonaler Antikörper der gegen MHC-Klasse II gerichtet ist) markiert. Bei Zielzellen, die mit einem Antikörper inkubiert wurden, der gegen den Isotyp IgG2a gerichtet war, konnte keine Inhibition der Lyse detektiert werden. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung von drei AdV-spezifischen ZTL-Linien, bei einer E:T Ratio von 40:1

Um auszuschließen, dass es sich dabei um einen unspezifischen Effekt der inhibierenden Antikörper handelt wurde zusätzlich eine Maus-IgG2a Isotypkontrolle verwendet. Die Zugabe dieses Antikörpers zeigte keinerlei Wirkung auf die Reaktivität der ZTL und die Zellen verhielten sich gleichermaßen als wären sie unbehandelt, wodurch die Spezifität der inhibierenden Antikörper bestätigt werden konnte.

Oberflächenprofil AdV-spezifischer ZTL-Linien

Die immunphänotypische Analyse der ZTL konnte bestätigen, daß die Mehrheit der T-Effektorzellen vom CD3⁺CD4⁺-T-Zell-Typ waren (62.6 ± 11.7 %) und nur wenige vom CD3⁺CD8⁺ T-Zelltyp (13.6 ± 5.2%). Natürliche Killer Zellen vom CD16⁺und CD56⁺ Phänotyp waren in nicht signifikanten Mengen vertreten (< 4,5 %). Darüberhinaus wurde noch eine differenziertere Analyse der auf den ZTL exprimierten Oberflächenantigenen erstellt. Dazu gehörte zum einen der IL-2-Rezeptor CD25, der in seiner hochaffinen Form u.a. auf aktivierten T-Lymphozyten exprimiert wird und das Adhäsionsmolekül CD2, das an LFA-3 (CD58) bindet und am Prozess der T-Zellaktivierung teilnimmt. Außerdem wurde ermittelt welche T-Zell-Rezeptorketten überwiegen und ferner ob die für B-Zellen bzw. Monozyten spezifische Oberflächenmoleküle exprimiert werden (CD19, CD14). Die Abbildung 23 zeigt die Phänotypische Analyse von vier verschiedenen ZTL-Linien.

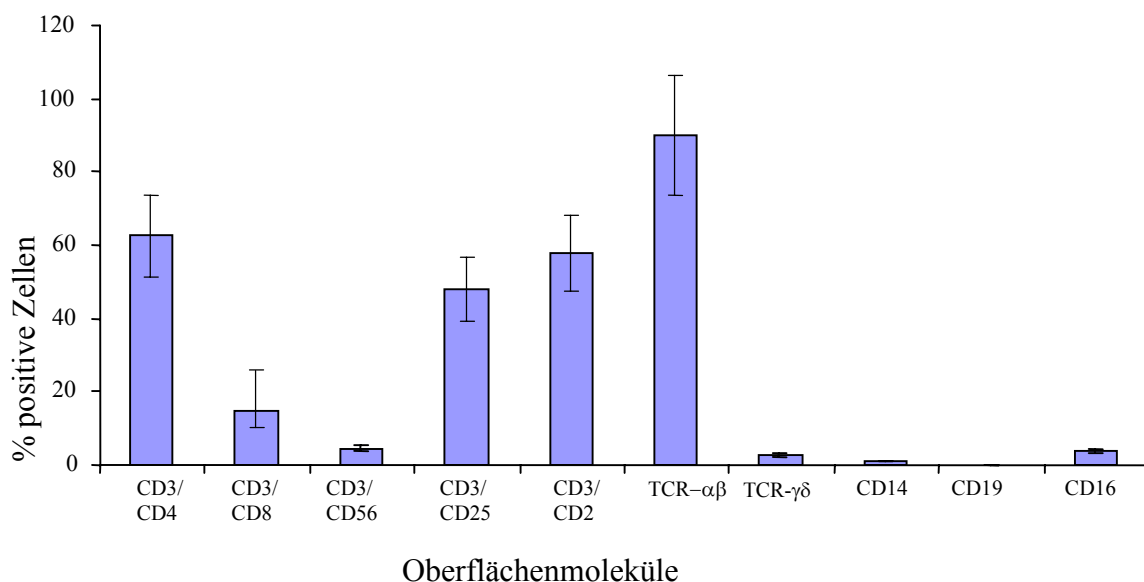


Abbildung 23: Durchflußzytometrische Analyse der Oberflächenmoleküle AdV-spezifischer ZTL

Analyse der Kreuzreaktivität AdV-spezifischer ZTL

Adenoviren sind in sechs Subklassen organisiert, die mindestens 47 verschiedene Serotypen aufweisen. Alle diese Vertreter können beim Menschen Krankheiten verursachen. Da nicht alle viralen Infektionen in Patienten durch einen einzelnen adenoviralen Serotyp verursacht werden, war eine wichtige Fragestellung, ob ZTL, die gegen einen deletierten Adenovirus vom Typ 5 generiert wurden auch in der Lage sind adenovirale Epitope von anderen viralen Serotypen zu erkennen und zu töten.

Für die Verwendung in Zytotoxizitäts-Assays wurden autologe und allogene DCs mit verschiedenen adenoviralen Serotypen infiziert. Dazu wurden Wildtyp Viren vom Typ 5, 2 und 11 verwendet um dadurch ein erweitertes Spektrum an adenoviralen Proteinen den T-Zellen zu präsentieren. Bisher ist noch wenig bekannt darüber, welche adenoviralen Proteine von den ZTL erkannt werden.

Adenoviren haben einen Mechanismus entwickelt, um der zellulären Immunüberwachung zu entkommen. Dieser Mechanismus wird über die E3-Proteine vermittelt und führt zur Herunterregulierung der MHC-Klasse I Moleküle der Wirtszelle.

Daher wurde die Expression der MHC-Klasse I- Moleküle auf den Wildtyp-infizierten DCs untersucht um somit die Infektionseffizienz der Viren zu testen. Allerdings konnte bei den Infektionen mit einer MOI von nur 50 keine signifikanten Veränderungen in der Oberflächenexpression der HLA-ABC Moleküle beobachtet werden. Deshalb wurden die Zellen in gleicher Weise wie zuvor mit dem E1-E3-deletiertem AdV Typ5 Virus infiziert und in den Chromfreisetzungstests auf Erkennung durch die ZTL getestet.

Wie in Abbildung 24 gezeigt, konnten ZTL (n=3), die gegen den deletierten Adenovirus vom Typ 5 generiert worden sind auch autologe DCs erkennen, die mit den Wildtypen der adenoviralen Serotypen Ad5, Ad2 und Ad11 infiziert worden waren. Dabei wurden die Zielzellen, die mit dem Wildtyp Ad5 infiziert wurden bei einer E:T Ratio von 40:1 mit annähernd der gleichen Spezifität ($65,2 \pm 15 \%$) erkannt, wie die Zielzellen, die mit dem deletierten Originalvirus infiziert wurden ($70,6 \pm 15 \%$).

Die spezifische Lyse der mit Ad2 infizierten DCs betrug $42,8 \pm 19 \%$. Die mit dem Ad11 infizierten DCs betrug $25 \pm 13 \%$.

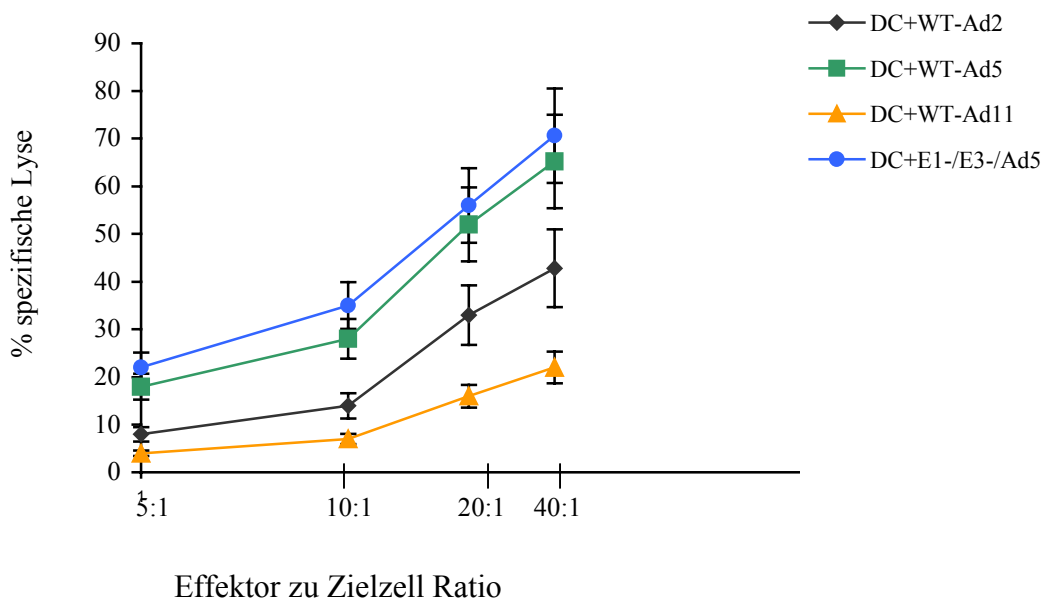


Abbildung 24: Kreuzreaktivität AdV-spezifischer ZTL

In vierstündigen Standard Chromfreisetzungstests wurden Ad5-spezifische ZTL gegen autologe DCs gerichtet, die entweder mit dem Wildtyp Ad2, Ad5, Ad11 oder dem E1/E3 deletierten Ad5-Virus transfiziert waren. Die hier dargestellten Ergebnisse repräsentieren den arithmetischen Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Diese Experimente waren unabhängig von denen in Abbildung 22 gezeigten Experimenten

Inhibition der MHC-Oberflächenmoleküle der mit unterschiedlichen adenoviralen Serotypen infizierten autologen DCs mit monoklonalen Antikörpern, die entweder gegen HLA-ABC oder HLA-DR gerichtet waren konnte bestätigen, daß auch diese kreuzreaktive Lyse in der Hauptsache durch MHC-II- abhängige Effektorzellen vermittelt wurde mit einem ebenfalls signifikantem Anteil an MHC-I-abhängiger Lyse. In Abbildung 25 wird dies gezeigt.

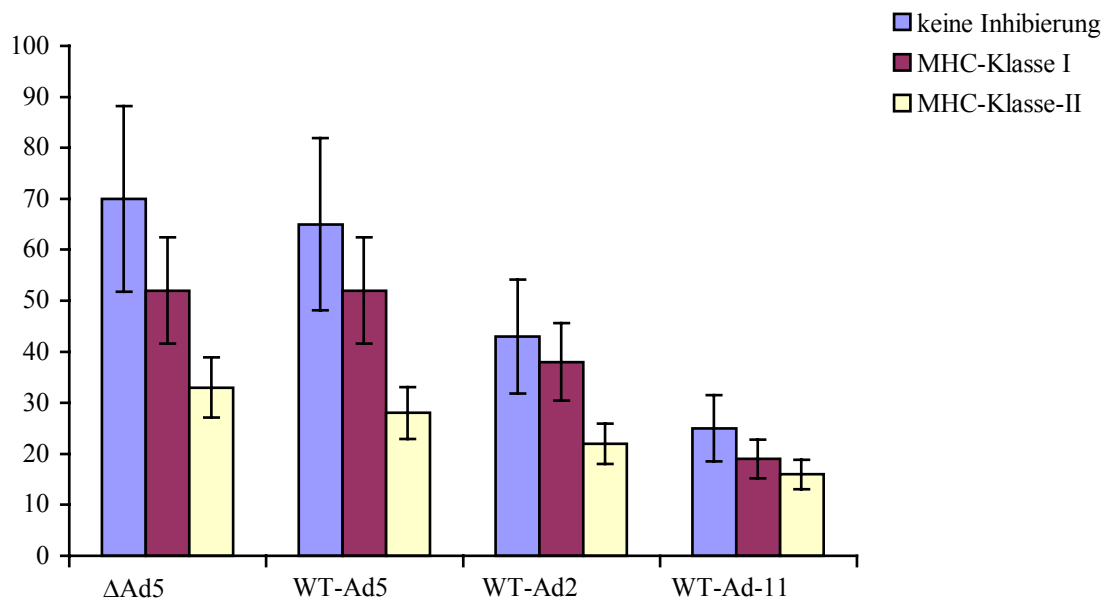


Abbildung 25: MHC-Inhibierung der kreuzreaktiven AdV-spezifischen Zytotoxizität

Zur Bestimmung der MHC-abhängigkeit der kreuzreaktiven, AdV-spezifischen Lyse wurden die autologen AdV-infizierten DCs zuvor mit W6/32 (monoklonaler Antikörper der gegen MHC-Klasse I gerichtet ist) oder mit CR3/43 (monoklonaler Antikörper der gegen MHC-Klasse II gerichtet ist) inkubiert. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen AdV-spezifischen ZTL-Linien, bei einer E:T Ratio von 40:1.

Teil II:

Die *In vitro* Generierung AdV und EBV spezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten

Wie bereits im Kapitel der Einleitung ausführlich behandelt, sind es viele verschiedene latente Viren, die durch Reaktivierung in immunsupprimierten Patienten große Probleme verursachen. Die Idee zytotoxische T-Lymphozyten zu generieren, die eine Spezifität gegen virale Proteine verschiedener Viren ausbilden können ist von großem therapeutischen als auch wissenschaftlichem Interesse. Die bisherigen Experimente konnten zeigen, daß AdV-infizierte DCs spezifische gegen adenovirale Epitope gerichtete zytotoxische T-Zellen stimulieren können. Deshalb richtete sich der nachfolgende Schwerpunkt dieser Arbeit auf die Entwicklung „bispezifischer“ zytotoxischer T-Lymphozyten, die in der Lage sein könnten sowohl adenovirale Proteine als auch EBV-spezifische Proteine zu erkennen. Dabei war die Arbeitshypothese, eine einzelne Stimulatorzelle so zu manipulieren, daß sie EBV-spezifische als auch Adenovirus-spezifische Proteine exprimieren kann und somit die Fähigkeit erhielt *in vitro* simultan ZTL zu expandieren, die Zielzellen erkennen und töten können, die EBV- und AdV-spezifische Antigene auf ihren MHC-Oberflächenmolekülen präsentieren. Da EBV eine strikte Rezeptorspezifität aufweist und latent nur B-Zellen infiziert, die das CD21 Molekül (C3d Komplementrezeptor) auf ihren Oberflächen tragen, können B-Zellen *in vitro* mit dem EBV-haltigen Überstand der B95-8 Murmeltierzelllinie dauerhaft immortalisiert werden. Die so transformierten lymphoblastoiden B-Zelllinien exprimieren dann das gesamte Repertoire der Antigene des latenten EBV-Entwicklungszyklus. Darüberhinaus exprimieren sie auch die kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40 und typischerweise auch MHC-Klasse II-Moleküle. Dadurch erweisen sich B-LCLs als höchst potente APCs und vorangegangenen Studien von Heslop, Rooney und Roskrow haben bereits zeigen können, daß solche LCLs die Fähigkeit besitzen hocheffizient EBV-spezifische T-Lymphozyten *in vitro* zu expandieren.

Für diesen Teil des Projektes waren daher einige Fragestellungen besonders wichtig:

1. Können LCLs effektiv mit einem rekombinanten Adenovirus infiziert werden?
2. Inwieweit beeinflusst das Virus die Viabilität der LCLs?
3. Können AdV-infizierte LCLs immunstimulatorische Funktionen ausüben?
4. Sind AdV-infizierte LCLs in der Lage ZTL zu stimulieren, die sowohl AdV- als auch EBV- exprimierende Zielzellen erkennen und töten können?

Infektion von LCLs mit dem rekombinanten Ad5-CMV-GFP

LCLs lassen sich bekanntlich schwer mit Adenovirus infizieren und viele Gruppen haben gezeigt, daß selbst bei extrem hohen MOIs (5000–20.000) zuweilen nur niedrige Infektionsraten erbracht werden konnten.

Die Hauptschwierigkeit war daher, die LCLs so zu manipulieren, daß sie zusätzlich zu ihren zahlreichen EBV-Antigenen auch ausreichende Mengen an immunogenen AdV-spezifischen Proteinen exprimieren können, um ergänzend zu den immundominanten und subdominanten EBV-spezifischen auch AdV-spezifische Gedächtnis T-Zellen zur Proliferation anzuregen. Dazu war es notwendig LCLs hocheffizient mit Adenovirus infizieren zu können.

In Abbildung 26 wird gezeigt, daß Versuche bei denen LCLs mit ansteigenden MOIs (50–5000) des Ad5-CMV-GFP infiziert wurden, nur niedrige Expression des Transgenes zeigten. Erst ab einer MOI von 1000 konnte die GFP-Expression signifikant gesteigert werden.

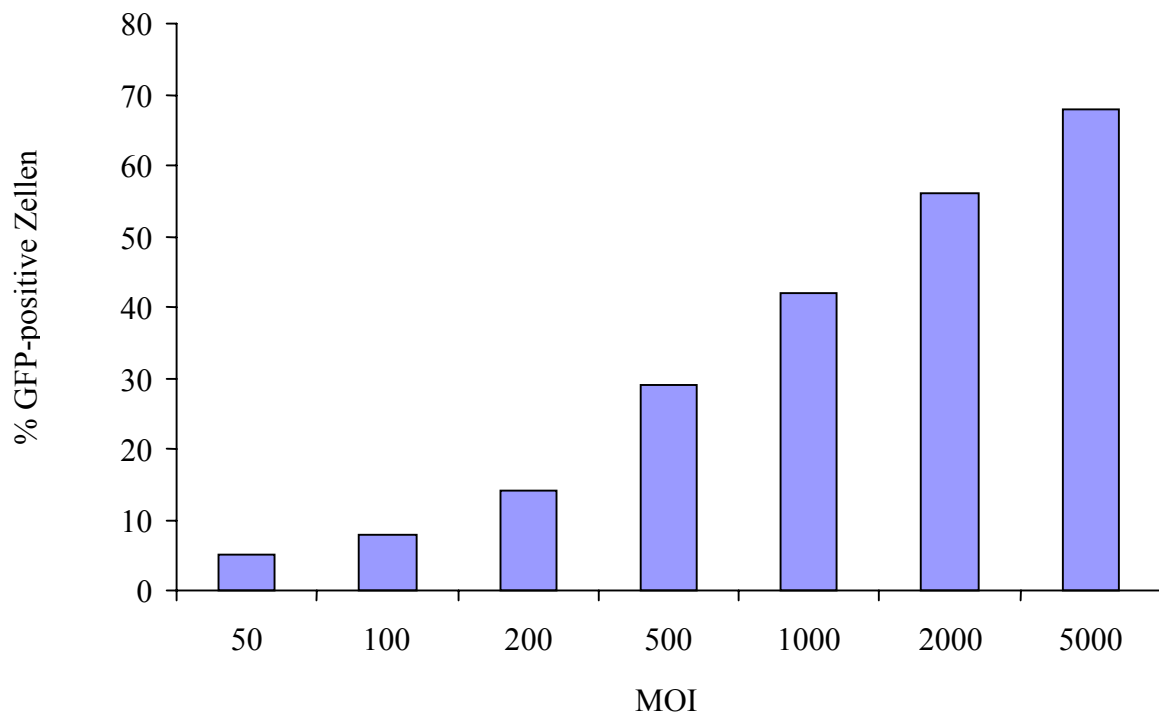


Abbildung 26. Durchflußzytometrische Analyse von AdV-infizierten B-LCLs
LCLs wurden mit steigenden Konzentrationen Ad5-CMV-GFP infiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet und der prozentuale Anteil GFP-exprimierender Zellen in der Durchflußzytometrie untersucht. Nicht infizierte LCLs dienen dabei als negative Kontrolle.

Allerdings hatten hohe MOIs von AdV auch eine signifikante Verminderung der Viabilität zur Folge, welches durch Anfärben der infizierten Zellen mit Trypanblau gezeigt werden konnte. Abbildung 27 zeigt den Einfluß des Virus auf die Viabilität der Zellen.

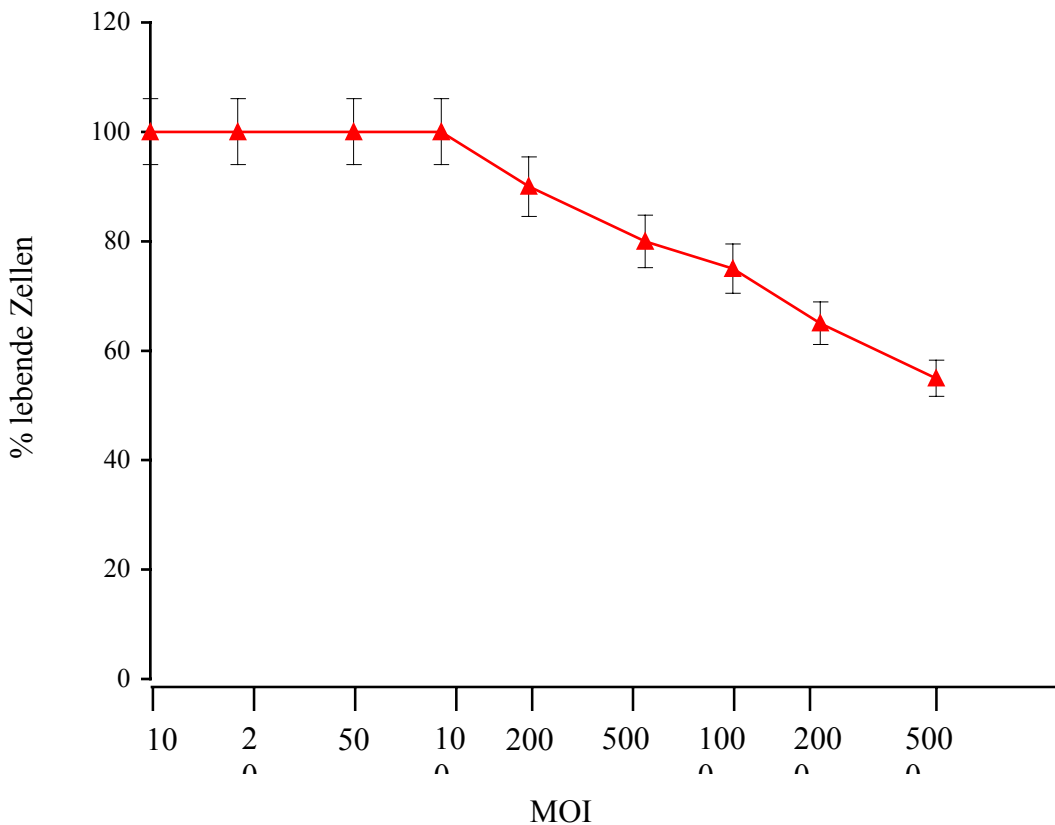


Abbildung 27: Viabilität der B-LCLs nach Infektion mit Ad5-CMV-GFP

B-LCLs wurden mit steigenden Konzentrationen des E1/E3 deletierten Ad5, der das GFP Reportergen trug, infiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet und durch Anfärben mit Trypanblau auf ihre Lebensfähigkeit hin getestet. Auf der Y Achse sind die Prozente der lebenden Zellen aufgetragen und auf der X-Achse die MOI. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

Innerhalb 24 Stunden nach der Infektion sinkt die Viabilität der Zellen (bei MOI 10-100) von 100 auf 90 % bei einer MOI von 200 und weiter auf 55 % bei einer MOI von 5000.

Da das Virus käuflich erworben wurde und der wirtschaftliche Faktor auch eine Rolle spielt bei der Erwägung einer potentiellen klinischen Anwendung, wurden keine höheren Viruskonzentrationen für das Testen der Infektionskapazität von LCLs verwendet. Aus diesem Grund wurden Versuche, die eine MOI von 200 überschritten auch nur drei mal durchgeführt und dies war ohnehin nur für das Testen der Infektionskapazität notwendig. Eine längere Inkubation von 48 bis 72 Stunden nach der Infektion bewirkte ein Ansteigen der Viabilität, bedingt durch die Teilungsgeschwindigkeit der lebenden Zellen bei gleichzeitiger Abnahme der Transgenexpression. Nach 72 Stunden überwog die Anzahl der lebenden Zellen bei allen MOIs, aber die GFP-Expression war nur noch schwach detektierbar.

Nachdem bestätigt werden konnte, daß LCLs tatsächlich nur mit sehr hohen AdV-Titern infiziert werden konnten, kam dieser Ansatz aus zwei Gründen für dieses Projekt nicht in Frage:

- * Zum Einen konnte gezeigt werden, daß hohe MOIs eine Verminderung der Viabilität zur Folge hatten. Die Qualität der für die Stimulation von T-Zellen verwendeten Antigenpräsentierenden Zellen ist von entscheidendem Interesse, um spezifische T-Zellpopulationen zu expandieren.
- * Der zweite Grund war der bereits erwähnte wirtschaftliche Faktor, der es uns aus Kostengründen nicht erlauben würde diesen Ansatz weiter zu forcieren. Daher stellten sich die beiden nächsten Fragen:
 1. Weshalb lassen sich LCLs so schwer mit dem Adenovirus infizieren, das bekanntlich ein breites Wirtsspektrum aufweist und sich daher auch als Vektorsystem in der Gentherapie eignet?
 2. Wie kann man die LCLs dennoch dazu bringen das Virus in die Zelle aufzunehmen?

Da bereits durch die Experimente mit den DCs gezeigt werden konnte, daß das $\alpha 5\beta 3$ -Integrin CD51 entscheidend an der Aufnahme des Adenovirus in die Zellen beteiligt ist, wurde die Expression dieses Moleküls auch auf LCLs untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß CD51 nur gering auf LCLs exprimiert wird. Im Falle des CAR-Rezeptors konnte überhaupt keine Expression nachgewiesen werden. Die geringe Infektionseffizienz der LCLs mit Adenovirus könnte daher durch die niedrige Expression von CD51 und die fehlende Expression des CAR-Rezeptors auf naiven LCLs erklärt werden.

Daher wurde zunächst versucht durch verschiedene Stimulationscocktails, bestehend aus unterschiedlichen Kombinationen von Wachstumsfaktoren (Zytokinen) eine Hochregulierung des CD51 Moleküls auf den LCLs zu bewirken. Die dazu verwendeten Zytokine waren Interleukin-4, da es *in vivo* von aktivierten TH2-Helfer-T Zellen gebildet wird und aktivierend auf B-Zellen wirkt, Interleukin-2, das nicht nur wachstumsfördernd auf T-Zellen, sondern auch stimulierend auf B-Zellen, sowie andere Effektorzellen des Immunsystems (NK-Zellen) wirkt, sowie Interferon- α , welches für seine vielfältigen Wirkungsweisen auf die Differenzierung von B-Zellen bekannt ist (Härfast *et al.* 1981). Darüber hinaus wurde Lipopolysaccharid (LPS) gewählt, ein Mitogen, daß B-Zellen ohne antigenen Stimulus direkt zur Proliferation anregen kann.

Verschiedene Konzentrationen von Interleukin-4 (50-1000 U/ml), IL-2 (20-200 U/ml), Interferon- α (50-500 U/ml) sowie Zugabe des bakteriellen Endotoxins Lipopolysaccharid wurden alleine oder in Kombinationen miteinander zum Kulturmedium der LCLs gegeben und diese für 24, 48 und 72 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die so stimulierten LCLs auf die Expression von CD51 hin untersucht und mit unstimulierten LCLs verglichen (Daten werden nicht gezeigt).

Allerdings hatte keiner dieser Ansätze eine Hochregulierung des CD51 Moleküls auf der Oberfläche der LCLs zur Folge.

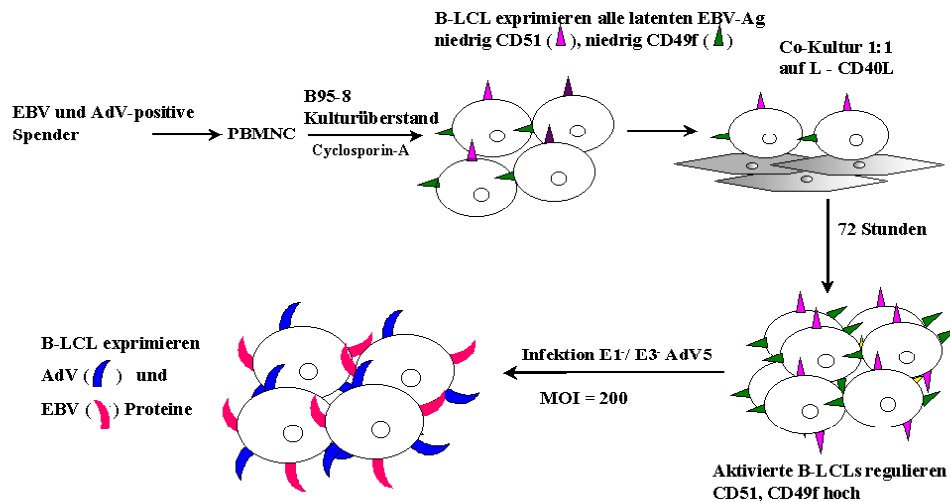
Da B-Zellen im Gegensatz zu DCs nicht über die Fähigkeit verfügen Makromoleküle durch Endozytose zu internalisieren, führte auch die Zugabe des Lipofectamins zu keiner erhöhten Infektionsrate, wobei der rezeptorvermittelte Infektionsweg hätte umgangen werden können. Deshalb blieb das vorherrschende Ziel die Expression des CD51 Moleküls auf den LCLs zu steigern in der Hoffnung damit eine höhere Infektionskapazität zu erzielen.

Kokultivierung von LCLs auf CD40-Ligand-exprimierenden Monolayern

CD40, ein Molekül, das aufgrund seiner Strukturverwandtschaft zur TNF-Gruppe von Rezeptormolekülen gehört stellt das wichtigste kostimulatorische Molekül auf B-Zellen dar. Diese werden *in vivo* durch TH2-Helfer-T Zellen über die Interaktion mit CD40L zur Proliferation und Differenzierung zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen, sowie zum Isotypwechsel angeregt. Somit erschien es ein aussichtsreicher Versuchsansatz zu sein, die LCLs über ein CD40L-exprimierendes Kokultursystem zu aktivieren, um eine verbesserte Infektionseffizienz zu erzielen. Dabei diente die murine Mausfibroblastenzelllinie (L-CD40L, Banchereau *et al.*, 1994), die nach retroviraler Transduktion stabil CD40L exprimiert, als „Feederlayer“ für die LCLs.

Die LCLs wurden in einer Ratio von 1:1 auf die bestrahlten Fibroblasten-Monolayer gesät und für 72 Stunden inkubiert. (siehe Abbildung 28).

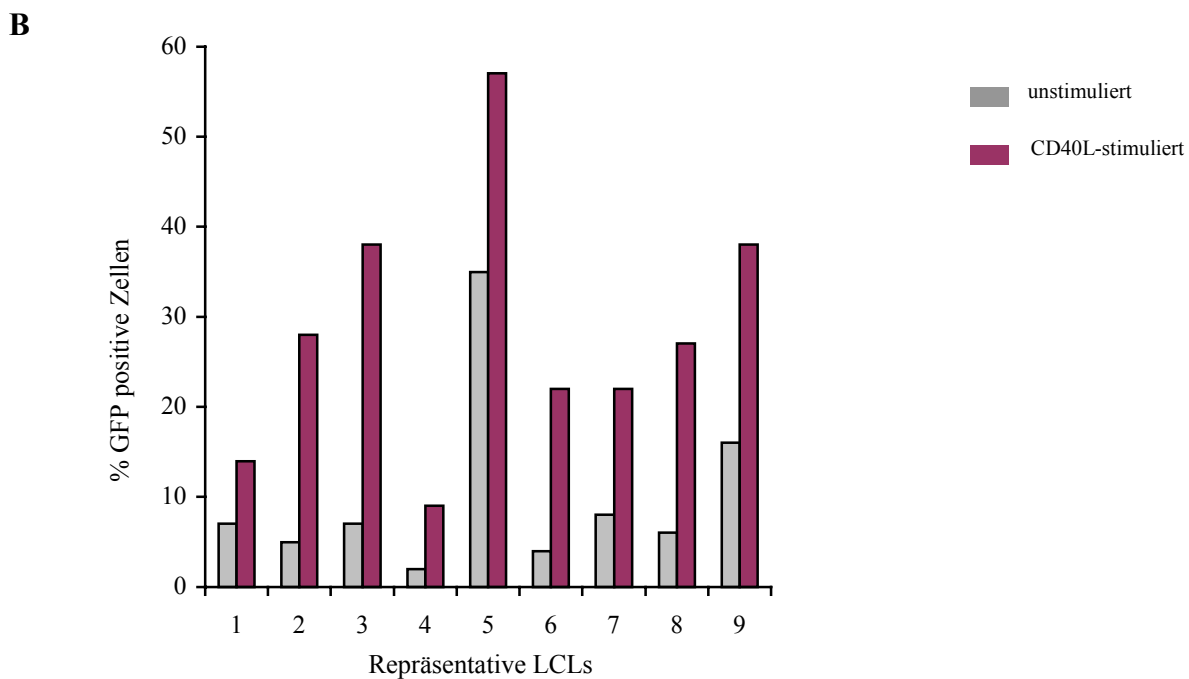
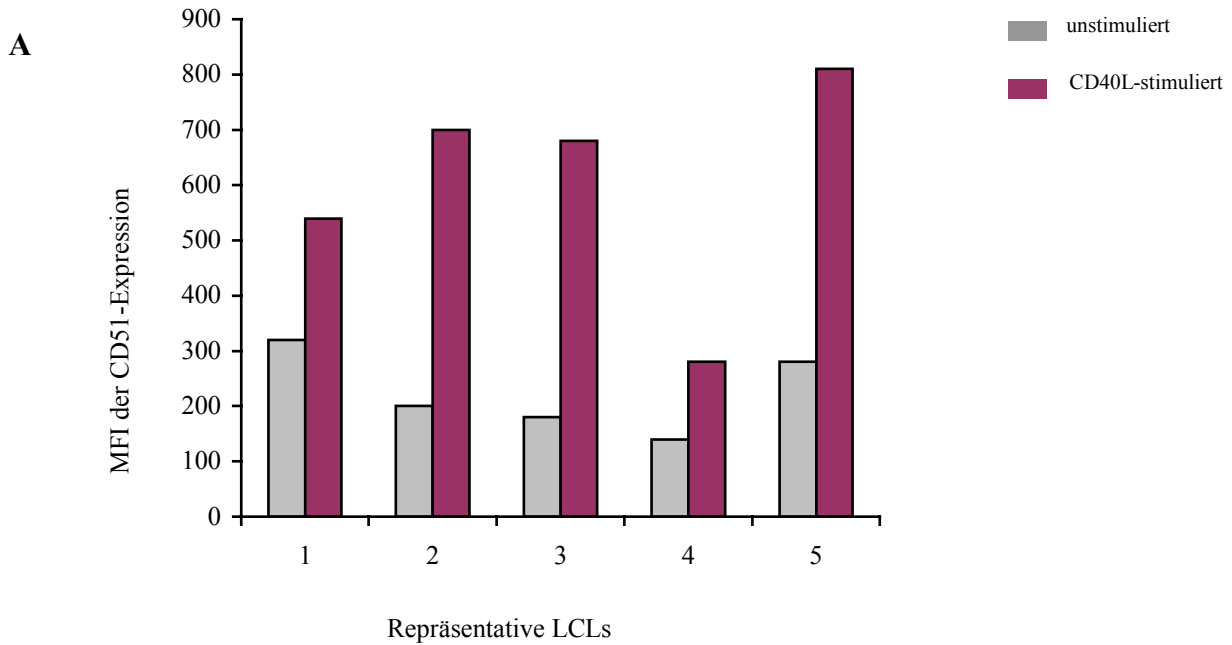
Abbildung 28: Schematische Darstellung des für die Stimulation von B-LCLs entwickelten Kokultursystems



Die so stimulierten LCLs wurden dann vorsichtig von dem adhärenen Zellrasen aufgenommen und unmittelbar danach auf die Expression von CD51 in der Durchflußzytometrie untersucht.

Abbildung 29 zeigt das Ergebnis der durchflußzytometrischen Analyse der B-LCLs vor und nach CD40L-Crosslinking.

Abbildung 29: Analyse der CD51-Expression und der Infektionskapazität durch AdV-CMV-GFP nach Kokultivierung der B-LCLs auf CD40L- exprimierenden Monolayern



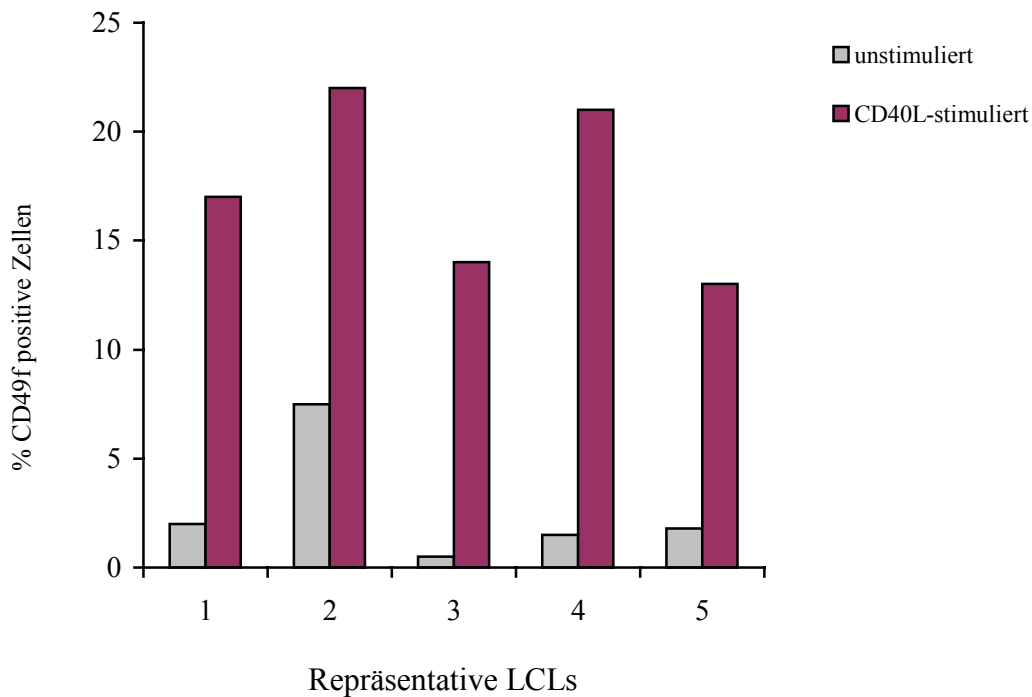
- A. MFI der CD51-Expression fünf repräsentativer B-LCLs, vor und nach der Stimulierung auf dem CD40L-Kokultursystem
- B. % GFP-positiver Zellen 24h nach der Infektion unstimulierter und CD40L-stimulierter B-LCLs mit AdV-CMV-GFP (MOI 200, 2h)

Dabei war die „mean fluorescence intensity“ (MFI = mittlere Fluoreszenz Intensität) der CD51 Expression signifikant in 4 von 5 repräsentativen LCL-Linien gesteigert (Abbildung 29 A). In einem zweiten Experiment wurden die gleichen LCLs vor und nach dem Crosslinken mit dem AdV-GFP bei einer MOI von 100-200 über einen Zeitraum von 2 bis 4 Stunden infiziert. 24 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen auf GFP Fluoreszenz in der Durchflußzytometrie untersucht. Abbildung 29 B zeigt, daß die infizierten LCLs, die nicht durch das CD40L-System stimuliert wurden, eine nur geringe Infektionsrate zeigten. Von den neun repräsentativen LCLs, die hier gezeigt werden, waren nur 2 von ihnen >10% positiv für GFP. Im Gegensatz dazu konnten diese gleichen LCLs, die durch CD40-CD40L Interaktion aktiviert wurden, signifikant besser mit Adenovirus infiziert werden. Alle getesteten neun LCLs zeigten eine Erhöhung in der Expression des GFP-Transgenes und der prozentuale Anstieg an GFP-positiven Zellen war signifikant ($p < 0.004$). Fünf von diesen LCLs waren die gleichen, die in Abbildung 30 A gezeigt wurden.

B-Zellen gehören ebenfalls zu den professionellen Antigen-präsentierenden Zellen, die sich ähnlich wie DCs durch ein weitreichendes Repertoire an kostimulatorischen Molekülen und an der Expression von MHC-II- Molekülen auszeichnen.

Darüberhinaus verfügen B-Zellen über spezifische Markermoleküle, die sie als solche charakterisieren, dazu gehören CD19, CD20 und CD21. Die CD40L stimulierten LCLs zeigten interessanterweise keine Veränderung bezüglich der Expression ihrer linienspezifischen Oberflächenmarker oder ihrer kostimulatorischen oder MHC-Moleküle im Vergleich zu unstimulierten LCLs. Nur das Integrin CD49f, wurde durch die CD40L-Stimulierung signifikant höher exprimiert. In Abbildung 31 wird der Phänotyp von fünf charakteristischen LCL Linien hinsichtlich ihrer CD49f Expression dargestellt. Anhand des prozentualen Anteils der CD49f Expression konnte gezeigt werden, daß unstimulierte LCLs den Integrinrezeptor entweder gar nicht oder kaum höher exprimieren als 7%. Kokultivierung der gleichen Zellen auf dem CD40L-exprimierenden Monolayer erzielte eine signifikante Hochregulierung des Moleküls bei allen untersuchten LCL Populationen mit einem maximalen Wert von 22 Prozent CD49f positiver Zellen.

Abbildung 30: Expression von CD49f vor und nach der Stimulation der B-LCLs auf den CD40L-Fibroblasten



Gesteigerte Expression von CD49f auf B-LCLs, die auf dem CD40L-exprimierenden Kokultursystem stimuliert wurden.

In einem weiteren Versuch sollte geklärt werden, ob die Zugabe von IL-4 zu der Kokultur einen Einfluß auf die Expression der untersuchten Moleküle, im Gegensatz zu den Zellen zeigen, die alleine mit dem CD40L exprimierten Monolayer kokultiviert wurden. Dies war nur insofern eine interessante Fragestellung, da *in vivo* TH2-Helferzellen B-Zellen durch die Bindung an CD40 zur Sekretion von IL-4 anregen. Das IL-4 wird dann nur in den Zwischenraum zwischen der Kontaktstelle der T und der B-Zelle entlassen und trägt unmittelbar zur Aktivierung und zur Differenzierung der B-Zelle bei. Offensichtlich hatte aber in diesem *in vitro* Kokultursystem die Zugabe von IL-4 (100- 1000 U/ml) keinen verstärkenden Einfluß auf die Expression der untersuchten Moleküle (*Daten werden nicht gezeigt*).

Immunstimulatorische Kapazität AdV-infizierter LCL

a) allogene MLR-Assays

Nachdem gezeigt werden konnte, daß die über die CD40-CD40L- Interaktion aktivierten LCLs signifikant besser mit Adenovirus infiziert werden konnten als unstimulierte LCLs, sollte nun auch überprüft werden, ob die so stimulierten, mit AdV-infizierten LCLs auch in der Lage sind, die Induktion der T-Zell-Proliferation zu bewirken. Dazu wurden zunächst allogene MLR-Assays durchgeführt. Unterschiedliche Mengen (Ratio 5:1 bis 150:1) von bestrahlten AdV-infizierten LCLs und uninfizierten LCLs wurden dabei mit aufgereinigten, allogenen, HLA-mismatched T-Zellen gemischt. Nach 6 Tagen wurde die Proliferation der T-Zellen mit Hilfe des [³H]Thymidineinbau gemessen. In Abbildung 31 konnte gezeigt werden, daß die AdV-infizierten LCLs eine ähnliche immunstimulatorische Aktivität ausübten, wie die uninfizierten LCLs.

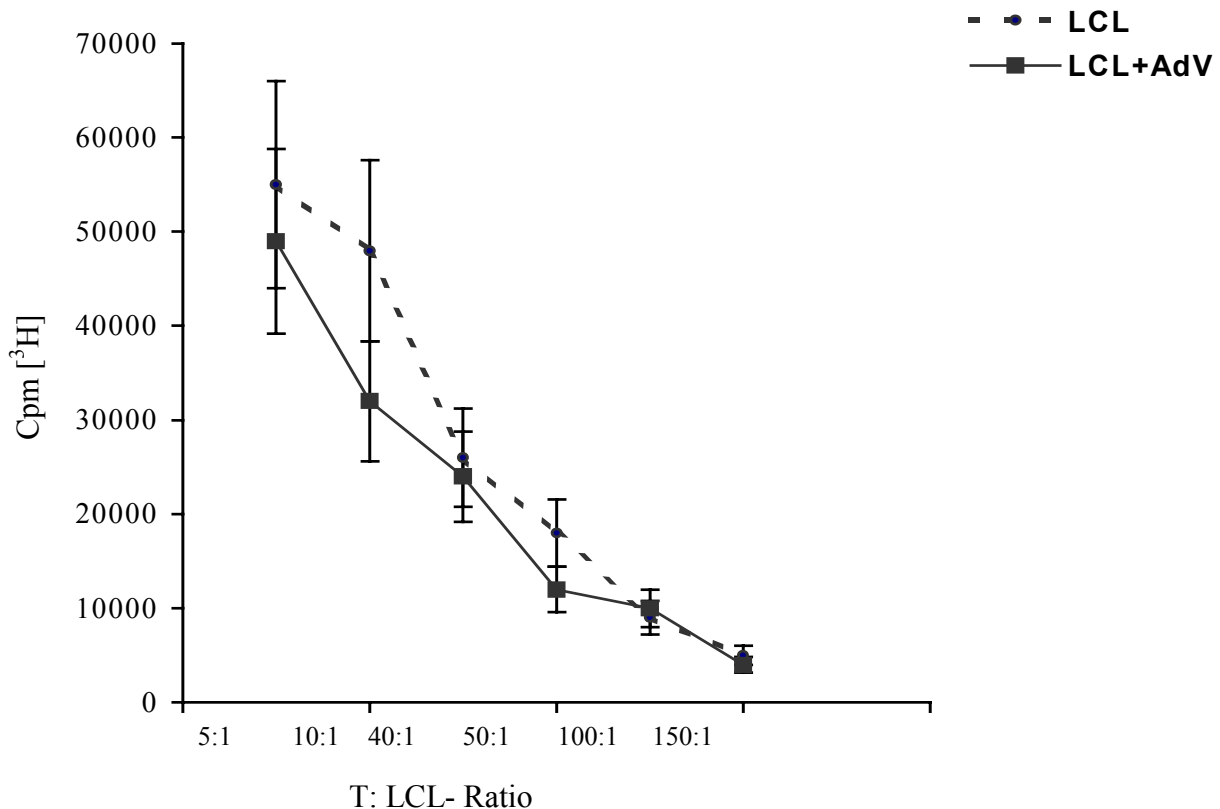


Abbildung 31: Proliferationskapazität allogener T-Zellen nach Kokultivierung mit AdV-infizierten bzw. nicht infizierten B-LCLs

Variierende Anzahlen von bestrahlten AdV-infizierten oder uninfizierten LCLs wurden mit HLA-mismatched aufgereinigten und negativ selektierten T-Zellen für 5 Tage inkubiert. Anschließend wurde der Einbau von [³H]-Thymidin gemessen (cpm). Die dargestellten cpm wurden gegenüber den Hintergrundmeßwerten proliferierender T-Zellen alleine und den LCLs alleine korrigiert. Die Werte zeigen die arithmetischen Mittelwerte und Standardabweichungen von acht Experimenten

waren (> 70 %), sich aber auch ein signifikant hoher Anteil an CD3⁺CD8⁺ T-Zellen (< 20 %) innerhalb der Population befand. Darüber hinaus konnte eine kleine Menge (<10%) von CD56⁺ NK Zellen in beiden Gruppen detektiert werden.

Tabelle 31.1: Phänotyp der proliferierenden T-Zellen

Phänotyp der T-Zellen	Stimulation: LCL	Stimulation: LCL+AdV
CD3/CD4	71,8 ± 9,8 %	72,7 ± 18 %
CD3/CD8	17,1 ± 6,2 %	16,9 ± 8 %
CD3/CD56	3,7 ± 0,9 %	7,2% + 3,5 %

b) autologe MLR-Assays

Nachdem die immunstimulatorische Kapazität AdV-infizierter LCLs in der allogenen MLR ähnlich hoch war, wie bei den nicht infizierten LCLs war es nun von besonderem Interesse herauszufinden, inwieweit dies auch für die autologe Situation zutreffen würde. Wie in Abbildung 32 ersichtlich konnten im Gegensatz zum allogenen System die AdV-infizierten LCLs (n=4) die Proliferation von autologen T-Zellen signifikant besser stimulieren als native LCLs ($p < 0.005$). Auch hier ergab die immunphänotypische Analyse eine Dominanz an $CD3^+CD4^+$ T-Zellen (>50%) und einen signifikanten Anteil an $CD3^+CD8^+$ T Zellen (20%), sowie einem verschwindenden Anteil an $CD56^+$ -Zellen (<1%) (Tabelle 32.1).

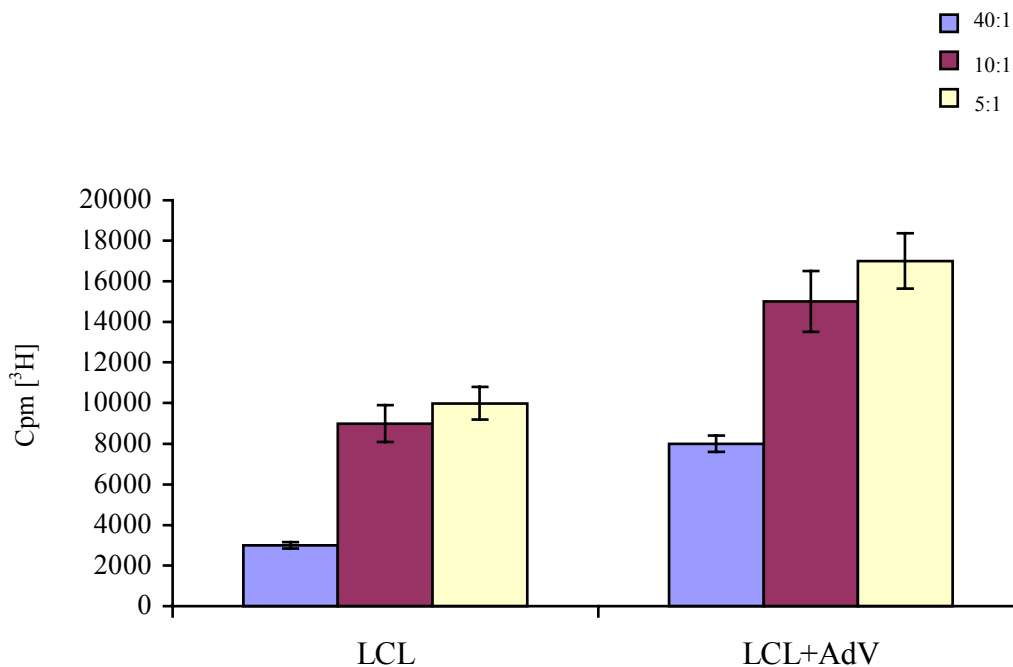


Abbildung 32: Immunstimulatorische Kapazität autologer AdV-infizierte LCLs gegenüber nicht infizierten autologen LCLs

Variierende Anzahlen von bestrahlten AdV-infizierten oder uninfizierten LCLs wurden mit autologen aufgereinigten und negativ selektierten T-Zellen für 5 Tage inkubiert. Anschließend wurde der Einbau von [³H]-Thymidin gemessen (cpm). Die dargestellten cpm wurden gegenüber den Hintergrundmeßwerten proliferierender T-Zellen alleine (< 300 cpm) und den LCLs alleine (1200 ± 500 cpm) korrigiert.

Tabelle 32.1: Phänotyp der proliferierenden T-Zellen

Phänotyp der T-Zellen	Stimulation: LCLs	Stimulation: LCLs + AdV
CD3/CD4	55,1 ± 10%	53,5 ± 15,4 %
CD3/CD8	20,8 ± 11,2%	19,6 ± 7,8 %
CD3/CD56	0,14 ± 0,1 %	0,3 ± 0,1 %

Simultane In vitro-Expansion AdV- und EBV-spezifischer ZTL

Nachdem bewiesen werden konnte, daß die über CD40L stimulierten AdV- infizierten LCLs hohe immunstimulatorische Aktivität aufweisen, sollte desweiteren die Kapazität dieser Zellen getestet werden, die simultane Expansion sowohl Adenovirusspezifischer als auch EBV-spezifischer zytotoxischer T-Zellen zu bewirken. Um simultan ZTL zu expandieren, die gleichermaßen AdV- und EBV-exprimierende Zielzellen erkennen können wurden AdV-infizierte LCLs mit autologen PBL kokultiviert. Wie bei den AdV-spezifischen ZTL betrug die Anfangsratio der primären Startkultur (40:1), 2×10^6 autologe PBL und 5×10^4 bestrahlte AdV+LCLs. Nach zehn Tagen wurde auch hier die sich entwickelnde ZTL-Kultur zum ersten Mal mit bestrahlten autologen AdV+LCLs in einer Ratio von 4:1 (ZTL:LCL) restimuliert. Nach einer weiteren Restimulation mit AdV+LCLs wurde ausschließlich nur mit autologen LCLs (4:1) restimuliert, wobei am Tag 17 niedrigdosiertes IL-2 (20 U/ml) dem Kulturmedium zugefügt wurde. Die so stimulierten ZTL zeigten im Gegensatz zu den monospezifischen ZTL ein verzögertes Wachstum. Erst nach 5 bis 7 Wochen wurde die Spezifität der expandierten ZTL in vierstündigen $^{51}\text{Chrom}$ -freisetzungstests überprüft. Als autologe Zielzellen wurden LCLs, AdV-infizierte DCs and uninfizierte DCs verwendet. Als allogene Zielzellen dienten HLA-mismatched LCLs, AdV-infizierte und uninfizierte DCs, sowie die NK-sensitive Zelllinie HSB2.

Wie Abbildung 33 veranschaulicht, wurden nur die autologen LCLs ($70,1 \pm 7.4$ % bei einer E:T Ratio von 40:1) und die autologen AdV-infizierten DCs (62 ± 15.2 % bei einer E:T Ratio von 40:1) von den ZTL erkannt und lysiert. Die Experimente wurden mehrfach (n=4) durchgeführt und in ihren Ergebnissen bestätigt, welches den Schluß zuläßt, daß ZTL, die nach der oben beschriebenen Methode generiert wurden, sowohl für EBV, als auch für AdV spezifisch sind. In keinem der Ansätze konnte eine signifikante Lyse der anderen autologen oder allogenen Targetzellen ermittelt werden. Darüber hinaus war auch der Prozentsatz an

HSB2 -spezifischer Lyse nicht signifikant (<5 %) wonach der Anteil an MHC-unabhängiger Lyse als gering bewertet werden konnte.

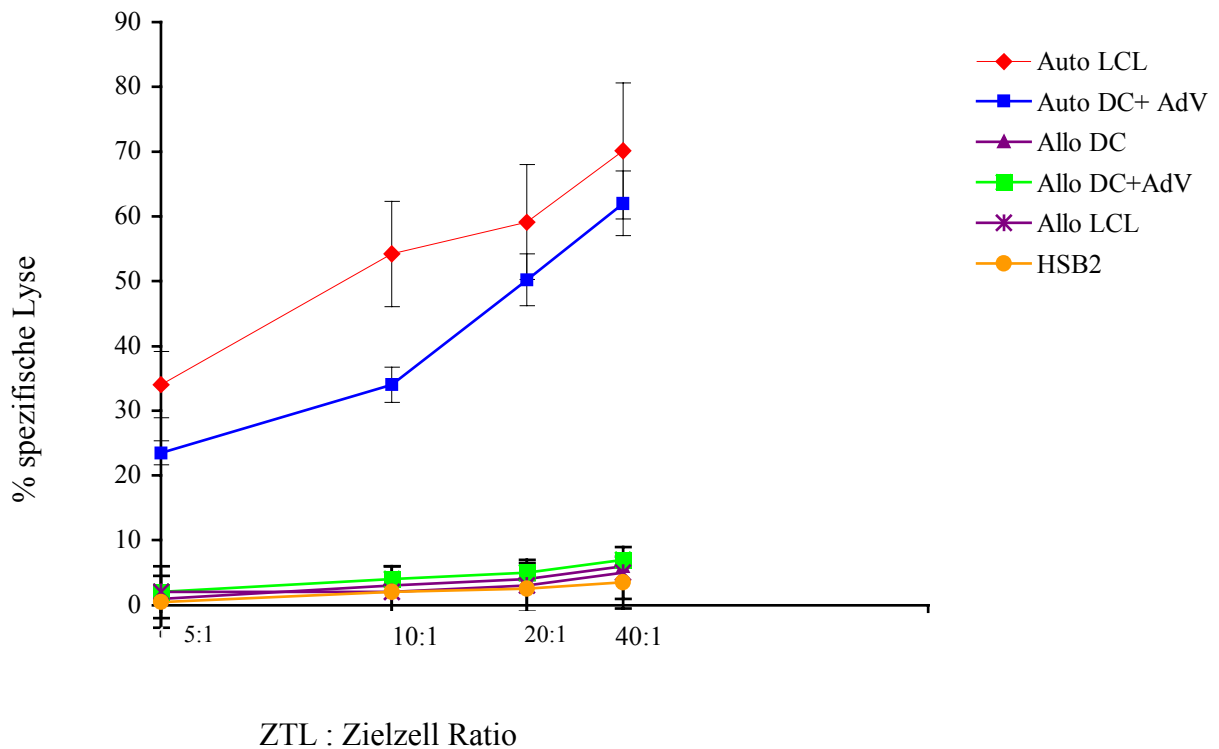


Abbildung 33: Bestimmung der zytotoxischen Aktivität AdV/EBV-spezifischer ZTL nach Expansion über CD40L-stimulierte AdV-infizierte B-LCLs

Die Graphik zeigt CD40L-stimulierte LCLs, die nach ihrer Infektion mit AdV mit autologen PBL kokultiviert wurden. Nach 5 bis 7 Wochen wurde die Spezifität der Linien in Standard Chromfreisetzungstests ermittelt. Die Verhältnisse von Effektoren (E) zu Targets (T) betrug 40:1 → 20:1 → 10:1 und 5:1. Die Graphik stellt den Logarithmus der E:T- Zellzahlen auf der X-Achse dar. Die Ergebnisse repräsentieren den arithmetischen Mittelwert und die Standardabweichung von vier Experimenten.

Um jedoch zu bestätigen, daß die „bispezifische“ Lyse der Zielzellen von MHC-abhängigen Effektorzellen verübt wurde, wurden die autologen EBV-exprimierenden LCLs und die AdV-infizierten autologen DCs mit monoklonalen Antikörpern inkubiert, die entweder gegen HLA Klasse I oder Klasse II gerichtet waren, bevor sie mit den ZTL in Kontakt kamen. In Abbildung 34 wird die MHC-Abhängigkeit der spezifischen Lyse dargestellt.

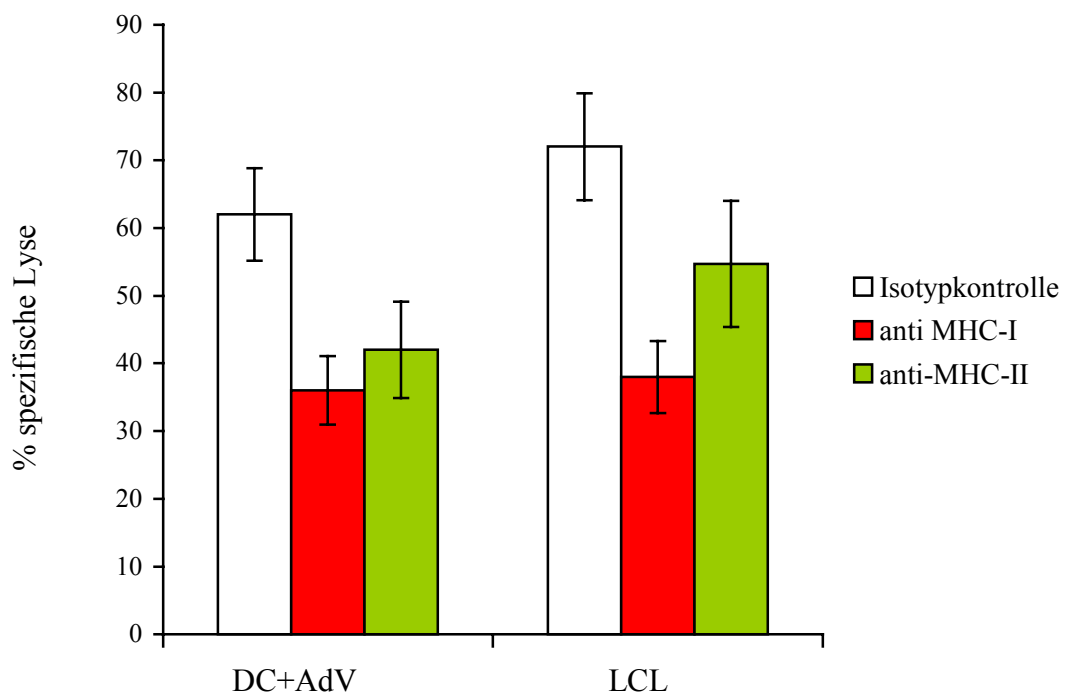


Abbildung 34: MHC-Inhibierung der AdV/EBV-spezifischen Zytotoxizität

Autologe AdV-infizierte DCs und autologe LCLs wurden zur Bestimmung der MHC-Abhängigkeit der „bispezifischen“ Lyse vor der Inkubation mit den ZTL mit W6/32 (monoklonaler Antikörper der gegen MHC-Klasse I gerichtet ist) oder mit CR3/43 (monoklonaler Antikörper der gegen MHC-Klasse II gerichtet ist) markiert. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert und die Standardabweichungen der spezifischen Lyse von AdV/EBV-spezifischen ZTL-Linien, bei einer Ratio von 40:1

In der Abbildung 34 wird gezeigt, daß auch hier die Bindung der monoklonalen Antikörper an die HLA-Moleküle auf der Zelloberfläche von sowohl autologen AdV-infizierten DCs als

auch von autologen LCLs die spezifische Lyse durch die ZTL herabsetzt. Insgesamt schien hier die Lyse durch CD3+/CD8+ ZTL zu dominieren. Bei den AdV-infizierten DCs wurde die MHC-Klasse-I vermittelte Lyse von 62 % auf 36 % gesenkt, während sich die MHC-Klasse-II vermittelte Lyse auf 42 % reduzierte. Das Inhibitionsmuster bei der autologen LCL Lyse war noch stärker in Richtung MHC-I abhängiger Lyse verschoben. Inkubation der autologen LCL Zielzellen mit dem unkonjugierten HLA-ABC Antikörper vermittelte eine Lysehemmung von 70 % auf 37 % und einer Klasse II Antikörperinhibierung der Lyse auf 54.7 %. Immunphänotypisierung der ZTL ergab eine Dominanz an CD8+ T-Zellen, aber auch einem signifikant hohen Anteil an CD3+/CD4+ T-Zellen. Außerdem konnte eine T-Zellsubpopulation mit einem NK-Phänotyp mit einem nicht signifikanten Anteil von 3 bis 4,5 % ermittelt werden. Tabelle 34.1 zeigt einen Überblick der durchflußzytometrischen Analyse.

Tabelle 34.1 Immunphänotypisierung „bispezifischer“ ZTL-Linien

Immunphänotyp	% positiver Zellen
CD3/CD8	52.6 ± 14.7 %
CD3/CD4	34.9 ± 10,4 %
CD3/CD56	3 ± 1,5 %

Um ferner zu zeigen, daß die über AdV-infizierte LCLs stimulierten ZTL tatsächlich „bispezifisch“ gegen autologe AdV- und EBV-exprimierende Zielzellen gerichtet waren, wurden von den gleichen Spendern immer auch monospezifische ZTL generiert, die durch nicht infizierte, LCLs stimuliert wurden. Diese ZTL erkannten und töteten nur die autologen LCLs und zeigten keinerlei Reaktivität gegenüber den AdV-infizierten autologen DCs.

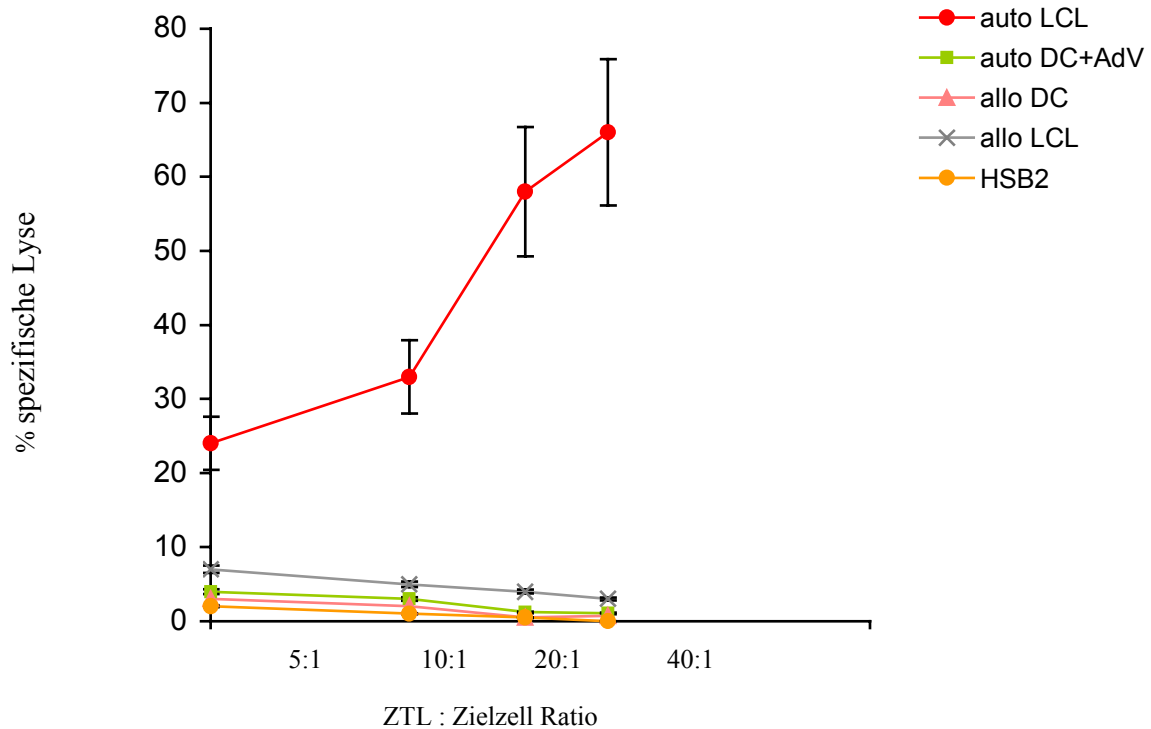


Abbildung 35: Bestimmung der zytotoxischen Aktivität „monospezifischer“ ZTL, nach Expansion über autologe CD40L-stimulierte, nicht-infizierte LCLs

Nach 5 bis 7 Wochen wurde die Spezifität der Linien in Standard Chromfreisetzungstests ermittelt. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung von drei Experimenten.

Wie in Tabelle 35.1 zu sehen, ergab die phänotypische Analyse der „monospezifischen“ LCL-ZTL eine hohe Dominanz von CD8⁺ T-Lymphozyten.

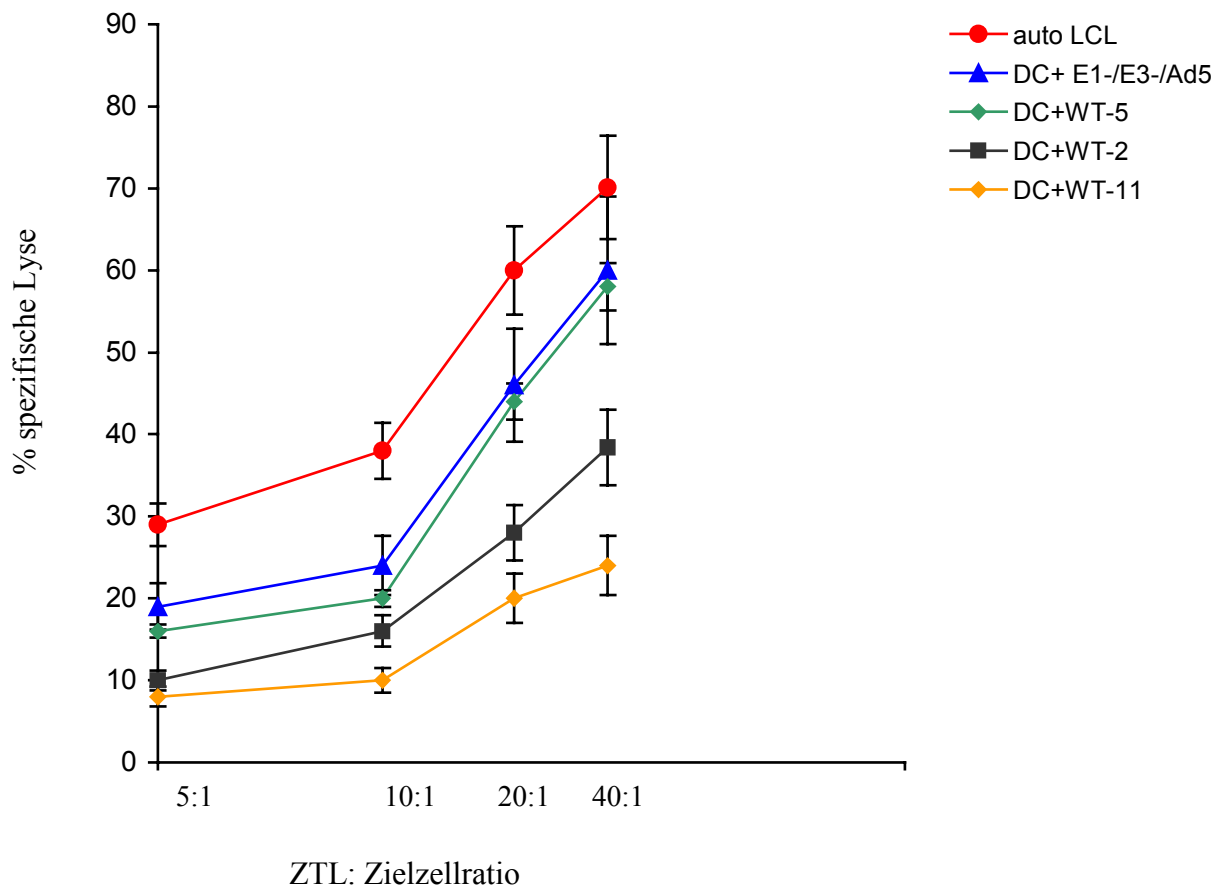
Tabelle 35.1 Immunphänotypisierung „monospezifischer“ LCL- ZTL-Linien

Immunphänotyp	% positiver Zellen
CD3/CD8	82,4 ± 17,0 %
CD3/CD4	17,8 ± 7,4 %
CD3/CD56	0,5 %

Analyse der Kreuzreaktivität AdV/EBV-„bispezifischer“ ZTL gegenüber Epitope anderer adenoviraler Serotypen.

Um zu zeigen, daß die hier generierten „bispezifischen“ ZTL, genauso wie die AdV-„monospezifischen“ ZTL auch Epitope anderer adenoviraler Serotypen erkennen können, wurde in Chromfreisetzungstests die Spezifität dieser ZTL-Linien getestet, Zielzellen zu erkennen und zu töten, die mit anderen Serotypen infiziert wurden. Wie bei den monspezifischen ZTL wurden für den Einsatz in Zytotoxizitäts-Assays autologe Dendritische Zellen mit den verschiedenen adenoviralen Wildtyp Viren vom Typ 5, 2 und 11 infiziert. In mehreren Ansätzen (n=3) konnte demonstriert werden, daß EBV⁺ und AdV⁺ - bispezifische ZTL, die gegen einen deletierten Adenovirus vom Typ 5 generiert worden waren sowohl autologe Dendritische Zellen erkennen und töten konnten, die mit dem deletierten Originalvirus infiziert worden waren (unbeachtet des GFP-Reportergens), als auch autologe DCs, die entweder mit dem Wildtyp-Ad5, Wildtyp Ad2 oder Wildtyp Ad11 infiziert worden waren. Gleichzeitig zeigten diese ZTL eine unverminderte Reaktivität gegenüber den autologen LCLs. In Abbildung 36 wird das Ergebnis dieser Versuche eindeutig dargestellt.

Abbildung 36: Kreuzreaktivität AdV/EBV-,bispezifischer ZTL



Ermittlung der Kreuzreaktivität in Standard Chromfreisetzungstests:
Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert und die Standardabweichungen der % spezifische Lyse von drei Experimenten.

Abbildung 36 zeigt deutlich, daß die höchste Zytotoxizität zwar gegenüber den Zielzellen, die mit dem deletierten Adenovirus Typ5 infiziert worden waren gerichtet wurde ($60 \pm 5,7 \%$), jedoch ist der Anteil an spezifischer Zytotoxizität gegenüber den anderen adenoviralen Serotypen ebenfalls hochsignifikant in allen drei Linien, die getestet wurden. So lag die Zytotoxizität gegenüber Wildtyp-Ad5-infizierten DCs $58 \pm 5,2 \%$, gegenüber Wildtyp Ad2-infizierten DCs bei $38,4 \pm 6\%$ und gegenüber Wildtyp-Ad 11-infizierten DCs bei $24 \pm 9 \%$ bei einer E:T Ratio von 40:1.

Die immunphänotypische Analyse der ZTL bestätigte erneut die bereits beschriebenen Ergebnisse, nämlich das eine Dominanz an $CD3^+/CD8^+$ T-Zellen, die zwischen 60 und 80 % lag und einer signifikant hohen Population an $CD3^+/CD4^+$ T-Zellen, der zwischen 20 und 40 % lag. Der Anteil an $CD56^+$ NK-Typ-Zellen lag unterhalb des 5% Signifikanzniveaus.

Aufgrund der hier dargestellten Daten kann die Hypothese aufgestellt werden, daß die in dieser Arbeit hergestellten virusspezifischen zytotoxischen T-Zellpopulationen in der Lage sind spezifisch und einzigartig gegen virale Peptide zu reagieren, die ihnen exklusiv auf Selbst-MHC-Komplexen im strikt autologen System präsentiert werden. In diesem System konnten keine Kreuzreaktivitäten mit Zellen anderer HLA-Spezifitäten ermittelt werden in der Annahme, daß eine MHC- unrestringierte Erkennung als gering zu bewerten ist. Diese Zellen sind nicht in der Lage nach dem Prinzip der „missing-self Hypothese“ Zellen zu lysieren, die gar keine MHC-Oberflächenmoleküle exprimieren und daher empfänglich wären um von Natürlichen Killerzellen erkannt zu werden. Dies ist eine besonders wichtige Beobachtung, da ausgeschlossen werden kann, daß die ZTL sich gegen gesunde, nicht infizierte Zellen des Patienten richten. Schließlich kann postuliert werden, daß der adoptive Transfer dieser Zellen in immunsupprimierte Patienten einen sicheren und effektiven Weg darstellen würde, um die fehlende Immunität gegen virale Pathogene zu korrigieren.

DISKUSSION

Nach einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation in Begleitung einer schwerwiegenden Immunsuppression ist die Reaktivierung latenter Viren, so wie AdV, EBV und CMV verbunden mit signifikanter Morbidität und Mortalität. Die eingeschränkte Wirkungsweise von antiviralen chemotherapeutischen Medikamenten auf der einen Seite und darüber hinaus das wachsende Interesse am Verständnis der zellulären Immunantworten gegen virale Pathogene auf der anderen Seite, hat die Entwicklung von adoptiven Immuntherapien für stark immunsupprimierte Patienten vorangetrieben. Bereits 1993 konnte in klinischen Studien demonstriert werden, daß durch adoptiven Transfer unmanipulierter Spenderlymphozyten ein Rückgang EBV induzierter Lymphome in Patienten nach allogener T-Zell-depletierter HSCT erzielt werden konnte. Dieser Ansatz war jedoch stark mit dem Auftreten von GvHD assoziiert (Papadopoulos *et al.* 1994). Riddell und Greenberg haben sich dann als erstes mit der Entwicklung Virusspezifischer, gegen CMV gerichtete zytotoxische T-Lymphozyten beschäftigt und haben diese Methode auch zur Anwendung in klinischen Studien der Phase I gebracht. Da damals noch die Meinung vorherrschte, daß nur CD8⁺ T Zellen eine antivirale Zytotoxizität vermitteln könnten, war der Versuch CMV- spezifische CD8⁺ T-Zellklone zur dauerhaften Restaurierung einer CMV- gestörten T-Zellimmunität einzusetzen durch die Abwesenheit Virusspezifischer CD4⁺ Helferzellen wenig erfolgreich. Die infundierten CD8⁺ Klone persistierten nur für 12 Wochen (Riddell *et al.* 1995, Dazzi und Goldman 1998).

Die ersten wirklich erfolgreichen Hinweise, daß solche Therapieansätze als Prophylaxe für Patienten eingesetzt werden können, die nach einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation EBV⁺ Lymphome entwickeln, stammen von den klinischen Studien der Gruppe von Rooney *et al.*, die demonstrieren konnten, daß der adoptive Transfer von *in vitro* generierten EBV-spezifischen ZTL in 39 Patienten, die ein T-Zell-depletieretes Stammzelltransplant erhielten, das Auftreten einer EBV-LPD in 100 % der Fälle verhinderten (Brenner *et al.* 1997, Heslop *et al.* 1995, 1996). Bei einer anderen Patientengruppe, gleicher medizinischer Indikation, die keine EBV-spezifischen ZTL erhielten, lag das Auftreten von EBV⁺ Lymphomen, innerhalb der ersten zwölf Monate nach der Transplantation bei 11.5%. (Heslop *et al.* 1995, 1996) Die polyklonalen (CD4⁺ und CD8⁺) EBV-spezifischen Spender-T-Zelllinien konnten *in vivo* expandiert werden und persistierten bis zu 78 Monaten und zeigten einen antiviralen Effekt in *ex vivo* generierten ZTL Linien. Entscheidend war außerdem, daß mit der Infusion dieser ZTL weder kurzfristig noch langfristig eine Entwicklung signifikanter Nebenwirkungen verbunden war. Darüber hinaus war die Beobachtung, daß durch diese Form

des adoptiven Transfers auch keine GvHD hervorgerufen wurde, der auffallendste Hinweis, daß infundierte EBV-spezifische ZTL die antivirale and antitumorale Immunität wiederherstellen können. Ergänzend zu diesen Studien konnte ferner die Erfahrung gewonnen werden, daß bereits etablierte EBV⁺ Lymphome vernichtet werden konnten, die in zwei Patienten auftraten, die ein T-Zell-depletiertes Transplantat erhielten aber keine prophylaktischen EBV⁺ ZTL.

Bei diesen Patienten konnten die ZTL direkt als Therapie eingesetzt werden. Deshalb ist die Bedeutung der Infusion EBV-spezifischer ZTL von offensichtlicher Aktualität für immunsupprimierte Patienten nach allogener hämatopoetischer Transplantation.

Die Behandlung post-transplantärer EBV-LPD mit pharmakologischen Medikamenten war bisher stark limitiert. Seit kurzer Zeit wird von der Firma Genentech ein B-Zell-spezifischer humanisierter CD20-Antikörper mit dem kommerziellen Namen „Rituximab“ angeboten, der für die Behandlung von follikulärem Lymphoma entwickelt wurde. Dieser Antikörper konnte bereits sehr erfolgreich zur Behandlung von EBV⁺LPD eingesetzt werden. Bei fortgeschrittenen Erkrankungen, sowie bei CD20 negativen Tumoren kann dieser Therapieansatz jedoch nicht verwendet werden (Milpied *et al.* 2000, Kuehnle *et al.* 2000). Darüber hinaus verursacht „Rituximab“ eine Verminderung von B-Zellen für die Dauer von ungefähr sechs Monaten.

EBV-spezifische ZTL werden am Center for Cell and Genetherapy am Baylor College for Medicine in Houston mittlerweile routinemäßig für die Therapie von Hochrisikopatienten entwickelt. Es gibt aber auch diverse Indikationen, bei denen eine ZTL-Therapie für einen Patienten nicht verfügbar ist, oder diese Therapie keine Erfolgsaussichten verspricht. In diesen Fällen konnte „Rituximab“ positiv eingesetzt werden (Kuehnle *et al.* 2000).

Andere chemotherapeutische Medikamente zur Kontrolle opportunistischer Infektionen haben bisher keinen hinreichenden Erfolg zeigen können. Das größte Problem stellen dabei auch die organotoxischen Nebenwirkungen dieser Medikamente dar, die für die ohnehin durch das höchst toxische Konditionierungsprotokoll belasteten Transplantationspatienten, erschwerend hinzukommen. Außerdem haben diese Medikamente aufgrund ihrer verzögerten Wirkungsweise keine Chance eine fortgeschrittene Viruserkrankung zu kontrollieren.

Da das Auftreten dieser therapiebedingter Toxizitäten zu einer signifikanten Mortalitätsrate bei Transplantationspatienten führt, investieren weltweit viele Transplantationszentren in die Entwicklung von Konditionierungstherapien mit verminderten Toxizitäten auf die angrenzenden Organe. Deshalb sind gerade Therapiemöglichkeiten zur Unterstützung der

immunologischen Regenerierung gegen virale Pathogene, die keine toxischen Nebenwirkungen zur Folge haben, besonders wertvoll.

Obwohl CMV und EBV die häufigsten Erreger posttransplantärer Komplikationen sind, gehört mittlerweile auch Adenovirus zu den Pathogenen, die zunehmend für das Auftreten opportunistischer Infektionen verbunden mit signifikanter Morbidität und Mortalität verantwortlich gemacht werden (La Rosa *et al.* 2001, Venard *et al.* 2000, Hale *et al.* 1999, Carrigan *et al.* 1997). Der Grund weshalb erst in letzter Zeit Adenovirus mit viral induzierten posttransplantären Erkrankungen in Zusammenhang gebracht wird, waren unzureichende Nachweismethoden und die Tatsache, daß AdV in vielen verschiedenen Serotypen vorkommt, die darüber hinaus noch in sechs Genotypen unterklassifiziert sind, hat das Aufspüren des Virus noch zusätzlich erschwert (Echavarria *et al.* 1999). Neu entwickelte, auf der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR=polymerase chain reaction) basierende Methoden sind aber mittlerweile sensitiv genug, um schon frühe Ausscheidungen des Virus im Urin, der Tränenflüssigkeit und der Bronchiallavage nachweisen zu können (Echavarria *et al.* 1999, Hale *et al.* 1999). Bereits etablierte Infektionen führen in der Hauptsache zu hämorrhagischer Urocystitis. Andere Komplikationen sind interstitielle Pneumonie, Gastroenteritis, Hepatitis und Konjunktivitis. Das Vorkommen von Adenovirus liegt zwischen 3 und 15 % bei Patienten nach allogener Transplantation und ist höher bei T-Zell-depletierten allogenen Transplantaten (bis zu 20%, Childs *et al.* 1998, Carrigan *et al.* 1997). Bei diesen Patienten liegt die Mortalitätsrate bei >50% (Hale *et al.* 1999, La Rosa *et al.* 2001). Bei Kindern liegen die Fallzahlen zudem höher als bei Erwachsenen (Legrand *et al.* 2001, Crooks *et al.* 2000, Hale *et al.* 1999). Das Auftreten von AdV wird zwischen 4 und 300 Tagen dokumentiert, mit einem Mittelwert von ca. 60 Tagen.

Antivirale Medikamente wie „Ribavirin“ oder „Cidofir“, die in verschiedenen Transplantationszentren zur Behandlung von adenoviral-induzierten Erkrankungen eingesetzt wurden konnten keine wirklich effektiven therapeutischen Erfolge erzielen und sind darüber hinaus von signifikanter Toxizität begleitet. Daher wird besonders auch im Fall von adenoviralen Infektionen in Folge einer allogenen Knochenmarktransplantation die Entwicklung von effektiven nicht toxischen antiviralen Therapien gefordert (La Rosa *et al.* 2001, Legrand *et al.* 2001).

Diese Problematik wurde bereits vor einigen Jahren erkannt, und es wurden daher experimentelle Studien entwickelt, die eine *in vitro* Generierung AdV-spezifischer ZTL erlaubte (Smith *et al.* 1996, 1998). Die Technologie war aber noch nicht genügend ausgereift um in einer klinischen Studie Anwendung zu finden.

Schließlich ließ der Zusammenhang zwischen einer lebensbedrohlichen AdV Infektion und Immunsuppression die Annahme zu, daß in gesunden Individuen AdV, genauso wie EBV unter der Kontrolle von virusspezifischen T-Zellen stehen, die im peripheren Blut normalerweise patrouillieren.

Ähnlich zu anderen humanen Viren hat AdV verschiedene Mechanismen entwickelt, um der Immunantwort zu entkommen. Wie bereits in der Einleitung zu dieser Arbeit im Detail besprochen, inhibieren beispielsweise die Proteine der E1A Region die Sensitivität der Zelle gegenüber Interferonen. Außerdem blockieren die adenoviralen Proteine, die von der E3-Promoter Transkriptionseinheit kodiert werden, wie z.B. das E3-gp19K, das in der inneren Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert ist und an MHC-Klasse-I Antigene von infizierten Zellen bindet, deren Export vom ER an die Zelloberfläche. Durch die Interaktion des E3-gp19K mit dem MHC-I-Präsentationsweg, kann die Aktivität von CD8⁺ ZTL inhibiert werden (Sparer *et al.* 1996). Außerdem sind zwei weitere Proteine (E3-10,4K/14,5K, E3-14,7K) innerhalb der E3-Transkriptionseinheit und ein weiteres innerhalb der E1- Transkriptionseinheit (E1B-19K) dafür verantwortlich, die infizierte Zelle vor der pro apoptotischen Wirkung des TNF- α zu schützen (Dimitrov *et al.* 1997) Bisher ist allerdings nichts darüber bekannt, ob adenovirale Proteine mit MHC Klasse-II-Moleküle interagieren, daher wäre in Anbetracht der Verwendung von AdV-spezifischen ZTL als adoptiven Transfer in Transplantationspatienten eine Methode, welche die Generierung von CD4⁺ ZTL gewährleistet, von großem Interesse.

Die in dieser Arbeit beschriebene Methodik zur Generierung AdV-spezifischer ZTL unter Verwendung einer AdV-infizierten dendritischen Zelle als Stimulatorzelle soll bei Patienten angewendet werden, die unter einem geringen Risiko stehen EBV⁺ LPD zu entwickeln, aber eine möglicherweise hohe Anfälligkeit besitzen ernsthafte AdV Infektionen zu entwickeln. Dies käme besonders für jungen Patienten oder Kinder in Frage, bei denen eine Primärinfektion mit EBV-möglicherweise noch nicht stattgefunden hat und der Spender ebenfalls EBV-seronegativ ist.

DCs sind spezialisierte antigenpräsentierende Zellen und verfügen über die Kapazität fremdes Antigen in großen Mengen aufzunehmen und zu verarbeiten. Darüber hinaus sind sie in der Lage diese Antigene naiven oder ruhenden T-Zellen *in vitro* und *in vivo* zu präsentieren. Diese APCs exprimieren große Mengen an MHC- Klasse I und II Molekülen und Adhäsionsmolekülen, sowie eine beträchtliche Anzahl der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 and CD40, welche essentiell für die T-Zellaktivierung sind.

In aktuellen Studien konnte gezeigt werden, daß DCs, die mit spezifischen Antigenen in Form von Proteinen, Peptiden oder RNA beladen wurden, sowohl CD8⁺ als auch CD4⁺ Tumor- und Virusspezifische ZTL *in vitro* und *in vivo* stimulieren konnten.

Erst kürzlich konnte auch im Rahmen einer Doktorarbeit in unserer Gruppe (Zhen Su, 2001) eindrucksvoll demonstriert werden, daß DCs, die mit der RNA der gesamten Kodierungssequenz des subdominanten EBV-spezifischen Antigens LMP2-A transfiziert wurden hocheffizient CD4⁺ zytotoxische T-Zellen stimulieren konnte, die sämtliche Epitope des Proteins unabhängig von ihrem HLA-Typ erkannten.

Die einzigartige Fähigkeit von DCs naive T-Zell-Antworten hervorzurufen könnte insbesondere dann von Vorteil sein, wenn der Spender AdV-seronegativ ist. Da dieser über kein immunologisches Gedächtnis gegen AdV verfügt könnten hier *in vitro* naive T-Zellen gegen AdV stimuliert werden. Zur Etablierung der Methodik zur Generierung AdV-spezifischer ZTL war der Status der Stimulatorzellen von entscheidender Bedeutung für das Zustandekommen einer effizienten und spezifischen T-Zell Antwort. Dabei wurden verschiedene Methoden zur Kultivierung der DCs erprobt und es konnte festgestellt werden, daß verschiedene Parameter für das Erzielen optimaler DC Populationen wichtig sind.

Dazu gehörten die Kulturbedingungen bzw. die Art der Medien die verwendet wurden sowie der Reifegrad der DCs. Letzteres war besonders entscheidend, da DCs abhängig von ihrem Reifestatus zwei verschiedene Funktionen ausführen. Als unreife Zellen sind sie hoch qualifiziert um Antigen der unterschiedlichsten Erscheinungsformen aufzunehmen. Angefangen bei Aminosäuren, über Polypeptide, Glykoproteine, Polysaccharide, Lipide, bis zu ganzen Zellen. Während der Prozessierung dieser antigenen Substanzen reifen sie heran und sind dann in der Lage als reife Zellen meisterhaft T-Zellantworten zu induzieren. Schließlich konnte demonstriert werden, daß unreife DCs exogenes Antigen signifikant besser aufnehmen können, als reife DCs. Untersuchungen zur Antigenaufnahme über den Mannose-Rezeptor unreifer DCs haben gezeigt, daß große Mengen an FITC-konjugiertem Dextran über einen Zeitraum von zwei Stunden aufgenommen werden konnte, während reife DCs nur eingeschränkt dazu in der Lage sind. Offensichtlich werden Rezeptoren, die für die Aufnahme von Antigen in die Zelle verantwortlich sind während der Reifephase herunterreguliert, weil dann die Zelle ihre Energie für die Antigenprozessierung und Präsentation benötigt. Darüber hinaus müssen peptidbeladene MHC-Moleküle an die Oberfläche gebracht, kostimulatorische Moleküle hochreguliert und die Zytokinproduktion (IL-12) angeregt werden.

Diese Prozesse sind für die Zelle energetisch sehr aufwendig. Daher verfolgen reife DCs, die ja *in vivo* durch die Aufnahme des Antigens und das sie umgebende Milieu zur Reife stimuliert werden, alleine das Ziel, diese Antigene den T-Zellen zu präsentieren.

Da in meinem System DCs mit Adenovirus infiziert werden sollten um virale Proteine zytotoxischen T-Zellen zu präsentieren, war die Bestimmung des Infektionszeitpunktes grundlegend wichtig für die Durchführung dieser Experimente.

Das Adenovirus, welches in diesem System verwendet wurde war ein in der E1- und E3 Region deletiertes Adenovirus vom Typ 5, welches keine Proteine mehr exprimieren konnte, um der Immunüberwachung zu entgehen. Dieses Virus, eingepackt in das Transfektionsreagenz Lipofectamin wurde verwendet um unreife DC zu transfizieren. Nach der „Lipofektion“ wurde den DCs zur Ausreifung TNF- α zugegeben, um die Antigenpräsentation über MHC-Klasse-II-Moleküle zu optimieren. Reife DCs wurden zur Hochregulierung der MHC-II-Moleküle, sowie der kostimulatorischen Moleküle angeregt, wodurch eine weit höhere immunstimulatorische Kapazität gewährleistet werden konnte. Es wurde außerdem gezeigt, daß TNF- α in einer dosisabhängigen Weise die Expression der Integrinrezeptoren CD51, CD49c und CD49f, sowie des Cocksackie- und Adenovirusrezeptors CAR verminderte. CD51 ist das bisher am besten charakterisierteste Molekül, das die Internalisation des zuvor an einen anderen zellulären Rezeptor gebundene Virus bewirkt. Um die Rolle des CD51 Integrins zu belegen, wurden die DCs mit einem spezifischen anti-CD51 Antikörper inkubiert bevor die Zellen mit Adenovirus infiziert wurden. Auf diese Weise wurde die virale Infektionsrate auf 40-50 % herabgesetzt, wodurch die Beteiligung des CD51-Moleküls an der AdV Infektion gezeigt werden konnte.

Die Expression des erst kürzlich charakterisierten Cocksackie- und Adenovirusrezeptors „CAR“ konnte in nur 60 % der untersuchten DC Kulturen nachgewiesen werden, während die $\alpha\beta$ 1 Integrine CD49b, CD49c, CD49e und CD49f auf allen DC-Populationen exprimiert werden und möglicherweise ebenfalls eine Rolle am Infektionsgeschehen von Adenoviren haben. Es wurden bereits umfangreiche Studien publiziert (Wickham *et al.* 1993, Mathias *et al.* 1994, Huang *et al.* 1999, Nemerow *et al.* 1999, 2000, 2001), die belegen, daß $\alpha\beta$ Integrine an der Internalisation des AdV in Zellen verantwortlich sind, aber lange war der eigentliche Rezeptor, der das „Attachment“ des Virus bewirkt nicht charakterisiert. Erst Bergelson und Finberg konnten 1997 publizieren, daß ein Protein von Immunglobulin-ähnlicher Struktur, dessen physiologische Funktion bisher unbekannt ist von Adenoviren sowie von Cocksackieviren als primären Rezeptor genutzt wird. Diesen Rezeptor nannte man wegen seiner doppelten Bindungsspezifität „CAR“. Da aber auch Zellen, die CAR nicht auf

ihrer Oberfläche exprimieren mit Adenovirus infiziert werden können, wie zum Beispiel humane Fibroblasten, liegt die Vermutung nahe, daß es möglicherweise noch einen weiteren bislang nicht charakterisierten Rezeptor für diese Viren gibt. Eine im Juni diesen Jahres publizierte Arbeit von Li *et al.* 2001, ebenfalls aus der Gruppe von Nemerow konnte anhand der Expression von $\alpha\beta 1$ Integrinen, die auf Zelllinien exprimiert wurden, die defizient in der Expression der als Korezeptoren fungierenden Integrine $\alpha\beta 3$ oder $\alpha\beta 5$ sind zeigen, daß eine AdV Internalisation auch über die $\alpha\beta 1$ Integrine erreicht werden konnte (Li *et al.* 2001). Diese zum ersten Mal eindeutig beschriebene Studie, daß auch $\beta 1$ Integrine am Infektionsgeschehen des AdV teilnehmen, läßt weiterhin vermuten, daß „CAR“ nicht der einzige Rezeptor ist, den Adenoviren für die Penetration an die Zelle ausnützen, denn warum sollte das Virus viele verschiedene Integrine erkennen um in die Zelle einzutreten und nur einen Rezeptor um an sie zu binden?

Das Ziel des Virus ist seine möglichst effektive Verbreitung und anschließende Persistenz. Dazu scheint es sinnvoll, möglichst viele zelluläre Rezeptoren zu erkennen, um eine große Bandbreite von verschiedenen Zelltypen infizieren zu können. Die Verminderung der Expression von CD51, CD49c, CD49f und „CAR“ durch TNF- α ist eine wahrscheinliche Erklärung dafür, daß reife DCs weniger effizient mit AdV infiziert werden können, als unreife DCs.

Die AdV-spezifischen ZTL die im Rahmen dieser Arbeit generiert wurden, waren im überwiegenden Maße CD4⁺ T-Zellen. Die zytotoxische Kapazität dieser T-Zellen wurde eindeutig durch Blockierung der MHC-II Oberflächenmoleküle bestätigt. Im Gegensatz dazu generierte Smith *et al.* AdV-spezifische ZTL, unter Anwendung einer ähnlichen Methodik, die ebenfalls in der Hauptsache CD4⁺ waren, doch wurde die Mehrheit der spezifischen Lyse durch CD8⁺ T-Lymphozyten verübt.

Das in dieser Arbeit entwickelte System war deshalb erfolgreicher, weil entscheidende Modifikationen dem System zugefügt wurden. Die erste Modifikation lag darin mir das antigenpräsentierende System genauer anzusehen. Dabei stellte sich heraus, daß unreife dendritische Zellen besser Antigen aufnehmen können, als reife DCs und daß unreife DCs besser mit AdV zu infizieren sind als reife DCs. Darüber hinaus hat die Verwendung des kationischen Lipids Lipofectamin eine entscheidende Verbesserung in der Infektionskapazität erbracht. Die zweite Modifikation bestand darin, daß ich diese mit AdV und Lipid transfizierten DCs einem zusätzlichen Reifestimulus in der Form von TNF- α aussetzte, bevor ich sie mit den PBL kokultivierte. Daraus resultierte, daß die Lipid-AdV Komplexe von den DCs in einer rezeptorunabhängigen und einer rezeptorabhängigen Weise

aufgenommen werden konnten. Letzteres durch Beteiligung des Coxsackie- und Adenovirusrezeptors und der Integrinrezeptoren. Da es sich bei dem deletierten AdV um einen replikationsinkompetenten Virus handelt, der nicht mehr in der Lage ist Virusspezifische Proteine zu synthetisieren, wird das gesamte Virion innerhalb der Zelle prozessiert. Das Antigen, welches über einen dieser beiden Mechanismen aufgenommen wird, gelangt in endosomale Vesikel und wird nach Übermittlung reifestimulierender Signale in Form von TNF- α über die MHC-II Transportroute den CD4⁺ T-Zellen präsentiert. Daher wurde durch die Anwendung des Lipides die Antigenpräsentation mehr in Richtung MHC-II Präsentation gesteuert. Die zusätzliche Verwendung des TNF- α als nachträglichen Reifestimulus nach erfolgter Infektion konnte vermutlich eine gesteigerte Expression peptidbeladener MHC-II-Komplexe bewirken. Diese beladenen DCs besaßen die Fähigkeit große Mengen an Virusspezifischen CD4⁺ T-Zellen zu stimulieren, die zudem in der Lage waren zytotoxische Effektorfunktionen auszuüben. Zweifellos wurde auch ein signifikanter Anteil an CD8⁺ T-Lymphozyten über den MHC-I Präsentationsweg stimuliert. Dies läßt sich möglicherweise dadurch erklären, daß nicht alle viralen Partikel in das Lipid verpackt werden. Dies konnte anhand der CD51-Inhibitionsexperimente demonstriert werden. Durch Blockade des Integrinrezeptors mit einem monoklonalen Antikörper, verminderte sich die Infektionskapazität um die Hälfte, trotz Verwendung des Lipofectamins als Transfektionsreagenz. Dies hat deutlich gezeigt, daß Lipofectamin die Infektionskapazität zwar deutlich verbesserte, den rezeptorvermittelnden Infektionsweg aber nicht ausschaltete. Dadurch wurde offensichtlich nicht die gesamte Viruslast über das endosomale System der Dendritischen Zelle aufgenommen sondern ein Teil der Viren wurde im Zytosol über die proteolytische Aktivität des Proteasoms in Peptidfragmente zerlegt und über das TAP-Transportsystem in den MHC-I-Präsentationsweg geschleust, wo sie CD8⁺ ZTL präsentiert wurden. Daß jedoch die Mehrheit der resultierenden ZTL vom CD4⁺ Typ waren, konnte wie bereits erwähnt eindeutig anhand von MHC-Inhibitionsexperimenten gezeigt werden. Zusätzlich konnte diese CD4⁺-vermittelnde Zytotoxizität in einem nur vierstündigen Chromfreisetzungstest nachgewiesen werden. Dies läßt die Vermutung zu, daß die Virusspezifische Zytotoxizität nicht über den Rezeptor vermittelnden Lyseweg des FAS-FAS-Ligand Mechanismus verübt wurde, sondern durch das Freisetzen lytischer Granula: dem Ca²⁺ abhängigen Granula-Exozytoseweg.

Früher wurde angenommen, daß zytotoxische CD4⁺ T-Zellen, nur über den FAS-FASL Weg Apoptose in ihren Zielzellen auslösen könnten. Dies wurde durch frühere Untersuchungen unterstützt, wobei man zytotoxische CD4⁺ T-Lymphozyten untersucht hat, die defizient in

der Expression von Perforin und Granzyme B waren, aber über die Expression des FAS Liganden verfügten und Zielzellen töteten, die den FAS-Rezeptor auf ihren Oberflächen exprimieren. Die meisten dieser Erkenntnisse wurden allerdings im murinen System gewonnen (Kägi *et al.* 1994, Lowin *et al.* 1994, Ramsdell *et al.* 1994). Beim Menschen waren die Details über die molekularen Mechanismen der CD4⁺ vermittelten Zytotoxizität noch nicht vollständig geklärt, welches auf das Fehlen geeigneter experimenteller Systeme zurückzuführen ist. In zwei aktuelleren Publikationen jedoch, die beide aus der Gruppe von Masaki Yasukawa stammen (Yasukawa *et al.* 1999, Yasukawa *et al.* 2000) konnte demonstriert werden, daß humane CD4⁺ T-Lymphozyten über den Ca²⁺-abhängigen Perforin-Granzyme- Zytolyseweg ihre Zielzellen töten. In diesen Studien wurden Zellen von Patienten verwendet, die Mutationen in ihren FAS-Genen aufwiesen. Die zytotoxischen CD4⁺ T-Lymphozyten wurden über allogene FAS⁺ und allogene FAS⁻ Zellen *in vitro* stimuliert und vermittelten ihre alloreaktive Zytotoxizität in gleicher Stärke gegen sowohl FAS⁺, als auch FAS⁻ Zielzellen. Inhibierung dieser Zellen durch den Perforinhemmstoff Concanamycin A (CMA) oder den Calcium-Chelatbildner EGTA (Ethylen-Glycol-bis(□-Aminoethylether)-N'-Tetraacetic acid) verhinderte die Ca²⁺-abhängige Zytolyse.

Deshalb schlußfolgerten die Autoren, daß anders als im murinen System, beim Menschen der Hauptanteil zytotoxischer Aktivität von CD8⁺, sowie CD4⁺ T- Lymphozyten über den Ca²⁺-abhängigen Granula-Exozytoseweg vermittelt wird.

Die von Zhen Su generierten LMP-2A spezifischen ZTL, die ebenfalls überwiegend CD4⁺ waren, lysierten ihre spezifischen Zielzellen ebenfalls während der relativ kurzen Zeit von vier Stunden im Rahmen eines Standard Chromfreisetzungstest. Diese CD4⁺ ZTL wurden separiert und die molekularen zytolytischen Mechanismen dieser Zellen untersucht. Dabei konnte ebenfalls gezeigt werden, daß diese Zellen, obwohl positiv in der Expression des FAS-Liganden ihre LMP-2A-spezifische Zytotoxizität über den Perforin Granzyme-Exozytoseweg ausübten.

Ob die oben geschilderten Erkenntnisse auch für die AdV-spezifischen CD4⁺ ZTL zutreffen ist bisher reine Vermutung und sollte zukünftig in entsprechenden experimentellen Testsystemen untersucht werden.

Im Gegensatz zu den nach unserem System generierten T-Zellpopulationen verfügten die AdV-spezifischen ZTL-Kulturen von Smith *et al.* über einen signifikanten Anteil an CD56⁺ NK-Zellen, die um eine spezifische Lyse zu gewährleisten aus der Gesamtpopulation depletiert werden mußten. Der Anteil an unspezifischen Effektorzellen in unserem System konnte ausschließlich durch die Immunphänotypisierung mit spezifischen Antikörpern, die

gegen NK- spezifische Rezeptormoleküle wie CD56 und CD16 gerichtet waren, in der FACS Analyse detektiert werden. Dieser Anteil lag bei unter fünf Prozent und war daher statistisch nicht signifikant. Da wir keine NK-spezifische Zellyse beobachten konnten, liegt ebenfalls die Vermutung nahe, daß eine unspezifische Zytotoxizität in diesem System vernachlässigbar war. Außerdem wurden die ZTL von Smith *et al.* nur für 14 –17 Tage mit nur zwei Restimulationsrunden kultiviert und einer Zugabe von niedrigdosiertem IL-2 schon am Tag 13. Meine ZTL wurden dagegen für mindestens drei Stimulationsrunden und 28 Tage in Kultur gehalten und niedrigdosiertes IL-2 wurde erst ab dem Tag 17 dazugegeben. Der Zeitpunkt und die Menge des zugefügten IL-2 waren entscheidend um das Auswachsen unspezifischer Effektorzellen zu verhindern, die sich zu Beginn in großen Mengen innerhalb der Gesamt T Zellpopulation in der Kultur aufhalten und durch IL-2 zur Proliferation angeregt werden können. Diese Zellen konnten dann durch das Expandieren der spezifischen T-Zellklone zurückgedrängt werden. Würde allerdings zu hochdosiertes IL-2 zu der Kultur gegeben, könnten wenige unspezifische T und NK Zellen auch noch später zur Proliferation gelangen und die Spezifität der gewünschten T-Zellpopulationen beeinträchtigen.

Die möglicherweise intensive Kreuzreaktivität dieser ZTL stellen einen bedeutenden therapeutischen Aspekt dar. Adenovirale Infektionen in Patienten können durch mindestens 47 adenovirale Subgruppen verursacht werden, von denen manche häufig und andere selten verantwortlich sind für die Etablierung ernsthafter Komplikationen (Venard *et al.* 2000). In der von Venard *et al.* publizierten klinischen Situation, wurde in der Transplantationseinheit des „ Centre Hospitalier Universitaire“ in Nancy, Frankreich unter 65 Empfängern einer allogenen Knochenmarktransplantation bei 13 Patienten Adenovirusinfektionen diagnostiziert.

Von diesen Patienten wurden 14 verschiedene Serotypen isoliert. Neun von diesen gehörten zu den Serotypen 1, 2, 3 oder 5 und die restlichen waren nicht typisierbar. Patienten, die an diesen untypisierbaren Serotypen erkrankt waren starben zu 80 %. Eine Therapiemöglichkeit, die alle diese verschiedenen Serotypen berücksichtigt ist daher von zusätzlicher und weitreichender Dringlichkeit.

In dieser Arbeit konnte schließlich gezeigt werden, daß die ZTL, die gegen einen in den für die Transkription der frühen Gene notwendigen E1 und E3 Region deletierten Adenovirus vom Typ 5 generiert wurden auch virale Epitope von Wildtypviren der Subtypen 2, 5 und 11 erkennen konnten. Dies läßt darauf schließen, daß frühe Genprodukte des Virus nicht von zytotoxischen T Lymphozyten erkannt werden, sondern eher späte Genprodukte, wie Strukturproteine der Hexon, Penton und Fiberdomänen. Diese Gene wurden vermutlich

während der Evolution stark konserviert. In bereits früheren Studien konnte demonstriert werden, daß CD4⁺ T-Lymphozyten von Patienten, die seronegativ waren für einen Adenovirus der Subgruppe B (AdV35) *in vitro* proliferative Antworten gegen das gleiche Virus zeigten. (Flomenberg *et al.* 1995). Smith *et al.* hat schließlich 1998 in einer weiterführenden Studie seiner 1996 veröffentlichten Studie gezeigt, daß spezifische ZTL, die gegen einen deletierten Ad5 oder Ad2 –Adenovirus gerichtet waren auch Zielzellen töten konnten, die mit anderen adenoviralen Serotypen verschiedener Subtypen infiziert waren.

Der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit war schließlich die simultane Expansion von ZTL-Populationen, die spezifisch gegen Adenovirus und EBV gerichtet waren. Die Vorstellung, mit Hilfe einer einzelnen Stimulatorzelle zwei oder mehrere ZTL-Populationen unterschiedlicher Spezifität zu aktivieren wurde kürzlich von der Gruppe von Ken Lucas realisiert (Sun *et al.* 1999). Die Autoren haben sich mit der Frage beschäftigt, ob es durchführbar wäre simultan „bi-spezifische“ ZTL *in vitro* zu generieren, die durch Stimulation mit einer einzelnen, genetisch modifizierten antigenpräsentierenden Zelle sowohl EBV-spezifische als auch CMV- spezifische Antigene erkennen können. Für diesen Ansatz wählte die Gruppe B-LCL als antigenpräsentierende Zelle und transduzierte diese mit einem Retrovirus, der das CMV-spezifische Antigen pp65 und das Neomycinresistenzgen trug. Damit konnten sie stabil transduzierte Zellklone erzeugen, die nicht nur das gesamte Spektrum der EBV-Antigene tragen, sondern noch zusätzlich das stark immunogene CMV-spezifische Antigen pp65. Eine einzige Antigenpräsentierende Zelle wurde so mit einem umfangreichen Spektrum von immunogenen Antigenen zweier Virustypen ausgestattet. Obwohl das Genom von CMV über 150 Polypeptide verfügt von denen ein großer Anteil als immunogen bekannt ist, wurde das interne Matrixprotein pp65 gewählt, da in früheren Studien gezeigt werden konnte, daß es sich dabei um ein immunodominantes Antigen handelt, das von 70-90% CMV-spezifischer ZTL erkannt wird (McLaughlin-Taylor *et al.* 1994, Walter *et al.* 1995). Die mit pp65 transduzierte B-LCL konnte nun als antigenpräsentierende Zelle simultan *in vitro* ZTL expandieren, die sowohl EBV- als auch CMV exprimierende Zielzellen lysieren konnten. Dieser Ansatz wurde weiterführend in einem klinischen Protokoll dokumentiert und kann in einer Phase I/II- Studie erprobt werden (Lucas *et al.* 2000).

Zur Generierung AdV und EBV-spezifischer ZTL wurden auch in meinem System B-LCL als Antigenpräsentierende Zellen gewählt. Der Vorteil dieses Zellsystems lag zum einen in der Tatsache, daß LCL alle latenten EBV-spezifischen dominanten und subdominanten Antigene exprimieren, die von ZTL erkannt werden und zum anderen handelt es sich bei LCL

um immortalisierte Zelllinien, die einfach und ohne Aufwand unbegrenzt in Kultur gehalten werden können. Zur Stimulierung der „bispezifischen“ ZTL-Antworten wurden LCL mit dem rekombinanten E1/E3-deletierten Adenovirus vom Typ 5 infiziert. Die Voraussetzung für eine erfolgreiche Expansion der EBV- und AdV-spezifischen ZTL war die Expression immundominanter Proteine beider Virustypen auf der Oberfläche der LCL.

Allerdings konnten unter normalen Kulturbedingungen die LCL nicht effizient mit dem Adenovirus infiziert werden. Ein Kokultursystem, bestehend aus einer murinen Fibroblastenzelllinie, die genetisch manipuliert worden war, den humanen CD40 Liganden zu exprimieren, leistete den entscheidenden Beitrag um die LCL in einer Weise zu stimulieren, die eine höhere Effizienz der Infektionsrate mit dem Adenovirus erlaubte. Bei diesem Ansatz wurden die LCL, die in hohem Maße das kostimulatorische Molekül CD40 exprimieren an den CD40L-Rezeptor auf dem adhärennten Fibroblastenrasen gebunden und während der 72-stündigen Inkubationsphase aktiviert. Eine mögliche Erklärung weshalb diese Art der Stimulation in eine höhere Infektionsrate resultierte war, daß CD51, sowie das $\alpha\beta 1$ -Integrin CD49f nach der Stimulation signifikant höher exprimiert wurde. Interessanterweise blieb aber die Expression der anderen kostimulatorischen Moleküle, wie CD80 und CD86, der Adhäsionsmoleküle CD54 und CD58, sowie der MHC-Moleküle unverändert, vor und nach der CD40-CD40L Interaktion. Auch konnte eine Expression des „CAR“-Rezeptors weder auf den stimulierten, noch auf den unstimulierten LCL ermittelt werden. Die CD40L aktivierten und mit AdV-infizierten LCL zeigten im allogenen Ansatz eine ähnliche immunstimulatorische Kapazität wie die uninfizierten LCL. Die gleichen Zellen bewirkten aber im autologen System eine höhere immunstimulatorische Kapazität, als die uninfizierten LCL. Daraufhin zeigten die EBV/AdV-spezifischen ZTL, die mit den CD40L-aktivierten und mit Adenovirus infizierten LCL stimuliert wurden, eine exklusive Reaktivität gegenüber den Zielzellen, die entweder EBV-spezifische oder AdV-spezifische Antigene präsentierten. Darüber hinaus konnte weder eine NK-spezifische Lyse, noch eine alloreaktive Lyse gegenüber den allogenen infizierten oder uninfizierten Zielzellen detektiert werden, mit dem Hinweis, daß eine MHC-unabhängige Lyse in diesem System nicht signifikant war.

Inhibitionsexperimente mit monoklonalen Antikörpern, die entweder gegen MHC-Klasse-I oder gegen MHC-Klasse-II gerichtet waren, konnten ferner bestätigen, daß die bispezifische Lyse von sowohl CD4⁺ als auch von CD8⁺ zytotoxischen T Lymphozyten verübt wurden. Dabei zeigte sich auch, daß die autologen DC-AdV⁺ Zielzellen zu einem höheren Anteil von CD4⁺ T Zellen lysiert wurden, als die autologen LCL Zielzellen, die überwiegend von CD8⁺ T-Zellen lysiert wurden.. Wie bereits oben diskutiert, kann es durchaus als Vorteil gewertet

werden, wenn die spezifische, gegen adenovirale Proteine gerichtete Reaktivität auch von CD4⁺ T Zellen vermittelt wird, da adenoviral infizierte Zellen sich *in vivo* vor den CD8⁺ T-Zellen durch Unterdrückung der MHC -Klasse I –Expression tarnen können.

Auch konnte bei den bispezifischen ZTL eine ebenfalls ausgeprägte Kreuzreaktivität gegenüber verschiedenen adenoviralen Serotypen nachgewiesen werden, welches ebenfalls die Hoffnung birgt, daß diese Reaktivität auch *in vivo* gegen die vielen verschiedenen adenoviralen Subtypen gerichtet werden würde. Der Vorteil dieser Kreuzreaktivität wurde bereits oben besprochen.

Im Gegensatz zu den „monospezifischen“ ZTL, die hocheffizient durch AdV-transfizierte DCs stimuliert und expandiert wurden, war das Wachstum der bispezifischen ZTL- Linien verzögert und eine Expansion der Linien konnte erst durch Restimulierung mit uninfizierten autologen LCL, die nicht über das CD40L exprimierende Kokultursystem aktiviert worden waren erreicht werden. Dadurch waren die ZTL länger in Kultur als die „monospezifischen“ Linien, konnten aber auch nach mehreren Wochen in Kultur nach nur zwei- bis dreimaliger Stimulation mit AdV-infizierten LCL ihre doppelte Spezifität behaupten. Kontrolllinien, die nur mit LCL zu EBV-spezifischen ZTL stimuliert wurden, zeigten eine ähnliche Expansionsbereitschaft, wie die AdV-spezifischen Linien. Diese EBV⁺ZTL Linien zeigten hohe Spezifität gegenüber ihrer autologen LCL-Zielzelle, mit keinerlei Kreuzreaktivität gegenüber den AdV-exprimierenden Zielzellen. Ein potentieller Grund weshalb die bispezifischen Linien ein verzögertes Wachstum zeigten, lag vermutlich an der Verfassung der Stimulatorzellen. Die CD40L-aktivierte LCL zeigten eine verbesserte Infektionskapazität mit dem Adenovirus, die möglicherweise auf die Hochregulierung der Integrinrezeptoren CD51 und CD49f zurückzuführen war, und es ist ferner bekannt, daß die Interaktion von B-Zellen mit dem CD40L, diese Zellen dazu veranlaßt Zytokine zu produzieren, die auf das Wachstum der B-Zelle und ihrer Differenzierung zu Antikörperproduzierenden Plasmazellen positiv einwirken (Banchereau *et al.*1994). Zu diesen Zytokinen gehören IL-4 und IL-10. IL-10 wirkt aber auf das Wachstum von T-Zellen hemmend und IL-4 lenkt CD4⁺ T-Zellen in Richtung TH2 Zellen, die eher immunregulierend als zytotoxisch wirken.

Trotzdem konnte mit dieser Arbeit ein sehr erfolgreiches Modell vorgestellt werden, das es erlaubte mit Hilfe einer einzelnen manipulierten Stimulatorzelle hochspezifisch zwei simultan nebeneinander proliferierende ZTL Populationen zu stimulieren, die schließlich in der Lage waren, uneingeschränkt die Zielzellen zu erkennen und zu lysieren, die entweder EBV-spezifische oder AdV-spezifische Proteine exprimierten. Eine MHC-unabhängige, oder allogene Erkennung dieser ZTL konnte darüber hinaus als unwesentlich betrachtet werden.

Die *in vitro* Generierung „bispezifischer“ ZTL für den adoptiven Transfer in allogene Knochenmarktransplantationspatienten birgt einige offensichtliche Vorteile:

Als erstes sei erwähnt, daß die Methode in der Durchführung zwar äußerst zeitaufwendig ist, aber relativ einfach in der Realisierung. Durch Stimulierung von zwei verschiedenen ZTL-Spezifitäten innerhalb eines Kulturansatzes, unter Verwendung nur eines antigenpräsentierenden Systems können auch die Kosten für das Unternehmen im Rahmen gehalten werden, im Gegensatz zu zwei separaten Linien. Außerdem wäre das Prozedere für den Patienten weniger belastend, da nur eine Zelllinie infundiert werden müßte. Die Zellen die transferiert werden, stammen meistens aus kryokonserviertem Material, das unmittelbar nach dem Auftauen dem Patienten direkt injiziert wird. Das Einfriermedium, das für diese Zellen verwendet wird, besteht aus humanem Serumalbumin, das in einer gepufferten Kochsalzlösung gelöst ist und mit dem Gefrierschutzmittel DMSO versetzt wird. Das DMSO wirkt bei physiologischen Temperaturen toxisch und ruft selbst in stark verdünnter Form bei den Patienten Übelkeit und Erbrechen hervor (Prof. Kolb, persönliche Kommunikation). Um diese zusätzlichen Belastungen für die Patienten zu minimieren wäre der Transfer nur einer Virusspezifischen ZTL-Linie sinnvoll.

Wie bereits im Kapitel der Einleitung geschildert, sind es viele verschiedene Viren, die Transplantationspatienten während ihrer Aufbauphase zu schaffen machen und die Entwicklung „multispezifischer“ ZTL-Linien, die gegen mehr als ein Virus gerichtet wären, könnten zusätzlich den Prozeß der Immunrekonstitution beschleunigen, unabhängig von einem akuten Auftreten der Infektion.

Alle allogenen transplantierten und immunsupprimierten Patienten stehen während der ersten 100 Tage unter dem akuten, lebensbedrohlichen Risiko der Entwicklung viraler Infektionen, assoziiert mit akuter GvHD. Deshalb könnte mit der Generierung der antiviralen, vom Spender stammenden ZTL schon früh begonnen werden um ein rechtzeitiges Infundieren der Zellen zu gewährleisten.

Trotzdem müssen bei allen positiven Prognosen für die erfolgreiche Anwendung virusspezifischer ZTL auch kritische Punkte angemerkt werden.

Wie bereits erwähnt kommen die erfolgreichsten Ergebnisse über den adoptiven Transfer EBV-spezifischer ZTL von der Gruppe von Heslop und Rooney, die diese ZTL mittlerweile routinemäßig in ihrer Transplantationseinheit für Hochrisikopatienten einsetzen. Ein wichtiger Punkt im Zusammenhang mit der therapeutischen Anwendung EBV-spezifischer ZTL ist daher auch das genaue Verständnis der immunologischen Erkennung von EBV.

Die EBV-latenten Proteine zeigen eine ausgeprägte Hierarchie der Immundominanz in Abhängigkeit des HLA-Allotyps. In den meisten Individuen ist das EBNA-3A-Protein das immundominanteste, gefolgt von anderen subdominanten, wenig dominanten oder nicht immunogenen Proteinen. Daher konnte nachgewiesen werden, daß obwohl LCL mindestens neun virale Antigene exprimieren, die sie während der *in vitro* Stimulierung von EBV⁺ ZTL autologen T-Zellen präsentieren, davon nur ein geringer Prozentsatz die subdominanten Epitope erkennt, während das Gros an Spezifität gegen die immundominanten Epitope gerichtet ist. Zusätzlich ist jede Linie auch noch durch ein oder zwei MHC-I -Allele restringiert und die Immunantwort reagiert bevorzugt gegen HLA-A3, A11, HLA-B7, B8 und B44. Daher kann die Bemühung EBV-LPD durch den adoptiven Transfer mit EBV-spezifischen ZTL zu behandeln scheitern, wenn der Tumor Mutationen in den immundominanten viralen Genen entwickelt hat. Die hochspezifischen T-Zellrezeptoren können diese Mutationen nicht erkennen und rare Zellklone innerhalb der polyklonalen Fraktion, die gegen subdominante nicht mutierte virale Gene gerichtet sind können nicht die Oberhand gewinnen und den Tumor bekämpfen.

In einer kürzlich veröffentlichten Publikation von Gottschalk *et al.* aus der Gruppe von Heslop und Rooney wird der Fall einer 17 jährigen Patientin geschildert, die 52 Tage nach einer T-Zelldepletierten HLA-mismatched unverwandten KMT eine EBV⁺Lymphoproliferative Erkrankung entwickelte. Der Patientin wurden am Tag 56 nach der KMT $2 \times 10^7 / m^2$ EBV⁺ZTL infundiert. Die Patientin zeigte als Reaktion auf die Therapie eine Verschlimmerung ihrer LPD, sowie sämtlicher begleitender Symptome. Die Lage der Patientin verschlechterte sich zunehmend und es konnte ein stets hoher Gehalt an EBV-DNA- im peripheren Blut erfaßt werden. Da der Grund für diese Entwicklung zu diesem Zeitpunkt unbekannt war, setzte man die Behandlung fort und 24 Tage nach der ersten ZTL-Infusion starb die Patientin an den Folgen ihrer Erkrankung (Gottschalk *et al.* 2001)

Anschließende Biopsie des Tumors und genetische Analysen der infundierten ZTL vor und nach der Infusion ergaben, dass die EBV⁺Tumorzellen Deletionen in den EBNA3B-Genen hatten. Genetische Analyse der Blutproben von Spender und Empfänger vor der Transplantation zeigte keine Übereinstimmung mit dem deletierten Virus. Im Gegensatz dazu

konnten 52 Tage nach der KMT und noch vor der ZTL-Infusion beide EBNA-3B-Genotypen, der Wildtyp sowie das deletierte Virus im peripheren Blut der Patientin nachgewiesen werden. Nach der ZTL-Infusion konnte der Wildtyp nicht mehr detektiert werden, sondern ausschließlich das deletierte Virus. Dies führte zu der Annahme, daß die ZTL nur die Wildtyp-infizierten Zellen töten konnten, aber nicht die Mutante. Weitere Analysen konnten beweisen, daß der Tumor durch das transplantierte Knochenmark des Spenders entstanden ist, und die Mutationen sich erst im Zuge der Entwicklung des Tumors bildeten. Der Tumor konnte damit einen neuen Mechanismus entwickeln um der Immunantwort zu entkommen, mit verheerenden Folgen für die Patientin.

Natürlich sind solche Fälle nicht die Regel und für die Mehrheit der Patienten, für die eine adoptive Immuntherapie in Frage kommen, besteht eine reale Chance auf einen positiven unterstützenden Effekt dieser ZTL auf die Rekonstitution eines zerstörten Immunsystems. Allerdings zeigen solche Fälle auch die Grenzen eines jeden Therapiemodells.

Zusammenfassend kann daher dokumentiert werden, daß mit dieser Arbeit effektive Methoden entwickelt wurden, die es ermöglicht haben *in vitro* sowohl „monospezifische“, als auch „bispezifische“ antivirale ZTL zu generieren.

Das weiterführende Ziel dieser Arbeit sollte sein, diese Methoden zur Anwendung in klinischen Studien zu bringen, um sie in der Zukunft Menschen nutzbar zu machen, die an unheilbaren Therapie bedingten viralen Infektionen erkrankt sind. Menschen, die so krank sind, daß eine Knochenmarktransplantation die einzige Hoffnung auf Heilung bedeutet, sollten nach der erfolgreichen Durchführung dieser Behandlungsmethode nicht an der Reaktivierung viraler Infektionen sterben. Die Entwicklung antiviraler zytotoxischer T-Lymphozyten, die spezifisch gegen diese Reaktivierungen eingesetzt werden können, bieten eine reale Überlebenschance für diese Patienten. Daher muß im Rahmen der Transplantationsmedizin die Entwicklung dieser Therapiemöglichkeiten forciert werden. Die Effizienz und Sicherheit dieser ZTL-Linien sollte zukünftig in klinischen Studien der Phase I und II bestätigt werden.

Dennoch muß man sich bewußt machen, daß alle diese Bemühungen keine „Wunderwaffen“ darstellen und das idealerweise die Verminderung der Konditionierungstoxizitäten in Kombinationen mit adoptiven immuntherapeutischen Maßnahmen in Zukunft zu einer Verbesserung der Heilungsaussichten für Patienten mit progressiven malignen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems führen können.

ZUSAMMENFASSUNG

Nach einer allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSCT) wird die Rekonstitution der zellulären Immunität entscheidend durch das Auftreten von GvHD und der Reaktivierung latenter Viren behindert, z.B. von Adenoviren und Vertretern der Herpesgruppe, zu der EBV gehört.

Im gesunden Individuum verursachen diese Viren eine meist nur milde Symptomatik, tragen aber beim immunsupprimierten Patienten zu einer signifikanten Mortalität und Morbidität bei. Konventionelle chemotherapeutische Therapieansätze haben sich als wenig effizient erwiesen und sind darüber hinaus mit erheblicher Toxizität assoziiert. Die zunehmenden Kenntnisse über zelluläre Effektoormechanismen des Immunsystems, haben zu der Entwicklung virusspezifischer adoptiver Immuntherapien geführt. *Ex vivo* expandierte EBV-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten (ZTL) wurden bereits mit großem Erfolg zur Prophylaxe und Behandlung EBV-induzierter lymphoproliferativer Erkrankungen bei Patienten eingesetzt. Basierend auf diesen Erfahrungen wurden in der vorliegenden Arbeit zwei Schwerpunkte behandelt: Zum einen die Generierung Adenovirusspezifischer ZTL unter Verwendung AdV-transfizierter dendritischer Zellen (DCs) als Stimulatoren und zum anderen, die Entwicklung einer Technologie, welche die Generierung von ZTL erlaubte, die in der Lage waren sowohl AdV, als auch EBV-exprimierende Zielzellen zu erkennen und zu töten. Zur Entwicklung Adenovirus-spezifischer ZTL wurden unreife DCs, die in serumfreiem Medium in der Anwesenheit von GM-CSF und IL-4 generiert wurden mit einem replikationsinkompetenten AdV vom Typ 5 unter Verwendung eines kationischen Lipids transfiziert. Die transfizierten DCs wurden anschließend einem Reifestimulus durch TNF- α unterzogen und zur Stimulation von autologen PBL (periphere Blutlymphozyten) verwendet. Zytotoxizitätstests der resultierenden ZTL zeigten eine spezifische Reaktivität gegenüber autologen AdV-exprimierenden Zielzellen. Interessanterweise wurde diese spezifische, MHC-abhängige Zytotoxizität zu einer Mehrheit von CD4⁺ T Zellen vermittelt. Darüber hinaus konnte auch eine kreuzreaktive Lyse von Zielzellen beobachtet werden, die mit anderen adenoviralen Serotypen transfiziert waren. Dies eröffnet die Chance diese ZTL gegen adenoviral induzierte Erkrankungen prophylaktisch einzusetzen, unbeachtet der vielen verschiedenen Serotypen, die möglicherweise Komplikationen verursachen können.

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß auch ZTL generiert werden können, die zugleich in der Lage waren Zytotoxizität sowohl gegen AdV als auch EBV-exprimierende autologe Zielzellen zu vermitteln. Dazu wurden EBV-immortalisierte

Lymphoblastoide Zelllinien (LCLs) als Stimulatorzellen verwendet. LCLs sind aufgrund der verminderten Expression geeigneter Rezeptoren nur schwer mit AdV zu infizieren. Um die AdV-Infektion von LCLs zu optimieren, wurde daher ein CD40L-exprimierendes Kokultursystem entwickelt. Die so stimulierten LCLs konnten hoch effizient mit AdV infiziert werden und wurden als Stimulatoren von autologen PBL eingesetzt. Die resultierenden ZTL waren in der Lage Zytotoxizität sowohl gegen autologe AdV-exprimierende, als auch gegen EBV-exprimierende Zielzellen auszuüben. Durch Inhibition der MHC-Moleküle mit monoklonalen Antikörpern konnte gezeigt werden, daß die „bispezifische“ Lyse von MHC-restringiert war. Dabei zeigte sich eine Dominanz von CD8⁺ T-Zellen, mit einem signifikanten Anteil an CD4⁺ T-Zellen. Darüber hinaus konnte auch bei den „bispezifischen“ ZTL eine kreuzreaktive Lyse gegenüber autologen Zielzellen festgestellt werden, die mit anderen adenoviralen Serotypen infiziert waren.

Abschließend kann festgestellt werden, daß in dieser Arbeit effektive Methoden entwickelt wurden, welche die *In-vitro*-Generierung „monospezifischer“, gegen Adenovirus gerichteter ZTL, aber auch „bispezifischer“, gegen Adenovirus und EBV gerichteter ZTL erlauben. Ferner kann behauptet werden, daß diese ZTL für den adoptiven Transfer in immunsupprimierte Patienten nach allogener HSCT verwendet werden können, um die Rekonstitution einer antiviralen Immunität zu unterstützen. Dies könnte in klinischen Studien der Phase I und II in Zukunft bestätigt werden.

LITERATUR

Akiyama H., Kurosu T., Sakashita C., Inoue T., Mori Si, Ohashi K., Tanikawa S., Sakamaki H., Onozawa Y., Chen Q., Zheng H., Kitamura T. Adenovirus is a key pathogen in hemorrhagic cystitis associated with bone marrow transplantation.
Clin Infect Dis. **32** (9), 1325-1330, 2001

Albert M.L., Pearce S.F., Francisco L.M., sauter B., Roy P., Silverstein R.L., Bhardwaj N. immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes.
J. Exp. Med. **188**, 1359-1368, 1998

Alcami A. and Koszinowski U.H. Viral mechanism of immune evasion
Immunology today. **21** (9) 447-455, 2000

Arpinati M, Green CL, Heimfeld S, Heuser JE, Anasetti C. ranulocyte-colony stimulating factor mobilizes T helper 2-inducing dendritic cells.
Blood **15**, 95(8), 2484- 2490, 2000

Arthur, J.F., Butterfield, L.H., Roth, M.D., Bui, L.A., Kiertscher, S.M., Lau, R., Dubinett, S., Glaspy, J.A., McBride, W.H & Economou, J.S. A comparison of gene transfer methods in human dendritic cells.
Cancer Gene Therapy. **4**, 17-25, 1997

Ashley D.M., Fiola B., Nair S., Hale L.P., Bigner D.D., Gilboa E. Bone-marrow-generated dendritic cells pulsed with tumor extracts or tumor RNA induce anti-tumor immunity against central nervous system tumors.
J. Exp. Med. **186**, 1177-1182

Aversa F., Tabilio A., Velardi A. Transplantation of high-risk acute leukemia with T-cell depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA-haplotype.
N. Engl. J. Med. **339**, 1186-1194, 1998

Babcock, GJ, Decker LL, Volk, M. and Thorley-Lawson, DA. EBV persistence in memory B cells in vivo.
Immunity **9**, 395-404, 1998

Bailey, A., Mautner, V. Phylogenetic relationships among adenovirus serotypes.
Virology, **205**, 438-452, 1994

Banchereau J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu Y.J, Palucka K. Immunobiology of Dendritic cells.
*Annu.Rev.***18**, 767-811, 2000

Banchereau, J. and Steinman, R.M. Dendritic cells and the control of immunity.
Nature, **392**, 245-252, 1998

- Banchereau J, Bazan F, Blanchard D, Briere F, Galizzi JP, van Kooten C, Liu YJ, Rousset F, Saeland S. The CD40 antigen and its ligand. *Annu Rev Immunol*, **12**, 881-922, 1994
- Barnes D.W.H., Loutit J.F. What is the recovery factor in spleen? *Nucleonics*, **12**, 68-71, 1954
- Begemann M. *Praktische Hämatologie, Klinik-Therapie- Methodik* Georg Thieme Verlag, 11. Auflage, 1999
- Bell D., Banchereau J. Dendritic cells. *Adv Immunol.*, **72**, 255-324. 1999
- Bender, A., Bui, L.K., Feldmann, M.A.V., Larson, M., Bhardwaj, N. Inactivated influenza virus, when presented on dendritic cells, elicits human CD8⁺ cytolytic T cell responses. *J. Exp. Med.*, **182**, 1663-1671, 1995
- Bender, A., Sapp, M., Schuler, G., Steinman, R.M & Bhardwaj, N. Improved Methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J. Immunol. Methods*, **196**, 121-135, 1996
- Benninger-Doring G, Pepperl S, Deml L, Modrow S, Wolf H, Jilg W. Frequency of CD8(+) T lymphocytes specific for lytic and latent antigens of Epstein-Barr virus in healthy virus carriers. *Virology* **25**, 264(2), 289-97, 1999
- Bergelson J.M., Cunningham J.A., Droguett G., Kurt-Jones E.A., Krithivas A., Hong J.S., Horwitz M.S., Crowell R.L., Finberg R.W. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5 *Science* **28**, 275 (5304), 1320-1323, 1997
- Berget S.M., Moore C., Sharp P.A. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **74**, 3171-3175, 1977
- Billingham R.E., Brent L Quantitative studies on tissue transplantation immunity. IV Induction of tolerance in newborn mice and studies on the phenomenon of runt disease. *Philos. Trans. R. Soc .Lond. B. Biol. Sci.* **242**, 477-492, 1959
- Birx, D.L., Redfield, R. and Tosato, G. Defective regulation of Epstein-Barr virus infection in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) or AIDS related disorders. *N. Engl. J. Med*, **314**, 879-890, 1986
- Boczkowski D, Nair SK, Synder D. Gilboa E. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J Exp Med.* **184**, 465-472, 1996
- Bornkamm G., Delius H., Zimmer U., Hudewentz J., Epstein M.A. Comparison of Epstein-Barr virus strains of different origin by analysis of the viral DNAs. *J. Virol.* **35**, 603-618, 1980

Borrow P. and Shaw G.M. Cytotoxic T-Lymphocytes escape viral variants, how important are they in viral evasion of immune clearance in vivo?
Immunological Reviews **164**, 37-51, 1998

Burgert H.G., Blusch J.H.
Immunomodulatory functions encoded by the E3 transcription unit of adenoviruses.
Virus Genes, 21(1-2):13-25, 2000

Boussiotis V.A., Freeman G.J., Berezovskaya A., Barber D.L., Nadler L.M. Maintenance of human T cell anergy, blocking of IL-2 gene transcription by activated Rap1.
Science **278**, 124-128, 1997

Braciale T.J., Morrison L.A., Sweetser M.T., Sambrook J., Gething M.J., Braciale V.L.
Antigen presentation pathways to class I and class II MHC-restricted T-Lymphocytes.
Immunol Rev **98**, 95-99, 1987

Brenner MK, Rill DR, Holladay MS, Heslop HE, Moen RC, Buschle M, Krance RA, Santana VM, Anderson WF, Ihle JN. Gene marking to determine whether autologous marrow infusion restores long-term haemopoiesis in cancer patients.
Lancet **342**, 1134-1137, 1993

Britt W.J., Alford C.A Cytomegalovirus, in Fields B, Knipe D.M., Howley P.M. (eds)
Fields Virology, Philadelphia, PA, Lippincott-Raven 2439, 1996

Brossart, P., Goldrath, A.W., Butz, E.A., Martin, S., Bevan, M.J. Virus-mediated delivery of antigenic epitopes into dendritic cells as a means to induce CTL.
J. Immunol. **158**, 3270-3278, 1997

Buer J., Lanoue A., Franzke A., Garcia C., von Boehmer H., Sarukhan A. Interleukin 10 secretion and impaired effector function of major histocompatibility complex class II-restricted T cells anergized in vivo.
J.Exp.Med, **187**, 177-183, 1998

Burrows SR, Pulsen LM, Sculley TB, Moss DJ, Khanna R. Unusually high frequency of Epstein-Barr virus genetic variants in Papua New Guinea that can escape cytotoxic T-cell recognition, implications for virus evolution .
J Virol **70**, 2490-2496, 1996

Burrows SR, Sculley TB, Misko IS, Schmidt C, Moss DJ. (1990) An Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T cell epitope in EBNA3.
J Exp Med **171**, 345-350

Callan MFC, Tan L, Annels N (1998) Direct visualization of antigen specific CD8+ T cells during primary immune response to Epstein Barr virus in vivo.
J Exp Med **187**, 1395-1402

Carrigan DR (1997) Adenovirus infections in immunocompromised patients.
Am. J. Med. **102** (3A),71-74

Cassell D.J., Schwartz R.H., (1994) A quantitative analysis of antigen –presenting cell function, Activated B cells stimulate naive CD4 T cells but are inferior to dendritic cells in providing costimulation. *Journal of experimental medicine* 180, 1829-1840

Cella, M., Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells.
Current Opinions in Immunology **9**, 10-16, 1997

Childs R., Sanchez C., Engler H., Preuss J., Rosenfeld S., Dunbar C., van Rhee F., Plante M., Phang S., Barrett A.J., High incidence of adeno-and polyomavirus-induced hemorrhagic cystitis in bone marroe allotransplantation for hematological malignancy following T cell depletion and cyclosporine.
Bone marrow transplantat. **22** (9), 889-893, 1998

Chow L., Gelinas R.E., Broker T.R., Roberts R.J. An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA.
Cell **12**, 1-8, 1977

Cowley S. The biology of HIV infection.
Lepr. Rev. **72** (2):212-20, 2001

Christ, M., Lusky, M., Stoeckel, F., Dreyer, D., Dieterle, A., Michou, A. I., Pavirani, A., Mehtali, M. (1997) Gene therapy with recombinant adenovirus vectors, evaluation of the host immune response.
Immunology **57**, 19-25

Clift R.A., Buckner, Thomas E.D. Marrow transplantation for chronic myeloid leukemia, A randomized study comparing cyclophosphamide and total body irradiation with busulfan and cyclophosphamide.
Blood **84**, 2036-2043, 1994

Chiu CY, Mathias P, Nemerow GR, Stewart PL.
Structure of adenovirus complexed with its internalization receptor, alphavbeta5 integrin.
J Virol. **73** (8), 6759-68, 1999

Cohen , J.I. (2000) Epstein-Barr Virus Infection .
N Engl.J.Med. **343** (7) 481-492, 2000

Cohen, P.A., Peng, L., Plautz, G.E., Kim, J.A., Weng, D.E., Shu, S., CD4+ T cells in A.doptive Immunotherapy and the Indirect mechanism of Tumor Rejection.
Crit. Rev. Immunol. **20**, 17-56, 2000.

Cohen, P.A, Cohen, P.J., Rosenberg, S.A., Mule, J.J., CD4+ T cells from mice immunized to syngeneic sarcomas recognize distinct, non-shared tumor antigens.
Cancer Res **54**, 1055-1058, 1994.

Cohen, P.A., Fowler, D.J., Kim, H., White, R.L., Czerniecki, B.J., Carter, C., Gress, R.E, Rosenberg, S.A., Propagation of murine and human T cells with defined antigen specificity and function .

Ciba Foundation Symposium No 187: Vaccines Against Virally Induced Cancers, Frazer, I., Chadwick, D., Marsh, J., Eds., Wiley & Sons Ltd., Chichester **187**, 179-193, 1994.

Cohen, P.A., Role of T cell subsets in tumor immunity, in *Biologic Therapy of Cancer Updates*, De Vita, V.T., Hellmann, S., Rosenberg, S.A., Eds., Lipincott, Philadelphia 1994.

Cohen, P.A., CD4+ T cells in tumor rejection: past evidence and current prospects, in *Immunotherapy of Cancer with Sensitized T Lymphocytes.*, Eds., Lipincott, Philadelphia 1994.

Chang, A.E., Shu, S

Ciba Foundation Symposium No 187, Vaccines Against Virally Induced Cancers, Frazer, I., Chadwick, D., Marsh, J., Eds., Wiley & Sons Ltd., Chichester **187**,179-193, 1994

Chiu CY, Mathias P, Nemerow GR, Stewart PL. Structure of adenovirus complexed with its internalization receptor, alphavbeta5 integrin. *J Virol.* **73**(8), 6759-6768, 1999

Cjte I, Rogers N.J., Lechler R.L. Allorecognition
Transfus Clin Biol. **8**, 318-323, 2001

Dambaugh T, Beisel C, Hummel M, King W, Fennewald S, Cheung A, Heller M, Raab-Traub N, Kieff E. EBV DNA. VII. Molecular cloning and detailed mapping of EBV (B95-8) DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**, 2999-3003, 1980

Davison G.M, Vovitzky N., Kline A., Thomas V., Abrahams L., Hale G., Waldmann H. Immune Reconstitution after allogeneic Bone marrow Transplantation Depleted of T Cells. *Transplantation*, **69** (7) 1341-1347, 2000

Dazzi F, Goldman J. Donor lymphocyte infusions.
Curr Opin Hematol **6** (6), 394-399, 1999

De Bruijn, M. L., Schuurhuis, D.H., Vierboom, M.P., Vermeulen, H., de Cock, K.A., Ooms, M.E., Rensing, M.E., Toebes, M., Franken, K.L., Drijthout, J.W., Ottenhoff, T.H., Offringa, R., Melief, C.J. Immunization with human papillomavirus type 16 (HPV 16) oncoprotein-loaded dendritic cells as well as protein in adjuvant induces MHC class I restricted protection to HPV-16 induced tumor cells.
Cancer research. **58**, 724-731, 1998

Dietz A.B., Vuk-Pavlovic'. High efficiency adenovirus-mediated gene transfer to human dendritic cells.
Blood **91** (2) 392-398, 1998

Dimitrov T., Krajcsi P., Hermiston T.W., Tollefson A.E., Hannink M., Wold W.S. Adenovirus E3-10.4K/14.5K protein complex inhibits tumor necrosis factor-induced translocation of cytosolic phospholipase A2 to membranes.
J. Virol. **71**(4):2830-2837, 1997

Dilloo D., Brown M., Roskrow M., Zhong W., Holden W., Brenner M.K. CD40L acts as a costimulator molecules for the generation of an anti-tumor response.
Blood **90**, 1927-1933, 1997

Doherty PC, Allan W, Eichelberger M, Carding SR. Roles of alpha-beta and gamma-delta T cell subsets in viral immunity. *Annu Rev Immunol* 10,123-125, 1992.

Doherty PC, Hou S, Tripp RA. CD8+ T-cell memory to viruses.
Curr Opin Immunol **6**, 545-552, 1995.

Doring G, Pepperl S, Deml L, Modrow S, Wolf H, Jilg W. Frequency of CD8(+) T lymphocytes specific for lytic and latent antigens of Epstein-Barr virus in healthy virus carriers.

Virology **264** (2), 289-297, 1999

Echavarria M.S., Ray S.C., Ambinder R., Dumler J.S. Charache P. PCR detection of adenovirus in a bone marrow transplant recipient, hemorrhagic cystitis as a presenting manifestation of disseminated disease.

J Clin Microbiol **37**(3), 686-689, 1999

Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus and Epstein-Barr particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma.

Lancet, 702-703, 1964.

Epstein MA, Henle G, Achong BG, Barr YM. Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma.

J Exp Med **121**,761-770, 1965.

Evans, A.S. Latent adenovirus infections of the human respiratory tract.

Am. J. Hyg. **67**, 256-263, 1968

Fearnley D.B., McLellan A.D., Mannering S.I., Hock B.D., Hart D.N.

Isolation of human blood dendritic cells using the CMRF-44 monoclonal antibody: implications for studies on antigen-presenting cell function and immunotherapy.

Blood **15**,89 (10), 3708-16. 1997

Ferrara JLM, Deeg HG. Graft-versus-host disease.

N Eng J Med 324,667, 1991.

Ferrara .JL. Pathogenesis of acute graft-versus-host disease: cytokines and cellular effectors.

J. Hematother. Stem. Cell Res **9** (3):299-230, 2000

Fleischer B. Acquisition of specific cytotoxic activity by human CD4+ T lymphocytes in culture.

Nature **308**, 365-367, 1984

Flomenberg, P., Babbitt, J., Drobyski, W.R., Ash, R.C., Carrigan, D.R., Sedmak, G.V., McAuliffe, T., Camitta, B., Horowitz, M.M., Bunin, N., Casper, J.T. Increasing incidence of adenovirus disease in bone marrow transplant recipients.

J. Infect. Dis. **169**, 775-781, 1994

- Flomenberg, P., Piaskowski, V., Truitt, R.L., Casper, J.T. Characterization of human proliferative T cell responses to adenovirus.
J. Infect. Dis. **171**, 1090-1096, 1995
- Freudenthal PS, Steinman RM. The distinct surface of human blood dendritic cells as observed after an improved isolation method.
Proc Natl Acad Sci USA **87**,7698, 1990.
- Galibert L., Maliszewski C.R., Vandenabeele. Plasmacytoid monocytes/Tcells, a dendritic cell lineage?
Seminars in Immunology **13**, 283-289, 2001
- Gallucci S., Lolkema M., Matzinger P. Natural adjuvants: Endogenous activators of dendritic cells
Nat.Med. 5 **11** 1249 – 1255, 1999
- Gavioli R, Kurilla MG, de Campos-Lima PO, Wallace Le, Dolcetti R, Murray RJ, Rickinson AB, Masucci MG. Multiple HLA-All-restricted cytotoxic T-lymphocyte epitopes of different immunogenicities in the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen 4.
J Virol **67**, 1572-1578, 1993
- Giralt S.A., Kolb H.J. Donor lymphocyte infusion
Curr Opin Oncol, 8 (2), 96-102, 1996
- Goulmy E. Human minor histocompatibility antigens, new concepts for marrow transplantation and adoptive immunotherapy.
Immunol Rev. **157**, 127-140, 1997
- Gottschalk S., Ng C.Y.C., Perez M., Smith C.A., Sample C., Brenner M.K. , Heslop H.E., Rooney C.M. An Epstein-Barr virus deletion mutant associated with fatal lymphoproliferative disease unresponsive to therapy with virus-specific CTLs
Blood, **15**, (97, 4), 835-843, 2001
- Gribben JG, Guinan EC, Boussiotis V. Complete blockade of B7 mediated costimulation is necessary to induce human alloantigen specific anergy, a method to ameliorate graft versus host disease and extend the donor pool.
Blood **87**, 4887-4895, 1996
- Harfast B., Huddlestone J.R., Casali P., Merigan T.C., Oldstone M.B. Interferon acts directly on human B lymphocytes to modulate immunoglobulin synthesis.
J. Immunol.;127(5):2146-2150, 1981
- Haynes BF, Hale LP. The human thymus. A chimeric organ comprised of central and peripheral lymphoid components.
Immunol Res. **18** (3), 175-92, 1998
- Haynes B.F., Sempowski G.D., Wells A.F., Hale L.P. The human thymus during aging.
Immunol Res., **22** (2-3), 253-261, 2001

Haynes B.F, Markert M.L., Sempowski G.D., Patel D.D., Hale L.P. The role of the thymus in immune reconstitution in aging, bone marrow transplantation, and HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol.* **18**, 529-60, 2000

Henderson R.A., Finn O.J. Human tumor antigens are ready to fly. *Adv Immunol* **62** ,217-256, 1996

Herbst H, Dallenback F, Hummel M, Niedobitek G, Pileri S, Nuller-Lantzsch N, Stein H. Epstein-Barr virus latent membrane protein expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**,4766-4770, 1991

Heslop H.E. and Roskrow M. Gene transfer for the therapy of hematologic malignancy. *Current Opinion in Hematology*, **2**, 417-422, 1995

Heslop H.E.,Ng C.Y., Li C., Smith C,A., Loftin S.K. Krance R.A., Brenner M.K., Rooney C.M. Long-term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T-Lymphocytes. *Nat. Med.* **2**, 551-558, 1996

Heslop HE, Brenner MK, Rooney CM. Donor T cells to treat EBV-associated lymphoma. *N Engl J Med* **331**,679-680, 1994.

Heslop HE, Rooney CM, Adoptive Immunotherapy of EBV Lymphoproliferative Diseases *Immunological Reviews* 1997

Heufler C, Koch F, Staples CA, Topar G, Wysocka M, Trinchieri G, Enk A, Steinman RM, Romani N, Schuler G. Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper-1 development as well as interferon-gamma production by T helper cells. *Eur. J. Immunol.* **26**, 569-668, 1996

Hill A, Worth A, Elliott T, Rowland-Jones S, Brooks J, Rickinson A, McMichael AJ. Characterization of two Epstein-Barr virus epitopes restricted by HLA-B7. *Eur. J. Immunol.* **25**, 18-24, 1995

Hromas, R., Cornetta, K., Srour, E., Blanke, C., Broun, E.R. Donor leukocyte infusion as therapy of life-threatening adenoviral infections after T-cell-depleted bone marrow transplantation. *Blood* **84**, 1689-1690, 1994

Hsu F.J., Benike C., Fangoni F., Liles T.M., Czerwinski D., Taidi B., Engleman E.G., Levy R. Vaccination of Patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat.Med.* **2**, 52-58, 1996

Huang, S, Endo R.I. & Nemerow G.R. Upregulation of Integrins $\alpha\beta 3$ and $\alpha\beta 5$ on Human Monocytes and T-Lymphocytes facilitates adenovirus-mediated gene delivery. *J. Virol.* **69** (4), 2257-2263, 1995

Janeway C.A., Travers P. Immunobiology. The Immune System in Health and Disease Current Biology Ltd., London/Garland Publishing Inc., New York, 1997

Johnson S.A. Clinical pharmacokinetics of nucleoside analogues: focus on haematological malignancies.

Clin Pharmacokinet **39**(1), 5-26, 2000

Jondal M, Klein G, Oldstone M, Bokish V, Yefenof E. Surface markers on human B and T lymphocytes VIII, association between complement and EBV receptors on human lymphoid cells.

Scan J Immunol **5**, 401-410, 1976

Kägi D, Vignaux F, Ledermann B, Burki K, Depraetere V, Nagata S, Hengartner H, Golstein P. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity.

Science **265**, 528-30, 1994

Kägi D., Ledermann B., Bürki, K., Zinkernagel, R.M., Hengartner, H. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo

Annu Rev Immunol **14**, 207-32, 1996

Kaplan J.E., Hanson D.L., Jones J.L., Dworkin M.S. Viral load as an independent risk factor for opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents.

AIDS **15**(14),1831-1836, 2001

Kato M., Neil T.K., Fearnley D.B., McLellan A.D., Vuckovic S., Hart D.N. Expression of multilectin receptors and comparative FITC-dextran uptake by human dendritic cells

Int Immunol Nov;12(11):1511-1519, 2000

Kolb H.J., Mittermuller J., Clemm Ch, Holler E., Ledderose G., Brehm G. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogeneous leukemia in marrow transplant patients.

Blood **76**, 2462-2465, 1990

Kolb H. J., Schattenberg A., Goldman J.M., Hertenstein B., Jacobsen N, Arcese W., et al., Graft-versus- Leukemia effect of donor lymphocyte transfusion in marrow grafted patients.

Blood **86**, 2041-2050, 1995

Kolb H.J. Donor leukocyte transfusions for treatment of leukemic relapse after bone marrow transplantation. EBMT Immunology and Chronic Leukemia Working Parties.

Vox Sang. **74** Suppl 2, 321-329, 1998

Koneru B., Jaffe R., Esquivel C.O., Kunz R., Todo S., Iwatsuki S., Starzl T.E., Adenoviral infections in pediatric liver transplant recipients

J. Am. Med. Assoc. **258**, 489-492

Kourilsky P, Claverie JM.

MHC restriction, alloreactivity, and thymic education: a common link

Cell **10**,56(3),327-329, 1989

Kuwana M, Kaburaki J., Wright T.M., Kawakami Y, Ikeda Y..Arpina.I.R. Induction of antigen-specific human CD4(+) T cell anergy by peripheral blood DC2 precursors.

Eur J Immunol, **31**(9), 2547-57, 2001

Kuehnle I., Huls M.H., Liu Z., Semmelmann M., Krance R.A., Brenner M-K., Rooney C.M., Heslop H.E. CD20 monoclonal antibody (rituximab) for therapy of Epstein-Barr virus lymphoma after hemopoietic stem-cell transplantation.
Blood. **95** (4), 1502-1504, 2000

La Rosa A.M., Champlin R.E., Mirza N., Gajewski J., Giralt S., Rolston K.V., Raad I., Jakobson K., Konntoyiannis D., Elting L. & Whimbey E. Adenovirus Infections in adult recipients of blood and marrow transplants.
Clin. Infect. Dis. **15**, 32 (6), 871-876, 2001

Lee SP, Thomas WA Murray RJ, Khanin F, Kaur S, Young LS, Rowe M, Kurilla M, Rickinson AB. HLA-class-I A2.1-restricted cytotoxic T cells recognizing a range of Epstein-Barr virus isolates though a defined epitope in latent membrane protein LMP2.
J. Virol **67**, 7428-7435, 1993.

Lee SP, Tierney RJ, Thomas WA, Brooks JM and Rickinson AB. Conserved CTL epitopes within EBV latent membrane protein 2, a potential target for CTL-based tumor therapy.
J. Immunol. **158**, 3325-3334, 1997.

Legrand F., Berrebi D., Houhou N., Freymuth F., Faye A., Duval M., Mougnot J., Peuchmaur M., Vilmer E.. Early diagnosis of adenovirus infection and treatment with cidofovir after bone marrow transplantation in children.
Bone marrow transplant. **27** (6), 621-626, 2001

Lenarsky C. Immune recovery after bone marrow transplantation.
Current Opinion in Hematology, **2**, 409-412, 1995

Leonard G.T, Sen G.C. Restoration of interferon responses of adenovirus E1A-expressing HT1080 cell lines by overexpression of p48 protein.
J. Virol, **71** (7), 5095-5101, 1997

Levitskaya J., Coram M., Levitsky V., Imreh S., Steigerwald-Mullen P.M., Klein G., Kurilla M.G. Masucci M.G. Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1.
Nature **357**, 685-688, 1995

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

Levitsky V., Zhang Q.J, Levitskaya J., Masucci M.G.
The life span of major histocompatibility complex-peptide complexes influences the efficiency of presentation and immunogenicity of two class I-restricted cytotoxic T lymphocyte epitopes in the Epstein-Barr virus nuclear antigen 4.
J. Exp. Med. **183**, 915-926, 1996

Li E., Brown S.L, Stupack D.G., Puente X.S., Cheresch D.A., Nemerow G.R.
Integrin alpha(v)beta1 is an adenovirus coreceptor.
J Virol. **75** (11), 5405- 5409, 2001

Lich J.D., Elliott J.F., Blum J.S. Cytoplasmic processing is a prerequisite for presentation of an endogenous antigen by major histocompatibility complex class II proteins
J.Exp. Med. **191** (9), 1513-1524, 2000

Link H., Kolb H.J, Ebell W. Die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen
Med Klein, Teil 1 und Teil 1997

Lowin B, Hahne M, Mattmann C, Tschopp J. Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways.
Nature **25**, 370(6491), 650-52, 1994

Lowenberg B., Downing J.R. Burnett A. Acute meloid leukemia.
N Engl J Med. **30**, 341(14),1051-62, 1999

Lucas K.G., Burton R.L., Zimmerman S.E., Wang J., Cornetta K.G.,Robertson K.A., Lee C.H., Emanuel D.J. Semiquantitative Epstein-Barr virus-(EBV) polymerase chain reaction for the determination of patients at risk for EBV –induced lymphoproliferative disease after stem cell transplantation.
Blood **91**, 3654-3660, 1998

Lucas K.G., Small T.N., Heller G., Dupont B., O'Reilly R.J. The development of cellular immunity to Epstein-Barr virus-after allogeneic bone marrow transplantation.
Blood **87**, 2594-2599, 1996

Lucas KG, Sun Q, Burton RL, Tilden A, Vaughan WP, Carabasi M, Salzman D, Ship A. A phase I-II trial to examine the toxicity of CMV- and EBV-specific cytotoxic T lymphocytes when used for prophylaxis against EBV and CMV disease in recipients of CD34-selected/T cell-depleted stem cell transplants.
Hum Gene Ther. **1**,11(10),1453-63, 2000

Luedwig, B., Ehl, S., Karrer, U., Odermatt, B., Hengartner, H.& Zinkernagel, R.M. Dendritic cells efficiently induce protective antiviral immunity.
J. Virol. **272**, 3812-3818, 1998

Maldonado-Lopez R., Moser M. Dendritic cell subsets and the regulation of Th1/Th2 responses
Seminars in Immunology. **13**, 275-282, 2001

Mathe G, Amiel JL, Schwarzenberg L. Adoptive immunotherapy of acute leukemia, Experimental and clinical results.
Cancer Res. **25**, 1525-1531, 1965

Mathias, P., Wickham, T., Moore, M., Nemerow, G. Multiple adenovirus serotypes use α_v integrins for infection.
J. Virol. **68**, 6811-6814, 1994

Matzinger P. Memories are made of this?
Nature **369**, 605-606, 1994.

Maximov A. Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere.
Folia Haematol **8**, 125-134, 1909

McLaughlin-Taylor E., Pande H., Forman S.J., Tanamachi B., Li C.R., Zaia J.A., Greenberg P.D., Riddell S.R. Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8⁺ virus-specific cytotoxic T lymphocytes.
J. Med. Virol., **43**(1), 103-110, 1994

Messner, H.A., Fauser, A. A., Lepine J., Martin M. Properties of human pluripotent hemopoietic progenitors.
Blood cells **6**, 595-607, 1980

Messner, H.A. Till, J.E., McCulloch, E.A. Interacting cell populations affecting granulopoietic colony formation by normal and leukemic human marrow cells.
Blood **42**, 701-710, 1973

Milpied N., Vasseur B., Parquet N., Garnier J.L., Antoine C., Quartier A., Carret A.S., Bouscary D., Faye A., Bourbigot B., Reguerre Y., Stoppa A., Bourquard P., Hurault de Ligny B., Dubief F., Mathieu-Boue A., Lebl V. Humanized anti-CD20 monoclonal antibody (Rituximab) in post transplant B-lymphoproliferative disorder, a retrospective analysis on 32 patients.
Ann Oncol, 11 Suppl **1**, 113-116, 2000

Modrow S. und Falke D. Molekulare Virulogie
Spektrum Akademischer Verlag, 1.korrigierter Nachdruck 1998

Molinier-Frenkel V., Gahery-Segard H., Methali M., Le Boulaire C., Ribault S., Boulanger P., Tursz T., Guillet J.G. & Farace F. Immune Response to recombinant Adenovirus in humans, Capsid components from viral input are targets for vector-specific cytotoxic T Lymphocytes.
J. Virol. **74** (16), 7678-7682, 2000

Moore K.W., Rousset F., Banchereau J. Evolving principles in immunopathology: interleukin 10 and its relationship to Epstein-Barr virus protein BCRF1.
Springer Semin. Immunopathol. **13**(2), 157-166, 1991

Münz C., Bickham K.L., Subklewe M., Tsang M.L., Chahroudi A., Kurilla M-G-, Zhang D., O'Donnell M., Steinman R.M. Human CD4⁺ T Lymphocytes consistently respond to the latent Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen EBNA1.
J. Exp. Med. **191**, 1649-1660, 2000

Murphy G., Tjoa B., Ragde H., Kenny G., Boynton A. Phase I clinical trial, Tcell therapy for prostate cancer using autologous dendritic cells pulsed with HLA-A0201- specific peptides from prostate-specific membrane antigen.
Prostate **29**, 371-380, 1996

Nair S.K., Boczkowski D., Morse M., Cumming R.I., Lyerly H.K., Gilboa E. Induction of primary carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T lymphocytes in vitro using human dendritic cells transfected with RNA.
Nat. Biotechnol **16**, 364-369, 1998.

Nair S.K., Hull S., Coleman D., Gilboa E., Lyerly HK, Morse MA. Induction of carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in vitro using autologous dendritic cells loaded with CEA peptide or CEA RNA in patients with metastatic malignancies expressing CEA.
Int. J. Cancer **82**,121-124, 1999

Nalesnik M.A. Lymphoproliferative disease in organ transplant recipients.
Springer Semin. Immunopatho. **13**,199-216, 1991.

Nemerow G.R. Adenoviral vectors--new insights.
Trends Microbiol. **8** (9), 391-404, 2000

Nemerow G.R. Adenoviral vectors--new insights.
Trends Microbiol. **8**(9), 391-394, 2000

Nemerow G.R. Cell receptors involved in adenovirus entry.

Virology **15**, 274 (1), 1-4, 2000

Nemerow G.R., Stewart PL. Role of alpha(v) integrins in adenovirus cell entry and gene delivery.
Microbiol Mol Biol Rev. **63** (3), 725-734, 1999

Nemerow G.R., Mold C., Schwend V.K, Tollefson V, Cooper N.R. Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediating attachment of Epstein-Barr virus (EBV) to the EBV/C3d receptor of B cells: sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d.
J Virol. **61**(5), 1416-1420, 1987

Nemerow G.R., Cooper NR. Virus receptors on lymphoid cells.
Methods Enzymol. **150**, 548-558, 1987

Oldstone M. B.A. How Viruses escape cytotoxic T Lymphocytes, Molecular Parameters and Players.
Virology **234**, 179-185, 1997

Papadopoulos E.B., Ladanyi M., Emanuel D., Mackinnon S., Boulad F., Carabasi M.H., Castro-Malaspina H., Childs B.H., Gillio A.P., Small T.N, Young J.W., Kernan N.A.,

O'Reilly R.J. Infusions of donor leukocytes to treat Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders after allogeneic bone marrow transplantation.
N. Engl. J. Med. **330**, 1185-1192, 1994

Patel D.D., Gooding M.E., Parrott R.E., Curtis K.M., Haynes B.F., Buckley R.H. Thymic function after hematopoietic stem-cell transplantation for the treatment of severe combined immunodeficiency.
N. Engl. J. Med. **342** (18),1325-32, 2000

Pido-Lopez J., Imami N., Aspinall R. Both age and gender affect thymic output: more recent thymic migrants in females than males as they age.
Clin Exp Immunol ., **125**(3):409-413, 2001

Porter D.L., Antin J.H. The Graft versus Leukemia effect of allogeneic cell therapy
Annu. Rev. Med. **50**, 369-386, 1999

Ramsdell F., Seaman M.S., Miller R.E., Picha K.S., Kennedy M.K., Lynch D.H. Differential ability of Th1 and Th2 T cells to express Fas ligand and to undergo activation-induced cell death.

Int Immunol.,**6** (10),1545-53, 1994

Ramsdell F., Seaman M.S., Miller R.E., Tough T.W, Alderson M.R., Lynch D.H
ld/gld mice are unable to express a functional ligand for Fas.

Eur J Immunol.,**24**(4):928-33, 1994

Ribas, A. Butterfield, L.H., McBride, W.H., Jilani, S. M., Bui, L.A., Vollmer, C.M., Lau, R., Dissett, V.B., Hu, B., Chen, A. Y., Glaspy, J.A. & Economou, J.S. Genetic immunization for the melanoma antigen MART-1/melan-A using recombinant adenovirus transduced murine dendritic cells.

Cancer research. **57**, 2865-2869, 1997

Rickinson A.B., Moss D.J. Human cytotoxic T Lymphocyte responses to Epstein- Barr virus infection.

Annu Rev Immunol **15**, 405-431, 1997

Riddell S.R., Gilbert M.J., Greenberg P.D. CD8+ cytotoxic T cell therapy of cytomegalovirus and HIV infection.

Curr Opin Immunol **5**, 484-491, 1993.

Riddell S.R., Greenberg P.D. Principles of adoptive T cell therapy for human viral diseases.
Annu Rev Immunology **13**, 545-586, 1995.

Riddell S.R., Walter B.A., Gilbert M.J., Greenberg P.D. Selective reconstitution of CD8+ cytotoxic T lymphocyte responses in immunodeficient bone marrow transplant recipients by the adoptive transfer of T cells clones.

Bone marrow Transplantation **14**, 78-84, 1994.

Riddell S.R., Watanabe K.S., Goodrich J.M., Li C.R., Agha M.E., Greenberg P.D. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones.

Science **257**, 238-242, 1992

Ritter M.A., Sauvage C.A., Cotmore S.F. The human thymus microenvironment: in vivo identification of thymic nurse cells and other antigenically-distinct subpopulations of epithelial cells.

Immunology **44**(3),439-446, 1981

Roelvink P.W., Lizonova A., Lee J.G., Li Y, Bergelson J.M., Finberg R.W., Brough D.E., Kovessi I., Wickham T.J. The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F.

J. Virol. **72** (10), 7909-7915, 1998

Roitt I., Brostoff J., Male D., *Immunology*

Mosby –Harcourt Publishers, Sixth Edition, 2001

Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kampgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., Konwalinka, G., Fritsch, P.O., Steinman, R.M., Schuler, G. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood.

J. Exp. Med. **180**, 83-91, 1994

Romani, N., Reider, D., Heuer, M., Ebner S., Eibl, B., Niederwieser, D. & Schuler. Generation of mature dendritic cells from human blood, An improved method with special regard to clinical applicability.

J. Immunol. Methods. **196**, 137-151, 1996

Rooney C.M., Smith C.A. Loftin S.K., Krance R.A., Brenner M.K., Heslop H.E. Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr-virus related lymphoproliferation.

Lancet **35**, 9-18, 1995

Roskrow, M.A., Suzuki, N., Gan, Y., Sixbey, J.W., Ng, C.Y.C., Kimbrough, S., Hudson, M., Brenner, M.K., Heslop, H.E. & Rooney C.M. Epstein-Barr Virus (EBV)- specific cytotoxic T-Lymphocytes for the treatment of patients with EBV-positive relapsed Hodgkin's disease.

Blood. **91**, 2925-2934, 1998

Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells maintained by granulocyte/macrophage colony stimulation factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α .

J. Exp. Med. , **179**, 1109-1118, 1994

Sette A, O'Sullivan D, Krieger JI, Karr RW, Lamont AG, Grey HM.

MHC-antigen-T cell interactions: an overview.

Semin Immunol **3**(4):195-202, 1991

Sharp P.A. Split Genes and RNA splicing. Nobel-Lecture

Cell **77**, 805-815, 1994

Schaefer U.W., Beelen D.W. Knochenmarktransplantation

Karger, 2. Überarbeitete Auflage, 1991

Shapiro R.S., McClain K., Frizzera G., Gajl-Peczalska K.J., Kersey J.H., Blazar B.R., Arthur D.C., Patton D.F., Greenberg J.S., Burke B., Ramsay N.K.C., McGlave P., Filipovich A.H. Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoproliferative disorders following bone marrow transplantation.

Blood **71**, 1234- 1241, 1988

Sharipo A., Imreh M., Leonchiks A., Imreh S., Masucci M-G. A minimal glycine-alanine repeat prevents the interaction of ubiquitinated I kappaB alpha with the proteasome: a new mechanism for selective inhibition of proteolysis

Nat.Med. **4**, 939-944, 1998

Shields A.F., Hackman R.C., Fife K.F., Corey L., Meyers J.D. Adenovirus infection in patients undergoing bone-marrow transplantation.

N. Engl. Med. **312**, 529-533, 1995

- Smith C.A., Woodruff LS, Kitchingman GR, Rooney CM, Adenovirus-pulsed dendritic cells stimulate human virus-specific T-cells in vitro.
J. Virol. **70** (10),6733-6740, 1996
- Smith C.A, Woodruff LS, Rooney CM, Kitchingman GR, Extensive Cross-reactivity of adenovirus-specific cytotoxic T-cells.
Human Gene Therapy **9**, 1419-1427, 1998
- Sparer T.E., Tripp R.A., Dillehay D.L., Hermiston T.W., Wold W.S., Gooding L.R.
The role of human adenovirus early region 3 proteins (gp19K, 10.4K, 14.5K, and 14.7K) in a murine pneumonia model.
J. Virol., **70**(4):2431-2439, 1996
- Song, W., Kong, H., Carpenter, H., Torii, H., Granstein, R., Rafii, S., Moore, M. A. S. & Crystal, R. G. Dendritic cells genetically modified with an adenovirus vector encoding the cDNA for a model tumor antigen induce protective and therapeutic antitumor immunity.
J. Exp. Med. **186**, 1247-1256, 1997
- Souberbielle B.E., Russell W.C. Human T cell proliferative response to polypeptides from adenovirus type 2.
J Infect Dis., **172** (5), 1421-1422, 1995
- Steinbrink K, Wöfl M, Jonuleit H et al. Induction of tolerance by IL-10-treated Dendritic cells. J Immunol, **159**, 4772, 1997
- Steinman, R.M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. Annual reviews of Immunology. **9**,271- 296, 1991
- Storb R., Thomas ED, Buckner CD, Allogeneic marrow grafting for treatment of aplastic anemia.
Blood **43**, 157-180, 1974
- Storek J., Witherspoon R., Storp R. T cell reconstitution after bone marrow transplantation into adult patients does not resemble T cell development in early life.
Bone Marrow Transplantat **16**, 413-421, 1995
- Su Z, Peluso MV, Raffegerst SH, Schendel DJ, Roskrow MA. The generation of LMP2a-specific cytotoxic T lymphocytes for the treatment of patients with EBV positive Hodgkin disease.
Eur. J. Immunol. **31** (3), 947-958, 2001
- Su Z, Peluso MV, Raffegerst SH, Schendel DJ, Roskrow MA. Antigen presenting cells transfected with LMP2a RNA induce CD4+ LMP2a-specific cytotoxic T lymphocytes which kill via a Fas- independent mechanism
(in press, 2001)
- Su Z. The in vitro generation of LMP2a-specific cytotoxic T lymphocytes for the treatment of patients with relapsed EBV positive Hodgkin disease.
Dissertation for the degree of Medicine, eingereicht an der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden, 2001

Sun Q., Pollok K., Burton R., Dai L.J., Britt W., Emanuel D.J. and Lucas K.G.
Simultaneous ex vivo expansion of Cytomegalovirus and Epstein-Barr Virus-specific Cytotoxic T-Lymphocytes using B-Lymphoblastoid Cell lines expressing Cytomegalovirus pp65.
Blood **94**, 9, 3242-3250, 1999

Sun Q, Burton RL, Dai LJ, Britt WJ, Lucas KG.
B lymphoblastoid cell lines as efficient APC to elicit CD8⁺ T cell responses against a cytomegalovirus antigen.
J. Immunol. **165** (7), 4105-11, 2000

Tait B.D., Maddison R., McCluskey J., Deayton S., Heatley S., Lester S., Bardy P., Szer J., Grigg A., Spencer A., Schwarzer A., Holdsworth R. Clinical relevance of the minor histocompatibility antigen HA-1 in allogeneic bone marrow transplantation between HLA identical siblings.
Transplant. Proc. **33** (1-2), 1760-1, 2001

Thomas E.D., Buckner C.D., Banaji M . One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogeneic marrow transplantation.
Blood **49**, 511-533, 1977

Thomas E.D., Lochte H.L., Cannon J.H. Sublethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man.
J Clin Invest **38**, 1709-1716, 1959

Thomas E.D., Storb R., Clift R.A. Bone-marrow transplantation.
N. Engl. J. Med. **292**, 832-843, 895-902, 1975

Thomas E.D., Blume K.G., Forman S.J., Hematopoietic cell transplantation (ed2) Boston, MA, Blackwell Science, 1999

Thurnher, M., Papesch, C., Ramoner, R., Gastl, G., Bock, G., Radmayr, C., Klocker, H., Bartsch, G. In vitro generation of CD83⁺ human blood dendritic cells for active tumor immunotherapy. *Exp. Hematol.* **25**, 232-245, 1997

Tjoa B., Simmons S.J., Bowes V.A., Ragde H., Rogers M., Elgamal A., Kenny G., Cobb O.E. Ireton R.C., Troychak M.J., Salgaller M.L., Boynton A., Murphy G. Evaluation of phase I/II clinical trials in prostate cancer with dendritic cells and PSMA peptides.
Prostate, **36**, 39-44, 1998

Tortorella D., Gewurz B.E., Furman M.H., Schust D.J., Ploegh H.L. (2000) Viral Subversion of the immune system.
Annu.Rev.Immunol. **18**, 861-926, 2000

Tosato G. The Epstein-Barr virus and the immune system.
Adv. Cancer Res. **49**, 75-86, 1987

Tseng L.H., Lin M.T., Hansen J.A., Gooley T., Pei J., Smith A.G., Martin E.G., Petersdorf E.W., Martin P.J. Correlation between disparity for the minor histocompatibility antigen HA-1 and the development of acute graft-versus-host disease after allogeneic marrow transplantation.

Blood **15**, 94 (8), 2911-2914, 1999

Trapani J.A. , Dual mechanisms of apoptosis induction by cytotoxic lymphocytes.

Int Rev Cytol. **182**, 111-192, 1998

Van Bekkum D.W., de Vries M.J. Radiation Chimeras, New York, NY, Academic Press, 1967

Van Ginkel, F.W., McGhee, J.R., Liu, C., Simecka, J. W., Yamamoto, M., Frizzell, R.A., Sorscher, E.J., Kiyono, H. & Pascual, D. W. Adenoviral gene delivery elicits distinct pulmonary-associated T-helper cell responses to the vector and to its transgene.

J. Immunol. **159**, 685-693, 1997

Venard V., Carret A., Corsaro D., Bordigoni P., Le Faou A. Genotyping of adenovirus isolated in an outbreak in a bone marrow transplant unit shows that diverse strains are involved. J Hosp Infect **44** (1), 71-74, 2000

Walter E.A., Greenberg P.D., Gilbert M.J., Finch R.J., Watanabe K.S., Thomas D., Riddell S.R. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor.

N. Engl. J. Med. **333**, 1038-1044, 1995

Wan, Y., Bramson, J., Carter, R., Graham, F. & Gauldie, J. Dendritic cells transduced with an adenoviral vector encoding a model tumor- associated antigen for tumor vaccination.

Human Gene Therapy **8**, 1355-1363, 1997

Wang K., Guan T., Cheresch D.A., Nemerow G.R. Regulation of adenovirus membrane penetration by the cytoplasmic tail of integrin beta5.

J Virol. **74** (6), 2731-2739, 2000

Weinberg K., Annett G., Kashyap A., Lenarsky C., Forman S.J., Parkman R..

The effect of thymic function on immunocompetence following bone marrow transplantation.

Biol. Blood Marrow Transplant., **1**(1):18-23, 1995

Wickham, T.J., Mathias, P., Cheresch, D.A., Nemerow, G.R. Integrins $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ promote adenovirus internalization but not virus attachment.

Cell. **73**, 309, 1993

Yang Y., Xiang Z., Ertl H.C.J., Wilson J.M. Upregulation of class I major histocompatibility complex antigens by interferon γ is necessary for T-cell mediated elimination of recombinant adenovirus-infected hepatocytes in vivo.

Proc.Natl.Acad.Sci.USA **92**, 7257 –7261, 1995

Yasukawa M., Zarling J.M. Human cytotoxic T cell clones directed against herpes simplex virus-infected cells. I. Lysis restricted by HLA class II MB and DR antigens.

J. Immunol **133**, 422-27, 1984.

Yasukawa M., Ohminami H., Yakushijin Y., Arai J., Hasegawa A., Ishida Y., Fujita S. Fas-independent cytotoxicity mediated by human CD4⁺ CTL directed against Herpes Simplex virus-infected cells.

J. Immunol **162**, 6100-6106, 1999.

Yasukawa M., Ohminami H., Arai J., Kasahara Y, Ishida Y., Fujita S. Granule exocytosis, and not the fas/fas ligand system, is the main pathway of cytotoxicity mediated by alloantigen-specific CD4(+) as well as CD8(+) cytotoxic T lymphocytes in humans.

Blood **95**, 2352-5, 2000.

Zahradnik, J.M., Spencer M.J., Porter D.D. Adenovirus infection in the immunocompromised patient.

Am. J. Med. **68**, 725-732, 1980

Zanetti A, Conforti G, Hess S, Martin-Padura I, Ghibaudi E, Preissner KT, Dejana E. Clustering of vitronectin and RGD peptides on microspheres leads to engagement of integrins on the luminal aspect of endothelial cell membrane.

Blood **15**,84(4),1116-23, 1994

Zdanov A., Schalk-Hihi C., Menon S., Moore KW., Wlodawer A.. Crystal structure of Epstein-Barr virus protein BCRF1, a homolog of cellular interleukin-10.

J Mol Biol. **268** (2), 460-7, 1997

Zhong L., Granelli-Piperno A., Choi Y., Steinman R.M. (1999) Recombinant adenovirus is an efficient and non-perturbing genetic vector for human dendritic cells.

Eur. J. Immunol. **29**, 964-972, 1999

Zhou, L-J., Tedder, T.F. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily.

J. Immunol. **154**, 3821-3828, 1995

Zhou, L.J., Tedder, T.F. CD14⁺ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83⁺ dendritic cells.

Proc Natl Acad Sci USA **93**, 2588, 1996

Zitvogel L., Mayordomo J.I, Tjandrawan T., Deleo A.B., Clarke M.R., Lotze M.T. Storkus W.J. Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells, dependence on T cells, B7 costimulation and T helper cell 1- associated cytokines.

J. Exp. Med. **183**, 87-97, 1996

Zitvogel L., Regnault A., Lozier A., Wolfers J., Flament C., Tenza D., Ricciardi-Castagnoli P., Raposo G., Amigorena S. Eradication of established tumors using a novel cellfree vaccine, dendritic cell derived exosomes.

Nat. Med. **4**, 594-600, 1998

Zutter M.M., Martin P.J, Sale G.E., Shulman H.M., Fisher L., Thomas E.D., Durnam D.M. Epstein-Barr virus lymphoproliferation after bone marrow transplantation.

Blood. **72**, 520-528, 1988

PUBLIKATIONSLISTE

Abstracts

Regn S., Raffegerst S., Schendel D., Kolb H.J., Roskrow M. Simultaneous expansion of cytotoxic T lymphocytes recognising both EBV and Adenovirus for the prophylaxis of patients receiving an allogeneic BMT.
American Society of Hematology, Blood **96** (11) 236, 2000

Regn S., Chen X., Kolb H.J., Roskrow M. The generation of monospecific and bispecific antiviral cytotoxic T lymphocytes (CTL) for the prophylaxis of patients receiving an allogeneic BMT.
American Society of Hematology, Blood **94** (10) 674, 1999

Chen X., **Regn S.**, Kolb H.J., Roskrow M. The generation of leukemic dendritic cells from patients with chronic myeloid leukemia (CML) using the combination of GM-CSF and Interferon-alpha.
American Society of Hematology, Blood **94** (10) 2369, 1999

Woiciechowsky A., **Regn S.**, Günther C., Kolb H.J., Roskrow M. Dendritic cells generated *in vitro* from patients with acute myeloid leukemia (AML) stimulate autologous and allogeneic HLA-matched leukemia-specific cytotoxic T lymphocytes.
American Society of Hematology, Blood **94** (10) 354, 1999

Publikationen

Regn S., Raffegerst S., Schendel D., Kolb H.J., Roskrow M. Simultaneous expansion of cytotoxic T lymphocytes recognising both EBV and Adenovirus for the prophylaxis of patients receiving an allogeneic BMT.
Bone Marrow Transplantation **27**, 53-64, 2001

Chen X., **Regn S.**, Kolb H.J., Roskrow M. The generation of leukemic dendritic cells from patients with chronic myeloid leukemia (CML) using the combination of GM-CSF and Interferon-alpha.
Br. J. Haematol. **111** (2), 596-607, 2000

Woiciechowsky A., **Regn S.**, Günther C., Kolb H.J., Roskrow M. Dendritic cells generated *in vitro* from patients with acute myeloid leukemia (AML) stimulate autologous and allogeneic HLA-matched leukemia-specific cytotoxic T lymphocytes.
Leukemia **15** (2), 246-255, 2001

Curriculum vitae

Name Sybille Susanne Regn, geb. Martin
Familienstand verheiratet mit Stefan Regn
Geburtsdatum und -ort 26. April 1964 in Wiesbaden
Wohnort Edelweißstraße 3g, 85591 Vaterstetten

Schulausbildung

Grundschule 1970-1974 Adolf-Reichwein-Schule, Wiesbaden-Rambach
Förderstufe 1975-1977 Theodor-Fliedner Gesamtschule in Wiesbaden
Gymnasium 1977-1984 Theodor-Fliedner Gesamtschule und ab 1981
Oberstufengymnasium am Moltkering in Wiesbaden

Studium

1984-1985 Studium der Geowissenschaften an der Johannes-
Gutenberg Universität in Mainz
WS 1985/86 Studium der Biologie an der Johannes-Gutenberg
Universität in Mainz
WS 1991/92 Diplomprüfung, mit Hauptfach Zoologie, Nebenfächer
waren: Botanik, Genetik und Paläontologie
1992-1993 Diplomarbeit am Institut für Populationsgenetik (Prof. Dr.
Alfred Seitz) der Biologischen Fakultät der Johannes-
Gutenberg Universität in Mainz mit dem Thema:
„Populationsgenetische Untersuchungen an *Gammarus
fossarum* (Crustacea, Amphipoda) aus zwei heimischen
Bachsystemen“

Dissertation

November 1998- November 2001 Promotion am Institut für Molekulare Immunologie
(Leiterin Prof. Dr. Dolores Schendel) des GSF-
Forschungsinstitutes für Umwelt und Gesundheit in der
klinischen Kooperationsgruppe: Hämatopoetische
Zelltransplantation (Leiter Prof. Dr. H.-J. Kolb) unter der
Betreuung von Dr. Marie A. Roskrow mit dem Thema:
„*Simultane Expansion zytotoxischer T-Lymphozyten
gerichtet gegen Adeno-und Epstein-Barr-Virus Epitope,
zur Therapie von opportunistischen Infektionen nach
allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation
(HSCT)*“