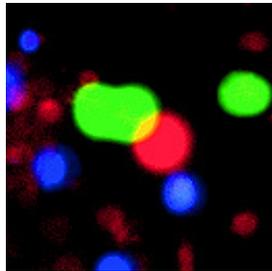


Aus der
Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie und internistischer Intensivmedizin
und dem Institut für medizinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

HLA-Typ unabhängige Generierung HCMV-spezifischer T-Zellen mittels überlappender Peptidbibliotheken und immunomagnetischer Anreicherung: Eine neue Strategie für die adoptive Immuntherapie



Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

von
Sonja Meyer
aus Nürnberg

Gutachter: 1. ...Prof. Dr. med. R. Reinke.....
2. ...Prof. Dr. med. D. Kabelitz.....
3. ...Prof. Dr. med. H. Einsele.....

Datum der Promotion: ...13.11.2006.....

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abbildungsverzeichnis.....	6
Tabellenverzeichnis.....	7
Abkürzungsverzeichnis.....	8
1. Einleitung	10
1.1 Adoptive Immuntherapie als Therapieoption.....	10
1.1.1 Rationale adoptiver Immuntherapie: Die Schlüsselrolle der T-Zellen	10
1.1.2 Anwendungen von T-Zellen zur adoptiven Immuntherapie	12
1.2. Überblick über HCMV und seine klinische Bedeutung	14
1.2.1 Epidemiologie.....	14
1.2.2 Virusaufbau	14
1.2.3 Die HCMV-Infektion in Immunsupprimierten.....	15
1.2.4 Therapieoptionen bei HCMV-Infektion	18
1.3 Adoptive Immuntherapie im Rahmen der HCMV-Infektion.....	20
1.3.1 Prinzipien und Anforderungen an die Generierung von T-Zellen.....	20
1.3.2 Methoden zur Generierung HCMV-spezifischer T-Zellen: Stand der Forschung.....	21
1.3.3 Die Immunantwort gegen HCMV als Grundlage adoptiver Immuntherapie	25
1.3.4 Überlappende Peptidbibliotheken von pp65 als Basis für die T-Zellgenerierung.....	27
2. Ziele und Arbeitsplan.....	29
2.1 Allgemeine Zielstellung der Arbeit	29
2.2 Konkrete Ziele und Fragestellungen	29
3 Material und Methoden.....	32
3.1 Probanden, Ethikkommission und Gentechnikgenehmigung	32
3.1.1 Probanden.....	32
3.1.2 Ethikvotum	32
3.1.3 Gentechnikgenehmigung.....	32
3.2 Zellkultur.....	32
3.2.1 Allgemeines.....	32
3.2.2 Zellzählung.....	33
3.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	33
3.2.4 Ficollgradient zur Isolation von PBMCs	34
3.2.5 Herstellung der PHA-Blasten.....	34
3.2.6 Herstellung der wt-LCLs	35
3.2.7 Herstellung transgener pp65 mini-LCLs.....	35

3.3 Selektion und Expansion der T-Zellen	36
3.3.1 Determinierung der Inkubationszeit für die Peptidstimulation (Vorversuch)	36
3.3.2 Peptidstimulation für die Vorversuche sowie für Protokoll I und II	36
3.3.3 Selektion der T-Zellen nach dem IFN- γ -Sekretions-Assay für Protokoll I und II.....	36
3.3.4 Generierung der T-Zellen für Protokoll III.....	38
3.3.5 Expansion der T-Zellen durch Restimulation	38
3.4 Analytische Methoden	38
3.4.1 HLA-Typisierung.....	38
3.4.2 PCR	39
3.4.3 Westernblot und Antikörperfärbung	39
3.4.4 Real-Time PCR	40
3.4.5 Oberflächenfärbung der Zellen und Durchflusszytometrie (FACS).....	42
3.4.6 Intrazelluläre Färbung zum Nachweis des pp65 Antigens.....	42
3.4.7 Multispezifische T-Zellantworten.....	43
3.4.8 Zytotoxizitätstestung.....	43
4. Ergebnisse	45
4.1 Generierung der wt-LCLs und pp65 mini LCLs	45
4.1.1 Herstellung der Zelllinien	45
4.1.2 Ausschluss viraler Rekombination durch PCR.....	46
4.1.3 Pp65-Expression auf Proteinebene	47
4.2 Generierung der T-Zellen nach Protokoll I, II, und III	48
4.2.1 Probandenauswahl.....	48
4.2.2 HLA-Typisierung.....	49
4.2.3. Bestimmung der geeigneten Inkubationszeit für die Peptidstimulation.....	49
4.2.4 Selektion der pp65-spezifischen Zellen	50
4.2.5 Expansion der T-Zellen mit pp65 Antigen-spezifität	51
4.2.6 Phänotypisierung.....	53
4.2.7 Multiple Epitop-Spezifitäten der T-Zelllinien	55
4.2.8 T-Zellfunktion: Zytotoxizität.....	57
5. Diskussion.....	62
5.1 Antigen-spezifische T-Zellen durch Spezifische Stimulation - Vergleich etablierter Methoden mit Protokoll I.....	63
5.2 Expansion der T-Zellen ohne Spezifitätsverlust.....	67
5.3 Multispezifität durch OPP-Stimulation.....	70
5.4 T-Zellhilfe	71
5.5 Biosicherheit.....	74
5.6 Kritische Analyse der Methoden und des Ansatzes	75

5.6.1 FCS.....	75
5.6.2 Varianz der Immunphänotypen.....	76
5.6.3 Zytotoxizitätstest.....	76
5.6.4 Auswahl von pp65 als Zielantigen	77
5.6.5 HCMV-seronegative Spender.....	78
5.6.6 Kosten.....	79
5.7 Ausblick.....	79
6. Zusammenfassung.....	81
Abstract European Journal of Immunology.....	82
Literaturverzeichnis	83
Erklärung.....	96
Curriculum Vitae.....	97
Vielen Dank.....	99

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Prinzipien der Immunabwehr durch T-Zellen.....	11
Abbildung 2: Die Struktur des HCMV-Virions.....	15
Abbildung 3: HCMV-infizierte Zellen im Lichtmikroskop.....	18
Abbildung 4: Design des mini-EBV-Plasmids zur Generierung der pp65 mini-LCLs	24
Abbildung 5: Der Peptidpool (OPP) von pp65.....	28
Abbildung 6: Übersicht der drei Protokolle I, II und III	30
Abbildung 7: Prinzip des IFN- γ -Sekretions-Assay	37
Abbildung 8: Nachweis der wt- und pp65-DNA in LCLs und mini-LCLs durch PCR	47
Abbildung 9: Nachweis der pp65-Expression durch pp65 mini-LCLs im Westernblot	48
Abbildung 10: Bestimmung der geeigneten Inkubationszeit für die Peptidstimulation	50
Abbildung 11: Nachweis IFN- γ -positiver T-Zellen (nach pp65-Stimulation) mittels FACS.....	51
Abbildung 12: Durchschnittliche Expansionsraten der T-Zellen mit pp65 Antigen-spezifität	53
Abbildung 13: Immunphänotypen antigenspezifischer Zelllinien je nach Generierungsstrategie.....	54
Abbildung 14: Multispezifische T-Zellantworten der T-Zelllinien aus Protokoll I im FACS	56
Abbildung 15: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme pp65-spezifischer Lyse durch eine T-Zelllinie	57
Abbildung 16: Spezifische Lyse im Zytotoxizitätstest – Vergleich der 3 Protokolle anhand eines Beispiels	59
Abbildung 17: Vergleich zytolytischer Aktivitäten je nach Generierungsstrategie.....	60

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Beziehung zwischen HCMV-spezifischen CTLs und HCMV-Erkrankung nach KM-Tx	17
Tabelle 2: Vor- und Nachteile aktueller Methoden zur T-Zellherstellung	25
Tabelle 3: T-Zellreaktivitäten HCMV-seropositiver Probanden gegen pp65 und IE1	26
Tabelle 3: Zeitbedarf zur Etablierung der wt-LCLs und der pp65 mini-LCLs	45
Tabelle 4: HLA-Typen der HCMV-seropositiven Probanden	49
Tabelle 5: Expansion der T-Zellen mit pp65 Antigen-spezifität	52
Tabelle 6: Medianwerte der Immunphänotypen	54
Tabelle 7: Lyseraten aller T-Zelllinien im Zytotoxizitätstest	61
Tabelle 8: Gegenüberstellung der Vor- und Nachteile der drei Protokolle	62

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AG	Antigen
AK	Antikörper
APC	Antigenpräsentierende Zelle
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of differentiation - Zelloberflächenantigen, welches eine Untergruppe von Lymphozyten charakterisiert
CD4 ⁺	Marker für T-Helferzellen
CD8 ⁺	Marker für zytotoxische T-Zellen
CD16 ⁺	Marker für Natürliche Killerzellen
CMV	Zytomegalievirus
CsA	Ciclosporin A
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
DC	Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleotidsäure
dNTP	Deoxynukleosidtriphosphat
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E : T Ratio	Verhältnis der Effektorzellen zu den Zielzellen
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter – Durchflusszytometer der Firma Becton-Dickinson
FAS/FAS-Ligand	Rezeptor, der nach Interaktion mit seinem Ligand (z. B. auf NK-Zellen oder aktivierten T-Zellen) zur Apoptose führt
FCS	Fetales Kälberserum
FITCS	Fluoresceinisothiocyanat
gb, gH	Glykoprotein b und H des Zytomegalievirus
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GvHD	Graft versus host disease
GY	Gray
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HCMV	Humanes Zytomegalievirus
HHV	Humanes Herpesvirus

IE	Immediate early
IFN- γ	Interferon Gamma, T-Zell-Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
K 562	Kommerziell erhältliche NK-Zell-sensitive Zelllinie
KM	Knochenmark
KM-Tx	Knochenmarkstransplantierte
LAK	Lymphokin-aktivierte Killerzelle
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie
MACS	Magnetisch assoziierte Zellsortierung
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
OPP	Overlapping Peptide Pool (überlappende Peptidbibliotheken)
PBMCs	Periphere Mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphat gepufferte saline Lösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridin Chlorophyll Protein
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phytohämagglutinin
pp	Phosphoprotein
PTLD	Lymphoproliferative Erkrankung nach Transplantation
RPMI	Roswell Park Memorial Medium
RT	Raumtemperatur
SEB	Staphylokokken Endotoxin B
Tab.	Tabelle
Th1	Subgruppe 1 der T-Helferzellen
Th2	Subgruppe 2 der T-Helferzellen
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
24-WP	24-Wellplatte
96-WP	96-Wellplatte