

Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
Aus der Medizinischen Klinik III
Hämatologie, Onkologie und Transfusionsmedizin
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Eckhard Thiel

**Phänotyp-Charakterisierung reaktiver T-Zellen von Melanompatienten
gegen autologe Tumorzellen und ein neues Tyrosinase-Epitop
mittels Durchflußzytometrie**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
Medizinischen Doktorwürde
Der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von
Anne Marie Asemissen
aus Bielefeld

Referent: Prof. Dr. med. Carmen Scheibenbogen

Koreferent: Prof. Dr. med. Ulrike Blume-Peytavi

Gedruckt mit Genehmigung der Charité –Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 02.04.2004

ZUSAMMENFASSUNG

Zahlreiche Untersuchungen belegen inzwischen die Existenz TAA-spezifischer T-Zellen bei unterschiedlichen Tumorentitäten. Besonders das maligne Melanom ist für seine Antigenität bekannt und wurde von Tumorimmunologen in den vergangenen Jahren intensiv erforscht. Viele Studien konnten Tumor-reaktive T-Lymphozyten nach *in vitro* Expansion von Vorläuferzellen aus dem peripheren Blut von Melanompatienten nachweisen. Die *in vitro* Expansion führt jedoch zu qualitativen und quantitativen Veränderungen der T-Zellen, so dass die *in vivo*-Funktion der Tumor-gerichteten Immun-Antwort nur eingeschränkt beurteilt werden kann. In dieser Arbeit wurde ein methodischer Ansatz gewählt, der direkt *ex vivo* zirkulierende T-Lymphozyten, die spezifisch autologe Tumorzellen erkennen, quantifiziert und charakterisiert.

Diese Untersuchung erforderte eine sehr sensitive Nachweismethode, die reaktive Zellen auf Einzelzellniveau nachweist. Da zusätzlich auch der Phänotyp der reaktiven Zellen beurteilt werden sollte, wurden zunächst zwei durchflußzytometrische Methoden im Vergleich mit dem IFN γ -ELISPOT-Assay, einer bereits etablierten, sensitiven Methode zur T-Zell-Analyse evaluiert. Die Analyse von Frequenzen Influenza-reaktiver T-Zellen ergab übereinstimmende Ergebnisse mit der IZ-DZ und dem IFN γ -ELISPOT-Assays. Deshalb wurde nachfolgend die IZ-DZ zur Quantifizierung der Tumor-reaktiven T-Zellen bei Melanompatienten eingesetzt.

Bei allen sechs untersuchten Patienten konnten Melanom-reaktive T-Zellen in der CD8 $^{+}$ - bzw. in der CD4 $^{+}$ -Population nachgewiesen werden. Die Frequenzen lagen mit 0,13%-2,17% spezifischer CD8 $^{+}$ T-Zellen in der Größenordnung Virus-reaktiver T-Zellen. Die Phänotypanalysen ergaben, dass es sich bei den reaktiven Zellen vor allem um CD45RA $^{+}$ CCR7 $^{-}$ -Effektorzellen handelte. Die Koexpression von Granzym B in den Tumor-reaktiven Zellen weist außerdem darauf hin, dass diese Zellen *in vivo* möglicherweise direkte zytotoxische Funktionen ausüben. Bei einer Patientin gelang nach direkter Separation Tyrosinase-spezifischer CD45RA $^{+}$ CCR7 $^{-}$ T-Zellen aus dem peripheren Blut mittels Tetrameren der Nachweis der Zytotoxizität direkt *ex vivo*.

Außerdem wurde die IZ-DZ in dieser Arbeit zur weitergehenden Charakterisierung Tyrosinase-reaktiver T-Zellen eingesetzt, die gegen ein neues, durch computergestützte Epitop-Vorhersage ermitteltes HLA-A1-restringiertes Tyrosinase-Peptid gerichtet sind. Mit dem ELISPOT-Assay wurden reaktive T-Zellen gegen das neue Tyrosinase-Epitop Tyr₄₅₄₋₄₆₃ nachgewiesen, die durchflußzytometrisch mit der IZ-DZ näher phänotypisiert wurden: Es handelt sich bei den reaktiven Zellen um CD3⁺CD8⁺ T-Lymphozyten, deren Effektorpotential durch den Nachweis von Granzym B gezeigt wurde.

Insgesamt demonstrieren die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse, dass Melanompatienten häufig funktionelle T-Zellantworten gegen den Tumor aufbauen. Die Beurteilung des Phänotyps reaktiver T-Zellen erlaubt ihre Zuordnung zu Differenzierungs-Subtypen, den naiven T-Zellen, Gedächtnis- und Effektorzellen. Die bei unseren Patienten nachgewiesenen Melanom-reaktiven Lymphozyten bilden eine Mischpopulation aus überwiegend Effektorzellen, aber auch Gedächtniszellen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Tumor-reaktive T-Zellen prinzipiell sowohl in der Lage sind, Tumorzellen zu zerstören, als auch eine langanhaltende Immunität aufrechtzuerhalten.

	Seite
INHALTSVERZEICHNIS	1
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
1 EINLEITUNG	6
1.1 Immunantwort gegen Tumoren	6
1.2 Antigen-spezifische zytotoxische T-Zell-Aktivität	7
1.3 Phänotyp und Subpopulationen von T-Zellen	10
1.4 Tumor-assoziierte Antigene	13
1.5 Immuntherapie von malignen Erkrankungen	16
1.6 Quantitative Nachweismethoden Antigen-reaktiver T-Zellen	18
1.7 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	23
1.8 Durchführung der Arbeit	23
2 MATERIAL UND METHODEN	25
2.1 Material	25
2.1.1 Spender	25
2.1.2 Patienten	25
2.1.3 Tumorzelllinien	25
2.1.4 Dichtegradient	26
2.1.5 Medien	26
2.1.6 Puffer	26
2.1.7 Peptide und Stimulanzen	27
2.1.8 Antikörper für den IFN γ -ELISPOT-Assay	28
2.1.9 Spezielle Reagenzien für den IFN γ -ELISPOT-Assay	28
2.1.10 Antikörper in der Durchflußzytometrie	29
2.1.11 Spezielle Reagenzien in der Durchflußzytometrie	30
2.1.12 Instrumente und Software	30
2.2 Methoden	31
2.2.1 Ficoll-Präparation mononukleärer Zellen	31
2.2.2 Auftauen der Zellen	31
2.2.3 Zellzahlbestimmung	31

2.2.4	Zellkultur	32
2.2.5	IFN γ -ELISPOT-Assay	32
2.2.6	Durchflußzytometrie	32
2.2.6.1	Färbung intrazellulärer Zytokine	33
2.2.6.2	Färbung oberflächengebundener Zytokine	34
2.2.6.3	Durchflußzytometrische Messung	35
2.2.5	Statistik	36
3	ERGEBNISSE	37
3.1	Methodenetablierung	37
3.1.1	Auswahl der Spender	37
3.1.2	Ermittlung der Anzahl der CD8+ Lymphozyten	38
3.1.3	Frequenz der IMP 58-66-reaktiven T-Lymphozyten im ELISPOT-Assay	38
3.1.4	Anzahl und Reproduzierbarkeit der INF γ -produzierenden MNZ mit der intrazellulären Zytokindetektion	39
3.1.5	Anzahl und Reproduzierbarkeit der INF γ -produzierenden MNZ mit dem Sekretionassay®	41
3.1.6	Vergleich der Ergebnisse der drei untersuchten Methoden	43
3.1.7	Analyse des Hintergrundes im IFN γ -Sekretionstest	45
3.2	Analyse Tumor-reaktiver T-Zellen bei Melanompatienten	46
3.2.1	Charakterisierung der Melanomzelllinien	46
3.2.2	T-Zell Reaktivität gegen autologe Melanomzellen	47
3.2.3	Phänotypbestimmung der Melanomreaktiven T-Lymphozyten	49
3.2.4	Nachweis von Granzym B in Melanom-reaktiven T-Zellen	51
3.2.5	T-Zell-Reaktivität gegen TAA	51
3.2.6	Stabilität der T-Zell-Reaktivität über die Zeit	53
3.2.7	Klinischer Verlauf der Patienten	55
3.3	Charakterisierung Tyrosinase-reaktiver T-Zellen	58
3.3.1	Identifizierung eines neuen HLA-A1 bindenden Tyrosinase- Kandidaten-Epitopes	58
3.3.2	Phänotypanalysen Tyrosinase-reaktiver T-Zellen	59

4	DISKUSSION	62
4.1	Methodenetablierung	62
4.2	Analyse Tumor-reaktiver T-Zellen bei Melanompatienten	66
4.3	Charakterisierung Tyrosinase-reaktiver Zellen bei Melanompatienten in Remission	71
4.4	Schlussfolgerungen	73
5	ZUSAMMENFASSUNG	74
6	LITERATURVERZEICHNIS	76
7	LEBENS LAUF	103
8	DANKSAGUNG	106

Abkürzungsverzeichnis

AB	humanes AB-Serum
AML	akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
APZ	antigen präsentierende Zelle
AS	Aminosäure
BCG	Bacille Calmette Guérain
BCIP/NBT	5-Bromo-3-Chloro-3-Indolyl-Phosphat/Nitroblau Tetrazolium
BFA	Brefeldin A
BSA	bovines Serum-Albumin
CD	engl.: cluster of differentiation
CDDP	Cisplatin
CEA	Carzino-embryonales Antigen
CO ₂	Kohlendioxid
CRA	engl.: Chromium-Release-Assay
DKFZ	deutsches Krebsforschungszentrum
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTIC	Dacarbazin
DZ	Dendritische Zellen
EBV	Ebstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetra-Acetat
ELISPOT	Enzyme Linked Immuno Spot
FACS	engl.: fluorescence activated cell sorter
FCS	engl.: fetal calf serum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen stimulierender Faktor
gp 100	Glykoprotein 100
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
HPV	humanes Papilloma Virus

IFN γ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
IMP 58-66	Influenza Matrix Protein, Aminosäuresequenz 58-66
IZ-DZ	intrazelluläre Zytokinfärbung in der Durchflußzytometrie
LDA	engl.: limiting dilution assay
mAK	monoklonaler Antikörper
mg	Milligramm
μ g	Mikrogramm
MHC	engl.: major histocompatibility complex
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
mMol	Millimolar
MNZ	mononukleäre Zellen (=Lymphozyten und Monozyten)
mRNA	engl.: Messenger-Ribonukleinsäure
N	Anzahl
NK-Zelle	natürliche Killer Zelle
PBS	engl.: phosphat buffered saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PWM	engl.: pokeweed mitogen
S-DZ	Zytokin-Sekretionassay® in der Durchflußzytometrie
TAA	Tumor-assoziierte Antigene
TAP	Transporter assoziiert mit Antigen Präsentation
TGF β	engl.: Tumor-growth-factor beta
TIL	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TZR	T Zell-Rezeptor
U/min	Umdrehungen/Minute
VDS	Vindesin
Verd	Verdünnungsfaktor
Vol	Volumen
ZTL	zytotoxische T-Lymphozyten

LEBENS LAUF

Personalien

Vorname und Name	Anne Marie Asemissen
Geburtsdatum	13. Oktober 1975
Geburtsort	Bielefeld
Familienstand	ledig
Eltern	Marie-Luise Asemissen, geb. Becker, Hausfrau und Mutter Hans-Jochen Asemissen, Kaufmann

Schul Ausbildung

1982-1986	Katholische Grundschule in Bielefeld
1986-1995	Ratsgymnasium Bielefeld
26.06.1995	Abitur

Akademische Ausbildung

1995 - 1997	Studium der Humanmedizin, Ernst-Moritz-Arndt-Universität zu Greifswald
10.09.1997	Ärztlichen Vorprüfung, LPA Mecklenburg Vorpommern
1997-2002	Studium der Humanmedizin an der Freien Universität zu Berlin
18.09.1998	1. Staatsexamen, LPA Berlin
Famulaturen	
9.3.1998 – 9.4.1998	Abteilung für Hämatologie und Onkologie, UKBF
15.3.1999 – 15.4.1999	Abteilung für Anästhesie und Intensivmedizin, UKBF
16.3.2000 – 30.3.2000	Abteilung für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Kantonsspital St. Gallen
14.8.2000 – 15.9.2000	Praxis für Dermatologie, Allergologie und Venerologie, Frau Dr. Belter, Lübeck
15.11.2000-15.12.2000	Abteilung für Neurologie, Klinikum Merheim, Köln
10.01.2001-15.02.2001	Puesto del salud, Sicaya, Peru (medizinische Grundversorgung)
13.09.2001	2. Staatsexamen, LPA Berlin

Praktisches Jahr

29.10.2001-15.02.2002	Radiologie, Kantonsspital Aarau, Schweiz
18.02.2002-07.06.2002	Chirurgie, Chris Hani Baragwanath Hospital, Soweto, Südafrika
10.06.2002-02.08.2002	Innere Medizin, Med. Klinik III, Universitätsklinikum Benjamin Franklin, Berlin
05.08.2002-20.09.2002	Innere Medizin, Internistische Notaufnahme, Universitätsklinikum Benjamin Franklin, Berlin
17.12.2002	3. Staatsexamen, LPA Berlin

Berufliche Tätigkeit

April 1998-Februar 2001	Tutorin im Hämatologiekurs, Med. Klinik III, UKBF
August 1999 - August 2002	Wiederholte Tätigkeit als Wissenschaftliche Hilfskraft im Labor Prof. Dr. C. Scheibenbogen.
Seit Januar 2003	Ärztin im Praktikum, Medizinische Klinik III

Doktorarbeit

März 1999–Oktober 2000, Labor Prof. Dr. Carmen Scheibenbogen

Publikationen

Asemissen AM, Nagorsen D, Keilholz U, Letsch A, Schmittel A, Thiel E und Scheibenbogen C, 2001. Flow cytometric determination of intracellular or secreted IFN-gamma for the quantification of antigen reactive T cells. *Journal of Immunological Methods*, 251:101-108.

Nagorsen D, Keilholz U, Rivoltini L, Letsch A, Asemissen AM, Thiel E und Scheibenbogen C, 2000. Natural T cell response against MHC class I epitopes of epithelial cell adhesion molecule, her-2/neu, and carcinoembryonic antigen in patients with colorectal cancer. *Cancer Research*, 50:4850-4854.

Scheibenbogen C, Sun Y, Keilholz U, Song M, Stevanovic S, Asemissen AM, Nagorsen D, Thiel E, Rammensee HG und Schadendorf D, 2002 (a). Identification of known and novel immunogenic T-cell epitopes from tumor antigens recognized by peripheral blood T cells from patients responding to IL-2-based treatment. *International Journal of Cancer*, 98:409-414.

Valmori D, Scheibenbogen C, Dutoit V, Nagorsen D, Asemissen AM, Rubio-Godoy V, Rimoldi D, Guillaume P, Romero P, Schadendorf D, Lipp M, Dietrich PY, Thiel E, Cerottini JC, Lienard D und Keilholz U, 2002. Circulating Tumor-reactive CD8(+) T cells in melanoma patients contain a CD45RA(+)CCR7(-) effector subset exerting ex vivo tumor-specific cytolytic activity. *Cancer Research*, 62:1743-1750.

Asemissen AM, Nagorsen D, Keilholz U, Schadendorf D, Letsch A, Schmittel A, Thiel E, Scheibenbogen C. "Dissecting T cell responses to melanoma"
Poster, präsentiert im Rahmen des SBT-Treffens, Berlin, September 2000

Asemissen AM, Nagorsen D, Keilholz U, Schadendorf D, Letsch A, Schmittel A, Thiel E, Scheibenbogen C. "Characterisation of tumor-specific T cells using multicolour flow cytometry"
Poster, präsentiert im Rahmen des DGHO-Treffens in Jena, Oktober 2000

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. Eckhard Thiel als Direktor der Medizinischen Klinik III sei gedankt für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in der Medizinischen Klinik III des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der FU Berlin durchführen zu können.

Ganz besonders herzlich danke ich Frau Prof. Dr. med. Carmen Scheibenbogen, die mir das Thema dieser Arbeit überließ und deren Entstehung sie mit großem Engagement, Begeisterungsfähigkeit und unentbehrlichen Hilfestellungen exzellent betreute und mich mit steter Diskussionsbereitschaft zum wissenschaftlichen Arbeiten anleitete. Auch Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Keilholz danke ich für viele wertvolle Anregungen und Hilfestellungen, mit denen er mich auch über den Rahmen dieser Arbeit hinaus unterstützte.

Frau Sandra Bauer danke ich für diverse nützliche und freundliche Anleitungen, Tipps und Tricks bei der Durchführung der Experimente.

Dr. Anne Letsch danke ich sehr für die hervorragende Einarbeitung ins Labor und besonders in die Durchflußzytometrie, die große Hilfsbereitschaft, Diskutierfreudigkeit, sowie die unentbehrliche Hilfe bei den Korrekturen zur Fertigstellung dieser Arbeit, und gemeinsam mit Ulrike Kuhne für allerlei Freundlichkeiten und die gute Stimmung im Labor. Auch Dr. Alexander Schmittel und Dr. Dirk Nagorsen danke ich für die stets konstruktive Diskussionsbereitschaft und viele gute Anregungen.

Herrn Prof. Dr. med. Dirk Schadendorf am DKFZ in Mannheim danke ich für die großzügige Überlassung von Patientenmaterial.

Bei allen meinen Freunden bedanke ich mich herzlich für die Unterstützung, die Geduld und Nachsicht während der Entstehung dieser Arbeit, namentlich Ruth Forster sei gedankt für Naturell und Stullen.

Mein persönlicher Dank gilt meinen Eltern für ihre großzügige und liebevolle Unterstützung mit der sie meine gesamte Ausbildung begleitet haben.