

# **Identifizierung potentiell immunogener Peptide auf Zellen der chronischen myeloischen Leukämie**

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctorum rerum naturalium**

(Dr. rer. nat.)

angefertigt am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin Berlin-Buch  
in der Arbeitsgruppe für Gen- und Immuntherapie

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Monika Schwarz  
aus Ochsenfurt

Berlin, August 2004

Gutachter:

1. Prof. Dr. A. Pezzutto

2. Prof. Dr. T. Blankenstein

Tag der mündlichen Prüfung:

28.01.05

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Antonio Pezzutto für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und seine großzügige Unterstützung und Förderung danken.

Dr. Eva-Christina Müller aus der Abteilung für Massenspektrometrie von Prof. Brigitte Wittmann-Liebold am MDC danke ich ganz besonders für die produktive Zusammenarbeit, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Ebenso danke ich Dr. Albrecht Otto für die fundierte Einführung in die HPLC-Technik.

Besonders möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee am Institut für Zellbiologie der Universität Tübingen, Abteilung Immunologie, für die offene Aufnahme als Gast in seine Arbeitsgruppe bedanken. Aus dieser Arbeitsgruppe danke ich ebenso herzlich Dr. Stefan Stevanovic und Claudia Lemmel für ihre ständige Diskussionsbereitschaft, wertvollen Anregungen und die gute Kooperation über meine Zeit in Tübingen hinaus. Stefan Tenzer gilt mein besonderer Dank für die Einführung in die Proteasomanalytik und Oliver Schoor für die Zusammenarbeit bei der Durchführung der Gen-Chip Analysen.

Prof. Dr. Thomas Blankenstein danke ich für die Betreuung der Arbeit am Fachbereich der Freien Universität Berlin und seine fördernden Anregungen.

Dr. Thomas Kammertöns aus der Abteilung für Molekulare Immunologie und Gentherapie danke ich für seine wertvollen fachlichen Ratschläge und die Durchsicht der Arbeit.

Allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe, besonders Tuan Duc Nguyen, dessen Diplomarbeit ich betreuen durfte, möchte ich für die angenehme Zusammenarbeit danken.

Helga Neubauer gilt mein Dank für die exzellente technische Assistenz.

Für die Bereitstellung der humanen Zellen und Gewebe danke ich allen Ärzten des Virchow-Klinikums Berlin, besonders Dr. Jörg Westermann, Dr. Markus Mapara und Dr. Thomas Mehlitz sowie Dr. Hans Martin und Dr. Alexandra Aicher am Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt a.M.

Nicht zuletzt möchte ich allen Wissenschaftlern danken, die mich auf dem Weg meiner Promotion gefördert und begleitet haben, insbesondere Frau Prof. Dr. Brigitte Wittmann-Liebold, Prof. Dr. Claus Schnarrenberger, Beate Wittmann, Dr. Günther Richter und Dr. Kurt Bommert.

Meiner Familie und meinen Freunden sei sehr liebevoll gedankt. Sie haben mir sehr viel Kraft und Mut gegeben.

<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Chronische myeloische Leukämie .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Zytogenetische und molekularbiologische Grundlagen der CML.....	2
1.1.2 Mechanismen der malignen Transformation in BCR-ABL-positiven Zellen .....	3
1.1.2.1 Aktivierung mitogener Kaskaden und anti-apoptotischer Signale.....	5
1.1.2.2 Veränderungen des Zytoskeletts und der Adhäsion durch BCR-ABL.....	6
1.1.3 Therapieansätze bei CML.....	6
1.1.3.1 Interferon- $\alpha$ -Therapie.....	7
1.1.3.2 STI 571-Therapie .....	7
1.1.3.3 Knochenmark- und Stammzelltransplantation.....	8
<b>1.2 Antigenprozessierung und -präsentation über MHC-Klasse-I-Moleküle.....</b>	<b>9</b>
1.2.1 MHC-Klasse-I-Moleküle.....	9
1.2.1.1 Aufbau von MHC-Klasse-I-Molekülen .....	10
1.2.1.2 Bindungsspezifität zwischen MHC- und Peptidligand .....	11
1.2.2 Antigenprozessierung.....	12
1.2.3 MHC-Klasse-I-Peptidbeladung und -präsentation.....	13
<b>1.3 MHC-Klasse-I-Moleküle und T-Zellantwort .....</b>	<b>14</b>
<b>1.4 Identifizierung und Bedeutung von Tumorantigenen.....</b>	<b>14</b>
<b>1.5 Therapeutisches Potenzial MHC-Klasse-I-präsentierter Peptide bei CML.....</b>	<b>17</b>
<b>1.6 Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>19</b>
<b>2 Material.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Geräte und sonstige Hilfsmittel .....</b>	<b>20</b>
<b>2.2 Chemikalien und allgemeines Material .....</b>	<b>21</b>
<b>2.3 Membranen .....</b>	<b>22</b>
<b>2.4 Kits.....</b>	<b>23</b>
<b>2.5 Vektoren .....</b>	<b>23</b>
<b>2.6 Bakterien .....</b>	<b>23</b>
<b>2.7 Oligonukleotide .....</b>	<b>23</b>
<b>2.8 Synthetische Peptide und MHC-Tetramere.....</b>	<b>24</b>
<b>2.9 Antikörper .....</b>	<b>24</b>
2.9.1 FACS-Antikörper.....	24
2.9.2 Western-Blot-Antikörper .....	24
2.9.3 Antikörper aus Hybridomen .....	25
2.9.4 Sonstige Antikörper .....	25
<b>2.10 Zelllinien.....</b>	<b>25</b>
<b>2.11 Humane Zellen und Gewebe .....</b>	<b>26</b>
<b>2.12 Puffer und Lösungen .....</b>	<b>27</b>
<b>3 Methoden .....</b>	<b>31</b>
<b>3.1 Zellbiologische Methoden .....</b>	<b>31</b>

---

3.1.1 Kultivierung humaner Zelllinien .....	31
3.1.2 <i>Large scale</i> -Kultivierung in Rollerflaschen .....	31
3.1.3 Anzucht von Hybridomzellen im Minifermenter .....	31
3.1.4 Cryokonservierung von Zellen .....	32
3.1.5 Auftauen von Zellen .....	32
3.1.6 Bestimmung der Lebendzellzahl .....	32
3.1.7 Isolierung von PBMCs aus humanem <i>Buffy-Coat</i> -Blut und Leukapherisaten .....	33
3.1.8 Isolierung von humanen Milzzellen .....	33
3.1.9 Elektroporation von humanen Zellen .....	34
3.1.10 Subklonierung von K562-Transfektanten .....	34
3.1.11 Analyse oberflächengefärbter Zellen mittels Durchflusszytometrie .....	34
3.1.12 Magnetisches Sortieren von Zellen (MACS) .....	35
3.1.13 Test auf MHC-Stabilisierung .....	36
3.1.14 Acridinorange-Färbung von K562-Zellen unter dem Einfluß von STI 571 .....	37
<b>3.2 Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>37</b>
3.2.1 DNA Standardmethoden .....	37
3.2.2 cDNA Synthese .....	38
3.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	38
3.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten .....	39
3.2.5 Hitzeschocktransformation von <i>Escherichia coli</i> .....	40
3.2.6 Gesamt-RNA Präparation .....	40
3.2.7 Northern-Blot Analyse .....	40
3.2.7.1 RNA Agarose Gelelektrophorese .....	41
3.2.7.2 Kapillartransfer von RNA .....	42
3.2.7.3 Herstellung radioaktiv markierter Sonden .....	42
3.2.7.4 Hybridisierung .....	43
3.2.8 Affymetrix Oligonukleotid <i>Array</i> Technologie .....	43
<b>3.3 Proteinchemische Methoden .....</b>	<b>44</b>
3.3.1 Reinigung monoklonaler Antikörper aus Hybridom-Überständen .....	44
3.3.2 Herstellung von Gesamtproteinrohextrakten .....	44
3.3.3 Protein-Gelelektrophorese ( <i>SDS-PAGE</i> ) .....	45
3.3.4 Silberfärbung .....	45
3.3.5 Western-Blot (Immunoblot) .....	45
3.3.6 Untersuchung der Proteasomschnittspezifität für BCR-ABL-Fusionsregions-peptide .....	46
3.3.6.1 Anzucht von LCL721 und LCL721.174 .....	46
3.3.6.2 Präparation von 20S Proteasomen .....	47
3.3.6.3 Kontrolle der proteolytischen Aktivität gereinigter Proteasomen .....	48
3.3.6.4 <i>In vitro</i> Proteasomspaltung eines synthetischen BCR-ABL 26mer Peptids .....	48
3.3.6.5 Chromatographische Auftrennung von Proteasomspaltprodukten .....	49
3.3.6.6 Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI/MS) .....	49
3.3.6.7 Edman-Abbau .....	49
3.3.7 Isolierung und Analyse von MHC-Klasse-I-Peptiden .....	50
3.3.7.1 Isolierung von MHC-Klasse-I-Molekülen aus humanen Zellen .....	50
3.3.7.2 Immunpräzipitation von MHC-Klasse-I-Molekülen .....	50
3.3.7.3 Peptidextraktion aus gereinigten MHC-Klasse-I-Molekülen .....	51
3.3.7.4 Entsalzung von gereinigten MHC-Klasse-I-Peptiden .....	51
3.3.7.5 Reverse-Phase-HPLC .....	51
3.3.7.6 Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) .....	52
3.3.7.7 MS-Identifizierung endogen präsentierter MHC-Klasse-I-Peptide mit Q-ToF Massenspektrometer .....	53
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>55</b>
<b>4.1 Untersuchung der Proteasomschnittspezifität für BCR-ABL-Fusionsregionspeptide .....</b>	<b>55</b>
4.1.1 Ermittlung des Zeitoptimums für den proteasomalen Abbau .....	55
4.1.2 Quantitative Analyse proteasomaler Degradationsprodukte .....	57
4.1.3 Schnittkarte für das BCR-ABL-Fusionsregionspeptid .....	58
4.1.4 Analyse der Proteasomexpression in BCR-ABL-positiven Zellen .....	60

<b>4.2 Versuche zum Nachweis der endogenen Präsentation von BCR-ABL Fusionsregionspeptiden</b> .....	<b>61</b>
4.2.1 Kontrolle der BCR-ABL-Expression und MHC-Klasse-I-Präsentation in K562-Zellen .....	62
4.2.2 Herstellung von HLA-B8- und HLA-A3-transfizierten K562-Zellen .....	63
4.2.3 Analyse des endogen präsentierten Peptidpools von KB8.15-Zellen .....	65
4.2.4 Analyse des endogen präsentierten Peptidpools von KA3.2-Zellen .....	69
<b>4.3 Identifizierung von MHC-Klasse-I-Liganden auf CML-Patientenzellen</b> .....	<b>71</b>
4.3.1 Reinigung und Analyse endogen präsentierter Peptide aus CML-Patientenzellen.....	72
4.3.1.1 Identifizierte Peptide aus Proteinen des Zytoskeletts und assoziierter Proteine.....	76
4.3.1.2 Identifizierte Peptide aus Aktin-assoziierten und -modulierenden Proteinen mit bekannter Krebsassoziation .....	76
4.3.1.3 Identifizierte Peptide aus Transkriptions- und Translations-assoziierten Proteinen.....	77
4.3.1.4 Identifizierte Peptide aus protoonkogenen Transkriptionsfaktoren und aus Genprodukten häufig translozierter Gene .....	78
4.3.2 Evaluierung der identifizierten Peptidliganden als potentielle Tumorstoffe .....	79
4.3.2.1 Analyse des Peptidrepertoires gesunder Zellen.....	80
4.3.2.2 Gen-Chip Expressionsanalyse .....	82
4.3.3 Untersuchungen zu LMO4 .....	85
4.3.3.1 Analyse der gewebespezifischen Expression von LMO4.....	85
4.3.3.2 Analyse der LMO4-Expression in verschiedenen humanen Tumoren .....	86
4.3.3.3 LMO4-Expressionsanalyse unter dem Einfluß des Tyrosinkinase-Inhibitors STI 572 .....	86
4.3.3.4 LMO4-Expressionsanalyse in CML-Patienten und gesunden Spendern .....	88
4.3.3.5 Identifizierung potentieller LMO4-Peptidliganden mit HLA-A2-Restriktion.....	90
4.3.4 Untersuchungen zu Lyl1 .....	92
<b>4.4 Identifizierung von MHC-Klasse-I-Liganden auf AML-Zellen</b> .....	<b>93</b>
<b>5 Diskussion</b> .....	<b>95</b>
<b>5.1 Prozessierung und Präsentation von BCR-ABL-Fusionsregionspeptiden</b> .....	<b>95</b>
5.1.1 Einfluß der Proteasom-Spezies auf die Prozessierung von BCR-ABL-Fusionsregionspeptiden.....	96
5.1.2 Strategie zur Untersuchung der endogenen Präsentation von BCR-ABL-Fusionsregionspeptiden .....	98
5.1.2.1 Der Predict-Calibrate-Detect-Ansatz .....	99
5.1.2.2 Das K562-Zellmodellsystem .....	100
5.1.3 Analyse der BCR-ABL Peptidpräsentation auf CML-Patientenzellen .....	103
<b>5.2 Identifizierung CML-assoziiierter, potentiell immuntherapeutisch relevanter MHC-Klasse-I-Peptidliganden</b> .....	<b>105</b>
5.2.1 Identifizierung krankheitsassoziiierter Peptidliganden .....	106
5.2.2 Krankheitsassoziierte Peptide mit potentiell immuntherapeutischer Relevanz .....	107
<b>5.3 Charakterisierung von LMO4 im Kontext der CML</b> .....	<b>110</b>
<b>5.4 Identifizierung endogen präsentierter Liganden bei AML</b> .....	<b>114</b>
<b>6 Ausblick</b> .....	<b>116</b>
<b>7 Zusammenfassung</b> .....	<b>117</b>
<b>8 Summary</b> .....	<b>119</b>
<b>9 Literatur</b> .....	<b>120</b>
<b>10 Anhang</b> .....	<b>133</b>
10.1 Abkürzungen .....	133
10.2 Vorträge und Poster .....	135
10.3 Erklärung.....	136

---

## 7 Zusammenfassung

Die Vakzinierung von CML-Patienten mit tumorspezifischen oder tumorassoziierten Antigenen stellt einen möglichen Ansatz für eine CML-Immuntherapie dar. Die interessantesten Kandidaten für diesen Ansatz würden Peptide wie GFKQSSKAL, ATGFKQSSK, KQSSKALQR und SSKALQRPV aus der tumorspezifischen Fusionsregion des BCR-ABL-Proteins darstellen, sofern sie in CML-Zellen endogen prozessiert und auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden. In dieser Arbeit sollte die Prozessierung und endogene Präsentation dieser Peptide für CML-Zellen über den Ansatz der *Reversen Immunologie* untersucht werden. Darüber hinaus sollten neue, potentiell immuntherapeutisch relevante Peptide identifiziert werden.

Zunächst konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Prozessierung der Peptide GFKQSSKAL, ATGFKQSSK und KQSSKALQR durch das konstitutive Proteasom möglich ist, die Schnittspezifität des Immunoproteasoms hingegen nur die Prozessierung des Liganden KQSSKALQR erlaubt. Die erhaltenen Resultate legten jedoch den Schluss nahe, dass der Ligand SSKALQRPV mit potentieller HLA-A2 Restriktion *in vitro* von keiner der beiden Proteasom-Spezies prozessiert werden kann. Wie anschließende Untersuchungen der Proteasom-Expression in CML-Zellen ergaben, wird in Zellen einiger CML-Patienten, vermutlich korrelierend mit dem Fortschritt der Erkrankung, ausschließlich das Immunoproteasom exprimiert.

Eine endogene Präsentation der BCR-ABL-Fusionsregionspeptide durch Analyse des MHC-Klasse-I-Peptidpools konnte weder im Tumormodell mit HLA-A3- und HLA-B8-transfizierten K562-Zellen noch für Zellen von CML-Patienten belegt werden. Im Gegensatz dazu gelang über den Ansatz der *Reversen Immunologie* die Identifizierung zahlreicher anderer, potentiell immuntherapeutisch relevanter Peptide insbesondere aus protoonkogenen Transkriptionsfaktoren. Der auf HLA-A3-positiven Zellen identifizierte Ligand KIADRIFFLY aus dem LIM-Domäne-Transkriptionsfaktor LMO4 erschien dabei am bemerkenswertesten. Dieser Ligand konnte auf allen untersuchten CML-Patientenzellen und auch auf HLA-A3-transfizierten K562-Zellen endogen präsentiert nachgewiesen werden, wurde nicht im Peptidpool gesunder Zellen (Leukozyten aus der Milz) detektiert und erste immunologische Untersuchungen in der Arbeitsgruppe zeigten, dass im Blut von einigen CML-Patienten KIADRIFFLY-spezifische T-Zellen nachzuweisen sind. LMO4-KIADRIFFLY ist damit ein denkbarer Kandidat für eine CML-Vakzinierungstherapie. Für einen eventuellen immuntherapeutischen Einsatz LMO4-abgeleiteter Peptide konnten darüber hinaus weitere potentielle Kandidaten mit HLA-A2-Restriktion nach Epitopvorhersage über einen Peptidstabilisierungsversuch identifiziert werden.

Zusammengefasst wurden durch die umfangreiche Identifizierung von MHC-Klasse-I-Liganden sowohl auf CML-Zellen wie auch auf gesunden Leukozyten grundlegende

Erkenntnisse gewonnen, welche sowohl für die Entschlüsselung von biologischen Mechanismen der Leukämogenese als auch für die Entwicklung einer Peptidvakzinierung zur zukünftigen Therapie der chronischen myeloischen Leukämie wichtig sind.



## 8 Summary

Tumor vaccination with tumor specific or tumor-associated peptides is an attractive therapy strategy for chronic myeloid leukemia (CML). Peptides derived from the tumor specific fusion region of the BCR-ABL protein such as GFKQSSKAL, ATGFKQSSK, KQSSKALQR and SSKALQRPV are potentially ideal candidates for such a vaccination, provided they are endogenously processed and presented by CML cells. In a *reverse immunology* approach, processing and endogenous presentation of these peptides was investigated. Moreover we anticipated to isolate and define other therapeutically relevant peptides.

We could demonstrate that the BCR-ABL peptides GFKQSSKAL, ATGFKQSSK and KQSSKALQR can be indeed specifically cleaved by the constitutive proteasome, while cleavage specificity of the immunoproteasome was restricted to processing of KQSSKALQR. Our results however suggest that the putative HLA-A2 binding peptide SSKALQRPV cannot be generated - at least *in vitro* - via cleavage by either the constitutive or the immunoproteasome. Analysis of proteasome expression in different patients showed that in some cases, mostly with advanced disease, only the immunoproteasome was expressed in the CML cells. Analysis of the MHC-bound peptide pool eluted from HLA-A3 or HLA-B8 transfected bcr-abl positive K562 cells as well as from native CML cells failed to detect BCR-ABL fusion peptides.

Conversely the reverse immunology approach allowed us to identify several other potentially immunogenic peptides, especially from proto-oncogenic transcription factors. The finding that the LIM-domain transcription factor LMO4 derived peptide KIADRFLLY could be eluted from all HLA-A3 positive patient samples as well as from HLA-A3 transduced K562 cells but not from normal human splenocytes, was particularly striking. First analyses of patients blood probes performed in our group suggest that T cells able to recognize KIADRFLLY are present in some CML patients indicating that LMO4-KIADRFLLY is indeed a potential candidate for CML vaccination. In order to broaden the spectrum of patients that could be potentially treated, we have evaluated LMO4 epitopes predicted to bind to HLA-A2 according to computer-based algorithms in a peptide-binding assay.

In summary, the extensive identification of MHC-class I binding peptides from leukemic cells and normal leukocytes have provided valuable information for both the development of peptide vaccines and the identification of molecules that may play a role in CML leukemogenesis.