

**Identifizierung und Charakterisierung neuer tumorassoziierter
T-Zellepitope für die Immuntherapie**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

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

vorgelegt von
Anne Bredenbeck
aus Offenbach

April 2006

1. Gutachter: Prof. Dr. Peter Walden

2. Gutachter: Prof. Dr. Petra Knaus

Tag der Disputation: 21. August 2006

Die vorliegende Arbeit wurde an der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, in der Klinischen Forschergruppe „Tumorimmunologie“ der Charité-Universitätsmedizin Berlin unter Leitung von Prof. Dr. Peter Walden durchgeführt.

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt zu haben. Desweiteren versichere ich, daß die vorliegende Arbeit nie Gegenstand eines früheren Promotionsverfahren war. Die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Berlin, April 2006

Anne Bredenbeck

Abkürzungen:

ANN	artifizielle neuronale Netze
APC	Antigen-präsentierende Zelle
AP	alkalische Phosphatase
BCIP	5-bromo-4-chloro-indolyl-Phosphatase
BSA	bovines Serumalbumin
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre (<i>complementary</i>) DNA
cds	kodierende Sequenz (<i>coding sequence</i>)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISpot	Enzyme-Linked Immunno Spot
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsorter (<i>fluorescence activated cell sorter</i>)
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
h	Stunde
HLA	Humanes Leukozyten Antigen (<i>human leucocyte antigen</i>)
IFN	Interferon
IL	Interleukin
kb	Kilobase
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
min	Minute
NBT	Nitroblautetrazolium
PBS	phosphate-buffered saline
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PHA	Phytohämagglutinin
PSSM	positionsspezifische Bewertungs- (<i>scoring</i>) Matrizen

RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde
sfu	Spot-bildende Einheit (<i>spot forming unit</i>)
SVM	support vector machines
TAA	tumorassoziertes Antigen
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TATE	tumorassoziertes T-Zellepitop
TCR	T-Zellrezeptor (<i>T cell receptor</i>)
TNF	Tumor Nekrose Faktor
WHO	<i>World Health Organization</i>

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Krebs	1
1.1.1	Das maligne Melanom	1
1.1.2	Krebs und Polyomaviren	2
1.2	Das Immunsystem	3
1.2.1	Der T-Zellrezeptor und seine Diversität	4
1.2.2	Effektormechanismen zytotoxischer CD8 ⁺ T-Zellen	6
1.2.3	Der Haupthistokompatibilitätskomplex	8
1.2.4	Peptidbindungseigenschaften von HLA-Molekülen	9
1.2.5	Antigenprozessierung durch das Proteasom und Aminopeptidasen	12
1.2.6	Peptidbeladung von HLA-Klasse I Molekülen	13
1.3	Tumorimmunologie	14
1.3.1	Tumorantigene	15
1.3.2	Identifizierung von TAA und tumorassoziierten T-Zellepitopen (TATE)	16
1.4	Bioinformatik	17
1.5	Immuntherapie	19
1.6	Zielsetzung	21
2	Material und Methoden	22
2.1	Standardmedien und -puffer	22
2.1.1	Medien:	22
2.1.2	Puffer:	22
2.2	Oligonukleotidprimer	22
2.3	Bioinformatik	25
2.4	Auswahl von Peptiden aus BKV und JCV	25
2.5	Auswahl von Peptiden aus der MAGE-A Familie	26
2.6	Peptide	26
2.7	Zellbiologische Methoden	26
2.7.1	Isolierung von PBMC aus Vollblut	26
2.7.2	Bestimmung der Lebendzellzahl	27
2.7.3	Kryokonservierung	27
2.7.4	Anreicherung von CD8 ⁺ -T-Zellen aus PBMC	27
2.7.5	FACS-Analyse	28
2.7.6	In vitro priming von CD8 ⁺ T-Zellen gesunder Spender mit 1970 Peptiden	28

2.7.7	In vitro priming von CD8 ⁺ T-Zellen gesunder Spender mit Peptiden aus SV40, BKV und JCV	30
2.7.8	Restimulation der CD8 ⁺ T-Zellen.....	30
2.7.9	ELISpot.....	30
2.7.10	⁵¹ Chrom-Freisetzungssassay	32
2.7.11	Stabilisierungssassay.....	32
2.7.12	Behandlung von PBMC mit 5'Aza-2'Desoxycytidin (5-Aza-dC).....	33
2.8	Molekularbiologische Methoden	33
2.8.1	RNA-Extraktion.....	33
2.8.2	Reverse Transkription von RNA in cDNA.....	33
2.8.3	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zur Expressionsanalyse	34
2.8.4	Gelelektrophorese.....	34
2.8.5	Gelextraktion	35
2.8.6	Sequenzierung von PCR-Produkten	35
3	Ergebnisse.....	36
3.1	Identifizierung nicht-kanonischer T-Zellepitope mit Hilfe artifizieller neuronaler Netze... 36	
3.1.1	Vorhersage der verwendeten Peptide	36
3.1.2	Vergleich der Vorhersagen der ANN mit SYFPEITHI und BIMAS	37
3.1.3	HLA-Stabilisierung durch die natürlichen Peptide und ihre modifizierten Varianten ...	38
3.1.4	T-Zellantworten gegen die vorhergesagten Peptide und ihre modifizierten Varianten... 40	
3.1.5	Vergleich der T-Zellantworten gegen die natürlichen und modifizierten Varianten der vorhergesagten Epitope.....	43
3.1.6	Prozessierung und Präsentation der natürlichen Peptide durch Melanomzellen	46
3.2	Identifizierung von T-Zellepitopen nach Vorhersagen mit SVM und PSSM.....	49
3.2.1	Auswahl der Antigene	49
3.2.2	Bioinformatische Vorhersagen	49
3.2.3	Durchführung der Stimulationen und des ELISpots.....	51
3.2.4	T-Zellantworten nach in vitro priming gesunder Spender.....	53
3.2.5	HLA-Restriktion der Peptide Sur ₈₀ und Tyro ₃₄₅	59
3.2.6	Ex vivo Reaktionen von spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen aus Melanompatienten und gesunden Spendern	60
3.3	Identifizierung von T-Zellepitopen aus SV40, BKV und JCV	66
3.3.1	In vitro priming von CD8 ⁺ T-Zellen gesunder Spender.....	67
3.3.2	Ex vivo Reaktionen von spezifischen T-Zellen aus Melanompatienten und gesunden Spendern	71
3.4	Expression tumorassoziierter Antigene im Melanom und anderen Geweben	74

3.5	Analyse zur Expression der MAGE-A Familie der cancer/testis Antigene	77
3.5.1	Organisation des MAGE-A Clusters auf Xq28	77
3.5.2	Das MAGE-A Subcluster III ist hoch repetitiv und invertiert dupliziert.....	77
3.5.3	Expression von MAGE-A mRNA im Melanom	79
3.5.4	Korrelation des Expressionsmusters und der chromosomalen Lokalisation	82
3.5.5	Induktion der MAGE-A und CSAG Expression	83
3.5.6	mRNA Expressionsmuster der MAGE-As und CSAGs in nicht melanozytären Tumoren und gesunden Kontrollen	84
3.6	Ex vivo Reaktionen von spezifischen T-Zellen gegen Peptide der MAGE-A Familie.....	86
3.7	Theoretische Analyse zur natürlichen Prozessierung der identifizierten Epitope.....	90
4	Diskussion.....	94
4.1	Schlußfolgerung und Ausblick:	114
5	Zusammenfassung	116
6	Summary	117
7	Literaturverzeichnis	118
8	Anhang.....	131
8.1	Anhang I: Bindungsmotive verschiedener HLA-Allele.....	131
8.2	Anhang II: Nach Vorhersage mit SVM und PSSM ausgewählte Peptide.....	133
8.3	Anhang III: Ausgewählte Peptide aus JCV und BKV	154
8.4	Anhang IV: Tumorassoziierte Antigene aus denen Vorhersagen mit SVM und PSSM durchgeführt wurden	155
8.5	Anhang V: TAA Expression in einzelnen Proben	157
9	Eigene Publikationen.....	158
10	Danksagung.....	160
11	Curriculum Vitae.....	161