



Universiteit
Leiden
The Netherlands

The generation of cytotoxic T cell epitopes and their generation for cancer immunotherapy

Kessler, J.

Citation

Kessler, J. (2009, October 27). *The generation of cytotoxic T cell epitopes and their generation for cancer immunotherapy*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/14260>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/14260>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

CHAPTER 8

CHAPTER 8

Samenvatting voor de niet-ingewijde

De titel van dit proefschrift luidt: 'De generatie van cytotoxische T cel epitopen en hun identificatie voor immunotherapie van kanker'. Er komen een paar vragen op:

- *Wat zijn cytotoxische T cellen?*
- *Wat zijn die epitopen?*
- *Waarom die epitopen identificeren voor een immunotherapie tegen kanker?*

Hier wil ik deze vragen in woord en beeld (zie figuur) beantwoorden voor de niet-immunoloog. Om te beginnen is het goed om je te realiseren dat het onderzoek veel meer met immunologie te maken heeft dan met kanker.

Het uiteindelijke doel is om de strategie die het lichaam gebruikt in de afweer tegen virussen en bacteriën therapeutisch toe te passen voor het dood maken van kankercellen.

Het immuunsysteem (afweersysteem) bestaat hoofdzakelijk uit de witte bloedcellen (ook leukocyten genoemd) en diverse immunologische herkenningmoleculen en stimulatiemoleculen die door de afweercellen worden uitgescheiden. Afweercellen bevinden zich in de lymfeklieren, de lymfe en het bloed en kunnen zodoende in alle organen doordringen. De afweercellen gaan ingenuïze interacties aan met elkaar en vooral ook met (componenten van) pathogene indringers waardoor de afweer tegen de ziekteverwekkers wordt geïnitieerd. Het immuunsysteem beschermt het menselijk lichaam tegen besmettelijke ziekten die door bacteriën, virussen en parasieten worden overgebracht en veroorzaakt. Deze pathogene indringers komen het lichaam meestal binnen via de gastrointestinale, urogenitale of nasofaryngale routes, en na verwonding ook via de huid. Ziekteverwekkers moeten eerst worden herkend door (componenten van) het immuunsysteem voordat ze geëlimineerd kunnen worden. **Herkenning** van pathogene structuren ligt daarom ten grondslag aan het functioneren van het immuunsysteem. Naast herkenning, bepaald **de mate van stimulering** van het immuunsysteem of de afweer voldoende, te weinig of te veel zal zijn. Afhankelijk van de aard van het pathogeen en de plaats van de infectie gebruikt het immuunsysteem een andere afweerstrategie. Een belangrijk verschil is er tussen de afweer tegen pathogenen die buiten de cel blijven en afweer tegen pathogenen die zich in cellen nestelen. Alle virussen (o.a. gewone verkoudheidsvirussen), sommige bacteriën (bv. degenen die TBC of tyfus veroorzaken) en sommige parasieten (bv. de malaria parasiet) infecteren lichaamscellen en vermenigvuldigen zich in de cel. Voor de eliminatie van deze pathogenen moeten de geïnfecteerde cellen worden opgeruimd door afweercellen.

Herkenning: hoe herkennen afweercellen dat een lichaamscel geïnfecteerd is?

Een subpopulatie van de witte bloedcellen, **de cytotoxische T-lymfocyten (ofwel T-cel, afgekort CTL)**, is daartoe uitgerust met een receptor (**T-cel receptor, ofwel TCR**) op zijn membraan waarmee hij continue alle lichaamscellen 'afsnuffelt' op kleine stukjes eiwit, **peptiden** genaamd, die op hun oppervlakte tentoongespreid worden. Als een CTL een peptide op de oppervlakte van de lichaamscel herkent komt hij in actie: hij bindt aan de cel en maakt de cel dood. Dus een CTL is cytotoxisch. Elke CTL heeft duizenden (circa 50.000) identieke kopies van

dezelfde TCR op zijn oppervlakte, en die TCR kan slechts één peptide goed herkennen, daarom heeft een CTL slechts specificiteit (bindingskracht) voor één peptide. De **herkenning van geïnfecteerde lichaamscellen** door de CTL vindt plaats middels de herkenning van **peptiden die afkomstig zijn van bacteriële of virale eiwitten** (bacteriën en virussen bestaan uit eiwitten) op de oppervlakte van die cellen.

Herkenning: hoe worden de herkende peptiden gemaakt?

Cellen bestaan voor een groot deel uit eiwitten (proteïnen) welke van cruciaal belang zijn voor de structuur en functie van de cel. Eiwitten zijn opgebouwd uit **aminozuren (afgekort aa. – van amino acids)**, waarvan er 20 verschillende zijn, die als een kralensnoer (ongeveer 100 tot 500 aa. per eiwit) in een voor ieder verschillend eiwit unieke volgorde aan elkaar gekoppeld zijn. In elke cel bevinden zich duizenden verschillende eiwitten, en van elk eiwit weer vele kopieën. De eiwitten hebben afhankelijk van hun rol in de cel een verschillende levensduur, variërend van enkele uren tot een week of langer. Eiwitmoleculen die aan het einde van hun levensduur zijn, en degene die met fouten gemaakt zijn, worden afgebroken tot aminozuren welke dan weer gebruikt worden voor de synthese van nieuwe eiwitten.

De **afbraak van eiwitten** in de cel is een stapsgewijs proces waarbij de koppelingen tussen de aminozuren worden 'losgeknipt'. Dit proces wordt gecontroleerd door enzymen (katalysatoren van chemische reacties). Een enzym dat een eiwit of een deel van een eiwit doorknipt wordt respectievelijk een **proteinase of peptidase** genoemd. Het belangrijkste proteinase in de cel is het zogenaamde **proteasome** dat de eerste stap van de eiwitaafbraak uitvoert waarbij **eiwitbrokstukken (peptiden)** van ca 10 á 20 aa. lang overblijven. Deze peptiden worden vervolgens door peptidasen in de cel in weer kleinere stukken geknipt. Het proteasome en de peptidasen hebben een bepaalde specificiteit, d.w.z. dat ze een bepaalde aminozuur volgorde (sequentie) al dan niet graag kapot knippen. De specificiteit van het proteasome en peptidasen bepaald dus waar (tussen welke aa.) in een eiwit geknipt wordt en daardoor welke peptiden uit een eiwit molecuul zullen ontstaan. De afbraak van eiwitten gaat **in principe** door tot er van elk peptide slechts losse aminozuren overblijven.

Echter, gedurende de evolutie is er een mechanisme ontstaan waarbij het immuunsysteem gebruik maakt van de peptiden die bij eiwitaafbraak ontstaan! Een klein percentage van deze peptiden zal namelijk ontsnappen naar een door membranen afgeschermd organel in de cel, het zogenaamde **endoplasmatisch reticulum (ER)** (zie figuur 1, blz. 18). Daar zijn de peptiden beschermd tegen verdere afbraak omdat er zich minder peptidasen bevinden. Bovendien zullen de peptiden als ze in het ER zijn – en de goede lengte en aminozuurvolgorde hebben – binden in de groeve van daar aanwezige **HLA moleculen** (HLA staat voor '**Human Leucocyte Antigen**'). Er ontstaat zo een **HLA-peptide complex**. Deze complexen worden vervolgens getransporteerd naar het celoppervlakte waar ze zich verankeren in de membraan. Het peptide wijst naar buiten en kan worden herkend door een CTL (die in de buurt is) indien de CTL een TCR heeft met de juiste specificiteit (bindingskracht) voor het peptide (gebonden in het HLA molecuul).

Van elk eiwit dat wordt afgebroken in de cel worden op deze manier peptiden gemaakt die op de celoppervlakte **gepresenteerd** (tentoongespreid) worden aan CTL. Dit mechanisme vindt net zo goed plaats in gezonde cellen als in cellen die geïnfecteerd zijn door virussen of bacteriën. In het

laatste geval zullen dus ook virale of bacteriële eiwitten die zich in de cel bevinden worden afgebroken tot peptiden die dan aan CTL gepresenteerd worden. Door de unieke aminozuurvolgorde van elk eiwit zijn de honderden tot duizenden verschillende peptiden op de oppervlakte van een cel een representatie van alle eiwitten in de cel, inclusief bacteriële of virale eiwitten als de cel geïnfecteerd is. Anders gezegd: elk peptide gepresenteerd op de oppervlakte van lichaamscellen is een **uniek ‘visitekaartje’** van het eiwit waar het van afkomstig is en verraad de aanwezigheid van dat eiwit in de cel. Van dit feit maakt het immuunsysteem gebruik om te bepalen of een cel al dan niet geïnfecteerd is door een virus of bacterie.

Herkenning: waarom worden gezonde cellen niet herkend en aangevallen door CTL?

Als een gepresenteerd peptide (HLA-peptide complex) herkend wordt door een TCR op de CTL, d.w.z. er aan bindt, dan wordt het peptide een **CTL-epitoot** genoemd. De herkenning door de CTL van een CTL-epitoot activeert de CTL zodat hij cytotoxische moleculen uitscheidt in zijn naaste omgeving die de lichaamscel waar hij aan gebonden is dood maakt.

Zoals gezegd heeft elke CTL, middels zijn TCR, een unieke specificiteit (bindingskracht) voor slechts één CTL-epitoot. **Uiteraard is het niet de bedoeling dat een CTL gezonde lichaamscellen herkent en aanvalt.** Ieder mens heeft in zijn lichaam een repertoire van miljoenen verschillende CTL (met elk veel kopieën van één TCR) zodat er evenveel verschillende peptiden herkend kunnen worden. Dus zou er gevaar zijn voor de herkenning van CTL epitopen afkomstig van gezonde eiwitten (lichaamseigen of ‘zelf’ eiwitten), wat auto-immuniteit (afweer tegen gezonde cellen) zou veroorzaken.

Echter, tijdens de ontwikkeling van de T cellen (in de thymus) zijn alle CTL die een CTL-epitoot herkennen dat afkomstig is van een gezond (lichaamseigen) eiwit er uitgeselecteerd! Deze zogenaamde **negatieve selectie** zorgt ervoor dat de overblijvende CTL in het repertoire alleen epitopen zullen herkennen die afkomstig zijn van pathogene (lichaamsvreemde) eiwitten, en dus op geïnfecteerde cellen gepresenteerd worden. Gezonde lichaamscellen worden niet aangevallen omdat er geen CTL zijn die peptiden van gezonde eiwitten herkennen.

De afweer tegen kanker: hoe zit het daarmee?

In geval van kanker is er wel een sluimerende CTL-afweer tegen de tumorcellen, maar die is niet afdoende. In een kankercel worden eiwitten gemaakt die een gezonde cel niet produceert, waardoor de kankercel zich blijft delen. Omdat deze eiwitten nieuw zijn – ofwel lichaamsvreemd – voor het immuunsysteem, heeft er geen negatieve selectie plaatsgevonden van CTL die epitopen herkennen welke afkomstig zijn van de afbraak van de kankereiwitten. **Er zijn dus wel degelijk CTL beschikbaar die tumorspecifieke CTL-epitopen herkennen en zo de kankercel kunnen aanvallen.** Echter, in tegenstelling tot de afweer tegen viraal- of bacterieel geïnfecteerde cellen, blijft de afweer tegen kankercellen meestal slechts sluimeren of is geheel afwezig.

Waar komt dat door? Elke CTL die een epitoot herkend wordt in voldoende mate geactiveerd om de herkende cel aan te vallen. In geval van een virale of bacteriële infectie wordt de CTL bovendien nog **extra geactiveerd** door een tweede signaal. Deze zogenaamde co-stimulatie leidt er toe dat de CTL zich ‘klonaal’ gaat delen. Zo komen er duizenden tot miljoenen identieke CTL beschikbaar die hetzelfde CTL-epitoot herkennen en daarmee alle geïnfecteerde cellen kunnen

opruimen die dat epitoom op hun membraan presenteren. **Het probleem bij kanker is dat het co-stimulatie signaal niet door kankercellen wordt gegeven.** Daarom is er **geen klonale expansie** van CTL die tegen de tumorcellen gericht zijn en zijn er niet genoeg CTL om de kanker-cellen op te ruimen.

De afweer tegen kanker: kan die therapeutisch versterkt worden?

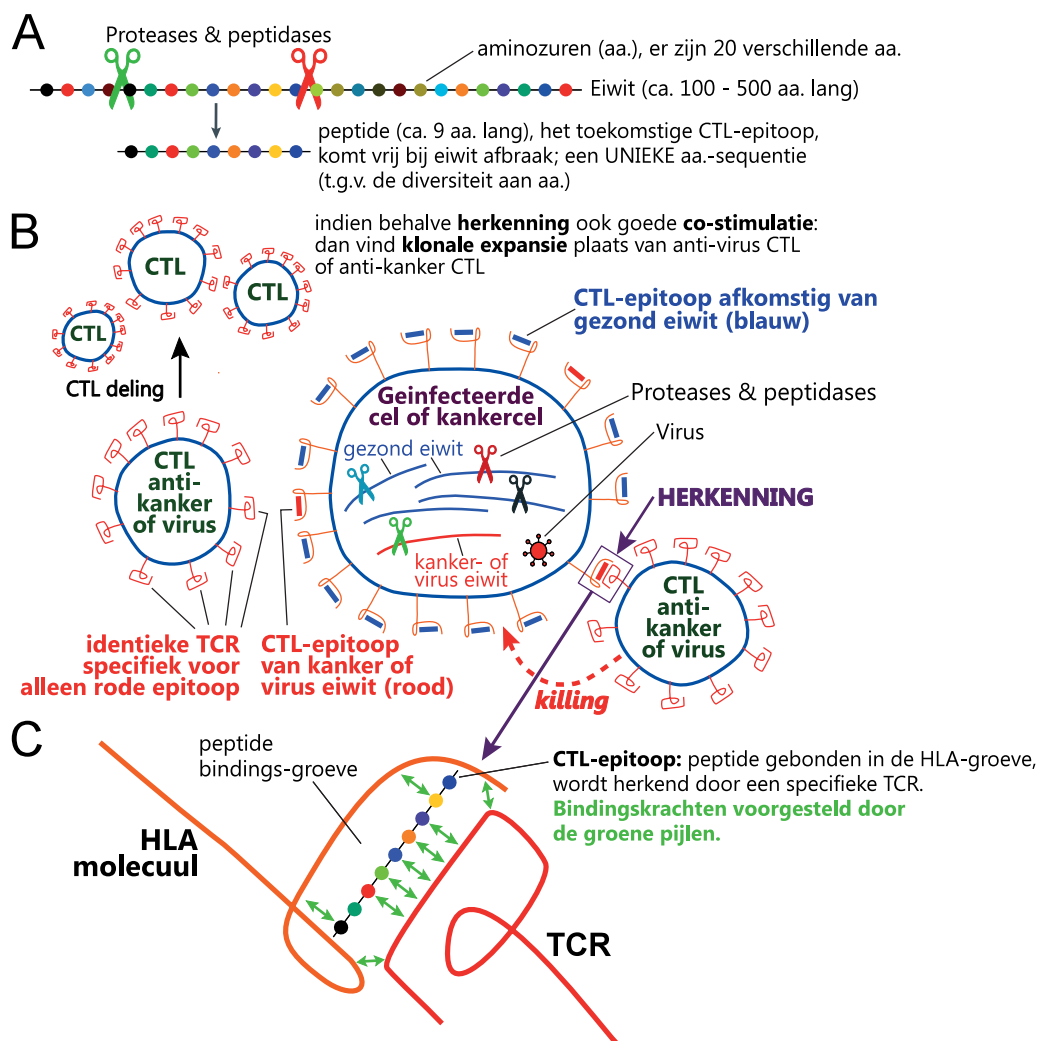
Ook al laat de natuurlijke afweer tegen kanker het afweten, deze valt wel op te wekken met immunotherapie. Als we de identiteit van de tumorspecifieke CTL-epitopen weten, kunnen we die peptiden artificieel synthetiseren en inspuiten in de patiënt (vaccinatie tegen kanker). Als dan ook nog het co-stimulatie signaal in de patiënt wordt bevorderd dan zal het synthetische peptide (na binding aan een HLA molecuul op lichaamscellen) de CTL die het peptide herkend activeren en doen laten expanderen, zodat er genoeg CTL zijn om zoveel mogelijk tumorcellen te herkennen en aan te vallen. In veel dierexperimenten en ook in klinische trials in patiënten is inmiddels aangetoond dat aldus opgewekte CTL de tumor geheel kan doen laten verdwijnen.

Tenslotte: wat is er onderzocht?

Als het bekend is welke proteasen en peptidasen waar knippen in een eiwit, dan valt het te voorspellen en te testen welke peptiden bij de afbraak vrijkomen. Dit is een universeel mechanisme, de eiwitafbraak verloopt in elk individu hetzelfde: er komt een zelfde set peptiden vrij uit een zelfde (kankerspecifiek) eiwitmolecuul in ieder individu. In **hoofdstuk 2** is gekeken naar de cruciale rol van het proteasome bij eiwitafbraak en in **hoofdstuk 6** is gezocht naar nog onbekende peptidasen die bijdragen aan eiwitafbraak en daarbij CTL-epitopen maken.

Eiwitafbraak is hetzelfde in elke individu, maar een complicerende factor is dat de HLA moleculen wel verschillen per individu. Er bestaan veel verschillende HLA moleculen die elk iets anders zijn en een eigen peptide bindingsspecificiteit hebben. Aangezien elk individu een bepaalde set van HLA moleculen op zijn lichaamscellen heeft zullen mensen ook verschillende peptiden 'kiezen' uit alle beschikbare afbraakpeptiden om als CTL-epitoom te presenteren. Daarom moet getest worden welke afbraakpeptiden kunnen binden in de groeve van de HLA moleculen die op de lichaamscellen van de patiënt aanwezig zijn. In **hoofdstuk 4** zijn er testen ontwikkeld waarmee die binding bepaald kan worden. Weten we welke peptiden kunnen binden, dan zijn de gepresenteerde CTL-epitopen bekend, zodat die in de patiënt therapeutisch kunnen worden ingespoten (vaccinatie). In **hoofdstuk 2** zijn er vier CTL-epitopen geïdentificeerd die afkomstig zijn van het kankerspecifieke eiwit 'PRAME'. En in **hoofdstuk 3** is hetzelfde gedaan: er is geïnventariseerd welke CTL-epitopen worden gemaakt uit het eiwit 'BCR-ABL' dat alleen in leukemiecellen voorkomt. In **hoofdstuk 5** is er tenslotte gekeken of er in het bloed van gezonde mensen en van kankerpatiënten CTL aanwezig zijn die de vier CTL-epitopen die geïdentificeerd zijn in hoofdstuk 2 kunnen herkennen.

Kortom, de bestudering van de manier waarop CTL-epitopen gemaakt worden en identificatie van deze epitopen staan in dit proefschrift centraal ten behoeve van het ontwikkelen van immunotherapie voor kanker.



Figuur 1. Herkenning van geïnfekteerde cellen of kanker cellen door CTL in a nutshell.

A. Detail eiwitaafbraak: eiwitten hebben een unieke aa. volgorde, dus de peptiden die ontstaan bij afbraak zijn ook uniek: ze 'veraden' de aanwezigheid van het eiwit binnen in de cel.

B. Overzicht CTL herkenning: geïnfekteerde cellen of kanker cellen hebben eiwitten (rood) die gezonde cellen niet hebben. Bij afbraak komen daar peptiden (rood) uit vrij die op de celmembranen gepresenteerd worden. In het lichaam zijn er CTL die deze rode epitopen zullen herkennen.

Herkenning van het epitop activeert de CTL die daarop aanvalt en de cel dood maakt. Indien er tevens een extra co-stimulatie signaal aanwezig is, zal de CTL ook gaan delen (klonale expansie).

C. Detail CTL herkenning: het CTL-epitop is a.h.w. een sleutel die op twee sloten past en daarmee de herkenning van de geïnfekteerde lichaamscel of kanker cel door de CTL mogelijk maakt.

Twee bindingsfenomenen spelen daarbij een rol (groene pijlen): (1) binding v.d. buitenste aa. van het epitop in de groeven van het HLA-molecuul (= epitop-presentatie). Terzijde: zolang de buitenste aa. van een peptide de goede eigenschappen hebben zal het peptide kunnen binden, en (2) binding v.d. TCR aan de binnenste aa. van het epitop en tevens aan delen van het HLA-molecuul (= epitop herkenning). Terzijde: de bindingcapaciteit van een TCR beperkt zich tot slechts één of ten hoogste een paar epitopen (dwz een peptide gebonden in een bepaald HLA molecuul).

