

**Qualitative und quantitative Analyse
krankheitsassoziierter MHC-Klasse-I-Liganden
durch massenspektrometrische Verfahren**

Dissertation

**der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften**

2004

vorgelegt von

Claudia Lemmel

Tag der mündlichen Prüfung:

24.06.2004

Dekan:

Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter:

PD. Dr. S. Stevanović

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. H.-G. Rammensee

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	5
1.1	Das Immunsystem	5
1.2	Die MHC-Moleküle	6
1.3	Antigenprozessierung	11
1.4	Die T-Zell-Antwort	14
1.5	Tumorerkrankungen und Immuntherapie.....	16
1.5.1	Tumorentstehung und Tumorantigene.....	16
1.5.2	Klassische Identifizierung von T-Zellepitopen.....	18
1.5.3	Identifizierung von T-Zellepitopen ohne präexistierende T-Zellen.....	18
1.5.4	Screening-Methoden zur Identifizierung von T-Zellepitopen.....	20
1.5.5	Tumor-Immuntherapie.....	22
1.6	Ziel der Doktorarbeit	25
2	Material und Methoden.....	26
2.1	Zellbiologische Methoden	26
2.1.1	Zelllinien	26
2.1.2	Kultivierung der Zelllinien	27
2.1.3	Zellernte	27
2.1.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen	28
2.1.5	Bestimmung der Lebendzellzahl	28
2.2	Immunologische und biochemische Methoden	28
2.2.1	Antikörperreinigung aus Hybridomüberstand	28
2.2.2	Durchflußzytometrie.....	29
2.2.3	Isolierung von MHC-Klasse-I-Liganden.....	31
2.2.4	Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese/Immunblot	33
2.3	Analytische Methoden	36
2.3.1	Massenspektrometrische Methoden	36
2.3.2	High performance liquid chromatography (HPLC).....	44
2.3.3	Sequenzanalyse durch Edman-Abbau.....	46

2.4 Biochemische und organisch-chemische Methoden.....	46
2.4.1 N-terminale Acetylierung von Peptiden.....	46
2.4.2 Guanidinylierung der ϵ -Aminogruppe der Lysinreste von Peptiden mit O-Methyl-Iso-Harnstoff-Hemisulfat.....	47
2.4.3 Nicotinylierung der α -Aminogruppe von guanidinylierten Peptiden.....	47
2.4.4 Synthese von 1-([$^1\text{H}_4/{}^2\text{D}_4$] Nikotinyloxy)-Succinimid- Ester.....	47
3 Ergebnisse und Diskussion	49
3.1 Bestimmung der Feinspezifität von MHC-Peptid-Motiven anhand von Einzelliganden.....	49
3.1.1 Bestimmung des WLA.1-1-spezifischen Peptidmotivs des amerikanischen Waldmurmeltiers für T-Zell-Epitopvorhersagen in WHV-Infektionen.....	49
3.1.2 Erstellung einer optimierten HLA-A*2601-Ligandenvorhersage für die SYFPEITHI-Datenbank mittels natürlicher HLA-Liganden.....	52
3.1.3 Motivverfeinerung der Allelprodukte HLA-A*24, -B*0702 und -B*4402 durch natürliche Ligandenanalyse.....	55
3.2 Suche nach vorhergesagten krankheitsassoziierten MHC-Klasse-I-Epitopen.....	56
3.2.1 Suche nach HLA-Klasse-I-Epitopen aus dem <i>Merozoite surface protein 1</i> des Malaria-Erregers <i>Plasmodium falciparum</i>	56
3.2.2 Suche nach HLA-Klasse-I-Epitopen aus dem humanen Hepatitis-C-Virus.....	61
3.3 Massenspektrometrische HLA-Ligandenanalyse von soliden Tumoren.....	69
3.3.1 Identifizierung von HLA-Liganden von soliden Kolonkarzinomproben.....	69
3.3.2 Identifizierung von HLA-Liganden eines Magenkarzinoms (MCA28) verbunden mit vergleichender <i>microarray</i> -basierender Genexpressionsanalyse von Tumor und autologem Normalgewebe.....	70
3.3.3 Identifizierung von HLA-Liganden zweier Glioblastome der Patienten NCH361 und NCH359, verbunden mit vergleichender <i>microarray</i> -basierender Genexpressionsanalyse von Tumor und normalem Hirngewebe.....	74

3.4	Massenspektrometrische HLA-Liganden-Analysen für die <i>patientenspezifische</i> Peptidvakzinierung von Nierenzellkarzinom-Patienten (RCC).....	84
3.4.1	Zusammenfassung und Ausblick: Identifizierung neuer HLA-Liganden aus Tumorantigenen für immuntherapeutische Ansätze.....	92
3.5	Differenzielle quantitative Analyse von MHC-Liganden mittels stabiler Isotopenmarkierung.....	94
3.5.1	Differenzielle quantitative Acetylierung von HLA-Liganden.....	97
3.5.2	Differenzielle quantitative Guanidinylierung/Nikotinylierung von HLA-Liganden.....	105
3.5.3	Zusammenfassung und Ausblick: Differenzielle quantitative HLA-Ligandenanalysen.....	120
4	Zusammenfassung.....	123
5	Publikationsliste.....	124
6	Abkürzungsverzeichnis.....	125
7	Literaturverzeichnis.....	126
8	Danksagung.....	143
9	Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	145
10	Lebenslauf.....	146

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein gegen körperfremdes Material gerichtetes, kompliziertes, körpereigenes Schutzsystem beim Menschen und bei höheren Wirbeltieren.

Es besteht aus den immunologisch kompetenten Organen, die sich in zentrale und periphere lymphatische Organe unterteilen lassen. Bei den zentralen lymphatischen Organen handelt es sich zum einen um das Knochenmark, Ort der Bildung der lymphatischen und der myeloischen Vorläuferzellen, und zum anderen um den Thymus, in dem die T-Lymphozyten heranreifen. Die peripheren lymphatischen Organe sind neben den Lymphknoten die Milz und die lymphatischen Gewebe der Schleimhäute. Hier treffen die Lymphozyten auf die Antigene, über die eine Immunantwort eingeleitet werden kann. Diese Immunantworten lassen sich grundsätzlich aufgrund ihrer angeborenen bzw. erworbenen Mechanismen unterscheiden. Hierbei dient die angeborene Immunantwort der ersten Abwehr gegen viele allgemein vorkommende Mikroorganismen, sie kann einige Krankheitserreger aufgrund konservierter Strukturen spezifisch erkennen, jedoch keinen gezielten Schutz gegen eine erneute Infektion bieten. Die adaptive Immunantwort hingegen basiert auf der klonalen Selektion von Lymphozyten, die eine Vielzahl hochspezifischer Rezeptoren besitzen, die es dem Immunsystem ermöglichen, jedes beliebige fremde Antigen zu erkennen und sich in Form eines immunologischen Gedächtnisses spezifischer Antigene zu erinnern. Bei der adaptiven Immunantwort lassen sich zudem eine humorale und eine zelluläre Antwort unterscheiden. Die humorale Reaktion wird durch die von B-Lymphozyten sezernierten Antikörper und die Komplementkomponenten (Plasmaproteine) vermittelt und richtet sich gegen extrazelluläre Krankheitserreger und Toxine. Für die zelluläre Reaktion hingegen sind die T-Lymphozyten verantwortlich, die zum einen über einen raffinierten Mechanismus intrazelluläre Erreger aufspüren und bekämpfen können und zum anderen bei der Aktivierung der B-Zell-Reaktion in Aktion treten.

Die immense Leistung, die dieses Schutzsystem für die Erhaltung eines gesunden Körpers erbringt, ist faszinierend. Immunologen versuchen bei Fehlfunktionen, wie z.B. bei Allergien und Autoimmunerkrankungen oder Tumorentwicklung regulierend einzugreifen. Ein vollständiges Verständnis der dem Immunsystem zugrunde liegenden Mechanismen scheint jedoch noch eine große Herausforderung für die Zukunft zu bleiben.

1.2 Die MHC-Moleküle

Der Begriff MHC (*major histocompatibility complex*) bezeichnet allgemein eine Gruppe von Genen, die die MHC-Moleküle kodieren. Die Bezeichnung beim Menschen lautet *Human leukocyte antigen* (HLA). Diese Gene befinden sich beim Menschen auf dem Chromosom 6. Bei der Maus spricht man in diesem Zusammenhang von den *Histocompatibility antigens 2* (H2), welche auf dem Chromosom 17 lokalisiert sind.

Der Begriff MHC wurde für diese Genabschnitte gewählt, da ihre prominentesten Proteinbiosyntheseprodukte, die MHC-Moleküle, die Hauptverantwortlichen für die Histokompatibilität, d.h. für die Verträglichkeit von Gewebe- und Organtransplantaten sind¹.

Die Funktion der MHC-Moleküle besteht prinzipiell darin, eigene und fremde Peptide aus extrazellulären oder aus zytosolischen Proteinen zu binden und für die Erkennung durch T-Lymphozyten auf der Zelloberfläche zu präsentieren.

Man unterscheidet grundsätzlich zwei Klassen von MHC-Molekülen sowohl nach ihrer Funktion als auch nach ihrer Struktur (Abb. 1.1 und 1.2).

Die MHC-Klasse-I-Moleküle findet man auf nahezu allen kernhaltigen Zellen. Sie bestehen aus einer MHC-kodierten, membrangebundenen α -Kette von 45 kDa (schwere Kette), die aus drei extrazellulären Immunglobulindomänen (α_{1-3}), einer Transmembrandomäne und einer kurzen zytosolischen Domäne aufgebaut ist. Der extrazelluläre Teil der schweren Kette assoziiert nichtkovalent mit einer β -Kette, dem nicht MHC-kodierten β_2 -Mikroglobulin von 12 kDa (kodiert auf Chromosom 15).

Die MHC-Klasse-II-Moleküle werden hingegen vornehmlich von spezialisierten antigenpräsentierenden Zellen (APCs) wie z.B. B-Lymphozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Thymusepithelzellen exprimiert. Ihre Struktur besteht aus zwei schweren Ketten, einer α -Kette (34 kDa) und einer β -Kette (29 kDa). Die schweren Ketten besitzen jeweils eine Transmembranregion, eine kurze zytosolische Domäne und 2 extrazelluläre Immunglobulindomänen (α_{1-2} ; β_{1-2}), über die beide Ketten nichtkovalent miteinander assoziiert sind.

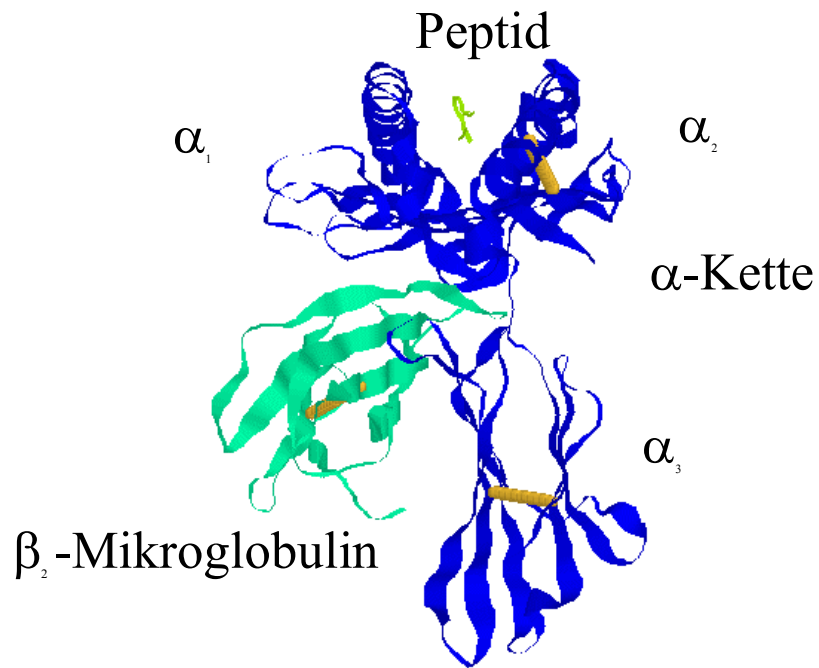


Abbildung 1.1 Raumstruktur des MHC-Klasse-I-Moleküls HLA-A*0201².

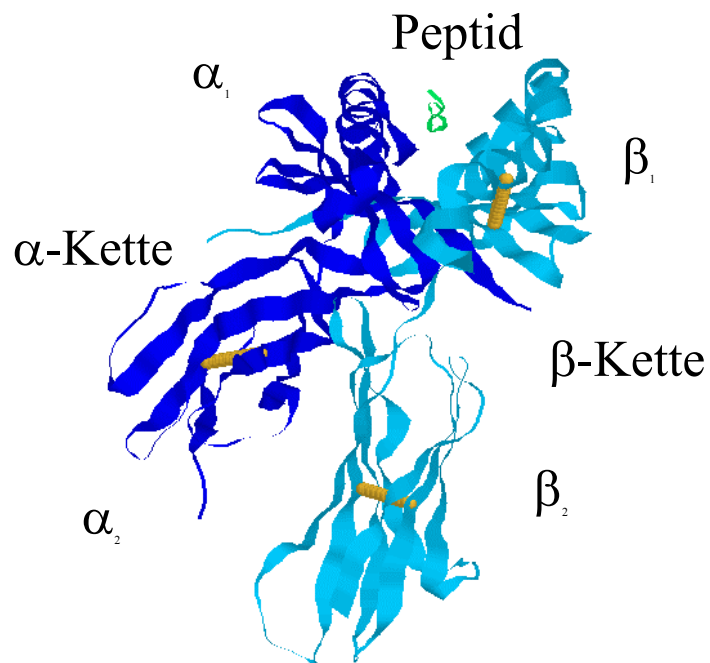


Abbildung 1.2 Raumstruktur des MHC-Klasse-II-Moleküls HLA-DRB1*01³.

Grundlage für die große Variabilität der MHC-Moleküle und somit für ihre Peptidpräsentationsvielfalt innerhalb eines Organismus und innerhalb einer Spezies ist zum einen ihre Polygenie, d.h. dass es mehrere MHC-Klasse-I und -II-Gene gibt. Beim Menschen und auch bei der Maus existieren für die schweren Ketten der Klasse-I und der Klasse-II-MHCs folgende Gene: Mensch-Klasse-I: HLA-A, -B, -C; Mensch-Klasse-II: HLA-DR (A+ 1-2 B), -DP (A+B), -DQ (A+B); Maus-Klasse-I: H2-K, -D, -L; Maus-Klasse-II: H2-A, -E. Diese Gene werden zudem bei beiden Spezies kodominant exprimiert. Zum anderen zeichnen sich die MHC-Gene durch einen außergewöhnlich starken Polymorphismus aus, d.h. dass es für jedes Gen multiple Allele gibt; so waren im April 2004 schon 309 Allele für HLA-A, 563 für HLA-B und 167 Allele für HLA-C bekannt (<http://www.anthonynolan.com/HIG>) und es werden immer weitere gefunden.

Entscheidend für die Funktion der MHC-Moleküle, nämlich die Präsentation von Peptiden an der Zelloberfläche, ist ihre so genannte Peptidbindungstasche. Auch in diesem Punkt unterscheiden sich die beiden MHC-Klassen. Die Peptidbindungstasche bei MHC-I-Molekülen wird von der α_1 - und α_2 -Domäne der schweren Kette gebildet. Diese beiden Domänen bilden aus einer β -Faltblattstruktur und zwei α -Helices eine an beiden Enden geschlossene Grube, in der die für MHC-Klasse-I typischen Peptide mit einer Länge von meist 8-10 Aminosäuren binden können (Abb. 1.3). In ganz ähnlicher Weise wird die Peptidbindung bei den MHC-Klasse-II-Molekülen durch die α_1 - und β_1 -Domäne ermöglicht, wobei jedoch eine an den Enden offene Peptidbindungstasche entsteht, die Peptide variabler Größe aufnehmen kann (Peptidlängen zwischen 9 und 25 Aminosäuren) (Abb. 1.3).

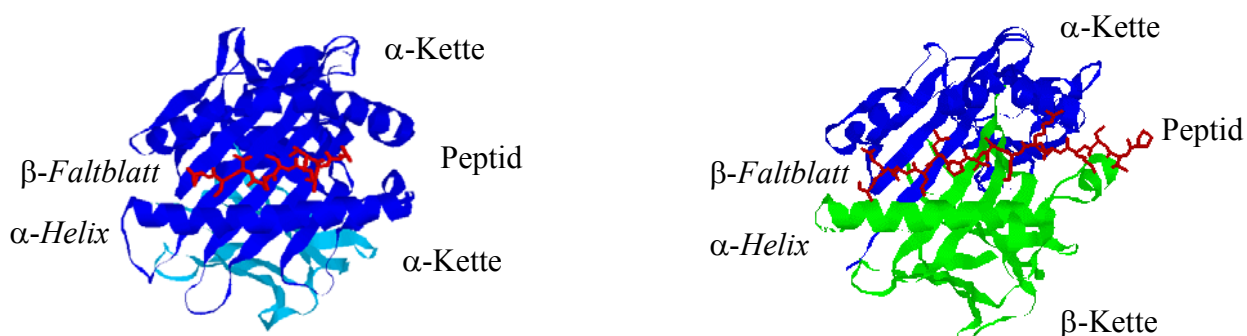


Abbildung 1.3 Peptidbindender Spalt der MHC-Klasse-I (HLA-A*0201)²
und -II-Moleküle (HLA-DRB1*01)³

Grundlegend dafür, welche Peptide an ein bestimmtes MHC-Allel binden, sind die hochpolymorphen Bereiche, die in der Bindungsfurche der MHC-Moleküle zu finden sind. Sie bilden die spezifischen Bindungstaschen der MHC-Moleküle, die vorzugsweise von bestimmten Aminosäuren des Bindungspartners besetzt werden⁴. Diese Aminosäuren der Liganden bilden eine besonders starke Bindung mit den Bindungstaschen der MHC-Moleküle aus. Dies geschieht zum einen über „komplementäre“ nicht kovalente Wechselwirkungen (van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen, ionische Wechselwirkungen) und zum anderen über ihre optimale Größe. Zudem wird die Peptidbindung bei MHC-Klasse-I-Molekülen über die Interaktion des freien Amino- und Carboxylendes des Peptids mit invarianten Bereichen der Peptidbindungsfurche, die bei allen MHC-Molekülen vorhanden sind, stabilisiert⁵. Wird eine Position im MHC ausschließlich von einem kleinen Set von nah verwandten Aminosäuren besetzt, werden diese Aminosäuren als Ankeraminosäuren bezeichnet und sind ausschlaggebend für die Allel-Spezifität. Aus der dreidimensionalen Struktur des MHC-Moleküls und der festen Einbindung des Peptids resultiert schließlich erst die Stabilität des MHC-Komplexes und diese ist eine entscheidende Voraussetzung für eine erfolgreiche und sinnvolle Präsentation von Peptiden auf der Zelloberfläche. Durch die begrenzte Auswahl möglicher Peptide, die zur Bindung und Stabilisierung eines bestimmten MHC-Allels befähigt sind, kann für dieses ein so genanntes „Peptidmotiv“ beschrieben werden. Dies zeigt im Grunde die Anforderungen, die für die Bindung an ein bestimmtes MHC-Allel an ein Peptid gestellt werden⁶. Die Bestimmung solcher Motive kann durch Peptidelutionen von MHC-Molekülen erfolgen, in deren Anschluss der eluierte Peptidpool mittels N-terminaler Sequenzanalyse untersucht wird. Durch diese Sequenzanalyse der eluierten Peptide können Sequenzübereinstimmungen in bestimmten Positionen der Peptide detektiert werden^{7,8}. Zur Ermittlung der Feinspezifität von MHC-Molekülen müssen zudem möglichst viele einzelne Liganden identifiziert werden, damit bevorzugte Aminosäuren in Nicht-Ankerpositionen, die bei einer Poolsequenzierung nicht sichtbar werden, mit in das Motiv eingearbeitet werden können.

Beim Vorliegen eines verlässlichen MHC-Motivs kann aus jedem beliebigen Protein, dessen Aminosäuresequenz bekannt ist, eine Vorhersage von möglichen MHC-Liganden gemacht werden. Hierbei ist zu beachten, dass die Bindungsfurche eines MHCs im Normalfall von neun Aminosäuren besetzt wird. Längere MHC-Klasse-I-Liganden nehmen in dieser Bindungsfurche eine gebogene oder nach außen gewölbte Konformation ein. Die mit dem MHC-Molekül in Kontakt tretenden Aminosäuren bzw. die, die sich aus der Furche herauswölben, können dabei je nach MHC-Allel unterschiedlich sein.

Für die Epitopvorhersage sind zurzeit sechs verschiedene Systeme frei im Internet zugänglich (Tab.1.1). Das älteste dieser Programme ist die NIH-Epitopvorhersage, die nach den Experimenten von K.C. Parker auf der Basis von synthetischen Peptiden entwickelt wurde⁹. Eine Vorhersage, bei der die Beurteilung des Bindungsverhaltens von Peptiden ausschließlich auf Informationen von natürlichen Liganden basiert, wurde von der Gruppe von Prof. Rammensee entwickelt und heißt SYFPEITHI¹⁰. Diese beiden haben die Annahme zur Grundlage, dass alle Aminosäuren eines Liganden einen größeren oder kleineren Beitrag zur Stabilität des MHC-Komplexes leisten. Über eine Matrix wird jeder Aminosäure ein Wert, gemäß ihres Stabilitätsbeitrags, zugeordnet und in bestimmter Weise, hierbei unterscheiden sich die beiden Systeme, mathematisch verarbeitet. Der resultierende Wert spiegelt schließlich die Wahrscheinlichkeit der Bindung des Peptids an das gewählte MHC-Allel wider. Bei der SYFPEITHI-Epitopvorhersage werden, basierend auf experimenteller Erfahrung bei der Epitopvorhersage und aktueller Peptidanalysen, die tatsächlich relevanten Peptide unter den bestbewerteten 2% aller Peptide erwartet.

Tabelle 1. 1 MHC-Epitop-Vorhersagen im Internet

Epitopvorhersage	Internet-Adresse
BIMAS	http://www-bimas.dcrn.nih.gov/molbio/hla_bind/
SYFPEITHI	http://www.syfpeithi.de
RANKPEP	http://www.mifoundation.org/Tools/rankpep.html
ProPred-I	http://www.imtech.res.in/raghava/propred1/index.html
HLA Ligand/Motif Database	http://hlaligand.ouhsc.edu
SVMHC prediction page	http://www.sbc.su.se/svmhc/new.cgi
MHCPred	http://www.jenner.ac.uk/MHCPred/

1.3 Antigenprozessierung

Die von den MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentierten Peptide können aus verschiedenen exogenen oder endogenen Proteinquellen stammen. Bei den zytosolischen Proteinen, deren Peptide von Klasse-I-MHC-Molekülen präsentiert werden, kann es sich sowohl um Selbstproteine, als auch um virale oder tumorassoziierte Proteine handeln. Die extrazellulären Proteine, die in Form von Peptiden auf den MHC-Klasse-II-Molekülen gefunden werden, stammen ebenfalls aus körpereigenen Proteinen oder von Erregern, die sich in intrazellulären Vesikeln vermehren, wie es z.B. die Mycobakterien oder verschiedene Leishmania-Arten tun. Die von MHC-Klasse-II-präsentierten Proteine haben gemeinsam, dass sie in Vesikeln der Zellen anzutreffen sind.

Bis vor kurzem wurde angenommen, dass die Quelle der MHC-präsentierten Peptide alte, ausgediente Proteine seien. Neuere Ergebnisse ergaben jedoch, dass sich das Immunsystem auftretende Fehler bei der Übersetzung der mRNA-Information in Proteinsequenzen, die zu missgefalteten, fehlerhaften Proteinen den so genannten „*defective ribosomal products*“ (DRIPS) führen, in Form eines vorzeitigen Abbaus und frühzeitiger Präsentation der Peptide auf MHC-Molekülen zu nutze macht¹¹⁻¹³.

Aufgrund der schon erwähnten unterschiedlichen Lokalisation der Proteine ergeben sich auch bei ihrer Prozessierung signifikante Unterschiede. Die Prozessierung der MHC-Klasse-I-Peptide beginnt deshalb, wie zu erwarten, im Zytosol, wo der Abbau der Proteine durch das Proteasom und einiger bisher beschriebener zytosolischer Proteasen erfolgt^{14,15}. Das Proteasom ist ein multikatalytischer tonnenförmiger Komplex. Die Kernkomponente, das 20S-Proteasom, besteht aus 28 Untereinheiten, welche sich in α - und β -Typen unterscheiden lassen. Diese Untereinheiten sind in vier Ringen mit je sieben Untereinheiten angeordnet ($\alpha_7\text{-}\beta_7\text{-}\beta_7\text{-}\alpha_7$) und so miteinander verbunden, dass sie drei große Hohlräume im Proteasom bilden. Der zentrale Hohlraum wird nur von β -Untereinheiten gebildet und beherbergt die katalytischen Bereiche auf je drei Untereinheiten jedes β -Rings. Diese katalytisch aktiven β -Untereinheiten sind verantwortlich für drei verschiedene proteolytische Aktivitäten: β_5 zeigt eine chymotrypsinartige Aktivität (hydrophobe Reste in Position 1), β_2 ist verantwortlich für die trypsinartige Aktivität (basische Reste in Position 1) und β_1 für die proteolytische Aktivität bei sauren Resten in Position 1. Diese katalytischen Aktivitäten werden jedoch durch IFN- γ -Induktion durch die drei Untereinheiten β_{1i} (MECL1), β_{2i} (LMP2; Low-molecular-weight protein 2) und β_{5i} (LMP7) ersetzt, von denen die letzten

beiden in der MHC-Region codiert sind. Das gebildete Proteasom wird als Immunproteasom bezeichnet¹⁶. Zudem induziert IFN- γ die Bildung des PA28-Aktivierungskomplexes. Die Ausbildung des Immunproteasoms und die Bildung des PA-28-Aktivators führen zu einer Verbesserung der quantitativen und qualitativen Fähigkeit des Proteasoms bei der Peptidgenerierung^{17,18}. Der Proteasomkomplex bildet Fragmente mit einer Längenverteilung, die einer Gaußverteilung entspricht, jedoch zeigt sich eine Präferenz für Peptide mit 8 bis 11 Aminosäureresten¹⁹⁻²¹, welches in guter Übereinstimmung mit den Bindungsmotiven der MHC-Klasse-I steht.

Im nächsten Schritt der Antigenprozessierung werden die vom Proteasom generierten Peptide über einen ATP-abhängigen *Transporter-associated-with-Antigen-Processing* (TAP) ins Endoplasmatische Retikulum (ER) transloziert. TAP bestehend aus den Untereinheiten TAP1 und TAP2, wählt hierbei Peptide einer bestimmten Länge (8 bis 16 Aminosäurereste) und bedingt auch einer spezifischen Aminosäuresequenz für den Transport aus²²⁻²⁴. Vom TAP bevorzugte Aminosäurereste befinden sich am Carboxy-Terminus und an den drei letzten Positionen des N-Terminus (P1: K, N, R; P2: R; P3: W, Y). Es scheint deshalb, dass die für die Bindung am TAP relevanten Aminosäurereste den der Ankeraminosäuren vieler MHC-Klasse-I-Moleküle entsprechen. In jedem Fall aber stimmt die Präferenz für den Carboxy-Terminus beim humanen TAP und Klasse-I-MHC gut überein, denn F, L, R, T und V, die vom humanen TAP bevorzugt werden, decken sich mit einem Großteil der Aminosäurereste, die bei Klasse-I-MHC-Molekülen als Ankeraminosäuren am Carboxy-Terminus gefunden wurden²⁵. Hingegen scheinen die Aminosäurereste in Position 5 bis 8 keiner Selektion durch den TAP zu unterliegen. Diese Aminosäuren sind von großer Bedeutung bei der T-Zell-Erkennung und müssen daher eine große Vielfalt zeigen. Neben positiver Selektion erscheint bei der TAP-Bindung auch eine negative Selektion, bei der z.B. Prolin in Position 2 und saure Aminosäuren (D, E) in Position 1 des Peptids eine Bindung an das TAP-Molekül fast vollständig verhindern. Dieses Phänomen wirft die Frage auf, wie MHC-Klasse-I-Allele mit Aspartat und Glutamat als Anker in Position 1 (z.B. HLA-A*2601) mit Peptiden versorgt werden. Da der Transport längerer Peptide als der an MHC-Klasse-I bindenden durch den TAP möglich ist, scheint das N-terminale Trimmen der transportierten Peptide in diesem Fall eine Schlüsselrolle zu spielen²⁶. Verschiedene zytosolische Proteasen wurden bereits beschrieben, wie z.B. die Leucin-Amino-peptidase (LAP)²⁷, die Tripeptidylpeptidase (TPPII)²⁸, die Bleomycin-Hydrolase (BH) und eine Puromycin-sensitive Amino-peptidase (PSH)²⁹. Die in diesem Fall für das Trimmen relevanten Amino-peptidasen müssen jedoch ER-resident sein und sind schon seit vielen Jahren in

der Diskussion³⁰. Tatsächlich wurden in letzter Zeit aufschlussreiche Daten über eine ER-residente Aminopeptidase, die so genannte ERAAP1, veröffentlicht³¹⁻³³.

Im weiteren Verlauf der Antigenprozessierung wirken im ER verschiedene Faktoren zusammen, wie Calnexin, Calreticulin und Tapasin, die zur Stabilisierung des MHC-I-Moleküls während seiner Faltung und auch zur Peptidbeladung beitragen^{34,35}. Nach Bindung des Peptids wird der trimere Komplex aus Peptid, schwerer Kette und β_2 -Mikroglobulin (β_2m) von den Chaperonen freigegeben und durch den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert.

Die Prozessierung der MHC-Klasse-II-Peptide beginnt nach der Aufnahme in die Zelle durch unspezifische oder Rezeptor-vermittelte Endozytose. In den Endosomen, in denen der pH-Wert nach Abschnürung von der Plasmamembran kontinuierlich sinkt, werden die enthaltenen Proteine durch saure Proteasen, wie Cathepsin B, D, S und L, in Peptide zerlegt^{36,37}. Ein komplexer biosynthetischer Ablauf ist nötig, um die Bildung und den Transport von reifen MHC-Klasse-II-Peptid-Komplexen zur Zelloberfläche zu ermöglichen. Neusynthetisierte Klasse-II α - und β -Ketten bilden im ER mit der invarianten Kette (Ii) erst ein Trimer und anschließend einen Nonamer (α/β -Ii)₃-Komplex^{38,39}. Diese Nonamere gelangen gezielt zu spezialisierten Kompartimenten des endozytotischen Abbauwegs, den sogenannten *MHC class II compartments* (MIIC), wo sie mit Peptid beladen werden⁴⁰. Während des Transports erfolgt ein selektiver proteolytischer Abbau der Ii-Kette, wodurch es zur Bildung eines Sets von Klasse-II-assoziierten Ii-Ketten-Peptiden (CLIP) kommt, welche die Bindungsspalten der Klasse-II-Dimere besetzen. CLIP wird schließlich wieder durch ein fest bindendes extrazelluläres Peptid ausgetauscht. Dieser Austausch wird mit Hilfe des HLA-DM-Moleküls vollzogen, welches die Entfernung des CLIP erleichtert und den peptidfreien Status des HLA-II-Moleküls stabilisiert⁴¹. Ein potentieller Regulator der HLA-DM-abhängigen Peptidbeladung ist das Klasse-II-codierte HLA-DO-Molekül. Es inhibiert die Fähigkeit des HLA-DM-Moleküls zur Katalyse der Peptidbeladung auf verschiedene Klasse-II-Allospezifitäten, wodurch es zu einem Selektionseffekt bei der Antigenpräsentation kommt⁴². Somit scheint das HLA-DO-Molekül eine zentrale Rolle bei der Gestaltung des von MHC-Klasse-II-Molekülen präsentierten Peptidreservoirs zu spielen. In einigen Fällen kann neben den dargestellten Prozessierungswegen auch eine Präsentation von extrazellulären Proteinen auf MHC-Klasse-I-Molekülen beobachtet werden, welche als Kreuzpräsentation (*cross presentation*) bezeichnet wird. Sie ermöglicht eine CD8⁺ T-Zellantwort gegen Viren, bei der keine professionellen antigenpräsentierenden Zellen

(APCs) infiziert wurden. In dieser Situation wären die infizierten Zellen nicht in der Lage das notwendige kostimulatorische Signal für die T-Zellaktivierung zu liefern. Und die APCs könnten unter diesen Bedingungen ohne Kreuzpräsentation keine viralen Peptide auf ihren MHC-Klasse-I-Molekülen präsentieren. Bisher ist ungeklärt, wie die Peptide vom endozytotischen in den zytosolischen Prozessierungsweg gelangen. Dieses Phänomen ist jedoch als eine elementare Voraussetzung für natürlich vorkommende CTL-Antworten gegen Tumorzellen zu sehen, da die meisten Tumorzellen weder MHC-Klasse-II noch kostimulatorische Moleküle besitzen. Jedoch kann nekrotisches Tumormaterial durch den Tumor umgebende Stromazellen aufgenommen werden, die dann in der Lage sind, die verdauten vom Tumor stammenden Proteine auf MHC-Klasse-I-Molekülen kreuzzupräsentieren⁴³.

Eine allgemeine Verbindung zwischen beiden Präsentationswege zeigt sich in der gemeinsamen Regulation der Expression beider MHC-Klassen. So existieren Proteine, die auf beide Klassen gleichsam regulierend wirken, wie z.B. der RFX-Proteinkomplex und der Transkriptionsfaktor *class-II-trans-activator* (CIITA)^{44,45}.

1.4 Die T-Zell-Antwort

Eine normale Zelle präsentiert etwa 10^4 verschiedene Peptide auf ihren 10^5 bis 10^6 MHC-Klasse-I-Molekülen. Die Kopienanzahl eines Peptids pro Zelle liegt dabei im Bereich von einer Kopie bis zu 10.000 Kopien. Dabei werden im Idealfall alle präsentierten Selbstpeptide vom Immunsystem toleriert, da die für die Erkennung zuständigen T-Zellen ($CD8^+$ -T-Zellen) aufgrund einer negativen Selektion während ihrer Entwicklung im Thymus oder später durch periphere Mechanismen inaktiviert werden. Werden hingegen Nicht-Selbstpeptide, z.B. aus einem Virus präsentiert, so werden diese Peptide in Verbindung mit MHC-Klasse-I-Molekülen vom T-Zellrezeptor der $CD8^+$ -T-Zellen (CTL, zytotoxische T-Lymphozyten) erkannt. Die Immunantwort durch CTLs benötigt neben der Wechselwirkung zwischen T-Zellrezeptor der CTLs und dem MHC-Peptidkomplex auf der Zielzelle gleichzeitige Signale kostimulatorischer Moleküle, z.B. durch den Kontakt von CD80 und CD86 auf einer antigenpräsentierenden Zelle (APC) mit CD28 auf der T-Zelle. Die Zerstörung der von den CTLs erkannten Zelle erfolgt über die Freisetzung von Zytotoxinen wie Perforin und Granzymen und auch über den Fas-Liganden. Perforin bildet hierbei durch Polymerisation Löcher in der Membran der Zielzelle aus, während Granzyme, eine Gruppe

von Serinproteasen, im Zytosol der Zielzelle eine Apoptose-auslösende Signalkaskade starten⁴⁶. Die Induktion von Apoptose kann ebenfalls durch die Bindung von Fas-Ligand an Fas auf der Zielzelle erfolgen^{47,48}. Allerdings muss erwähnt werden, dass die Grenze zwischen „selbst“ und „fremd“ während der Erkennung durch T-Zellen nicht klar definiert ist. So können z.B. CD8⁺-T-Zellen stimuliert werden, gegen Selbstpeptide zu reagieren, die auf normalen Zellen nur in kleinen Mengen präsentiert werden. In einem anderen Fall werden CD8⁺-T-Zellen genutzt, um gegen Tumorzellen vorzugehen, die Selbstpeptide in einer größeren Dichte als normale Zellen exprimieren⁴⁹. Weitere Ziele von tumorzerstörenden CD8⁺-T-Zellen könnten möglicherweise Oncogen-Produkte, Tumor-Supressor-Genprodukte, mutierte normale Proteine und ungewöhnlich exprimierte Proteine sein.

Die T-Zellen, die im Zusammenhang mit MHC-Klasse-II-Molekülen stehen, gehören zur Subpopulation der CD4⁺-T-Zellen. Erkennt eine solche CD4⁺-T-Zelle ein fremdes von MHC-Klasse-II präsentiertes Peptid auf einer professionellen antigenpräsentierenden Zelle (APC, wie z.B. Makrophagen, Dendritische Zellen) und existiert gleichzeitig ein Stresssignal, wird die T-Zelle dazu angeregt Zytokine zu produzieren. Die CD4⁺-T-Zellen können aufgrund ihrer verschiedenen Zytokinproduktion in zwei Subgruppen eingeteilt werden: T-Helfer-1-Zellen (Th₁), die als typisches Zytokin IFN- γ produzieren und T-Helfer-2-Zellen (Th₂), die als Leitzytokin IL-4 produzieren. Th₁-Zellen sind inflammatorische Zellen, die extrazelluläre Parasiten, wie z.B. Leishmania, durch Produktion verschiedener Zytokine und durch Aktivierung von Makrophagen über CD40-Ligand, bekämpfen und CD8⁺-T-Zellen stimulieren. Th₂-Zellen wirken vor allem als Regulator in der humoralen Immunität, da sie hauptsächlich B-Zellen aktivieren.

Neben den Th₁- und Th₂-Zellen konnte kürzlich eine weitere Subpopulation der CD4⁺-T-Zellen definiert werden, die regulatorischen T-Zellen (T_{reg}). Sie zeichnen sich durch eine konstitutive Expression von CD25 aus und regulieren T-Zellantworten in einer bisher noch nicht sehr gut verstandenen Weise.

1.5 Tumorerkrankungen und Immuntherapie

1.5.1 Tumorentstehung und Tumorantigene

Die Zellen eines Tumorgewebes sind gekennzeichnet durch Defekte in ihren regulierenden Kreisläufen, welche die normale Zellproliferation und Homeostasis verwalten. Diese Regelkreise arbeiten entweder Zell-autonom oder sind gekoppelt an Signale, die die Tumorzellen von dem sie umgebenen Gewebe erhalten (Mikroenvironment). Trotz der großen Heterogenität der verschiedenen Tumore wird für einen allgemeinen Tumorzellgenotyp die Manifestierung von sechs essentiellen Veränderungen der Zellphysiologie vorgeschlagen⁵⁰. Diese Veränderungen zusammen führen zum malignen Wachstum und können andererseits im intakten Zustand als Antitumor-Mechanismen der Zelle angesehen werden:

1. Selbstversorgung mit Wachstumssignalen (PDGF *platelet-derived growth factor*, EGFR *epidermal growth factor receptor*)
2. Unempfindlichkeit gegenüber inhibitorischen Wachstumssignalen (p53, pRb)
3. Umgehung des programmierten Zelltods (Apoptose) (Bcl-2)
4. Unbegrenztes replikatives Potential (Telomerase)
5. Anhaltende Angiogenese (VEGF, Thrombospondin-1)
6. Gewebsinvasion und Metastasierung (Integrine, E-Cadherin, extrazelluläre Proteasen)

Diese Vielfalt an Schutzmechanismen, die in erfolgreichen Tumorzellen außer Kraft gesetzt werden muss, legt nahe, dass sich Tumorgewebe auch in seiner Proteinexpression von normalen Zellen des gleichen Gewebes unterscheiden muss. Dies ermöglicht wiederum, dem adaptiven Immunsystem auf T-Zell-Ebene zwischen Tumor- und Normalgewebszellen zu differenzieren. Die für diese Unterscheidung relevanten Strukturen werden als Tumorantigene bezeichnet. Ihre Existenz und Relevanz als Zielmolekül für tumorzerstörende T-Zellen konnte bereits sowohl in der Maus als auch im humanen System molekular nachgewiesen werden^{51,52}. Das ideale Tumorantigen sollte möglichst tumorspezifisch sein, d.h. ausschließlich im Tumor exprimiert werden.

Tabelle 1.2 Klassifizierung von Tumorantigenen

Klasse	Beispiel	Erkennung durch	
		T-Zellen	Antikörper
Punktmutation eines normalen Gens	CDK4 ⁵³	+	-
Leseraster -Mutation eines normalen Gens	TGFβ ⁵⁴	+	-
Anti-Sense-Transkript eines normalen Gens	RU2AS ⁵⁵	+	-
Exprimiertes Intron eines normalen Gens	N-Acetylglucosaminyl -transferase ⁵⁶	+	-
Fusionsprotein durch Translokation	BCR-ABL ⁵⁷	+	-
Posttranslationale Modifikation	Tyrosinase ⁵⁸	+	-
Tumor/Embryonales Antigen	CEA ^{59,60}	+	+
Überexprimiertes Antigen - Protein	Her2/neu, MUC1 ^{61,62}	+	+
Überexprimiertes Antigen - nicht Protein	Gangliosid GD3 ⁶³	-	+
Tumor/Testis Antigen	NY-ESO-1 ⁶⁴	+	+
	MAGE Familie ⁶⁵	+	+
Onkogen	Ras ⁶⁶⁻⁶⁸	+	+
Tumorsuppressorgen	p53 ^{69,70}	+	+
Differenzierungsantigen	Tyrosinase ^{71,72}	+	+
	Gp100 ^{73,74}	+	+
Virales Protein	E7 aus HPV ^{75,76}	+	+

Da sich die Identifizierung dieser Art von Tumorantigenen als relativ schwierig erweist, sind die meisten der definierten Tumorantigene, inklusive der in klinischen Studien eingesetzten, auch in anderen Geweben zu finden, wie z.B. in embryonalen Geweben, an immunprivilegierten Stellen, wie den Hoden⁷⁷ oder auch mit geringer Expression in anderen normalen Geweben. Nach Rammensee et al. ist eine aktuelle formale Klassifizierung von Tumorantigenen in Tabelle 1.2 dargestellt⁷⁸. Neben einer von Renkvist et al. im Jahr 2001 veröffentlichten Übersicht über humane Tumorantigene bzw. T-Zellepitope⁷⁹ und der Liganden und Epitopzusammenstellung in der SYFPEITHI-Datenbank sind weitere aktuelle Datenbanken von Antigenen und Epitopen im World Wide Web unter <http://www.cancerimmunity.org> zu finden.

1.5.3 Klassische Identifizierung von T-Zellepitopen

Bei der klassischen Identifizierung von Tumorantigenen geht man von existierenden tumorspezifischen T-Zellen aus. Hierbei kann die T-Zellrezeptor-Spezifität entweder durch einen genetischen oder einen biochemischen Ansatz ermittelt werden. Die Gruppe von Thierry Boon identifizierte 1991 mittels Expressionsbibliotheken das erste humane tumorspezifische Epitop, EADPTGHSY, aus MAGE-1⁵². Hierbei wurde eine Expressionsbibliothek aus Tumorzellmaterial hergestellt und die einzelnen Komponenten zusammen mit dem restringierenden HLA-Genkonstrukt in kompatible Zellen cotransfiziert. Das so ermittelte Gen MAGE-1 wurde nach weiterer genetischer Verkürzung und anschließendem Epitopmapping auf Peptidebene eindeutig charakterisiert. Eine kürzlich veröffentlichte Strategie zur Erstellung von Expressionsbibliotheken in einem Vaccinia-virus-basierenden Vektor, die eine Selektion aufgrund von Letalität erlaubt, könnte dazu beitragen, dieses aufwändige Verfahren zu beschleunigen⁸⁰. Hunt und seinen Mitarbeitern gelang 1994 nach biochemischer Isolierung von MHC-Liganden einer von T-Zellen erkannten Melanomzelllinie die Identifizierung eines Epitops aus gp100. Hierbei führten neben Zytotoxizitätstests chromatographische und massenspektrometrische Techniken zur Epitop-Identifizierung⁸¹.

1.5.4 Identifizierung von T-Zellepitopen ohne präexistierende T-Zellen

In der Literatur sind verschiedene erfolgreiche Projekte beschrieben, die ohne zuvor existierende spezifische T-Zellen als Kontrollsystem zur Identifizierung von T-Zellepitopen geführt haben. So wurde z.B. das HLA-B8-präsentierte Epitop von RAGE⁸² anhand eines auf Massenspektrometrie basierenden biochemischen Ansatz identifiziert. Umfassende ESI-MS-Analysen in einem Ansatz, bei dem Tumorzelllinien mit löslichen MHC-Klasse I Molekülen transfiziert und analysiert wurden, führten ebenfalls zur Identifizierung tumorassoziierter HLA-Liganden aus MAGE-B2 und Mucin⁸³. Dieser experimentelle Ansatz gleicht allerdings, aufgrund der Komplexität der MHC-Ligandenmischungen einer Suche nach der Nadel im Heuhaufen und ist somit in der Regel sehr zeitaufwändig.

Die Entdeckung der allel-spezifischen MHC-Peptid-Motive⁶ ermöglichte eine völlig neue Herangehensweise bezüglich der T-Zellepitop-Identifizierung. MHC-Peptidmotive beschreiben die Sequenzvoraussetzungen für MHC-Liganden und ermöglichen eine zuverlässige Vorhersage von potentiellen Liganden eines spezifischen MHC-Allels für jede beliebige Proteinsequenz^{84,85}. Die Epitopvorhersage für MHC-Klasse-II-Peptide existiert zwar,

ist jedoch aufgrund der Charakteristika dieser Liganden, als wesentlich schwieriger und weniger zuverlässig anzusehen, als die für MHC-Klasse-I-Liganden. Der Einsatz der MHC-Peptid-Vorhersage bei der Suche nach T-Zellepitopen wird als reverse Immunologie bezeichnet. Die Mehrzahl der heute bekannten Epitope wurden mittels dieser Strategie identifiziert, inklusive der HLA-Klasse-I-präsentierten Epitope aus den Tumorantigenen MAGE-A3⁸⁶, Telomerase⁸⁷, Survivin⁸⁸ und TRP2 (Tyrosinase Related Protein 2)⁸⁹.

Im Jahr 1994 wurde von Celis und Mitarbeitern die erste Arbeit veröffentlicht, bei der nach Epitopvorhersage synthetische Peptide zur Induktion einer primären *in vitro* Antwort aus PBMC von gesunden Menschen eingesetzt wurden. Die erhaltenen Peptid-spezifischen T-Zellen wurden im Weiteren auf effektive MHC-restringierte Erkennung der das Antigen exprimierenden Tumorzellen getestet⁸⁶. Viele Variationen dieses Ansatzes wurden seitdem publiziert, um die häufig auftretende Problematik der fehlenden Erkennung der Antigen-präsentierenden Tumorzellen durch die induzierten Peptid-spezifischen T-Zellen zu lösen. Der Grund für die fehlende Erkennung kann zum einen auf eine niedrige Affinität der T-Zellen zurückzuführen sein oder aber auf das Fehlen des vorhergesagten Peptids auf der Tumorzelloberfläche. Probleme bei der Antigenprozessierung sowie Herabregulierung oder Verlust von Komponenten der Antigenpräsentation wie TAP oder bestimmter MHC-Moleküle selbst⁹⁰ können zum Fehlen des Peptids auf der Zelloberfläche führen. Zur Sicherstellung der Existenz des vorhergesagten Peptids nach Prozessierung durch das Proteasom wurden Arbeiten veröffentlicht in denen eine Generierung des entsprechenden Liganden durch *in vitro* Proteasomverdaus eines verlängerten Vorläuferpeptids nachgewiesen wurde. Diese Methode führte zur Identifizierung der T-Zellepitope aus PRAME⁹¹ und SSX-2⁹². Im diesem Zusammenhang erscheint auch die Frage nach der Art des Proteasoms, immun oder konstitutives Proteasom, von Bedeutung zu sein. So konnte z.B. für ein HLA-B40-präsentiertes Epitop aus MAGE-A3 eine Präsentation nur auf Immunproteasom exprimierenden Melanomzellen gezeigt werden⁹³. Dies unterstreicht die Bedeutung der Vorhersage-Algorithmen nicht nur für die Peptidbindung, sondern auch für proteasomale Schnittstellen, wie sie im Programm PAPROC⁹⁴ verwendet werden.

Eine anderes Verfahren zur Identifizierung von T-Zellepitopen, bei dem nur tatsächlich prozessierte MHC-Liganden berücksichtigt werden, ist die von M. Schirle in unserem Labor entwickelte „Predict, Calibrate, Detect“- Methode (PCD). Der erste Schritt ist hierbei die Vorhersage von potentiellen Epitopen aus Sequenzen schon bekannter Tumorantigene, um die Anzahl an möglichen Peptiden zu reduzieren. Mit den besten vorhergesagten HLA-bindenden synthetischen Peptiden wird im Folgenden ein analytisches HPLC-System ka-

libriert. Somit kann für die ausgewählten Peptide neben der Masse auch eine Aussage über die Retentionszeit im chromatographischen System gemacht werden. Bei der Analyse einer natürlichen HLA-Peptidmischung kann so gezielt und höchst sensitiv nach koeluiierenden Peptiden der gleichen Masse gesucht werden und diese anhand eines Tandem-MS-Experiments mit der Identität des synthetischen Peptids verglichen werden. Der Beweis der Immunogenität der Epitope muss jedoch nach wie vor im Anschluss an erfolgreiche LC-MS-Analysen in T-Zellversuchen bewiesen werden. Die PCD-Methode wurde bereits erfolgreich bei der Suche nach einem HLA-A*0201-restringierten MAGE-A1⁹⁵ und einem aus dem Carcinoembryonic Antigen (CEA) stammenden Epitop eingesetzt⁹⁶. Auch bei Fragestellungen, die auf virale oder parasitäre Epitope gerichtet sind, kann diese Methode Anwendung finden (siehe Ergebnisteil dieser Arbeit 3.2).

1.5.5 Screening-Methoden zur Identifizierung von T-Zellepitopen

Die Reverse Immunologie hat den gravierenden Nachteil auf bekannte Antigene angewiesen zu sein oder zumindest auf verdächtige Kandidaten. Die Suche nach neuen Antigen-Kandidaten setzt eine Erweiterung der zu betrachtenden Zielmoleküle voraus und erfordert den Einsatz von Screening-Methoden die in der Lage sind, viele Gene, Proteine oder andere charakteristische Moleküle parallel untersuchen zu können. Dies kann schließlich zur Aufstellung von Datenbanken bestehend aus möglichen immunogenen Zielmolekülen führen. In den letzten Jahren wurden große Fortschritte im Bereich dieser Screening-Verfahren gemacht, wie z.B. durch die Etablierung der serologischen Identifizierung von Antigenen durch rekombinante Expressionsklonierung (SEREX)⁹⁷, die DNA-Microarray-Technologie^{98,99} oder auch die serielle Analyse der Genexpression (SAGE)¹⁰⁰. Zudem wurden erhebliche Fortschritte im Bereich der Proteomanalytik erzielt.

Die SEREX-Methode ist speziell auf die Identifizierung von tumorassoziierten Antigenen durch das Antikörper-Repertoire eines Tumorpatienten ausgelegt. Tumorassoziierte Antigene, welche zu CTL-Epitopen führen, zeichnen sich häufig im Tumorpatienten durch Antikörper mit einem hohen Titer aus, die nicht in gesunden Individuen zu finden sind. Man schlussfolgert daher, dass es sich bei den durch die Antikörper erkannten Strukturen um immunogene Proteine handelt. Die Anwendung der SEREX-Methode hat inzwischen zu einer Datenbank geführt (<http://www.licr.org/SEREX.html>) die viele Hundert tumorassoziierte Antigene enthält. Diese Datenbank kann wiederum den Ausgangspunkt für die

Identifizierung von T-Zellepitopen aus diesen Antigenen mittels Reverser Immunologie bilden.

Ein in unserer Abteilung entwickelter Patienten-individueller Ansatz zur Identifizierung von tumorassoziierten Antigenen für immuntherapeutische Zwecke kombiniert zwei Screening-Methoden¹⁰¹: die DNA-Microarray-Technik zur Genexpressionsanalyse und die biochemische Aufreinigung und Identifizierung des HLA-Ligandoms durch massenspektrometrische Verfahren. Für jeden neuen vom Tumor charakterisierten HLA-Liganden liefert die vergleichende Genexpressionsanalyse von Tumorgewebe und autologem Normalgewebe eine Aussage über den Expressionsstatus des entsprechenden Quellproteins. Durch Überexpression oder besser noch ausschließliche Genexpression im Tumor wird ein HLA-Ligand zum potentiellen T-Zelltarget. Ein weiteres Auswahlkriterium für Zielmoleküle ist die Genexpression des Quellproteins in anderen normalen Geweben und Organen im Vergleich zur Expression im Tumorgewebe des Patienten. Dadurch wird das Risiko von unerwünschten Autoimmunreaktionen nach einer T-Zellaktivierung minimiert bzw. auch die Gefahr von T-Zell-Toleranz und damit Unwirksamkeit des Peptids in der Immuntherapie verringert. Schließlich besteht die Möglichkeit, periphere CD8⁺-T-Zellen von Tumorpatienten und gesunden Probanden auf ihre Reaktivität gegen verschiedene neu identifizierte, tumorassoziierte HLA-Liganden anhand von quantitativer PCR¹⁰² und MHC-Peptid-Tetramer-Färbung¹⁰³ zu testen, um den Beweis ihrer Immunogenität zu erbringen. Der vorgestellte integrale Ansatz fand Anwendung bei verschiedenen Tumorfragestellungen in dieser Dissertation (siehe Ergebnisteil 3.3).

Die vergleichende Genexpressionsanalyse von Tumor und korrespondierendem autologen Normalgewebe durch DNA-Microarray-Technologie ist eine exzellente Methode für die Identifizierung einer großen Anzahl an tumorassoziierten Antigenkandidaten. Jedoch muss im Bewusstsein bleiben, dass einige tumorassoziierte Antigenklassen, wie z.B. Fusionsproteine oder Antisense-translatierte Produkte nicht erfasst werden können. Zudem ist zu beachten, dass bei den meisten zellulären Prozessen Proteine die ausführenden und damit relevanten Moleküle sind, welches nahe legt, dass letztendlich der Proteingehalt einer Zelle von größerer Bedeutung ist als der mRNA-Gehalt. Arbeiten in *Saccharomyces cerevisiae* zeigen anhand vergleichender Genexpressions- und Proteomanalysen^{104,105}, dass eine einfache Ableitung der Proteinexpression vom mRNA-Gehalt stark fehlerbehaftet ist. Da jedoch vieles darauf hinweist, dass ein Anteil von etwa 30% der MHC-Liganden nicht aus nativen Proteinen, sondern aus DRIPS (defective ribosomal products) prozessiert werden^{11-13,106,107}, könnte die Korrelation zwischen mRNA-Expression und HLA-

Ligandenpräsentation besser übereinstimmen und so den von Weinschenk getroffenen Rückschluss der Genüberexpression auf einen Kandidaten als T-Zelltarget rechtfertigen. Die klassische Proteomanalyse hingegen eröffnet die Möglichkeit, auch die oben erwähnten durch Genexpressionsanalyse nicht erfassbaren Antigenklassen zu detektieren und erlaubt durch den Einsatz von *Isotope-coded affinity tags* (ICAT) eine relative Quantifizierung der Proteine des Tumors versus der des Normalgewebes¹⁰⁸. Es muss dabei jedoch auch im Anschluss noch die Identifizierung von T-Zellepitopen des entsprechend im Tumor überexprimierten Proteins erfolgen, von denen das Maß der HLA-Oberflächenpräsentation nicht bekannt ist. Eine differenzielle HLA-Ligandom-Analyse des Tumors und der korrespondierenden normalen Gewebszellen wäre zur Identifizierung von tumorassoziierten T-Zellepitopen deshalb aus zwei Gründen ideal. Erstens würde die zu quantifizierende Größe direkt das Zielmolekül selbst darstellen und weitere Identifizierungsschritte würden sich damit erübrigen, die sowohl ausgehend von der mRNA-Ebene als auch von der Proteinebene unerlässlich sind. Zweitens würde die Identifizierung überpräsentierter HLA-Liganden auf Tumor im Vergleich zum autologen Normalgewebe direkt die Situation widerspiegeln, die die Zellen des Immunsystems vorfinden. So könnte der schon beschriebene Einfluss der verschiedenen Proteasomtypen (konstitutiv/immun) auf den generierten HLA-Peptidpool einer Zelle als auch noch weiter, auch unbekannt Einflüsse hierbei erfasst werden^{93,109-111}. Trotz bereits durchgeführter vergleichender Analysen der MHC-Peptidpräsentation in verschiedenen zellulären Systemen oder Zuständen mittels verschiedener massenspektrometrischer Techniken¹¹²⁻¹¹⁵, existiert bisher keine Methode die geeignet wäre, um eine große Anzahl von unbekannt MHC-Peptiden differenziell quantitativ zu untersuchen.

1.5.6 Tumor-Immuntherapie

Nach Dekaden des Zweifels an der Existenz von tumorassoziierten Antigenen konnten in den 90er Jahren T-Zellantworten in Melanompatienten auf molekularer Ebene nachgewiesen werden⁵². Die tumorassoziierten Antigene bilden die Grundlage für die auf T-Lymphozyten basierende anti-Tumor-Immuntherapien und können auf zwei unterschiedlichen Wegen therapeutisch genutzt werden. Zum einen in der adoptiven T-Zellimmuntherapie, bei der tumorspezifische T-Zellen *ex vivo* expandiert und anschließend in den Tumorpatienten transferiert werden. Und zum anderen durch Vakzinierung gegen tumorspezifische oder tumorassoziierte Antigene, um eine spezifische zelluläre oder hu-

morale Immunität gegen den Tumor zu induzieren. Sowohl klinische als auch Laborexperimente stützen die Hypothese, dass T-Zellen unter bestimmten Umständen getriggert werden können, eine bedeutende Anti-Tumorantwort zu induzieren. Zurzeit existieren unzählige Vakzinierungsstrategien, welche in klinischen Studien eingesetzt werden: hierbei findet man bestrahlte allogene¹¹⁶ oder autologe Tumorzellen¹¹⁷, für Tumorabstoßungsgene kodierende DNA, die mit einem hoch entwickelten Transportsystem, wie virale Transporter, kombiniert wurde¹¹⁸, vom Tumor isolierte Hitzeschockproteine¹¹⁹, DCs transfiziert mit Gesamt-RNA¹²⁰ oder mit für definierte Tumorantigene kodierender RNA¹²¹ oder DCs beladen mit MHC-Klasse-I-Peptiden¹²², Proteinen allein¹²³ oder Peptide, Peptide plus Adjuvantien, wie GM-CSF¹²⁴, IL-2¹²⁵, Montanide ISA51¹²⁶, Keyhole limpet Hemocyanin (KLH)¹²⁴, tumorassoziierten¹²⁷ oder artifiziellen MHC-Klasse-II-Liganden¹²⁸. Neben der unterschiedlichen Zusammensetzung der Vakzine gibt es zudem sehr unterschiedliche Vakzinierungsprotokolle, die sich bezüglich der Injektionsstelle, Anzahl und Häufigkeit der Vakzinierung, Menge der Vakzine pro Injektion und sonstigen Feinheiten unterscheiden.

Die Tumorimpfstoffe aus autologem Tumorgewebe zeichnen sich durch die in ihnen enthaltene große Anzahl an Antigenen aus. Dieser Tatbestand ist von Vorteil, betrachtet man die Wahrscheinlichkeit der Anwesenheit spezifischer Tumorantigene im autologem Impfstoff. Ein Entkommen des Tumors durch den durch das Immunsystem ausgeübten selektiven Druck scheint deshalb wenig wahrscheinlich, da die Immunantwort gegen viele verschiedene Zielmoleküle gerichtet sein sollte. Der Nachteil des nicht definierten Impfstoffs zeigt sich jedoch bei der Mengenanalyse der spezifischen Antigene, die aufgrund ihrer Anzahl deutlich verdünnt vorliegen. Die Induktion einer Immunantwort wäre in diesem Fall deshalb generell in Frage gestellt und auch ein spezifisches Monitoring im Falle einer T-Zellantwort wäre nicht möglich. Im autologen Impfstoff sind zudem vornehmlich Selbstantigene zu erwarten, die stets ein gewisses Risiko bezüglich Autoimmunreaktionen und Toleranz in sich bergen. Die begrenzte Verfügbarkeit des autologen Tumormaterials kann zudem zu einer Limitierung der möglichen Anzahl an Impfungen führen.

Aus Tumorantigenen abgeleitete molekular definierte T-Zellepitope hingegen sind bisher zwar noch stark in ihrer Anzahl begrenzt, besitzen jedoch generell einige Vorteile gegenüber dem nicht definierten autologen Impfstoff. Die definierten Moleküle sind in der Regel in unbegrenzten Mengen herstellbar und eine wiederholte Impfung, wenn nötig über Jahre, ist durchaus im Bereich des Möglichen. Auch die effektive Konzentration des wirkenden Moleküls kann an dieser Stelle variiert werden, um eine optimale Immunstimulation zu

erreichen. Die Einschränkung auf einige bekannte Zielmoleküle, wie z.B. auf einige Peptide, bietet zudem den Vorteil, dass die Immunantwort anhand verschiedener sensitiver Methoden spezifisch verfolgt werden kann. Zudem kann eine *in vivo* Selektion von antigennegativen Klonen bei der Impfung eines Patienten durch den Einsatz essentielle Tumorproteine enthaltender Antigenmischungen reduziert oder sogar verhindert werden. Optimale breit angelegte Antigenmischungen können auch das Problem der heterogenen Expression von bestimmten Antigenen in einer individuellen Tumorspezies lösen.

Bei den bisher definierten Tumorantigenen handelt es sich vornehmlich um zytoplasmatische Selbstantigene, die selektiv vom Tumor exprimiert werden. Die T-Zellantwort gegen ein solches Antigen erfordert generell eine „Epitoperzeugung“. Sie entsteht also aus einer Aktivierung naiver T-Zellen, die eine relativ geringe Anfälligkeit für Anergie oder Toleranz aufweisen. Allerdings erweist sich die Induktion einer spezifischen Antwort dieser Art schwieriger als die Verstärkung einer schon existierenden Antwort.

In klinischen Studien deutet sich heute an, dass verbesserte Antigenmischungen einen signifikanten Einfluss auf den Erfolg klinischer Studien haben¹²⁹. Zahlreiche Studien können inzwischen mit klinischen Antworten aufwarten^{122,130-140} und auch eine Korrelation mit einer immunologischen Antwort konnte gezeigt werden¹²⁹.

1.6 Zielsetzung

In dieser Dissertation sollten neue tumorassoziierte bzw. krankheitsassoziierte CD8⁺-T-Zellepitope durch biochemische, chromatographische und massenspektrometrische Analysen identifiziert werden. Im Mittelpunkt dieser Bemühungen stand die Entwicklung einer Methode zur differenziellen quantitativen Analyse zweier aus verschiedenen Quellen stammender MHC-Klasse-I-Ligandenpools. Hierbei sollte das Prinzip der in der Proteomanalytik verwendeten ICAT-(*isotope-coded affinity tag*) Methode den Ausgangspunkt bilden, welche ihrerseits aufgrund der inhärenten Peptideigenschaften für HLA-Liganden nicht einsetzbar war. Unter Einsatz synthetischer Peptide sollte eine organische Derivatisierungsmethode entwickelt werden. Im Folgenden war die Erprobung dieser Derivatisierungsmethode an realen HLA-Peptidproben, wie Tumor/ Normalgewebspaaren (Kolon, Niere) bzw. transfizierten/ nicht transfizierten Zellpaaren (Awells-Keratin18; Priess-Präproinsulin) vorgesehen.

Im integralen Ansatz, der HLA-Peptidrepertoire- und Genexpressionsanalysedaten bezüglich ihrer für immuntherapeutische Ansätze geeigneten neuen T-Zellepitope untersucht, sollten durch Kooperationen zur Verfügung stehende Tumor und zum Teil autologe Normalgewebe von Kolon, Magen, Gehirn und Niere analysiert werden. Im Fall der Nierenzellkarzinome war zusätzlich die Initiation einer klinischen Immuntherapiestudie der Phase I und II in Kooperation mit der Urologischen Klinik in Tübingen unter Leitung von Prof. Arnulf Stenzl geplant.

Des Weiteren wurden in Rahmen dieser Dissertation in Zusammenarbeit mit verschiedenen Kooperationspartnern MHC-präsentierte Peptide mittels biochemischer, chromatographischer und massenspektrometrischer Methoden charakterisiert (siehe Ergebnisteil 3.2 und 3.5.2.5).

2. Material und Methoden

2.1 Zellbiologische Methoden

2.1.1 Zelllinien

Tabelle 2.1 Verwendete Zelllinien.

Zelllinie	Zelltyp	HLA-Typisierung	Referenz
C1R-A2	Humanes B-Zell-Lymphom, selektiert auf niedrige MHC-Expression, transfiziert mit HLA-A*0201	HLA-A*0201	¹⁴¹
Awells	EBV- transformierte humane lymphoblastoide Zelllinie.	HLA-A*0201, -B*4402	IHW 9090
P815-WLA.1-1	Maus-Mastocytom-Zelllinie transfiziert mit WLA.1-1	WLA.1-1	¹⁴²
MGAR	EBV- transformierte humane lymphoblastoide Zelllinie.	HLA-A*2601, -B*0801	¹⁴³
JY	EBV- transformierte humane lymphoblastoide Zelllinie.	HLA-A*0201, -B*0702	IHW 9287
Hela-P83/30	Humane Zelllinie Zervix Karzinom (HeLa) transfiziert mit HLA-A*0201 und einem Teil des MSP1 aus <i>Plasmodium falciparum</i>	HLA-A*0201, -A*6802, -A*33, -B*14, -B*44	¹⁴⁴
U-NS3/4A	Humane Osteosarcom-Zelllinie transfiziert mit HLA-A*0201 und NS3/NS4A aus HCV	HLA-A*0201, -A*30, -B*44	¹⁴⁵
U-HCVcon	Humane Osteosarkom-Zelllinie transfiziert mit HLA-A*0201 und HCV-Genom	HLA-A*0201, -A*30, -B*44	¹⁴⁵
MZ7	Melanom-Zelllinie	HLA-A*26, -A*03, -B*07, -B*38	(Thomas Wölfel)
W6/32	Maus-Hybridom-Zelllinie; α -HLA-A, -B, -C; IgG _{2a}	nicht relevant	¹⁴⁶
pT85	Maus-Hybridom-Zelllinie; anti-Schwein-MHC, kreuzreaktiv mit WLA.1-1	nicht relevant	(R. Erlich, Israel)

2.1.2 Kultivierung der Zelllinien

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte im Brutschrank (Labotect Inkubatoren, Forma Scientific) bei 37°C und 7,5% CO₂ in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre. Als Nährstoffquelle für die nicht transfizierten Suspensionszelllinien wurde RPMI 1640- bzw. DMEM-Medium verwendet, welchem folgende Zusatzstoffe zugesetzt wurden: NaHCO₃ (2 g/l), HEPES (2,4 g/l), L-Glutamin (2 µmol/l), 2-Mercaptoethanol (50 µmol/l), Penicillin (50 U/ml), Streptavidin (50 µg/ml) und 10% fötales Kälberserum (Fetal Calf Serum, FCS).

Für die transfizierten, adhärenen Zelllinien wurden dem supplementierten DMEM-Medium verschiedene Selektionsantibiotika zugesetzt: bei U-NS3/4A und U-HCVcon Zellen wurde 0,5 mg/ml G418 (PAA-Labor), 0,1 mg/ml Hygromycin (Roche) und 1 µg/ml Puromycin (Sigma) hinzugefügt. Zudem wurde für die induzierbare Expression von NS3/4A bzw. HCVcon 1 µg/ml Tetracyclin (Roche) verwendet.

Zur Anzucht größerer Mengen von Zellen wurden Rollerulturen verwendet. Hierbei wurden die Zellen in 2 l-Glasflaschen (Schott, Mainz) bei 37°C und 1,5 Umdrehungen pro Minute auf Rollergestellen in Medium ohne Selektionsmarker kultiviert.

2.1.3 Zellernte

Zur Gewinnung der Zellpellets von Suspensionszellen für die MHC-Präzipitation wurde die Zellsuspension aus den Rollerulturen in 500 ml Zentrifugenbechern bei 1600 rpm (ca. 500 g) und 4°C 10 min zentrifugiert (Sorvall RC 5C Plus, Rotor GS-3). Der Überstand wurde verworfen, die Zellpellets in eiskaltem PBS (pH 7.2) gewaschen, vereinigt und erneut bei 1600 rpm, 4°C 15 min zentrifugiert. Im Fall von adhärenen Zellen wurden die Zellen mittels 25 ml 0,05% EDTA in PBS von der Flaschenwand abgelöst, mit 25 ml PBS gewaschen und bei 1600 rpm, 4°C 10 min zentrifugiert. Anschließend wurden alle Zellpellets in PBS resuspendiert, vereinigt und nochmals wie zuvor abzentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurden die so erhaltenen Zellpellets sofort bei -70°C eingefroren.

2.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die einzufrierenden Zellen wurden in einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml in sterilfiltriertem Einfriermedium (90% FCS, 10% DMSO) aufgenommen und 1 ml Aliquots in Kryoröhrchen mit Schraubverschluss (Merck) überführt. Diese wurden sofort bei -70°C eingefroren. Für eine längere Lagerung wurden die Röhrchen dann nach dem Einfrierprozess in flüssigen Stickstoff überführt.

Die eingefrorenen Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Danach wurden die Zellen sofort in 5 ml vorgelegtes entsprechendes Kulturmedium überführt und abzentrifugiert (1500 rpm, 3 min, RT, Eppendorf Centrifuge 5416). Das Zellpellet wurde anschließend in 5 ml Medium gewaschen und nochmals abzentrifugiert. Dieses Pellet wurde nun in 2-3 ml Medium resuspendiert. In einer 6-well-Kulturplatte wurden in 3 Kavitäten je 5 ml, 3 ml und 2 ml Medium vorgelegt. Dann wurden die 2-3 ml Zellsuspension in der ersten Kavität resuspendiert und 2 ml dieser Zellsuspension in die zweite Kavität überführt und von dieser schließlich nach Resuspension 2 ml in die dritte Kavität.

2.1.5 Bestimmung der Lebendzellzahl

Ein Aliquot der Zellsuspension wurde mit Trypanblaulösung (0.05% w/v Gibco) 1:2 verdünnt und die ungefärbten Zellen in 16 Kleinquadraten einer Zählkammer (Neubauer, Tiefe 0,1 mm) ausgezählt. Aus der ermittelten Zahl ergab sich die Lebendzellzahl pro ml durch Multiplikation mit dem Faktor 10^4 , welcher das Volumen der Zählkammer beinhaltet, und mit dem Verdünnungsfaktor.

2.2 Immunologische und biochemische Methoden

2.2.1 Antikörperreinigung aus Hybridomüberstand

Die Hybridomzellsuspension wurde mit NaN_3 (0,02% Endkonzentration) versetzt und der pH-Wert der Lösung auf 8,0 eingestellt. So wurde die Zellsuspension 1-2 Tage bei 4°C gelagert, damit sich die Zellen absetzen konnten, bevor der Hybridomzellüberstand mittels eines $0,2\ \mu\text{m}$ Membranfilters von allen partikulären Bestandteilen befreit werden konnte.

Die Aufreinigung des Antikörpers aus dem klaren Überstand erfolgte mittels einer Affinitätssäule, bestehend aus Protein A-Sepharose (Protein A-Sepharose CL-4B, Pharmacia). Zur Präparation der Säule wurden 0,6 mg Protein A-Sepharose in etwa 5 ml H₂O bidest. zum Quellen 15 min bei RT geschwenkt. Nach dem anschließenden Absetzen der Protein A-Sepharose wurde der Überstand abgesaugt. Das Säulenmaterial wurde in PBS pH 7,2 aufgenommen und in eine Säule gepackt. Das Volumen der gequollenen Protein-A-Sepharose beträgt das 5-fache des Trockengewichts, d.h. das Säulenvolumen betrug etwa 3 ml. Nach dem erneuten Absetzen in der Säule wurde das Gelbett mit 50 ml PBS gewaschen.

Jetzt wurde der klare Hybridomüberstand bei 4°C über die Säule geführt und im Anschluss wieder mit 50 ml PBS gewaschen. Die Elution des Antikörpers von der Säule erfolgte mittels 3 ml Citratpuffer (50 mM Zitronensäure, 0,02% NaN₃, pH 3,0) welche nach einem zu verwerfenden Vorlauf von 0,5 ml in 9 ml Kopplungspuffer (0,1 M NaHCO₃; 0,5 M NaCl; pH 8,3) aufgefangen wurden. Alle Wasch- und Elutionsschritte wurden mittels der Schwerkraft mit Sicherheitsschleife bei Flussraten von ca. 3 ml/min durchgeführt. Die Quantifizierung des Antikörpers erfolgte anhand der UV-Absorption bei 280 nm, wobei eine Absorption von 1,0 OD₂₈₀ für IgG einer Antikörperkonzentration von 0,7 mg/ml entspricht. Die kurzzeitige Lagerung erfolgte bei 4°C, bei längerer Lagerung wurde die Antikörperlösung bei – 20°C eingefroren.

2.2.2 Durchflusszytometrie

2.2.2.1 Antikörpervermittelte Färbung der Zellen

Die Färbung der Zellen wurde in 96-*well* Mikrotiterplatten durchgeführt. Zuerst wurden pro Loch etwa 10⁵ lebende Zellen in FACS-Puffer (PBS; 2% FCS; 0,02% NaN₃) vorgelegt und dann abzentrifugiert (1500 rpm; 4°C; 3 min; Heraeus Instruments; Megafuge 1.0 R). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 200 µl FACS-Puffer pro *well* gewaschen und nochmals abzentrifugiert. Nach erneutem Verwerfen des Überstands wurden die Zellen durch kurzes Schütteln auf dem Vortex resuspendiert und der 1. Antikörper (aufge-reinigter Antikörper aus Hybridomüberständen) in verschiedenen Verdünnungen in 100 µl eiskaltem FACS-Medium zu den Zellen gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde dreimal gewaschen, indem bei jedem Waschschrift die Zellen abzentrifugiert (s.o.), der Überstand verworfen, die Zellen resuspendiert und jeweils 200 µl eiskalter FACS-

Puffer in jedes *well* gegeben wurden. Anschließend wurde ein FITC-gekoppelter Ziegenanti-Maus Zweitantikörper (Jackson Immuno Research) 1:100 verdünnt in eisgekühltem FACS-Puffer zu den Zellen pipettiert und wieder für 30 min auf Eis inkubiert. Erneut wurde dreimal gewaschen und die Zellen nach dem letzten Waschschrift in 250 µl FACS-Medium mit Propidiumjodid (5 µg/ml) aufgenommen und in Polyethylen-Röhrchen überführt. Die Messung am Zytometer erfolgte direkt im Anschluss.

2.2.2.2 Analytische Messung am FACS-Gerät

Das FACS-(Fluorescence-Activated Cell Sorter) Gerät (FACSCalibur, Becton-Dickinson) ermöglicht generell eine Analyse und Auftrennung von Zellpopulationen, die sich aufgrund der Lichtstreuung oder aufgrund bestimmter fluoreszenzmarkierter Oberflächenmoleküle unterscheiden.

Zum einen kann die Zellgröße über die Streuung in Einstrahlrichtung des Laserlichts (forward scatter, FSC) und die Granularität der Zelle durch die Seitwärtsstreuung (side scatter, SSC) gemessen werden. Dies ermöglicht in vielen Fällen eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen und verschiedenen Zellpopulationen.

Zum anderen können Oberflächenmoleküle mit Hilfe monoklonaler Antikörper erkannt werden, die ihrerseits mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert sind. Die gebräuchlichsten Fluorochrome sind hierbei Fluoresceinisothiocyanat (FITC, grünes Emissionslicht, Messkanal FL-1) und Phycoerythrin (PE, rotes Emissionslicht; FL-2). Außerdem kann mit Hilfe eines Fluorochroms wie Propidiumjodid (PI) eine Erkennung der toten Zellen über ein Fluoreszenzsignal (FL-3) erfolgen.

Zur Messung werden die Zellen in einem großen Volumen Salzlösung durch eine Düse gepresst, wodurch ein dünner Flüssigkeitsstrahl mit einer Zelle pro Tropfen entsteht. Die Streuung und die Emission, die durch einen auf die Zelle treffenden Laserstrahl erzeugt wird, werden von verschiedenen Detektoren registriert.

Im FACS-Assay wurde erst durch Veränderung der Spannungen an den Detektoren für SSC und FSC in einem *dot blot* eine definierte Zellpopulation ausgewählt, die in ihrer Größe und Granularität der von lebenden Zellen entspricht. Diese Zellpopulation wurde durch das Setzen eines Rahmens ausgewählt, so dass bei der Betrachtung der Fluoreszenzparameter nur Zellen innerhalb dieses Rahmens berücksichtigt wurden.

Ein Histogramm mit der Fluoreszenzintensität einer bestimmten Wellenlänge (FL-1 oder FL-3) auf der x-Achse und der Anzahl der Zellen auf der y-Achse wurde zum einen dazu

genutzt, tote Zellen über die Fluoreszenz des PI (FL-3) erneut durch das Setzen eines Rahmens auszugrenzen. Zum anderen wurde die Fluoreszenz von FITC (FL-1), welches an einen spezifischen HLA-spezifischen Antikörper gekoppelt war, zur Detektion der verschiedenen MHC-Moleküle auf den Zellen verwendet. Zu Beginn der Messung wurde die Spannung am Fluoreszenzdetektor mittels ungefärbter Zellen so eingestellt, dass der Fluoreszenzpeak der Autofluoreszenz gerade noch am linken Rand des Histogramms bei kleinen Fluoreszenzwerten erkennbar war.

Tabelle 2.2 Zur Durchflusszytometrie verwendete monoklonale Antikörper

Antikörper	Isotyp, Spezies	MHC-Spezifität
B1.23.2	IgG aus Maus	HLA-B, -C
BB7.2	IgG _{2b} aus Maus	HLA-A2
W6/32	IgG _{2a} aus Maus	HLA-A, -B, -C

2.2.3 Isolierung von MHC-Klasse-I-Liganden

2.2.3.1 Verwendetes Gewebematerial

Es wurden MHC-Klasse-I-Liganden aus dem Gewebe verschiedener Tumorarten (RCC, CCA, MCA, NCH) und wenn möglich der autologen Normalgewebe isoliert. Das Material wurde direkt nach operativer Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Für die HLA-Typisierung wurden 10 ml EDTA-Blut entnommen.

2.2.3.2 Herstellung des Zell- oder Gewebelysats

Das gefrorene Zellpellet (20 -100 ml) bzw. schockgefrorenes Gewebe wurde mit einem Volumenteil doppelkonzentriertem Lysepuffer (PBS; 0,6% CHAPS: 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propansulfonate; 3 Tabletten Proteaseinhibitoren „complete“ von Roche pro 200 ml) versetzt und unter langsamen Rühren bei 4 °C aufgetaut bzw. im Fall von solidem Gewebe erst im Mixer und dann im Potter zu einem Brei verarbeitet. Nach dem Auftauen wurde noch ein Volumen einfach konzentrierter Lysepuffer hinzugefügt und die Zellsuspension / der Gewebebrei 60 min bei 4 °C verstärkt gerührt. Der weitere Aufschluss erfolgte im Dounce-Homogenisator, wenn möglich, durch 5 Kol-

benstöße bei großem Spalt (50-70 μm) und 20 Stöße bei kleinem Spalt (10-30 μm). Nach Zugabe eines weiteren Volumens Lysepuffer wurde erneut 60 min gerührt. Das erhaltene Lysat wurde erst 20 min bei 4000 rpm (ca. 3000 g), 4°C (Heraeus Instruments, Megafuge 1.0 R) und der Überstand dann 1 h bei 40000 rpm, 4°C (Beckman L-80 Ultracentrifuge, Rotor Ti45) zentrifugiert. Die Pellets wurden verworfen. Der Überstand der Ultrazentrifugation wurde im Anschluss sterilfiltriert (0,2 μm).

2.2.3.3 Affinitätschromatographie und Säureextraktion

Zum Lysat wurden zunächst 5-20 mg Antikörper hinzugefügt und die Mischung für eine Stunde rotierend inkubiert. Anschließend wurde sie entweder zyklisch (viermal) oder im Batch (dreimal) mit einer Flussrate von 1-2 ml/min über eine Protein-A-Säule (Herstellung wie unter 2.2.1 beschrieben) geführt. Nach einem Waschzyklus von 30 min mit PBS und 30 min mit H₂O wurden die gebundenen Antikörper bzw. Antikörper-MHC-Komplexe mittels 3 bis 4 ml Elutionspuffer (50 mM Zitronensäure; 0,02% NaN₃; pH 3) von der Säule eluiert. Der Vorlauf von 0,5 ml wurde verworfen. Vor einer erneuten Beladung der Protein-A-Säule durch Lysat wurde die Säule 30 min mit Lysepuffer gewaschen. Beladung und Elution wurden zwei- bis dreimal durchgeführt. Im nächsten Schritt wurden zum Protein-A-Eluat 25 μl 25%ige TFA hinzugefügt, um eine vollständige Extraktion der Peptide vom MHC im stark sauren Milieu zu gewährleisten. Vom extrahierten Eluat wurde ein Aliquot von je 2% für die Edman-Sequenzanalyse und die Immunblotanalyse entnommen. Anschließend wurde das extrahierte Eluat in ein zuvor mit Elutionspuffer gewaschenes 10 kDa Zentrikon (centricon filtrators 10, Amicon) überführt und zur Abtrennung größerer Proteine bei 4000 rpm (Heraeus Instruments, Megafuge 1.0 R) solange zentrifugiert, bis die gesamte Flüssigkeit filtriert war. Da das Gesamtvolumen bei dieser Methode relativ groß war, wurde ein Konzentrierungsschritt eingefügt der im Folgenden beschrieben ist.

2.2.3.4 Konzentrierung des Zentrikonfiltrats für die SMART-HPLC-Auftrennung

Das Volumen des Zentrikonfiltrats wurde mittels einer RP-C18-Sequenzierungs-Säule (G1017A, Hewlett-Packard) an einer Sequencer-Proben-Vorbereitungsstation (Hewlett-Packard) auf 100 μl verringert, wobei gleichzeitig eine Entsalzung erfolgte. Diese Station dient normalerweise der Adsorption von Proteinen und Peptiden an die erwähnte RP-C18-Säule. Von diesen an die Säule gebundenen Peptiden kann dann anschließend eine Sequenzanalyse an einem HP-Sequencer durchgeführt werden. In unserem Fall wurde jedoch

wie folgt verfahren: die zuvor mit 0,1% TFA in H₂O äquilibrierte RP-Säule wurde als erstes mit dem Zentrikonfiltrat beladen und anschließend mit 0,5 ml 0,1% TFA in H₂O (v/v) gewaschen. Die Elution der gebundenen Peptide erfolgte mit 100 µl 50% Acetonitril, 0,1 % TFA in H₂O (v/v). Das Eluat wurde dann mit 400 µl 0,1% TFA in H₂O (v/v) verdünnt. Die anschließende Auftrennung der Peptide am SMART-System erfolgte wie unter 2.3.2.1 beschrieben.

2.2.3.5 Konzentrierung des Zentrikonfiltrats für die *online* LC-MS-Analyse

Das Zentrikonfiltrat wurde im gefrorenen Zustand über Nacht lyophilisiert (Vaco5, ZIRBUS). Nach vollständiger Sublimation der Flüssigkeit wurde das Lyophilisat in 200 bis 1000 µl LC-MS-Lösungsmittel A (4 mM NH₄Ac in H₂O; pH 3,0 mit Ameisensäure eingestellt) gelöst. Die erhaltene Lösung wurde in LC-MS/MSMS-Analysen eingesetzt.

2.2.4 Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese/Immunblot

2.2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (DISC-Page) nach LAEMMLI (1970). Hierbei besteht über einen bestimmten Bereich ein linearer Zusammenhang zwischen Wanderungstrecke s und dem Logarithmus der Molekülmasse (M). Durch ein dem Trenngel vorgeschaltetes Sammelgel werden die Proteine nach dem Prinzip der Isotachophorese stark fokussiert und können dadurch scharf ins Trenngel eintreten. Die Molekulargewichtsbestimmung der Proteine erfolgt durch den Vergleich der Laufstrecke mit bekannten Markerproteinen. Für die Herstellung von jeweils 2 Gelen wurden folgende Lösungen verwendet:

<u>Trenngel</u>	10% (w/v)	<u>Sammelgel</u>	5% (w/v)
4,9 ml	ddH ₂ O	6,4 ml	ddH ₂ O
2,5 ml	1,5 M Tris-HCl, pH 8,6	2,5 ml	1,5 M Tris-HCl, pH 8,6
100 µl	10% SDS	100 µl	10% SDS
2,5 ml	40% Acrylamid-Mix	1,0 ml	40% Acrylamid-Mix
50 µl	APS	50 µl	APS
10 µl	TEMED	10 µl	TEMED

Nach Herstellung der Lösungen wurde die Lösung zwischen die Platten der Minigelkammer (Mini-Protean II Electrophoresis Cell, Biorad) gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Das Sammelgel wurde nach Entfernung des Isopropanols und vollständiger Polymerisation auf das Trenngel gegossen. Nach abgeschlossener Polymerisation wurde das Gel in die mit Laufpuffer (25 mM Tris-Base (Sigma), 190 mM Glycin (Roth), 0,1% SDS (Sigma), pH 8,75) gefüllte Elektrophoreseapparatur eingesetzt.

Vor dem Laden wurden die Proteinproben (10 µl, pH 3) mit 1 µl 1 M NaOH neutralisiert und mit dem gleichen Volumen 2x Ladepuffer (125 mM Tris-HCl (Sigma) pH 6,8, 3,5% SDS (Sigma), 20% Glycerin (Roth), 10% Mercaptoethanol (Sigma), 0,2% Bromphenolblau) auf dem Heizblock (Thermomixer 5436, Eppendorf) 5 min bei 95°C inkubiert. Neben den zu analysierenden Proben wurden ein Proteinstandard (*Prestained Protein Marker Broad Range*: 175 kDa, 83 kDa, 62 kDa, 47,5 kDa, 32,5 kDa, 25 kDa, 16,5 kDa, 6,5 kDa) und im Fall einer MHC-Quantifizierung eine Standardverdünnungsreihe aus MHC-Monomeren aufgetragen (Steffen Walter) bzw. im Fall der Detektion der HCV-Proteine eine Positiv- und eine Negativkontrolle des entsprechenden Zelllysats. Die Elektrophorese wurde mit der Spannungsquelle (Power Pac 200, Biorad) bei 30 mA und 120 V über etwa 2,5 h durchgeführt.

2.2.4.2 Immunblot

Die unter 2.2.6.1 im Gel aufgetrennten Proteine wurden mittels einer *semidry*-Apparatur (Transfer-Blot Kammer SDI, CTI) auf eine Nitrocellulosemembran (Hybond ECL, Pharmacia) transferiert. Hierzu wurde die Membran zwischen puffergetränktes Filterpapier (Whatman) gelegt. Folgende Lagen wurden auf der unteren Graphitelektrode (Anode) aufgeschichtet:

4 Lagen in Anodenpuffer getränktes Papier
Nitrozellulose-Membran
SDS-Page-Gel
4 Lagen in Kathodenpuffer getränktes Papier

(Anodenpuffer: 50 mM Natriumborat, 20% Methanol, pH 9;

Kathodenpuffer: 50 mM Natriumborat, 0,05% SDS, pH 9)

Es wurde mit konstantem Strom 1 mA pro cm² über 2 bis 4 h geblottet. Dabei ergaben sich Spannungswerte von zu Beginn 4 V bis zu 10 V.

Anschließend wurde die Membran zur Blockierung unspezifischer Bindungen über Nacht bei 8°C in TBB (0,1% IGEPAL CA-630 (Sigma), 3% bovines Albumin (Sigma), 5 mM EDTA in TBS) geschwenkt. Auf die anschließende zweistündige Inkubation bei 8°C mit dem 1. Antikörper folgte ein dreimal durchgeführter fünfminütiger Waschschrift mit TWB (0,1% IGEPAL CA-630 in TBS). Die Membran wurde dann für 1 h mit dem 2. Antikörper inkubiert, gefolgt von mehreren Waschschriften: fünf Minuten mit TBS, dreimal zehn Minuten mit TWB und schließlich zweimal fünf Minuten mit TBS. Die lichtemittierende Reaktion wurde durch Zugabe der Entwicklungslösung (Western Blot Chemiluminescence extra plus, NEN Life Science Products) gestartet. Der HRP-Anteil des 2. Antikörpers oxidiert das zyklische Diacylhydrazid Luminol unter Lichtemission ($\lambda = 428$ nm). Die Detektion dieser Lichtemission erfolgte an der Image-Station (Fuji Film, LAS-1000). Das Bild wurde mit der Software Image Gauge (Fuji Film) ausgewertet und quantitativ analysiert. Anhand der im Densitometer gemessenen Eichwerte bzw. ihrer Mittelwerte bei Doppelbestimmungen wurde eine Regressionsgerade erstellt, durch die die MHC-Quantifizierung der Proben erfolgte.

Tabelle 2.3 Zum *Immunblotten* verwendete monoklonale Antikörper

Protein	1. Antikörper	2. Antikörper
MHC-α-Kette	monoklonaler Mouse-Anti-Human-HLA-A,B,C-IgG (Anogen) Verd. 1:1000	HRP-konjugierter Sheep-Anti-Mouse-IgG (Amersham) Verd. 1:5000
Beta-2-Mikroglobulin	polyklonaler Rabbit-Anti-Human-Beta-2-Mikroglobulin-IgG (Dako oder Abcam) Verd. 1:50000	HRP-konjugierter Donkey-Anti-Rabbit IgG (Amersham) Verd. 1:5000
NS3/NS4A	1B6.14.21.AF 0,04% Acites polyklonaler Mouse-Anti-HCV-NS3-IgG (Moradpour, Freiburg) Verd. 1:500	HRP-konjugierter Sheep-Anti-Mouse-IgG (Amersham) Verd. 1:5000
HCVcon	Wie für NS3/NS4A	Wie für NS3/NS4A

2.3 Analytische Methoden

2.3.1 Massenspektrometrische Methoden

2.3.1.1 MALDI-Tof-Massenspektrometrie

Die Besonderheit der *MALDI* (Matrix-assisted Laser Desorption Ionization)-Massenspektrometrie ist ihre besonders schonende Ionisierungstechnik. Diese Technik beruht auf der Cokristallisation eines Analyten in die Kristallstruktur einer kleinen UV-absorbierenden Verbindung, welche die Laserenergie aufnimmt und auf die Analytmoleküle überträgt und so die Ionisierung von empfindlichen Biomolekülen ermöglicht. Das organische Kristall muss bei der Wellenlänge des einstrahlenden Lasers, normalerweise ein N_2 -Laser mit der Wellenlänge 337 nm, absorbieren, damit eine Ionisierung des Analyten erfolgen kann. Verschiedene als Matrix verwendete organische Substanzen sind in Tabelle 2.4 aufgeführt. Bei den so erhaltenen ionisierten Moleküle handelt es sich um einfach geladene Ionen.

Die Analysen wurden an folgenden Geräten durchgeführt:

1. MALDI-Tof-Gerät HP G2025A von Hewlett Packard. Hierbei handelt es sich um ein Gerät mit linearer Flugbahn, welches keinen Reflektor besitzt und zudem über keine sogenannte „Delayed extraction“ verfügt. Die Auflösung des Gerätes liegt deshalb im Bereich von $R = m/\Delta m \geq 500$, wobei Δm für die Halbwertsbreite (*full width at half maximum*, FWHM) und die Sensitivität bei etwa 100 bis 500 femtomol. Der analysierbare Massenbereich liegt beim HP G2025A zwischen 0 bis zu 200 000 Da.
2. Reflex III der Firma Bruker. Das Maldi-Tof-Gerät wurde freundlicher Weise von Prof. Dr. Nordheim zur Verfügung gestellt. Dieses Gerät kann in einem linearen und einem Reflektor-Modus eingesetzt werden, da es sowohl einen Reflektor besitzt, als auch zwei Detektoren, von denen sich einer am Ende der linearen Flugstrecke und einer am Ende der Flugstrecke nach Reflektion befindet. Diese Ausstattung ermöglicht die Bestimmung der Massen von Molekülen mit hohen Molmassen (M_r bis zu 500 000 Da) im linearen Modus, als auch die von kleineren Molekülen (M_r bis zu 10 000 Da) im Reflektor-Modus. Zudem erfolgt die Ionisation mit der sogenannten Pulsed Ion Extraction (PIE) welches der Delayed Extraction (DE) äquivalent ist. Sowohl der Reflektor als auch die PIE führen zu der bei diesem Gerät üblichen Auflösung von $R = m/\Delta m = 8000$ und zu einer Sensitivität, die bei etwa 500 attomol liegt.

Beide Geräte sind mit dem erwähnten 337 nm Stickstofflaser und einem *Time-of-flight* (*Tof*)-Analysator ausgestattet. Nach einer Beschleunigung der Ionen in der Quelle durch ein definiertes elektrostatisches Feld (z.B. 28 kV Beschleunigungsspannung) ermöglicht der *Tof*-Analysator die Bestimmung der Ionenmasse/Ladung (m/z) aufgrund der Zeit, die für das Durchfliegen einer im Hochvakuum ($p = 3,8 \times 10^{-8}$ mbar) liegenden feldfreien Driftstrecke benötigt wird. Das Verhältnis zwischen Molekülmasse und Ladung ist dem Quadrat der Flugzeit proportional und kann somit über die Flugzeit ermittelt werden¹⁴⁷.

Zudem bietet das Reflex III *MALDI-Tof*-Gerät die Möglichkeit im „*Post-source-decay-Modus*“ (PSD) Fragmentspektren von Peptiden aufzunehmen, um so ihre Primärstruktur zu ermitteln. Hierbei werden die Ionen nach der Ionisierung der Probe auf dem Target in einem zweistufigen Beschleunigungssystem („*Pulsed delayed ion extraction*“) beschleunigt. Nach dem Verlassen der Ionenquelle haben alle Ionen die gleiche nominelle kinetische Energie, wobei die meisten noch nicht fragmentierte Vorläufer-Molekülonen sind und schon innere Energie über verschiedene Mechanismen aufgenommen haben (z.B. Gasphase-Kollisionen, Laserstrahlen, thermische Energie). Während ihres Fluges durch die feldfreie Driftregion haben die metastabilen Ionen einige Mikrosekunden zur Verfügung, um nach Verlassen der Quelle spontan in Produkt-Ionen zu zerfallen. Diese Produkt-Ionen haben grundsätzlich die gleiche Geschwindigkeit wie ihre Vorläuferionen, aber besitzen nun eine wesentlich geringere kinetische Energie aufgrund ihrer geringeren Masse. Die kinetische Energie der Produkt-Ionen ist somit ein Maß für ihre Masse. In linearen Instrumenten würden PSD-Ionen zur gleichen Zeit detektiert werden wie ihre Vorläufermoleküle und ihre Masse könnte somit nicht bestimmt werden. Der Ionen-Reflektor, der in klassischen *Tof*-Instrumenten normalerweise als Einheit zur Kompensation der Anfangsenergieverteilung der Ionen benutzt wird, wird hier als Energie-Analysator und somit als Massenanalysator der PSD-Ionen eingesetzt. Aufgrund ihrer massenabhängigen, kinetischen Energien werden die PSD-Ionen an verschiedenen Positionen, d.h. verschiedenen äquipotentiellen Oberflächen des Reflektors reflektiert. Dies führt zu einer massenabhängigen totalen Flugzeit durch das Instrument.

In typischen PSD-Instrumenten muss ein vollständiges Produkt-Ionenspektrum in mehreren Schritten aufgenommen werden, da ein Ionenreflektor normalerweise nur in der Lage ist, die Energien eines begrenzten Bereichs mit ausreichender Auflösung zu analysieren. Die Potentiale des Reflektors werden deshalb Schritt für Schritt abgesenkt, bis alle Produkt-Ionen in guter Auflösung abgebildet sind. Schließlich werden alle Segmente des PSD-Spektrums durch ein Computerprogramm aneinandergereiht. Die Auswertung des Fragmentspektrums kann dann computergestützt und mit einer Datenbanksuche verknüpft erfolgen.

Die Probenvorbereitung erfolgte in den meisten Fällen nach dem „dried droplet“-Verfahren: dazu wurden erst 0,5 µl Matrix auf den Probenträger (Target) getropft und unter Vakuum oder an der Luft getrocknet, dann wurden 0,5 µl Probenlösung auf die getrocknete Matrix getropft und ebenfalls getrocknet. Der Probenträger wurde nun in das Massenspektrometer geladen und die Probe analysiert. Die Laserenergie wurde stets so gering wie möglich gehalten, um Matrixsignale und Auflösungsverluste niedrig zu halten, deshalb wurde mit geringer Laserenergie begonnen und diese dann langsam erhöht. Die Spektren wurden durch Aufsummieren von Einzelspektren erzeugt, wobei mit dem Laserstrahl verschiedene Bereiche des Probenträgers beschossen werden konnten.

Tabelle 2.4 Matrizen für die MALDI-Tof-Analytik

Matrix	Herstellung
2,5-Dihydroxyacetophenon * (DHAP)	15 mg DHAP + 5 mg Ammoniumcitrat in 200 µl H ₂ O und 800 µl Isopropanol
2'-(4-Hydroxyphenyl)-azo-benzoesäure* (HABA)	15 mg HABA + 5 mg Ammoniumcitrat in 200 µl H ₂ O und 800 µl Ethanol
α-Cyano-4-hydroxy-zimtsäure* (ACCA)	10 mg ACCA in 666 µl H ₂ O mit 0.1 % TFA und 333 µl Acetonitril
α-Cyano-4-hydroxy-zimtsäure (ACCA)*/ Nitrocellulose (NC) im Verhältnis 1:1	15 mg ACCA in 500µl Aceton lösen (Vortex + Ultraschall); 5 mg NC in 250 µl Aceton + 250 µl Isopropanol

* Gesättigte Lösungen, vor Benutzung abzentrifugiert und nur den Überstand verwendet.

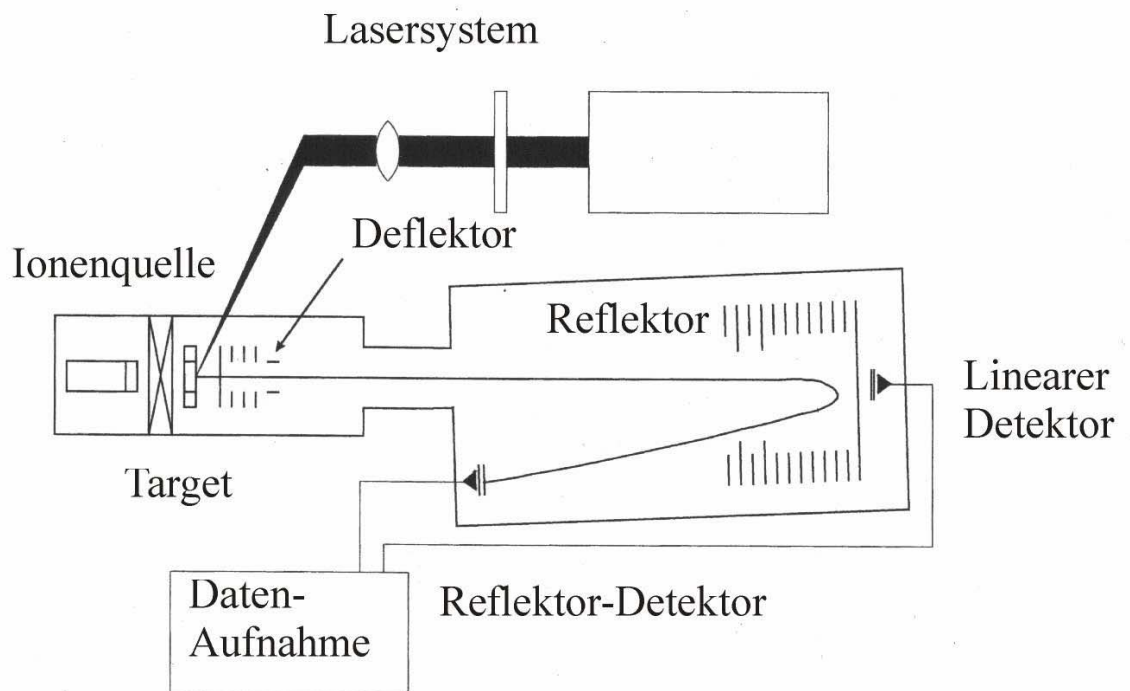


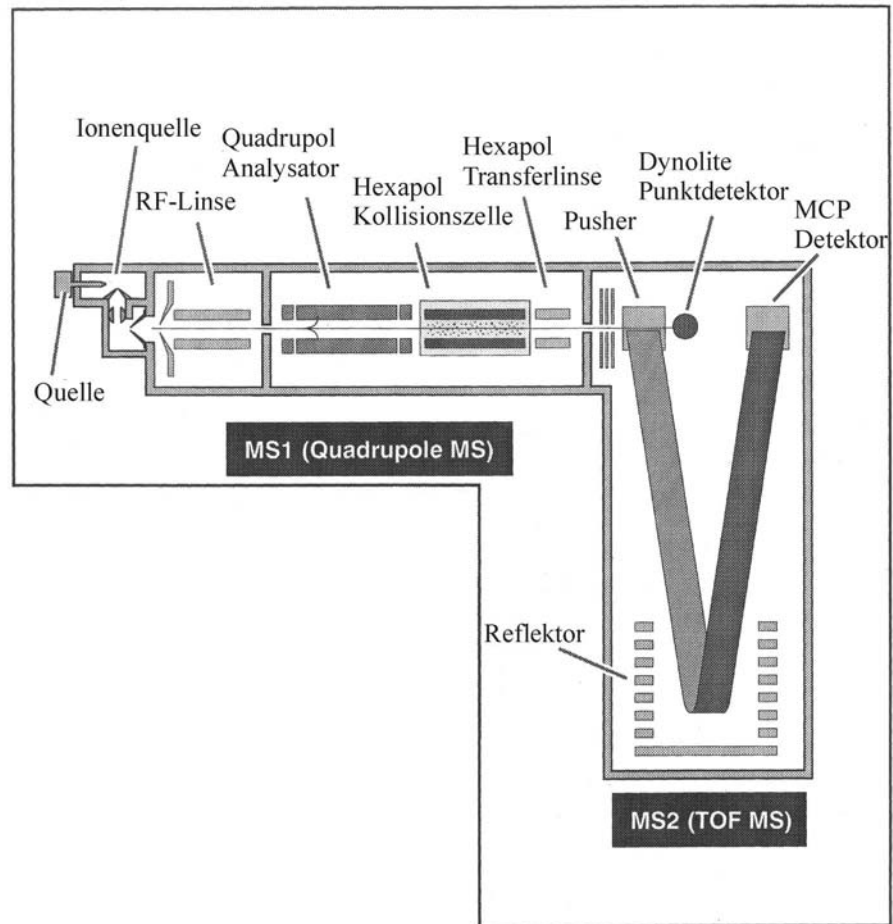
Abbildung 2.1 Schematischer Aufbau eines MALDI-ToF-Massenspektrometers

2.3.1.2 Elektrospray-Ionisierung (ESI) Massenspektrometrie

Elektrospray-Ionisierung ist, neben MALDI, die am häufigsten eingesetzte Ionisierungsmethode in Peptid- und Proteinstudien. Während des Elektrospray-Ionisierungsprozesses wird die Analytlösung kontinuierlich durch eine enge Kapillare geführt, an die ein hohes Potential (800-2000 V) angelegt wird. Das starke elektrische Feld bewirkt den Austritt der Analytlösung aus der Kapillare in Form eines Sprays bestehend aus kleinen, geladenen Tröpfchen, die einem Druck- und Potentialgradienten folgend durch einen senkrecht zur Flugrichtung stehenden Stickstoffstrom (*curtain gas*) in den Massenanalysator des Massenspektrometers wandern. Während dieser Wanderung werden die Tröpfchen durch Lösungsmittelverdunstung und „Coulomb-explosionen“ kleiner und kleiner¹⁴⁸⁻¹⁵⁰. Für den Übergang der Analytmoleküle in die Gasphase existieren zwei Theorien: zum einen die *single ion in droplet* Theorie von F. Röllgen nach der die völlig desolvatisierten einzelnen Ionen durch Kollision mit Stickstoffmolekülen am Übergang zum Massenspektrometer entstehen¹⁵¹ und zum anderen die *Ionenemissionstheorie* von Iribane und Thomson bei der die direkte Emission von Ionen aus hochgeladenen Tröpfchen erfolgt¹⁵². Das Versprühen

der Analytlösung kann zudem durch ein *nebulizer gas*, welches koaxial an der Kapillare entlang geführt wird, erleichtert werden. Charakteristisch für die durch Elektrospray erzeugten Ionen ist das Auftreten von unterschiedlichen Ladungszuständen einer Molekülart. Da Massenspektrometer nach m/z auflösen, können auch hochmolekulare Verbindungen gemessen werden, wenn sie mehrfach geladen sind. Diese bilden dann im Spektrum eine Reihe von Signalen mit $m/z = (M + nH^+)/n$ mit n -Werten von 1 bis zur maximalen Ladungszahl. Die Massenanalyse der Ionen erfolgt hierbei in der Regel durch Quadrupol-, Ionenfallen-, Flugzeit- (time of flight, TOF) oder *Fourier transform ion cyclotron resonance* (FTICR)-Massenspektrometer.

Die Messung der in dieser Arbeit beschriebenen Proben erfolgte an einem Q-ToF-Massenspektrometer (Micromass, Manchester), welches ein „Hybrid-Quadrupol-ToF-Massenspektrometer“ ist. Dieses Gerät besteht aus zwei funktionellen Einheiten, MS1 und MS2 (siehe Abb. 2.2). Die an der Z-Spray-Ionenquelle durch Elektrospray gebildeten Ionen gelangen durch die unabhängig evakuierte Ionenoptik in den Quadrupol-Analysator MS1. Im konventionellen MS-Experiment werden hier alle primär vorhandenen Ionen durch den Quadrupol-Analysator in die Hexapol-Kollisionszelle gelassen, die argonfrei unter Hochvakuum steht. Im Falle einer Fragmentierung dient der MS1 dazu, Ionen eines vorgegebenen m/z -Wertes auszuwählen und in die Kollisionszelle zu führen. Hier befindet sich während der Fragmentierung (Tandem-MS-Experiment) ein inertes Gas, z.B. Argon, gegen welches die Ionen stoßen und dabei fragmentieren (*collisionally induced decomposition*, CID). Für eine effektive Fragmentierung ist jedoch, je nach Druckverhältnissen, Typ des Kollisionsgases sowie Molekülzusammensetzung und Ladungszustand eine zusätzliche Beschleunigungsspannung (Kollisionsspannung, 20-60 V) kurz vor der Stoßaktivierung notwendig¹⁵³⁻¹⁵⁵. Im Folgenden fokussiert eine Hexapol-Transferlinse den Ionenstrahl auf den „Pusher“, der mit maximaler Frequenz von 20 kHz den Ionenstrahl in Richtung des orthogonal angeordneten Reflektrons ablenkt. Dieses Reflektron-ToF-Massenspektrometer (MS2) stellt den analytischen Teil des Gerätes dar. Am Detektor werden über die Flugzeitdifferenz zwischen Pusher-Aktivierung und Eintreffen der Ionen auf dem Detektor (*multi channel plate*, MCP) die m/z -Werte ermittelt.



MCP: Multi channel plate detector, RF-Linse: Radio-frequency-Linse

Abbildung 2.2 Schematischer Aufbau des ESI-Q-Tof-Massenspektrometers (Q-Tof Handbuch der Firma Micromass).

Die maximale Auflösung des Geräts beträgt $R = m/\Delta m \geq 5000$, wobei Δm für die Halbwertsbreite (*full width at half maximum*, FWHM) eines Peaks steht. Der analysierbare Massenbereich liegt zwischen 2 und 4000 Da. Hier sei jedoch daran erinnert, dass aufgrund der Mehrfachladung der auftretenden Ionen sehr viel größere Moleküle gemessen werden können.

Zur Optimierung des Ionenstroms können am Punktdetektor (Photomultiplier, Dynolite™) die Ionen, die aus dem ersten Teil des Gerätes kommen (MS1), analysiert werden.

Die Steuerung des verwendeten Q-Tof-Massenspektrometers erfolgt über die PC-Software MassLynx 4.0, über die auch die Datenaufnahme und Prozessierung erfolgt.

Im Bereich der Peptid und Proteinanalytik hat sich eine spezielle Ausführung der *offline* Elektrosprayionisation, die Nanospraytechnik, durchgesetzt¹⁵⁶. Hierbei werden platinbedampfte ausgezogene Glaskapillaren (Proxeon) verwendet, die mit 0,5-3,0 μl Probe befüllt werden und durch die sehr geringe Flussraten (20 bis 50 nl pro Minute) erzielt werden können. Da der Ionenstrom im Elektrosprayprozess mit der Probenkonzentration korreliert und nicht mit dem versprühten Lösungsmittelvolumen pro Zeit, erweist sich diese Methode gegenüber der herkömmlichen Elektronenspray-Ionisierung (Flussraten von 5-50 $\mu\text{l}/\text{min}$ bis zu 1 ml/min) als höchst sensitiv. Eine differenzielle Quantifizierung modifizierter Peptide konnte hierbei anhand von Signalintensitäten ermittelt werden.

Die Identifizierung von Peptiden, als zentrale Aufgabe dieser Arbeit, ergibt sich durch die Interpretation der CID-MSMS-Spektren. Die Produkt-Ionen, die während einer solchen Peptidfragmentierung auftreten, resultieren bevorzugt aus Brüchen des Peptidrückgrats, ein Mechanismus, der inzwischen als gut verstanden gilt¹⁵⁷⁻¹⁵⁹. In Abbildung 2.3 sind die häufigsten Fragmentierungsprodukte sowie ihre Nomenklatur dargestellt^{160,161}. Hierbei wird zwischen den positiv geladenen Produkt-Ionen die noch den N-Terminus tragen (a-, b-, c-Ionen) und solchen, die den C-Terminus (x, y, z) des Vorläufer-Ions besitzen unterschieden. Von all diesen Ionen, werden b- und y-Ionen gewöhnlich mit der höchsten Intensität detektiert. Das a Ion, welches ebenfalls vergleichsweise häufig auftritt, wird aus dem korrespondierenden b Ion durch Verlust von Kohlenmonoxid (CO: $\Delta m = -28$ Da) gebildet. Zudem treten begleitende Serien mit Abständen von $\Delta m = -18$ Da (Verlust von Wasser bei S, T, D, E), $\Delta m = -17$ Da (Verlust von Ammoniak bei Q, K, R) und $\Delta m = -64$ Da (Verlust von Methylsulfensäure bei oxidiertem M) auf. Die Gegenwart von spezifischen Aminosäuren wie F oder H in einem Peptid kann durch entsprechende Immonium-Ionen angezeigt werden, die sich im niedrigen Massenbereich befinden ($m/z < 200$). Ein Immonium-Ion entsteht durch eine Bruchkombination des a-Typs und des y-Typs. In Tabelle 2.5 sind die Massen der üblichen Aminosäurereste und Immonium-Ionen aufgelistet. Schließlich können zudem interne Fragmente auftreten, die bei zwei Brüchen des Peptidrückgrats in einem Molekül entstehen. All diese Informationen helfen bei der Interpretation eines Fragmentspektrums und letztendlich bei der Identifizierung der Peptidsequenz.

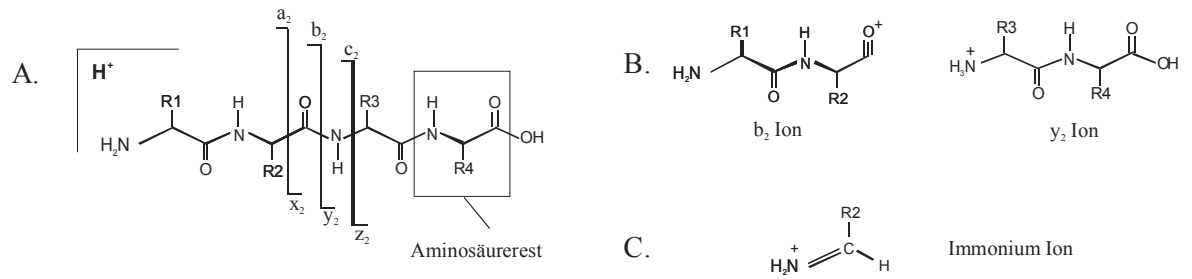


Abbildung 2.3 Nomenklatur der Peptidfragment-Ionen. (A) Nomenklatur der Peptidfragment-Ionen entstanden aus Brüchen des Peptidrückgrats. (B) Vereinfachte Struktur für b_2 - und y_2 -Ionen (speziell im Fall des b_2 Ions wird eine zyklisches Oxazol beschrieben¹⁵⁵). (C) Immonium-Ion des zweiten Aminosäurerestes.

Tabelle 2.5 Massen der üblichen Aminosäurereste und Immonium-Ionen

Aminosäurerest	3- Buchstaben Code	1- Buchstaben Code	Masse	
			Aminosäure Rest	Immonium Ion ^a
Alanin	Ala	A	71	44
Arginin	Arg	R	156	129
Asparagin	Asn	N	114	87
Aspartat	Asp	D	115	88
Cystein	Cys	C	103	76
Glutamat	Glu	E	129	102
Glutamin	Gln	Q	128	101
Glycin	Gly	G	57	30
Histidin	His	H	137	110
Isoleucin	Ile	I	113	86
Leucin	Leu	L	113	86
Lysin	Lys	K	128	101
Methionin	Met	M	131	104
Phenylalanin	Phe	F	147	120
Prolin	Pro	P	97	70
Serin	Ser	S	87	60
Threonin	Thr	T	101	74
Tryptophan	Trp	W	186	159
Tyrosin	Tyr	Y	163	136
Valine	Val	V	99	72

^a Fettdruck steht für starke Signale

Die vollständige Identifizierung unbekannter natürlicher Peptide („*de novo*“) und ihrer zugehörigen Quellproteine direkt anhand einer manuellen Auswertung von Tandem-MS-Spektren, ist sowohl komplex als auch sehr zeitaufwendig. Die Identifizierung eines kurzen Sequenzabschnitts von 3 bis 5 Aminosäuren kombiniert mit der Gesamtmasse des Pep-

tids reicht jedoch schon häufig aus, um mit speziellen Programmen, die im World Wide Web (www) frei verfügbar sind, verschiedene Protein- und Nukleotid-Datenbanken durchsuchen zu lassen, und so eine Peptidsequenz und ihre Zuordnung zum Quellprotein zu ermitteln. Eine eindeutige Verifizierung einer Sequenz kann schließlich anhand des Fragmentspektrums des analogen synthetischen Peptids erfolgen.

2.3.2 High performance liquid chromatography (HPLC)

2.3.2.1 Offline HPLC (SMART)

Das Zentrikonfiltrat bzw. die darin enthaltenen MHC-Peptide (2.2.5.4) wurden zur Analyse über ein Microbore-HPLC-System (SMART-System, Amersham) aufgetrennt. Das verwendete System enthielt neben einer *reversed-phase*-Säule (μ RP SC C2/C18 2,1/10-Säule, Säulendimension 100 x 2,1 mm, Amersham) einen Fraktionsensammler, der im Zeitfraktionierungsmodus (1 min) eingesetzt wurde. Über eine 500 μ l-Probenschleife konnte das gesamte bzw. reduzierte Zentrikonfiltrat aufgetragen werden. Die Elution der Peptide erfolgte bei einer Flussrate von 150 μ l/min unter Verwendung des folgenden Gradienten:

Tabelle 2.6 Gradient für Reversed-Phase-HPLC des Peptidgemischs im Zentrikonfiltrat; Lösungsmittel A: 0,1% TFA (v/v) in H₂O, Lösungsmittel B: 0,08% TFA (v/v) in 80% Acetonitril/H₂O.

Zeit [min]	Konzentration B [%]
0	10
5	10
25	20
45	40
55	60
60	100
65	100

Die erhaltenen HPLC-Fractionen wurden im Anschluss bei -80°C eingefroren und kurz vor der *offline* Nanoflow-MS-Analyse in der Vakuumzentrifuge bis zur Trockne reduziert und anschließend in 5 bis 10 μ l MS-geeignetem Lösungsmittel aufgenommen (50% Methanol/Wasser (v/v), 1% Ameisensäure).

2.3.2.2 *Online* LC-MS-Kopplung

Synthetische als auch komplexe natürliche Peptidmischungen wurden mit dem μ Kapillar-LC-System Ultimate der Firma Dionex aufgetrennt und im direkt gekoppelten ESI-Massenspektrometer (2.3.1.2) analysiert.

Das Ultimate HPLC-System ist für sehr geringe Flussraten und kleinste Probenmengen ausgelegt und wurde direkt über die Kapillarsäule mit der ESI-Quelle des Massenspektrometers verbunden. Zur Elektrospray-Ionisierung wurden in der ESI-Quelle goldbeschichtete Glaskapillaren (360/20 μ m OD/ID Kapillare, 10 μ m ID Auslassöffnung, PicoTip, New Objective) verwendet. Diese Anordnung ermöglicht eine kontinuierliche Aufnahme der Massenspektren aller von der LC eluierten Substanzen. Das hierbei stark reduzierte Elutionsvolumen führt zudem zu einer stark erhöhten Konzentration der Peptide im Vergleich zur *offline* Nanospray-MS-Analyse, die sich an eine SMART-HPLC-Auftrennung anschließt und führt somit zu einer erheblich höheren Sensitivität.

Das verwendete μ kapillar-LC-Pumpensystem (Ultimate, Dionex) wurde mit einer Flussrate von etwa 150 bis 200 μ l/min betrieben. Ein integriertes Splitsystem verringerte den Fluss auf ca. 300 nl/min. Die Probe mit einem Volumen bis zu 150 μ l wurde in eine 200 μ l Probenschleife injiziert und über ein Pumpensystem (Applied Biosystems) mit einer Flussrate von 20 μ l/min auf eine Vorsäule (C18, 300 μ m, 10 mm, Dionex) zur Volumenreduktion und Entsalzung geladen. Nach dem Ladeprozess wurde die Vorsäule für die Peptidtrennung in den Fluss zur *fused-silica*-Mikrokapillarsäule (5 μ m C18-Material, 75 μ m ID x 250 mm) geschaltet. Für den binären Gradienten wurden folgende Lösungsmittel eingesetzt: A: 4 mM NH_4Ac in H_2O und B: 2 mM NH_4Ac in 80% Acetonitril; 20% H_2O , beide Lösungen wurden mit Ameisensäure auf pH 3 eingestellt, da sich die sonst übliche TFA negativ auf die Ionisierung im Massenspektrometer auswirkt^{162,163}. Nach 30 min Äquilibrierung und 30 min Ladezeit mit 15% Lösungsmittel B wurde ein 120-minütiger Gradient mit einer Steigung von 0,25 bis 0,35% B pro min gestartet.

Die Aufnahme der MS-Daten erfolgte mit einer Integrationszeit für den TOF Analysator von 1 s und einer Interscanverzögerung von 0,1 s. In Tandem-MS-Experimenten betrug die Integrationszeit des TOF Analysators 4 s mit der gleichen Interscanverzögerung. Fragmentierung der Vorläuferionen $[\text{M}+\text{H}]^+$ oder $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ erfolgte durch automatisches Umschalten zwischen dem MS und MSMS-Modus durch die in MassLynx 4.0 einstellbaren Parameter.

Differenzielle Quantifizierungen z.B. deuterierter und nicht-deuterierter Peptidspezies wurden anhand von relativen Signalintensitäten bzw. von Peakflächen ermittelt.

2.3.3 Sequenzanalyse durch Edman-Abbau

Die klassische Methode zur Bestimmung von Protein-/Peptidsequenzen ist der Edman-Abbau. Dieser zyklische Prozess besteht aus drei voneinander gut abgrenzbaren Schritten: Kupplung, Spaltung und Konvertierung und ist gut automatisierbar. Im ersten Schritt reagiert Phenylisothiocyanat bei milden alkalischen Bedingungen mit der N-terminalen Aminosäure des Proteins unter Bildung ihres Phenylthiocarbamoyl (PTC)-Addukts. Der zweite Schritt, die Spaltung, erfolgt durch eine Behandlung mit wasserfreier Trifluoressigsäure, wodurch der N-terminale Rest selektiv als Thiazolinon-Derivat abgespalten wird, ohne dass andere Peptidbindungen hydrolysiert werden. Der dritte Schritt beinhaltet die selektive Extraktion der Thiazolinon-Aminosäure mit einem organischen Lösungsmittel und die Konvertierung in das stabilere Phenylthiohydantoin (PTH)-Derivat durch eine Behandlung mit wässriger Säure. Die entstandene PTH-Aminosäure wird nun chromatographisch im Vergleich zu den Retentionszeiten einer Referenzprobe, die die PTH-Derivate aller bekannten Aminosäuren enthält, identifiziert und über die Peakhöhe der Absorption bei 269 nm quantifiziert.

Das in dieser Arbeit verwendete automatische Proteinsequenziergerät („Procise“ 494A Protein Sequencer, ABI) enthält eine spezielle C18-Säule (Spheri-5 PTH 5 μm , 220 x 2,1 mm; Perkin Elmer) zur Identifizierung und Quantifizierung

2.4 Biochemische und organisch-chemische Methoden

2.4.1 N-terminale Acetylierung von Peptiden

Zu 100 μl Peptidmischung (200 pmol bis 2 nmol) bzw. zu den aufkonzentrierten MHC-Liganden (2.2.5.5) in 50% Acetonitril/ H_2O (v/v) wurden 10 μl $^1\text{H}_6$ -Essigsäureanhydrid oder $^2\text{D}_6$ -Essigsäureanhydrid (50% v/v in Methanol) hinzugefügt. Nach einer Reaktionszeit von 15 min bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 1,1 μl Ameisensäure gestoppt. Nach dem Mischen der deuterierten und nicht-deuterierten Peptidspezies wurde das Gesamtvolumen 222 μl in der Vakuumzentrifuge auf ein Volumen von 50 μl reduziert. Anschließend wurde diese im Volumen reduzierte Peptidfraktion mit 300 μl

Wasser verdünnt und mittels *offline* HPLC, *High Performance Liquid Chromatography* aufgetrennt und weiter im MS quantitativ analysiert (2.3.2 und 2.3.1.2)

2.4.2 Guanidinylierung der ϵ -Aminogruppe der Lysinreste von Peptiden mit O-Methyl-Iso-Harnstoff-Hemisulfat

Der pH-Wert der Peptidmischungen (200 pmol bis 2 nmol) bzw. der isolierten MHC-Liganden (2.2.5.3) in Zitratpuffer (50 mM; pH 3,0) versetzt mit 0,25% Trifluoressigsäure (TFA) (v/v) wird mit 200 μ l NaOH (10 M) auf 10,5 eingestellt. Nach Zugabe von 1 ml einer frisch hergestellten O-Methyl-Iso-Harnstoff-Hemisulfat-Lösung (2,5 M in H₂O) wird die Mischung 10 min bei 65 °C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 200 μ l Ameisensäure gestoppt und die Proben sofort auf Eis gelagert.

2.4.3 Nicotinylierung der α -Aminogruppe von guanidinylierten Peptiden

Die guanidinylierten Peptide werden auf eine C-18-reversed-phase Microsäule geladen (Agilent Technologies hydrophobic 202-XGSXB) und mit 0,5 ml H₂O gewaschen. Die gebundenen Peptide werden anschließend modifiziert indem eine frisch angesetzte ¹H₄- oder ²D₄-NicNHS-esterlösung (2,2 mg/ml) in Natriumphosphatpuffer (50 mM; pH 8,5) langsam über die Säule geleitet wird. Dies wird noch einmal wiederholt bevor 1ml Hydroxylaminlösung (50%) auf die Säule gegeben wird, um die Nikotinylierung an Tyrosinresten zu hydrolysieren. Schließlich, nach einem Waschschrift mit H₂O, werden die Peptide mit 100 μ l Acetonitril/Wasserlösung (50% v/v) von der Säule eluiert.

2.4.4 Synthese von 1-([¹H₄/²D₄] Nikotinyloxy)-Succinimid-Ester

²D₄-Nikotinsäureethylester bzw. ¹H₄-Nikotinsäureethylester (5 g, 32,2 mmol) wird in Ethanol/Wasser (1:1, 32 ml) gelöst, Natriumhydroxid (1,53 g, 38,1 mmol) hinzugefügt und die Lösung unter Rückfluss über Nacht gekocht. Nach der Evaporation des Ethanol wird die Lösung mit Wasser (40 ml) und Diethylether (32 ml) extrahiert. Die wässrige Phase wird mit konzentrierter HCl neutralisiert und der pH auf 4-4,5 eingestellt. Das entstandene Präzipitat wird filtriert und mit kaltem Wasser und Ether gewaschen. Wässrige Waschlösungen und Mutterlauge werden vereinigt, auf pH 2,8 eingestellt und zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird resuspendiert in 1 N HCl (so wenig wie möglich) und auf pH

3,5 mit gesättigter NaOH eingestellt. Das resultierende Präzipitat wird filtriert und mit kaltem Wasser und Ether gewaschen. Vereinigung der Präzipitate ergab $^2\text{D}_4$ -Nikotinsäure in Form eines weißen Puders (3,11 g, 76%). Diese gewonnene $^2\text{D}_4$ -Nikotinsäure (3,11 g, 24,5 mmol) wird in trockenem CH_2Cl_2 (150 ml) suspendiert. N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimid hydrochlorid (EDC) (5,18 g, 27 mmol) und N-hydroxysuccinimid (3,53 g, 30,63 mmol) werden hinzugefügt und die entstandene Lösung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Diese Mischung wird mit gesättigter Natriumbicarbonat Lösung (75 ml) und Wasser (75 ml) extrahiert und die organische Phase getrocknet (Na_2SO_4). Vakuum-Evaporation des Lösungsmittels ergibt den $^1\text{H}_4/^2\text{D}_4$ -Nik-NHS-Ester (5,06 g, 92%). Reinheit und Struktur der Substanzen wird anhand von ^1H - and ^{13}C -NMR kontrolliert. Alle organischen Synthesen wurden von Steffen Weik vom Institut für Organische Chemie durchgeführt.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Bestimmung und Feinspezifizierung von MHC-Peptid-Motiven anhand von Einzelliganden

3.1.1 Bestimmung des WLA.1-1-spezifischen Peptidmotivs des amerikanischen Waldmurmeltiers (*Marmota monax*) für T-Zell-Epitopvorhersagen in WHV-Infektionen.

Die Infektion des amerikanischen Waldmurmeltiers (Woodchuck) mit „seinem“ Hepatitis-B-Virus (WHV) ist der humanen Hepatitis-B-Virus- (HBV) Infektion sehr ähnlich und das einzige Tiermodell zur Untersuchung humaner HBV-Infektionen. Um WHV-induzierte T-Zellantworten vorhersagen und verifizieren zu können, muss zunächst das MHC-Motiv des Tiermodells bestimmt werden. In unserem Fall handelt es sich um das Peptidmotiv des dominanten Woodchuck-MHC-Klasse-I-Moleküls WLA.1-1. Dazu wurden WLA.1-1-transfizierte P815-Zellen in der Arbeitsgruppe von Prof. Roggendorf (Essen) auf eine Zellzahl von 10^{11} expandiert und ihre MHC-Expression mit dem unter anderem für WLA.1-1-spezifischen monoklonalen Antikörper (mAk) pT85 im FACS-Assay getestet (Tabelle 3.1) (durchgeführt von P. Hrstic). Die relativ große Zellzahl, die für die Immunpräzipitation verwendet wurde, begründet sich auf der vergleichsweise schwachen WLA.1-1-Expression der P815 transfizierten-Zellen.

Tabelle 3.1 Mittlere Fluoreszenzintensitäten (MFI) der P815 WLA.1-1-Transfektante und der Kontrollzelllinien im FACS-Assay.

Zelllinie	mAk	MFI
P815	pT85	24,6
P815 WLA.1-1	pT85	126,4
LCL721	W6/32	1731,2

Nach Immunpräzipitation mit dem mAk pT85, Peptidextraktion und Auftrennung der Peptide durch *offline* HPLC (SMART) konnten 14 natürliche WLA.1-1-Liganden massenspektrometrisch identifiziert werden (Tabelle 3.2). Die Sequenzanalyse von Einzelli-

ganden durch massenspektrometrische Analyse spielt eine wichtige Rolle bei der Bestimmung von Peptidmotiven. Wie in Tabelle 3.2 zu sehen, zeigen sich bei den Liganden in bestimmten Positionen Gesetzmäßigkeiten für die bindenden Peptide. So konnte mit Hilfe der identifizierten WLA.1-1-Liganden ein Peptidmotiv erstellt werden (Tabelle 3.3).

Tabelle 3.2 Massenspektrometrisch identifizierte WLA.1-1-Liganden.

MW [Da]	Sequenz ^a	Protein	Position
1046.6	AVLPRLHQL	Putative	118-126
910.5	GVLPNIQAV	Histone H2A1	116-124
1016.5	SVLEVSHVF	STAT3 interacting protein 1	4-12
851.4	SVLEVSHV	STAT3 interacting protein 1	4-11
940.4	SSFDGIIAM	Supressor of Ty 4	55-63
771.5	LSVAVAVI	Serotonin receptor	129-136
963.5	LSLNFEKI	EST	-
1119.6	SIFEHKIVF	EST	-
1157.6	SVRLPPITQF	EST	-
1003.6	STIRLLTSL	Matricin	457-465
1178.5	YIHYPLEPF	Imidazoline receptor I-1-like protein	91-99
1083.5	SVRDFLVTF	Tyrosine phosphatase cytoplasmic	507-515
1194.5	SVFEKYFQF	Putative	9-17
1086.6	GTLPATILTSL	RIKEN cDNA 1110001I24 gene	162-172

^aFettdruck: Ankeraminosäuren

Tabelle 3.3 MHC-Peptidmotiv des Waldmurmeltierallelprodukts WLA.1-1. Ankeraminosäuren sind durch Fettdruck hervorgehoben.

	Position								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ankeraminosäuren		V I S T							F I L M V
Bevorzugte Aminosäuren	S G L		L F M R	D E P	F N	I L T	T E H I	Q V A S	

Das WLA.1-1 Motiv zeichnet sich durch die mit kleinen hydrophoben (V, I) bzw. hydrophil-neutralen Aminosäuren (S, T) besetzte Ankerposition 2 und die mit mittleren bis großen hydrophoben Aminosäuren (F, I, L, M, V) besetzte Ankerposition 9 aus. Daneben zeigt sich eine leichte Bevorzugung bestimmter Aminosäuren in Nichtankerpositionen wie in Tabelle 3.3 dargestellt.

Die im Motiv enthaltenen Informationen werden im Folgenden in eine Matrix umgesetzt (Tabelle 3.4), welche die Vorhersage von Liganden, die an das WLA.1-1-Molekül binden ermöglicht. Diese Art von Matrix wird in der Datenbank SYFPEITHI für Epitopvorhersagen verwendet¹⁶⁴. Bei der Vorhersage werden, basierend auf experimenteller Erfahrung bei Epitopvorhersagen die tatsächlich relevanten Peptide unter den bestbewerteten 2% aller Peptide erwartet.

Tabelle 3.4 Matrix zur Vorhersage von WLA.1-1-Nonamer-Peptiden, wie üblicherweise in der Datenbank-SYFPEITHI verwendet. Ankeramino­säuren sind hervorgehoben.

Aminosäure	Code	Position								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Alanin	A	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Cystein	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aspartat	D	0	0	0	3	0	0	0	0	0
Glutamat	E	0	0	0	3	0	0	1	0	0
Phenylalanin	F	0	0	2	0	1	0	0	0	10
Glycin	G	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Histidin	H	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Isoleucin	I	0	4	0	0	0	2	1	0	8
Lysin	K	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leucin	L	1	0	3	0	0	2	0	0	8
Methionin	M	0	0	1	0	0	0	0	0	6
Asparagin	N	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Prolin	P	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Glutamin	Q	0	0	0	0	0	0	0	2	0
Arginin	R	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Serin	S	4	4	0	0	0	0	0	1	0
Threonin	T	0	4	0	0	0	1	2	0	0
Valin	V	0	6	0	0	0	0	0	2	6
Tryptophan	W	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Undefiniert	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tyrosin	Y	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Die vier immundominanten Hepatitis-B-Virusproteine Core Antigen, Polymerase, Surface Antigen und X Antigen wurden mit der erstellten Matrix analysiert. Für T-Zellstudien wurden die Peptide mit den höchsten Scores synthetisiert (Tabelle 3.5).

Tabelle 3.5 WLA.1-1 Motivpeptide aus vier immundominanten WHV-Proteinen für T-Zell-Studien.

1. Core Antigen			2. Surface Antigen		
Position	Score	Sequenz	Position	Score	Sequenz
141	30	STLPEHTVI	407	25	SILPPFIPI
114	27	TVQEFLVSF	287	24	LVLLLCLIF
11	22	SSYQLLNFL	416	23	FVLFFLIWV
			412	19	FIPIFVLFF

3. Polymerase			4. X Antigen		
Position	Score	Sequenz	Positi-	Score	Sequenz
462	26	LSLDVSAAF	79	25	RTMDSTVNF
592	26	RTSEHLTAI	120	25	SIDPRLSIF

In der Gruppe von Prof. Roggendorf (Essen) wird zurzeit das Blut von WHV-infizierten Waldmurmeltieren auf spezifische CD8-T-Zellantworten gegen die synthetisch hergestellten Peptide untersucht.

3.1.2 Erstellung einer optimierten HLA-A*2601-Ligandenvorhersage für die SYFPEITHI-Datenbank mittels natürlicher HLA-Liganden

Ein grobes Motiv von HLA-A*2601 wurde bereits vor einigen Jahren aufgrund von Poolsequenzierung und nur drei Einzelliganden in unserer Gruppe ermittelt¹⁶⁵. Die daraus resultierende Vorhersage für HLA-A*2601 wurde jedoch aufgrund des Qualitätsanspruchs an die SYFPEITHI-Datenbank als nicht verlässlich eingestuft und war deshalb *online* nicht verfügbar. Das Ziel dieser neuen HLA-A*2601-Untersuchungen war nun, anhand einer großen Anzahl natürlicher Einzelliganden eine Bestätigung und Verfeinerung des Motivs zu erreichen. Speziell sollte der Frage nachgegangen werden, ob die dominanten sauren Aminosäuren in Position 1 eine Definition als Hauptanker oder nur als Hilfsanker erlauben. Die Verfeinerung eines Motivs zeigt sich, neben der Bestätigung von Ankeraminosäuren, speziell in einer differenzierten Beurteilung der Aminosäuren in Nichtankerpositionen. Hierzu wurden von MGAR-Zellen extrahierte natürliche HLA-A*2601-Liganden durch *offline* ESI-MS-Analyse identifiziert (Tab. 3.6).

Tabelle 3.6 Massenspektrometrisch identifizierte HLA-A*2601-Liganden.

Ankeraminosäuren sind durch Fettdruck hervorgehoben.

Sequenz	Quellprotein	MHC
ETIDVHSGYDI	C-4 methyl sterol oxidase	A*26
ETFNTPAM(ox)Y	Beta actin	A*26
EVISSVSEL	KIAA0301	A*26
SVIDSaelQAY	DNA-dependent protein kinase	A*26
TTIDIGVKY	calponin 3	A*26
ETADTLM(ox)GLRY	Glucosamine-fruc.-6-p. aminotransferase	A*26
EVQEIVSVY	KIAA0746 protein	A*26
EVLEYNAIGGKY	Farnesyl diphosphate synthase	A*26
EVFTGGIGSY	Topoisomerase-related function protein	A*26
ETIRNIPHL	hypothetical protein FLJ10460	A*26
EVIPPYYSY	TRAF and TNF receptor associated protein	A*26
EVELLARY	DNA directed RNA polymerase II Polyp. E	A*26
DVIERVIQY	IDN 3 protein	A*26
EVFQTKIQEF	Mitotic checkpoint protein	A*26
DSFPM(ox)EIRQY	ISGF-3	A*26
EIIKIIGKY	KIAA0826	A*26
ETFPGVtAL	Similar to MHC class I-like sequence	A*26
EVVSEPFrsF	26S Proteasome subunit P97	A*26
EVNGLISM(ox)Y	U5 smRNP-specific protein	A*26
DIPENVdITL	Ribosomal protein L9	A*26
DTISPTLGF	ADP-ribosylation factor like 2	A*26
EVVENLLNY	Glucocorticoid receptor	A*26
SVIDIINKY	Phospholipase C-L2	A*26
DTLAHVLYY	DNA-directed RNA polymerase II 140 kDa	A*26
DVVQELLKY	KIAA1453 protein	A*26
EIKDILIQY	40S ribosomal protein S16	A*26
SVIEAVAHF	KIAA0349	A*26
SVVEAIPEF	KIAA0386	A*26
EVYPFgIVGM	NRAS-related protein	A*26
DVIESVNLL	Adapter related protein complex 1	A*26
DLIKGISV	TAR DNA binding protein	A*26

Anhand der neu identifizierten 31 Einzelliganden wurde ein verfeinertes Motiv erstellt. Es zeigte sich, wie aufgrund des vorläufig ermittelten Motivs vermutet, dass die Position 1 in diesem HLA-Allel fast ausschließlich (bei 26 von 31 Liganden) von sauren Aminosäuren, wie Glutamat und Aspartat, besetzt wird. Daher wurde die Position 1 als Ankerposition definiert. In Position 2 wurden die Aminosäuren Valin und Threonin als Ankeraminosäuren ermittelt. Die hydrophoben Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Leucin besetzen

Die aus den Liganden ermittelten und im Motiv zusammengefassten Informationen wurden im Folgenden in je eine Matrix für Nonamer- und Dekamer-Peptide umgesetzt (Tab. 3.8). Diese Matrizes dienen als Grundlage für die aktuelle Epitopvorhersage für HLA-A*2601 Liganden in der SYFPEITHI Datenbank. Mit den neuen Matrizes können nun auch für HLA-A*2601 zuverlässig Liganden und somit potentielle T-Zellepitope vorhergesagt werden. Auch hierbei gilt, dass die tatsächlich relevanten Peptide unter den bestbewerteten 2% aller vorhergesagten Peptide erwartet werden.

3.1.3 Motivverfeinerung der Allelprodukte HLA-A*24, -B*0702 und -B*4402 durch natürliche Ligandenanalyse.

Die unter 3.1.2 beschriebene Art der Motivverfeinerung und Vorhersageoptimierung wurde des Weiteren für folgende Allele anhand von *offline* massenspektrometrisch identifizierten Einzelliganden nach Immunpräzipitation von verschiedenen Tumor bzw. Zelllinien durchgeführt: HLA-A*24 (Tumoriganden), HLA-B*0702 (JY-Zelllinie), HLA-B*4402 (LCL721.221-B*4402 Zelllinie/Tumoriganden). Einzelliganden sind nicht gezeigt, eine Zusammenfassung über Anzahl und Herkunft der Liganden ist in Tabelle 3.9 zu sehen. Alle verfeinerten Motive werden in der SYFPEITHI-Datenbank zur Epitopvorhersage zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3.9 HLA-Allel-Restriktion, Ligandenherkunft und -anzahl der in der Motivverfeinerung eingesetzten massenspektrometrisch identifizierten Peptide.

HLA-Allel	Tumor/Zelllinie	Liganden
		Anzahl
A*24	CCA60	12
	MET2	12
B*0702	JY-Zellen	28
B*4402	LCL721.221-B*4402	20
	CCA60	8

Interessanter Weise konnte im Fall der JY-Zellen nach Immunpräzipitation der HLA-Moleküle neben zahlreichen aus üblichen zytosolischen Proteinen stammenden Liganden das Peptid FPSLREAAL massenspektrometrisch identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um eine Sequenz aus dem als tumorassoziiert geltenden Protein MAGE-1 (*Melanoma*

associated antigen 1). In weiterführenden Studien konnten mittels *high density bead* Stimulation niedrig-avide zytotoxische-T-Lymphozyten (CTL) gegen das Peptid induziert werden (Tetramerfärbung). Für diese antigenspezifischen CTLs konnte Funktionalität bei peptidbeladenen JY-Zellen sowohl anhand eines Zytotoxizitätstest als auch in Form von induzierter intrazellulärer IFN- γ und TNF- α Produktion gezeigt werden. Unbeladene JY-Zellen hingegen wurden im Zytotoxizitätstest von den niedrig-aviden CTLs nicht lysiert (durchgeführt von Steffen Walter).

3.2 Suche nach vorhergesagten krankheitsassoziierten MHC-Klasse-I-Epitopen

3.2.1 Suche nach HLA-Klasse-I-Epitopen aus dem *Merozoite surface protein 1* des Malaria-Erregers *Plasmodium falciparum*.

Die Malaria ist die häufigste Tropenkrankheit, an der nach Schätzungen der WHO weltweit mehr als 300 Millionen Menschen jährlich erkranken. Es gibt insgesamt vier verschiedene Malariaerreger, die unterschiedliche Formen der Erkrankung hervorrufen. Die gefährlichste Form ist die Malaria tropica, die durch den Erreger *Plasmodium falciparum* ausgelöst wird und unbehandelt in ca. 30% der Fälle zum Tod führt. Eine Impfung existiert derzeit noch nicht. Zur Prophylaxe gehören zum einen die Vermeidung von Mückenstichen sowie zum anderen die Einnahme verschiedener Medikamente wie z.B. Chloroquin. Ein Problem dieser Behandlung ist die weltweite Verbreitung insbesondere chloroquinresistenter Malariaerreger.

Bei *Plasmodium falciparum* entwickeln sich alle Schizonten (Zwischenstufe nach Sporozoiten Infektion der Leberzellen durch den Anopholes-Mückenstich) in den Leberzellen zu Merozoiten. Diese werden nach Zerstörung der Leberzelle freigesetzt und gelangen in das Blut, wo sie Erythrozyten befallen.

Um infizierte Zellen auf der Stufe der Merozoiten-Vermehrung angreifen zu können, wurde deshalb als Zielmolekül für eine Immunantwort das *Merozoite Surface Protein 1* ausgewählt, aus dem in diesem Projekt HLA-A*0201-bindende Peptide für eine potenzielle CD8⁺-T-Zellantwort identifiziert werden sollten.

Tabelle 3.10 HLA-A*0201-Motivpeptide aus dem *Plasmodium falciparum* MSP1₂₀₋₈₉₂
(*Merozoite surface protein*).

Score	Sequenz ^a	Position	[M+H] ⁺	[M+2H] ²⁺
30	KLLDKINEI	313	1085,65	543,33
30	KLKEFIPKV	674	1101,70	551,35
29	LLIKKIEDL	624	1084,69	542,85
29	SLEVSDIVKL	609	1102,63	551,82
28	LLRAKLNDV	183	1041,63	521,32
28	SMDQKLLEV	804	1062,54	531,77
27	YLIDGYEEI	162	1114,52	557,76
27	VLLIKKIEDL	623	1183,76	592,38
26	EINELLYKL	169	1134,63	567,82
26	VLEKRIDTL	297	1086,64	543,82
26	SLFTDPLEL	363	1034,53	517,77
26	YLREKNKKV	374	1177,70	589,35
26	YLIVLKKEV	664	1104,70	552,85
26	VLKKEVDKL	667	1071,67	536,34
26	DLLRAKLNDV	182	1156,66	578,83
26	SVLEKRIDTL	296	1173,68	587,34
25	GLEADIKKL	575	986,58	493,79
25	SMNNDLQHL	848	1071,48	536,24
25	SLYDSMNNDL	844	1171,49	586,25
24	KLKKALSYL	544	1063,68	532,34
24	EMIYYLHKL	864	1209,63	605,32
24	ALSYLEDYSL	548	1173,56	587,28
24	KLQVQKVLLI	617	1181,75	591,38
24	IVLKKEVDKL	666	1184,54	592,88
24	NLTPEEENEL	814	1187,54	594,27
23	ELVKKLEAL	8	1042,64	521,82
23	SLFQKEKMV	25	1109,59	555,30
23	TTIANINEL	243	988,52	494,76
23	KLYQAQYDL	273	1141,58	571,29
23	TLLDKNKKI	335	1072,66	536,83
23	KLQVQKVLL	617	1068,71	534,86
23	VLSSITQPL	692	957,55	479,28
23	SLFQKEKMVL	25	1222,68	611,84
23	KIRANELDVL	204	1170,68	585,84
23	KTIKFNIDSL	355	1178,67	589,84
23	LMNPHTKEKI	431	1210,65	605,83
23	KILEKNFKGL	593	1189,72	595,36
23	DIVKLQVQKV	614	1169,72	585,36

*Fettdruck grau unterlegt: massenspektrometrisch identifiziertes Epitop

Hierzu wurden adhärenzte HLA-A*0201-transfizierte HeLa-Zellen mit dem N-terminalen Teil des *Merozoite Surface Protein 1* (MSP1₂₀₋₈₉₂) von *Plasmodium falciparum* kotransfiziert, dessen Expression durch ein Doxycyclin-Induktionssystem reguliert wurde (hergestellt von Irina Idler, Heidelberg).

Diese Zellen wurden in Rollerflaschen bis auf eine Zellzahl von $2,8 \times 10^{10}$ expandiert. Nach Immunpräzipitation der HLA-Moleküle mit 10 mg des HLA-A, -B, -C spezifischen monoklonalen Antikörpers W6/32 (durchgeführt von Patricia Hrستیć) wurde gezielt nach den für HLA-A*0201-vorhergesagten Liganden aus MSP1₂₀₋₈₉₂ gesucht (Tabelle 3.10).

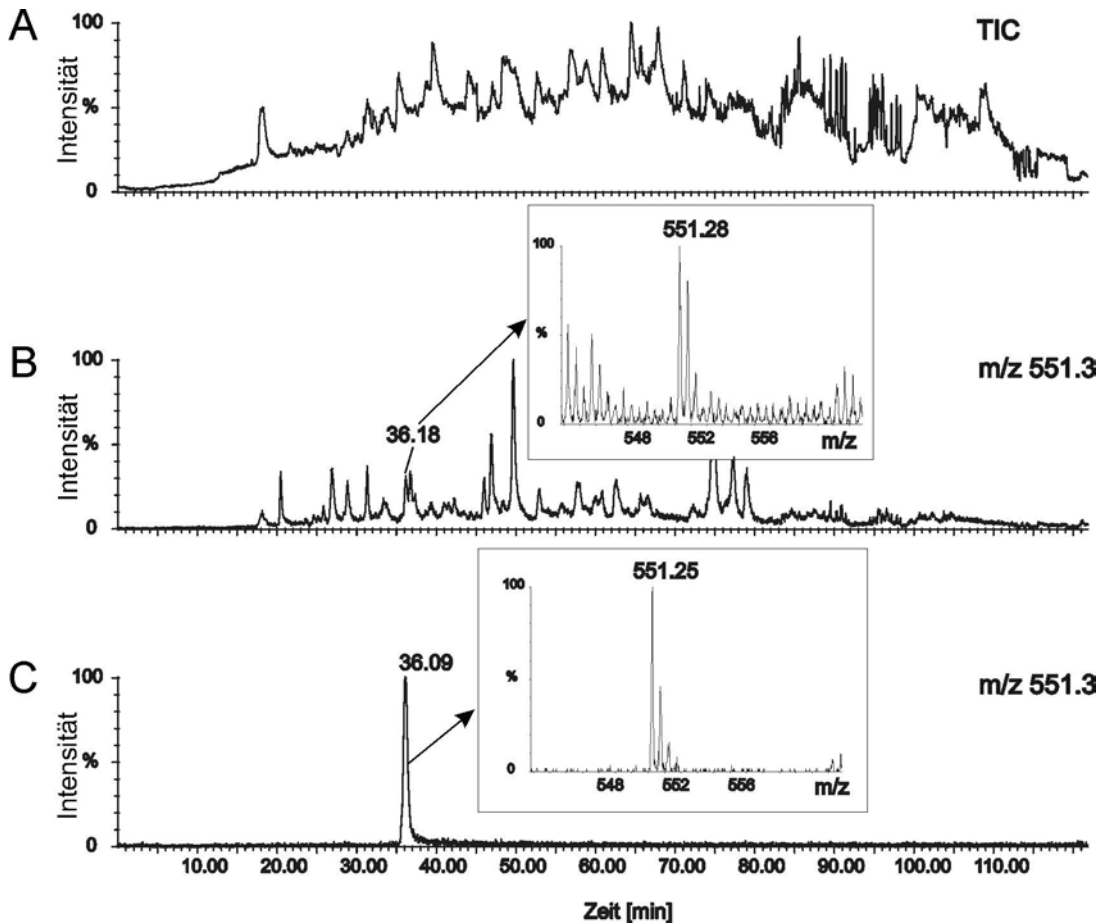


Abbildung 3.1 Identifizierung des vorhergesagten HLA-A*0201-Liganden MSP1₆₇₄₋₆₈₂ in einer von HeLa-MSP1₂₀₋₈₉₂-transfizierten Zellen extrahierten Peptidmischung. (A) Chromatogramm des totalen Ionenstroms (TIC) der natürlichen Peptidmischung. (B) Massenchromatogramm für m/z 551,3 der natürlichen Peptidmischung. Ein Signal bei 36,18 min koeluiert mit dem in (C) dargestellten synthetischen Peptid KLKEFIPKV mit m/z = 551,3.

Die Suche nach den vorhergesagten MSP1₂₀₋₈₉₂-Liganden erfolgte in Aliquots der extrahierten Peptide von etwa 7×10^9 MSP1₂₀₋₈₉₂-transfizierten HeLa-Zellen mit dem *online* LC-ESI-MS-System. In Abbildung 3.1. (A) ist das Chromatogramm des totalen Ionenstroms (TIC) und das Massenchromatogramm für m/z 551,3 der natürlichen Probe (B) im Vergleich zum Massenchromatogramm (m/z 551,3) des synthetischen KLKEFIPKV darge-

stellt (C). Diese Analyse der natürlichen Peptide zeigt Koelution des vorhergesagten Peptids MSP1₆₇₄₋₆₈₂ (KLKEFIPKV) bei einer Retentionszeit von etwa 36 min.

Im folgenden *online* Tandem-LC-MS Experiment wurde die aus MSP1₆₇₄₋₆₈₂ stammende Sequenz KLKEFIPKV sowohl für das synthetische (Abb. 3.2 A), als auch für das natürliche Peptid mit m/z 551,3 bei einer Retentionszeit von 36 min eindeutig bestätigt (Abb. 3.2 B). Aus den mehreren hundert aufgenommenen MSMS-Spektren konnten zudem in diesem Experiment zahlreiche weitere nicht aus MSP1 stammende natürliche HLA-A*0201-Liganden identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

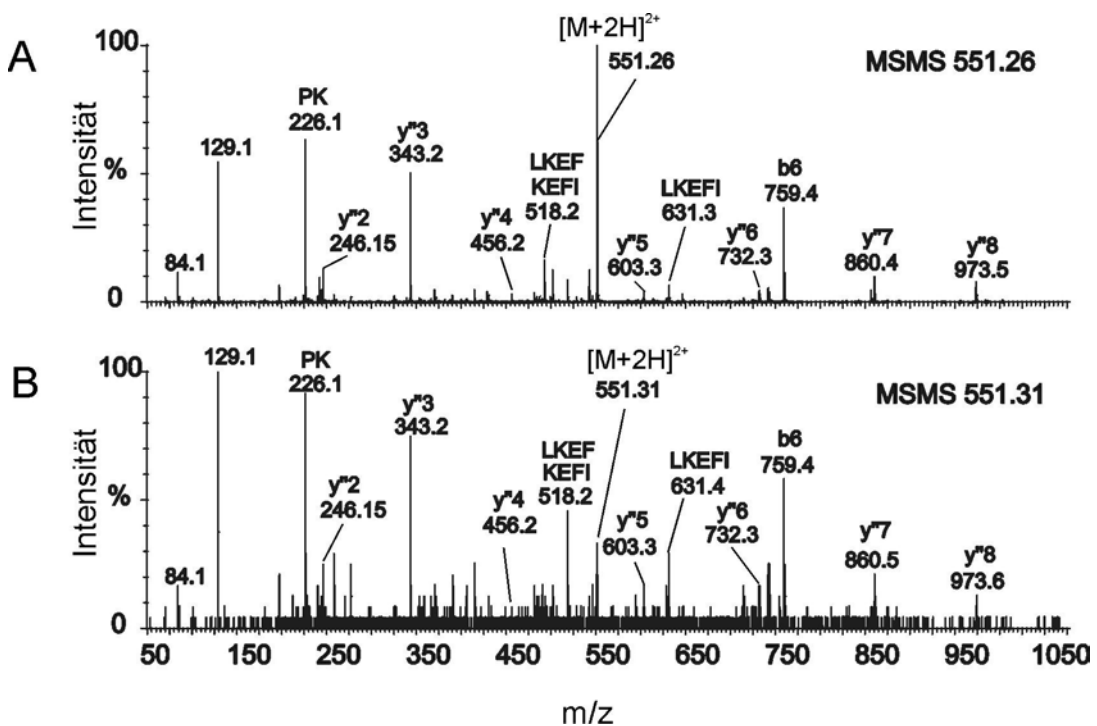


Abbildung 3.2 Identifizierung des vorhergesagten HLA-A*0201-Liganden MSP1₆₇₄₋₆₈₂ in einer von HeLa-MSP1₂₀₋₈₉₂ transfizierten Zellen extrahierten Peptidmischung. (A) Fragmentspektrum des synthetischen Peptids KLKEFIPKV mit $[M+2H]^{2+} = 551,3$ und einer Retentionszeit von 36,09 min. (B) Fragmentspektrum des aus der natürlichen Probe stammenden Peptids KLKEFIPKV der Masse $[M+2H]^{2+} = 551,3$ eluiert nach 36,18 min.

Bei einer quantitativen Betrachtung zeigte sich, dass der aus MSP1₂₀₋₈₉₂ stammende Ligand KLKEFIPKV eine etwa fünfzigfach schwächere Intensität im integrierten Massenchromatogramm im Vergleich zu dem sehr abundant auftretenden Peptid YLLPAIVHI aus dem *DEAD Box Protein 5* (DDX5) aufwies (Abb.3.3). Die relativ schwache Intensität des MSP1-Epitops, sogar in einem Modellsystem in dem das MSP1₆₇₄₋₆₈₂-Protein stark über-

reprimiert vorliegt, könnte die Tatsache erklären, dass bisher nur sehr wenige virale Epitope unter normalen physiologischen Bedingungen auf molekularer Ebene identifiziert werden konnten¹⁶⁶. Es ist sogar zu vermuten, dass das MSP1-Epitop in Zellen ohne Überexpressionssystem nicht detektierbar gewesen wäre.

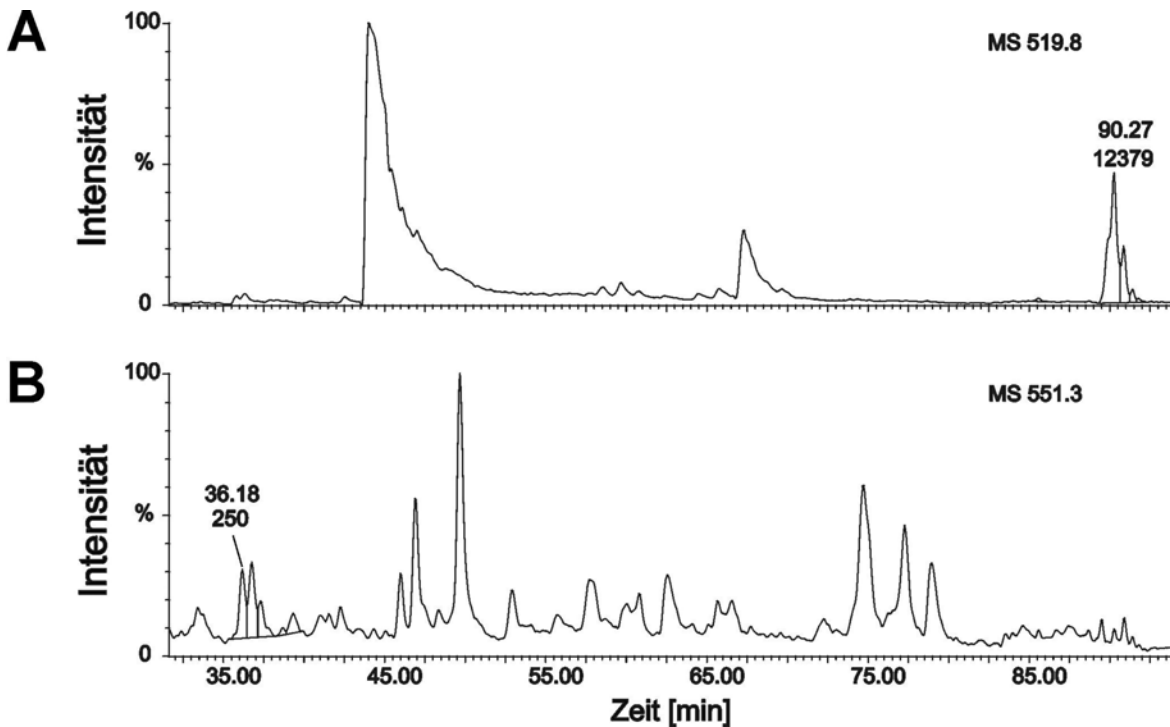


Abbildung 3.3 Quantifizierung des vorhergesagten HLA-A*0201-Liganden MSP1₆₇₄₋₆₈₂ im Vergleich zu dem abundant auftretenden DDX5₁₄₈₋₁₅₆ Liganden in einer von HeLa-MSP1₂₀₋₈₉₂-transfizierten Zellen extrahierten Peptidmischung. (A) Massenchromatogramm des abundanten DDX5₁₄₈₋₁₅₆ Peptids YLLPAIVHI ($[M+2H]^{2+} = 519,8$; Retentionszeit = 90,27 min) mit einer Peakfläche von 12379. (B) Massenchromatogramm des MSP1₆₇₄₋₆₈₂-Peptids KLKEFIPKV ($[M+2H]^{2+} = 551,3$; Retentionszeit = 36,18 min) mit einer Peakfläche von 250.

Der neu identifizierte HLA-A*0201-Ligand KLKEFIPKV aus MSP1₂₀₋₈₉₂ von *Plasmodium falciparum* wurde synthetisiert und das HLA-A*0201-Tetramer für T-Zellstudien hergestellt. In nächster Zukunft soll mit Hilfe des synthetischen Peptids und des dazugehörigen Tetramers nach einer induzierbaren CD8⁺-T-Zellantwort gesucht werden (Bujard, Heidelberg; Pascolo, Tübingen).

3.2.2 Suche nach HLA-Klasse-I-Epitopen aus dem humanen Hepatitis-C-Virus (HCV)

Das Hepatitis-C-Virus ist ein RNA-Virus, das weltweit etwa 170 Millionen Menschen persistent infiziert. Nach akuter Infektion gibt es eine Anfangsperiode, während der sich die Langzeitentwicklung der Krankheit entscheidet. Es gibt starke Anzeichen auf eine zu diesem Zeitpunkt existierende zelluläre Immunantwort, an der sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺-T-Lymphozyten beteiligt sind. Ihre Wirksamkeit entscheidet über Erfolg oder Misserfolg bei der HCV-Eliminierung. Was jedoch letztendlich entscheidend ist für die Wirksamkeit, ist nicht bekannt. Der wichtigste Faktor ist aber wahrscheinlich die Epitopauswahl, welche durch den Wirts-MHC erfolgt. Zum Verständnis der Wirtsimmunität von HCV ist deshalb das detaillierte Wissen um die beteiligten Peptide in der T-Zellantwort von größter Bedeutung. Eine große Anzahl an HCV-Epitopen wurde bereits in der Literatur beschrieben, von denen jedoch keines bis heute auf molekularer Ebene nachgewiesen werden konnte. Da das Virus bisher, außer im Schimpansen, nicht vermehrt werden kann, wurden zur Aufklärung der natürlichen Peptidpräsentation in der Medizinischen Abteilung II der Universität von Freiburg humane Zelllinien von Darius Moradpour und Benno Wölk etabliert, die einen subgenomischen Teil (NS3/NS4A) oder das gesamte offene Leseraster von HCV exprimieren.

3.2.2.1 Identifizierung von MHC-Klasse-I-Epitopen aus dem NS3 und NS4A Proteinen des Hepatitis-C-Virus.

In einem ersten Versuchsansatz wurden T1-Zellen¹⁶⁷ mit den nichtstrukturellen Proteinen NS3 und NS4A transfiziert (Moradpour, Freiburg). NS3 enthält neben einer Autoprotease, welche in *cis* die Spaltung zwischen NS2 und NS3 vollzieht¹⁶⁸, im aminoterminalen Drittel zusätzlich eine Serinprotease, welche in *cis* und in *trans* die nachfolgenden nichtstrukturellen Proteine prozessiert¹⁶⁹. Im carboxyterminalen Anteil von NS3 findet sich eine RNA Helikase¹⁷⁰. Das 54-Aminosäure-lange Polypeptid NS4A dient als Kofaktor für die NS3 Serinprotease¹⁶⁹ und wird als integraler Bestandteil in die aminoterminalen β -Faltblattdomäne des Enzyms eingebaut. Diese transfizierten T1-Zellen (T1-NS3/4A) wurden von der Firma Alvito Biotechnologies (Berlin) im Auftrag auf eine Zellzahl von 5×10^{10} expandiert. Nach einer anschließenden Immunpräzipitation der HLA-Moleküle mit 10 mg des HLA-A, -B, -C spezifischen Antikörpers W6/32 wurde die erhaltene natürliche

Peptidmischung mittels *offline* HPLC (SMART) fraktioniert. Die Fraktionen wurden per *offline* ESI-MS analysiert und es wurde nach den vorhergesagten NS3 und NS4A Epitopen gesucht (Tabelle 3.11). Die massenspektrometrische Analyse führte zur Identifizierung einer Auswahl an Liganden aus normalen zellulären Proteinen, wobei keine aus HCV stammenden Liganden nachgewiesen werden konnten (Daten nicht gezeigt).

In einem zweiten Versuchsansatz wurde die Osteosarkomzelllinie U2-OS mit den HCV Gensequenzen des Proteins NS3, dem dazugehörigen Kofaktor NS4A und dem HLA-A*0201-Molekül transfiziert (U-NS3/NS4A). Durch die Integrierung eines Tetrazyklin-induzierbaren Systems in die U-NS3/NS4A-Zellen können diese im voll induzierten Zustand große Mengen viraler Proteine exprimieren (Moradpour, Freiburg). Die Proteinexpression wurde mittels Immunblot und die HLA-Expression mittels FACS-Analyse überprüft. Die getesteten adhärennten Zellen wurden dann in Rollerflaschen bis zu einer Zellzahl von $6,6 \times 10^{10}$ Zellen expandiert. Nach Immunpräzipitation der HLA-Moleküle mit 38 mg des HLA-A, -B, -C spezifischen monoklonalen Antikörpers W6/32 (durchgeführt von Tobias Krüger) wurde gezielt nach den für HLA-A*0201 neu vorhergesagten Liganden als auch nach bekannten T-Zellepitopen aus NS3 und NS4A gesucht (Tabelle 3.11).

Tabelle 3.11 HLA-A*0201-Motivpeptide aus den HCV-Proteinen NS3 und NS4A.

Score	Sequenz ^{a, b}	Position	[M+H] ⁺	[M+2H] ²⁺	Protein
31	GLLGCIITSL	13	989.56	495.28	NS3
30	VLVGGVLAAL	636	911.58	456.29	NS4A
29	FLATCINGV	44	937.47	469.24	NS3
28	LLGCIITSL	14	932.54	466.77	NS3
28	LLSPRPISYL	127	1158.68	579.84	NS3
28	VLNPSVAATL	228	984.60	492.80	NS3
27	ELAAKLVAL	377	927.58	464.29	NS3
27	YLVAYQATV	560	1027.54	514.27	NS4A
27	KLVALGINAV	1406	997.63	499.32	NS3
26	LLCPAGHAV	144	880.46	440.73	NS3
26	TLHGPTPLL	592	948.54	435.26	NS3
24	VLAALAAAYCL	641	1007.55	504.28	NS4A
23	CINGVCWTV	1073	994.44	497.72	NS3

^a **Fettdruck:** Bereits beschriebene T-Zellepitope

^b **Fettdruck grau unterlegt:** Massenspektrometrisch identifiziertes T-Zellepitop aus U-NS3/NS4A

Die Suche nach den NS3- und NS4-Liganden bzw. Epitopen erfolgte in Aliquots der extrahierten Peptide von etwa 1×10^{10} U-NS3/NS4A-Zellen mit dem *online* LC-ESI-MS Sys-

tem. In Abbildung 3.4 (A) ist das Chromatogramm des totalen Ionenstroms (TIC) und das Massenchromatogramm für m/z 499,3 der natürlichen Probe (B) im Vergleich zum Massenchromatogramm (m/z 499,3) des synthetischen vorhergesagten Peptids dargestellt (C). Diese Analyse der natürlichen Peptide zeigt Koelution des vorhergesagten Peptids NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅ (KLVALGINAV) bei einer Retentionszeit von etwa 49 bzw. 51 min.

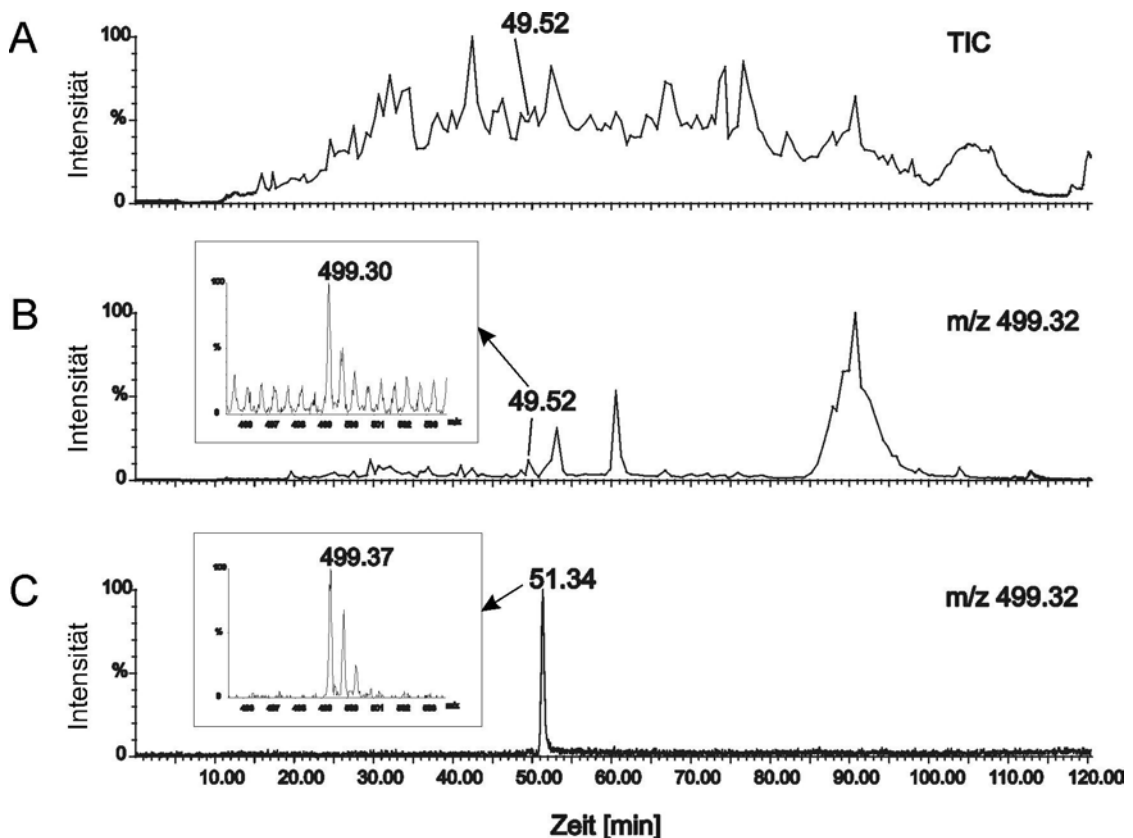


Abbildung 3.4 Identifizierung des aus HCV-stammenden NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅-T-Zellepitops in einer von U-NS3/NS4A-Zellen extrahierten Peptidmischung. (A) Chromatogramm des totalen Ionenstroms (TIC) der natürlichen Peptidmischung. (B) Massenchromatogramm für m/z 499,3 der natürlichen Peptidmischung. Ein Signal bei 49,5 min koeluiert mit dem in (C) dargestellten synthetischen Peptid KLVALGINAV mit m/z 499,3 welches bei einer Retentionszeit von 51,34 min eluiert.

Im folgenden *online* Tandem-LC-MS-Experiment wurde die aus NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅-stammende Sequenz KLVALGINAV, sowohl für das synthetische (Abb. 3.5 A), als auch für das natürliche Peptid mit m/z 499,3 bei der Retentionszeit 49,5 bzw. 51,3 min eindeutig bestätigt (Abb. 3.5 B). Zudem konnten in diesem Experiment zahlreiche weitere nicht aus NS3- und NS4A-stammende natürliche HLA-A*0201-Liganden identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

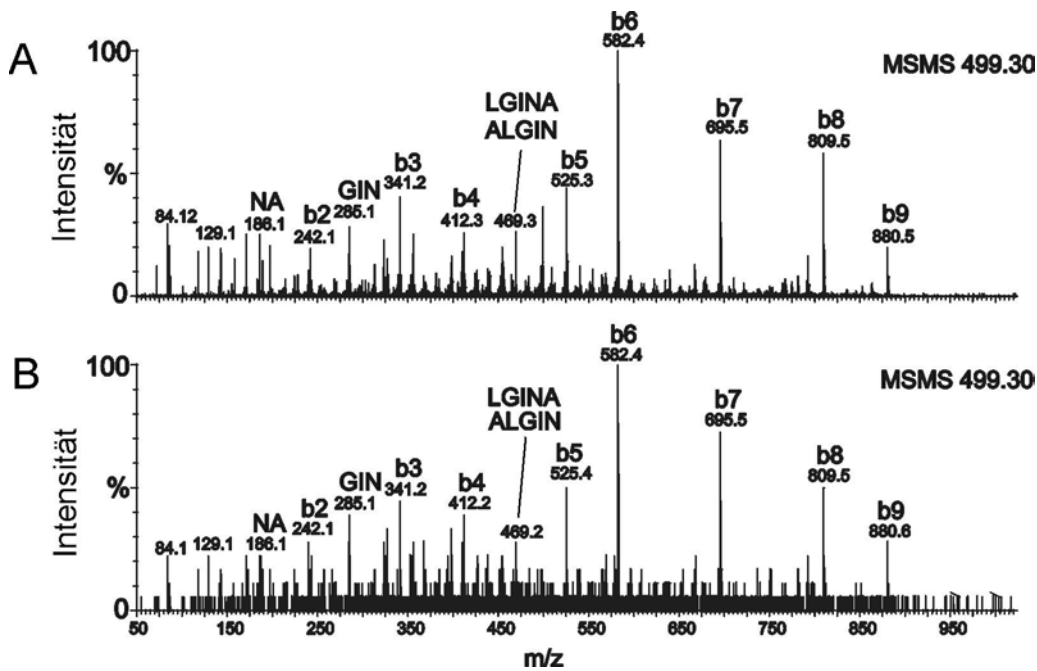


Abbildung 3.5 Identifizierung des aus HCV-stammenden T-Zellepitops NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅ in einer von U-NS3/NS4A-Zellen extrahierten Peptidmischung. (A) MSMS-Spektrum des synthetischen Peptids KLVALGINAV mit m/z 499,3 und einer Retentionszeit von 51,34 min. (B) MSMS Spektrum des aus der natürlichen Probe U-NS3/NS4A stammenden Peptids KLVALGINAV der Masse $[M+2H]^{2+} = 499,3$ eluiert nach 49,52 min.

Bei dem identifizierten HLA-A*0201-Liganden KLVALGINAV handelt es sich um ein bereits bekanntes T-Zellepitop aus der Serinprotease NS3 aus HCV, das in dieser Arbeit zum ersten Mal auf molekularer Ebene nachgewiesen werden konnte.

3.2.2.2 Identifizierung von MHC-Klasse-I-Epitopen aus dem Hepatitis-C-Virus.

Die Osteosarkomzelllinie U2-OS wurde mit der gesamten HCV-Gensequenz und dem HLA-A*0201-Molekül transfiziert (U-HCVcon). Die Zellen wurden hierbei ebenfalls mit einem Tetrazyklin-induzierbaren Systems ausgestattet (Moradpour, Freiburg). Die Proteinexpression wurde auch bei diesen Zellen mittels Immunblot und die HLA-Expression mittels FACS-Analyse überprüft. Die getesteten adhärennten Zellen wurden dann in Wannenstapeln bis zu einer Zellzahl von etwa $6,5 \times 10^{10}$ Zellen expandiert (Moradpour, Freiburg). Nach Immunpräzipitation der HLA-Moleküle mit 24 mg des HLA-A, -B, -C spezifischen monoklonalen Antikörpers W6/32 (durchgeführt von Tobias Krüger) wurde gezielt nach den für HLA-A*0201 neu vorhergesagten Liganden als auch nach bekannten T-Zellepitopen aus HCV gesucht (Tabelle 3.12).

Tabelle 3.12 HLA-A*0201-Motivpeptide aus dem gesamten HCV-Genom

Score	Sequenz ^{a, b}	Position	[M+H] ⁺	[M+2H] ²⁺	Protein
31	GLAGAALDSV	1833	873.46	437.23	NS4B
30	ALYDVVSKL	2594	1007.57	504.28	NS5B
30	ALAHGVRVL	150	935.57	468.29	Core
30	SLNTGWLAGL	432	1031.54	516.27	E1
30	ILAGYGAGV	1851	820.45	410.72	NS4B
29	ILQASLLKV	901	984.64	492.82	NS2
29	SLMAFTAAV	1789	910.46	455.73	NS4B
28	DLMGYIPLV	132	1020.54	510.77	Core
28	ALSTGLIHL	684	924.54	462.77	E2
28	GMWPLLLLL	792	1055.62	528.31	P7
28	AIFGPLWIL	894	1029.61	515.30	NS2
28	ILSPGALAV	1886	840.51	420.76	NS4B
28	KLMPQLPGI	1998	996.58	498.79	NS5A
28	TLPTALAEI	2339	928.53	464.76	NS5A
27	YLLPRRGPR	35	1240.76	620.88	Core
27	DLLVGSATL	263	888.50	444.75	E1
27	ALVFDITKL	883	1019.61	510.30	NS2
27	GMWPLLLLLL	792	1168.71	584.85	P7
27	WILQASLLKV	900	1170.72	585.86	NS2
27	KLVALGINAV	1406	997.63	499.32	NS3
26	SMVGNWAKV	363	991.50	496.25	E1
23	CINGVCWTV	1073	994.44	497.72	NS3

^a **Fettdruck:** Beschriebene T-Zellepitope

^b **Fettdruck grau unterlegt:** Massenspektrometrisch identifiziertes T-Zellepitop aus U-HCVcon

Die Suche nach den vorhergesagten HCV-Liganden bzw. bekannten Epitopen erfolgte wie zuvor in Aliquots der extrahierten Peptide von etwa 1×10^{10} U-HCVcon-Zellen mit dem *online* LC-ESI-MS System. In Abbildung 3.6.A sind das Chromatogramm des totalen Ionenstroms (TIC) und das Massenchromatogramm für m/z 504.3 der natürlichen Probe dargestellt (B). Im Folgenden *online* Tandem-LC-MS Experiment wurde das in der natürlichen U-HCVcon-Probe bei 63 min auftretende Signal fragmentiert und als die aus NS5B₂₅₉₄₋₂₆₀₂ stammende Sequenz ALYDVVSKL identifiziert (Abb.3.7.B). Diese Sequenz konnte anhand eines *offline* aufgenommenen Fragmentspektrums des synthetischen Peptids ALYDVVSKL mit $m/z = 504,3$ eindeutig bestätigt werden (Abb. 3.7.A). Zudem konnten in diesem Experiment aus mehreren hundert Fragmentspektren zahlreiche weitere nicht aus HCV-stammende natürliche HLA-A*0201-Liganden identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

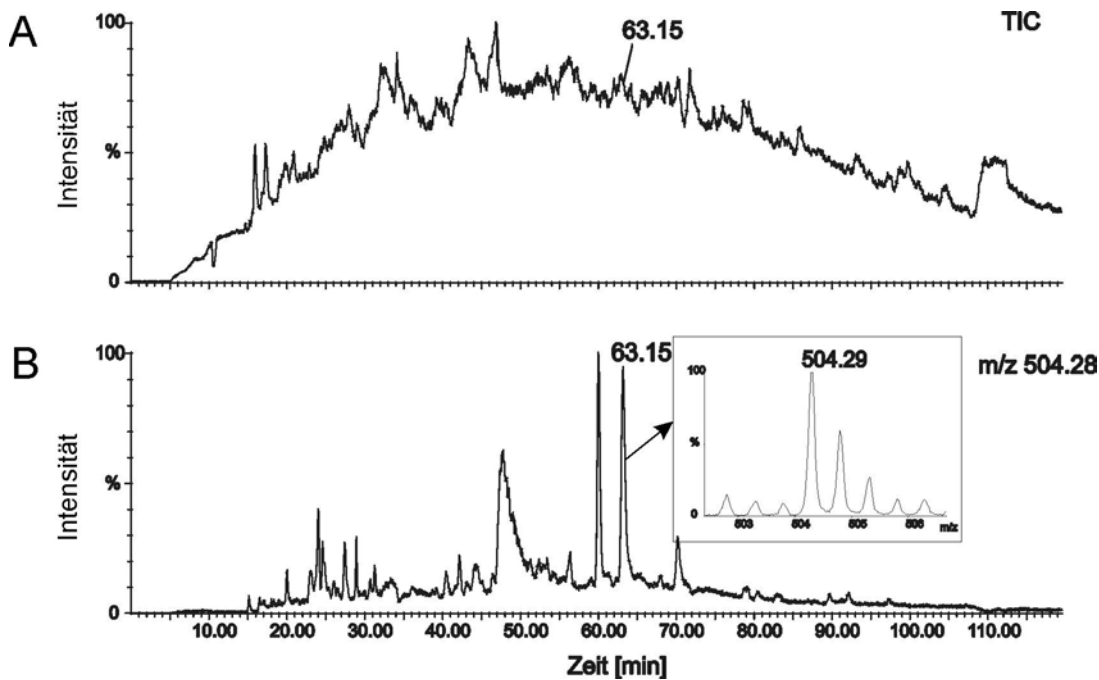


Abbildung 3.6 Identifizierung des aus HCV-stammenden T-Zellepitops NS5B₂₅₉₄₋₂₆₀₂ in einer von U-HCVcon-Zellen extrahierten Peptidmischung. (A) Chromatogramm des totalen Ionenstroms (TIC) der natürlichen Peptidmischung. (B) Das Massenchromatogramm für m/z 504,3 der natürlichen Peptidmischung ist dargestellt. Das Signal bei 63 min wurde in einem weiteren Tandem-MS-Experiment als das Peptid ALYDVVSKL identifiziert.

Bei dem identifizierten HLA-A*0201-Liganden ALYDVVSKL handelt es sich um ein bereits bekanntes T-Zellepitop aus dem Protein NS5B, das in dieser Arbeit zum ersten Mal auf molekularer Ebene nachgewiesen werden konnte. Das Quellprotein NS5B enthält die RNA-abhängige RNA-Polymerase des Hepatitis-C-Virus¹⁷¹, welche sich durch das Fehlen einer „proof-reading“ Funktion auszeichnet und neben der hohen replikativen Aktivität die bekannte hohe genetische Variabilität des HCV bedingt.

Zusätzlich zur Identifizierung der beiden HCV-Epitope KLVALGINAV und ALYDVVSKL wurde eine relative Quantifizierung der Epitope im Vergleich zum abundant vorkommenden HLA-A*0201-Peptid YLLPAIVHI (DDX5) durchgeführt. Analog zum MSP1-Epitop aus *Plasmodium falciparum*, dargestellt in Abbildung 3.3, wurde die Peakfläche jedes einzelnen Peptids im entsprechenden Massenchromatogramm berechnet und verglichen.

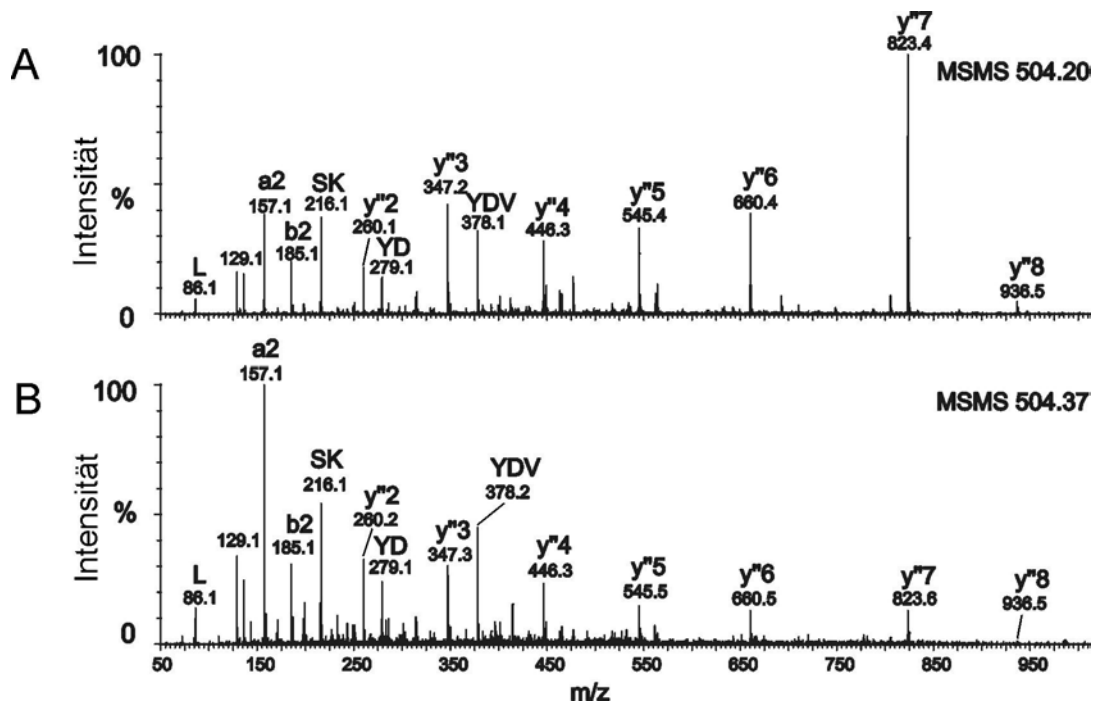


Abbildung 3.7 (A) MSMS-Spektrum des synthetischen Peptids ALYDVVSKL (m/z 504). (B) MSMS-Spektrum des Peptids ALYDVVSKL aus der U-HCVcon-Präzipitation (m/z 504 Retentionszeit 63,15 min).

Es zeigte sich, dass der aus NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅-stammende Ligand KLVALGINAV eine fast hundertfach schwächere Intensität im integrierten Massenchromatogramm zeigte (Peakfläche = 723) als der DDX5₁₄₈₋₁₅₆ Ligand YLLPAIVHI (Peakfläche = 64463). Der aus NS5B₂₅₉₄₋₂₆₀₂-stammende Ligand ALYDVVSKL hingegen war mit einer Peakfläche von 6565 nur etwa zehnfach schwächer als der DDX5₁₄₈₋₁₅₆ Ligand (Peakfläche = 68409) vertreten. Hierbei muss allerdings erwähnt werden, dass diese relative Quantifizierung der Epitope nur bedingt aussagekräftig ist, da die Ionisierung der Peptide im ESI-Prozess in Abhängigkeit ihrer Aminosäurezusammensetzung durchaus unterschiedlich sein kann. Somit kann keine absolute Aussage über die Menge der Peptide getroffen werden. Für eine absolute Quantifizierung müsste jedes Peptid mittels eines synthetischen Eichpeptids in direkte Korrelation zur im Massenspektrometer auftretenden Signalintensität gesetzt werden.

Laut Literatur scheint von der großen Anzahl bekannter HCV-Peptide nur eine Handvoll hinsichtlich einer erfolgreichen T-Zellantwort von Bedeutung zu sein¹⁷². Allerdings wurde schon eine erfolgreiche Virus-Eliminierung in einem Patienten beschrieben, bei der eine T-Zellantwort gegen 8 verschiedene Epitope detektiert werden konnte. In dieser Studie wurden starke CD8⁺-Lymphozyten-Antworten gegen das NS5B₂₅₉₄₋₂₆₀₂- und das NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅-Epitop in unterschiedlichen Patienten detektiert, bei der 7,4% bzw. 4,2% der zirkulierenden CD8⁺-Lymphozyten für das jeweilige Peptid spezifisch waren¹⁷³. Die in dieser Arbeit gefundene dominante HLA-Präsentation der NS5B₂₅₉₄₋₂₆₀₂- und NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅-Epitope

findet in der starken Immunantwort im Patienten ihre Bestätigung. Neben den hier erwähnten Epitopen gilt vor allem das NS3₁₀₇₃₋₁₈₁ als ein im Allgemeinen in *ex vivo*-Untersuchungen gut durch T-Zellen erkannter HLA-A*0201-Ligand¹⁷². Das Epitop CINGVCWTV konnte jedoch in Form eines synthetischen Analogons auch in höheren piko mol-Mengen nur sehr schlecht im Massenspektrometer detektiert werden. Die geringe Sensitivität des Massenspektrometers für dieses Peptid resultiert aus zwei Peptideigenschaften: zum einen enthält diese Sequenz keine basische Aminosäure, die neben dem N-Terminus als Ladungsträger fungieren könnte, zum anderen besitzt das Peptid zwei Cysteinreste, die zur Dimerisierung unter oxidierenden Bedingungen führen können. Daher ist es nicht erstaunlich, dass diese Epitop experimentell-molekular nicht nachgewiesen werden konnte.

Für das Zellsystem U2-OS konnte anhand von Immunblot-Verfahren gegen die Proteasomuntereinheit LMP2 gezeigt werden, dass diese Zellen die konstitutive Form des Proteasoms exprimieren (Moradpour, Freiburg). Da eine Virusinfektion aller Wahrscheinlichkeit nach zur Induktion des Immunproteasoms führt, liegt die Annahme nahe, dass die beiden molekular identifizierten Epitope unabhängig vom Proteasomentyp generiert werden, da eine Immunantwort auch im infizierten Patienten nachgewiesen werden konnte.

Erstaunlich ist, dass selbst bei starker Überexpression der Proteine in den transfizierten Zellen nur jeweils ein Epitop auf molekularer Ebene, anhand von *online* LC-MS Experimenten detektierbar war. Zudem konnte das in der U-NS3/NS4A-Transfektante nachgewiesene Epitop KLVALGINAV nicht in der U-HCVcon-Transfektante neben ALYDVVSKL nachgewiesen werden. Bei beiden Epitopen handelt es sich nach der Epitopvorhersage um sehr gut bindende Peptide. Für KLVALGINAV wurde bei der Epitopvorhersage ein Score von 27 ermittelt, dies entspricht Rang 23 unter Berücksichtigung aller vorhergesagten Nona- und Dekamere aus HCV. Das Epitop ALYDVVSKL ergab sogar einen Score von 30, womit dieses Peptid als das Zweitbeste aller möglichen Nonamere und Dekamere vorhergesagt wurde. Dieser Bindungsunterschied der Epitope könnte eine logische Erklärung für die 10-fach stärkere Präsentation des NS5B-Peptids im Vergleich zum NS3-Peptid liefern. Abschließend kann gesagt werden, dass in dieser Arbeit erstmals Epitope aus HCV und ein Ligand aus *Plasmodium falciparum* molekular mittels *online* LC-MS Analyse nachgewiesen werden konnten. Die Identifizierung war jedoch nur in Zellen mit transfizierten Proteinüberexpressionssystemen und durch Einsatz der zurzeit sensitivsten analytischen Methode, der *online* µkapillaren-ESI-LC-MS Technik möglich.

3.3 Massenspektrometrische HLA-Liganden-Analysen von soliden Tumoren.

3.3.1 Identifizierung von HLA-Liganden von soliden Kolonkarzinomproben (CCA)

In dieser Studie wurden Kolonkarzinome von acht Patienten (CCA) der chirurgischen Klinik in Tübingen (Prof. Dr. Becker) untersucht. Bei allen Kolonkarzinomgeweben wurde eine Immunpräzipitation der HLA-Moleküle von Medizin-Doktoranden durchgeführt (siehe Tabelle 3.13). Anschließend erfolgte eine chromatographische Auftrennung und massenspektrometrische Analyse der isolierten HLA-Liganden. In Tabelle 3.13 sind die Anzahl der identifizierten Liganden der einzelnen Tumore aufgelistet.

Tabelle 3.13 Ergebnisse der HLA-Liganden Identifizierung verschiedener Kolonkarzinompatienten.

Patient	HLA-Allele	Liganden Anzahl	Durchführung der Extraktion	Bemerkung ^{a, b}
CCA049	A*02, B*07, B*51	5	M. Häntschel	-
CCA060	A*24, B*18, B*44	24	M. Häntschel	Motiv
CCA061	A*02, A*03, B*15, B*35	5	M. Häntschel	-
CCA069	A*24, A*03, B*13, B*39	2	F. Obermayr	-
CCA085	A*02, A*33, B*07, B*14	2	F. Obermayr	-
CCA125	A*02, A*68, B*14, B*44	7	U. Eberle	dAc
CCA128	A*01, A*68, B*08, B*44	19	U. Eberle	dAc
CCA129	A*11, A*24, B*15, B*35	5	U. Eberle	dAc

^a dAc: Differenzielle Ligandenanalyse von Tumor und autologem Normalgewebe mittels Acetylierung

^b Motiv: Motivverfeinerung erfolgte anhand dieser Liganden

Die 12 identifizierten HLA-A*24-Liganden des Kolonkarzinoms des Patienten CCA060 wurden zur Motivverfeinerung dieses Allelprodukts verwendet. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind im Einzelnen in Abschnitt 3.1.3 beschrieben.

Die Kolonkarzinome der Patienten CCA125, CCA128 und CCA129 wurden vor der chromatographischen Trennung differenziell acetyliert. Die Ergebnisse der differenziellen Modifizierung sind im Einzelnen im Abschnitt 3.5 dargestellt.

3.3.2 Identifizierung von HLA-Liganden eines Magenkarzinoms (MCA28) verbunden mit vergleichender *microarray*-basierender Genexpressionsanalyse von Tumor und autologem Normalgewebe.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden Magenkarzinome von drei Patienten analysiert. In zwei Fällen, bei Patient MCA39 (Tumor/Fettgewebsmasse: 190 g) und MCA40 (Tumormasse: 31 g), war es nicht möglich nach standardisierter Immunpräzipitation der HLA-Moleküle mit dem monoklonalen Antikörper W6/32 (6 mg bzw. 15 mg) und chromatographischer Auftrennung der erhaltenen Probe massenspektrometrisch Peptide zu identifizieren. Während der *offline* HPLC-Auftrennung der Peptide traten bei beiden MCA-Proben in den Chromatogrammen sehr große Signale bei der UV-Detektion auf. Anschließende massenspektrometrische Analysen zeigten, dass diese UV-Signale vermutlich durch unspezifisch gebundene Moleküle aus der Immunpräzipitation, jedoch in keinem Fall durch Peptide hervorgerufen wurden. Die Immunpräzipitationen und chromatographischen Trennungen dieser beiden Magenkarzinome wurden von Ute Eberle durchgeführt.

Eine dritte Immunpräzipitation wurde nach einem veränderten Protokoll von Christian Reichle durchgeführt. Die HLA-Moleküle des Magenkarzinoms des Patienten MCA28 (Tumormasse = 43 g) wurden mit 22,6 mg des Antikörpers W6/32 immunpräzipitiert. Zuvor erfolgte eine Vorreinigung des Tumorlysats. Vor Zugabe des Antikörpers wurde das Tumorlysat mehrere Stunden zyklisch über eine Protein-A-Säule geführt, um unspezifisch bindende Moleküle aus dem Lysat zu entfernen. Im Anschluss wurde wie üblich der monoklonale Antikörper zum Lysat gegeben und die HLA-Peptid-Antikörperkomplexe mittels Protein-A-Sepharose isoliert. Die Auftrennung der so erhaltenen natürlichen Peptidmischung erfolgte mittels *offline* HPLC. Vier Fraktionen wurden im Anschluss durch ESI-MS analysiert. Zur Beschleunigung der weiteren Analyse wurden die Fraktionen dann wiedervereinigt und lyophilisiert. Die lyophilisierte Probe wurde nach Resuspension erneut über *online* LC-MS/MS analysiert. Anhand der Fragmentspektren konnten bisher 25 HLA-Liganden identifiziert werden (Tab. 3.14). Die Auswertung der Fragmentspektren war allerdings bei Abschluss dieser Arbeit noch nicht beendet.

Parallel zur HLA-Liganden Identifizierung wurden Genexpressionsanalysen des Tumorgewebes und des autologem Normalgewebes des Patienten MCA28 mittels Affymetrix Micro-Array-Technologie von Oliver Schoor durchgeführt. Aufgrund der Heterogenität des Gewebes wurde für die Genanalyse die Laser Mikrodisektionstechnik angewendet.

Hierbei werden ausschließlich gesunde bzw. maligne Magenepithelzellen für die RNA-Isolierung ausgewählt und die erhaltene Gesamt-RNA in zwei Runden durch *in vitro* Transkription amplifiziert¹⁷⁴. Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse für die Quellproteine der gefundenen HLA-Liganden sind nach absteigender Überexpression sortiert in Tabelle 3.14 dargestellt.

Tabelle 3.14 Massenspektrometrisch identifizierte HLA-Liganden (A*02, -B*15, -B*44) eines Magenkarzinompatienten (MCA28) verglichen mit den Genexpressionsdaten des Tumors gegenüber dem autologen Normalgewebe. Ankeraminosäuren sind hervorgehoben. Im Text besprochene Liganden sind grau unterlegt.

Peptid-Sequenz	Quellprotein	HLA	x-fach Überexpression
KLLAATVLL	Apolipoprotein A-II	A*02	75,10
LADPENRQL	Syntropin, beta 1	A*02	6,06
ALLDRIVSV	Nucleoporin 205 kDa	A*02	3,48
ALASLIRSV	Plasma glutamate carboxypeptidase	A*02	3,24
KLVTVKSEV	Phosphatidylinositol transfer protein	A*02	2,46
VLLGKVYVV	DRE1 protein	A*02	2,30
ITAPPSRVL	Acyl-CoA desaturase	A*02	2,14
KIYEGQVEV	60S ribosomal protein L5	A*02	2,14
TQMPDPKTF	HSPC038 protein	B*15	2,00
GLIDRQVTV	Microtubule-actin crosslinking factor 1	A*02	1,87
RLAAAAAQSIV	Glutathione peroxidase 1	B*15	1,32
GLATDVQTV	Proteasome subunit beta subtype 3	A*02	1,15
KLHGVNINV	RNA binding motif protein 4	A*02	1,07
ILMEHIHKL	Ribosomal protein L19	A*02	1,00
ALISNSHQL	Transcription factor Maf	A*02	0,93
SIIGRLLEV	Protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha	A*02	0,93
SLFGGSVKL	Programmed cell death 6 interacting protein	A*02	0,93
ILHDDEVTV	60S acidic ribosomal protein P1	A*02	0,87
ALSGHLETV	Annexin II	A*02	0,81
TLADIARL	KIAA1305	A*02	0,76
GEASRLAHY	Histone, H2bm	B*44	0,71
ILTDITKGV	Eucaryotic translation elongation factor 2	A*02	0,66
AIVDKVPSV	Coatome gamma subunit	A*02	0,50
VLSSRLAFA	MHC class II antigen HLA-DR-beta 3	A*02	0,47
ALADGVQKV	Apolipoprotein L, 1	A*02	0,25

Einige Proteine, von denen ein HLA-Ligand auf der Zelloberfläche identifiziert wurde, zeigen im Tumor im Vergleich zu normalen Magenepithelzellen eine Überexpression auf mRNA-Ebene. Dies ermöglicht eine potentielle Erkennung durch das Immunsystem und somit die Möglichkeit eines immuntherapeutischen Eingreifens. Erstens können T-Zellen die an HLA gebundenen und tatsächlich auf den Tumorzellen präsentierten Liganden erkennen. Zweitens kann eine unterschiedlich starke mRNA-Expression, wobei in diesem Fall auch von einer erhöhten Proteinexpression und dadurch verstärkter HLA-Peptidpräsentation ausgegangen wird, die Unterscheidung zwischen Tumor und Normalgewebszelle ermöglichen. Im Fall von immuntherapeutischen Fragestellungen muss neben der Expression in normalen Magenepithelzellen jedoch gleichfalls darauf geachtet werden, dass das Zielprotein nicht in anderen Geweben oder Organen des Körpers stark exprimiert vorliegt, um das Risiko einer Autoimmunreaktion oder Anergie im Falle einer T-Zellaktivierung zu minimieren. Aus diesem Grunde wird die mRNA-Expression des im Tumor überexprimierten Kandidatenproteins in einer Vielzahl normaler Gewebe bestimmt. Ein solches Genexpressionsprofil für das überexprimierte Protein Nukleoporin, welches einen Teil des nuklearen Porenkomplexes darstellt, ist in Abbildung 3.8 gezeigt. Dieser Proteinkomplex erlaubt den passiven und aktiven Molekültransport in und aus dem Zellkern. Der Kerntransport kann durch verschiedene Mechanismen reguliert werden, wie z.B. durch Modifizierungen der zu transportierenden Moleküle (Phosphorylierung, Methylierung, Ubiquitinylierung), die Anzahl an Transportmolekülen (Expression in bestimmten Geweben in bestimmten Entwicklungsstadien) oder eine Variation der Anzahl der funktionellen Poren (Beeinflussung der allgemeinen Permeabilität des Kerns) und somit durch die Nukleoporinexpression. Eine Störung dieses Vorgangs durch Veränderungen in der Expression oder Mutation bestimmter Proteine kann neben weiteren parallel auftretenden Ereignissen zur Tumorentstehung führen¹⁷⁵ und somit tumorassoziiert oder sogar tumorspezifisch sein. Die Expression des Nukleoporins in verschiedenen gesunden Geweben und Organen zeigt, dass dieses Protein im Tumor (MCA28T) 3-fach überexprimiert ist im Vergleich zum autologen Magennormalgewebe und in keinem anderen Gewebe signifikant hoch exprimiert wird (Abb. 3.8). Obgleich keine sehr starke Überexpression vorliegt, wäre der identifizierte HLA-Ligand aus Nukleoporin aus unserer Sicht in einer Peptidvakzinierung einsetzbar.

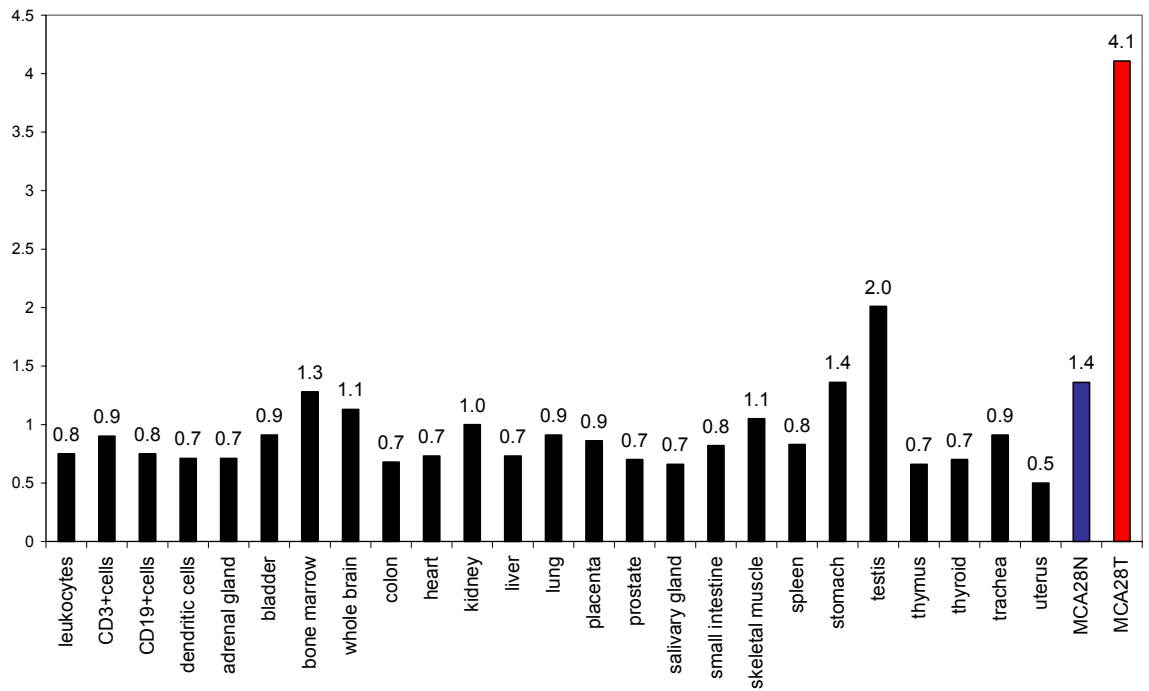


Abbildung 3.8 Genexpressionsdaten für Nucleoporin in Normalgeweben und im Tumorgewebe des Patienten MCA28. Expression wurde mit Affymetrix HG-U133A Microarrays gemessen.

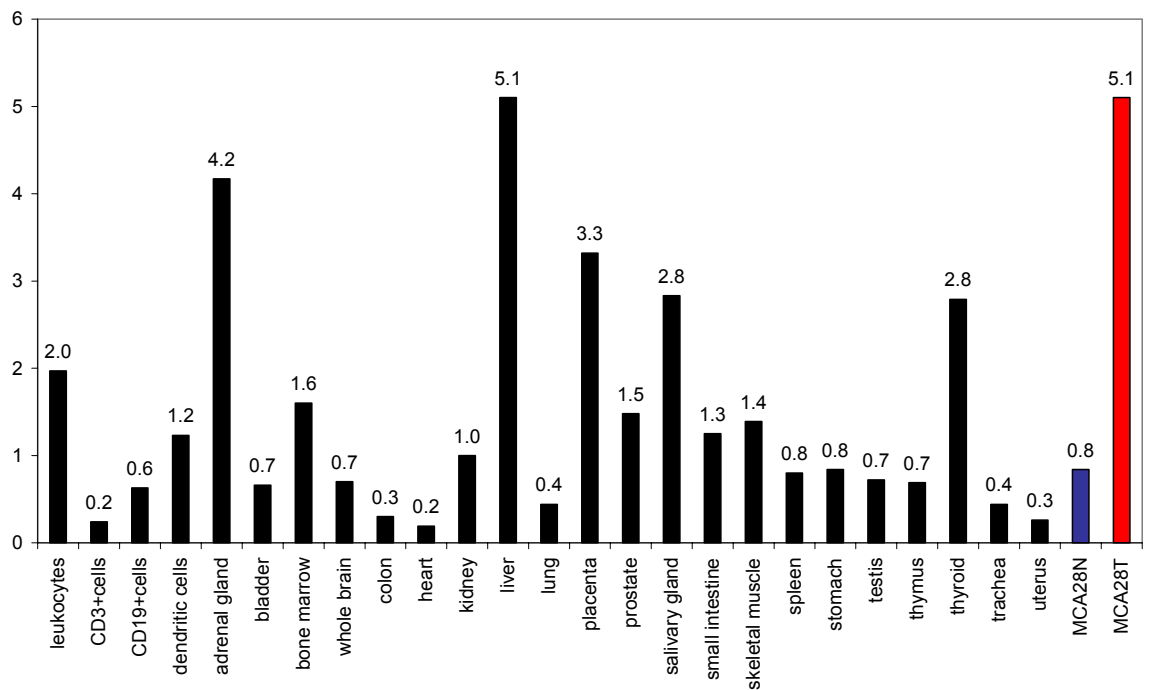


Abbildung 3.9 Genexpressionsdaten für Syntrophin in Normalgeweben und im Tumorgewebe des Patienten MCA28. Expression wurde mit Affymetrix HG-U133A Mikroarrays gemessen.

Die in Abbildung 3.9 gezeigte mRNA-Gewebsexpression des Proteins Syntrophin zeigt hingegen eine deutlich höhere Überexpression (etwa 5-fach) im Magentumorgewebe gegenüber dem autologen Normalgewebe jedoch auch signifikante Überexpression in der Nebenniere (4-fach) und der Leber (5-fach) sowie in anderen Geweben. Das Apolipoprotein A-II ist ein weiteres Beispiel für eine ausgesprochen starke Überexpression eines Quellproteins im Tumorgewebe (75-fach), jedoch zeigt sich auch bei diesem Protein eine extrem hohe Expression in der Leber (238-fach). Eine Verwendung als Impfstoff wäre somit für Peptide aus diesen beiden Proteinen nicht empfehlenswert.

3.3.3 Identifizierung von HLA-Liganden zweier Glioblastome der Patienten NCH361 und NCH359, verbunden mit vergleichender *microarray*-basierender Genexpressionsanalyse von Tumor und normalem Hirngewebe.

Das Gliom ist der häufigste Hirntumor in Erwachsenen. Die bösartigste Variante, die Glioblastom Multiform (GBM), tritt mit einer Häufigkeit von 2-3 Fällen pro 100.000 Menschen pro Jahr auf. Trotz sorgfältiger chirurgischer Entfernung sind Rückfälle sehr häufig und daher ist die Zukunftsprognose für diese Patienten sehr schlecht, mit mittleren Überlebenszeiten von nicht mehr als einem Jahr. Zurzeit besteht die Standardglioblastomtherapie aus einer Kombination von Chirurgie und Radiotherapie.

Ziel der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente war die Identifizierung von molekular definierten Zielmolekülen, die entweder selektiv oder hoch überexprimiert im Glioblastom vorkommen. Biochemische Identifizierung von HLA-präsentierten Peptiden und Genexpressionsanalyse wurden in diesem Ansatz kombiniert. Mögliche Kandidaten könnten schließlich in einer CTL-basierten Immuntherapie eingesetzt werden.

Die HLA-Moleküle des ersten untersuchten Glioblastoms (Patient NCH361: A*26, B*38), mit einer Tumormasse von 25 g, wurden mit 7,0 mg HLA-A, -B, -C spezifischen Antikörper immunpräzipitiert und mittels *offline* HPLC aufgetrennt. Anschließend konnten in Tandem-ESI-MS-Analysen 96 natürliche HLA-Liganden identifiziert werden (Tab. 3.15). Zudem wurde die Genexpressionsanalyse für das Glioblastomgewebe im Vergleich zu nicht-autologem gemischtem Normalhirngewebe von 2 gesunden Individuen mittels Affymetrix Microarray-Technologie von O. Schoor durchgeführt (22000 Transkripte je Microarray). Für die identifizierten Liganden sind die Genexpressionsdaten der Quellproteine im

Tumorgewebe vergleichend zum Normalhirngewebe nach absteigender Überexpression in Tabelle 3.15 gezeigt.

Von den identifizierten HLA-Liganden sind 64 HLA-A*26 restringiert und bestätigen das im Ergebnisteil 3.1.2 verfeinerte HLA-A*2601-Motiv sehr gut.

Drei Proteine bzw. ihre HLA-Liganden, die sich durch höchste Expressionswerte in beiden untersuchten Glioblastomen auszeichnen, werden im Folgenden exemplarisch bezüglich ihrer Tumorassoziation und Verwendbarkeit als Impfpptide betrachtet. Sie sind in Tabelle 3.15 grau unterlegt dargestellt. Bei den Beispielproteinen handelt es sich um das Transportprotein SEC61 und die Rezeptorprotein Tyrosin Phosphatase Zeta (RPTPZeta). Die genannten Proteine zeigen eine deutliche Überexpression im Tumorgewebe und nur eine schwache Expression in vielen anderen normalen Geweben und Organen, welches für die Verwendbarkeit bei Impfungen spricht. In Abbildung 3.10 und 3.11 sind die mRNA-Expressionsdaten für SEC61 und die RPTPZeta gezeigt.

Während das Transportprotein SEC61 bisher nicht durch eine besondere Tumorassoziation in der Literatur bekannt wurde, ist die RPTPZeta und ihr Ligand das heparin-bindende Zytokin Pleiotrophin (PTN) bereits als überexprimiert in humanen Glioblastomen beschrieben worden¹⁷⁶. Sie sind beteiligt an der neuronalen Migration während der Entwicklung des zentralen Nervensystem und Pleiotrophin wird beschrieben als ein Faktor bei Tumorwachstum und Angiogenese¹⁷⁷. Es wird vermutet, dass die Überexpression von PTN und RPTPzeta einen autokrinen Loop erzeugt, der wichtig für die Gliomzellenmigration und damit Metastasierung ist¹⁷⁸.

Tabelle 3.15 Massenspektrometrisch identifizierte natürliche HLA-Liganden (A*26, B*38) eines Glioblastoms (NCH361) verglichen mit den Genexpressionsdaten des Tumors gegenüber Normalgewebe. Ankeraminosäuren sind hervorgehoben. Grau unterlegte Zeilen: Quellproteine, die zu den 25 am höchsten exprimierten Genen in NCH361 und NCH351 gehören.

Peptid-Sequenz	Quellprotein	HLA Restriktion	x-fach Überexpression
SAVDFIRTL	Serine/threonine protein kinase 17A	A*26	21,11
DVISNIETF	Transcription factor SOX-9	A*26	13,93
EHAHLIVVL	ATP-binding cassette, sub family B, member 9	B*38	12,13
QTPDFTPKY	Triple homeobox 1 protein	A*26	9,85
IHIPINNII	Protein transport protein SEC61 gamma subunit	B*38	8,57
SHSDYLLTI	STAT induced STAT inhibitor 2	B*38	6,96
QHEGTVNIF	Rezeptor protein tyrosine phosphatase zeta	B*38	6,50
DVLQKIKY	DRC3	A*26	4,92

Tabelle 3.15 Fortführung

Peptid-Sequenz	Quellprotein	HLA	x-fach Überexpression
TAAPFPFHL	T-box transcription factor TBX2	A*26	4,92
DVFNEKGWNY	Pre-B cell enhancing factor	A*26	4,00
TTIDIGVKY	Calponin, acidic isoform	A*26	4,00
DVIAQGIGKL	60S acidic ribosomal protein P2	A*26	3,73
GHYEVAELL	Tankyrase 1	B*38	3,48
DTLDKVFTY	Long-chain-fatty-acid CoA ligase 3	A*26	3,03
DLIEHFSQF	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	A*26	2,83
DVAEGDLIEHF	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	A*26	2,83
FHNELLTQL	Similar to BAI1-associated protein 2	B*38	2,64
MHLRQYELL	Guanine nucleotide-binding protein Gs alpha-3	B*38	2,64
DHHQEVIQF	Protein C9ORF10	B*38	2,46
GHDASQITL	TH1-like	B*38	2,46
ETFDAGLQAF	Spectrin alpha chain, brain	A*26	2,30
SHIGDAVVI	Proliferating cell nuclear antigen	B*38	2,30
ELIAKIPNF	Template activating factor-I alpha	A*26	2,14
IHDDFVTF	Aortic carboxypeptidase-like protein ACLP	B*38	2,14
EVIDLMIKEY	Hypothetical PHD zinc finger protein XAP135	A*26	1,74
IHLIDPNTL	CGI-07 protein	B*38	1,74
RLDDAIHVL	Transcription factor 12	A*26	1,74
VHILDTEF	Kelch domain containing protein 2	B*38	1,74
DHDPVDKIVL	Heterogeneous nuclear ribonucleoprot,A2/B1	B*38	1,62
ETVRELTEF	Peroxisome proliferators activated receptor	A*26	1,62
EVFPLAMNY	G1/S-specific cyclin D1 (D2, D3)	A*26	1,62
EIYGGSDSRF	Splicing factor 3B subunit 1	A*26	1,52
ELVKRILNF	DEK protein	A*26	1,52
EVVSEPFRSF	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	A*26	1,52
SVIEAVAHF	Hypothetical protein KIAA0349	A*26	1,52
SVVDLINHY	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory β subunit	A*26	1,52
SVVEIHNY	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory γ subunit	A*26	1,52
DSFPMERQY	Signal transducer and activator of transcription 1	A*26	1,41
DVIERVIQY	IDN3 prot, or IDN3-B	A*26	1,41
FGVDRAILY	Integrin alpha-V	A*26	1,41
MPVGPDAILRY	Large proline-rich protein BAT3	A*26	1,41
QVAEIVSKY	Integrin alpha-V	A*26	1,41
EHAGVISVL	Hepatitis B virus interacting protein	B*38	1,32
EVAATEIKM	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	A*26	1,32
EVAAVLLHF	Exocyst complex component Sec10	A*26	1,32
EVIPPMKEF	NADH-ubiquinone oxidoreductase B17	A*26	1,32
KAFQKIVVL	Basic leucine-zipper protein	A*26	1,32
SHLDYDITL	Hypothetical protein KIAA0794	B*38	1,32
SHSPFGLDSF	KIAA 1082	B*38	1,32
AHDDGRWSL	Fascin	B*38	1,23
EAIEQILKY	Hypothetical protein FLJ10539	A*26	1,23
EIAEAYLGY	Heat shock protein 72	A*26	1,23
ETADTLMGLRY	Glucoseamine-fructose-6-phosphate aminotransf,	A*26	1,23
IHDLDNISF	Proteasome subunit beta type 2	B*38	1,23

Tabelle 3.15 Fortführung

Peptid-Sequenz	Quellprotein	HLA	x-fach Überexpres- sion
SHFVSDVVI	Guanine nucleotide-binding protein	B*38	1,23
YVDPVITSI	Hepatocyte growth factor receptor	A*26	1,23
DTISPTLGF	ADP-ribosylation factor-like protein 2	A*26	1,15
ETADTLLALRY	Glucoseamine-fructose-6-phosphate aminotransf,	A*26	1,15
GHFKEPLFL	Neuropathy target esterase	B*38	1,15
SHSQLMQLI	Adhesion regulating molecule 1	B*38	1,15
SSVPGVRLL	Vimentin	A*26	1,15
SVVELINHY	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory γ subunit	A*26	1,15
TRDELEWKL	HTPHLP	B*38	1,15
DHINDIIKI	Ras GTPase activating-like protein	B*38	1,07
EVTELLARY	DNA-directed RNA polymerase II	A*26	1,07
GVIEKLLTSY	UNR protein	A*26	1,07
THLDSVTKI	C6.1A	B*38	1,07
SVVSVISRF	Defender against cell death 1	A*26	1,00
THSLPVVVI	Signal transducer and activator of transcription 3	B*38	1,00
DVIRLIMQY	Hypothetical protein FLJ10805	A*26	0,93
EHSLVIDTL	Prefoldin subunit 2	B*38	0,93
EIGKRGHGY	ATP synthase g chain, mitochondrial	A*26	0,93
EVIKNFIQY	Euk, translation init, factor 3 sub, 6 interact, protein	A*26	0,87
EVVAGIKEY	Transcription factor-like protein MORF4	A*26	0,87
EVVAGIKEYF	Transcription factor-like protein	A*26	0,87
AHVDLIEKL	DNA-directed RNA polymerase II	B*38	0,81
DHMRFISEL	Hypothetical protein KIAA0068	B*38	0,81
DVLESVNL	Clathrin coat assembly protein AP50	A*26	0,81
LVVYPWTQRF	Hemoglobin beta chain	A*26	0,66
VVYPWTQRF	Hemoglobin beta chain	A*26	0,66
EVVERVLTF	F-box protein FBX22p44	A*26	0,50
DTGILDSIGRF	Myelin basic protein	A*26	0,44
EVIPPYYSY	TRAF and TNF receptor associated protein	A*26	0,44
EVIPYTPAM	Heme oxygenase (Decycling)	A*26	0,10
DVAGIADY	Hypothetical protein KIAA1238	A*26	n.b.
ETVNIWTHF	EST	A*26	n.b.
ETVWRLEEF	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha	A*26	n.b.
EVFDKTYQF	HSPC253	A*26	n.b.
EVNGLISMY	U5 snRNP-specific protein, 116 kD	A*26	n.b.
IHVIGGNDV	KIAA1268 protein	B*38	n.b.
ISTPVIRTF	Unknown	A*26	n.b.
RHVEVFELL	Multiple PDZ domain protein	B*38	n.b.
SHDLTLVNL	Hypothetical protein KIAA 1706	B*38	n.b.
SVVDAIGISRF	Similar to hypothetical protein	A*26	n.b.
YQDLLNVKL	Glial fibrillary acidic protein, astrocyte	A*26	n.b.

n.b.: Nicht bestimmbar, da Gentranskript nicht auf dem Microarray vorhanden

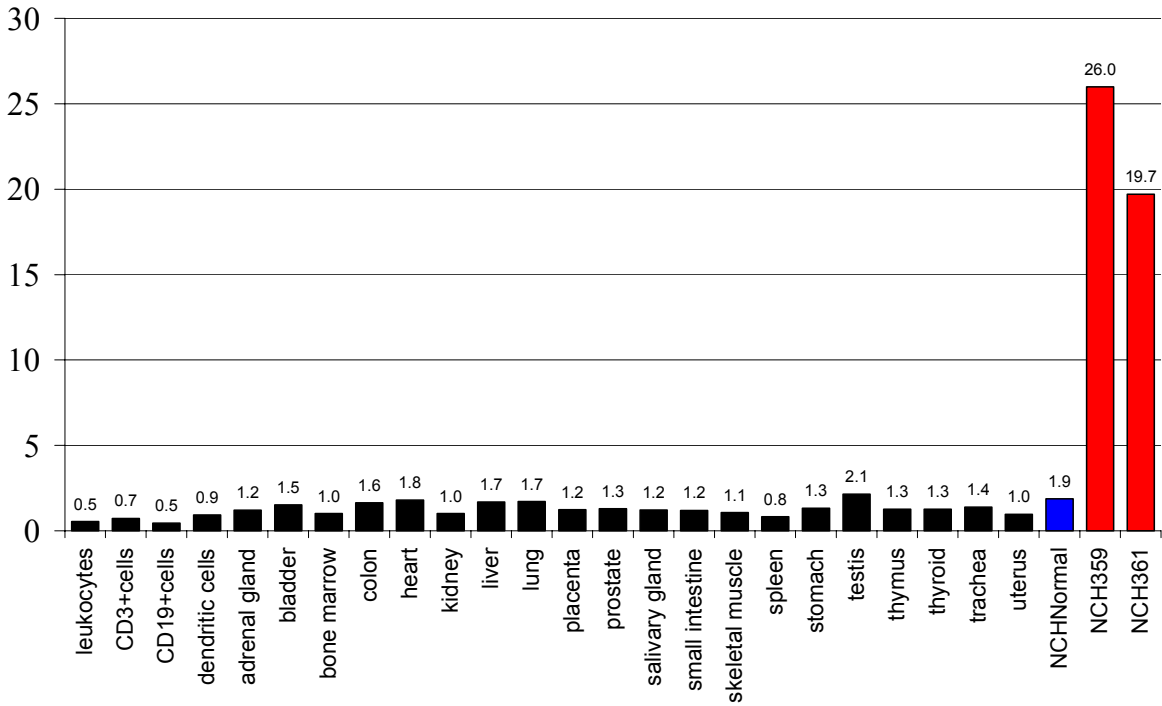


Abbildung 3.10 Genexpressionsdaten für Sec61 Gamma in Normalgeweben und den Glioblastomen NCH359 und NCH361. Expression wurde mit Affymetrix HG-U133A Microarrays gemessen.

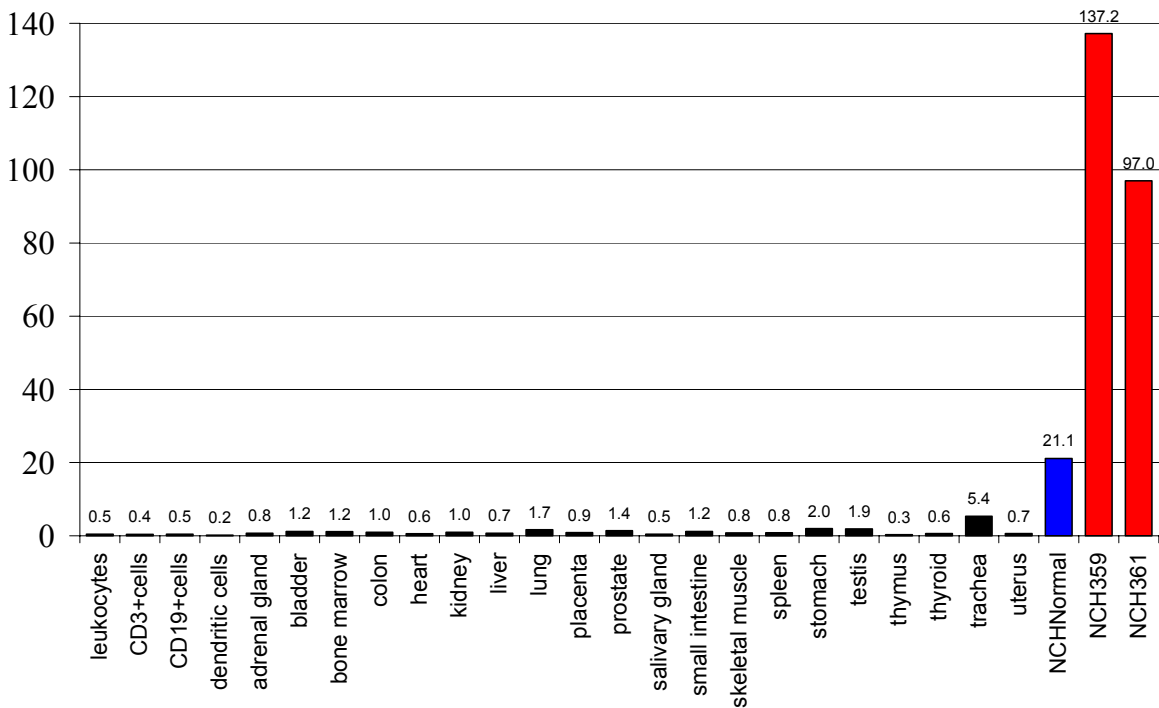


Abbildung 3.11 Genexpressionsdaten für Rezeptor Protein Tyrosin Phosphatase Zeta in Normalgeweben und den Glioblastomen NCH359 und NCH361. Expression wurde mit Affymetrix HG-U133A Microarrays gemessen.

Das zweite in dieser Studie untersuchte Glioblastom (Patient: NCH359) hatte eine Tumormasse von 28 g. Die Immunpräzipitation der HLA-Moleküle erfolgte mit 9,3 mg des monoklonalen Antikörpers W6/32. Nach *offline* HPLC-Fraktionierung der erhaltenen Peptidmischung wurden die Fraktionen 1 - 60 vereinigt und lyophilisiert. In der sich anschließenden *online* LC-MS Analyse wurden bisher 32 HLA-Liganden identifiziert (Tab.3.17). Die Auswertung der Fragmentspektren war zum Ende dieser Dissertation noch nicht abgeschlossen, daher sind noch mindestens 50 weitere Liganden zu erwarten. Die Genexpressionsanalyse wurde, wie beim ersten analysierten Glioblastom, auch hier für das Glioblastomgewebe im Vergleich zu Normalgeweben mittels Affymetrix Microarray-Technologie von O. Schoor untersucht (22000 Transkripte pro Mikroarray). Für die identifizierten Liganden sind die Genexpressionsdaten der Quellproteine in absteigender Reihenfolge in Tabelle 3.16 gezeigt.

Die Proteine bzw. ihre HLA-Liganden, die aufgrund ihrer hohen Genexpression in beiden untersuchten Glioblastomen besonders interessant erscheinen, sind grau unterlegt dargestellt. Bei diesen Proteinen handelt es sich zum einen um das Protein Tenascin C und zum anderen um den *Epidermal growth factor receptor* (EGFR). In Abbildung 3.12 und 3.13 sind die mRNA-Gewebsexpressionsprofile dieser Proteine dargestellt. Sie zeigen, dass der mRNA-Gehalt im Tumor deutlich höher ist als in allen anderen normalen Geweben und Organen, wobei eine relativ hohe Expression von Tenascin auch im Magen und für EGFR in der Plazenta gefunden wurde. Unabhängig von den Ergebnissen dieser Dissertation wurden beide Proteine schon vorher in der Literatur als Glioblastom- bzw. auch allgemeiner als tumorassoziiert beschrieben. Bei Tenascin C handelt es sich um ein extrazelluläres Matrixprotein, welches an Prozessen wie der Embryogenese¹⁷⁹, Wundheilung¹⁸⁰ und Neoplasie¹⁸¹ beteiligt ist. Überexpression in Gliomzellen und geringe bzw. keine Expression in normalem Gehirn wurde, korrelierend mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen, schon dokumentiert¹⁸². Auch andere epitheliale Tumore weisen eine Hochregulierung der Tenascin Expression auf, wie z.B. Mammakarzinome oder Kolonkarzinome^{183,184}. Zudem konnte eine erhöhte Tenascin C Expression speziell im Bereich der Blutgefäße, in Korrelation mit früheren Krankheitsrückfällen gebracht werden¹⁸⁵.

Tabelle 3.16 Massenspektrometrisch identifizierte natürliche HLA-Liganden (A*03, A*32, B*07, B*35) des Glioblastoms des Patienten NCH359 verglichen mit den Genexpressionsdaten des Tumors gegenüber dem Normalgewebe. Ankeraminosäuren sind hervorgehoben. Grau unterlegte Zeilen: Quellproteine, die zu den 25 am höchsten exprimierten Genen in NCH361 und NCH351 gehören.

Peptid Sequenz	Quellprotein	HLA	x-fach Überexpression
SPSTSRTPLL	Epidermal growth factor receptor	B*07	337,79
STFDSPAHW	Epidermal growth factor receptor	A*32	337,79
GLAPSIRTK	Tenascin C (hexabrachion)	A*03	13,93
GVLKKVIRH	Tenascin C (hexabrachion)	A*03	13,93
YPHLHNAEL	Transcription factor SOX-9 (homolog zu 8 /10)	B*07	13,93
KVSDYILQH	Astrotactin 2	A*03	4,00
LPTRVDFSL	Glial fibrillary acidic protein	B*07	3,03
ATNRITVTW	Protein inhibitor of activated STAT protein	A*32	2,14
KIADRFLLY	LIM domain only 4	A*03	2,00
QIFVKTLTGK	Ubiquitin C	A*03	1,74
APEEHPVLL	Actin beta	B*07	1,62
RVFPDKGYSF	TIA1 cytotoxic granule-asso,RNA bind,Prot,	A*03	1,52
SIFDGRVVAK	Putative membrane protein	A*03	1,32
VPDSSGPERIL	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	B*07	1,23
KLLPSVVLK	Diphtheria toxin receptor	A*03	1,15
TPSEHPVVL	High-glucose-regulated protein 8	B*07	1,15
IPRAALLPLL	Protease, serine, 11 (IGF binding)	B*07	1,00
HPVHPDIKL	Protein inhibitor of activated STAT, 1	B*07	0,93
KSFGSAQEFAW	Coatomer beta subunit	A*32	0,87
RLFEPPLYR	Family with sequence similarity 20, number C	A*03	0,87
SLYKKLEIK	Solute carrier family 9	A*03	0,87
RQITQVYGF	Protein phosphatase 6 (2 und 4) catalytic subunit	A*03	0,81
FPEHIFPAL	Actin-related protein 2 homolog (yeast)	B*07	0,76
APRPRLLL	Transforming growth factor beta receptor I	B*07	0,57
TAMDVVYAL	Histone H4	B*07	0,54
KLFDHAVSKF	Fatty-acid-Coenzyme A ligase, long chain 4	A*03	0,29
HPVSDHEATL	MHC class I antigen	B*07	n.b.
ITVLTKPLPV	Protein tyrosine phosphatase, receptor type O	A*32	n.b.
RLFVGSIPK	Synaptotagmin binding protein	A*03	n.b.
SLMHSFILK	Dynein light chain 2A, cytoplasmic	A*03	n.b.
VLYDRVLKY	Signal recognition particle 68 kDa	A*03	n.b.

n.b.: Nicht bestimmbar da Gentranskript nicht auf dem Microarray vorhanden.

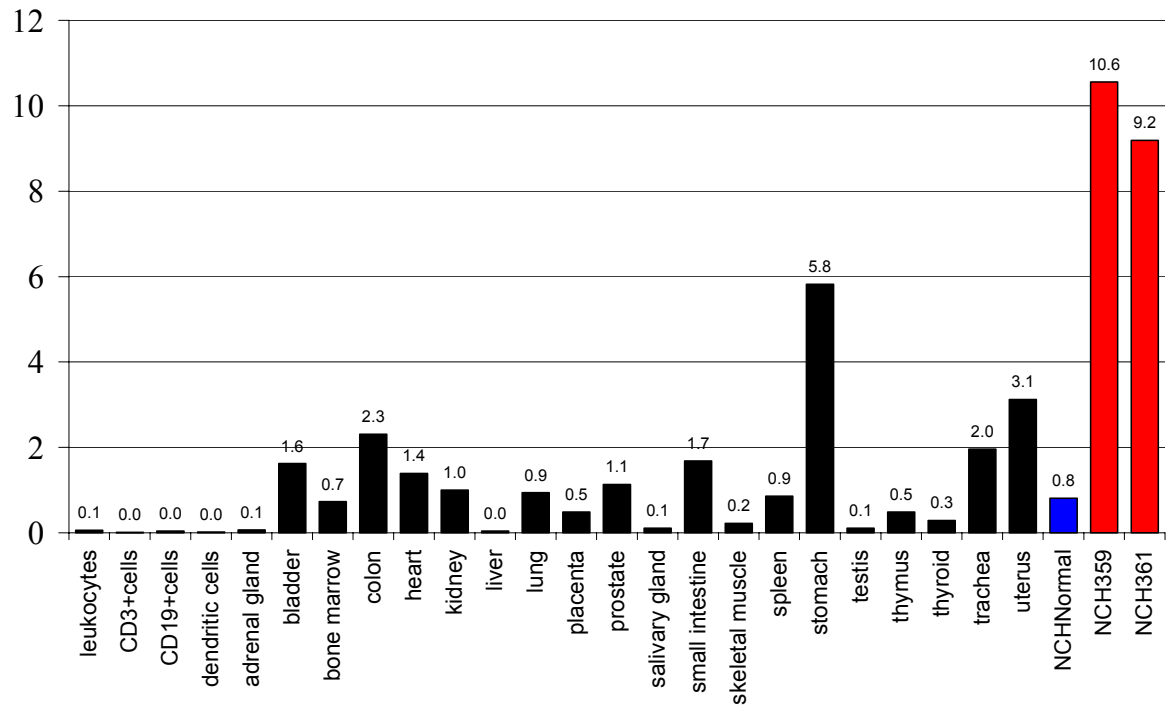


Abbildung 3.12 Genexpressionsdaten für Tenascin C in Normalgeweben und den Glioblastomen NCH359 und NCH361. Expression wurde mit Affymetrix HG-U133A Microarrays gemessen.

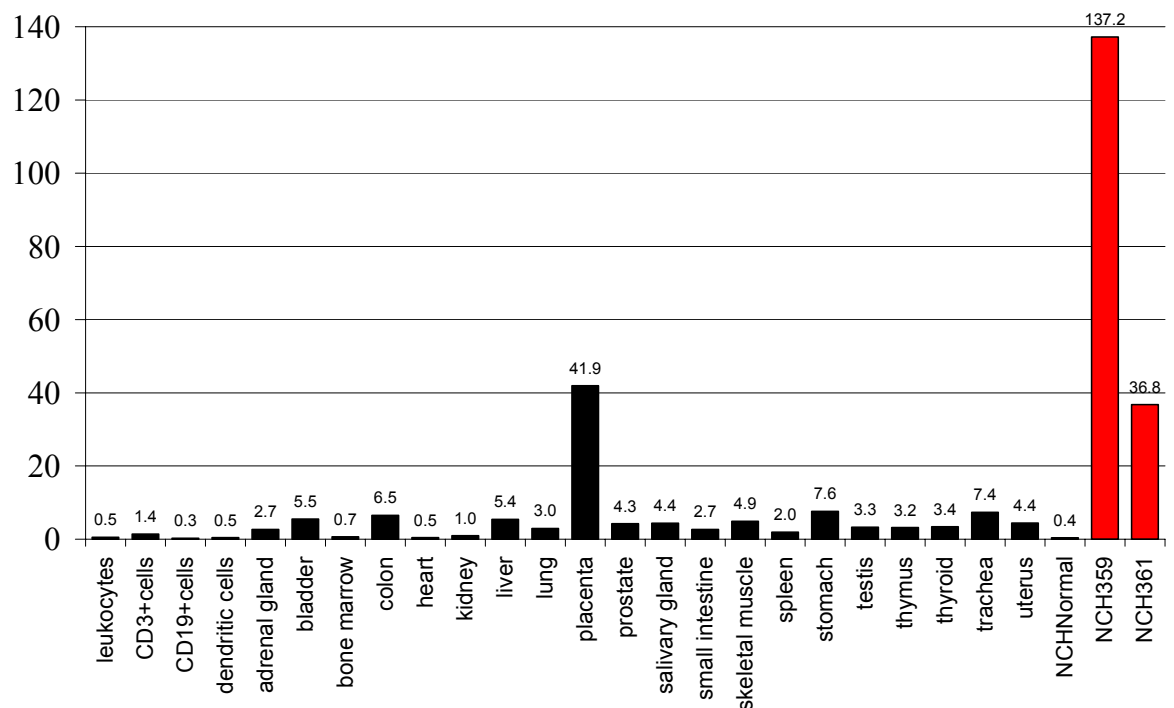


Abbildung 3.13 Genexpressionsdaten für den *Epidermal growth factor receptor* (EGFR) in Normalgeweben und den Glioblastomen NCH359 und NCH361. Expression wurde mit Affymetrix HG-U133A Microarrays gemessen.

Die EGF-Rezeptoren sind weitverbreitete transmembrane Glykoproteine und besitzen Tyrosinkinase-Aktivität. Überexpression dieser Rezeptoren wurde bereits für zahlreiche Tumore beschrieben und kann aufgrund erhöhter aktiver Liganden/Rezeptor-Komplexbildung zu verstärktem Zellwachstum führen. Genamplifikation und genomische Umlagerung sind in 40% der Glioblastome die für die Überexpression des EGFR zugrunde liegenden Mechanismen^{186,187}. Die genomische Umlagerung führt zur Expression eines verkürzten Rezeptors ohne extrazelluläre Domäne, der eine konstitutive Tyrosinaseaktivität aufweist. Dem veränderten EGFR wird daher eine signifikante Rolle bei der Progression von Tumoren zugeschrieben¹⁸⁸.

Tabelle 3.17 Liste der Top 25 überexprimierten Gene in NCH359 and NCH361 verglichen mit normalem Hirn. P bedeutet anwesend. A bedeutet abwesend in normalem Hirn.

Quellprotein	x-fach Genüberexpression				Normal Hirn
	NCH359	Ligand ^a	NCH361	Ligand ^a	
Mesenchyme homeo box 2	119	-	362	-	A
Epidermal growth factor receptor	338	+	91	-	A
Neuro-oncological ventral antigen 1	52	-	39	-	A
DKFZP434D146 protein	21	-	16	-	A
Cyclin D2	37	-	8	-	A
Hypothetical protein FLJ14117	21	-	14	-	A
SRY (sex determining region Y)-box 11	24	-	9	-	A
Spermatogenesis associated 6	26	-	8	-	A
Tenascin C (hexabrachion)	14	+	15	-	P
Matrilin 2	17	-	11	-	P
Transcription factor SOX-9	14	+	13	+	P
Glypican 1	21	-	8	-	A
Fatty acid binding protein 7. brain	11	-	12	-	P
Chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)	16	-	7	-	P
Forkhead box G1B	11	-	10	-	P
Insulin-like growth factor binding protein 2	16	-	7	-	P
Butyrylcholinesterase	11	-	10	-	P
Sec61 gamma	12	-	9	+	P
Vascular endothelial growth factor	13	-	8	-	P
KIAA0523 protein	16	-	6	-	A
Megalencephalic leukoencephalopathy	9	-	11	-	A
Cannabinoid receptor 1 (brain)	8	-	11	-	P
Hypothetical protein FLJ10748	9	-	10	-	M
Hypothetical protein MGC10772	11	-	9	-	A
Transforming growth factor. beta 2	7	-	13	-	P

^a: HLA-Ligand identifiziert +; kein HLA-Ligand identifiziert –

Eine vergleichende Darstellung der Ergebnisse beider Glioblastome bezüglich der 25 am stärksten überexprimierten Gene ist in Tabelle 3.17 gezeigt, einschließlich der Angabe, ob ein Ligand des überexprimierten Genprodukts gefunden wurde. Von vier Proteinen konnte auf molekularer Ebene mindestens ein HLA-Ligand in einem der beiden Glioblastome identifiziert werden. Vom Transkriptionsfaktor Sox-9 konnte sogar in beiden Tumorpatienten jeweils ein Ligand charakterisiert werden. Bei den Sox-Proteinen handelt es sich allgemein um eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die unter anderem an der Regulation der embryonalen Entwicklung beteiligt sind.

Tenascin C wird bereits im Rahmen von lokalen Antikörpertherapien bei Gliomen als Zielmolekül eingesetzt. Diese Antikörper sind in der Regel mit einem therapeutischen Isotop wie z.B. Yttrium-90 oder Iod-131 gekoppelt und haben bei Glioblastompatienten zu einer verbesserten Überlebenszeit geführt¹⁸⁹⁻¹⁹¹. Allerdings führt diese Art der Therapie auch zu unerwünschten Nebenwirkungen, wie z.B. Strahlennekrose¹⁹². Auch für den EGF-Rezeptor existieren bereits Antikörpertherapien mit radioaktivem Isotop oder Toxin gekoppelt, allerdings nicht im Zusammenhang mit Glioblastompatienten¹⁹³⁻¹⁹⁵. Auch die in Tabelle 3.17 nicht enthaltene, aber dennoch stark überexprimierte RPTPzeta (Tab. 3.15; etwa 6-fach im Patienten NCH359 und etwa 4,5-fach im Patienten NCH361) wurde aufgrund der beschriebenen Wirkung bereits als Zielmolekül für eine Antikörper-vermittelte Therapie von Hirntumoren vorgeschlagen¹⁷⁶.

Die in dieser Arbeit identifizierten HLA-Liganden aus RPTPzeta, Transkriptionsfaktor Sox-9, Sec61, EGFR und Tenascin C könnten nun in Zukunft den Ansatz für eine bei Glioblastomen neuartige Therapie bilden, eine auf T-Zellen basierende Immuntherapie.

3.4 Massenspektrometrische HLA-Liganden-Analysen für die *patientenspezifische* Peptidvakzinierung von Nierenzellkarzinom-Patienten (RCC).

In dieser klinischen Studie werden Nierenzellkarzinome der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen (Prof. Dr. Stenzl) akquiriert und in Zusammenarbeit mit der Abteilung III der Medizinischen Universitätsklinik (Hämatologie/Immunologie (Dr. Brosart) die jeweiligen Patienten mit einem individuell abgestimmten Peptidcocktail geimpft. Die Identifizierung der MHC-Klasse-I-Liganden erfolgt anhand von *online* oder *offline* ESI-MS-Analysen durch die Abteilung Immunologie (C. Lemmel, O. Schoor, J. Dengjel, M. Müller und T. Weinschenk). Die Aufarbeitung des Tumorgewebes für die HLA-Liganden-Identifizierung wird von verschiedenen Medizin-Doktoranden durchgeführt (C. Reichle, B. Krämer, T. Krüger). mRNA-Genexpressionsanalysen erfolgen mit Affymetrix Microarray-Technologie durch O. Schoor.

In Tabelle 3.18 sind alle bisher in dieser Studie untersuchten und behandelten Patienten aufgelistet. Der Patient RCC073 wurde nach erfolgter Tumoranalyse auf eigenen Wunsch nicht geimpft. In der Mehrzahl der Proben konnten über 100 natürliche HLA-Liganden von einem einzelnen Tumor identifiziert werden. Die Ligandenanzahl steht hierbei nur in bedingter Abhängigkeit zur Tumorgroße. Selbst bei einer Tumormasse von nur etwa 2,5 g (RCC112) konnten 83 natürliche HLA-Liganden identifiziert werden, hingegen führte ein Tumor mit einer Masse von ungefähr 10 g zu keinem einzigen identifizierten Peptid. Großen Einfluss auf den Erfolg einer solchen Tumoranalyse haben zum einen die biochemische Tumoraufarbeitung, bei der sowohl der Tumorzellaufschluss als auch der bei der Immunpräzipitation der HLA-Moleküle eingesetzte monoklonale Antikörper eine zentrale Rolle spielen. Zum anderen zeigt sich in der massenspektrometrischen Analyse eine unterschiedliche Sensitivität für die verschiedenen HLA-Allele, in Abhängigkeit von ihren Ankeraminoacidsäuren – Ladungsträger wie basische Aminosäuren sind generell von Vorteil bei der massenspektrometrischen Peptidanalytik. Bei der HLA-Liganden-Analyse sind bis zu 5% der neu identifizierten HLA-Liganden geeignete neue Kandidatenpeptide, die für Vakzinierungszwecke eingesetzt werden können. Mit jedem neuen analysierten Tumorpatienten erhöht sich somit die Anzahl der bekannten tumorassoziierten Peptide, die für folgende Patienten mit passender HLA-Ausstattung zur Verfügung stehen.

Tabelle 3.18 Liste der Nierenzellkarzinom-Impfpatienten der klinischen Phase I-Studie

Patient	HLA- Typisierung	Tumor- Masse	Peptid- Anzahl
RCC068	A*02, A*29, B*15, B*45	20,0 g	105
RCC070	A*01, A*02, B*07, B*08	8,5 g	8
RCC073	A*02, A*03, B*07, B*57	10,0 g	0
RCC075	A*03, B*07, B*40	16,0 g	101
RCC098	A*01, A*03, B*07, B*18	21,0 g	141
RCC103	A*11, A*25, B*15, B*44	10,0 g	80 ^a
RCC112	A*01, A*31, B*08, B*27	2,5 g	83
RCC115	A*02, A*03, B*15, B*18	26,0 g	132
RCC116	A*01, A*02, B*27, B*37	15,8 g	101 ^a

^a: HLA-Liganden Identifizierung noch nicht abgeschlossen.

In den Tabellen 3.19 bis 3.25 sind die für die Vakzinierung ausgewählten Peptide der einzelnen Patienten gezeigt. Die Auswahl der Vakzinierungspeptide erfolgt nach mehreren Gesichtspunkten. Eine Voraussetzung ist, dass das Quellprotein deutlich überexprimiert im Tumor gegenüber dem autologen Normalgewebe vorliegt. Das Kandidaten-Peptid kann dabei entweder aus dem autologen Tumor des zu impfenden Patienten stammen oder ein schon zuvor in einem anderen Patienten identifizierter Ligand sein, der natürlich zur HLA-Allelausstattung des Patienten passen muss. Möglich ist außerdem die Suche nach tumorassoziierten Epitopen in MHC-Datenbanken wie z.B. SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de>), die eventuell schon bekannte für eine Vakzinierung geeignete Epitope enthält. Vorhergesagte Peptide aus bekannten tumorassoziierten Antigenen können für den Fall eingesetzt werden, dass keine Epitope oder Liganden für die entsprechenden HLA-Allele eines Patienten bekannt sind. Allerdings kann an dieser Stelle nicht garantiert werden, welches vorhergesagte Peptid tatsächlich prozessiert und präsentiert wird, d.h. weitere Unsicherheitsfaktoren kommen zur generellen Frage der Induzierbarkeit einer Immunantwort gegen ein spezifisches Peptid noch hinzu. Bei Patient RCC112 wurden deshalb mehrere Peptide von nur zwei Antigenen, RGS5 und Met-Protoonkogen, neben einem ausgewählten Klasse-II-Liganden im Impfcocktail eingesetzt (Tab. 3.24).

Für alle Quellproteine ausgewählter Peptidkandidaten wird zudem die mRNA-Expression in fast allen normalen Geweben und Organen untersucht, entweder in schon existierenden frei verfügbaren Datenbanken, wie z.B. die auf humane Normalgewebe spezialisierte HUGeIndex Datenbank (<http://www.hugeindex.org>) oder wie in unserem Fall in einer im Labor selbst erstellten Normalgewebsdatenbank. Letztere hat den Vorteil, dass die in ihr enthaltenen Daten unter den gleichen experimentellen Bedingungen generiert wurden wie die Patientendaten selbst und so eine bessere Übereinstimmung der Daten zu erwarten ist. Die Untersuchung der mRNA-Normalgewebsexpression ist wichtig für die Abschätzung der Tauglichkeit der Kandidaten-Peptide für einen Impfeinsatz, damit das Risiko von Autoimmunreaktionen und T-Zelltoleranz minimiert werden kann. Die Abbildung 3.14 zeigt das mRNA-Normalgewebsexpressionsprofil für das Met-Protoonkogen für das in 11 Patienten, darunter alle aufgeführten Impfpatienten, im Tumor eine starke Überexpression detektiert wurde und das Gen in allen anderen Geweben nur relativ schwach exprimiert vorlag. Dies ist ein Beispiel für ein Antigen, das als unbedenklich eingestuft und somit als Vakzinierungspeptidquelle ausgewählt werden kann.

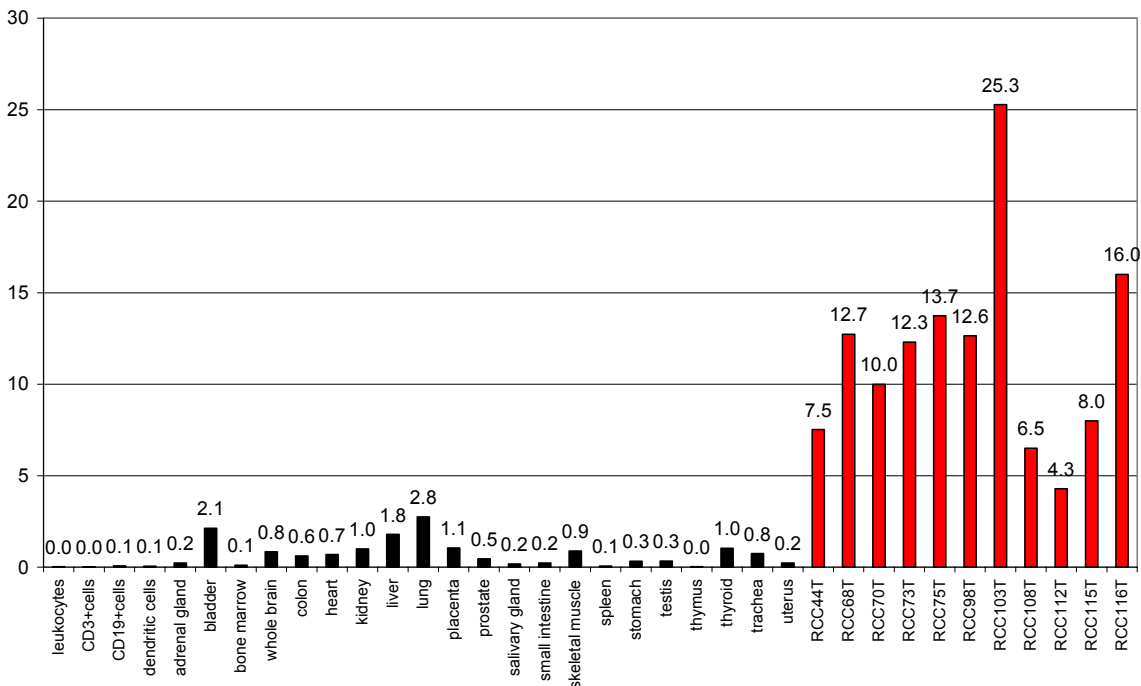


Abbildung 3.14 Genexpressionsdaten für Met-Protoonkogen in Normalgeweben und verschiedenen Nierenzellkarzinom-Patienten (RCC). Expression wurde mit Affymetrix HG-U133A Microarrays gemessen.

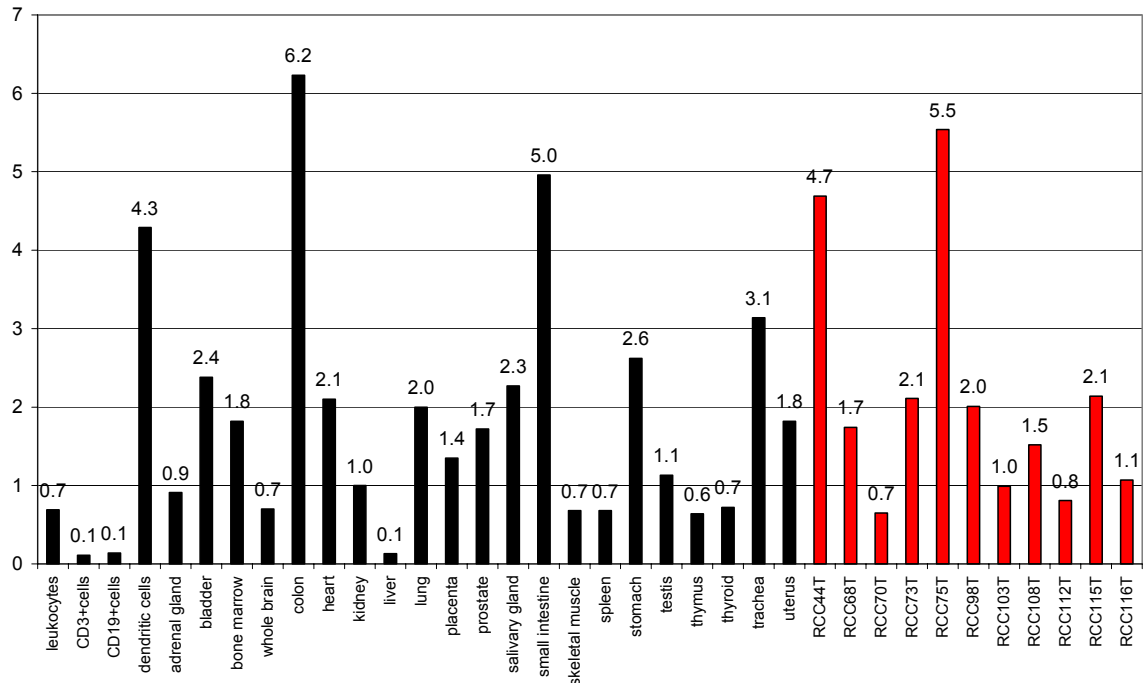


Abbildung 3.15 Genexpressionsdaten für Galektin 3 in Normalgeweben und verschiedenen Nierenzellkarzinom-Patienten (RCC). Expression wurde mit Affymetrix HG-U133A Mikroarrays gemessen.

In Abbildung 3.15 ist ein Negativbeispiel gezeigt, es zeigt die mRNA-Normalgewebsexpression von Galektin 3. Galektin liegt in den meisten RCC Tumoren gegenüber dem autologen normalen Nierengewebe überexprimiert vor, wird jedoch auch in verschiedenen normalen Geweben relativ stark exprimiert. Diese Tatsache führt zum Ausschluss des Galektins 3 als Quelle für mögliche HLA-Liganden bei Vakzinierungen.

Unter Berücksichtigung der zuvor beschriebenen Voraussetzungen wird generell versucht die PeptidAuswahl so zu treffen, dass mehrere HLA-Allele des Patienten, wenn möglich MHC-Klasse-I und -II, sowie Liganden aus verschiedenen überexprimierten Proteinen berücksichtigt werden. Diese Strategie soll einem Entkommen des Tumors, z.B. durch immunselektiven Antigenverlust, entgegen wirken und einer ungleichen Proteinexpression in heterogenen Tumoren Rechnung tragen.

Als Konsequenz finden sich in den Vakzinierungscocktails zum einen HLA-Liganden aus bekannten tumorassoziierten Proteinen bei denen schon nachweisbare T-Zellantworten vorliegen, wie beispielsweise bei Survivin (BIRC5)¹⁹⁷⁻¹⁹⁹, Met-Protoonkogen (Met) (Schag im Druck in Clin Cancer Res; 2004;), Adipophilin (ADFP)²⁰⁰, Cyclin D1 (CCND1)²⁰¹, Mucin (Muc1)^{202,203}, CA9 (*Carbonic anhydrase 9*)²⁰⁴ und PRAME (*Preferentially expressed antigen of melanoma*)²⁰⁵. Zum anderen werden auch neu identifizierte Liganden aus Proteinen, wie z.B. RGS5 (*G protein signalling protein 5*)²⁰⁶ und Cyp1B1 (*cytochrome*

P450 family 1, subfamily B, polypeptide 1)^{207,208}, die als tumorassoziierte Proteine in der Literatur bereits beschrieben sind und ein gutes Normalgewebsprofil aufweisen, verwendet. Hoffnung bieten außerdem Liganden, deren Quellproteine bisher bezüglich ihrer Tumorassoziierung noch nicht in der Literatur erwähnt sind, wie z.B. APOL-1 (*Apolipoprotein 1*), FACLA (*Synaptotagmin binding protein*) oder NSAP1 (*Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4*). Dies sind Liganden aus Proteinen, die aufgrund der Erfüllung der beschriebenen Kriterien ebenfalls als Impfstoff eingesetzt werden. So wurde z.B. ein Ligand aus dem Protein RGS5 als interessanter Kandidat von uns für die Impfung ausgewählt, bevor in einem Seminarvortrag in Tübingen im Jahr 2003 durch Ruth Ganss die Relevanz dieses Proteins experimentell gezeigt und später durch die Veröffentlichung von Furuya 2004 bestätigt wurde.

Zudem wird in der Regel das künstlich entworfene MHC-Klasse-II-Epitop PADRE (*Pan DR reactive epitope*), das in der Lage ist an verschiedene DR-Moleküle zu binden und erwiesenermaßen T-Zellreaktionen hervorruft, hinzugefügt, um eine T-Zellhilfe zu induzieren²⁰⁹.

Tabelle 3.19 Impfpeptide für den Nierenzellkarzinompatienten RCC68

HLA	Vakzin	Gen	Sequenz	Länge
A*02	Survivin	BIRC5	ELTLGEFLKL	10
A*02	Met	MET	YVDPVITSI	9
A*02	G250	CA9	HLSTAFARV	9
A*02	Adipophilin	ADFP	SVASTITGV	9
A*02	CyclinD-1	CCND1	LLGATCMFV	9
A*02	CyclinD-2	CCND1	RLTRFLSRV	9
A*02	MUC-1	MUC1	STAPPVHNV	9
A*02	MUC-2	MUC1	LLLLTVLTV	10
A*02	PRAME-1	PRAME	SLLQHLIGL	9
DR	PADRE	-	aKXVAAWTLKAAa	13

Tabelle 3.20 Impfpeptide für den Nierenzellkarzinompatienten RCC70

HLA	Vakzin	Gen	Sequenz	Länge
A*02	Met	MET	YVDPVITSI	9
A*02	G250	CA9	HLSTAFARV	9
A*02	Adipophilin	ADFP	SVASTITGV	9
A*02	CyclinD-1	CCND1	LLGATCMFV	9
A*02	CyclinD-2	CCND1	RLTRFLSRV	9
A*02	MUC-1	MUC1	STAPPVHNV	9
A*02	MUC-2	MUC1	LLLLTVLTV	10
A*02	PRAME-1	PRAME	SLLQHLIGL	9
DR	PADRE	-	aKXVAAWTLKAAa	13

Tabelle 3.21 Impfpeptide für den Nierenzellkarzinompatienten RCC73

HLA	Vakzin	Gen	Sequenz	Länge
A*02	Adipophilin	ADFP	SVASTITGV	9
A*02	Met	MET	YVDPVITSI	9
A*02	G250	CA9	HLSTAFARV	9
A*02	CyclinD-1	CCND1	LLGATCMFV	9
A*02	CyclinD-2	CCND1	RLTRFLSRV	9
A*02	MUC-1	MUC1	STAPPVHNV	9
A*02	MUC-2	MUC1	LLLLTVLTV	9
DR	PADRE	-	aKXVAAWTLKAAa-NH ₂	13

Tabelle 3.22 Impfpeptide für den Nierenzellkarzinompatienten RCC75

HLA	Vakzin	Gen	Sequenz	Länge
A*03	EF1e	EEF1E1	TLADILLYY	9
A*03	FACL4	FACL4	KLFDHAVSKF	10
A*03	NSAP1	NSAP1	GLTDVILYH	9
B*07	FACL4	FACL4	VPNQKRLTLL	10
DR	PADRE	-	aKXVAAWTLKAAa	13

Tabelle 3.23 Impfpeptide für den Nierenzellkarzinompatienten RCC98

HLA	Vakzin	Gen	Sequenz	Länge
A*03	RGS5	RGS5	GLASFKSFLK	10
A*03	Adipophilin	ADFP	SLLTSSKGQLQK	12
A*03	MMP7	MMP7	SLFPNSPKWTSK	12
A*03	Adipophilin	ADFP	TSALPIIQK	9
B*07	Adipophilin	ADFP	IARNLTQQL	9
B*07	IBP3	IGFBP3	RPTLWAAAL	9
B*07	CD70	-	GPALGRSFL	9
B*18	NY-CO-37	USH1C	DEIVRINGY	9
DR	PADRE	-	aKXVAAWTLKAAa	13

Tabelle 3.24: Impfpeptide für den Nierenzellkarzinompatienten RCC112

HLA	Vakzin	Gen	Sequenz	Länge
A*01	RGS-3	RGS5	SLDKLLQNNY	10
A*01	RGS-4	RGS5	NLEFWIACEDY	11
A*01	RGS-5	RGS5	MAEKAKQIY	9
B*08	RGS-6	RGS5	EIKIKLGIL	9
A*01	MET-2	MET	KSEMNVNMKY	10
A*01	MET-3	MET	MLDGILSKY	9
B*08	MET-4	MET	AVKLIKIDL	9
B*08	MET-5	MET	WLKKRKQI	9
DR	PADRE	-	aKXVAAWTLKAAa	13

Tabelle 3.25: Impfpeptide für den Nierenzellkarzinompatienten RCC115

HLA	Vakzin	Gen	Sequenz	Länge
A*02	APOL-1	APOL1	FLGENISNFL	9
A*02	APOL-2	APOL1	ALADGVQKV	9
A*02	RGS-2	RGS5	LAALPHSCL	9
A*02	CYP-1	CYP1B1	FLDPRPLTV	9
A*02	MET-1	MET	YVDPVITSI	9
A*02	MUC-1	MUC1	STAPPVHNV	9
A*02	MUC-2	MUC1	LLLLTVLTV	9
A*03	RGS-1	RGS5	GLASFKSFLK	10
A*03	FMO-1	FMO1	ILNSWNISK	9
A*03	ADFP-2	ADFP	SLLTSSKGQLQK	12
A*03	ADFP-3	ADFP	TSALPIIQK	9
DR	PADRE	-	aKXVAAWTLKAAa	13

Die bisherigen Ergebnisse dieser klinischen Impfstudie sind nicht viel versprechend, da keiner der Patienten bisher eine klinische Antwort gezeigt hat. Jedoch ist zu beachten, dass sich die Patienten in einem sehr fortgeschrittenen Krankheitsstadium befinden, da neben einem guten Allgemeinzustand die Ausbildung eines Primärtumors in Verbindung mit Metastasen als Eingangskriterium in die Studie gefordert ist. Metastasen sind eine geforderte Voraussetzung, damit ein Therapieerfolg anhand der Metastasenrückbildung nachweisbar ist. Diese Voraussetzungen führen zu einer sehr schlechten Prognose für den Patienten. Die meisten Patienten werden daher schon während der ersten Vakzinierungen progredient, also zu einem Zeitpunkt zu dem noch keine T-Zellantwort zu erwarten ist.

3.4.1 Zusammenfassung und Ausblick: Identifizierung neuer HLA-Liganden aus Tumorantigenen für immuntherapeutische Ansätze

Die Identifizierung von bisher maximal 140 HLA-Liganden ausgehend von nur einem einzelnen Tumorgewebsstück begründet sich auf einer optimalen Aufarbeitung des Tumorgewebes. Die Tumoraufarbeitung erfolgt mit hochspezifischen und hochaffinen monoklonalen Antikörpern zum einen und sehr sensitiven analytischen Methoden, wie die *online* mit Elektrospray-Massenspektrometrie gekoppelte Kapillar-Chromatographie.

Diese guten Erfolge in der HLA-Liganden Identifizierung können bei den verschiedensten Tumortypen erzielt werden. So wäre auch für alle in dieser Dissertation untersuchten Tumorarten, wie das Kolonkarzinom, Magenkarzinom und das Glioblastom in Zukunft eine Impfung basierend auf HLA-Peptiden vorstellbar. Trotzdem beträgt der Anteil der identifizierten HLA-Liganden pro Tumor bezüglich des gesamten MHC-Ligandoms bisher nur etwa 1%, da etwa 10.000 verschiedene HLA-Liganden auf einer Zelle zu erwarten sind²¹⁰. Grundsätzlich gilt natürlich, je mehr HLA-Liganden identifiziert werden können, desto größer sind die Chancen auf, in der Immuntherapie wirksame Epitope aus Tumorantigenen zu stoßen. Deshalb bleibt als wichtiges Ziel für die Zukunft die stete Verbesserung der biochemischen Aufarbeitung von soliden Tumoren als auch die Erhöhung der Sensitivität der angewandten analytischen Methoden. Differenzielle quantitative Analysen der HLA-Liganden von Tumor- und Normalgewebspaaren können zudem die Selektion von T-Zellzielstrukturen in Zukunft erleichtern. Die Detektion von selektiv auf Tumorgewebe überpräsentierten HLA-Liganden würde den Vorteil bieten, dass das direkte Zielmolekül der T-Zellen identifiziert und quantitativ beurteilt würde. Die differenzielle Quantifizierung von HLA-Liganden wird im Ergebnisteil 3.5 dieser Arbeit detaillierter diskutiert.

Je mehr Patienten untersucht werden, desto mehr Liganden werden als potentielle Impfstoffe vorhanden sein und auch tumorübergreifende Quellproteine und damit HLA-Peptide können identifiziert werden, wie z.B. das Met-Protoonkogen. Sie würden die Grundlage für eine universelle Impfmischung bilden, die in Patienten mit verschiedenen Tumorerkrankungen einsetzbar wäre.

3.4 Differenzielle quantitative Analyse von MHC-Liganden mittels stabiler Isotopenmarkierung.

Die MHC-Moleküle einer Zelle präsentieren bekanntlich nicht nur Selbstpeptide, sondern im Fall von Virusinfektion oder Tumorentwicklung auch Peptide, die vom infektiösen Pathogen oder aus tumorassoziierten Proteinen stammen²¹¹⁻²¹³. Ihre Erkennung durch T-Zellen kann schließlich zu einer Immunantwort führen²¹⁴. Konsequenter Weise ist speziell die Identifizierung dieser antigenen Peptide von elementarer Bedeutung für die Entwicklung von Impfstoffen.

Die MHC-Klasse-I-Ligandenanalyse ist jedoch aufgrund der extremen Peptidkomplexität von mehreren Tausend verschiedener Sequenzen pro Zelle mit stark variierenden Abundanzen sehr anspruchsvoll^{215,216}. Zudem ist die Erkennung von viralen oder tumorassoziierten HLA-Liganden eine weitere Herausforderung. Eine differenzielle quantitative Untersuchung von relevanten Antigenen bei Paaren wie Tumor und Normalgewebe bzw. infizierten und nicht infizierten Zellen erfolgte bisher entweder mittels Genexpressionsanalysen²¹⁷ oder konventioneller Proteomanalyse²¹⁸. Beides sind jedoch Methoden, die keine direkten Informationen über MHC-präsentierte Peptide liefern. Rückschlüsse auf MHC-Ligandenpräsentation aufgrund von Unterschieden auf mRNA- bzw. Proteinebene zu ziehen, birgt die Gefahr von Fehlschlüssen in sich, da z.B. zunehmend Hinweise existieren, dass bestimmte Epitope nur auf Tumorzellen präsentiert werden, obgleich das Quellprotein in gleichen Mengen in beiden Zelltypen vorhanden ist²¹⁹. Auch gibt es zunehmend Beweise für Unterschiede der Peptidpools, die vom Immunproteasom bzw. dem konstitutiven Proteasom generiert werden²²⁰⁻²²². Die zuverlässigste Informationsquelle für HLA-Epitope scheinen daher die MHC-Liganden selbst zu sein und nicht die ihnen zugrunde liegende mRNA oder Proteine.

Quantitative Aspekte der MHC-Ligandenpräsentation konnten bisher jedoch nur unter Einsatz von Kalibrierungspeptiden in der *online* LCMS-Analyse untersucht werden. Die Verwendung von Peptiden zu Kalibrierungszwecken bei quantitativen Untersuchungen ist notwendig, da es sich bei der Massenspektrometrie um eine zwar sehr sensitive aber nur semi-quantitative Methode handelt. Zur differenziellen Untersuchung des MHC-Ligandoms wäre dieser experimentelle Ansatz jedoch zur Quantifizierung nicht durchführbar, da die synthetische Herstellung und Kalibrierung aller MHC-Peptide nötig wäre. In dieser Dissertation wurde deshalb die Entwicklung einer neuartigen differenziellen quantitativen

tativen Methode zur Untersuchung des MHC-Ligandoms von Gewebs- oder Zelllinienpaaren angestrebt. Sie soll generell helfen, Unterschiede in der MHC-Peptidpräsentation z.B. Tumorzellen gegenüber Normalgewebszellen oder virusinfizierten gegenüber nicht infizierten Zellen zu detektieren. Schließlich könnte mithilfe einer solchen Methode auch die Korrelation zwischen mRNA-Expression und HLA-Peptidpräsentation untersucht werden. Während der letzten Jahre wurden große Fortschritte bei der Charakterisierung des Proteoms verschiedener Zellstadien erzielt. Die Proteome verschiedenster Zellen wurden mittels differenzieller quantitativer Proteinanalysen untersucht. In Proteinquantifizierungen dieser Art wird häufig vor dem tryptischen Proteinverdau eine Isotop-kodierte Affinitäts-Markierung (ICAT- *isotope-coded affinity tag*) eingesetzt. ICAT trägt eine reaktive Gruppe, die an Sulfhydrylgruppen koppelt und somit spezifisch mit Cysteinresten in Proteinen reagiert. Die Komplexizität des Peptidgemisches nach tryptischem Verdau wird in dem verwendeten Reagenz mittels eines Affinitätstags reduziert. Ein eingefügtes stabiles Isotop (z.B. Deuterium ^2D / Wasserstoff ^1H oder Kohlenstoff ^{13}C / Kohlenstoff ^{12}C) ermöglicht eine hochsensitive differenzielle Peptidquantifizierung in der massenspektrometrischen Analyse²²³. Inzwischen wurden auch andere Methoden entwickelt, die alle speziell auf eine Quantifizierung von Peptiden abzielen, die aus einem für die Proteomanalytik typischen tryptischen Proteinverdau stammen²²⁴⁻²²⁶. Leider besitzen MHC-bindende Peptide selten Cysteinreste und sind daher nicht zugänglich für Sulfhydrylreagenzien. Somit können sie mit der ICAT-Methode nicht detektiert und quantifiziert werden.

In dieser Arbeit wurden zwei Cystein-unabhängige Methoden entwickelt, die für eine vereinfachte Identifizierung von pathogen-stämmigen oder tumorassoziierten Epitopen geeignet sind. Sie basieren ebenso auf einer Markierung von Peptiden mit stabilen Isotopen, die eine differenzielle quantitative Analyse in massenspektrometrischen Experimenten erlauben. Neben einer N-terminalen Acetylierung wurde eine Kombination aus Guanidinylierung und Nikotinylierung zur differenziellen quantitativen Analyse von MHC-Liganden aus zwei verschiedenen Quellen entwickelt. Die Methoden wurden mit synthetischen Peptiden optimiert, an natürlichen HLA-Ligandenproben getestet und ihre Fehlerrate bestimmt. Schließlich wurden beide Methoden für differenzielle Quantifizierungen unterschiedlicher natürlicher HLA-Ligandenproben eingesetzt.

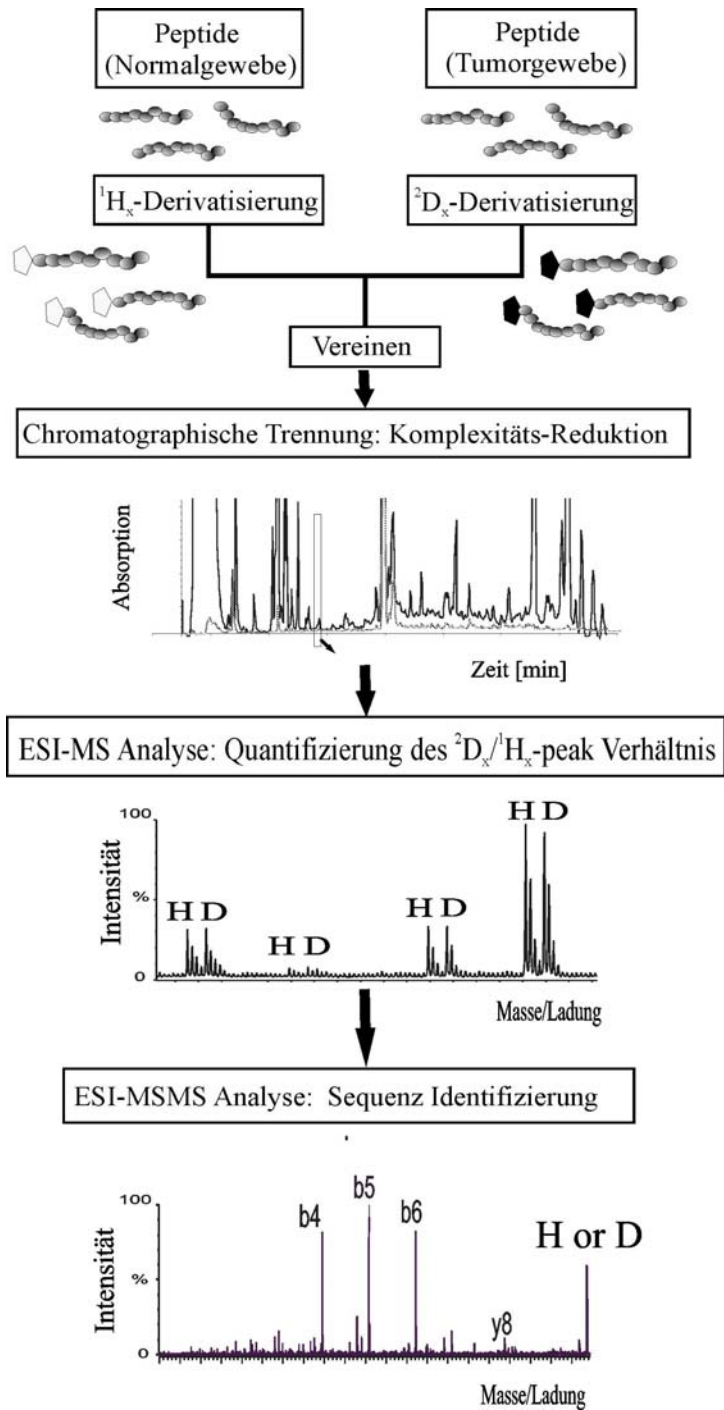


Abbildung 3.16 Prinzip der differentiellen Quantifizierung von MHC-Liganden. MHC-Liganden aus zwei unterschiedlichen Quellen (z.B. Tumor- und Normalgewebe) werden N-terminal derivatisiert mit $^1\text{H}_x$ - oder $^2\text{D}_x$ -Reagenz (Reagenzien: Acetanhydrid oder Nic-NHS-Ester) und anschließend vereinigt. Nach Komplexitätsreduktion mittels HPLC werden die Peptide anhand von ESI-MS-Analyse entsprechend ihrer Peakfläche quantifiziert. Ein derivatisiertes Peptidpaar (H, $^1\text{H}_x$ -Derivatisierung; D, $^2\text{D}_x$ -Derivatisierung) ist physikalisch-chemisch identisch und einfach detektierbar, da es im chromatographischen System im wesentlichen koeluiert. Zudem wird eine konstante Massendifferenz in den massenspektrometrischen Scans gemessen. Diese Differenz ist abhängig von der Anzahl der stabilen Isotope im Peptidderivat ($[\text{M}+\text{H}]^+$: Acetylierung: 3 m/z; Nikotinylierung: 4 m/z; $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$: Acetylierung: 1,5 m/z; Nikotinylierung: 2 m/z).

Das grundlegende Prinzip dieser Methoden ist in Abbildung 3.16 dargestellt. MHC-Peptide aus zwei unterschiedlichen Quellen werden entweder mit einem ein leichtes Isotop enthaltenden Reagenz (Wasserstoff) oder mit einem ein schweres Isotop enthaltenden Reagenz (Deuterium) derivatisiert. Gleiche Peptidsequenzen aus unterschiedlichen Quellen erhalten somit eine Differenz in ihrer Masse, jedoch weisen beide nach wie vor das gleiche physikalisch-chemische Verhalten auf. Dies ist von Bedeutung bei der nachfolgenden chromatographischen Auftrennung der Liganden, die nach der Mischung der beiden unterschiedlich derivatisierten Peptidpools durchgeführt wird und bei der Derivate der gleichen Sequenz im wesentlichen koeluiieren. Sowohl *offline* HPLC als auch *online* LC-MS-Techniken können zur Reduktion der Komplexität der Peptidpools eingesetzt werden. Im Anschluss wird zuerst ein ESI-MS-Experiment für eine möglichst genaue differenzielle Ligandenquantifizierung durchgeführt. Die Sequenzinformationen der quantifizierten MHC-Liganden werden im Folgenden in einem Tandem-MS-Experiment und der anschließenden Interpretation der Fragmentspektren unter zu Hilfenahme computerunterstützter Datenbanksuche ermittelt.

3.5.1 Differenzielle quantitative Acetylierung von HLA-Liganden.

Die Acetylierung freier Aminogruppen ist eine sehr alte Methode der Protein- bzw. Peptid-Derivatisierung, die sehr einfach und schnell durchführbar ist²²⁷. Auch im Bereich der massenspektrometrischen Analytik findet sie schon seit langem Anwendung. Bei dieser Methode werden sowohl N-Terminus als auch im geringeren Maße die ϵ -Aminogruppe von Lysinresten in Peptiden acetyliert. Dies führt aufgrund so erhaltener Zusatzinformationen zur Vereinfachung der Interpretation der Fragmentspektren. So weist das Fragmentenspektrum eines N-terminal acetylierten Peptids für b-Ionen eine charakteristische Massenverschiebung von $\Delta m = 42$ Da im Vergleich zu b-Ionen der nicht-modifizierten Form auf. Dadurch wird eine eindeutige Zuordnung von y- und b-Ionen möglich, wenn beide Spektren vorliegen.

Im Fall einer Anwendung der Acetylierung zur differenziellen Quantifizierung von Peptiden kommt es zu einer Massendifferenz von 3 Da zwischen den erhaltenen Peptidderivaten, da nach Acetylierung drei Wasserstoffatome bzw. drei Deuteriumatome im Peptid vorliegen. Für eine erfolgreiche Quantifizierung ist eine unabdingbare Voraussetzung die 100%ige Derivatisierung der N-Termini, da durch sie die Massendifferenz der Peptide der

verschiedenen Quellen erfolgt. Hierzu wurde das bereits im Labor existierende Acetylierungsprotokoll optimiert. Als Modifizierungsreagenz wurde in den Optimierungsansätzen Essigsäureanhydrid bzw. deuteriertes Essigsäureanhydrid eingesetzt, welches sich durch seine hohe Aminogruppen-Spezifität und schnelle Reaktivität selbst unter milden Bedingungen auszeichnet. Außerdem sind beide Reagenzien günstig kommerziell erhältlich.

3.5.1.1 Optimierung der Acetylierung für die differenzielle quantitative HLA-Liganden-Analyse.

Die Acetylierung von Peptiden wurde experimentell unter Verwendung von synthetischen Nonamer- und Decamer-Peptiden optimiert (Tab. 3.26; Abb. 3.17.A). Eine vollständige N-terminale Acetylierung der Peptide konnte nach einer Reaktionszeit von 15 min bei 22°C nach der im Methodenteil beschriebenen Behandlung erreicht werden. Allerdings war eine partielle Modifizierung der ϵ -Aminogruppen bei lysinhaltigen Peptiden, wie in Abbildung 3.17.B für die Peptide ALSPYVNKT (B) und IQKAFDDIA (C) zu sehen ist, nicht zu vermeiden.

Tabelle 3.26 Synthetische Peptide eingesetzt bei der Optimierung der Acetylierung; Erwartete Massen $[M+H]^+$ nach der Acetylierungsreaktion sind in Fettdruck gezeigt.

Code	Peptidsequenz	$[M+H]^+$	$[M+H]^+$ einfach acetyliert	$[M+H]^+$ doppelt acetyliert
A	LIGDDVDSV	932,45	974,45	1016,45
B	ALSPYVNKT	992,53	1034,53	1076,53
C	IQKAFDDIA	1020,53	1062,53	1104,53
D	YLPISGVSSV	1021,55	1063,55	1105,53
E	FLPSDFFPSV	1155,56	1197,56	1239,56

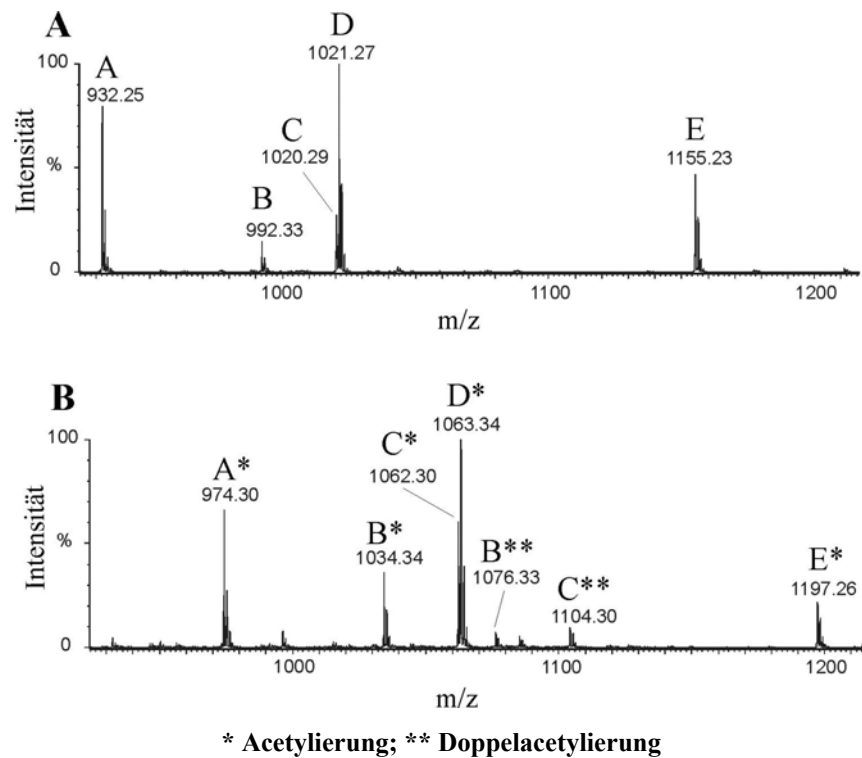


Abbildung 3.17 Massenspektrum (A) nicht modifizierter und (B) acetylierter synthetischer Peptide.

3.5.1.2 Test auf Zuverlässigkeit und Bestimmung der Fehlerrate der optimierten Acetylierungsmethode an einer natürlichen HLA-Ligandenmischung - Differenzielle quantitative massenspektrometrische Analyse von HLA-Liganden extrahiert von MGAR-Zellen.

Zur Demonstration der Anwendbarkeit der Acetylierungsmethode für eine differenzielle Quantifizierung natürlicher HLA-Liganden wurden von MGAR-Zellen extrahierte Peptide mittels *offline* HPLC aufgetrennt und eine Fraktion nach Abnahme einer geringen Menge für Vergleichszwecke in zwei gleiche Teile geteilt. Ein Teil wurde mit $^1\text{H}_6$ -Essigsäureanhydrid und der andere Teil mit $^2\text{D}_6$ -Essigsäureanhydrid acetyliert. Nach der Derivatisierung wurden beide Teile für eine differenzielle massenspektrometrische Quantifizierung wiedervereinigt. Abbildung 3.18 zeigt beispielhaft die nicht modifizierte Variante (A) und die $^1\text{H}_3$ - und $^2\text{D}_3$ -Varianten eines Peptids (B) der Aminosäuresequenz EVNGLISMY ($\text{MW}_{\text{unmodifiziert}} = 1040,5 \text{ Da}$) (D), welches aus dem U5 snRNP-spezifischen Protein stammt. Die Acetylierung führt neben der Möglichkeit zur differenziellen Quantifizierung zur erwähnten Verschiebung der b-Ionenserie um 42 Da von nicht modifizierten gegenüber $^1\text{H}_3$ -acetylierten Peptiden bzw. um 3 Da von $^1\text{H}_3$ -acetylierten gegenüber $^2\text{D}_3$ -

acetylierten Peptiden. Diese eindeutige Identifizierbarkeit von b-Ionen erzeugt somit eine Vereinfachung bei der Auswertung der Fragmentspektren (C).

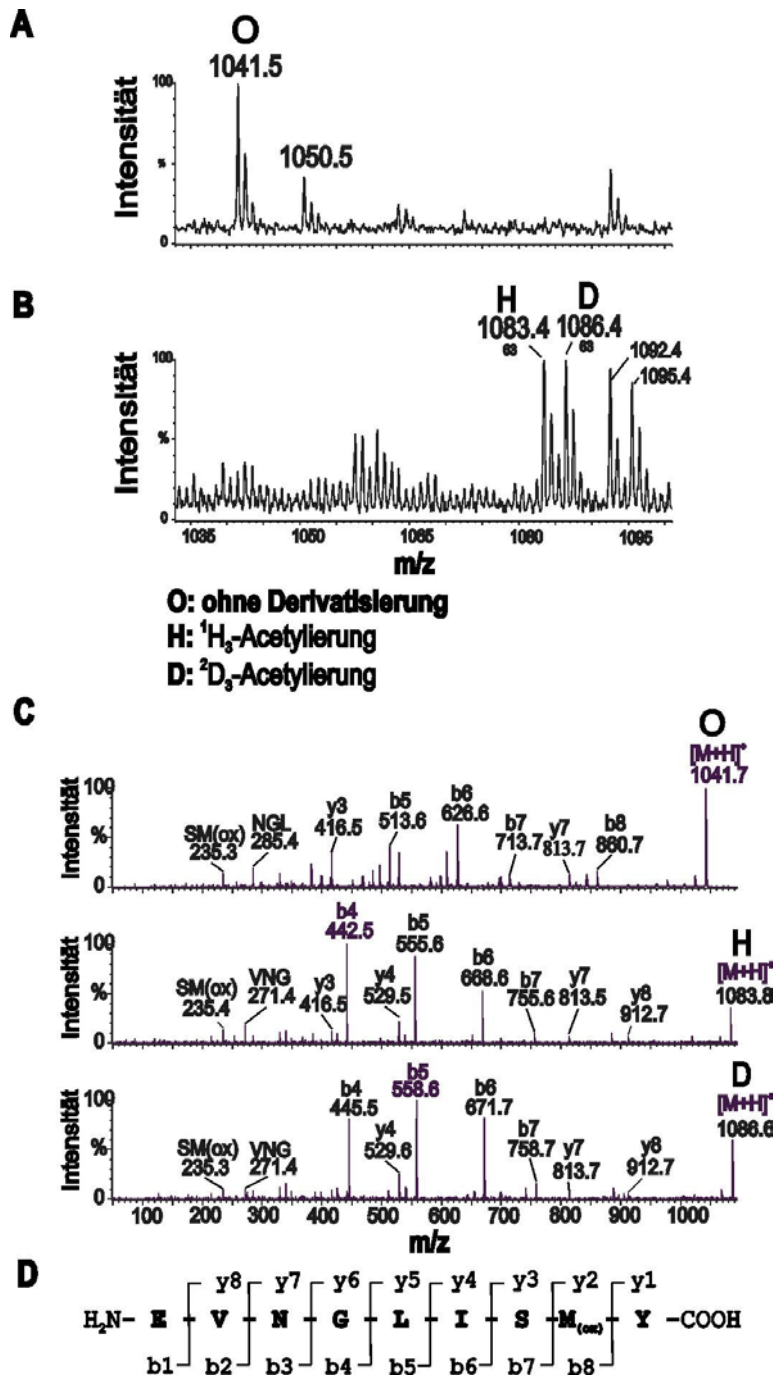


Abbildung 3.18 Massenspektren von (A) nicht modifizierten und (B) ¹H₃-/²D₃-acetylierten HLA-Peptiden extrahiert von MGAR-Zellen. (C) Fragmentspektrum von [M+H]⁺ des Peptids EVNGLISM(Y) nicht modifiziert, ¹H₃-acetyliert und ²D₃-acetyliert. (D) Nomenklatur der Fragment-Ionen.

Das Verhältnis zwischen $^1\text{H}_3$ - und $^2\text{D}_3$ -Varianten des in Abbildung 3.18.B dargestellten Peptids betrug 1,0. Für weitere 15 Peptide, die entweder als einfach oder zweifach geladene Ionen massenspektrometrisch detektiert wurden, betrug das $^1\text{H}_3$ - und $^2\text{D}_3$ -Verhältnis im arithmetischen Mittel 1,01. Die Standardabweichung (SD) lag bei $\pm 0,13$ (Tabelle 3.27), welches auf eine hohe Zuverlässigkeit der Methode hindeutet. Doppelt geladene Ionen zeigen dabei generell eine dramatisch höhere Intensität als einfach geladene Ionen.

Tabelle 3.27 Massenspektrometrische Signalintensitäten und $^2\text{D}_3$ -/ $^1\text{H}_3$ -Verhältnisse einer äquimolaren Mischung von $^1\text{H}_3$ - und $^2\text{D}_3$ -acetylierten HLA-Peptiden, die von MGAR-Zellen extrahiert wurden. Doppelt geladene Ionen zeigen eine dramatisch höhere Intensität als $[\text{M}+\text{H}]^+$ Ionen. Die aufgelisteten Signale der $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ stammen von anderen Sequenzen als die der $[\text{M}+\text{H}]^+$ Signale. Eine hohe Zuverlässigkeit der Methode zeigt sich in der für diesen Probensatz ermittelten niedrigen Standardabweichung.

Peptid Ladungs- zustand	m/z			Ratio ($^2\text{D}_3$ / $^1\text{H}_3$)- Peptidsignal
	($^1\text{H}_3$ -acetylierte Spezies)	$^1\text{H}_3$ -Peptidsignal [Ionenzahl]	$^2\text{D}_3$ -Peptidsignal [Ionenzahl]	
$[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$	554,45	409	361	0,88
	567,99	590	511	0,86
	574,50	316	306	0,96
	578,52	884	877	0,99
	582,01	615	598	0,97
	597,96	612	800	1,30
	604,95	499	558	1,11
	612,49	515	502	0,97
	941,49	33	32	0,97
	992,51	39	51	1,30
$[\text{M}+\text{H}]^+$	1028,55	23	20	0,87
	1039,47	21	22	1,04
	1057,56	30	32	1,06
	1083,48	63	63	1,00
	1092,47	59	54	0,92
	1170,47	77	70	0,90
	Mittelwert			1,01
	Standardabweichung			$\pm 0,13$

3.5.1.3 Differenzielle quantitative massenspektrometrische Analyse der HLA-Liganden aus einem Tumor/Normalgewebepaar des Kolonkarzinompatienten CCA128.

Peptid-Liganden wurden wie beschrieben von MHC-Klasse-I-Molekülen einer Kolonkarzinomprobe (CCA1289) und einer Probe des den chirurgisch entfernten Tumor umgebenden Normalgewebes isoliert und im Anschluss durch $^2\text{D}_3$ - (Tumor) und $^1\text{H}_3$ - (normales Gewebe) Acetylierung chemisch modifiziert. Nach Vereinigung der modifizierten Proben und chromatographischer Auftrennung mittels *offline* HPLC wurden 19 Peptide durch nano-ESI-MS Analyse identifiziert (Tab. 3.28). Von diesen 19 HLA-Liganden konnten 17 Peptide über das relative Intensitätsverhältnis differenziell quantifiziert werden. Die Mehrzahl der identifizierten Peptide lag in beiden untersuchten Proben in ähnlichen Mengen vor ($^2\text{D}_3$ -/ $^1\text{H}_3$ -Verhältnisse zwischen 1,07 und 2,42). Insgesamt war in der Tumorprobe etwa die 1,7-fache Peptidmenge im Vergleich zur Normalgewebeprobe vorhanden (Abb. 3.19.A, linkes Spektrum). Zwei Peptide waren im Tumorgewebe überpräsentiert (ein Beispiel gezeigt in Abb. 3.19.A, mittleres Spektrum), ein Peptid war im Tumor unterpräsentiert (Abb. 3.19.A, rechtes Spektrum). Die statistische Auswertung der Ergebnisse unter Anwendung des „Student-t-Test“ bestätigte, dass nur die zwei überpräsentierten und das unterpräsentierte Peptid außerhalb eines 99,99%igen Konfidenzintervalls von 0,87 bis 2,56 lagen (Tab. 3.28) und somit signifikant über- bzw. unterpräsentiert wurden. In Abbildung 3.19.B sind exemplarisch die Fragmentspektren des $^1\text{H}_3$ - (oberes Spektrum) und $^2\text{D}_3$ -acetylierten Peptids (unteres Spektrum) DAAHPTNVQR aus Beta-Catenin gezeigt.

Tabelle 3.28 Liste natürlicher HLA-Liganden des Tumor- und Normalgewebes eines Kolonkarzinompatienten (HLA-A*01, A*68, B*08, B*44). Extrahierte HLA-Peptide wurden mit $^2\text{D}_6$ -Essigsäureanhydrid (Tumor) und $^1\text{H}_6$ -Essigsäureanhydrid (Normal) modifiziert und anschließend nach HPLC-Auftrennung mittels ESI-MSMS-Analyse identifiziert. Anhand ihrer $^2\text{D}_3/^1\text{H}_3$ -Peptidverhältnisse wurden die Peptide von Tumor im Vergleich zu Normalgewebe relativ quantifiziert. Zur Beurteilung einer signifikanten Über- oder Unterpräsentation der HLA-Liganden wurde der Student-t-Test auf die $^2\text{D}_3/^1\text{H}_3$ -Verhältnisdaten angewendet.

Sequenz (HLA Anker in Fettdruck)	HLA	Quellprotein	As- Position	Ratio ($^2\text{D}_3/^1\text{H}_3$)
T T E Q H G A R Y	A*01	Tapasin	372-380	n.b.
F T K V K P L L	B*08	Myosin heavy chain, nonmuscle A	831-838	n.b.
V A V G V A R A R	A*68	Poly IG receptor	656-664	0,69
D V S H T V V L R	A*68	Translocon-associated protein β -SU	88-96	1,07
T L G D I V F K R	A*68	Fatty acid-bindin protein, liver	114-122	1,14
D I H H K V L S L	B*08	Ras-GAP SH3 binding protein 2	60-68	1,30
E V T R I L D G K	A*68	SH3BGR3-like protein	23-31	1,32
R V A P E E H P V L	n.a.	Actin, cytoplasmic 1	94-103	1,39
T T A E R E I V R	A*68	Actin alpha	204-212	1,45
S I F D G R V V A K	A*68	Putative membrane protein (PNAS10)	88-97	1,45
E A G P S I V H R	A*68	Actin alpha	366-374	1,51
D T A A Q I T Q R	A*68	MHC class I antigen (HLA-B)	136-144	1,61
D T I E I I T D R	A*68	HNRP A2/B1	139-147	1,66
E S T G S I A K R	A*68	Aldolase A	34-42	1,73
A V A A V A A R R	A*68	Glucosidase II alpha subunit	3-11	1,91
T A A D T A A Q I T R	A*68	MHC class I antigen (HLA-B)	133-144	2,19
E S G P S I V H R	A*68	Actin beta	364-372	2,42
D A A H P T N V Q R	A*68	Beta-Catenin	115-124	3,02
S L A D I M A K R	A*68	Ribosomal protein L24	86-94	3,27
Mittelwert				1.71
Standardabweichung				± 0.68
Student-t-Test: Vertrauensintervall 99,99 % (n = 17)				0.87 - 2.56

n.a.: Nicht angegeben; n.b.: Nicht bestimmt

Die beiden im Tumor überpräsentierten Peptide stammen aus den humanen ribosomalen Protein L24 und Beta-Catenin. Derweil keine Daten bezüglich einer Tumorassoziation für das ribosomale Protein L24 existieren, wurde für das mit dem „ribosomal protein 24“ verwandte „ribosomal protein L15“ eine Rolle in der Entstehung von Speiseröhrenkrebs beschrieben²²⁸. Für Beta-Catenin hingegen wurde eine Funktion als Onkogen, das durch Transaktivierung andere Onkogene wie z.B. die Matrix-Metallproteinase MMP-7 anschaltet beschrieben²²⁹. Zudem wurde bereits ein mutiertes Beta-Catenin-Peptid als Zielstruktur in Verbindung mit dem menschlichen MHC-Allel HLA-A*24 für CD8-positive, den Hautkrebs infiltrierende T-Zellen beschrieben²³⁰.

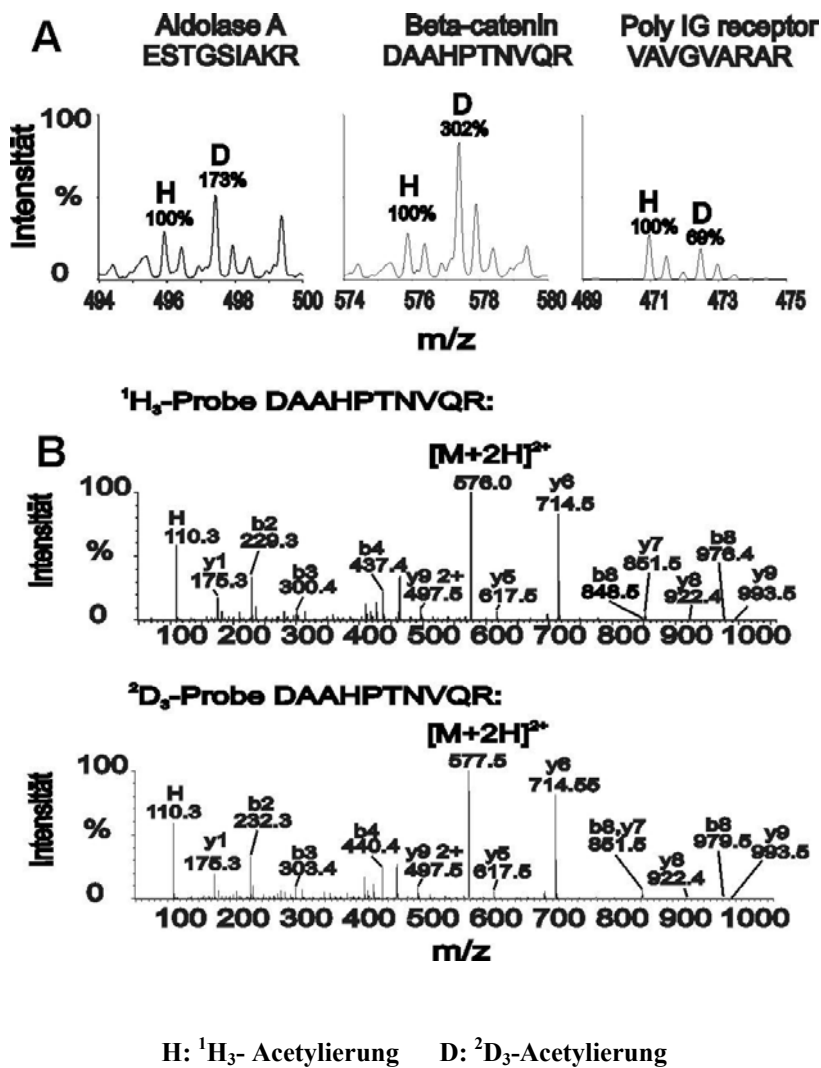


Abbildung 3.19 Differenzielle Quantifizierung von HLA-Liganden aus zwei verschiedenen Quellen. (A) Massenspektren von ²D₃-acetylierten HLA-Peptiden von Kolonkarzinomgewebe verglichen mit ¹H₃-acetylierten HLA-Peptiden von gesundem Kolongewebe. (Linkes Spektrum) Beispiel für ein etwa gleich präsentiertes Peptid; (Mittleres Spektrum) Überpräsentiertes Peptid auf Kolonkarzinomgewebe; (Rechtes Spektrum) Unterpräsentiertes Peptid auf Kolonkarzinomgewebe. (B) Fragmentspektrum des ¹H₃-acetylierten Peptids DAAHPTNVQR; m/z = 576.0 (oberes Spektrum); Fragmentspektrum des ²D₃-acetylierten Peptids DAAHPTNVQR; m/z = 577.5 (unteres Spektrum).

Ein Nachteil bei der Acetylierung von Peptiden ist, dass die Positionierung einer Ladung am N-Terminus nicht mehr möglich ist. Da die Ladung eine Voraussetzung für die Detektion im Massenspektrometer ist und sogar grundsätzlich mehrfach geladene Peptide besser massenspektrometrisch detektiert werden können als einfach geladene, bewirkt die Acetylierung also in vielen Fällen einen Verlust an Sensitivität. Dieser Sensitivitätsverlust macht sich vor allem bei HLA-Liganden bemerkbar, die von HLA-Allelen stammen, die keine basischen Aminosäuren in Ankerpositionen besitzen, wie z.B. HLA-A*0201 Ligan-

den. Bei HLA-Allelen wie z.B. HLA-A*68 ist diese Problematik weniger ausgeprägt, da die HLA-Liganden hier die Aminosäuren Lysin und Arginin als C-terminalen Anker tragen. Die durchgeführten Experimente zeigten ebenfalls, dass eine Acetylierung der ϵ -Aminogruppe von Lysinresten nicht vollständig vermeidbar ist und so eine Signalaufspaltung eines Peptids erfolgt, mit der wiederum ein Sensitivitätsverlust einhergeht. Dieser Sensitivitätsverlust gilt aber im gleichen Maße für die zugrunde liegenden Peptide gleicher Aminosäuresequenz aus den unterschiedlichen Quellen. Es kommt daher zu keiner messbaren Beeinflussung des inneren Verhältnisses zwischen den zugehörigen Signalen der sequenzgleichen, im einen Fall $^1\text{H}_3$ - und im anderen Fall $^2\text{D}_3$ -acetylierten Peptide. Generell ist die Acetylierung aufgrund ihrer schnellen und einfachen Durchführung besonders für Liganden mit basischen Ankeraminosäuren gut anwendbar.

3.5.2 Differenzielle quantitative Guanidinylierung/Nikotinylierung von HLA-Liganden.

Die beobachteten Probleme der Signalaufspaltung und der fehlenden Ladung am N-Terminus, die bei der Acetylierungsmethode auftraten, sollten durch die Entwicklung einer alternativen Derivatisierungsmethode gelöst werden. Die Kombination zweier zur chemischen Modifizierung von Peptiden eingesetzten Methoden, die Guanidinylierung und die Nikotinylierung, sollte deshalb für HLA-Peptide etabliert werden. Die Guanidinylierung sollte eine Signalaufspaltung verhindern, indem alle ϵ -Aminogruppen der Lysinreste der Peptide vor der N-terminalen Modifizierung blockiert werden. Die Nikotinylierung des N-Terminus hatte den Erhalt des N-terminalen Ladungsträgers im Peptid zum Ziel. Für die Nikotinylierung musste vor der Methodenetablierung das für die differenzielle Peptidmodifizierung verwendete Reagenz, der $^1\text{H}_4$ - und $^2\text{D}_4$ -Nikotinoyl-N-Hydroxy-Succinimid-Ester ($^1\text{H}_4$ - und $^2\text{D}_4$ -NikNHS-Ester), synthetisch hergestellt werden, da dies nicht kommerziell erhältlich war.

3.5.2.1 Synthese der $^1\text{H}_4$ - und $^2\text{D}_4$ -NikNHS-Ester.

Die organischen Synthesen der $^1\text{H}_4$ - und $^2\text{D}_4$ -NikNHS-Ester wurden von Steffen Weik vom Institut für Organische Chemie in Tübingen durchgeführt. In Abbildung 3.20 sind die Massenspektren der hergestellten Syntheseprodukte gezeigt.

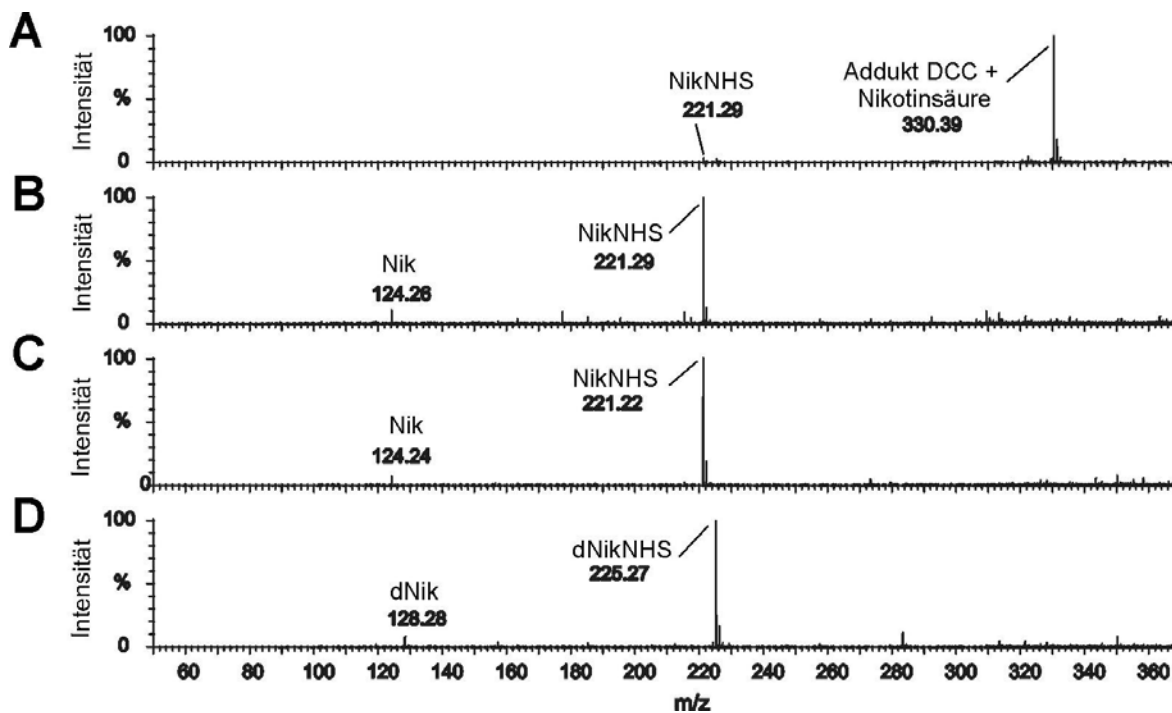


Abbildung 3.20 Massenspektrum (A) des NicNHS-Esters hergestellt mit DCC, (B) aufgereinigt über eine reversed-phase-C18-Säule (C) des NikNHS-Esters und (D) dNikNHS-Esters hergestellt mit EDC.

Der erste Syntheseversuch erfolgte mit dem Aktivierungsreagenz DCC, welches zu einem dominanten Nebenprodukt, einem Addukt aus dem Edukt Nikotinsäure und dem Aktivierungsreagenz DCC führte (Abb. 3.20.A). Durch Produktaufreinigung über eine reversed-phase Säule konnte das gebildete Nebenprodukt zwar entfernt werden (Abb. 3.20.B), aufgrund der Hydrolyseanfälligkeit des NikNHS-Esters bestand jedoch die Gefahr des Verlustes des reaktiven Reagenzes durch diesen Aufreinigungsschritt. Daraufhin wurde eine veränderte Synthese sowohl für den $^1\text{H}_4$ - NikNHS-Ester als auch für den $^2\text{D}_4$ -NikNHS-Ester durchgeführt, in der das Aktivierungsreagenz EDC verwendet wurde, welches zu keinem dominanten Nebenprodukt führte (Abb. 3.20.C und D). Reinheit und Struktur der Substanzen wurden zudem anhand von ^1H - und ^{13}C -NMR kontrolliert (Daten nicht gezeigt). Diese NikNHS-Ester wurden im Folgenden für die Peptidderivatisierung eingesetzt.

3.5.2.2 Optimierung der Guanidinylierung und Nikotinylierung für die differenzielle quantitative HLA-Liganden Analyse.

Die Guanidinylierung und Nikotinylierung wurden mittels synthetischer Peptide (Tab. 3.29) für eine kombinierte Anwendung auf MHC-Klasse-I-Liganden optimiert. Der Ausgangspunkt war bei der Guanidinylierung ein im Jahr 2002 veröffentlichtes Protokoll nach Beardsley und bei der Nikotinylierung eine Publikation von Munchbach und Kollegen aus dem Jahr 2000.

Tabelle 3.29 Synthetische Peptide eingesetzt bei der Optimierung der Guanidinylierungs-/Nikotinylierungsmethode. Erwartete $[M+2H]^{2+}$ nach Guanidinylierung *kursiv* dargestellt, gewünschtes Endprodukt nach Nikotinylierung grau unterlegt und durch Fettdruck markiert.

Code	Peptidsequenz	$[M+2H]^{2+}$	$[M+2H]^{2+}$ 1 Gua	$[M+2H]^{2+}$ 2 Gua	$[M+2H]^{2+}$ x Gua/Nik	$M+2H]^{2+}$ Gua/2Nik
A	SLGLQLAKV	464,78	<i>485,78</i>	-	538,28	-
B	AETSYVKVL	505,27	<i>526,27</i>	-	578,77	631,27
C	VLDPRGIYL	<i>523,30</i>	-	-	575,80	628,30
D	KVLEYVIKV	545,84	566,84	<i>587,84</i>	640,34	692,84

Die erste Derivatisierungsmethode, die Guanidinylierung von ϵ -Aminogruppen von Lysinresten, erfolgte wie in Abbildung 3.21 schematisch dargestellt durch die Umsetzung der Peptide mit O-Methyliso-Harnstoff.

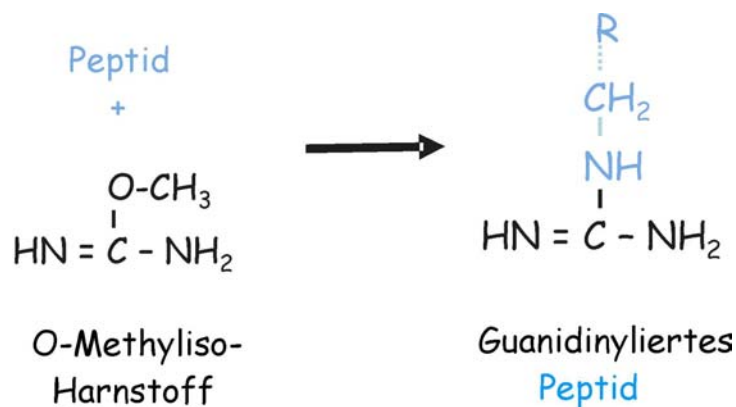


Abbildung 3.21 Darstellung der Guanidinylierungsreaktion von ϵ -Aminogruppen von Lysin.

Hierbei wird eine Guanidinogruppe vom O-Methyliso-Harnstoff auf die ϵ -Aminogruppe vom Lysinrest übertragen und es entsteht neben dem guanidinylierten Peptid als Nebenprodukt Methanol. Unter definierten Reaktionsbedingungen sollen so nur die Seitenketten von Lysinresten, nicht aber bzw. nur minimal N-terminale Aminogruppen derivatisiert werden²²⁷.

Die zweite Derivatisierungsmethode, die Nikotinylierung der N-Termini von Peptiden, wurde wie in Abbildung 3.22 schematisch dargestellt mit den selbst hergestellten NikNHS-Estern durchgeführt. Die aktivierte Carboxylgruppe des NikNHS-Esters überträgt hierbei den Nikotinsäurerest auf die N-terminale Aminogruppe des schon guanidinylierten Peptids.

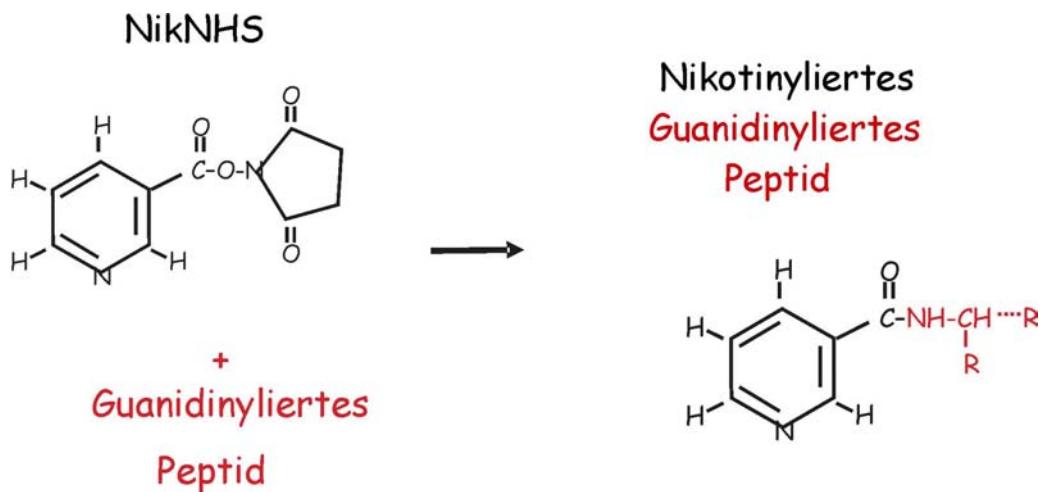
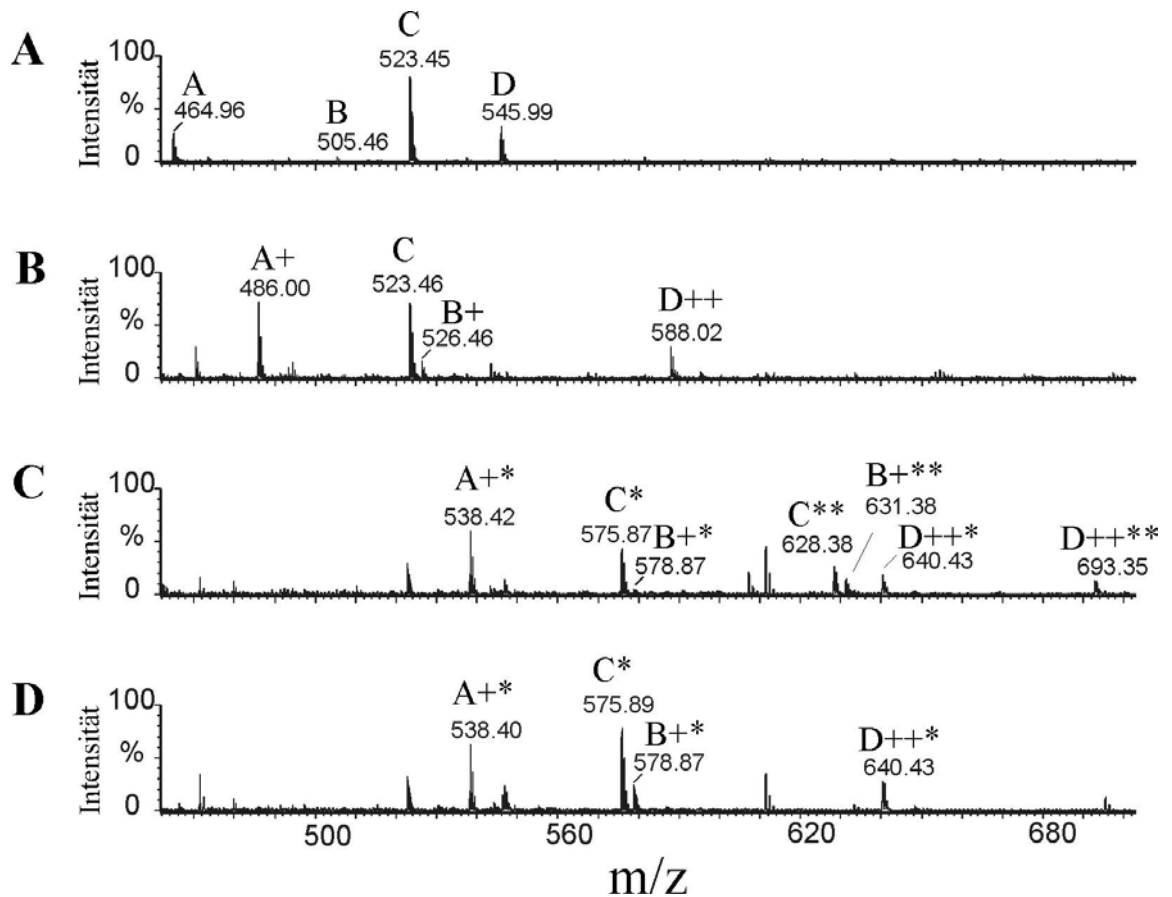


Abbildung 3.22 Darstellung der N-terminalen Nikotinylierung von Peptiden, bei denen die Lysinreste zuvor durch eine Guanidinylierung blockiert wurden.

Die synthetischen Peptide (Abb. 3.23.A) wurden zunächst wie im Methodenteil beschrieben behandelt, so dass alle Lysinreste statt der Aminogruppe eine Guanidinogruppe aufwiesen. Die Guanidinylierung der ϵ -Aminogruppen zeigt sich im Massenspektrum (Abb. 3.23.B) in einer Massenverschiebung je eingefügter Guanidinogruppe von $\Delta m = 42$ Da gegenüber der Ausgangs-peptidmasse (Abb. 3.23.A). Im Anschluss wurden diese guanidinylierten Peptide direkt auf einer C18-Chromatographiesäule erst entsalzt und dann nikotinyliert, Δm je eingefügtem Nikotinsäurerest beträgt 105 Da (Abb. 3.23.C). Die unerwünschte Nikotinylierung von Tyrosinseitenketten wurde direkt auf der Säule durch eine Hydroxylamin-Behandlung spezifisch hydrolysiert, ohne die N-terminale Derivatisierung

zu entfernen (Abb. 3.23.D). In jedem Reaktionsschritt wurde auf vollständige Derivatisierung bzw. Hydrolyse geachtet.



+ Guanidinylierung; ++ Doppelguanidinylierung; * Nikotinylierung; ** Doppelnikotinylierung

Abbildung 3.23 Massenspektren von (A) nicht modifizierten (B) guanidinylierten (C) guanidinylierten + nikotinylierten (D) Hydroxylamin behandelten doppelgeladenen synthetischen Peptiden.

Das Ergebnis der Methodenoptimierung war somit eine kombinierte vollständige Guanidinylierung und Nikotinylierung der synthetischen Peptide ohne unerwünschte Nebenprodukte wie die Nikotinylierung von Tyrosinresten (Abb. 3.23.D).

3.5.2.3 Test auf Zuverlässigkeit der optimierten Guanidinylierungs/Nikotinylierungs- methode anhand einer natürlichen HLA-Ligandenmischung – Differenzielle quantitative massenspektrometrische Analyse von C1R-A2-Liganden.

Zur Kontrolle der Verlässlichkeit der Guanidinylierungs/Nikotinylierungs-Methode bei der Quantifizierung von natürlichen HLA-Liganden wurde ein Peptidpool verwendet, den wir durch Immunpräzipitation der HLA-A*0201-Moleküle von C1R-A2-Zellen erhielten (durchgeführt von Gerd Rechtsteiner). Nach Guanidinylierung der ϵ -Aminogruppen der Lysinreste wurde der Peptidpool in zwei gleiche Teile geteilt, separat entweder mit $^1\text{H}_4$ - oder $^2\text{D}_4$ -nikotinyliert und anschließend wiedervereinigt. Nach Auftrennung der Peptide mittels *offline* HPLC konnten 19 natürliche HLA-A*0201-Liganden mittels Tandem-ESI-MS-Analyse identifiziert werden (Tab.3.30).

Tabelle 3.30 Liste natürlicher HLA-A*0201-Liganden extrahiert von C1R-A2-Zellen. Eine äquimolare Mischung der zuvor guanidinylierten $^1\text{H}_4$ - und $^2\text{D}_4$ -nikotinylierten Peptide wurde hergestellt. Sequenzinformationen wurden durch ESI-MSMS-Analyse ermittelt und $^2\text{D}_4/{}^1\text{H}_4$ -Peptidverhältnisse bestimmt. Eine hohe Zuverlässigkeit der Methode zeigt sich in der für diesen Probensatz ermittelten niedrigen Standardabweichung.

Sequenz (HLA Anker in Fettdruck)	Quellprotein	As- Position	Ratio ($^2\text{D}_4/{}^1\text{H}_4$)
A L G S V V A V	Polymyositis/scleroderma autoantigen 2	39-46	1,09
L L S A E P V P A	B-cell antigen receptor compl. assoc. prot. β	20-28	1,01
F A Y D G K D Y I A	HLA-Cw 0401	140-149	0,98
A L S D H H I Y L	Fructose-bisphosphate aldolase A	215-223	1,06
L L P P H S S A P	Unnamed protein product	145-153	0,94
S L A G G I I G V	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	154-162	0,91
I L F G H E N R V	Guanine nucleotide-binding protein	320-328	0,85
S L L G G D V V S V	Glucocorticoid-induced leucine zipper prot.	27-36	0,94
F L A G A V T S V	Genomic DNA, BCRL2 Region	-	0,93
L L G P P P V G V	Cip1-interacting zinc finger protein	159-167	1,21
T L V Y H V V G V	Splicing factor 3B subunit 3	165-173	0,91
S L G L Q L L N L	EST-database	74-82	0,89
V L S S R L A F A	MHC class II antigen HLA-DR-beta 3	2-10	1,05
F L H E A T V R L	Sterol regulatory element binding protein-2	1033-1041	1,06
Q L D D L K V E L	60S ribosomal protein L35	19-27	0,89
T L A D L V H H V	PCAD-associated factor 400	378-386	0,91
R L D E L G G V Y L	Ribophorin II	190-199	1,24
I L T D I T K G V	Elongation factor 2	660-668	1,11
A L A T L I H Q V	COP9 complex subunit 7A	26-34	0,89
Mittelwert			1,00
Standardabweichung			$\pm 0,12$

In Abbildung 3.24 sind Massenspektren der Modifizierungspaare von guanidinylierten $^1\text{H}_4$ - und $^2\text{D}_4$ -nikotinylierten Peptiden sowohl als einfach geladene Ionen (A) als auch als doppelt geladene Ionen gezeigt (B). Aufgrund der äquimolaren Mischung wiesen diese wie zu erwarten eine etwa gleiche Intensität auf. Der Mittelwert der Verhältnisse der Signalintensitäten für die gefundenen guanidinylierten $^2\text{D}_4$ -/ $^1\text{H}_4$ -Peptide betrug 1,0, die Standardabweichung war mit $\pm 0,12$ sogar etwas besser als im Fall der Acetylierung. Dieses Ergebnis kann somit als Bestätigung für die Zuverlässigkeit der Guanidinylierungs/Nikotinylierungs-Methode gewertet werden.

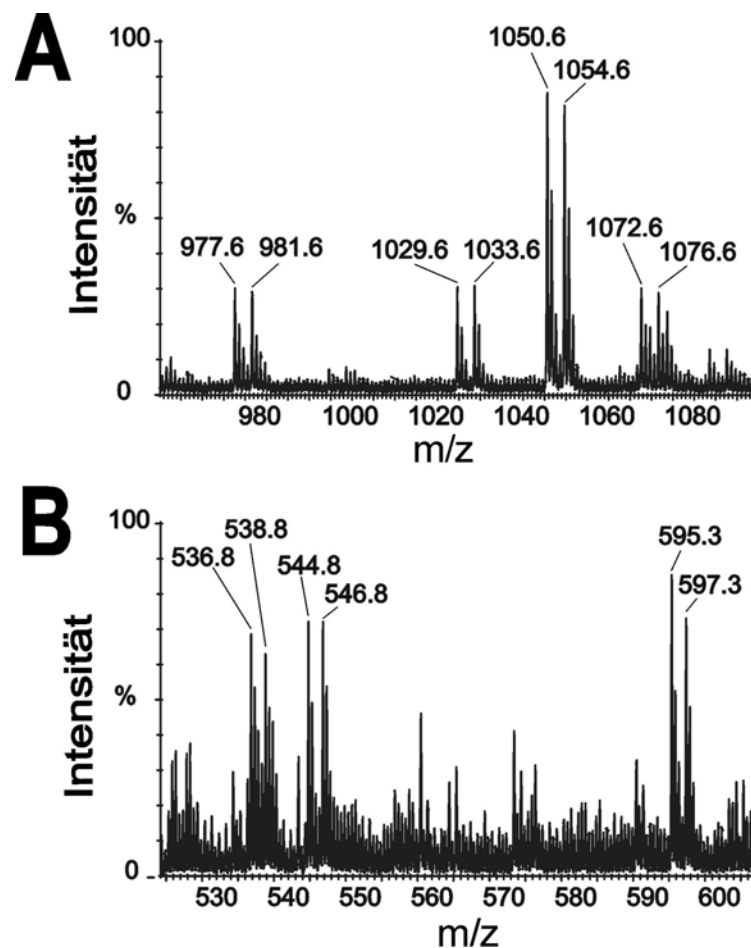


Abbildung 3.24 Äquimolare Mischung von modifizierten HLA-Liganden extrahiert von C1R-A2-Zellen. Massenspektrum von (A) einfach geladenen und (B) doppelt geladenen guanidinylierten und $^1\text{H}_4$ - bzw. $^2\text{D}_4$ -nikotinylierten HLA-Peptiden.

Exemplarisch sind Fragmentspektren des guanidinylierten und $^1\text{H}_4$ - bzw. $^2\text{D}_4$ -nikotinylierten HLA-Peptids ILFGHENRV in Abbildung 3.25.A bzw. B dargestellt. Analog zur Acetylierung wird hier eine durch die N-terminale Nikotinylierung hervorgerufene

Verschiebung der b-Serien sichtbar, die zudem im nicht fragmentierten Zustand die Identifizierung der schweren und leichten Peptidvariante ermöglicht und somit eine Zuordnung zu einer der beiden MHC-Quellen. Die Massendifferenz der beiden Varianten bzw. ihrer b-Ionen beträgt im doppelt geladenen Zustand bei der Nikotinylierung 4 Da.

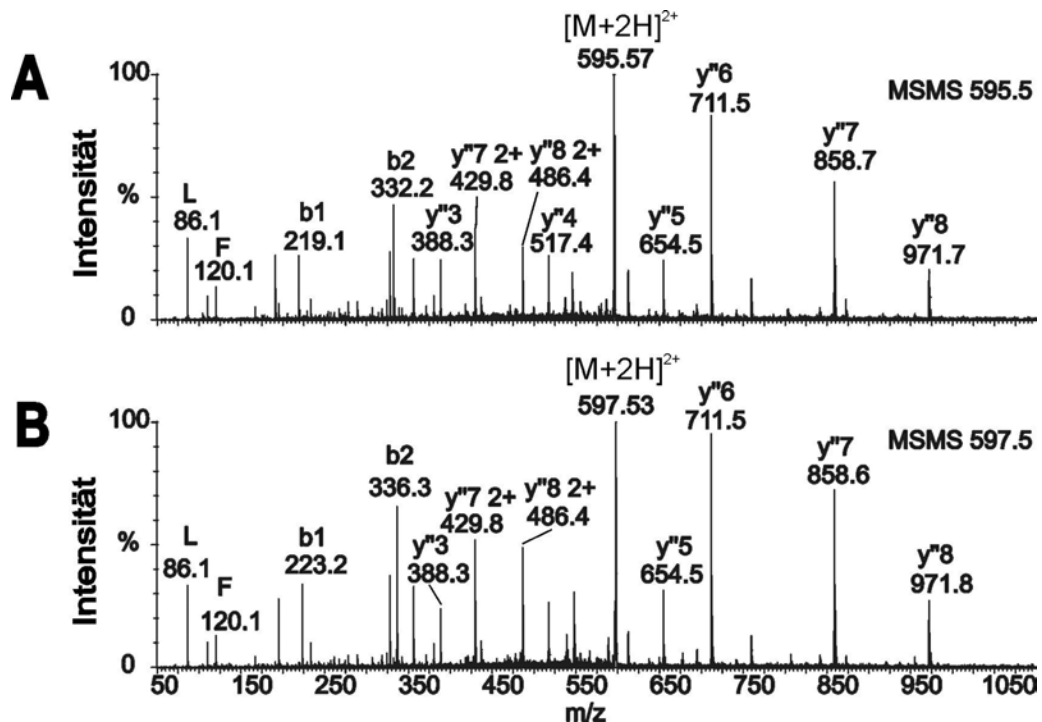


Abbildung 3.25 Äquimolare Mischung modifizierter HLA-Liganden extrahiert von C1R-A2-Zellen. (A) Fragmentspektrum des guanidinylierten und ¹H₄-nikotinylierten HLA-Peptids ILFGHENRV (m/z = 595,5). (B) Fragmentspektrum des gleichen guanidinylierten und ²D₄-nikotinylierten HLA-Peptids (m/z = 597,5).

Die in dieser Arbeit etablierte Methode der Guanidinylierung und Nikotinylierung von Peptiden unter Verwendung der zwei Wasserstoff-Isotope ¹H und ²D erlaubt erstmals die schnelle und sensitive Bestimmung von relativen quantitativen Unterschieden zwischen sequenzgleichen Peptiden aus zwei Quellen. Durch Anwendung des Verfahrens zur Guanidinylierung und Nikotinylierung von Peptiden auf Proben von Tumorgewebe und normalem Gewebe oder durch Anwendung besagten Verfahrens auf mit tumorassoziierten Genprodukten transfizierten Zelllinien können tumorassoziierte Peptidantigene bestimmt werden, die für die Herstellung von Impfstoffen zur Krebstherapie besonders geeignet sind. Nach dem Beweis der Zuverlässigkeit der kombinierten Guanidinylierungs/Nikotinylierungs-Methode anhand von natürlichen HLA-Liganden wurden nun im Folgenden natürliche HLA-Liganden aus zwei unterschiedlichen Quellen differenziell quantitativ untersucht.

3.5.2.4 Differenzielle quantitative massenspektrometrische Analyse von HLA-Liganden von Awells-Zellen im Vergleich zu Keratin18-transfizierten Awells-Zellen.

Durch Trask et al. 1990 war gezeigt worden, dass sich Keratine als Marker für die Unterscheidung von Tumor- und gesundem Gewebe eignen.

Um neue MHC-Klasse-I-gebundene Peptide aus humanem Keratin18 zu identifizieren und um die differenzielle Quantifizierung anhand eines beispielhaften Tumorantigens aufzuzeigen, waren Peptide aus der nicht-transfizierten (Awells) und aus der mit dem genannten Plasmid transfizierten Awells-Zelllinie (Awells-Keratin 18) isoliert worden (durchgeführt von J. Dengjel). Die isolierten Peptidgemische wurden im Anschluss wie beschrieben durch Guanidinylierung und $^2\text{D}_4$ -, respektive $^1\text{H}_4$ -Nikotinylierung chemisch modifiziert. Die chemisch modifizierten Peptidgemische wurden wiedervereinigt und durch *online* LC-MS-Analyse wie beschrieben untersucht. In einem zweiten Experiment wurde im MSMS-Modus gearbeitet, wodurch die Aminosäuresequenzen von insgesamt 27 verschiedenen Peptiden bestimmt werden konnten (Tab. 3.31). Alle 27 gefundenen Peptide, mit Ausnahme eines Peptids mit einer Molmasse von 1091,6 Da, wurden sowohl auf transfizierten als auch auf nicht-transfizierten Zellen in Mengen detektiert, die innerhalb des Konfidenzintervalls von 0,64 bis 2,28 lagen (statistische Auswertung unter Anwendung des „Student-t-Test“).

Tabelle 3.31 Liste natürlicher HLA-Liganden präzipitiert von Awells-Zellen (homozygot für HLA-A*0201 und HLA-B*4402) und ihrer Keratin-18-Transfektante. HLA-Peptide von Awells und Awells-Keratin18 wurden guanidinyliert und $^1\text{H}_4$ - or $^2\text{D}_4$ - nikotinyliert. Sequenzinformationen wurden durch Tandem-ESI-MS-Analyse ermittelt und $^2\text{D}_4/^1\text{H}_4$ -Peptidverhältnisse bestimmt. Der Student-t-Test wurde auf die Daten der $^2\text{D}_4/^1\text{H}_4$ -Verhältnisse zur Beurteilung von signifikant über- oder unterpräsentierten Liganden angewendet.

Sequenz (HLA Anker in Fettdruck)	HLA	Quellprotein	As- Position	Ratio ($^2\text{D}_4/^1\text{H}_4$)
K E S T L H L V L	B*44	Ubiquitin	63-71	0,96
A E S L L T M E Y	B*44	KIAA1390	31-39	1,02
L L M E H T M V A F	A*02	EST	24-33	1,05
H L A V E R G K V	A*02	Similar to x-kinase	532-540	1,06
S E I E A K V R Y	B*44	Talin 1	290-298	1,08
T L F P G K V H S L	A*02	WD-repeat protein 6	432-441	1,09
S E D N R I L L W	B*44	Methylosome protein 50	187-195	1,10
S I I G R L L E V	A*02	Phosphatase PP1- α 1	11-19	1,12
Y L L P A I V H I	A*02	RNA-dependent helicase p68	148-156	1,12
Q L V D I I E K V	A*02	Proteasome activator complex SU 3	114-122	1,14
A L L D K L Y A L	A*02	Similar to mitochon. ribosom. prot. S4	78-86	1,14
I E H G I I T N W	B*44	Actin alpha skeletal muscle	73-81	1,19
I M L E A L E R V	A*02	Small nuclear ribonucleoprotein G	68-76	1,19
L L F D R P M H V	A*02	HNRP M	268-276	1,22
A E K L I T Q T F	B*44	NPD011	2-10	1,23
R L A Q H I T Y V	A*02	Licensing factor MCM7	532-540	1,25
S E P D F V A K F	B*44	FLJ20671	121-129	1,28
T E V T G H R W	B*44	Basigin	48-55	1,37
A E T P D I K L F	B*44	40S ribosomal protein S5	12-20	1,48
Q E H V K S F S W	B*44	Sortilin-related receptor	245-253	1,50
A I V D K V P S V	A*02	Coatomer gamma subunit	147-155	1,52
E E P T V I K K Y	B*44	Sorting nexin 5	257-265	1,54
Q E A G I K T A F	B*44	Multifunctional protein ADE2	69-77	1,60
G E A S R L A H Y	B*44	Histone H2B.f	75-83	1,65
Q E D L R T F S W	B*44	Ras-GTPase-activating protein	243-251	1,66
M E Q V I F K Y L	B*44	Actin-like protein 3	93-101	1,98
R L A S Y L D R V	A*02	Cytokeratin 18	89-97	$\geq 5,95$
Mittelwert				1,46
Standardabweichung				$\pm 0,93$
Student-t-Test: Vertrauensintervall 99.99 % (n = 27)				0,64 – 2,28

Das Massenspektrum in Abbildung 3.26.A (links) zeigt exemplarisch von beiden Zelltypen gleich stark präsentierte Peptide. Das rechte Massenspektrum stellt das auf der Transfektante am geringsten präsentierte Peptid dar, welches sich aber noch innerhalb des Konfidenzintervalls befindet und somit nicht als „unterpräsentiert“ angesehen werden kann.

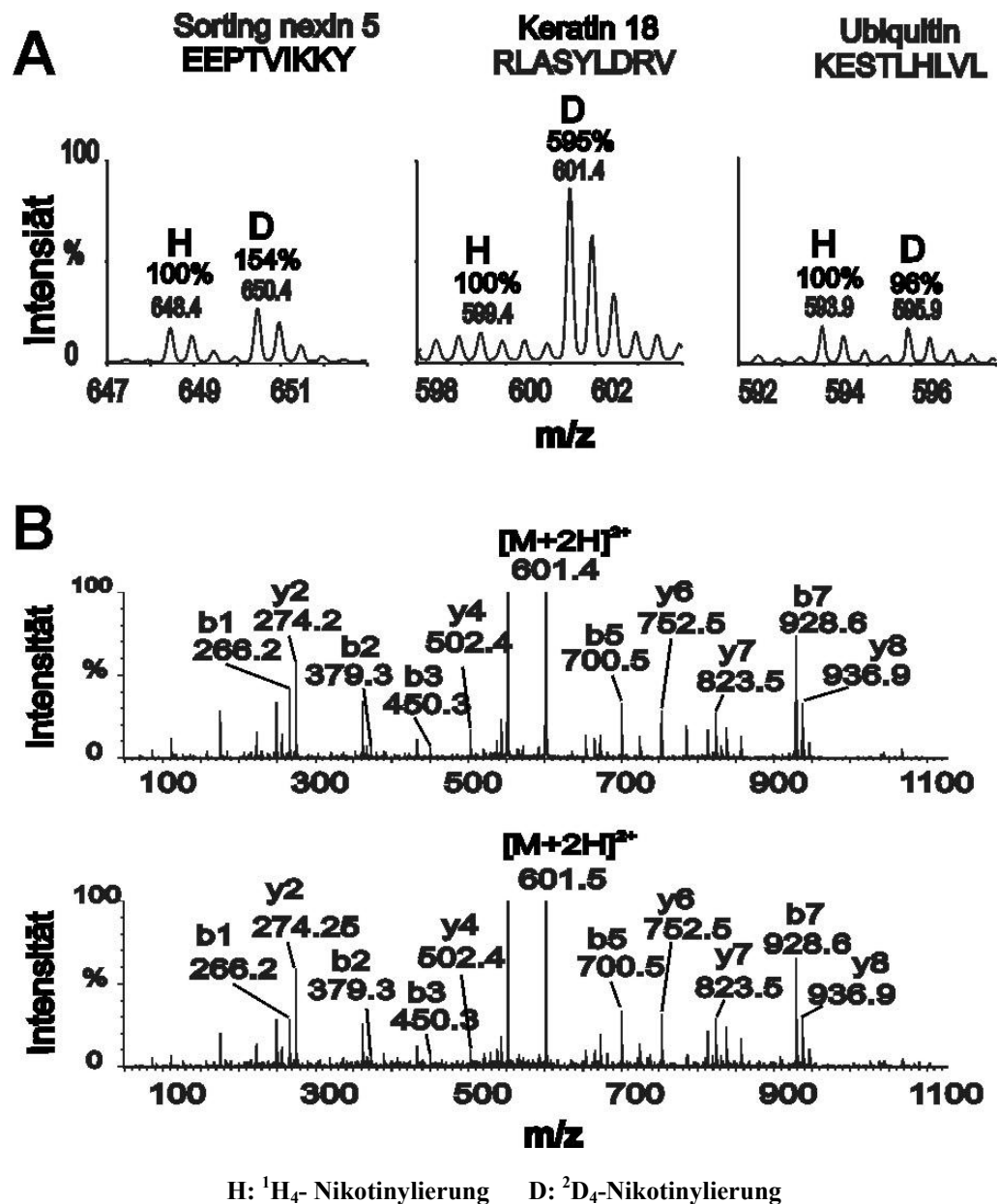


Abbildung 3.26 Differenzielle Quantifizierung von HLA-Liganden aus zwei verschiedenen Quellen. (A) Massenspektren von $^2\text{D}_4$ -nikotinylierten HLA-Peptiden von Keratin18-transfizierten Awells-Zellen verglichen mit $^1\text{H}_4$ -nikotinylierten HLA-Peptiden von Awells-Zellen. (Linkes Spektrum) Beispiel für ein etwa gleich präsentiertes Peptid; (Mittleres Spektrum) überpräsentiertes Peptid auf Awells-Keratin18-Transfektante; (Rechtes Spektrum) am niedrigsten präsentiertes Peptid auf der Keratin18-Transfektante. (B) Fragmentspektrum des synthetischen $^2\text{D}_4$ -nikotinylierten Peptids RLASYLDRV; $m/z = 601.5$ (oberes Spektrum); Fragmentspektrum des aus der Probe stammenden $^2\text{D}_4$ -nikotinylierten Peptids RLASYLDRV; $m/z = 601.5$ (unteres Spektrum).

Für das Peptid mit einer Molmasse von 1091,6 Da wurde durch die Tandem-ESI-MS-Analyse die Aminosäureabfolge RLASYLDRV bestimmt, welche ein Fragment des Proteins Keratin 18 darstellt. Die Fragmentspektren, die zur Identifizierung des Peptids mit der Sequenz RLASYLDRV geführt haben, sind in Abbildung 3.26.B abgebildet. Sie zeigen eine sehr gute Übereinstimmung der Spektren des aus der Probe stammenden Signals mit dem des synthetischen Analogons. Ein $^1\text{H}_3$ -Peptidsignal für RLASYLDRV konnte nicht beobachtet werden (Abb. 3.26.A Mitte), das Signal für dieses Peptid mit einem $^2\text{D}_3$ -Nikotinyrest hingegen wurde sechsfach stärker als der Hintergrund detektiert. Diese Beobachtung legt nahe, dass Keratin18 exklusiv in den Awells-Keratin18-Zellen exprimiert wurde bzw. die Präsentation in den nicht transfizierten Awells-Zellen unter der Nachweisgrenze lag. Dies ist der erste gelungene Versuch einen neuen MHC-Klasse-I-Liganden aus einem Tumor-assoziierten Protein mittels differenzieller quantitativer Analyse zu identifizieren.

3.5.2.5 Suche nach potenziellen T-Zellepitopen aus dem Protein Präproinsulin mittels differenzieller quantitativer massenspektrometrischer Analyse.

Ziel dieser differenziellen quantitativen Analysen war die Identifizierung neuer HLA-A*0201-Liganden aus dem Diabetes-Mellitus-assoziierten Präproinsulin.

Natürliche Peptidmischungen wurden erhalten aus je einer HLA-Klasse-I-Immunpräzipitation von PRIESS-Zellen und mit Präproinsulin (PPI) transfizierten PRIESS-Zellen durchgeführt von Jens Brandenburger aus der Gruppe von Hubert Kalbacher (Tübingen). Die Peptidpools wurden lyophilisiert und im Anschluss im Fall der PRIESS-Peptide guanidinyliert und $^1\text{H}_4$ -nikotinyliert bzw. im Fall der PRIESS-(PPI)-Transfektante guanidinyliert und $^2\text{D}_4$ -nikotinyliert.

Die differenziell modifizierten Peptidpools wurden vereinigt und anschließend in *online* LC-MS-Experimenten analysiert. Hierbei wurde gezielt nach Einzelsignalen im Übersichtsmassenspektrum gesucht, um bevorzugt die ausschließlich von der Präproinsulin-(PPI)-Transfektante stammenden MHC-Klasse-I-Liganden zu detektieren. Neben vielen Doppelsignalen, wie beispielhaft in Abbildung 3.27.A gezeigt ($m/z = 584,28 / 586,3$ bei einer Retentionszeit von 120 min) trat ein Einzelsignal bei einer Retentionszeit von 118 min mit $m/z 583,25$ auf (Abb. 3.27.B).

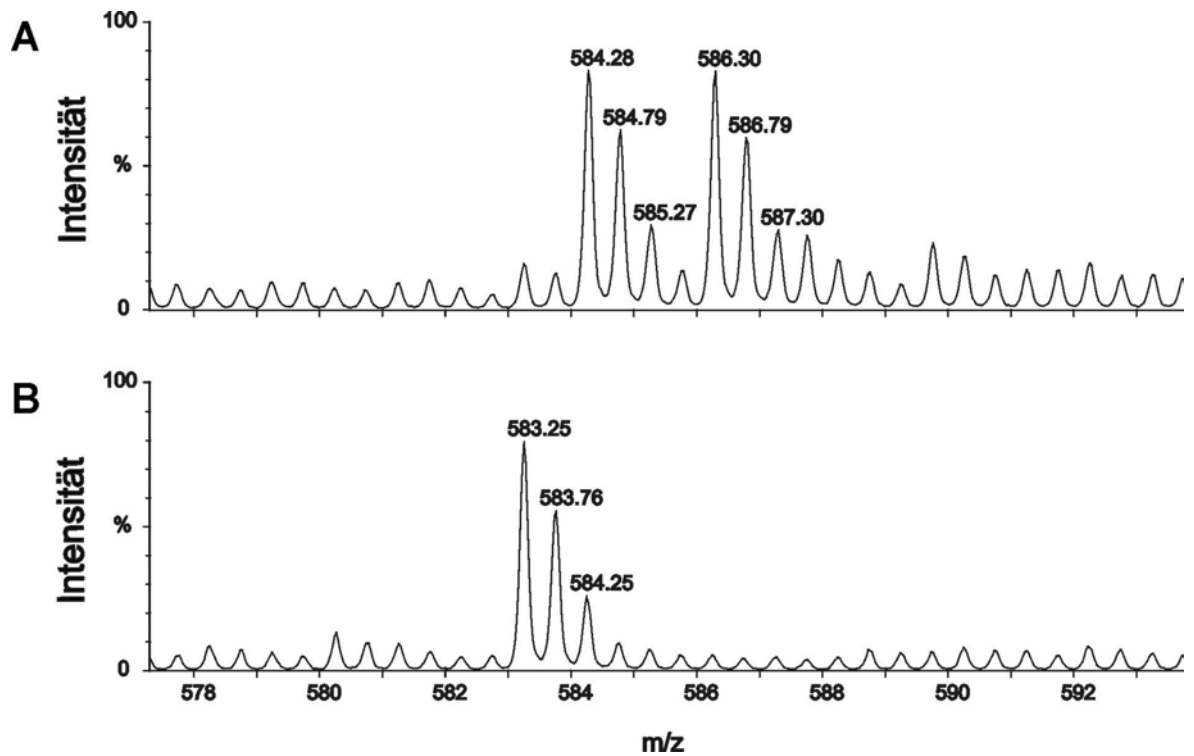


Abbildung 3.27 Differenzielle Quantifizierung von HLA-Liganden aus zwei verschiedenen Quellen mittels LC-MS-Analyse. (A) Differenzielle Massenspektren von $^2\text{D}_4$ -nikotinylierten HLA-Peptiden von mit Präproinsulin-transfizierten PRIESS-Zellen und $^1\text{H}_4$ -nikotinylierten HLA-Peptiden von nicht transfizierten PRIESS-Zellen. (A) Massenspektrum eines auf beiden Zelltypen gleich stark präsentierten Peptids bei einer Retentionszeit von 120 min; $^1\text{H}_4$ -nikotinylierte Peptidvariante ($m/z = 584,26$) und $^2\text{D}_4$ -nikotinylierte Peptidvariante ($m/z = 586,30$). (B) Massenspektrum eines Einzelsignals bei einer Retentionszeit von 118 min ($m/z = 583,25$).

In Tandem-LC-MS Analysen wurden die Doppelsignale bei 120 min und das Einzelsignal bei 118 min fragmentiert und konnten nach Interpretation der Fragmentspektren identifiziert werden (Abb. 3.28). Bei dem Doppelsignal handelt es sich um das auf beiden Zelltypen gleich stark präsentierte Peptid VLIPKLPQL aus dem Protein ORM1-like3 (Abb. 3.28 A und B). Das Einzelsignal konnte als das aus Präproinsulin stammende N-terminal $^2\text{D}_4$ -nikotinylierte Peptid HLVEALYLV identifiziert werden (Abb. 3.28.C). Diese Sequenz konnte anhand eines synthetischen $^2\text{D}_4$ -nikotinylierten Peptids bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Auch in diesem Projekt konnte somit die neu entwickelte und etablierte differenzielle quantitative Analyse von HLA-Liganden bei der Suche nach krankheits-assoziierten MHC-Liganden erfolgreich eingesetzt werden.

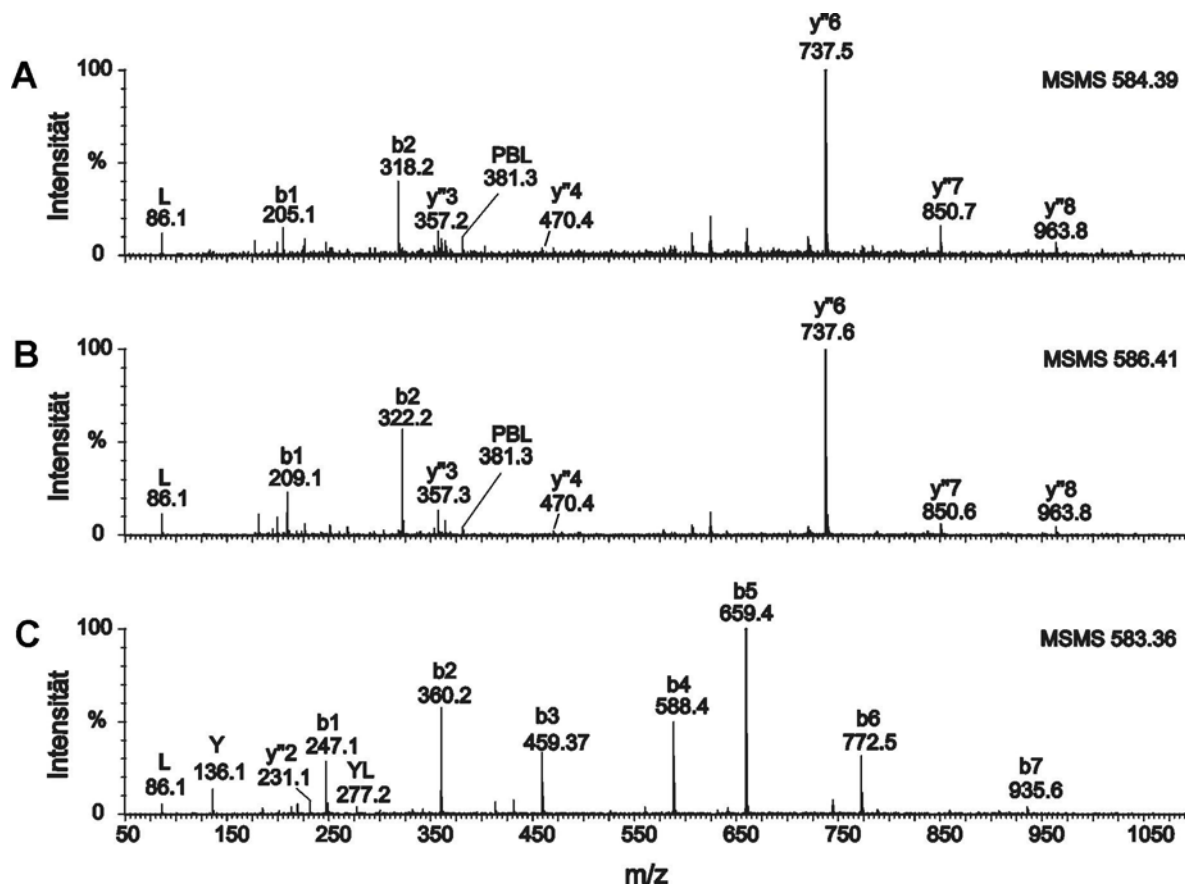


Abbildung 3.28 Differenzielle Quantifizierung von HLA-Liganden aus zwei verschiedenen Quellen mittels Tandem-LC-MS-Analyse. (A) Fragmentspektren von $^2\text{D}_4$ -nikotinylierten HLA-Peptiden von Präproinsulin-transfizierten PRIESS-Zellen und $^1\text{H}_4$ -nikotinylierten HLA-Peptiden von PRIESS-Zellen. Fragmentspektren (A) und (B) eines auf beiden Zelltypen gleich stark präsentierten Peptids (VLIPKLPQL). (C) Fragmentspektrum des aus Präproinsulin stammenden HLA-A*0201- $^2\text{D}_4$ -nikotinylierten Peptids HLVEALYLV ($m/z = 583.3$).

Das aus Präproinsulin stammende MHC-Klasse-I-Peptid HLVEALYLV wird zurzeit in T-Zellstudien untersucht (Ivana Duranovic-Bello, Ulm). Bei diesem Peptid handelt es sich um den ersten MHC-Klasse-I-Liganden aus dem mit Diabetes Mellitus in Verbindung gebrachten Protein Präproinsulin. Zudem konnte erstmals ein solcher Ligand aus Präproinsulin molekular nachgewiesen werden.

3.5.2.6 Vergleich der HLA-Peptidpräsentation mit der mRNA-Expression in solidem Tumorgewebe und korrespondierendem autologen Normalgewebe eines Nierenzellkarzinompatienten.

In einem weiteren Projekt sollte die Korrelation der mRNA-Expressionsanalyse mit der HLA-Ligandenpräsentation, speziell in tumorösen Geweben im Vergleich zu normalen Geweben untersucht werden. Bisher wurde davon ausgegangen, dass die Genexpressionsdaten mit der MHC-Ligandenpräsentation in guter Übereinstimmung stehen (siehe Kapitel 3.4), allerdings ohne dass ein experimenteller Beweis dafür vorliegt.

Tabelle 3.32 Liste natürlicher HLA-Liganden extrahiert von solidem Tumorgewebe eines Nierenzellkarzinom-Patienten und autologem Normalgewebe (HLA-A*02, A*03, B*07, B*18). HLA-Peptide des Tumors und des Normalgewebes wurden guanidinyliert und $^1\text{H}_4$ - oder $^2\text{D}_4$ -nikotinyliert und massenspektrometrisch quantifiziert. Im Vergleich dazu werden Genexpressionsdaten (Affymetrix-Microarray-Analyse) Tumor versus Normal gezeigt. Gut übereinstimmende Gen- und HLA-Peptid-Daten im Fettdruck grau unterlegt; hohe relative Genexpression zu relativ niedriger Ligandenpräsentation im Fettdruck dargestellt; niedrige relative Genexpression zu hoher Ligandenpräsentation im Fettdruck *kursiv* dargestellt.

Peptid-Sequenz	Quellprotein (Gen-Symbol)	HLA	Gen x-fach Überexpression (Tumor/Normal)	Peptid x-fach Überpräsentation ($^2\text{D}_4/{}^1\text{H}_4$)
VVYPWTQRF	HBB	A*03	0,62	0,00
RAFSSLGLLK	UMOD	A*03	0,00	0,00
HELPLPHSV	EPAS1	B*18	1,74	0,46
RTFTWLVGK	MYO1C	A*03	1,00	0,46
DEMKVLVL	SPTBN1	B*18	1,41	0,47
KIADRFLLY	LMO4	A*03	0,66	0,60
FSKLRPLISK	PGBD3	A*03	0,71	0,66
RMLPHAPGV	HDAC1	A*02	0,93	0,75
RLFVGSIPK	HNRPR	A*03	0,66	0,87
EERIVELF	STAT3	B*18	0,62	0,87
KVANIILSY	FLJ21439	A*03	0,54	0,97
DEVKLPACL	PTRF	B*18	1,41	1,04
<i>KLSEIDVAL</i>	<i>EFHD1</i>	<i>A*02</i>	<i>0,10</i>	<i>1,17</i>
SLMHSFILK	DNCL2A	A*03	0,62	1,30
TEKVLAADV	ALDOB	B*18	0,62	1,43
ILMEHIHKL	RPL19	A*02	1,23	1,84
QIFVKTLTGK	UBC	A*03	0,93	2,17
DEVKFLTV	ANXA4	B*18	1,87	2,20
SVYVYKVLK	HIST1H2BL	A*03	2,83	2,23
NLLPKLHIV	CLIC1	A*02	1,41	2,31
ALASHLIEA	EHD2	A*02	12,13	2,89
ALSDHHIYL	ALDOA	A*02	1,52	3,97
SLLTSSKGQLQK	ADFP	A*03	2,64	4,08
TMLARLASA	CSPG4	A*02	5,66	5,90

Zur Untersuchung dieses Sachverhalts wurden HLA-Liganden vom Tumor- und Normalgewebe eines Nierenzellkarzinompatienten (RCC100) extrahiert (durchgeführt von Björn Krämer) und mittels differenzieller quantitativer Massenspektrometrie analysiert. Die HLA-Liganden des Tumors wurden guanidinyliert und $^2\text{D}_4$ -nikotinyliert, die des autologen Normalgewebes wurden guanidinyliert und $^1\text{H}_4$ -nikotinyliert. Nach der Derivatisierung wurden beide Ligandenpools vereint und in einer LC-MS-Analyse quantifiziert. Die anschließende Identifizierung der quantifizierten Liganden erfolgte in einer Tandem-LC-MS-Analyse. Zudem wurde für beide Gewebe eine relative Genexpressionsanalyse mittels Affymetrix-Microarray-Technologie von Oliver Schoor durchgeführt. Die erhaltenen mRNA-Expressionsdaten und die HLA-Peptidpräsentationsdaten sind in Tabelle 3.32 dargestellt. Die Daten zeigen einerseits eine gute Übereinstimmung der relativen Genexpression und Peptidpräsentation, sowohl bei extrem starker Überexpression beim Protein CSPG4, als auch bei Unterexpression beim Protein Uromodulin (UMOD). Andererseits können auch große Unterschiede beobachtet werden: sowohl eine hohe relative Genexpression und gleichzeitig eine niedrige relative Peptidpräsentation wurde für das Protein EHD2 gefunden, als auch eine niedrige relative Genexpression und eine hohe relative Peptidpräsentation wurde für das Protein EFHD1 detektiert. Bei gleich starker relativer Genexpression auf beiden Geweben zeigen sich ebenfalls Schwankungen bezüglich der relativen Peptidpräsentation. Insgesamt muss allerdings eine größere Anzahl an HLA-Liganden identifiziert und mit mRNA-Expressionsdaten verglichen werden, um eine verlässliche Aussage über eine mögliche Korrelation dieser beiden experimentellen Ansätze machen zu können. Ziel bleibt es somit größere Datensätze differenziell quantifizierter HLA-Liganden zu generieren.

3.5.3 Zusammenfassung und Ausblick: Differenzielle quantitative HLA-Ligandenanalysen

Die beschriebenen Methoden, sowohl Acetylierung als auch Guanidinylierung/Nikotinylierung, sind auf quantitative Untersuchungen der MHC-Ligandenpräsentation gerichtet. Die Acetylierung wurde in dieser Arbeit erfolgreich bei der Untersuchung eines Tumor-/Normalgewebspaars eingesetzt. In diesem Projekt konnten zwei überpräsentierte HLA-Liganden auf Tumorgewebe identifiziert werden. Der Einsatz der Guanidinylierung/Nikotinylierung führte sowohl zur Identifizierung eines neuen,

aus dem tumorassoziierten Protein Keratin18 stammenden Liganden, als auch zu einem MHC-Klasse-I-Liganden aus dem Diabetes-Mellitus-assoziierten Protein Präproinsulin. Die Acetylierungsmethode ist einfach und schnell im Vergleich zur Guanidinylierungs-/Nikotinylierungsmethode. Jedoch beschränkt sich die erfolgreiche Anwendung der N-terminalen Acetylierung auf MHC-eluierte Peptide, die basische Aminosäuren in einer Ankerposition besitzen, um die analytische Sensitivität während der massenspektrometrischen Analyse zu erhalten. Die Derivatisierung von Peptiden durch Acetylierung und Guanidinylierung/Nikotinylierung hat einen großen Einfluss auf die Peptid-Ionisierung.

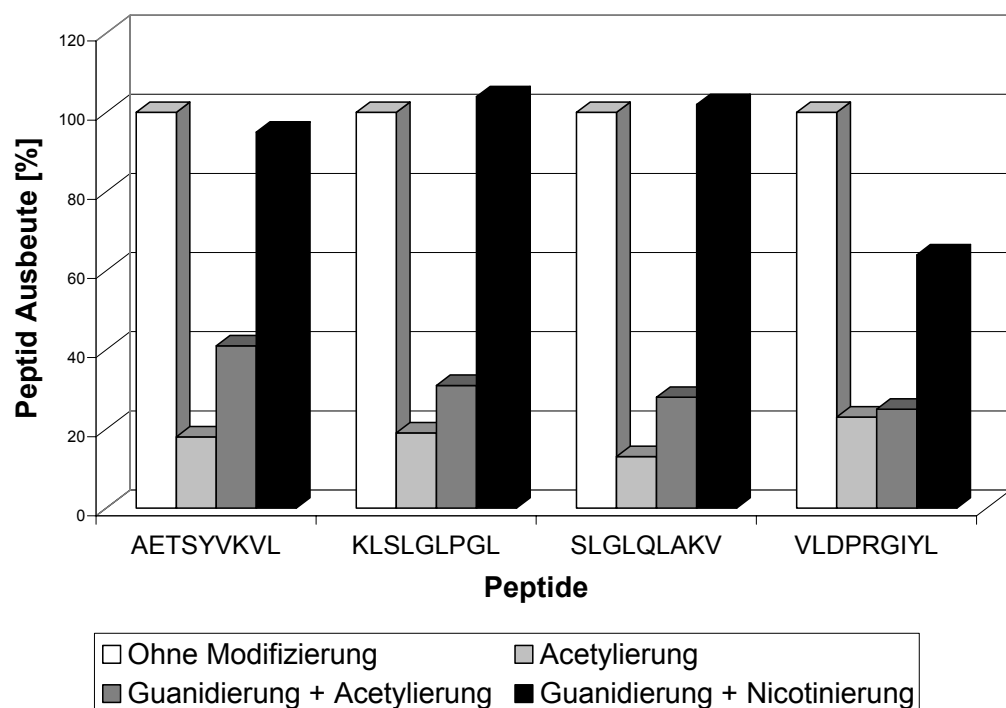


Abbildung 3.29 Ausbeuten verschiedener Peptidderivate. Vier synthetische Peptide wurden in äquimolaren Konzentrationen entweder acetyliert, acetyliert/guanidinyliert oder guanidinyliert/nikotinyliert. Nach vollständiger Derivatisierung wurde jede Peptidmischung mit der anfänglichen nicht derivatisierten Peptidmischung vereint (folglich werden äquimolare Ausbeuten von beiden Peptidspezies erwartet) und in einer nano-ESI-MS-Analyse quantifiziert.

Die Ergebnisse von drei Lysin-haltigen Peptiden deuten an, dass ein erheblicher Verlust der Peptidausbeute nach Acetylierung teilweise durch die Guanidinylierung in Lysin-haltigen Peptiden kompensiert werden kann. Den größten Effekt auf die Ionisierung hat allerdings die N-terminale Nikotinylierung, die zu ähnlichen Peptidausbeuten führt wie bei nicht-modifizierten Peptiden. Die Analyse von guanidinylierten und nikotinylierten Pepti-

den ist damit etwa gleich in ihrer Sensitivität wie die Analyse nicht-derivatisierter Peptide. Somit können beide Methoden alternativ, entsprechend der vorliegenden Probeneigenschaften, für eine relative Quantifizierung von MHC-Liganden aus zwei verschiedenen Quellen benutzt werden.

Beim Einsatz von Deuterium-haltigen Reagenzien ist generell ein chromatographischer Isotopeneffekt zu beobachten, d.h. dass früh in der Elution eines Peaks die deuterierte Variante angereichert vorliegt, während im späteren Teil eines Peaks die Wasserstoffenthaltende Variante vorherrscht. Dieser Effekt nimmt mit der Anzahl der im Reagenz enthaltenen Deuterium-Atome zu²³¹. Folglich weisen acetylierte (D₃) oder nikotinylierte (D₄) Peptide einen höheren Grad der Koelution auf als Peptide, die mit dem klassischen ICAT-Reagenz, welches 8 Deuterium Atome enthält, derivatisiert wurden. Eine zweite Generation von ¹³C-ICAT-Reagenzien wurde bereits entwickelt, um die Koelution der zwei Peptidspezies zu optimieren. Leider sind die notwendigen Edukte für die Synthese eines ¹³C-enthaltenen Nic-NHS-Ester-Reagenzes, welches ebenfalls keinen chromatographischen Effekt aufweisen würde, bisher nicht kommerziell erhältlich.

Allgemein zeigen die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse, dass mittels paarweiser quantitativer Analysen von MHC-Liganden potentielle tumorassoziierte (überexprimierte) Antigene aufgrund einer verstärkten Abundanz ihrer HLA-Liganden und potentielle tumorspezifische (exklusiv exprimierte) Antigene aufgrund von Einzelsignalen einer Peptidspezies detektiert werden können. Die Identifizierung neuer tumorassoziierter Antigene erfolgt gewöhnlich durch quantitative Screening-Methoden wie z.B. Genexpressions- oder Proteomanalysen. Der Weg von der mRNA oder der Proteinexpression bis zu den MHC-Liganden ist jedoch weit und beinhaltet unter anderem Spezifitätsschritte wie die proteasomale Prozessierung, den TAP-Transport und die MHC-Bindung. Zukünftige erweiterte Studien der Korrelation zwischen differenzieller Quantifizierung von MHC-Liganden und Genexpressionsanalysen wären von großem Interesse.

4. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene etablierte massenspektrometrische Methoden im Rahmen unterschiedlicher Fragestellungen zur Identifizierung von MHC-Klasse-I-Liganden eingesetzt. Als zentraler Punkt dieser Dissertation wurden des Weiteren zwei differenzielle Methoden, die Acetylierung und die kombinierte Guanidinylierung/Nikotinylierung, zur massenspektrometrischen Quantifizierung von HLA-Liganden aus zwei unterschiedlichen Quellen entwickelt und getestet. Der Einsatz der Acetylierungsmethode führte in einem Tumor-/Normalgewebepaar eines Kolonkarzinompatienten zur Identifizierung von zwei auf HLA-Ebene überpräsentierten Tumorliganden aus dem ribosomalen Protein L24 und dem als tumorassoziiert beschriebenen Protein Beta-Catenin. Unter Einsatz der Guanidinylierungs-/Nikotinylierungsmethode konnte in einer A-wells-Keratin18-Transfektante ein neuer HLA-A*0201-Ligand aus dem Tumormarker Keratin18 identifiziert werden und in Präproinsulin-transfizierten PRIESS-Zellen wurde zum ersten Mal ein MHC-Klasse-I-Ligand aus Präproinsulin charakterisiert. Außerdem wurde die relative mRNA-Expression eines Tumor-/Normalgewebepaars eines Nierenzellkarzinompatienten mit der relativen HLA-Ligandenpräsentation verglichen, was in weiterführenden Studien für Aussagen über eine Korrelation zwischen mRNA-Expression und HLA-Liganden-Präsentation genutzt werden kann.

Des Weiteren wurden mittels massenspektrometrischer Techniken zahlreiche Tumorliganden aus verschiedenen soliden Tumoren, wie Kolonkarzinomen, Magenkarzinomen und Glioblastomen identifiziert. Im Fall von Nierenzellkarzinompatienten wurde eine Impfstudie initiiert, bei der, auf HLA-Ligandenidentifizierung und Genexpressionsdaten basierende, Patienten-spezifische Impfstoffe eingesetzt wurden.

Gezielte Suchen nach krankheitsassoziierten HLA-Liganden wurden mit der „*Predict, Calibrate, Detect*“-Methode durchgeführt. Dies führte zur Identifizierung eines HLA-Liganden aus dem Malaria-assoziierten MSP1-Protein und erstmals zum Nachweis zweier Hepatitis-C-Virus-Epitope auf molekularer Ebene.

Das MHC-Motiv des WLA.1-1 vom amerikanischen Waldmurmeltier, einem Hepatitis-B-Virus Modellsystem, wurde für T-Zellepitopstudien bestimmt. Des Weiteren konnten die HLA-Allele A*2601, A*24, B*0702 und B*4402 anhand von massenspektrometrisch identifizierten natürlichen HLA-Liganden verfeinert werden, so dass jetzt eine optimierte T-Zellepitopvorhersage für diese Allele möglich ist.

5. Publikationsliste

Claudia Lemmel

1. Silveira,M.M., Wisbeck,E., **Lemmel,C.**, Erzinger,G., da Costa,J.P., Bertasso,M., and Jonas,R. (1999). Bioconversion of glucose and fructose to sorbitol and gluconic acid by untreated cells of *Zymomonas mobilis*. *J. Biotechnol.* 75, 99-103.
2. Huebener,N., Lange,B., **Lemmel,C.**, Rammensee,H.-G., Strandsby,A., Wenkel,J., Jikai,J., Zeng,Y., Gaedicke,G., and Lode,H.N. (2003). Vaccination with minigenes encoding for novel 'self' antigens are effective in DNA-vaccination against neuroblastoma. *Cancer Lett.* 197, 211-217.
3. **Lemmel,C.** and Stevanovic,S. (2003). The use of HPLC-MS in T-cell epitope identification. *Methods* 29, 248-259.
4. **Lemmel,C.**, Rammensee,H.-G., and Stevanovic,S. (2003). Peptide Motif of HLA-B*05101 and Linkage To Behcet's Disease. *Immunology of Behcet's Disease*, Manfred Zierhut and Shigeaki Ohno, eds. SWETS & ZEITLINGER, pp. 127-138.
5. Stevanovic,S., **Lemmel,C.**, Hantschel,M., and Eberle,U. (2003). Generating data for databases--the peptide repertoire of HLA molecules. *Novartis. Found. Symp.* 254:143-55; *discussion* 155-64, 216-22, 250-2., 143-155.
6. **Lemmel,C.**, Weik,S., Eberle,E., Dengjel,J., Kratt,T., Becker,H.-D., Rammensee,H.-G., and Stevanovic S. (2004). Differential quantitative analysis of MHC ligands using stable isotope labelling in mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* 22, 450-454.

6. Abkürzungsverzeichnis

β2m	Beta 2 Mikroglobulin
APC	Antigen präsentierende Zelle (Antigen Presenting Cell)
As	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-Propan Sulfonat
CID	Collision-induced decay
CTL	Cytotoxic T-Lymphocyte
EBV	Epstein-Barr-Virus
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Electrospray Ionisation
EST	Expressed sequence tag
FACS	Fluorescence-Activated-Cell-Sorter
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
H2	Histocompatibility antigens 2
HLA	Human leucocyte antigen
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	Horseradish Peroxidase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LC-MS	Liquid Chromatography Mass Spectrometry
mAk	monoklonaler Antikörper
MALDI-Tof	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of flight
MHC	Major Histocompatibility Complex
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem Massenspektrometrie
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
pH	Potentia Hydrogenii
PSD	Post source decay
PTC	Phenylthiocarbamoyl
PTH	Phenylthiohydantoin
Q-Tof	Quadrupol-Time of flight
RP-HPLC	Reversed Phase HPLC
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
TAP	Transporter Associated with Antigen Processing
TCR	T-cell receptor
TFA	Trifluoressigsäure
TIC	Total Ion Current

7. Literaturverzeichnis

1. Snell,G.D. Methods for the study of histocompatibility genes. *J. Genet.* 87-108 (1948).
2. Madden,D.R., Garboczi,D.N. & Wiley,D.C. The antigenic identity of peptide-MHC complexes: a comparison of the conformations of five viral peptides presented by HLA-A2. *Cell* **75**, 693-708 (1993).
3. Stern,L.J. *et al.* Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* **368**, 215-221 (1994).
4. Saper,M.A., Bjorkman,P.J. & Wiley,D.C. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **219**, 277-319 (1991).
5. Bouvier,M. & Wiley,D.C. Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of MHC class I molecules. *Science* **265**, 398-402 (1994).
6. Falk,K., Rotzschke,O., Stevanovic,S., Jung,G. & Rammensee,H.G. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* **351**, 290-296 (1991).
7. Rotzschke,O. *et al.* Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells. *Nature* **348**, 252-254 (1990).
8. Stevanovic,S. & Jung,G. Multiple sequence analysis: pool sequencing of synthetic and natural peptide libraries. *Anal. Biochem.* **212**, 212-220 (1993).
9. Parker,K.C., Bednarek,M.A. & Coligan,J.E. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J. Immunol.* **152**, 163-175 (1994).
10. Rammensee,H., Bachmann,J., Emmerich,N.P., Bachor,O.A. & Stevanovic,S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* **50**, 213-219 (1999).
11. Yewdell,J.W., Anton,L.C. & Bennink,J.R. Defective ribosomal products (DRiPs): a major source of antigenic peptides for MHC class I molecules? *J. Immunol.* **157**, 1823-1826 (1996).
12. Reits,E.A., Vos,J.C., Gromme,M. & Neefjes,J. The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature* **404**, 774-778 (2000).
13. Schubert,U. *et al.* Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* **404**, 770-774 (2000).
14. Stoltze,L. *et al.* Generation of the vesicular stomatitis virus nucleoprotein cytotoxic T lymphocyte epitope requires proteasome-dependent and -independent proteolytic activities. *Eur. J. Immunol.* **28**, 4029-4036 (1998).

15. van Endert, P.M. Genes regulating MHC class I processing of antigen. *Curr. Opin. Immunol.* **11**, 82-88 (1999).
16. Tanaka, K. & Kasahara, M. The MHC class I ligand-generating system: roles of immunoproteasomes and the interferon-gamma-inducible proteasome activator PA28. *Immunol. Rev.* **163:161-76.**, 161-176 (1998).
17. Dick, T.P. *et al.* Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands. *Cell* **86**, 253-262 (1996).
18. Groettrup, M., Soza, A., Kuckelkorn, U. & Kloetzel, P.M. Peptide antigen production by the proteasome: complexity provides efficiency. *Immunol. Today* **17**, 429-435 (1996).
19. Ehring, B., Meyer, T.H., Eckerskorn, C., Lottspeich, F. & Tampe, R. Effects of major-histocompatibility-complex-encoded subunits on the peptidase and proteolytic activities of human 20S proteasomes. Cleavage of proteins and antigenic peptides. *Eur. J. Biochem.* **235**, 404-415 (1996).
20. Kisselev, A.F., Akopian, T.N. & Goldberg, A.L. Range of sizes of peptide products generated during degradation of different proteins by archaeal proteasomes. *J. Biol. Chem.* **273**, 1982-1989 (1998).
21. Wenzel, T., Eckerskorn, C., Lottspeich, F. & Baumeister, W. Existence of a molecular ruler in proteasomes suggested by analysis of degradation products. *FEBS Lett.* **349**, 205-209 (1994).
22. Trowsdale, J. *et al.* Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the 'ABC' superfamily of transporters. *Nature* **348**, 741-744 (1990).
23. Shepherd, J.C. *et al.* TAP1-dependent peptide translocation in vitro is ATP dependent and peptide selective. *Cell* **74**, 577-584 (1993).
24. Momburg, F. & Hammerling, G.J. Generation and TAP-mediated transport of peptides for major histocompatibility complex class I molecules. *Adv. Immunol.* **68:191-256.**, 191-256 (1998).
25. Rammensee, H.G., Friede, T. & Stevanovic, S. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* **41**, 178-228 (1995).
26. Uebel, S. *et al.* Recognition principle of the TAP transporter disclosed by combinatorial peptide libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 8976-8981 (1997).
27. Beninga, J., Rock, K.L. & Goldberg, A.L. Interferon-gamma can stimulate post-proteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase. *J. Biol. Chem.* **273**, 18734-18742 (1998).
28. Geier, E. *et al.* A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome. *Science* **283**, 978-981 (1999).
29. Stoltze, L. *et al.* Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nat Immunol.* **1**, 413-418 (2000).

30. Falk, K., Rotzschke, O. & Rammensee, H.G. Cellular peptide composition governed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* **348**, 248-251 (1990).
31. York, I.A. *et al.* The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nat Immunol.* **3**, 1177-1184 (2002).
32. Saric, T. *et al.* An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat Immunol.* **3**, 1169-1176 (2002).
33. Serwold, T., Gonzalez, F., Kim, J., Jacob, R. & Shastri, N. ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* **419**, 480-483 (2002).
34. Hammond, C. & Helenius, A. Quality control in the secretory pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 523-529 (1995).
35. Sadasivan, B., Lehner, P.J., Ortmann, B., Spies, T. & Cresswell, P. Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity.* **5**, 103-114 (1996).
36. Nakagawa, T. *et al.* Cathepsin L: critical role in Ii degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science* **280**, 450-453 (1998).
37. Nakagawa, T.Y. *et al.* Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice. *Immunity.* **10**, 207-217 (1999).
38. Pieters, J. MHC class II restricted antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* **9**, 89-96 (1997).
39. Cresswell, P. Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* **84**, 505-507 (1996).
40. Geuze, H.J. The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning. *Immunol. Today* **19**, 282-287 (1998).
41. Denzin, L.K. & Cresswell, P. HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading. *Cell* **82**, 155-165 (1995).
42. Kropshofer, H. *et al.* A role for HLA-DO as a co-chaperone of HLA-DM in peptide loading of MHC class II molecules. *EMBO J.* **17**, 2971-2981 (1998).
43. Heath, W.R. & Carbone, F.R. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **19:47-64.**, 47-64 (2001).
44. Gobin, S.J., Peijnenburg, A., Keijsers, V. & van den Elsen, P.J. Site alpha is crucial for two routes of IFN gamma-induced MHC class I transactivation: the ISRE-mediated route and a novel pathway involving CIITA. *Immunity.* **6**, 601-611 (1997).

45. Gobin,S.J. *et al.* The RFX complex is crucial for the constitutive and CIITA-mediated transactivation of MHC class I and beta2-microglobulin genes. *Immunity*. **9**, 531-541 (1998).
46. Shiver,J.W., Su,L. & Henkart,P.A. Cytotoxicity with target DNA breakdown by rat basophilic leukemia cells expressing both cytolysin and granzyme A. *Cell* **71**, 315-322 (1992).
47. Suda,T., Takahashi,T., Golstein,P. & Nagata,S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* **75**, 1169-1178 (1993).
48. Fisher,G.H. *et al.* Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* **81**, 935-946 (1995).
49. Kawakami,Y., Robbins,P.F. & Rosenberg,S.A. Human melanoma antigens recognized by T lymphocytes. *Keio J. Med.* **45**, 100-108 (1996).
50. Hanahan,D. & Weinberg,R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70 (2000).
51. De Plaen,E. *et al.* Immunogenic (tum-) variants of mouse tumor P815: cloning of the gene of tum- antigen P91A and identification of the tum- mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**, 2274-2278 (1988).
52. Van der Bruggen,P. *et al.* A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* **254**, 1643-1647 (1991).
53. Wolfel,T. *et al.* A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* **269**, 1281-1284 (1995).
54. Saeterdal,I., Gjertsen,M.K., Straten,P., Eriksen,J.A. & Gaudernack,G. A TGF betaRII frameshift-mutation-derived CTL epitope recognised by HLA-A2-restricted CD8+ T cells. *Cancer Immunol. Immunother.* **50**, 469-476 (2001).
55. Van den Eynde,B.J. *et al.* A new antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human kidney tumor results from reverse strand transcription. *J. Exp. Med.* **190**, 1793-1800 (1999).
56. Guilloux,Y. *et al.* A peptide recognized by human cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas is encoded by an intron sequence of the N-acetylglucosaminyltransferase V gene. *J. Exp. Med.* **183**, 1173-1183 (1996).
57. Clark,R.E. *et al.* Direct evidence that leukemic cells present HLA-associated immunogenic peptides derived from the BCR-ABL b3a2 fusion protein. *Blood* **98**, 2887-2893 (2001).
58. Skipper,J.C. *et al.* An HLA-A2-restricted tyrosinase antigen on melanoma cells results from posttranslational modification and suggests a novel pathway for processing of membrane proteins. *J. Exp. Med.* **183**, 527-534 (1996).

59. Tsang, K.Y. *et al.* Generation of human cytotoxic T cells specific for human carcinoembryonic antigen epitopes from patients immunized with recombinant vaccinia-CEA vaccine. *J. Natl. Cancer Inst.* **87**, 982-990 (1995).
60. Carrel, S., Delisle, M.C. & Mach, J.P. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity of human colon carcinoma cells induced by specific antisera against carcinoembryonic antigen. *Cancer Res.* **37**, 2644-2650 (1977).
61. Disis, M.L. *et al.* Existing T-cell and antibody immunity to HER-2/neu protein in patients with breast cancer. *Cancer Res.* **54**, 16-20 (1994).
62. Karanikas, V. *et al.* Antibody and T cell responses of patients with adenocarcinoma immunized with mannan-MUC1 fusion protein. *J. Clin. Invest* **100**, 2783-2792 (1997).
63. Cheresch, D.A., Honsik, C.J., Staffileno, L.K., Jung, G. & Reisfeld, R.A. Disialoganglioside GD3 on human melanoma serves as a relevant target antigen for monoclonal antibody-mediated tumor cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **82**, 5155-5159 (1985).
64. Jager, E. *et al.* Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *J. Exp. Med.* **187**, 265-270 (1998).
65. Traversari, C. *et al.* A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytotoxic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E. *J. Exp. Med.* **176**, 1453-1457 (1992).
66. Abrams, S.I., Stanziale, S.F., Lunin, S.D., Zaremba, S. & Schlom, J. Identification of overlapping epitopes in mutant ras oncogene peptides that activate CD4+ and CD8+ T cell responses. *Eur. J. Immunol.* **26**, 435-443 (1996).
67. Gedde-Dahl, T., III, Spurkland, A., Eriksen, J.A., Thorsby, E. & Gaudernack, G. Memory T cells of a patient with follicular thyroid carcinoma recognize peptides derived from mutated p21 ras (Gln->Leu61). *Int. Immunol.* **4**, 1331-1337 (1992).
68. Takahashi, M. *et al.* Antibody to ras proteins in patients with colon cancer. *Clin. Cancer Res.* **1**, 1071-1077 (1995).
69. Theobald, M. *et al.* Tolerance to p53 by A2.1-restricted cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **185**, 833-841 (1997).
70. Crawford, L.V., Pim, D.C. & Bulbrook, R.D. Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer. *Int. J. Cancer* **30**, 403-408 (1982).
71. Wolfel, T. *et al.* Two tyrosinase nonapeptides recognized on HLA-A2 melanomas by autologous cytotoxic T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **24**, 759-764 (1994).
72. Sahin, U. *et al.* Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 11810-11813 (1995).

73. Kawakami, Y. *et al.* Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-infiltrating T lymphocytes associated with in vivo tumor regression. *J. Immunol.* **154**, 3961-3968 (1995).
74. Huang, S.K., Okamoto, T., Morton, D.L. & Hoon, D.S. Antibody responses to melanoma/melanocyte autoantigens in melanoma patients. *J. Invest Dermatol.* **111**, 662-667 (1998).
75. Tarpey, I. *et al.* Human cytotoxic T lymphocytes stimulated by endogenously processed human papillomavirus type 11 E7 recognize a peptide containing a HLA-A2 (A*0201) motif. *Immunology* **81**, 222-227 (1994).
76. Konya, J. & Dillner, J. Immunity to oncogenic human papillomaviruses. *Adv. Cancer Res.* **82:205-38.**, 205-238 (2001).
77. Scanlan, M.J. *et al.* Identification of cancer/testis genes by database mining and mRNA expression analysis. *Int. J. Cancer* **98**, 485-492 (2002).
78. Rammensee, H.G., Weinschenk, T., Gouttefangeas, C. & Stevanovic, S. Towards patient-specific tumor antigen selection for vaccination. *Immunol. Rev.* **188:164-76.**, 164-176 (2002).
79. Renkvist, N., Castelli, C., Robbins, P.F. & Parmiani, G. A listing of human tumor antigens recognized by T cells. *Cancer Immunol. Immunother.* **50**, 3-15 (2001).
80. Smith, E.S. *et al.* Lethality-based selection of recombinant genes in mammalian cells: application to identifying tumor antigens. *Nat Med.* **7**, 967-972 (2001).
81. Cox, A.L. *et al.* Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science* **264**, 716-719 (1994).
82. Flad, T. *et al.* Direct identification of major histocompatibility complex class I-bound tumor-associated peptide antigens of a renal carcinoma cell line by a novel mass spectrometric method. *Cancer Res.* **58**, 5803-5811 (1998).
83. Barnea, E. *et al.* Analysis of endogenous peptides bound by soluble MHC class I molecules: a novel approach for identifying tumor-specific antigens. *Eur. J. Immunol.* **32**, 213-222 (2002).
84. Pamer, E.G., Harty, J.T. & Bevan, M.J. Precise prediction of a dominant class I MHC-restricted epitope of *Listeria monocytogenes*. *Nature* **353**, 852-855 (1991).
85. Rotzschke, O. *et al.* Exact prediction of a natural T cell epitope. *Eur. J. Immunol.* **21**, 2891-2894 (1991).
86. Celis, E. *et al.* Induction of anti-tumor cytotoxic T lymphocytes in normal humans using primary cultures and synthetic peptide epitopes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 2105-2109 (1994).
87. Vonderheide, R.H., Hahn, W.C., Schultze, J.L. & Nadler, L.M. The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity.* **10**, 673-679 (1999).

88. Schmitz,M. *et al.* Generation of survivin-specific CD8+ T effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides. *Cancer Res.* **60**, 4845-4849 (2000).
89. Sun,Y. *et al.* Identification of a new HLA-A(*)0201-restricted T-cell epitope from the tyrosinase-related protein 2 (TRP2) melanoma antigen. *Int. J. Cancer* **87**, 399-404 (2000).
90. Seliger,B. *et al.* Immune escape of melanoma: first evidence of structural alterations in two distinct components of the MHC class I antigen processing pathway. *Cancer Res.* **61**, 8647-8650 (2001).
91. Kessler,J.H. *et al.* Efficient identification of novel HLA-A(*)0201-presented cytotoxic T lymphocyte epitopes in the widely expressed tumor antigen PRAME by proteasome-mediated digestion analysis. *J. Exp. Med.* **193**, 73-88 (2001).
92. Ayyoub,M. *et al.* Proteasome-assisted identification of a SSX-2-derived epitope recognized by tumor-reactive CTL infiltrating metastatic melanoma. *J. Immunol.* **168**, 1717-1722 (2002).
93. Schultz,E.S. *et al.* The production of a new MAGE-3 peptide presented to cytolytic T lymphocytes by HLA-B40 requires the immunoproteasome. *J. Exp. Med.* **195**, 391-399 (2002).
94. Nussbaum,A.K., Kuttler,C., Hadelers,K.P., Rammensee,H.G. & Schild,H. PAMProC: a prediction algorithm for proteasomal cleavages available on the WWW. *Immunogenetics* **53**, 87-94 (2001).
95. Pascolo,S. *et al.* A MAGE-A1 HLA-A A*0201 epitope identified by mass spectrometry. *Cancer Res.* **61**, 4072-4077 (2001).
96. Schirle,M. *et al.* Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T cell-independent approach. *Eur. J. Immunol.* **30**, 2216-2225 (2000).
97. Sahin,U., Tureci,O. & Pfreundschuh,M. Serological identification of human tumor antigens. *Curr. Opin. Immunol.* **9**, 709-716 (1997).
98. Schena,M., Shalon,D., Davis,R.W. & Brown,P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**, 467-470 (1995).
99. Lockhart,D.J. *et al.* Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* **14**, 1675-1680 (1996).
100. Velculescu,V.E., Zhang,L., Vogelstein,B. & Kinzler,K.W. Serial analysis of gene expression. *Science* **270**, 484-487 (1995).
101. Weinschenk,T. *et al.* Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. *Cancer Res.* **62**, 5818-5827 (2002).

102. Kammula,U.S. *et al.* Functional analysis of antigen-specific T lymphocytes by serial measurement of gene expression in peripheral blood mononuclear cells and tumor specimens. *J. Immunol.* **163**, 6867-6875 (1999).
103. Altman,J.D. *et al.* Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* **274**, 94-96 (1996).
104. Gygi,S.P., Rochon,Y., Franza,B.R. & Aebersold,R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol. Cell Biol.* **19**, 1720-1730 (1999).
105. Washburn,M.P. *et al.* Protein pathway and complex clustering of correlated mRNA and protein expression analyses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 3107-3112 (2003).
106. Yewdell,J.W., Schubert,U. & Bennink,J.R. At the crossroads of cell biology and immunology: DRiPs and other sources of peptide ligands for MHC class I molecules. *J. Cell Sci.* **114**, 845-851 (2001).
107. Schild,H. & Rammensee,H.G. Perfect use of imperfection. *Nature* **404**, 709-710 (2000).
108. Gygi,S.P. *et al.* Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol* **17**, 994-999 (1999).
109. Morel,S. *et al.* Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity.* **12**, 107-117 (2000).
110. Chen,W., Norbury,C.C., Cho,Y., Yewdell,J.W. & Bennink,J.R. Immunoproteasomes shape immunodominance hierarchies of antiviral CD8(+) T cells at the levels of T cell repertoire and presentation of viral antigens. *J. Exp. Med.* **193**, 1319-1326 (2001).
111. Toes,R.E. *et al.* Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J. Exp. Med.* **194**, 1-12 (2001).
112. Hunt,D.F. *et al.* Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. *Science* **255**, 1261-1263 (1992).
113. Luckey,C.J. *et al.* Differences in the expression of human class I MHC alleles and their associated peptides in the presence of proteasome inhibitors. *J. Immunol.* **167**, 1212-1221 (2001).
114. Herberts,C.A. *et al.* Autoreactivity against induced or upregulated abundant self-peptides in HLA-A*0201 following measles virus infection. *Hum. Immunol.* **64**, 44-55 (2003).
115. Macdonald,W.A. *et al.* A naturally selected dimorphism within the HLA-B44 supertype alters class I structure, peptide repertoire, and T cell recognition. *J. Exp. Med.* **198**, 679-691 (2003).

116. Morton,D.L. *et al.* Prolongation of survival in metastatic melanoma after active specific immunotherapy with a new polyvalent melanoma vaccine. *Ann. Surg.* **216**, 463-482 (1992).
117. Veelken,H. *et al.* A phase-I clinical study of autologous tumor cells plus interleukin-2-gene-transfected allogeneic fibroblasts as a vaccine in patients with cancer. *Int. J. Cancer* **70**, 269-277 (1997).
118. Borysiewicz,L.K. *et al.* A recombinant vaccinia virus encoding human papillomavirus types 16 and 18, E6 and E7 proteins as immunotherapy for cervical cancer. *Lancet* **347**, 1523-1527 (1996).
119. Belli,F. *et al.* Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous tumor-derived heat shock protein gp96-peptide complexes: clinical and immunologic findings. *J. Clin. Oncol.* **20**, 4169-4180 (2002).
120. Su,Z. *et al.* Immunological and clinical responses in metastatic renal cancer patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritic cells. *Cancer Res.* **63**, 2127-2133 (2003).
121. Heiser,A. *et al.* Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. *J. Clin. Invest* **109**, 409-417 (2002).
122. Nestle,F.O. *et al.* Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med.* **4**, 328-332 (1998).
123. Gonzalez,G. *et al.* A novel cancer vaccine composed of human-recombinant epidermal growth factor linked to a carrier protein: report of a pilot clinical trial. *Ann. Oncol.* **9**, 431-435 (1998).
124. Scheibenbogen,C. *et al.* Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and foreign helper protein as immunologic adjuvants on the T-cell response to vaccination with tyrosinase peptides. *Int. J. Cancer* **104**, 188-194 (2003).
125. Rosenberg,S.A. *et al.* Impact of cytokine administration on the generation of anti-tumor reactivity in patients with metastatic melanoma receiving a peptide vaccine. *J. Immunol.* **163**, 1690-1695 (1999).
126. Salgaller,M.L., Marincola,F.M., Cormier,J.N. & Rosenberg,S.A. Immunization against epitopes in the human melanoma antigen gp100 following patient immunization with synthetic peptides. *Cancer Res.* **56**, 4749-4757 (1996).
127. Gjertsen,M.K. *et al.* Intradermal ras peptide vaccination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as adjuvant: Clinical and immunological responses in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Int. J. Cancer* **92**, 441-450 (2001).
128. Weber,J.S. *et al.* A phase I trial of an HLA-A1 restricted MAGE-3 epitope peptide with incomplete Freund's adjuvant in patients with resected high-risk melanoma. *J. Immunother.* **22**, 431-440 (1999).

129. Banchereau, J. *et al.* Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res.* **61**, 6451-6458 (2001).
130. Rosenberg, S.A. *et al.* Immunizing patients with metastatic melanoma using recombinant adenoviruses encoding MART-1 or gp100 melanoma antigens. *J. Natl. Cancer Inst.* **90**, 1894-1900 (1998).
131. Tjoa, B.A. *et al.* Evaluation of phase I/II clinical trials in prostate cancer with dendritic cells and PSMA peptides. *Prostate* **36**, 39-44 (1998).
132. Marchand, M. *et al.* Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int. J. Cancer* **80**, 219-230 (1999).
133. Brossart, P. *et al.* Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood* **96**, 3102-3108 (2000).
134. Jager, E. *et al.* Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8+ T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1+ cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 12198-12203 (2000).
135. Rensing, M.E. *et al.* Detection of T helper responses, but not of human papillomavirus-specific cytotoxic T lymphocyte responses, after peptide vaccination of patients with cervical carcinoma. *J. Immunother.* **23**, 255-266 (2000).
136. Scheibenbogen, C. *et al.* Phase 2 trial of vaccination with tyrosinase peptides and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with metastatic melanoma. *J. Immunother.* **23**, 275-281 (2000).
137. Mackensen, A. *et al.* Phase I study in melanoma patients of a vaccine with peptide-pulsed dendritic cells generated in vitro from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *Int. J. Cancer* **86**, 385-392 (2000).
138. Muderspach, L. *et al.* A phase I trial of a human papillomavirus (HPV) peptide vaccine for women with high-grade cervical and vulvar intraepithelial neoplasia who are HPV 16 positive. *Clin. Cancer Res.* **6**, 3406-3416 (2000).
139. Lau, R. *et al.* Phase I trial of intravenous peptide-pulsed dendritic cells in patients with metastatic melanoma. *J. Immunother.* **24**, 66-78 (2001).
140. Slingluff, C.L., Jr. *et al.* Phase I trial of a melanoma vaccine with gp100(280-288) peptide and tetanus helper peptide in adjuvant: immunologic and clinical outcomes. *Clin. Cancer Res.* **7**, 3012-3024 (2001).
141. Storkus, W.J., Howell, D.N., Salter, R.D., Dawson, J.R. & Cresswell, P. NK susceptibility varies inversely with target cell class I HLA antigen expression. *J. Immunol.* **138**, 1657-1659 (1987).
142. DUNN, T.B. & POTTER, M. A transplantable mast-cell neoplasm in the mouse. *J. Natl. Cancer Inst.* **18**, 587-601 (1957).

143. Kimura,A., Dong,R.P., Harada,H. & Sasazuki,T. DNA typing of HLA class II genes in B-lymphoblastoid cell lines homozygous for HLA. *Tissue Antigens* **40**, 5-12 (1992).
144. SCHERER,W.F. & HOOGASIAN,A.F. Preservation at subzero temperatures of mouse fibroblasts (strain L) and human epithelial cells (strain HeLa). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **87**, 480-487 (1954).
145. Heldin,C.H. *et al.* A human osteosarcoma cell line secretes a growth factor structurally related to a homodimer of PDGF A-chains. *Nature* **319**, 511-514 (1986).
146. Barnstable,C.J. *et al.* Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis. *Cell* **14**, 9-20 (1978).
147. Karas,M. & Hillenkamp,F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* **60**, 2299-2301 (1988).
148. Ballard,K.D. & Gaskell,S. Dehydration of peptide (M+H)⁺ ions in the gas phase. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **4**, 477-481 (1993).
149. Kebarle,P. A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **35**, 804-817 (2000).
150. Wilm,M. & Mann,M. Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last. *Int. J. Mass. Spec. Ion Proc.* **136**, 167-180 (1994).
151. Schmelzeisen-Redeker G., Bütfering L. & Röllgen F.W. *Int. J. Mass. Spectrom. Ion Processes* **90**, 123 (1989).
152. Iribarne J.V. & Thompson B.A. *J. Chem. Phys.* **64**, 2287 (1976).
153. Hunt,D.F., Yates,J.R., III, Shabanowitz,J., Winston,S. & Hauer,C.R. Protein sequencing by tandem mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **83**, 6233-6237 (1986).
154. Papayannopoulos,I.A. The interpretation of collision-induced dissociation tandem mass spectra of peptides. *Mass Spectrom. Rev.* **14**, 49-73 (1995).
155. Haller,I., Mirza,U.A. & Chait,B.T. Collision induced decomposition of peptides. Choice of collision parameters. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **7**, 677-681 (1996).
156. Wilm,M. & Mann,M. Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal. Chem.* **68**, 1-8 (1996).
157. Tsaprailis,G. *et al.* Influence of Secondary Structure on the Fragmentation of Protonated Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 5142-5154 (1999).
158. Yalcin,T., Khouw,C., Csizmadia,I.G., Peterson,M.R. & Harrison,A.G. Why are B ions stable species in peptide spectra? *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **6**, 1165-1174 (1995).

159. Nold, M.J., Wesdemiotis, C., Yalcin, T. & Harrison, A.G. Amide bond dissociation in protonated peptides. Structures of the N-terminal ionic and neutral fragments. *Int. J. Mass. Spectrom.* **164**, 137-153 (1996).
160. Roepstorff, P. & Fohlman, J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.* **11**, 601 (1984).
161. Biemann, K. Appendix 6. Mass values for amino acid residues in peptides. *Methods Enzymol.* **193**, 886-887 (1990).
162. Banks, J.F., Jr., Quinn, J.P. & Whitehouse, C.M. LC/ESI-MS determination of proteins using conventional liquid chromatography and ultrasonically assisted electrospray. *Anal. Chem.* **66**, 3688-3695 (1994).
163. Eshraghi, J. & Chowdhury, S.K. Factors affecting electrospray ionization of effluents containing trifluoroacetic acid for high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.* **65**, 3528-3533 (1993).
164. Rammensee, H., Bachmann, J., Emmerich, N.P., Bachor, O.A. & Stevanovic, S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* **50**, 213-219 (1999).
165. Dumrese, T. *et al.* HLA-A26 subtype A pockets accommodate acidic N-termini of ligands. *Immunogenetics* **48**, 350-353 (1998).
166. Planz, O. *et al.* A naturally processed rat major histocompatibility complex class I-associated viral peptide as target structure of borna disease virus-specific CD8+ T cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 13689-13694 (2001).
167. Salter, R.D., Howell, D.N. & Cresswell, P. Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids. *Immunogenetics* **21**, 235-246 (1985).
168. Grakoui, A., McCourt, D.W., Wychowski, C., Feinstone, S.M. & Rice, C.M. A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 10583-10587 (1993).
169. Bartenschlager, R., Ahlborn-Laake, L., Mous, J. & Jacobsen, H. Nonstructural protein 3 of the hepatitis C virus encodes a serine-type proteinase required for cleavage at the NS3/4 and NS4/5 junctions. *J. Virol.* **67**, 3835-3844 (1993).
170. Kim, D.W., Gwack, Y., Han, J.H. & Choe, J. C-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protein contains an RNA helicase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **215**, 160-166 (1995).
171. Behrens, S.E., Tomei, L. & De Francesco, R. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J.* **15**, 12-22 (1996).
172. Ward, S., Lauer, G., Isba, R., Walker, B. & Klenerman, P. Cellular immune responses against hepatitis C virus: the evidence base 2002. *Clin. Exp. Immunol.* **128**, 195-203 (2002).

173. Lechner,F. *et al.* Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J. Exp. Med.* **191**, 1499-1512 (2000).
174. Schoor,O. *et al.* Moderate degradation does not preclude microarray analysis of small amounts of RNA. *Biotechniques* **35**, 1192-1201 (2003).
175. Kau,T.R., Way,J.C. & Silver,P.A. Nuclear transport and cancer: from mechanism to intervention. *Nat Rev. Cancer* **4**, 106-117 (2004).
176. Muller,S. *et al.* A role for receptor tyrosine phosphatase zeta in glioma cell migration. *Oncogene* **22**, 6661-6668 (2003).
177. Kadomatsu,K. & Muramatsu,T. Midkine and pleiotrophin in neural development and cancer. *Cancer Lett.* **204**, 127-143 (2004).
178. Ulbricht,U. *et al.* Expression and function of the receptor protein tyrosine phosphatase zeta and its ligand pleiotrophin in human astrocytomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **62**, 1265-1275 (2003).
179. Dorries,U. & Schachner,M. Tenascin mRNA isoforms in the developing mouse brain. *J. Neurosci. Res.* **37**, 336-347 (1994).
180. Laywell,E.D. *et al.* Enhanced expression of the developmentally regulated extracellular matrix molecule tenascin following adult brain injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 2634-2638 (1992).
181. Chiquet-Ehrismann,R. Tenascin and other adhesion-modulating proteins in cancer. *Semin. Cancer Biol.* **4**, 301-310 (1993).
182. Herold-Mende,C., Andl,T., Laemmler,F., Reisser,C. & Eichhorn,S. [Expression and localization profile of tenascin in squamous cell carcinomas of the head and neck]. *HNO* **47**, 723-729 (1999).
183. Broll,R., Meyer,S., Neuber,M. & Bruch,H.P. Expression of tenascin in tumors of the esophagus, small intestine and colorectum. An immunohistochemical study. *Gen. Diagn. Pathol.* **141**, 111-119 (1995).
184. Hanamura,N., Yoshida,T., Matsumoto,E., Kawarada,Y. & Sakakura,T. Expression of fibronectin and tenascin-C mRNA by myofibroblasts, vascular cells and epithelial cells in human colon adenomas and carcinomas. *Int. J. Cancer* **73**, 10-15 (1997).
185. Herold-Mende,C. *et al.* Clinical impact and functional aspects of tenascin-C expression during glioma progression. *Int. J. Cancer* **98**, 362-369 (2002).
186. Nishikawa,R. *et al.* A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 7727-7731 (1994).
187. Sehgal,A. Molecular changes during the genesis of human gliomas. *Semin. Surg. Oncol.* **14**, 3-12 (1998).

188. Voldborg,B.R., Damstrup,L., Spang-Thomsen,M. & Poulsen,H.S. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann. Oncol.* **8**, 1197-1206 (1997).
189. Reardon,D.A. *et al.* Phase II trial of murine (131)I-labeled antitenascin monoclonal antibody 81C6 administered into surgically created resection cavities of patients with newly diagnosed malignant gliomas. *J. Clin. Oncol.* **20**, 1389-1397 (2002).
190. Popperl,G. *et al.* [Initial experiences with adjuvant locoregional radioimmunotherapy using 131I-labeled monoclonal antibodies against tenascin (BC-4) for treatment of glioma (WHO III and IV)]. *Nuklearmedizin* **41**, 120-128 (2002).
191. Goetz,C. *et al.* Locoregional radioimmunotherapy in selected patients with malignant glioma: experiences, side effects and survival times. *J. Neurooncol.* **62**, 321-328 (2003).
192. Goetz,C. *et al.* Intralesional radioimmunotherapy in the treatment of malignant glioma: clinical and experimental findings. *Acta Neurochir. Suppl* **88:69-75.**, 69-75 (2003).
193. Ellis,L.M. & Hoff,P.M. Targeting the epidermal growth factor receptor: an important incremental step in the battle against colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **22**, 1177-1179 (2004).
194. Janmaat,M.L. & Giaccone,G. The epidermal growth factor receptor pathway and its inhibition as anticancer therapy. *Drugs Today (Barc.)* **39 Suppl C:61-80.**, 61-80 (2003).
195. Kim,E.S., Vokes,E.E. & Kies,M.S. Cetuximab in cancers of the lung and head & neck. *Semin. Oncol.* **31**, 61-67 (2004).
196. Gedde-Dahl,T., III, Spurkland,A., Eriksen,J.A., Thorsby,E. & Gaudernack,G. Memory T cells of a patient with follicular thyroid carcinoma recognize peptides derived from mutated p21 ras (Gln-->Leu61). *Int. Immunol.* **4**, 1331-1337 (1992).
197. Schmitz,M. *et al.* Generation of survivin-specific CD8+ T effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides. *Cancer Res.* **60**, 4845-4849 (2000).
198. Casati,C. *et al.* The apoptosis inhibitor protein survivin induces tumor-specific CD8+ and CD4+ T cells in colorectal cancer patients. *Cancer Res.* **63**, 4507-4515 (2003).
199. Kishi,H. *et al.* Expression of the survivin gene in prostate cancer: correlation with clinicopathological characteristics, proliferative activity and apoptosis. *J. Urol.* **171**, 1855-1860 (2004).
200. Schmidt,S.M. *et al.* Induction of adipophilin-specific cytotoxic T lymphocytes using a novel HLA-A2-binding peptide that mediates tumor cell lysis. *Cancer Res.* **64**, 1164-1170 (2004).

201. Sadovnikova,E., Jopling,L.A., Soo,K.S. & Stauss,H.J. Generation of human tumor-reactive cytotoxic T cells against peptides presented by non-self HLA class I molecules. *Eur. J. Immunol.* **28**, 193-200 (1998).
202. Brossart,P. *et al.* Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies. *Blood* **93**, 4309-4317 (1999).
203. Brossart,P. *et al.* The epithelial tumor antigen MUC1 is expressed in hematological malignancies and is recognized by MUC1-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Res.* **61**, 6846-6850 (2001).
204. Vissers,J.L. *et al.* The renal cell carcinoma-associated antigen G250 encodes a human leukocyte antigen (HLA)-A2.1-restricted epitope recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res.* **59**, 5554-5559 (1999).
205. Kessler,J.H. *et al.* Efficient identification of novel HLA-A(*)0201-presented cytotoxic T lymphocyte epitopes in the widely expressed tumor antigen PRAME by proteasome-mediated digestion analysis. *J. Exp. Med.* **193**, 73-88 (2001).
206. Furuya,M. *et al.* Expression of regulator of G protein signalling protein 5 (RGS5) in the tumour vasculature of human renal cell carcinoma. *J. Pathol.* **203**, 551-558 (2004).
207. McFadyen,M.C., Melvin,W.T. & Murray,G.I. Cytochrome P450 enzymes: novel options for cancer therapeutics. *Mol. Cancer Ther.* **3**, 363-371 (2004).
208. Sasaki,M. *et al.* Polymorphisms of the CYP1B1 gene as risk factors for human renal cell cancer. *Clin. Cancer Res.* **10**, 2015-2019 (2004).
209. Alexander,J. *et al.* Development of high potency universal DR-restricted helper epitopes by modification of high affinity DR-blocking peptides. *Immunity.* **1**, 751-761 (1994).
210. Stevanovic,S. & Schild,H. Quantitative aspects of T cell activation--peptide generation and editing by MHC class I molecules. *Semin. Immunol.* **11**, 375-384 (1999).
211. Pamer,E.G. Antigen presentation in the immune response to infectious diseases. *Clin. Infect. Dis.* **28**, 714-716 (1999).
212. Morrison,L.A., Lukacher,A.E., Braciale,V.L., Fan,D.P. & Braciale,T.J. Differences in antigen presentation to MHC class I-and class II-restricted influenza virus-specific cytolytic T lymphocyte clones. *J. Exp. Med.* **163**, 903-921 (1986).
213. Moore,M.W., Carbone,F.R. & Bevan,M.J. Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell* **54**, 777-785 (1988).
214. van der Bruggen,B.P. *et al.* Tumor-specific shared antigenic peptides recognized by human T cells. *Immunol. Rev.* **188:51-64.**, 51-64 (2002).

215. Hunt,D.F. *et al.* Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. *Science* **255**, 1261-1263 (1992).
216. Stevanovic,S. & Schild,H. Quantitative aspects of T cell activation--peptide generation and editing by MHC class I molecules. *Semin. Immunol.* **11**, 375-384 (1999).
217. Schena,M., Shalon,D., Davis,R.W. & Brown,P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**, 467-470 (1995).
218. Shevchenko,A. *et al.* Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 14440-14445 (1996).
219. Schultz,E.S. *et al.* The production of a new MAGE-3 peptide presented to cytolytic T lymphocytes by HLA-B40 requires the immunoproteasome. *J. Exp. Med.* **195**, 391-399 (2002).
220. Morel,S. *et al.* Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity.* **12**, 107-117 (2000).
221. Chen,W., Norbury,C.C., Cho,Y., Yewdell,J.W. & Bennink,J.R. Immunoproteasomes shape immunodominance hierarchies of antiviral CD8(+) T cells at the levels of T cell repertoire and presentation of viral antigens. *J. Exp. Med.* **193**, 1319-1326 (2001).
222. Toes,R.E. *et al.* Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J. Exp. Med.* **194**, 1-12 (2001).
223. Gygi,S.P. *et al.* Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol* **17**, 994-999 (1999).
224. Ji,J. *et al.* Strategy for qualitative and quantitative analysis in proteomics based on signature peptides. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **745**, 197-210 (2000).
225. Cagney,G. & Emili,A. De novo peptide sequencing and quantitative profiling of complex protein mixtures using mass-coded abundance tagging. *Nat Biotechnol* **20**, 163-170 (2002).
226. Munchbach,M., Quadroni,M., Miotto,G. & James,P. Quantitation and facilitated de novo sequencing of proteins by isotopic N-terminal labeling of peptides with a fragmentation-directing moiety. *Anal. Chem.* **72**, 4047-4057 (2000).
227. Kimmel,J.R. Analysis of Homoarginine. *Methods Enzymol.* **11**, 584-589 (1967).
228. Wang,Q. *et al.* Cloning and characterization of full-length human ribosomal protein L15 cDNA which was overexpressed in esophageal cancer. *Gene* **263**, 205-209 (2001).

229. Ougolkov,A.V., Yamashita,K., Mai,M. & Minamoto,T. Oncogenic beta-catenin and MMP-7 (matrilysin) cosegregate in late-stage clinical colon cancer. *Gastroenterology* **122**, 60-71 (2002).
230. Robbins,P.F. *et al.* A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.* **183**, 1185-1192 (1996).
231. Zhang,R., Sioma,C.S., Wang,S. & Regnier,F.E. Fractionation of isotopically labeled peptides in quantitative proteomics. *Anal. Chem.* **73**, 5142-5149 (2001).

8. Danksagung

PD Dr. Stefan Stevanović gilt mein besonderer Dank, da er mich auf einem wichtigen Lebensabschnitt so gut begleitet und geleitet hat.

Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee danke ich sehr für sein immerwährendes Interesse an allen Aspekten dieser Arbeit und seine stete Unterstützung in fachlicher, finanzieller und vor allem menschlicher Hinsicht.

Bei Toni Weinschenk und Jörn Dengjel bedanke ich mich für die sehr gute Zusammenarbeit vor allem im „Kuhdoofladen“.

Oliver Schoor möchte ich für die exzellente Durchführung aller Microarray-Arbeiten und die interessanten Gespräche und Hilfestellungen bezüglich des DNA-S... danken.

Steffen Weik danke ich für die intensiven Bemühungen um eine perfekte Synthese.

Florian Obermayr, Maik Häntschel, Ute Eberle, Christian Reichle, Björn Krämer und Tobias Krüger danke ich für die unermüdliche Tumorbeschaffung und Aufarbeitung.

Patricia Hrستیć, als gute Seele des Labors, danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft und die erholsamen kleinen Pausen zwischendurch.

Lynne Yakes gebührt mein Dank für ihre stets nette Art mit der sie mir bei diversen Fragen zur Seite gestanden hat.

Claudia Falkenburger, Franziska Löwenstein, Gerhard Hörr und Beate Pömmerl danke ich für den reibungslosen Ablauf bei den grundlegenden Dingen, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Alfred Nordheim danke ich für die unkomplizierte Nutzung des MALDI-Tof Geräts und Martin Priemer für die kompetente Hilfe bei allen damit verbundenen Fragen.

An Darius Moradpour, Benno Wölk und Jan Martin Berke geht mein Dank für eine exzellente Kooperation im Bereich der Hepatitis-C-Virus-Epitopsuche.

Meinen Kooperationspartnern Dr. Ivana Duranović-Bello (Ulm), Jens Brandenburger aus der Gruppe H. Kalbacher (Tübingen), Irina Idler aus der Gruppe H. Bujard (Heidelberg), Mengji Lu aus der Gruppe M. Roggendorf (Essen) danke ich für die Bereitstellung von gutem Ausgangsmaterial für verschiedenste massenspektrometrische Untersuchungen.

Für die Versorgung mit den unterschiedlichsten Tumormaterialien danke ich Prof. Dr. H.-D. Becker, Dr. T. Kratt (Chirurgische Klinik, Tübingen - Kolonkarzinom, Magenkarzinom), Prof. Dr. A. Stenzl, Dr. S. Corvin und J. Hennenlotter (Klinik für Urologie, Tübingen - Nierenzellkarzinom), Dr. C. Herold-Mende und Dr. P. Beckhove (Neurochirurgische Klinik Heidelberg – Glioblastom).

Danke, natürlich auch an alle lieben Menschen, die mir den Laboralltag so angenehm haben werden lassen – manchmal durch heitere und manchmal durch ernste Gespräche und Taten.

Meinen Eltern danke ich für ihre stete seelische und moralische Unterstützung während dieser Dissertation.

Mark verdient Dank für so viele Dinge - jedenfalls steht fest, ohne ihn wäre alles doppelt so schwer und nicht halb so gut geworden - Danke!

9. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Prof. Albert, Prof. Bayer, Prof. Bisswanger, Prof. Bock, Prof. Bohley, Prof. Breyer-Pfaff, Prof. Eisele, PD Dr. Fröhlich, Prof. Gauglitz, Prof. Günzl, Prof. Hagenmaier, Prof. Hamprecht, Prof. Hanack, Prof. Hoffmann, Prof. Jung, Prof. Lindner, Prof. Mayer, Prof. Mecke, Prof. Nakel, PD. Pommer, Prof. Pfaff, Prof. Pfeiffer, Prof. Probst, Prof. Rammensee, Prof. Reinecke, Prof. Reutter, PD Dr. Schild, PD Dr. Stevanović, PD Dr. Stoeva, Prof. Strähle, Prof. Voelter, Prof. Wegmann, Prof. Weser, Prof. Wiesinger, Prof. Wohlleben

10. Tabellarischer Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Claudia Lemmel
Geburtsdatum/-ort: 13. September 1967; Braunschweig

Schulbildung

1973 - 1977 Grundschole IlmenaustraÙe
1977 - 1979 Orientierungsstufe Rothenburg
1979 - 1983 Realschule John F. Kennedy
1983 - 1986 Gymnasium Hoffmann von Fallersleben

Abschluß: Abitur

Berufsausbildung

September 1986 - Juni 1988 Ausbildung zur Biologisch-technischen Assistentin an der Berufsfachschule Dr. von Morgenstern in Braunschweig

Mai 1994 - August 1995 Studium der Industriellen Chemie (Quimica Industrial) an der UNIVILLE in Joinville (Brasilien).

Oktober 1995 - Dezember 2000 Studium der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
Diplomarbeit: Bestimmung der Feinspezifität von MHC-Molekülen durch Ligandenanalyse

März 2001- Juni 2004 **Doktorarbeit:** Qualitative und quantitative Analyse krankheitsassoziierter MHC-Klasse-I-Liganden durch massenspektrometrische Verfahren

Diplom- und Doktorarbeit wurden im Arbeitskreis von Prof. Dr. H.-G. Rammensee unter Anleitung von PD Dr. S. Stevanović am Institut für Zellbiologie in der Abteilung Immunologie der Universität Tübingen erstellt.

Berufserfahrung als Biologisch-technische Assistentin

Juni 1988 - August 1989 Pharma Biotechnologie Hannover
September 1989 - August 1994 Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig / Joinville (Brasilien)
September 1994 - August 1995 Centro de Desenvolvimento Biotecnológico (CDB) in Joinville (Brasilien)

