

**HLA-Ligandom- und Expressions-Analyse von  
Tumor- und Autophagie-assoziierten Antigenen in  
soliden Tumoren und Zelllinien**

der Fakultät für Biologie  
der EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

von

**Margret Müller**

aus Berlin

vorgelegte

**Dissertation**

2008

Tag der mündlichen Prüfung 26.03.2008  
Dekan: Prof. Dr. H. Mallot  
1. Berichterstatter: Prof. Dr. S. Stevanović  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H.-G. Rammensee

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Das Immunsystem . . . . .	1
1.1.1	MHC-Moleküle . . . . .	1
1.1.2	Antigenprozessierung . . . . .	4
1.1.3	T-Zell-Antwort . . . . .	6
1.2	Tumorerkrankungen und Immuntherapie . . . . .	7
1.2.1	Tumorentstehung . . . . .	7
1.2.2	Tumorantigene . . . . .	8
1.2.3	Identifizierung von T-Zellepitopen . . . . .	9
1.2.4	Immuntherapie . . . . .	12
1.2.5	Nierenzellkarzinom . . . . .	15
1.3	Autophagie . . . . .	18
1.3.1	Molekulare Mechanismen der Autophagie . . . . .	19
1.3.2	Nachweismethoden der Autophagie . . . . .	21
1.3.3	Autophagie und Tumorentwicklung . . . . .	23
1.4	Zielsetzung . . . . .	25
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>26</b>
2.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterial . . . . .	26
2.2	Geräte und Zubehör . . . . .	27
2.3	Zelllinien . . . . .	29
2.4	Zellbiologische Methoden . . . . .	29
2.4.1	Kultivierung der Zelllinien . . . . .	29
2.4.2	Passagieren der Zellen . . . . .	29
2.4.3	Bestimmung der Lebendzellzahl . . . . .	29
2.4.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen . . . . .	30
2.4.5	Zellernte . . . . .	30
2.4.6	Autophagie-Induktion . . . . .	30
2.4.7	Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	30
2.5	Immunologische und biochemische Methoden . . . . .	32
2.5.1	Antikörperreinigung . . . . .	32
2.5.2	Säureextraktion von MHC-Liganden nach Immunpräzipitation . . . . .	32
2.5.3	Proteinbestimmung . . . . .	33
2.5.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) . . . . .	34
2.5.5	Western Blot . . . . .	34
2.5.6	Protein-Mikroarray-Technologie . . . . .	38

2.6	Modifizierung von Peptiden . . . . .	44
2.7	Analytische Methoden . . . . .	45
2.7.1	Sequenzanalyse und Quantifizierung von Peptiden durch Edman-Abbau . . . . .	45
2.7.2	Massenspektrometrie . . . . .	47
2.7.3	Genexpressionsanalysen von Oligonukleotid-Mikroarrays . . . . .	53
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>55</b>
3.1	HLA-Liganden-Analyse von Tumorgeweben im Kontext der individuellen Peptidvakzini- erung von Nierenzellkarzinom-Patienten . . . . .	55
3.1.1	Eingesetzte Tumorgewebe und experimentelle Analysen zur Isolierung von HLA- Liganden . . . . .	55
3.1.2	Diskussion des RCC-Ligandoms und seiner Quellproteine . . . . .	60
3.1.3	Patienten-individuelle Peptidvakzine . . . . .	92
3.2	Protein-Expressionsanalysen ausgewählter Tumorantigene in Tumorgeweben aus Nieren- zellkarzinomen . . . . .	96
3.3	Autophagie-Einflüsse auf das HLA-Ligandom und die Proteinexpression ausgesuchter Antigene . . . . .	106
3.3.1	Autophagie-Nachweise . . . . .	106
3.3.2	Protein-Expressionsanalysen Autophagie-assoziiierter Antigene . . . . .	112
3.3.3	Protein-Expressionsanalysen ausgewählter Tumorantigene und Proliferationsmar- ker nach Autophagie-Induktion . . . . .	120
3.3.4	HLA-Ligandenanalyse nach Autophagie-Induktion . . . . .	123
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>138</b>
<b>5</b>	<b>Listenanhang</b>	<b>139</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>179</b>
<b>7</b>	<b>Literatur</b>	<b>181</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>216</b>
<b>9</b>	<b>Publikationsliste</b>	<b>217</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>219</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Um sich vor schädlichen Einwirkungen durch Pathogene zu schützen, bedient sich der menschliche Organismus des Immunsystems. Dieses bildet ein komplexes System, in dem zelluläre und humorale Anteile zusammenwirken, um Eigen und Fremd zu unterscheiden und das als Fremd erkannte abzuwehren.

Das Immunsystem gründet sich auf Organe, die in zentrale und periphere unterteilt werden. Zu den zentralen Organen zählen das Knochenmark und der Thymus, in denen die Bildung und Entwicklung der meisten Komponenten des Immunsystems stattfindet. Zu den peripheren Organen zählen vor allem Milz, Lymphknoten und das lymphatische System der Schleimhäute. Hier kommt es zur weiteren Entwicklung der Immunzellen, vor allem aber zum Kontakt zwischen dem Immunsystem und Pathogenen. Man unterscheidet zwei Arten der Immunantwort: die eine wird durch das angeborene Immunsystem, die andere durch das erworbene Immunsystem getragen; beide setzen sich aus zellulären und humoralen Bestandteilen zusammen. Das angeborene oder auch nicht-adaptive Immunsystem ist die Grundausstattung, die dem menschlichen Körper von Geburt an mitgegeben ist, um sich schnell gegen allgemeine pathogene Strukturen zu wehren. Zu diesem Teil des Immunsystems gehören unter anderem Phagozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Teile des Komplementsystems. Die erworbene oder auch adaptive Immunität zeichnet sich durch hohe Spezifität und ein sogenanntes „immunologisches Gedächtnis“ aus. Sie beruht auf der klonalen Selektion, durch die eine große Vielfalt ganz spezifisch selektierter Zellen im Körper vorhanden ist, die außerdem die Fähigkeit haben, Antigene, denen sie bereits begegnet sind, wieder zu erkennen und daraufhin umso schneller zu reagieren. Zu den Hauptvertretern der adaptiven Immunität zählen einige antigenpräsentierende Zellen (APC), die T- und die B-Lymphocyten.

Zu den antigenpräsentierenden Zellen werden Makrophagen, Dendritische Zellen (DCs) und B-Zellen gezählt. Die B-Zellen produzieren weiterhin wichtige Komponenten des adaptiven Immunsystems, die Antikörper, die zusammen mit einigen Teilen des Komplementsystems den humoralen Anteil der adaptiven Immunität bilden.

T-Zellen werden weiter unterteilt in T-Helferzellen ( $T_H1$  und  $T_H2$ ) und cytotoxische Killerzellen (CTL). Die T-Helferzellen haben eine Vermittlerrolle im Immunsystem. Durch die Erkennung von Antigenen auf APC werden sie dazu angeregt, wiederum andere Zellen zu aktivieren, indem sie beispielsweise entsprechende Cytokine ausschütten. Die  $T_H1$ -Zellen aktivieren vor allem Makrophagen und CTL,  $T_H2$ -Zellen aktivieren B-Zellen. CTL erkennen und lysieren Zellen, die fremde Proteine enthalten - virale oder tumorspezifische Proteine.

### 1.1.1 MHC-Moleküle

Damit es zur Erkennung von Antigenen durch T-Zellen kommen kann, gibt es auf beinahe allen Körperzellen Moleküle, die den T-Zellen - beziehungsweise dem T-Zellrezeptor (TCR) - Antigene präsentieren.

Im Gegensatz zu Antikörpern, die komplexe und auch nicht-proteinogene Stoffe erkennen, können diese MHC (*major histocompatibility complex*)-Moleküle nur Fragmente von Proteinen binden. Die Bezeichnung MHC beruht darauf, dass die MHC-Moleküle hauptverantwortlich für die Histokompatibilität, also die Verträglichkeit von Gewebe- und Organtransplantaten sind [540]. Beim Menschen werden die MHC-Moleküle auch HLA (*Human leukocyte antigen*), bei der Maus H2 (*Histocompatibility antigen 2*) genannt.

Der MHC ist polygen und polymorph. Polygenie bedeutet, dass es mehrere Genloci für Moleküle derselben Funktion gibt. Polymorphismus bedeutet, dass es für jeden Genlocus in der Bevölkerung viele verschiedene Allele gibt.

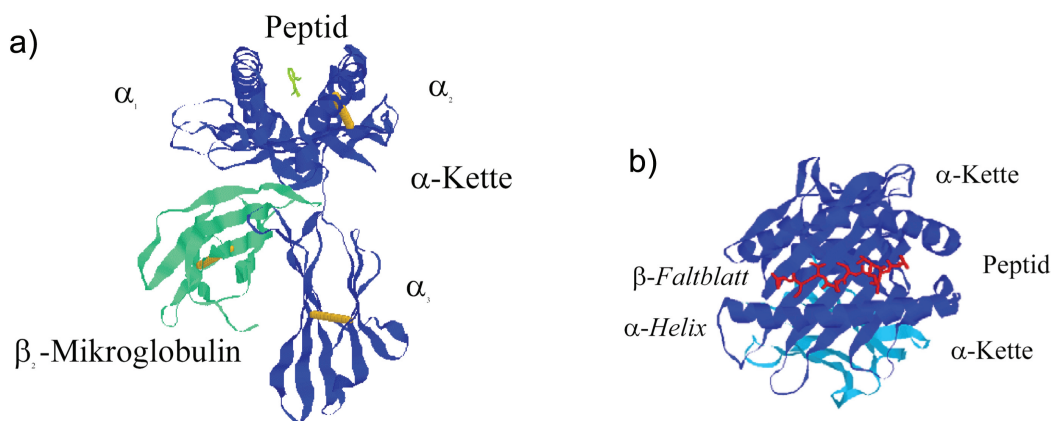
Man unterscheidet zwei Arten von MHC-Molekülen, die sich in Struktur und Funktion unterscheiden: MHC Klasse I- und MHC Klasse II-Moleküle.

### 1.1.1.1 MHC Klasse I-Moleküle

MHC Klasse I-Moleküle sitzen auf beinahe allen kernhaltigen Körperzellen. Sie bilden Heterodimere aus einer schweren (45 kDa) und einer leichten Kette (12 kDa). Die schwere Kette unterteilt sich in die drei Domänen  $\alpha_1$ - $\alpha_3$ . Die leichte Kette wird als  $\beta_2$ -Mikroglobulin ( $\beta_{2m}$ ) bezeichnet und ist nicht kovalent mit der schweren Kette verknüpft. Die schwere Kette wird über einen Transmembran-Anteil in der Zellmembran verankert. Die  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Domänen bilden zusammen eine Furche, in der die Antigenfragmente gebunden und präsentiert werden. Dabei bilden 8  $\beta$ -Faltblätter den Boden dieser Furche und jeweils eine  $\alpha$ -Helix von jeder der Domänen den Rand [47].

MHC Klasse I-Moleküle präsentieren der Umgebung Peptide mit 8-10 AS Länge. Die Peptide liegen meist in gestreckter Konformation in dieser Rinne. Ihre Seitenketten und der C- und N-Terminus stehen in Wechselwirkung mit der Bindungsfurche. C- und N-Terminus werden über invariante Positionen der Bindungsfurche gehalten [57], die Seitenketten dagegen interagieren mit Bindungstaschen innerhalb der Furche. Diese hochpolymorphen Taschen, die durch mehrere spezifische Aminosäuren gebildet werden [156, 498], binden die sogenannten „Ankerreste“ der Peptide. Als Ankerreste werden kleine Gruppen von nahe verwandten Aminosäuren bezeichnet, die an der gleichen Position im Peptidliganden eines MHC-Allels auftreten. Sie bilden die Grundlage für die große Variabilität der verschiedenen MHC I-Allele und der dazu passenden Peptidliganden [447]. So ergibt sich aus den Taschen jedes Allels und den Ankerresten seiner Liganden ein spezifisches Peptidmotiv, aufgrund dessen eine Vorhersage von MHC I-Liganden möglich wird [446]. Die Bindungen zwischen den Taschen und den Ankerresten beruhen auf nicht-kovalenten Wechselwirkungen (van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen, ionische Wechselwirkungen) und auf der optimalen Größe der Ankerreste für die Taschen. Erst durch die Gesamtheit der Wechselwirkungen zwischen MHC-Molekül und Peptidligand entsteht ein stabiler ternärer Komplex aus schwerer Kette, leichter Kette und Peptid.

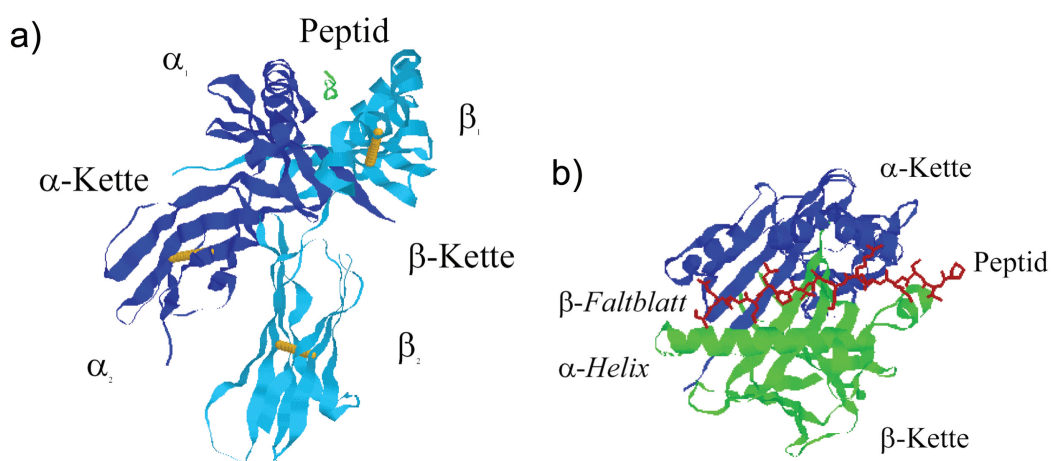
Die Genloci für die schwere Kette liegen in der MHC Klasse I-Region; sie werden beim Menschen mit HLA-A, -B und -C bezeichnet. Das Gen für  $\beta_{2m}$  liegt außerhalb des MHC und ist invariant. Zur Identifikation eines bestimmten Allels eines MHC-Locus wird eine vier- bis achtstellige Zahl angehängt, z.B. HLA-A\*02010101.



**Abbildung 1.1:** a Kristallstruktur des MHC Klasse I-Moleküls HLA-A\*0201; das Proteinrückgrat wird als *ribbon*-Diagramm dargestellt. Die Kristallstrukturen von MHC-Molekülen haben Ähnlichkeit mit einem Elchkopf, wobei die die Bindungsfurche begrenzenden  $\alpha$ -Helices das Geweih bilden. b Peptidbindungsfurche des HLA-A\*0201 aus Sicht des T-Zellrezeptors mit dem gebundenen Peptid als rotem *stick*-Modell. Die  $\alpha$ -Helices begrenzen die Bindungsfurche, das  $\beta$ -Faltblatt bildet den Boden der Bindungsfurche [nach Madden et al. [345]].

### 1.1.1.2 MHC Klasse II-Moleküle

MHC Klasse II-Moleküle sitzen vor allem auf den APC, konnten aber auch auf Nierentumoren nachgewiesen werden [130, 666]. Sie setzen sich zusammen aus zwei etwa gleich schweren nicht kovalent verbundenen Ketten, der 34 kDa schweren  $\alpha$ -Kette und der 29 kDa schweren  $\beta$ -Kette. Beide Ketten besitzen einen Transmembrananteil und lagern sich derart zusammen, dass die  $\alpha_1$ - und die  $\beta_1$ -Domäne ähnlich wie die  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Domänen der MHC Klasse I-Moleküle zusammen eine Furche für die Peptidbindung bilden, die allerdings im Gegensatz zur Furche der MHC Klasse I-Moleküle an beiden Enden offen ist [545].



**Abbildung 1.2:** a Kristallstruktur des MHC Klasse II-Moleküls HLA-DR1 (DRA\*0101/ DRB1\*0101); das Proteinrückgrat wird als *ribbon*-Diagramm dargestellt. Auch hier erkennt man leicht die Ähnlichkeit zu einem Elchkopf. b Peptidbindender Spalt des HLA-DR1 aus Sicht des T-Zellrezeptors mit dem gebundenen Peptid als rotem *stick*-Modell [nach Stern et al., [545]].

MHC Klasse II-Moleküle binden Peptide mit ca. 9-25 AS Länge [448]. Auch hier liegen die Peptide in gestreckter Konformation in der Bindungsfurche, was dazu führt, dass N- und C-Terminus über die Enden der Bindungsfurche hinausragen.

Zwar enthalten MHC Klasse II-Moleküle auch polymorphe Bindungstaschen, die sich in Peptidmotiven mit Ankeraminosäuren niederschlagen, doch sind diese im Vergleich zu Klasse I-Motiven oft stark degeneriert. Die Bindung zwischen MHC Klasse II-Molekülen und Peptiden findet daher hauptsächlich zwischen dem Peptidrückgrat und der Bindungsfurche des MHC-Moleküls statt [545].

Die Genloci für die beiden MHC II-Ketten liegen in der MHC Klasse II-Region und werden beim Menschen mit HLA-DP, -DQ, und -DR bezeichnet.

### 1.1.2 Antigenprozessierung

Die Peptide, die von MHC Klasse I- und II-Molekülen präsentiert werden, unterscheiden sich nicht nur in ihrer Länge, sondern auch in ihrem Ursprung und ihrer Generierung. Während MHC Klasse I-präsentierte Peptide aus cytosolischen Selbst-, viralen oder tumorassoziierten Proteinen stammen, kommen MHC Klasse II-präsentierte Peptide aus intrazellulären Vesikeln, die beispielsweise endocytisch aufgenommene Antigene oder parasitierende Organismen enthalten.

Ihrem unterschiedlichen Ursprung entsprechend werden MHC Klasse I- und II-Peptide auf verschiedene Weise generiert - hier spricht man von Antigenprozessierung.

#### 1.1.2.1 Antigenprozessierung für MHC Klasse I-Moleküle

Die Antigenprozessierung der MHC Klasse I-präsentierten Peptide geschieht im Cytosol durch das Proteasom und cytosolische Proteasen. Das Proteasom ist ein multikatalytischer tonnenförmiger Komplex. Der zentrale Baustein des Proteasoms besteht aus 4 Ringen mit je 7 Untereinheiten ( $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ ) [565]. Zwischen den Ringen liegen Hohlräume. Die Hauptaktivität liegt im zentralen Hohlraum, denn hier liegen die katalytischen Untereinheiten  $\beta_1$  mit proteolytischer Aktivität, die C-terminal nach sauren Resten schneidet,  $\beta_2$  mit trypsinartiger Aktivität (schneidet C-terminal nach basischen Resten) und  $\beta_5$  mit chymotrypsinartiger Aktivität (schneidet C-terminal nach hydrophoben Resten). Genau diese drei Untereinheiten werden unter Interferon $_\gamma$  (IFN $_\gamma$ )-Einfluss ausgetauscht durch MECL1 (für  $\beta_1$ ), LMP2 (für  $\beta_2$ ) und LMP7 (für  $\beta_5$ ). IFN $_\gamma$  induziert unter anderem die Synthese einiger Produkte des MHC-Genclusters. Dazu zählen auch die zwei Untereinheiten LMP2 und LMP7 und der PA28-Aktivator des sogenannten Immunproteasoms (im Gegensatz zum konstitutiven Proteasom) [566]. Durch die Zusammenlagerung von Immunproteasom und PA28-Aktivator kommt es zur quantitativen und qualitativen Steigerung der Peptid-Generierung durch das Proteasom [133, 201]. Die Längenverteilung der gebildeten Fragmente entspricht einer Gaußverteilung mit einer deutlichen Präferenz für Peptide mit einer Länge von 8 bis 11 Aminosäuren [149, 283, 630]. Die generierten Peptide weisen den C-Terminus der anschließend MHC-präsentierten Peptide auf, werden N-terminal jedoch oft noch von weiteren Aminosäuren flankiert [87, 549]. Noch im Cytosol kann es durch weitere Proteasen zur Spaltung der N-terminal verlängerten Vorläuferpeptide kommen [521, 550]. Um die Peptide vor dem vollständigen Abbau durch cytosolische Proteasen zu schützen, werden sie von dem cytosolischen Chaperonin TRiC (TCP-1 ring complex) gebunden [309].

Die Beladung der Peptide auf MHC Klasse I-Moleküle geschieht im endoplasmatischen Reticulum (ER). Dazu werden die Peptide über einen *Transporter associated with Antigen Processing* (TAP) transpor-



tiert, der zur Familie der ABC-Transporter gehört [317] und aus den 2 Untereinheiten TAP1 und TAP2 besteht. TAP wählt Peptide bevorzugt nach bestimmten Längen und Sequenzeigenschaften aus: Die Peptide sollten unter anderem 8-16 AS lang sein und basische oder hydrophobe AS am C-Terminus aufweisen [388]. Sobald sie im ER sind, werden die TAP-importierten Peptide durch die *ER aminopeptidase associated with antigen processing* (ERAAP) auf ihre korrekte Länge getrimmt, soweit dies nicht schon im Cytosol geschehen ist. Diese IFN $\gamma$ -induzierbare Aminopeptidase hat ein breites Spezifitätsspektrum, ist jedoch nicht in der Lage, N-terminale Aminosäuren, die von Prolin gefolgt werden, abzuspalten, was zu dem häufigen X-Pro-Xn-Motiv führt [528].

Im ER warten auf die Peptide die neu synthetisierten MHC Klasse I-Moleküle, die vom Chaperon Calnexin an das TAP-assoziierte Chaperon Tapasin weitergegeben werden. Weiterhin gehören diesem Komplex die Chaperone Calreticulin und Erp57 an [406, 488]. Erst durch die Beladung mit einem Peptid nehmen die MHC-Moleküle eine stabile Konformation an und können nun über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert werden.

### 1.1.2.2 Antigenprozessierung für MHC Klasse II-Moleküle

MHC Klasse II-präsentierte Peptide stammen von Antigenen, die über unspezifische oder rezeptorvermittelte Endocytose von APC aufgenommen werden und den endosomalen Abbauweg einschlagen: durch steigende Ansäuerung der Endosomen werden Proteasen aktiviert, die Proteine zu Peptiden abbauen. Dabei geht man von mehreren Schritten aus, in denen zunächst durch Endoproteasen, vor allem durch die Cysteinprotease AEP (Asparaginendopeptidase), Proteine in kleinere Fragmente gespalten werden, so dass es zur Entfaltung der Proteine und Bindung an MHC Klasse II-Moleküle kommt. Sekundäre Endoproteasen, unter anderem Cathepsin D und E, können durch Spaltung dieser partiell denaturierten Substrate weitere MHC Klasse II-Bindungsstellen freilegen und mit dem Trimmen der bereits MHC-gebundenen Fragmente beginnen. Das Trimmen wird schließlich durch die Aktivität von Exopeptidasen wie z.B. Cathepsin B, H und C abgeschlossen [384, 385, 623].

Damit MHC Klasse II-Moleküle mit diesen Peptiden beladen werden können, müssen sie vom ER ins Endosom transportiert werden [188]. Dies geschieht mit Hilfe der invarianten Kette Ii, die sich mit je einer neu synthetisierten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette zusammenlagert und mit zwei weiteren solcher Komplexe ein Nonamer  $(\alpha/\beta/Ii)_3$  bildet [113, 426]. Die Ii erfüllen dabei mehrere Aufgaben. Sie dienen als Chaperone bei der korrekten Faltung der beiden schweren Ketten [11], verhindern die falsche Beladung der MHC Klasse II-Komplexe mit Peptiden im ER dadurch, dass sie selbst die Bindungsfurche belegen [470] und kontrollieren den Transport ihrer Vesikel zu den sogenannten MHC Klasse II-Kompartimenten (MIIC) [24, 427]. Durch selektiven partiellen Abbau der Ii bleiben schließlich MHC Klasse II-Moleküle zurück, deren Bindungsgrube durch Klasse II-assoziierte Ii-Ketten-Peptide (CLIPs) besetzt sind. Diese CLIPs werden unter dem Einfluss der Chaperone HLA-DM und -DO gegen stärker bindende Peptide aus dem endosomalen Weg ausgetauscht. Dabei stabilisiert HLA-DM den peptidfreien Zustand des MHC Klasse II-Moleküls [132]. HLA-DO inhibiert die Fähigkeit von HLA-DM zur Katalyse der Peptidbeladung bei verschiedenen MHC Klasse II-Allospezifitäten, so dass ein Selektionseffekt eintritt [305]. Sobald die MHC Klasse II-Moleküle mit Peptid beladen sind, werden sie zur Zelloberfläche transportiert [159].

### 1.1.2.3 Kreuzpräsentation

Mit den oben beschriebenen Mechanismen kann die Präsentation endogener Antigene auf Klasse I- und exogener Antigene auf Klasse II-Molekülen erklärt werden. Es gibt jedoch zwei wichtige alternative Mechanismen. Durch den Mechanismus der Kreuzpräsentation können Peptide exogener Antigene auf Klasse I-Molekülen präsentiert werden. Im Gegensatz dazu kann Autophagie (s. 1.3) zur Beladung von Klasse II-Molekülen mit Peptiden endogener Antigene führen.

Kreuzpräsentation findet hauptsächlich auf DCs und Makrophagen statt [125, 145, 432, 471]. Es gibt verschiedene Theorien, die den Mechanismus der Kreuzpräsentation erklären. Zum einen könnte ein Peptid-Austausch stattfinden, bei dem MHC Klasse I-Moleküle über Endocytose internalisiert werden und durch Verschmelzung mit Lysosomen in Kontakt mit Peptiden exogener Antigene kommen, die gegen die ursprünglichen Peptide ausgetauscht werden [94]. Einer anderen Theorie zufolge enthalten frühe Phagosomen ER-Membranbestandteile, die sowohl Sec61 und andere Porenkomplexe enthalten, über die Peptide ins Cytosol zu direkt assoziierten Proteasomen geleitet werden, als auch TAP und alle weiteren Bestandteile des MHC Klasse I-Komplexes. Auf diese Weise würde die Antigenprozessierung exogener Antigene im Phagosom analog zur Klasse I-Prozessierung im ER stattfinden. Alternativ könnten Phagosomen mit dem ER verschmelzen und damit exogene Antigene dem ER-Lumen und damit der MHC Klasse I-Prozessierung freigeben [4, 114].

### 1.1.3 T-Zell-Antwort

Im Durchschnitt werden auf einer Zelle etwa  $10^4$  verschiedene Peptide auf etwa  $10^5$  bis über  $10^6$  MHC Klasse I-Molekülen präsentiert. Um die MHC-Peptid-Komplexe zu erkennen, brauchen die T-Zellen spezielle Rezeptoren, die T-Zellrezeptoren (TCR). Diese bilden ein Heterodimer aus zwei schweren Ketten, der 50 kD schweren  $\alpha$ - und der 39 kD schweren  $\beta$ -Kette.

Während der T-Zellreifung werden die T-Zellen entscheidend geprägt: durch negative Selektion werden diejenigen T-Zellen inaktiviert, die Selbstpeptide auf MHC erkennen, und durch genetische Umlagerungen wird eine Variationsbreite von über 1000 verschiedenen TCR-Varianten unterschiedlicher Spezifität erreicht, wobei jede T-Zelle immer nur einen einzigen funktionellen TCR exprimiert. Zur Erkennung der MHC-Peptid-Komplexe dienen zum einen der TCR, der Peptid und Peptid-Bindungsregion der MHC-Moleküle erkennt, und zum anderen die Corezeptoren CD4 oder CD8, die konstante Regionen der MHC-Moleküle binden. Durch diese Wechselwirkungen und mit Hilfe des CD3-Komplexes werden schließlich Signale an das T-Zell-Innere weiter geleitet. Von T-Zellen erkannte MHC-Liganden, die zu T-Zell-Aktivierung führen, werden T-Zellepitope genannt.

Sobald naive T-Zellen fremde Peptide auf MHC-Molekülen durch ihren TCR erkennen (*priming*), proliferieren und differenzieren sie zu Effektorzellen; MHC Klasse I-Moleküle werden durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkannt, die daraufhin zu CTL differenzieren, MHC Klasse II-Moleküle werden von CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkannt, die zu T-Helferzellen differenzieren. Das *priming* kann nur zwischen naiven T-Zellen und professionellen APC stattfinden. Denn professionelle APC liefern für das *priming* benötigte costimulatorische Signale, u.a. die Rezeptoren CD80 und CD86, die mit CD28 auf den naiven T-Zellen wechselwirken. Ohne diese costimulatorischen Signale werden die T-Zellen anergisch.

Die Einteilung der T-Helferzellen in T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen erfolgt unter anderem aufgrund ihrer Leitzytokine [347, 378]. T<sub>H</sub>1 schütten besonders IFN $\gamma$  aus und führen unter anderem dadurch zur Aktivierung

von Makrophagen über deren CD40-Liganden. Dies bewirkt vor allem die Bekämpfung intrazellulärer Mikroorganismen und das Auftreten von Entzündungsreaktionen.  $T_H2$  produzieren als typisches Cytokin Interleukin (IL)-4. Dieses wiederum regt B-Zellen zur Antikörperproduktion an [476].

Neben den  $T_H1$  und  $T_H2$  gibt es eine weitere Subpopulation von  $CD4^+$  T-Zellen, nämlich die  $CD4^+ CD25^+$  regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ ) [494]. Diese Zellen können die Proliferation und Funktion dendritischer Zellen, naiver  $CD4^+$  und  $CD8^+$  und B-Zellen unterdrücken [77, 493]. Durch ihre inhibitorische Wirkung leisten sie einen entscheidenden Beitrag zur Verhinderung von Autoimmunität [236, 272]. Andererseits können  $T_{reg}$  auch wichtige Funktionen bei der Abwehr chronischer Krankheiten oder von Tumor-Erkrankungen hemmen [617].

CTL schließlich schütten nach Antigenerkennung nicht nur Cytokine sondern vor allem Perforin und Granzyme aus [536]. Während Perforin die Membran der Zielzelle zerstört, lösen Granzyme und die Expression des Fas-Liganden [165, 554] die Apoptose der Zielzellen aus.

Die Grenzen zwischen „Eigen“ und „Fremd“ sind für das Immunsystem nicht immer stringent. Dies kann negative Folgen haben, wie zum Beispiel bei Autoimmunerkrankungen oder Allergien. Andererseits kann diese Tatsache dazu genutzt werden, CTL gegen Tumorzellen zu aktivieren, die Selbstpeptide in erhöhten Mengen oder veränderter Form auf MHC präsentieren [268].

## 1.2 Tumorerkrankungen und Immuntherapie

### 1.2.1 Tumorentstehung

Karzinogenese ist ein mehrstufiger Prozess, bei dem zunächst in einer gesunden Zelle eine Mutationsbedingte Veränderung stattfindet (Tumorinitiation). Die daraus resultierende Tumorstammzelle kann daraufhin entweder den Weg des programmierten Zelltods einschlagen und abgebaut werden oder proliferieren. Jede Tumorstammzelle kann nun erneut Mutationen unterliegen, sich auf diesem Weg schrittweise zu einer malignen Tumorzelle entwickeln und durch klonale Expansion zu einem kompletten Tumorzellverband heranreifen.

Gesunde Zellen werden durch regulierende Kreisläufe, die die Zellproliferation und Homeostase steuern, vor Entartung und malignem Wachstum geschützt. Im Falle eines Tumors sind diese Kreisläufe außer Kraft geraten. Es bestehen sechs bekannte Phänomene, die als verantwortlich dafür angesehen werden, dass im intakten Zustand Tumorentstehung unterdrückt und bei genannter Veränderung entartetes Wachstum eintreten kann [214]:

- Selbstversorgung mit Wachstumssignalen  
Unabhängigkeit von der Versorgung mit Wachstumssignalen (Autarkie) z.B. durch die Produktion von PDGF (*platelet-derived growth factor*) und EGFR (*epidermal growth factor receptor*) sowie durch die Aktivierung des H-Ras Onkogens.
- Unempfindlichkeit gegenüber inhibitorischen Wachstumssignalen  
Die Steuerung der Proliferation durch antiproliferative Signale, wie z.B. durch das Retinoblastomprotein pRb, entfällt. Dies geschieht durch Herunterregulation oder Verlust von Genen, die für Signalproteine des Wachstumsfaktorsignalweges oder Zellzyklus-regulierende Proteine kodieren, wie beispielsweise den Tumorsuppressorgen p53 oder WT1.

- Umgehung des programmierten Zelltods (Apoptose)  
Mutationen in dem Tumorsuppressorgen p53 oder dem Onkogen bcl-2 führen zum Verlust der Apoptose-Fähigkeit.
- Unbegrenzt replikatives Potential  
Durch Proteinüberexpression wird die Telomeraseaktivität erhöht, so dass eine andauernde Replikation aufrecht erhalten wird.
- Anhaltende Angiogenese  
Es besteht die Notwendigkeit verstärkter Angiogenese, um dem wachsenden Gewebe genügend Nahrung zu verschaffen. Erhöhte Expression von Angiogenesefaktoren wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und verminderte Expression von Angiogeneseinhibitoren wie Thrombospondin-1 sind die Folge.
- Gewebsinvasion und Metastasierung  
Der Fähigkeit, in umliegendes Gewebe eindringen und metastasieren zu können, dienen extrazelluläre Proteasen und Mutationen oder transkriptionelle Repression in Proteinen wie dem E-Cadherin und  $\beta$ -Catenin, die Zell-zu-Umgebung-Interaktionen regulieren.

All diese Mechanismen stellen ein erfolgreiches Durchbrechen eines Anti-Krebs-Verteidigungsmechanismus' dar, die nur in ihrer Gesamtheit zur Karzinogenese führen.

### 1.2.2 Tumorantigene

Die genannten Tumorentstehungsmechanismen haben einen Einfluss auf die Proteinexpression. Es werden qualitativ andere Proteine produziert; aber auch quantitative Unterschiede in der Expression normaler Proteine entstehen aufgrund von veränderter Transkription, Translation oder Abbauverhältnissen. Diese veränderten Strukturen werden als Tumorantigene bezeichnet, die dem adaptiven Immunsystem auf MHC-Ebene präsentiert werden können. Man unterscheidet bei Tumorantigenen zwischen tumorspezifischen Antigenen, die nur auf Tumorzellen präsentiert werden und tumorassoziierten Antigenen (TAAs), die vermehrt auf Tumorzellen, aber auch in geringerem Umfang auf Zellen normalen Gewebes präsentiert werden. Im Idealfall kann das Immunsystem aufgrund der Tumorantigene zwischen Normal- und Tumorgewebe unterscheiden und T-Zellantworten gegen den Tumor ausrichten [457, 600]. Tumorantigene werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Charakteristika wie folgt eingeteilt [546]:

- Cancer/Testis Antigene  
Proteine, die ausschließlich in Tumoren und in Stammzellen der Keimbahn exprimiert werden. Dazu gehören u.a. Mitglieder der MAGE-Familie [32, 282, 600] und NY-ESO-1 [251].
- Differenzierungsantigene  
Antigene, die nur auf Tumorzellen und dem korrespondierenden Normalgewebe exprimiert werden. Beispiele hierfür sind das Prostata-spezifische Antigen (PSA) [225], Melan-A [110], Tyrosinase [639] und gp100 [25, 111] aus Melanocyten.
- Antigene, die in Tumoren überexprimiert oder selektiv präsentiert sind  
Antigene, die in Tumoren viel stärker exprimiert oder präsentiert werden als in gesunden Ge-

weben. Dies kann z.B. daran liegen, dass Antigene im Tumor anders prozessiert werden als im Normalgewebe. Beispiele hierfür sind MUC-1 [67, 135], Her2/neu [66, 167] und WT-1 [405].

- Antigene, die durch Mutation, Leserasterverschiebung oder Spleißvarianten entstanden sind  
Punktmutationen können die Aminosäuresequenz und -länge (bei Mutationen in Stop-Codon-Bereichen) von Proteinen verändern. Dies kann entweder Proteinvarianten hervorrufen, die spezifisch für den einen Tumor sind, in dem sie entstehen, da die Wahrscheinlichkeit der entsprechenden Mutation in anderen Geweben extrem gering ist. Beispiele hierfür sind Punktmutationen in der Sequenz von  $\beta$ -Catenin [467] oder CDK4 [640] oder im Stop-Codon von Caspase-8 [351]. Oder die Mutation findet in Genen wie dem ras-Gen statt, die sogenannte hot spots enthalten, an denen in vielen verschiedenen Tumorarten Punktmutationen nachgewiesen werden konnten [175]. Eine weitere Gruppe von Tumorantigenen kann durch posttranslationales Splicing entstehen, ein Mechanismus, der bisher nur selten in höheren Eukaryonten, dort aber in einigen Tumorantigenen beschrieben wurde, wie zum Beispiel dem gp100 [607], FGF-5 [213]. Die Translation von Introns, alternativen offenen Leserastern oder die translationale Leserasterverschiebung wurde bei den Antigenen TRP-2 [342], BING-4 [480], TGFBR2 [333, 490] und OGT [466] nachgewiesen.
- Virale Tumorantigene  
Es gibt Viren, die in den von ihnen befallenen Zellen Onkogenese auslösen können. Die entsprechenden Tumorantigene sind virale Proteine, wie z.B. die Onkoproteine E6 und E7 aus dem humanen Papillomavirus Typ 16 (HPV16) des Zervixkarzinoms [459].

Viele dieser Tumor-assoziierten oder -spezifischen Antigene, v.a. die durch Mutation hervorgerufenen, wären sehr geeignete Ziele für die Immuntherapie. Jedoch sind sie oft schwer zu detektieren oder nur spezifisch für den einen Tumor bzw. eine Gewebeart innerhalb eines heterogenen Tumors, in dem sie identifiziert wurden.

### 1.2.3 Identifizierung von T-Zellepitopen

Geht man davon aus, dass das Immunsystem Tumorzellen aufgrund von Tumorantigenen erkennen und abwehren kann, liegt es nahe, nach den entsprechenden T-Zellepitopen zu suchen.

Es gibt verschiedene Ansätze, T-Zellepitope zu identifizieren. Drei Methoden beruhen auf bereits existierenden tumorspezifischen T-Zellen. In einer werden Zellen mit Bibliotheken aus genomischer DNA oder cDNA von Tumorzellen transfiziert und dann in Cytokin-Freisetzungs- oder Lyse-Assays mit den Tumor-reaktiven T-Zellen analysiert [54, 539]. Bei einer anderen Methode werden MHC-Liganden isoliert und chromatographisch in Fraktionen aufgetrennt. Anschließend werden mit diesen Fraktionen beladene APC in T-Zell-Assays untersucht. Peptide aus den Fraktionen, die von T-Zellen erkannt wurden, werden schließlich per Massenspektrometrie sequenziert [111]. Die letzte Methode beruht auf der *in vitro*-Stimulation von Tumor-infiltrierenden Lymphocyten (TILs) mit autologen Tumorzellen [61, 155, 185, 213, 435, 477, 620].

Es konnten auch Tumor-assoziierte MHC-Liganden identifiziert werden mit Hilfe von Tumorzelllinien, die mit löslichen MHC-Molekülen transfiziert und deren Liganden anschließend massenspektrometrisch analysiert wurden [35].

Oft finden sich im Serum von Tumorpatienten Antikörper gegen TAA. 25-77% aller Nierenzellkarzinompatienten entwickeln beispielsweise Antikörper gegen TAA [196]. Auf dieser Tatsache beruht das

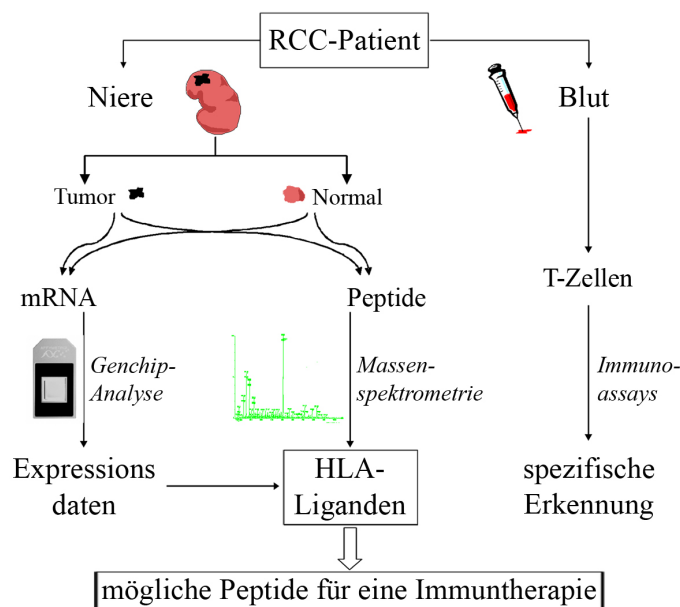
Prinzip von SEREX (*Serological analysis of autologous tumor antigens by recombinant cDNA expression cloning*). Hier konnten bei der Durchsuchung von cDNA Expressionsbibliotheken aus menschlichem Serum TAA-spezifische Antikörper identifiziert werden [294, 491]. Mittels SEREX, dem Serum Antikörper Detektionsarray (SADA) oder der Proteomics-basierten Analyse SPEAR können weitere immunogene Antigene detektiert werden, gegen die wahrscheinlich auch T-Zellreaktionen entwickelt werden können, wie bereits für das Melanom-assoziierte Antigen NY-ESO-1 gezeigt werden konnte [192, 252]. Dies bedeutet, dass mit Hilfe der Analyse humoraler Bestandteile auch weitere T-Zellepitope identifiziert werden können.

Eine weitere verbreitete Methode ist die sogenannte „Reverse Immunologie“. Hierbei nutzt man die Tatsache, dass für viele HLA-Allele Peptidmotive bereits sehr genau definiert sind. Darauf basierend können für die Proteinsequenzen interessanter Tumorantigene Ligandenvorhersagen gemacht werden [448]. Mit den vorhergesagten synthetisierten Liganden werden *in vitro*-T-Zell-Stimulationen durchgeführt. Anschließend werden die stimulierten T-Zellen auf ihre Tumorreaktivität untersucht [66, 90, 512, 556, 610]. Ein alternativer Ansatz anhand von vorhergesagten T-Zellepitopen ist die „Predict, Calibrate, Detect“-Methode (PCD) [415, 506]. Hier werden zunächst auch T-Zellepitope vorhergesagt und synthetisiert. In einem natürlichen HLA-Peptid-Gemisch aus Tumorzellen kann spezifisch nach diesen Peptiden gesucht werden, indem dieses Gemisch chromatographisch getrennt und koeluierende Peptide anschließend massenspektrometrisch sequenziert werden. Dazu wird zuvor das chromatographische System mit den gesuchten Peptiden kalibriert.

Der Screening-Ansatz XPRESIDENT, der in unserem Labor für Patienten-individuelle immuntherapeutische Zwecke entwickelt wurde und durch den bereits mehrere RCC-assoziierte TAA und deren HLA-Liganden identifiziert werden konnten [303, 304], kombiniert zwei Methoden [625] (s. Abbildung 1.3): Aus Tumorgewebe werden HLA-Liganden biochemisch aufgereinigt und massenspektrometrisch analysiert. Außerdem wird vom Tumor- und autologen Normalgewebe mittels DNA-Mikroarray-Technik eine Genexpressionsanalyse erstellt. Für jeden identifizierten HLA-Liganden wird anschließend das Genexpressionsprofil für das entsprechende Quellprotein im Tumor- und autologen Normalgewebe und möglichst vielen weiteren gesunden Organen und Zelltypen ermittelt. Entspricht ein Ligand dem Kriterium der Über- oder idealerweise ausschließlichen Expression im Tumorgewebe, kommt er für die Immuntherapie als T-Zell-Target in Frage.

Um die Reaktivität peripherer CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegen das identifizierte Tumorantigen zu testen, können verschiedene Methoden angewandt werden: die quantitative Polymerase Kettenreaktion (PCR) [265], MHC-Peptid-Tetramer-Färbungen [7], Proliferationsassays mit Carboxyfluoresceindiacetat-Succinimidylester (CFSE)-Markierung [343] und ELISPOT- [119] oder intrazelluläre Cytokin-Färbungen (ICS) [438].

Die komparative Genexpressionsanalyse eignet sich sehr gut für die Ermittlung der unterschiedlichen mRNA-Expression potentieller T-Zellantigene in verschiedenen Geweben. Jedoch lässt der Nachweis von Tumorantigenen mittels Genexpressionsanalysen einige Fragen offen: Fusions-, Antisense- oder mutierte Proteine sowie Tumor-spezifische posttranslationale Modifikationen werden außer Acht gelassen. Die Lang- oder Kurzlebigkeit und damit der eigentliche Gehalt von Proteinen in den Zellen wird auch nicht widerspiegelt. Gerade langlebige Proteine könnten in Zellen vorhanden sein, die über Genexpressionsanalyse nicht nachweisbar wären. Auf diese Weise bestünde die Gefahr, gegen vorhandene Proteine durch Impfung T-Zellreaktionen hervorzurufen.



**Abbildung 1.3:** Strategie zur Identifizierung patientenindividueller Tumorantigene für Peptidvaksinierungen am Beispiel von Nierenzellkarzinomen (RCC). Aus der Untersuchung von Tumorgewebe, gesundem Gewebe und Blut mittels vergleichender Genexpressionsanalyse, HLA-Ligandenanalyse und T-Zell-Assays ergeben sich komplementäre Informationen bezüglich geeigneter Peptide für eine Vakzinierung (Darstellung nach T. Weinschenk)

Vergleichende Genexpressions- und Proteomanalysen in *Saccharomyces cerevisiae* zeigen deutliche Abweichungen zwischen mRNA- und Proteinexpression auf [207, 622]. Da die Interaktion zwischen T- und Tumor-Zellen auf Ebene der HLA-Liganden stattfindet, und da diese im Grunde als Schaufenster für das zelluläre Proteom jeder Zelle fungieren, müsste man annehmen, dass Proteomanalysen geeigneter für die Auswahl von Tumorantigenen wären als Genexpressionsanalysen.

Etwa 30% der MHC-Liganden gehen jedoch nicht aus nativen Proteinen sondern aus DRiPs (*defective ribosomal products*) hervor [455, 505, 515, 659, 660]. Dies wiederum könnte die Ableitung eines T-Zellepitops von der Genexpression rechtfertigen. Wie jedoch gezeigt werden konnte [628], besteht zwischen Transkriptom und HLA-Ligandom kaum eine Korrelation. Unterschiede in Transkriptionseffizienz, Antigenprozessierung, Abbauprozessen und Halbwertszeiten der Proteine spielen hierbei eine Rolle. Es bleibt nun abzuwarten, was Analysen über die Vergleichbarkeit von Proteom und HLA-Ligandom ergeben.

Ein prominentes und im Hinblick auf das Nierenzellkarzinom relevantes Beispiel für die Einschränkungen, die bei Genexpressionsanalysen gegeben sind, ist der *Hypoxia-inducible factor* (HIF) bzw. seine Untereinheit HIF1 $\alpha$ . Auf die Funktion dieses Transkriptionsfaktors wird unter 3.1.2.3.2 genauer eingegangen. Hier von Bedeutung ist, dass HIF1 $\alpha$  konstitutiv exprimiert wird und seine intrazelluläre Konzentration über seinen Abbau reguliert wird. Entsprechend konnten in unserem Labor keine Veränderungen im Genexpressionsprofil von HIF1 $\alpha$  festgestellt werden, stattdessen wurden jedoch bereits zwei MHC-Liganden aus HIF1 $\alpha$  auf zwei RCC-Geweben identifiziert, was auf eine abundante Präsentation dieser Liganden schließen lässt.

Die klassische Proteomanalyse bietet die Möglichkeit, auch die nicht durch Genexpressionsanalyse er-

fassbaren oben erwähnten Antigenklassen zu detektieren. Außerdem könnte durch den Einsatz *Isotope-coded affinity tags* (ICAT) eine relative Quantifizierung von Proteinen aus Tumor- versus Normalgewebe vorgenommen werden [207]. Allerdings wäre auch nach diesen Analysen eine Identifizierung von T-Zellepitopen des entsprechend im Tumor überexprimierten Proteins, von denen das Maß an HLA-Oberflächenpräsentation nicht bekannt ist, unerlässlich.

Eine ideale Alternative ist daher die differentielle HLA-Ligandom-Analyse der Tumor- und korrespondierenden Normal-Gewebiszellen [320]. Diese Methode bietet zwei wichtige Vorteile: Zum einen werden mit dieser Methode gleichzeitig potentielle T-Zellepitope ermittelt und relativ quantifiziert, so dass sich folgende Analysen zu Expressionsbedingungen auf Tumor- und Normalgewebe, wie sie in den zuvor besprochenen Methoden nötig sind, erübrigen (jedoch nicht die Expressionsanalysen aller anderen Gewebe, die nötig sind, um Autoimmunität durch Vakzinierungen auszuschließen). Außerdem wird hierbei im Grunde direkt analysiert, was das Immunsystem „sieht“ - die differentielle Präsentation von Antigenen auf Tumor- und Normal-Gewebiszellen. Auf diese Weise umgeht man die Problematik der Abweichungen theoretisch vorhergesagter von realen Transkriptom-, Proteom- und Prozessierungs-Bedingungen und eventuell weiterer unbekannter Faktoren [96, 371, 516, 580].

Zusammenfassend lässt sich also der Schluss ziehen, dass für die Identifizierung potentieller neuer Tumorantigene auf Peptidebene die differentielle HLA-Ligandom-Analyse eine sehr attraktive Methode ist. Zur Auswahl identifizierter Liganden für die Vakzinierung muss jedoch auch die Genexpressionsanalyse hinzugezogen werden, um auszuschließen, dass die entsprechenden Quellproteine auch auf anderen gesunden Geweben exprimiert werden.

### 1.2.4 Immuntherapie

Die klassischen Therapie-Ansätze gegen Krebs, Chemo- und Strahlentherapie, zielen gegen das entartete Wachstum und die Vermehrung der Zellen. Da Wachstum an sich aber eine Eigenschaft aller, auch der gesunden Zellen ist, werden dabei Unspezifität und damit verbunden schwere Nebenwirkungen in Kauf genommen. Es besteht daher ein großes Interesse, mit höherer Spezifität gegen Tumore bzw. deren Wiederkehr nach operativer Entfernung vorzugehen.

Als Grundlage für die gezielte Immuntherapie dienen unter anderem folgende Erkenntnisse: CTL können Tumorzellen angreifen, die Selbstpeptide in höherer Dichte präsentieren als gesunde Zellen [269]. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems, beispielsweise TILs, in das Tumorgewebe eindringen können [286] und dass das Tumorstroma zur Phagozytose und Kreuzpräsentation aufgenommener Tumorantigene in der Lage ist [218, 541].

Mittlerweile gibt es eine große Bandbreite an möglichen immuntherapeutischen Ansätzen, von denen einige hier genannt werden. Allen gemeinsam ist das Prinzip, eine humorale und/ oder zelluläre Immunantwort gegen die TAA als Angriffsobjekte auszulösen. Dazu werden entweder direkt TAA-spezifische T-Zellen oder Antikörper eingesetzt oder durch Vakzinierung Immunantworten induziert.

- Vakzine aus Tumorzellen  
Allogene und autologe Tumorzellen werden *in vitro* expandiert, bestrahlt, um weiteres Wachstum zu verhindern, und dem Patienten infundiert [93, 146, 158, 209, 259, 375, 376, 537, 568, 605].
- Vakzine aus Nucleinsäuren  
Für Tumorabstoßungsgene kodierende Nucleinsäuren werden alleine oder assoziiert mit z.B. vi-



ralen Transportsystemen eingesetzt [55, 84, 85, 278, 329, 501, 542, 592, 593].

- Vakzine aus Peptiden  
Peptide aus Tumorantigenen werden meist in Kombination mit Adjuvantien, wie GM-CSF [172, 502, 503], IL-2 [172, 479], dem inkompletten Freund'schen Adjuvans (IFA) Montanide ISA 51 [495, 591, 616], *Keyhole limpet Hemocyanin* (KLH) [503], und tumorassozierten oder artifiziellen MHC Klasse II-Liganden [191] verabreicht.
- Vakzine aus Hitzeschockproteinen  
Das Hitzeschockprotein gp96 kann unter anderem immunogene Tumorpeptide binden und damit eine T-Zellreaktion induzieren. Vom autologen Tumor isoliertes gp96 wird direkt eingesetzt [39, 88, 355].
- Vakzine aus Tumorantigen-beladenen DCs  
DCs werden mit TAA-codierenden Nukleinsäuren [222, 223, 553, 613], Peptiden [91, 410, 633], oder Tumorzelllysaten [190, 235, 352, 391] transfiziert bzw. beladen oder mit Tumorzellen fusioniert [22, 23, 193].
- Adoptive Immuntherapie  
Allogene oder autologe immunkompetente oder tumorspezifische Zellen werden *ex vivo* expandiert und anschließend wieder in den Tumorpatienten transferiert [71, 100, 162, 163, 463, 464, 475, 582].
- Antikörper-basierte Immuntherapie  
Antikörper gegen TAA oder gegen allgemeine Antigene, die in der Tumorbiologie eine besondere Rolle spielen wie beispielsweise Wachstumsfaktoren und Angiogenesemarker, werden entweder eingesetzt mit dem Ziel, beispielsweise als einfache oder bispezifische Antikörper Effektormechanismen zu induzieren, oder sie können gekoppelt an Toxine oder radioaktive Komponenten selbst direkt als Angriffsmolekül wirken [48, 49, 151, 210, 240, 380, 465, 483, 655].

Die große Bandbreite an Vakzinen wird durch die große Zahl an Vakzinierungsprotokollen ergänzt. Dazu müssen unter anderem Anzahl und Häufigkeit der Vakzinierung, Art und Ort der Injektion und die Menge der Vakzine pro Injektion in Betracht gezogen werden.

Ein Vorteil der aus autologem Tumorgewebe gewonnenen Vakzine ist die große Zahl an Tumorantigenen, die in ihnen enthalten ist und die potentiell eine Immunantwort induzieren kann. Dadurch nimmt die Wahrscheinlichkeit eines Entkommens des Tumors aufgrund des selektiven Drucks durch das Immunsystem stark ab. Allerdings besteht in diesem System die Gefahr, dass die Menge der in solch einem Vakzin enthaltenen Tumorantigene zu gering ist, um eine Immunantwort zu induzieren oder um eine induzierte Immunantwort experimentell zu verfolgen. Weitere Nachteile eines autologen Impfstoffes sind die enthaltenen Selbstantigene, die das Risiko von Autoimmunität oder Toleranz steigern, das limitierte Material, mit dem nur geimpft werden kann, und vor allem auch die Tatsache, dass in dem Material eine Immunabwehr gegen bisher unbekannte Antigene stattfindet, die auf diese Weise gar nicht detektiert werden.

Molekular definierte T-Zellepitop-Vakzine bieten dagegen den Vorteil, gezielt gegen die Tumorantigene vorzugehen. Außerdem stellt in diesem Fall die Herstellung größerer Mengen kein Problem dar. Dadurch ist erstens die Wahrscheinlichkeit der Induktion einer gezielten Immunantwort durch Einsatz optimaler

Konzentrationen höher. Zweitens stellt die Verfügbarkeit für wiederholte Impfungen, wenn nötig über Jahre hinweg, kein Problem dar. Da in diesem Fall die Art und Anzahl der Zielmoleküle überschaubarer ist als in einem undefinierten Gemisch aus Tumorgewebe, ist auch ein Monitoring gezielter durchführbar.

Abgesehen von einzelnen individuellen Vor- und Nachteilen, die bereits erwähnt wurden, unterliegt die vielversprechende große Anzahl an immuntherapeutischen Ansätzen einigen allgemeinen Limitationen, die den Erfolg dieser Ansätze erschweren. Dazu zählen:

- Heterogenität des Tumorgewebes

Tumorgewebe kann sich aus Zellen sowohl histologisch als auch genetisch verschiedenster Herkunft zusammensetzen. Einzelne Tumorantigene können gleichzeitig für einen Zelltyp eines Tumors hochspezifisch und für einen anderen Zelltyp des gleichen Tumors völlig unspezifisch sein. Durch die große Varianz der genetischen und molekularen Zusammensetzung der Tumorgewebe, nicht zuletzt die unterschiedliche HLA-Typisierung, besteht die Notwendigkeit, Therapieansätze individuell zu gestalten.

- Fluchtmechanismen

Unter dem immuntherapeutischen Selektionsdruck können Tumorzellen verschiedene Fluchtmechanismen (*immune escape*) entwickeln. Dazu zählt die Ausbildung „immunresistenter Klone“, die die Fähigkeit verloren haben, das entsprechende T-Zellepitop zu präsentieren, oder die generell die MHC-Präsentation herunterregulieren. Andere Mechanismen sind die Inhibition von T-Zellen durch direkte Anergie-Induktion oder Ausschüttung immunsuppressiver Faktoren, die Resistenz gegen verschiedene proapoptotische Signale oder die Induktion apoptotischer Kaskaden in den Immunzellen [79, 82, 137, 150, 203, 429, 523, 578, 612, 672].

- Regulatorische T-Zellen ( $T_{reg}$ )

$T_{reg}$  wurden in erhöhten Mengen im Blut und in Tumoren von Patienten mit verschiedenen Tumorarten nachgewiesen, meist assoziiert mit negativen Prognosen [118, 638, 642]. TAA-spezifische  $T_{reg}$  können innerhalb von Tumorgeweben auftreten und sind dort an der Inhibition lokaler Effektor-Lymphocyten beteiligt [619].

- Geschwächter Immunstatus

Viele Patienten befinden sich zum Zeitpunkt des Therapiebeginns bereits in fortgeschrittenen Stadien mit stark geschwächtem Immunsystem.

- Aufwand der Therapie-Entwicklung

Um möglichst viele Tumorantigene eines Tumors anzugreifen und die Wahrscheinlichkeit damit außerdem zu verringern, dass der Tumor durch seine Fluchtmechanismen allen eingesetzten Zielstrukturen entgeht, müssen möglichst für den Tumor essentielle, Patienten-individuelle Vakzine eingesetzt und zuvor Patienten-individuelle Expressionsanalysen durchgeführt werden.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Notwendigkeit eines die Therapie begleitenden Immunmonitorings, von dem die Effizienz der Vakzinierung abzulesen ist. Dabei kristallisiert sich heraus, dass für ein aussagekräftiges umfassendes Ergebnis mehrere Tests zur Frequenz, Funktionalität und Lokalisation induzierter bzw. stimulierter T-Zellen im Kreislauf und im Tumor-Zielgewebe nötig sind [64].

All diese Faktoren sind mit einem großen Kosten-, Zeit- und Arbeitsaufwand verbunden.

### 1.2.5 Nierenzellkarzinom

Das Nierenzellkarzinom (*renal cell carcinoma*, RCC) ist eine maligne Neoplasie der Niere epithelialen Ursprungs. Sein Ursprung liegt im tubulären System der Niere. Von allen Neoplasien der Niere stellt das RCC 80-90%. 3% aller malignen Geschwülste des Menschen sind RCCs. Im Jahr 2007 wurden in den USA 51190 Neuerkrankungen und 12890 Nierenkrebs-assoziierte Todesfälle geschätzt, wobei etwa zwei Fünftel der Erkrankungen Frauen betraf, drei Fünftel Männer [254]. In Deutschland erkranken jährlich ungefähr 6-7 pro 100000 Einwohner, die Inzidenzraten sind jedoch überall meist steigend [411, 645]. Bei der Erstdiagnose sind die meisten Frauen ca. 70, Männer ca. 65 Jahre alt [68].

Histologisch teilt man das Nierenzellkarzinom in verschiedene Phänotypen ein. Sie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Häufigkeit und ihrem Krankheitsverlauf [169]. Die Klassifikation von RCC erfolgt gemäß der histologischen Klassifikation renaler Tumoren der *Union Internationale Contre le Cancer* (UICC) und des *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) [551] sowie nach der „Heidelberger Klassifikation“ [298]. Danach werden 5 Phänotypen unterschieden:

1. *Conventional (clear cell) renal carcinoma*

Das klarzellige Nierenzellkarzinom ist mit 70-80% der häufigste histologische Subtyp aller RCCs. Seinen Ursprung hat es aus den Epithelzellen des proximalen Tubulus.

2. *Papillary renal cell carcinoma*

Das papilläre oder chromophile Nierenzellkarzinom ist mit 10-15% der zweithäufigste histologische Subtyp. Auch dieser Subtyp entstammt den Epithelzellen des proximalen Tubulus.

3. *Chromophobe renal carcinoma*

Das Chromophobe Nierenzellkarzinom stellt 5% aller RCCs. Es hat seinen Ursprung im distalen Tubulus.

4. *Collecting duct carcinoma*

Das Sammelrohr- oder Ductus Bellini-Karzinom ist mit weniger als 1% aller RCCs ein sehr seltener Subtyp. Es entsteht, wie der Name schon sagt, im Sammelrohr-Epithel.

5. *Renal cell carcinoma, unclassified*

Das unklassifizierbare Nierenzellkarzinom stellt 3-5% aller RCCs dar.

Der histologische Phänotyp korreliert mit der Prognose für den Krankheitsverlauf, wobei eine chromophobe Histologie mit einer vergleichsweise guten Prognose verbunden ist, die Überlebensraten sinken in der Reihenfolge papilläres-, klarzelliges-, unklassifizierbares Nierenzellkarzinom [9].

Nierenzellkarzinome werden wie andere solide Tumoren auch entsprechend ihrer histologischen Bestimmung des Entdifferenzierungsgrades, dem „grading“, und entsprechend ihrer klinischen Beurteilung des Krankheitsstadiums, dem „TNM-staging“, nach dem von der UICC/AJCC vorgeschlagenen System eingeteilt [199]. Dabei steht „G“ für „*histological grade*“, „T“ für Primärtumor, „N“ für Lymphknotenmetastasen und „M“ für Fernmetastasen. Die einzelnen Ausprägungen der TNM-Klassifikation wurden für das Nierenzellkarzinom zu vier Krankheitsstadien zusammengefasst. Die Klassifikationen und Stadieneinteilung sind in Tabelle 1.1 und 1.2 wiedergegeben.

**Tabelle 1.1:** TNM-Klassifikation des Nierenzellkarzinoms nach UICC/AJCC [199]

Grading	UICC 2002 Definition
G = Histologischer Krankheitsgrad	
Gx	Ein Entdifferenzierungsgrad kann nicht angegeben werden
G1	Gut differenziertes Nierenzellkarzinom
G2	Moderat differenziertes Nierenzellkarzinom
G3-4	Schlecht bis undifferenziertes Nierenzellkarzinom
TNM	UICC 2002 Definition
T = Primärtumor	
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt auf Primärtumor
T1	Tumor durchmisst maximal 7 cm in seiner größten Ausdehnung, ist begrenzt auf die Niere
T1a	Tumor durchmisst maximal 4 cm in seiner größten Ausdehnung
T1b	Tumor durchmisst mehr als 4 cm, jedoch maximal 7 cm in seiner größten Ausdehnung
T2	Tumor durchmisst mehr als 7 cm, ist jedoch auf die Niere begrenzt
T3	Tumor infiltriert perirenale Strukturen, jedoch durchbricht er nicht die Gerota-Faszie
T3a	Tumor infiltriert die Nebenniere oder perirenales Fettgewebe
T3b	makroskopische Ausbreitung in Nierenvene(n) oder Vena cava caudal des Zwerchfells
T3c	Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in Vena cava cranial des Zwerchfells
T4	Tumor durchbricht die Gerota-Faszie.
N = regionäre Lymphknoten	
Nx	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase in einem regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in mehr als einem regionären Lymphknoten
M = Fernmetastasen	
Mx	Vorhandensein von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen vorhanden
M1	Fernmetastasen vorhanden

**Tabelle 1.2:** TNM-Staging des Nierenzellkarzinoms

UICC-Stadium	UICC 2002 TNM-Klassifikation		
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
IV	T4	N0, N1	M0
	Jedes T	N2	M0
	Jedes T	Jedes N	M1

Mit steigender Stadieneinteilung sinkt die Fünfjahresüberlebensrate rapide: Während im Stadium I und II noch 95% bzw. 90% aller Patienten die ersten fünf Jahre nach Diagnose überleben, sinkt diese Zahl im Stadium III bereits auf 63% und in Stadium IV sogar auf 28% [160]. Die Hälfte aller Patienten entwickelt metachrone Metastasen, also Metastasen, die frühestens 6 Monate nach Erstdiagnose detektiert werden [196]. Da gerade in frühen Stadien das RCC kaum zu äußerlich bemerkbaren Symptomen führt, wird es meist erst diagnostiziert, wenn es bereits weiter fortgeschritten ist.

Die klassische Therapie des Nierenzellkarzinoms ist die radikale Nephrektomie [468, 469]. Die Behandlung höherer metastasierter Stadien ist jedoch schwierig, da sie auf Chemo- und Strahlentherapie nur selten ansprechen [164, 215, 261, 285, 631, 651]. Daher greift man meist auf immuntherapeutische Ansätze zurück, wie beispielsweise die Behandlung mit Interleukin 2 (IL-2) und Interferon  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), oft auch in Kombination mit Chemotherapeutika [20, 21, 70, 161, 166, 389]. Daneben gibt es weitere Therapieansätze wie unter anderem die Inhibition von Tyrosinkinase und der Angiogenese. Seit 2006 zugelassen sind die beiden Multityrosinkinaseinhibitoren Sorafenib, (Handelsname: Nexavar, Bayer) und Sunitinib (Handelsname: Sutent, Pfizer) [154, 381, 462, 513].

Neben dem Melanom zählt das RCC zu den immunogensten Tumoren, d.h. hier findet eine hohe Rate immunspezifischer Prozesse gegen den Tumor statt. Diese Einstufung ist unter anderem auf die Entwicklung von RCC in immunsupprimierten Patienten [420] als auch auf seltene Fälle spontaner Metastasen-Rückbildung [338] zurückzuführen. Vor allem aber beruht sie auf der Tatsache, dass im Tumorgewebe meist TILs nachgewiesen werden können, vor allem CD8<sup>+</sup> und auch NK-Zellen [12, 126, 386]. Diese TILs weisen oft ein reduziertes cytotoxisches Potential auf. Effektorfunktionen, wie Cytokin-Sekretion und das Abtöten autologer Tumorzellen können aber nach *in vitro*-Stimulation regeneriert werden [12, 126], d.h. sie werden zwar durch Interaktion mit den Tumorzellen aktiviert, sind aber funktionell eingeschränkt. Trotzdem konnte eine Korrelation zwischen klinischer Reaktion und Infiltration des Tumorgewebes durch aktivierte T-Zellen und DCs bereits nachgewiesen werden [136, 606].

Tumorantigene, die in RCCs beschrieben wurden und von denen T-Zellepitope bekannt sind, können in vier Kategorien eingeteilt werden [196]:

- Antigene, die auf mehreren Tumorarten überexprimiert gefunden wurden, z.B. Telomerase [514], Survivin [10, 231, 456], Mucin-1 (MUC1) [67] und Her2/neu [292, 421]
- Antigene, die von den meisten RCC exprimiert werden, aber kaum oder gar nicht im Normalgewebe, z.B. G250/ Carboanhydrase IX (CA-9) [197]
- Antigene, die manchmal von RCC oder anderen Tumoren exprimiert werden, z.B. Adipophilin [511], MAGE-A3 [109, 516], RAGE-1 [400]
- Antigene, die aus Mutationen oder Leserasterverschiebungen resultieren, z.B. FGF-5 [213], M-CSF [435], Hsp-70 [61]

### 1.3 Autophagie

Während der Abbauweg über das Proteasom vor allem regulatorischen Zwecken dient und dazu hauptsächlich Proteine mit regulatorischen Funktionen und missgefaltete lösliche Proteine einschließt, findet der Abbau von ganzen Organellen, langlebigen Proteinen und Proteinen, die missgefaltet in Aggregaten vorliegen, vor allem in Lysosomen über den Prozess der Autophagie mit dem Zweck des Nahrungsrecyclings statt [277, 288, 289]. Beide Abbauwege dienen außerdem der Entgiftung nicht-funktionaler, missgefalteter Proteine [134]. Damit eröffnet sich, wie unter 1.1.2.3 bereits angedeutet, eine weitere Ausnahme der üblichen Antigenprozessierungswege. Denn durch den Mechanismus der Autophagie gelangen cytosolische Proteine über den lysosomalen Abbauweg auf MHC Klasse II-Proteine [63, 129, 393]. Der Begriff „Autophagie“ leitet sich von „Selbst“ (griech.: *auto*) und „Essen“ (griech.: *phagein*) ab. Es gibt verschiedene Formen der Autophagie, unter anderem die Chaperon-induzierte, die Mikro- und die Makroautophagie [325, 349, 661]. Im Folgenden wird der Begriff Autophagie stellvertretend für Makroautophagie eingesetzt.

Zum ersten Mal wurde Autophagie Anfang der 60er Jahre beschrieben [18, 37, 143]. Kurze Zeit später wurde sie als programmierter Zelltod vom Typ II (PCD II) als Gegenstück zur Apoptose (PCD I) definiert [106, 517, 671]. Mittlerweile wird Autophagie allerdings in gleichem Maß die Rolle als Überlebens-Mechanismus in zellulären Stress-Situationen zugesprochen [326].

Das Spektrum der Funktionen, die Autophagie erfüllt, ist breit gefächert [325, 357, 661]. Als konstitutiver Prozess erfüllt sie regulatorische Funktionen in der Zell-Homöostase, indem sie sowohl den Stoffwechsel langlebiger Proteine als auch die generelle Zusammensetzung des Cytoplasmas kontrolliert. Gleichzeitig kann sie induziert werden durch interne sowie externe Stress-Situationen, wie Anhäufung missgefalteter Proteine, Nahrungsknappheit, oxidativem Stress, Bestrahlung oder hormonellen Einflüssen. Generell erfüllt Autophagie folgende Funktionen:

- Anpassung an sich verändernde Bedingungen  
Autophagie fördert das Recycling von Aminosäuren bei Nahrungs-, Energie- und Sauerstoffmangel [53, 374, 430, 433] sowie unter Stressbedingungen wie hoher Populationsdichte oder Temperatur [194, 611].
- Zelluläre Umstrukturierung während der Entwicklung und Differenzierung  
Autophagie ist am Abbau von Geweben und Zelltypen im Lauf der Entwicklung beteiligt [234, 248, 312, 325].

- Beeinflussung der Lebensspanne

Autophagie baut überflüssige oder defekte Organellen oder Moleküle ab. So werden zum Beispiel Mitochondrien mit vermindertem Membranpotential und erhöhter Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), Moleküle mit altersabhängiger Peroxidierung oder toxische Aggregate missgefalteter Proteine eliminiert [40, 121, 318, 325].

- Unterstützung des Immunsystems

Autophagie ist sowohl am Abbau als auch der Präsentation pathogener Antigene beteiligt [138, 206, 383, 409, 492, 508, 510].

Alle vier Eigenschaften können je nach Kontext im gesunden wie im kranken Zustand sowohl positive als auch negative Auswirkungen haben [117, 534]. Darauf wird unter 1.3.3 genauer eingegangen.

### 1.3.1 Molekulare Mechanismen der Autophagie

Autophagie beschreibt die Abfolge mehrerer Schritte, angefangen bei der Bildung der „Isolationsmembran“ oder „Phagophore“ bzw. in Hefe der perivakuolären pre-autophagosomalen Struktur (PAS) [157, 452]. Dabei stülpt sich die Isolationsmembran derart um cytoplasmatischen Inhalt, dass beim Verschmelzen der aufeinander zuwachsenden Enden ein Organell mit Doppelmembran entsteht - das Autophagosom. Dieses verschmilzt mit einem Lysosom zum Autolysosom, wobei die innere Einzelmembran als autophagisches Körperchen vom Lysosom aufgenommen und abgebaut wird [452, 614, 632, 661]. Die Identifizierung der konservierten Gene, auf denen die molekularen Mechanismen der Autophagie beruhen, war essentiell für die Aufklärung Autophagie-bezogener Prozesse [579, 587]. Diese werden in Hefe *autophagie-related genes* (Atg) genannt. Seit 2003 gibt es eine einheitliche Nomenklatur für Organismen von Hefe bis zu höheren Eukaryonten [290].

Autophagie kann selektiv und unselektiv sein. Während selektive Autophagie durch intrazelluläre Signale wie beispielsweise Interaktion zwischen bestimmten Atg-Proteinen und Bakterien ausgelöst wird und damit zum selektiven Abbau dieser Pathogene führt [206, 393, 409, 451], erhält unselektive Autophagie Signale indirekt über äußere Faktoren wie Nahrung oder Cytokine [206, 341, 452, 534].

Viele Stimuli von Tyrosinkinaserzeptoren [233] über MAP-Kinasen [216, 402] bis hin zu Calcium [195] wurden als potentielle Induktionsfaktoren für die Autophagie-Signalkaskade in Betracht gezogen. Jedoch ist bei all diesen Einflüssen immer nur eine indirekte Wirkung nachweisbar gewesen. Ein Faktor, bei dem sich all diese Einflüsse vereinen, ist mTOR (*mammalian target of rapamycin*). Denn mTOR ist sowohl Sensor für Aminosäuren und ATP als auch Verarbeitungsstelle hormoneller Signale über den Klasse I PI3K/ PKB-Signalweg [14, 131, 353, 474]. All diese Faktoren beeinflussen die Autophagie-Aktivität einer Zelle [372, 373, 431, 504, 519, 604]. Die hemmende Wirkung eines Aminosäureangebots sowie weitere inhibitorische Effekte können jedoch durch Rapamycin aufgehoben werden [51]. Das bedeutet: wenn Nahrungs- und Energiequellen ausreichend vorhanden sind, ist mTOR aktiviert und inhibiert damit die Autophagie und andersherum.

In *Saccharomyces cerevisiae* konnte außerdem gezeigt werden, dass mTOR eine inhibitorische Wirkung auf die Genexpression an der Autophagie beteiligter Gene, wie zum Beispiel dem Atg8 aufweist [3]. Da mTOR - wie der Name schon sagt - Zielmolekül von Rapamycin ist und zentraler Punkt der oben

genannten Signalwege, liegt es nahe, dieses Molekül als direkte inhibitorische Schaltstelle für die Autophagie einzustufen.

Der Einfluss von mTOR auf die folgende Autophagie-Signalkaskade scheint durch eine indirekte Interaktion mit dem Atg1-Homolog ULK1, einer Serin-Threonin-Kinase, und weiteren Proteinen vermittelt zu werden. Die genaue Reaktionsfolge dieser Interaktionen ist jedoch noch nicht bekannt [325, 357].

Das Membranwachstum zur Phagophore wird durch zwei Konjugationssysteme eingeleitet, die an das Ubiquitin-Konjugationssystem erinnern und aufeinander abgestimmt sind [325, 390, 559, 570]. In dem ersten Konjugationssystem entspricht Atg7 dem Ubiquitin-Aktivierungs-Enzym E1 und Atg10 dem Ubiquitin-Konjugations-Enzym E2 [535, 569]. Dabei kommt es zur Konjugation des Ubiquitin-ähnlichen Proteins (Ubl, ubiquitin-like protein) Atg12 mit Atg5, die nicht-kovalent an Atg16 binden, woraufhin es zur Membran-assoziierten Multimerisierung kommt [363–365]. Diese Atg12-Atg5-Atg16-Multimere bilden übergangsweise einen Mantel um die sich bildende Autophagosomenmembran, die daher wahrscheinlich ihre Krümmung erhält [325, 452]. Kurz vor dem Ringschluss zum fertigen Autophagosom scheinen die Komplexe jedoch abzufallen [366, 367].

Auch im zweiten Konjugationssystem nimmt Atg7 die Rolle von E1 ein. In diesem Fall wird das Ubl Atg8 mit Phosphatidylethanolamin (PE) über das E2-Homolog Atg3 konjugiert [244]. Zuvor wird von der Cysteinprotease Atg4 das C-terminale Arginin (Arg117) gespalten, um für die Konjugation mit PE Glycin116 freizusetzen [217]. Im Gegensatz zu den Atg12-Atg5-Atg16-Komplexen kann Atg8 sowohl in der Phagophoren-Membran als auch dem fertigen Autophagosom detektiert werden bis zur Fusion mit dem Lysosom, wo es mit dem restlichen Autophagosomeninhalt abgebaut wird [281].

Beide Systeme sind in Hefe und Säugetierzellen konserviert [364]. Eines von mehreren menschlichen Homologen zu Atg8 ist MAP1LC3 (*microtubule-associated protein light chain 3*). Es liegt in drei verschiedenen Isoformen vor, MAP1LC3A, MAP1LC3B, MAP1LC3C. Diese drei Isoformen unterscheiden sich nicht nur in ihren Sequenzen, sondern auch in ihrer Gewebsspezifität [217]. Während MAP1LC3A vor allem in Herz, Gehirn, Leber, Skelettmuskel und Niere exprimiert wird, findet man diese Isoform weder im Thymus noch in peripheren Blutlymphocyten (PBL). In PBL kommt nur die Isoform MAP1LC3B vor. Die MAP1LC3C-Expression dagegen ist in allen untersuchten Geweben sehr viel niedriger als die der beiden anderen Isoformen.

Ein weiteres wichtiges Protein bei der Autophagie-Induktion ist die Klasse III Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) oder auch „*human vacuolar protein sorting 34*“ (hVps34). PI3Ks sind mit dem Adapterprotein p150 assoziiert. P150 und das Reaktionsprodukt von PI3K, Phosphatidylinositol-3-Phosphat (Ptd-Ins3P), rekrutieren Membranproteine an die Phagophore, die für das Wachstum zum Autophagosom wichtig sind [392]. Der Klasse III PI3K/p150-Komplex ist beim Menschen mit dem Tumorsuppressorprotein Beclin-1 assoziiert [275]. Unter Aminosäure-Mangelbedingungen wird dieser Beclin-1-assoziierte Komplex und damit die Induktion zur Autophagie aktiviert [76, 394, 573]. Sowohl 3-Methyladenin (3-MA), das PI3K durch Interaktion mit der regulatorischen Unterinheit inhibiert [520], als auch Wortmannin und LY294002, zwei Inhibitoren der katalytischen Untereinheit der PI3K, verhindern die Autophagie-Induktion. Dies unterstreicht die Funktion der Klasse III PI3K bei der Regulation von Autophagie [652].



Viele weitere Einflussfaktoren und Atg-Proteine sind auf dem Weg zwischen Autophagie-Induktion und vollständiger Autophagosomen-Bildung bekannt, auf die hier jedoch nicht weiter eingegangen wird. Das Andocken an das Lysosom beruht schließlich auf bereits bekannten Mechanismen der Membranfusion über SNAPs (*soluble NSF attachment proteins*) und SNAREs (*soluble NSF attachment receptors*). Sobald die Membranen von Autophagosom und Lysosom miteinander zum Autophagolysosom verschmolzen sind, wird die innere Membran als autophagisches Körperchen ins Lysosomen-Lumen freigesetzt. Mit Hilfe des sauren lysosomalen pHs und Proteinase B wird schließlich das autophagische Körperchen und sein Inhalt abgebaut [661]. Erst mit diesem letzten Schritt ist der Prozess der Autophagie vollständig abgeschlossen.

### 1.3.2 Nachweismethoden der Autophagie

Der Nachweis von Autophagie ist bis heute nicht hinreichend und zufriedenstellend geklärt. Hinzu kommt, dass es in den meisten Fällen auch nicht so sehr darum geht, überhaupt autophagosomale Strukturen zu detektieren; da jede normale Zelle ein basales Level an Autophagie aufweist, wäre es verwunderlich, keine Autophagosomen zu finden. Vielmehr muss der Anstieg Autophagie-assoziiierter Prozesse in einer großen Anzahl von Zellen aufgezeigt werden, um eine Autophagie-Induktion nachzuweisen.

Es gibt allerdings die Möglichkeit, statt eines Nachweises von im Vergleich zur Kontrolle erhöhter Autophagie im untersuchten System die Autophagie im Vergleichssystem zu hemmen. Dies geschieht entweder mit Null-Mutanten oder siRNA gegen essentielle Atg-Gene, z.B. Atg5 [307, 668], oder durch Inhibitoren, wie beispielsweise 3-Methyladenin (3-MA) [520], Wortmannin und LY294002 [52]. Diese genannten Inhibitoren gelten zwar allgemein als Autophagie-spezifisch [291]. Allerdings hemmen sie als Inhibitoren der Klasse III PI3K-Signalkaskade nicht nur Autophagie-assoziierte Prozesse. 3-MA beispielsweise beeinflusst sowohl generell den Membranverkehr [224, 439], die Phosphorylierung von JNK und p38, zwei Schlüsselfaktoren Stress-induzierter Apoptose [649] als auch weitere zelluläre Prozesse [83, 650]. Wortmannin hemmt außerdem auch weitere MAP-Kinasen [141] und ist zusammen mit LY294002 an der Regulation der Klasse I PI3K beteiligt. Inhibitoren des lysosomalen Abbaus, wie Chloroquin, das die lysosomale Ansäuerung hemmt, oder E64d und Pepstatin A, zwei Inhibitoren lysosomaler Proteasen, resultieren bei Autophagie-Induktion in einer Akkumulation von Autophagolysosomen und Autophagosomen-spezifischen Markern [15, 509]. Allein die Zugabe von Aminosäuren oder Serum kann auch zu Autophagie-Inhibition führen [173, 296, 518].

Obwohl Autophagie bereits in den 60er Jahren beschrieben wurde, wurde erst ab den 90er Jahren intensiv daran geforscht. Eine Nachweismethode aus dieser Zeit ist der Monodansylcadaverin (MDC)-Assay von Biederbick et al. [42]. Dieser Publikation zufolge färbt der fluoreszierende Cadaverinfarbstoff subzelluläre Fraktionen an, in denen zwar lysosomale Enzyme, jedoch keine frühen oder späten endosomalen Marker enthalten waren. Daraufhin wurde MDC längere Zeit als spezifischer Autophagosomen-Marker eingesetzt.

Jedoch konnte 2001 von Munafo und Colombo gezeigt werden, dass die MDC-gefärbten Strukturen in mikroskopischen Assays mit späten endosomalen und lysosomalen Markern koloalisieren und vor allem

um den Kern herum zu finden waren, während Autophagosomen über das gesamte Cytoplasma verteilt sind [382]. Hinzu kommt, dass MDC nur saure Kompartimente anfärbt [362], so dass MDC-Färbungen, wenn sie denn mit autophagosomalen Strukturen zusammenfallen, lediglich die Autophagolysosomen markieren.

Eine Notlösung für diese Einschränkungen fanden Dengjel et al. [129], indem sie nicht nur mikroskopische Assays mit MDC machten, sondern zusätzlich mittels Fluoreszenzspektroskopie den Fluoreszenzgehalt der Zellen nach MDC-Färbung ermittelten. Dabei konnte unter Autophagie-induzierenden Bedingungen eine deutliche Steigerung der intrazellulären Fluoreszenz nachgewiesen werden, was auf eine erhöhte Abbaurate zurückzuführen ist. Einschränkend ist dazu jedoch zu bemerken, dass diese Abbaurate sowohl durch autophagosomale als auch endosomale Aktivitäten bedingt sein kann.

Eine Alternative ist der Autophagie-Nachweis mittels MAP1LC3 (im Folgenden nur noch LC3 genannt). Es gibt verschiedene Nachweismöglichkeiten mit diesem Marker, da dieses Molekül einerseits Autophagie-spezifisch prozessiert wird und damit als Bandenverschiebung im Western Blot nachweisbar ist [262], andererseits von den ersten Schritten der Phagophorenbildung bis zum Verschmelzen mit dem Lysosom am Autophagie-Signalweg beteiligt ist. Dieses Phänomen kann mikroskopisch gut verfolgt werden [281].

Aufgrund der posttranslationalen C-terminalen Modifizierung von LC3 kann man die cytoplasmatische Form von der Autophagosomen-Membran-gebundenen Form von LC3 im Western Blot unterscheiden. Allerdings muss dabei bedacht werden, dass es von LC3 drei Isoformen gibt. Es konnte gezeigt werden, dass nur zwei dieser Isoformen, LC3A und LC3C, eine Bandenverschiebung von 18 kD (LC3A-I) nach 15 kD (LC3A-II) bzw. von 16 kD (LC3C-I) nach 15,5 kD (LC3C-II) zeigten, während die dritte Isoform, LC3B nur eine Bande bei 16 kD ergab. Auch in mikroskopischen Untersuchungen konnten nur LC3A und LC3C als Autophagosomen-assoziiert detektiert werden [217].

Es besteht die Möglichkeit, dass LC3-II in Immunoblot-Assays aufgrund seiner höheren Hydrophobizität oder veränderten Konformation mit größerer Sensitivität nachgewiesen werden kann als LC3-I [263]. Dadurch wäre eine Quantifizierung der Autophagie-Rate aufgrund des LC3-II- zu LC3-I-Verhältnisses nicht möglich. Eine weitere wesentliche Einschränkung erfährt das LC3-Nachweisverfahren mittels Bandenverschiebung durch die eingeschränkte Zahl spezifischer Western Blot-tauglicher Antikörper.

Im Gegensatz dazu gibt es mehrere mikroskopische Nachweismöglichkeiten mittels LC3. Sowohl Fusionskonstrukte beispielsweise mit dem grünen fluoreszierenden Protein (GFP) oder seinen Derivaten als auch die Detektion mit Hilfe von LC3-spezifischen Antikörpern liefert überzeugende Ergebnisse [366, 509]. Mit GFP-LC3-Konstrukten ist selbst die zeitliche Verfolgung des Autophagie-Signalweges in lebenden Zellen sowie der Nachweis von Autophagie *in vivo* möglich [362, 368]. Der Nachteil ist die Notwendigkeit des GFP-LC3-Genstransfers. Die transiente Lipofectamin-Transfektion kann die Autophagierate beeinflussen und zu Autophagie-unspezifischen LC3-Aggregaten führen [308]. Daher müssen stabile Transfektionen durchgeführt werden [362]. Bei der Auszählung der GFP-markierten Strukturen muss zusätzlich bedacht werden, dass nicht jedes GFP-LC3-positive Signal auf eine autophagosomale Struktur hinweist; die Behandlung mit Saponin oder anderen Detergenzien bei der Zellfixierung kann bei GFP-LC3-Konstrukten zur Autophagie-unabhängigen Aggregatbildung führen [105], und auch LC3 alleine kann in nicht-Autophagie-assoziierten Proteinaggregaten vorkommen [308, 437]. Daher muss im Zweifel zusätzlich zur Autophagosomen-Detektion auf die Zahl und Lage der Lysosomen geachtet wer-

den. Hinzu kommt, dass lediglich Phagophoren und Autophagosomen, jedoch kaum Autolysosomen detektiert werden. Die lysosomale Umsatzrate von LC3-II spiegelt daher eher die Autophagie-Aktivität einer Zelle wider als die Markierung der transient Membran-gebundenen Form [571].

Ein weiteres Molekül, das sich als zukünftiger Autophagie-Marker herausstellen könnte, ist das **WD-repeat protein *Interacting with Phospho-Inosides*** (WIPI)-1 (WIPI49/Atg18), im Folgenden als WIPI1 bezeichnet. Als WD-repeat Protein bietet WIPI1 eine Plattform für Protein-Protein-Interaktionen [603] und spielt durch die Verbindung mit Phospholipiden vor allem eine Rolle bei der Zusammenlagerung von Proteinkomplexen an Membranen [140, 253, 552]. Außerdem kolokalisiert WIPI1 nach Autophagie-Induktion mit LC3 und lagert sich an große gekrümmte und vesikelartige cytoplasmatische Gebilde. Diese Phänomene konnten durch den PI3K-Inhibitor Wortmannin aufgehoben werden [436], sind allerdings von Zelltyp zu Zelltyp unterschiedlich stark ausgeprägt [437]. Die durch Aminosäuremangel ausgelöste Aktivierung des Beclin-1-assoziierten Klasse III PI3K/-Komplexes könnte WIPI1 also als Signalmolekül für die Autophagie-Induktion nutzen [395].

Der Autophagienachweis für WIPI1 funktioniert analog zum mikroskopischen Nachweis von LC3 vor allem über Konstrukte wie GFP-Fusionsproteine. Eine wichtige Einschränkung besteht: WIPI1 konnte bisher nicht an kompletten Autophagosomen nachgewiesen werden [437]. Da es bisher kaum weitere Publikationen über WIPI1 gibt, die die Autophagie-Spezifität dieses Markers bestätigen, muss dieser Marker zunächst noch mit Vorsicht behandelt werden.

Eine letzte hier beschriebene Nachweismethode ist die Elektronenmikroskopie. Autophagosomen weisen eine Doppelmembran auf. Damit sind sie von den meisten anderen Organellen theoretisch gut zu differenzieren. Abgesehen davon, dass Elektronenmikroskopie an sich aber bereits sehr aufwändig ist und ein hohes Maß an Erfahrung bei der Interpretation verschiedener zellulärer Strukturen fordert, werden die Nachweismöglichkeiten mit Hilfe dieser Methode eingeschränkt dadurch, dass andere Strukturen - nicht nur das Mitochondrium - je nach Schnittebene mehrere Membranen aufweisen können. So erscheinen Zellausstülpungen, die in benachbarte Zellen eindringen, bei senkrechter Schnittebene genauso als Doppelmembran wie auch Phagosomen-Vesikel mit entsprechend aufgenommenem membranhaltigem Inhalt [362]. Verbindet man jedoch die Elektronenmikroskopie mit der Verwendung der oben genannten Marker, ergibt sich daraus eine überzeugende Nachweismethode [262, 366].

Viele weitere Nachweismethoden für Autophagie wurden im Laufe der Zeit etabliert [291], auf die jedoch hier nicht weiter eingegangen werden soll, da sie im Kontext dieser Dissertation nicht von entscheidender Bedeutung sind.

### 1.3.3 Autophagie und Tumorentwicklung

Die vielen Aufgaben, die Autophagie erfüllt, führen dazu, dass die Rolle, die Autophagie im Kontext der Onkogenese als auch im Rahmen der Krebstherapie spielt, nicht geklärt ist.

Im Grunde erfüllt Autophagie bereits die Aufgabe der Krebsprävention durch den Abbau von Proteinaggregaten missgefalteter Proteine und die Eliminierung von ROS-Quellen, die für die Zelle toxisch sind. Auch das Gleichgewicht zwischen Proteinsynthese und -abbau, das durch Autophagie gewährleistet wird, ist ein wichtiger Faktor, der Zellen vor dem entarteten Wachstum bewahrt.

Die Präsentation endogener Proteine durch Autophagie-vermittelte HLA-Peptid-Präsentation auf HLA Klasse II-Molekülen kann einen wichtigen Aspekt der Tumorbekämpfung durch das Immunsystem darstellen.

In ihrem Anfangsstadium, wenn die gesteigerte Angiogenese noch nicht eingesetzt hat und es an Nahrung und Sauerstoff mangelt, können Tumorzellen durch die Aktivierung von Autophagie besser überleben. Auch später unter Chemo- oder Radiotherapie kann Autophagie einen Schutzmechanismus für Tumorzellen darstellen. Denn durch den Abbau von ROS-Quellen oder defekter DNA und missgefalteten Proteinen kann auch Tumorzellen ein Überleben erleichtert werden. Andererseits kann eine auf diese Weise gesteigerte Induktion von Autophagie, wenn sie ein bestimmtes Limit überschreitet, ebenso dazu führen, dass die Zellen sich selbst auffressen und damit in den programmierten Zelltod übergehen. Im gesunden System führt metabolischer Stress nach 24-48 Stunden zur Apoptose [122, 267, 354]. Weist eine Zelle Defekte in Autophagiefunktionen auf, kann sich dieser Prozess enorm beschleunigen [59]. Weist eine Zelle Defekte in Apoptosefunktionen auf, kann der durch Autophagie eingeleitete Zelltod sich um Wochen verzögern oder aber durch Autophagie-unterstütztes Recycling überlebenswichtiger Metabolite ganz umgangen werden, wobei sich die Zellgröße drastisch verringert [122, 267, 341, 354]. Im Falle sowohl defekter Apoptose als auch defekter Autophagie schlagen Zellen den nekrotischen Zelltod ein [258]. Dieser Zelltod ist verbunden mit DNA-Schäden, löst eine inflammatorische Immunantwort aus und im chronischen Fall auch erhöhte Angiogenese und Tumorwachstum [26, 27, 208, 596].

In vielen Krebsarten findet man Deletionen von Autophagie-spezifischen Genen. Tumorsuppressorgene wie Beclin-1, p53 oder PTEN [14, 324], die oft Mutationen in Krebszellen aufweisen, aktivieren Autophagie, während Gene, die in Krebszellen aktiviert sind, wie Klasse I PI3K oder AKT [425, 533], Autophagie inhibieren.

Alle genannten Einflüsse der Autophagie auf das Tumorwachstum lassen diesen Mechanismus als sehr ambivalent erscheinen und für die Krebstherapie bis jetzt keine Schlussfolgerung darüber zu, ob Autophagie zur Tumorbekämpfung gefördert oder unterdrückt werden sollte.

## 1.4 Zielsetzung

Ein Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung neuer Tumorantigene für die Immundiagnostik und Immuntherapie. Dazu werden im Rahmen zweier klinischer Studien mit Stage III- und Stage IV-Nierenzellkarzinompatienten die auf den Tumorgeweben präsentierten HLA-Liganden biochemisch aufgereinigt und massenspektrometrisch analysiert. Außerdem wird die Proteinexpression ausgewählter Tumorantigene in den Tumorgeweben mehrerer Nierenzellkarzinome mittels Mikroarray-Expressionsanalyse untersucht. Zusätzlich wird das HLA-Ligandom aller bisher in unserer Abteilung analysierter RCC-Gewebe auf der Suche nach allgemeinen RCC-spezifischen Liganden vergleichend betrachtet, vor allem auch im Hinblick auf die Tauglichkeit der einzelner Peptide als Impfkandidaten.

Dazu wird sowohl die HLA-Ligandenpräsentation als auch die Proteinexpression mit den jeweiligen Genexpressionsdaten, soweit vorhanden, verglichen.

Ein weiteres Projekt ist die Aufklärung grundlegender Fragen zur Autophagie bei der Antigenprozessierung. Nachdem die Veränderungen des MHC Klasse II-Ligandoms als Reaktion auf Autophagie-Induktion bereits aufgezeigt worden waren [129], sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob sich Autophagie-induzierte Veränderungen auch im MHC Klasse I-Ligandom niederschlagen. Dies wird an zwei unterschiedlichen Zelllinien untersucht, einer B-Zelllinie und einer Zelllinie aus dem Tumorgewebe eines Nierenzellkarzinoms. Auch hierfür werden die HLA-Liganden biochemisch aufgereinigt und massenspektrometrisch analysiert.

Desweiteren soll vor dem Hintergrund eines fehlenden uneingeschränkt einsetzbaren Autophagienachweissystems nach Autophagie-induzierbaren Veränderungen in der Proteinexpression von solchen Proteinen gesucht werden, die im Verlauf des Autophagie-Signalweges eine Rolle spielen.

Gleichzeitig wird untersucht, ob sich durch verschiedene Arten der Autophagie-Induktion die Proteinexpression bzw. die Aktivierung ausgewählter Proliferationsmarker und Tumorantigene verändern.

Für das Screening sowohl nach potentiellen Autophagie-Markern als auch nach den Proliferationsantigenen wurden wiederum die beiden oben genannten Tumor- und B-Zelllinien und die Methode der Mikroarray-Expressionsanalyse eingesetzt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Soweit nicht anders angegeben, stammen alle Glaswaren von der Firma Schott (Mainz), alle Chemikalien (p.a. Qualität) von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (München).

RPMI 1640-Medium	Gibco, Karlsruhe
L-Glutamin	PAA Laboratories, Cölbe
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin Mix, je 10 mg/ml	PAA Laboratories, Cölbe
100x nicht-essentielle Aminosäuren	Sigma-Aldrich, München
Fötales Kälberserum (Fetal calf serum, FCS)	PAA Laboratories, Cölbe
Trypsin	Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien
Rapamycin	LC Laboratories, Woburn, MA, USA
Chloroquin	Sigma-Aldrich, München
Concanamycin A	Sigma-Aldrich, München
Trypanblaulösung (0,05% w/v)	Gibco, Karlsruhe
Phosphate buffered saline (PBS)	Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien
Gewebekulturflaschen 100, 250 und 550 ml, steril	greiner bio-one, Frickenhausen
6- und 96-well-Platten	Becton Dickinson, Heidelberg
0,5 ml-, 1,5 ml-, 2 ml-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
2 ml-Polypropylen-Einfrierröhrchen mit Schraubverschluss	greiner bio-one, Frickenhausen
15 und 50 ml-Röhrchen	greiner bio-one, Frickenhausen
8-well LabTec Kammerdeckgläser	Nunc, Thermo Fisher Scientific, Wiesbaden
0,2 $\mu$ m-Sterilfilter	Millipore, Schwalbach
0.2 $\mu$ m-Sterilfilter Sartolab-P20	Sartorius, Göttingen
0,65 $\mu$ m-Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
Einmalspritzen	Becton Dickinson, Heidelberg
Pasteurpipette, 230mm	Fortuna, Wertheim
Protein A-Sepharose, CL-4B	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
CNBr-activated Sepharose 4B	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propansulfonat (CHAPS)	Roche, Mannheim
Proteaseinhibitor "complete"	Roche, Mannheim
Trifluoro acetic acid (TFA)	Applied Biosystems, Darmstadt

Centricon-10 Zentrifugen-Filtereinheiten	Millipore, Schwalbach
Quarzküvette, Schichtdicke 10 mm, Zentrum 15 mm	Hellma, Müllheim
Cryoröhrchen	Nalgene, Neerijse, Belgium
CLB1 Lysepuffer	Zeptosens, Witterswil, Schweiz
CSBL Druckpuffer	Zeptosens, Witterswil, Schweiz
384-well-Platten PP Masterblock V shape	greiner bio-one, Frickenhausen
Alexa Fluor 647 Monoclonal Antibody Labeling Kit	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
Bradford Reagenz Coomassie Plus	Pierce, Rockford, IL, USA
NuPAGE Gelelektrophorese-System Komponenten	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
XCell II Blot Module Komponenten	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
0,2 $\mu\text{m}$ -Nitrozellulosemembranen	Protran, Blackburn North, Australien
Filterpapier	Whatman, Dassel
Enwicklungslösung, SuperSignal West Pico	Pierce, Rockford, IL, USA
1H4- und 2D4-NicNHS-Ester	Weik, S., Universität Tübingen
pH-Indikatorstäbchen pH-Fix 0-14	Macherey-Nagel, Düren
O-Methyl-Isoharnstoff-Hemisulfat 94%	ACROS Organics, New Jersey, USA
Spinsäulen Peptide Cleanup C-18 Spin Tubes	Agilent, Böblingen
100 $\mu\text{l}$ -Spritze Hamilton Gastight Syringe Type 1710N	Mascom, Bremen
Glaskapillaren, GC120F-10 Clark	BMI, Zöllnitz
Picotips, 360/20 $\mu\text{m}$ OD, 10 $\mu\text{m}$ ID Auslassöffnung, 1P-4P Beschichtung	New Objective, Woburn, MA, USA

## 2.2 Geräte und Zubehör

Sterilbank Technoflow	Integra Biosciences, Fernwald
37°C Inkubator, 7,5% CO <sub>2</sub> Begasung Forma Scientific	Labotect, Göttingen
Lichtmikroskop Leica DMIL	Leica, Bensheim
Zählkammer Neubauer, Tiefe 0,1 mm	LO - Laboroptik, Friedrichsdorf
Einfrierbehälter "Cryo Freezing Container"	Nalgene, Houghton le Spring, UK
Wasserbad Thermomix BM-S	Braun Biotech, Göttingen
Tischkühlzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus-Instruments, Hanau
Tischkühlzentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus-Instruments, Hanau
Kühlzentrifuge RC 5C Plus, Rotor SLA 3000	Sorvall Langenselbold
Ultrazentrifuge L-80 Ultracentrifuge, Rotor Ti45, Rotor Ti70	Beckman Coulter, Krefeld
Rotanta Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Easy Load Peristaltische Pumpe	Millipore, Schwalbach
Easy Load Pumpschlauch, Außendurchmesser 6 mm, Innendurchmesser 3 mm	Millipore, Schwalbach
pH-Meter 765	Knick, Berlin
UV-Spektrometer Ultrospec 3000	Amersham Pharmacia Biotech,

Quarzküvetten, Schichtdicke 10mm, Zentrum 15 mm	Freiburg
Magnetrührer RCT basic	Hellma, Müllheim
Vortexer Minishaker MS 1	IKA, Staufen
Thermomixer 5436	IKA, Staufen
Pumpen Pharmacia P1 peristaltic pump	Eppendorf, Hamburg
Mixer Model 32BL79 mit 250ml Edelstahlbecher	GE Healthcare, München
Potter RZR 2020, mit spitz zulaufendem Glasgefäß und Teflonpistill	Waring Commercial, Torrington, CT, USA
Ultraschallgerät Sonifier 250, Schallkopf Typ 102-C	Heidolph, Schwabach
Lyophilisieranlage Vaco5	G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Rotator Model LD-28	ZIRBUS, Bad Grund
Schüttler Duomax 1030	Labinco BV, Breda, Niederlande
UV-Spektrometer, Pharmacia Ultrospec 3000	Heidolph, Schwabach
Spektrometer Fluostar OPTIMA	GE Healthcare, München
NuPAGE Gelelektrophorese-System	MWG Biotech, Ebersberg
XCell II Blot Module	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Gel- & Membran-Auslesestation Kodak Image Station 440 CF, Software Kodak Digital Science 1D	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Orbital Schüttler KL-2	Kodak Eastman, Rochester, NY, USA
Taumelroller RM5	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Thermomixer Comfort	Karl Hecht KG, Sondheim
Mikrodismembrator, Einsatz für 4 Cryogegefäße, Edelstahlkugeln (9 mm Durchmesser)	Eppendorf, Hamburg
Pipettier-Roboter Genesis Gemini 100, Steuerungssoftware Gemini 3.5	Sartorius, Göttingen
Mikroarrayer Nanoplotter NP 2	TECAN, Hombrechtikon, Schweiz
Auslesegerät für planare Wellenleitertechnologie ZeptoREADER, Software ZeptoVIEW	GeSiM, Großerkmannsdorf, Deutschland
Wärmeschrank BF115	Zeptosens, Witterswil, Schweiz
Ultraschallvernebler Blocking Station	BINDER GmbH, Tuttlingen
ZeptoCARRIER, Flusszellen	Zeptosens, Witterswil, Schweiz
Absaugvorrichtung Vacuboy	Zeptosens, Witterswil, Schweiz
Edman-Sequencer ABI "Procise"494A Protein Sequencer, Chemikalien zum Edman-Abbau	IBS Integra Biosciences, Fernwald
C-18 Säule Spheri-5 PTH 5 $\mu$ , 220 x 2,1 mm	Applied Biosystems, Foster City, USA
Vorsäulen C-18-Material, 300 $\mu$ m, 10 mm fused-silicia-Mikrokapillarsäule (5 $\mu$ m C-18-Material, ID 75 $\mu$ m, Länge 250 mm)	Applied Biosystems, Foster City, USA
Vorsäulenpumpe ABI 140D Delivery System	Dionex, Germering
Probentransfer auf Vorsäule 112A Oven/Injector	Dionex, Germering
	Perkin Elmer, Boston, USA
	Applied Biosystems, Foster City, USA



$\mu$ Kapillar-LC-System Ultimate	Dionex, Germering
NanoLC 2D System	Eksigent Technologies, Dublin, CA, USA
Q-ToF-Massenspektrometer Q-ToF I, MassLynx 4.0 Software	Micromass, Manchester, UK
Laser-Scanning-Mikroskop LSM510	Zeiss, Oberkochen
Epifluoreszenzmikroskop Axiovert 100 M	Zeiss, Oberkochen

### 2.3 Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	MHC-Typisierung	Referenz
Awells	EBV-transformierte humane lymphoblastoide Zelllinie	A*0201, B*4402, Cw*0501, DPB1*0401, DPB1*1401, DQA1*03, DQB1*0301, DQB1*0401, DRB1*0401	IHW 9090
RCC68	immortalisierte Zelllinie aus dem Tumorgewebe von Patient RCC068	A*02, A*29, B*1501, B*4501	C. Gouttefangeas

### 2.4 Zellbiologische Methoden

#### 2.4.1 Kultivierung der Zelllinien

Die Zelllinien wurden bei 37°C und 7,5 % CO<sub>2</sub> in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre gehalten. Als Zellkulturmedium wurde RPMI 1640 mit folgenden Zusätzen verwendet: NaHCO<sub>3</sub> (2 g/l), HEPES (2,4 g/l), L-Glutamin (2  $\mu$ /l),  $\beta$ -Mercaptoethanol (50  $\mu$ mol/l), Penicillin (50 U/ml), Streptomycin (50  $\mu$ g/ml), 10 % FCS, pH 7,2. Um größere Mengen von Zellen zu kultivieren, wurden die Zellkulturen in 2l-Glasflaschen überführt. Diese Rollerulturen wurden bei 37°C und 1,5 Umdrehungen pro Minute auf Rollergestellen gehalten.

#### 2.4.2 Passagieren der Zellen

Adhärente Zellen wurden durch Entfernen des Kulturmediums, einmaligem Waschen in PBS und anschließender Inkubation entweder in 0,05% EDTA in PBS bzw. Trypsin für etwa 10 min bei 37°C abgelöst. Nach Zugabe von PBS bzw. Medium wurden die gelösten Zellen durch Zentrifugation (1500 rpm, 3 min, RT, Megafuge 1.0R) pelletiert und in frischem Kulturmedium aufgenommen. Bei Suspensionszellen wurde die vorhandene Suspension lediglich mit neuem Kulturmedium verdünnt.

#### 2.4.3 Bestimmung der Lebendzellzahl

Ein Aliquot der Zellsuspension wurde je nach erwarteter Dichte der Zellen mit Trypanblau-Lösung verdünnt und auf die Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Die ungefärbten Zellen aus 2 x 16 Kleinquadraten multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor und dem Faktor 10<sup>4</sup> ergaben die Lebendzellzahl pro ml.

#### 2.4.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden Zellen mit einer Konzentration von  $10^6$  Zellen/ml in sterilfiltriertem Einfriermedium (90 % FCS, 10 % DMSO) aufgenommen. Dann wurden 1 ml Aliquots in Einfrierröhrchen überführt und zunächst in Isopropanol-gefüllten Behältern auf  $-70^\circ\text{C}$  gekühlt. Für die längerfristige Lagerung wurden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

Eingefrorene Zellen wurden im Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  aufgetaut. Danach wurden die Zellen in 5 ml vorgelegtem Zellkulturmedium resuspendiert und abzentrifugiert (1500 rpm, 3 min, RT, Megafuge 1.0R). Das Zellpellet wurde in 5 ml Zellkulturmedium gewaschen und erneut zentrifugiert. Dieses Pellet wurde in 2 ml Zellkulturmedium resuspendiert. In einer 6-well-Platte wurden in drei wells je 5 ml, 3 ml und 2 ml Zellkulturmedium vorgelegt. Die 2 ml Zellen wurden im ersten well resuspendiert, 1,5 ml davon wurden ins zweite well übertragen und resuspendiert, 750  $\mu\text{l}$  davon wurden im dritten well resuspendiert.

#### 2.4.5 Zellernte

Für die MHC-Präzipitation von Suspensionszellen wurden die Zellsuspensionen aus Rollerkulturen in 500 ml-Zentrifugenbechern zentrifugiert (1600 rpm, 10 min,  $4^\circ\text{C}$ , Sorvall RC 5C Plus, Rotor GS-3). Adhärente Zellen wurden nach Abnahme der Zellsuspension aus dem Überstand für 10 min mit 0,05 % EDTA in PBS bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden die Zellen von der Flaschenwand abgeklopft, mit den Zellen aus dem Überstand vereint oder getrennt aufgefangen und abzentrifugiert. Die Überstände aus der Zentrifugation wurden verworfen, die Zellpellets in eiskaltem PBS pH 7,2 gewaschen, in 50 ml-Röhrchen vereinigt und erneut zentrifugiert (1600 rpm, 20 min,  $4^\circ\text{C}$ , Megafuge 1.0R). Der Überstand wurde erneut verworfen und die Zellpellets bei  $-70^\circ\text{C}$  gelagert. Für die Generierung von Zellpellets für Immunoassays wurde das Protokoll auf kleinere Maßstäbe angepasst; Zellen wurden aus Zellkulturflaschen gewonnen, in 50 ml-Röhrchen abzentrifugiert (1600 rpm, 20 min,  $4^\circ\text{C}$ , Megafuge 1.0R) und anschließend mit geringen Mengen an PBS in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt, erneut abzentrifugiert (1600 rpm, 20 min,  $4^\circ\text{C}$ , Biofuge fresco).

#### 2.4.6 Autophagie-Induktion

Zur Autophagie-Induktion wurde dem normalen Kultiviermedium Rapamycin in einer Endkonzentration von  $0,2 \mu\text{g/ml}$  zugesetzt oder Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, 0,185 g/l  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 0,4 g/l KCl, 0,06 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 g/l  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 8 g/l NaCl, 0,35 g/l  $\text{NaHCO}_3$ , 0,048 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1 g/l Glucose, 2,38 g/l HEPES, pH 7,4) verwendet. Zuvor wurden die Zellen für mindestens eine Woche bei einer Dichte unter  $2 \cdot 10^5$  gehalten, um das konstitutive Autophagie-Level möglichst gering zu halten. Vor dem Mediumwechsel wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen (1500 rpm, 3 min, Megafuge 1.0R) und anschließend in frische Zellkulturflaschen überführt, um Serumfreiheit bei der HBSS-Behandlung zu garantieren.

Zur Anreicherung von Autophagosomen durch Inhibition des lysosomalen Abbaus wurden entweder 40  $\mu\text{M}$  Chloroquin oder 2nM Concanamycin eingesetzt.

#### 2.4.7 Fluoreszenzmikroskopie

Für den Autophagie-Nachweis mittels Fluoreszenzmikroskopie wurden zwei verschiedene Marker eingesetzt: Monodansylcadaverin (MDC) und ein LC3-Antikörper (Maus-anti-LC3, MabLC3-5F10, na-

noTools, Teningen, 1:200). Beim MDC-Nachweis wurden die Zellen im Anschluss an die Autophagie-Behandlung für 10 min mit 0.05 mM MDC inkubiert. Die Färbung wurde durch dreimaliges Waschen mit eiskaltem PBS gestoppt und die Zellen direkt in 8-well Kammerdeckgläser überführt und mikroskopisch analysiert. Beim LC3-Nachweis wurden die Zellen im Anschluss an die Autophagie-Behandlung zweimal mit filtriertem PBS gewaschen (1500 rpm, 3 min, Megafuge 1.0R), bevor sie mit 3,7% Formaldehyd fixiert wurden (20 min, -20°C). Die fixierten Zellen wurden erneut einmal mit filtriertem PBS gewaschen. Danach wurden sie erst für 30 min bei RT mit 1% BSA blockiert und anschließend für 15 min bei RT mit Saponinpuffer (0.1% Saponin, 0.1% BSA in filtriertem PBS) permeabilisiert. Die Primärantikörper-Inkubation fand für 1 h bei RT statt. Danach wurden die Zellen zweimal mit filtriertem PBS gewaschen und dann mit dem Sekundärantikörper (Alexa Fluor 546 goat-anti-mouse, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, 1:500) für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen überführt in 8-well Kammerdeckgläser. Diese waren im Fall von Suspensionszellen zuvor für 6 h mit Poly-L-Lysin-Hydrobromid (MW 70.000-150.000) inkubiert und direkt vor Befüllung dreimal mit filtriertem PBS gespült worden.

Aufnahmen wurden sowohl mittels Epifluoreszenz- als auch Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) gemacht. Für die Epifluoreszenzmikroskopie wurde ein Axiovert 100 M zusammen mit der mitgelieferten Software Axiovision 3.2 verwendet. Die Bildaufnahme erfolgte mit Hilfe einer Sencicam 1200, als Lichtquelle diente eine Quecksilberdampflampe. Zusätzlich wurden zu der Software Metamorph kompatible Softwaremodule für automatische Positionierung, Bilderfassung und Einscannen eingesetzt (entwickelt von Frau Regina Bohnert, Arbeitsgruppe PD Brock, Tübingen).

<u>Filtersätze</u>	Anregungsfilter	Strahlteiler	Emissionsfilter
Rhodamin	HQ548/10	Q565LP	HQ610/75
DAPI	HQ470/40	Q495LP	HQ525/50

#### Objektive

5-fach	Plan Neofluar 5 x NA 0,15
10-fach	Plan Neofluar 10 x NA 0,3 (DIC I)

Zur konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) wurde ein invertiertes LSM510 Laser-Scanning-Mikroskop verwendet. Für die Anregung der Fluorophore wurden ein HeNe-Excimer-Laser und ein Argonionenlaser eingesetzt.

#### Filtereinstellungen

Rhodamin	HFT UV/488/543 Strahlteiler in Kombination mit einem NFT 545 Strahlteiler und einem LP 560 Langpassfilter
----------	---

#### Objektive

20-fach	Plan Neofluar 20 x NA 0,5 (DIC II)
40-fach	C-Apochromat 40 x NA 0,75 (DIC II)
63-fach	Plan-Apochromat 63 x NA 0,1,4

## 2.5 Immunologische und biochemische Methoden

### 2.5.1 Antikörperreinigung

Hybridomzellsuspensionen wurden mit Natriumazid (0,02% Endkonzentration) versetzt und der pH-Wert der Lösungen mit 5 M NaOH auf pH 8,0 eingestellt. Zum Absetzen der Zellen wurde die Zellsuspension daraufhin mehrere Tage bei 4°C gelagert. Anschließend wurde der Hybridomzellüberstand mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe über einen 0,65 µm-Membranfilter filtriert.

Die Aufreinigung des Antikörpers aus dem klaren, partikelfreien Überstand erfolgte über eine Protein A-Sepharose-Affinitätssäule. Zur Präparation der Säule wurden 1,2 g Protein A-Sepharose in 10 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen und 15 min bei RT auf dem Schüttler gequollen. Nach dem anschließenden Absetzen der Protein A-Sepharose wurde der Überstand abgenommen. Das Säulenmaterial wurde in PBS aufgenommen und in eine Säule gepackt. Nach dem erneuten Absetzen des Säulenmaterials wurde das Gelbett 30 min mit PBS gewaschen. Der Hybridomüberstand wurde bei 4°C über die Säule geschickt und im Anschluss wieder 30 min mit PBS gewaschen. Eluiert wurde der Antikörper mit 8 ml Zitratpuffer (50 mM Zitronensäure, pH 3,0), wobei die ersten 1,0 ml als Vorlauf verworfen wurden. Die restlichen 7 ml Eluat wurden direkt in 23 ml Kopplungspuffer (0,1 M NaHCO<sub>3</sub>; 0,5 M NaCl; pH 8,3) aufgefangen. Alle Wasch- und Elutionsschritte wurden mittels Schwerkraft mit Sicherheitsschleife durchgeführt (in der Regel 3 ml/min). Zwischen den einzelnen Schritten wurde das Säulenmaterial mit Pasteurpipette aufgeschlämmt.

Die Quantifizierung des Antikörpers erfolgte anhand der UV-Absorption bei 280 nm. Eine Absorption von 1,0 OD<sub>280</sub> entspricht einer Antikörperkonzentration von 0,7 mg/ml.

### 2.5.2 Säureextraktion von MHC-Liganden nach Immunpräzipitation

#### 2.5.2.1 Herstellung der Säule für die Immunpräzipitation

Antikörper wurde im Verhältnis 1:40 (w/v) an CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelt. Die Kopplung des Antikörpers an CNBr-aktivierte Sepharose beruht auf einer nukleophilen Substitutionsreaktion, wobei das Bromid-Anion als Abgangsgruppe fungiert. Als angreifende Nucleophile dienen der Aminotermi- nus bzw. die ε-Aminogruppen von Lysin-Resten. Die Reaktion muss im Basischen stattfinden, da die Aminogruppen nicht protoniert vorliegen dürfen. Vor der Antikörper-Kopplung wurde die Sepharose in 40 ml 1 mM HCl 30 min auf dem Rotator bei RT gequollen und aktiviert. Anschließend wurde sie abzentrifugiert (300 rpm ohne Bremse; 4°C; 2 min, Megafuge 1.0R) und der Überstand durch die Antikörperlösung in 40 ml Kopplungspuffer ersetzt. Diese Mischung wurde etwa 1 h bei RT auf dem Rotator inkubiert. Vor und nach erfolgter Kopplung wurden zur Bestimmung der Kopplungseffizienz 200 µl der Sepharose-Antikörpermischung entnommen, die Sepharose abzentrifugiert (13000 rpm; RT; 2 min, Biofuge fresco) und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Kopplungseffizienz ergab sich aus dem Verhältnis der OD<sub>280</sub> am Anfang und am Ende der Kopplungszeit. Anschließend wurden die noch unbesetzten reaktiven Gruppen der Sepharose durch Zugabe von 40 ml 0,1 M Glycin abgesättigt, die 30 min auf dem Rotator inkubiert wurde. Zum Abschluss wurde die Sepharose mit 40 ml PBS gewaschen und in eine Säule gepackt und nochmals für 30 min mit PBS bei einer Flussrate von 1,0 ml/min gewaschen. Folgende Antikörper wurden zu Immunpräzipitation eingesetzt:

Antikörper	Isotyp, Spezies	MHC-Spezifität	Referenz
L243	IgG <sub>2a</sub> , Maus	HLA-DR	Lampson and Levy, 1980 [313]
W6/32	IgG <sub>2a</sub> , Maus	HLA-A, -B, -C	Barnstable et al., 1978 [36]

### 2.5.2.2 Verwendetes Gewebe für die Immunpräzipitation

Zellysate wurden aus den Zelllinien RCC68 oder Awells (s. 2.3) oder aus Gewebe von soliden Nierenzellkarzinomen gewonnen. Die Gewebeproben wurden bei Nephrektomien aus dem Tumorgewebe und dem autologen gesunden Nierengewebe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Gewebeproben bei -70°C gelagert. Zur HLA-Typisierung wurden jeweils 10 ml EDTA-Blut abgenommen.

### 2.5.2.3 Herstellung des Zellysats für die Immunpräzipitation

Das gefrorene Zellpellet oder schockgefrorene Gewebe wurde mit dem gleichen Volumen 2-fach konzentriertem Lysispuffer (PBS, 0,6 % CHAPS, 3 Tabletten Proteaseinhibitor „complete“ pro 200 ml) versetzt und unter langsamem Rühren bei 4°C aufgetaut bzw. im Fall von Gewebe mit Hilfe von Mixer und Potter homogenisiert. Nach dem Auftauen wurden weitere 1-3 Volumen 1-fach konzentrierter Lysispuffer hinzugefügt und die Zellsuspension für weitere 60 min bei 4°C gerührt. Anschließend wurde das Lysat mit Ultraschall behandelt. Dazu wurde das eisgekühlte Lysat dreimal bei maximaler Leistung beschallt (Arbeitsschritt 20 sek, Ruheschritt 20 sek). Anschließend wurde das Zellysat zuerst abzentrifugiert (4000 rpm; 4°C; 20 min; Megafuge 1.0 R) um grobe Zelltrümmer, wie Zellkerne, Mitochondrien und Teile des Cytoskeletts vom Überstand abzutrennen. Dann wurde der Überstand ultrazentrifugiert (40.000 rpm; 4°C; 1 h; L-80 Ultracentrifuge, Ti45 oder Ti70 Rotor). Die Pellets wurden verworfen, der Überstand für die weitere Verwendung sterilfiltriert (0,2 µm).

### 2.5.2.4 Affinitätschromatographie

Das Zellysat wurde mit einer Flussrate von 2,0 ml/min auf die vorbereitete Antikörpersäule aufgetragen. Anschließend wurde die Säule erst 30 min mit PBS, dann 1 h mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Für die Säureextraktion wurde das Gelbett trockenlaufen gelassen und dann für 30-60 min mit jeweils 10 µl 10 % TFA und soviel 0,125 % TFA inkubiert, wie nötig war, um das Gelbett damit zu bedecken. Das Eluat wurde im Anschluss direkt von der Säule in ein zuvor zweimal mit 0,1 % TFA gespültes 10 kDa-Zentrikon gepumpt. Das Extraktionsverfahren wurde noch siebenmal jedoch ohne die 10 % TFA wiederholt, die Eluate möglichst im gleichen Zentrikon vereinigt, und ein Aliquot von je 2 % des Gesamtvolumens zur Edman-Sequenzanalyse entnommen. Die Zentrikons wurden zur Abtrennung der HLA-Liganden von den HLA-Molekülen bei 4000 rpm (Megafuge 1.0 R) bei 4°C solange zentrifugiert, bis die gesamte Flüssigkeit filtriert war. Das Filtrat wurde anschließend zur dauerhaften Lagerung im gefrorenen Zustand lyophilisiert.

### 2.5.3 Proteinbestimmung

10 µl Zellysat (in einer Verdünnung von 1:20 bis 1:50 in CLB1) sowie jeweils 10 µl der BSA-Standard-Probenreihe (von 0 bis 1 mg/ml BSA in CLB1) und des CLB1-Verdünnungspuffers wurden jeweils in

Duplikaten in einer 96-well-Platte vorgelegt. Diese wurden mit 300  $\mu$ l Bradford Reagenz versetzt und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde gegen die CLB1-Proben als Nullwert die Absorption bei 595 nm im Spektrometer Fluostar OPTIMA gemessen. Mit Hilfe der geräteeigenen Software wurden anhand der über die BSA-Verdünnungsreihe geeichten optischen Dichte der Proben die Proteinkonzentrationen ermittelt.

### 2.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur analytischen Auftrennung von Proteinen wurden Apparatur, Puffer und Gele des NuPAGE-Elektrophorese-Systems (Invitrogen) eingesetzt. Auf Bis-Tris 4-12%-Gradienten-Gele (Dicke 1mm, 1 well, 2D) wurden 400  $\mu$ g Protein bzw. auf 10% Bis-Tris-Gele (Dicke 1mm, 15 wells) 15  $\mu$ g Protein jeweils 1:4 verdünnt mit 4x LDS-Ladepuffer aufgetragen, nachdem sie für 10 min bei 70°C denaturiert worden waren. Als Größenreferenz wurden 5  $\mu$ l der Eichprobe SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard (4 - 250 kDa) eingesetzt. Die Elektrophorese wurde bei konstanten 200 V und 70-125 mA für ca. 45 min durchgeführt. Als Laufpuffer wurde 50 mM MES, 50 mM Tris, 0,1% SDS, 1 mM EDTA in H<sub>2</sub>O bidest. pH 7.3, eingesetzt.

### 2.5.5 Western Blot

Zur elektrophoretischen Übertragung der mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf Nitrocellulosemembranen wurden Apparatur und Puffer der Blot-Apparatur XCell II Blot Module (Invitrogen) eingesetzt. Der Transfer erfolgte bei folgendem Aufbau: Kathodenplatte - 3-4 Schwämme - 1 Filterpapier - Gel - Nitrocellulosemembran - Filterpapier - 3-4 Schwämme. Zuvor wurde alles außer dem Gel in Transferpuffer getränkt. Der Transfer fand bei konstanten 30 V, ca. 170 mA für 60 min statt.

#### 2.5.5.1 Ponceau S-Färbung von Proteinen auf Western-Blot-Membranen

Im Anschluss an den Protein-Transfer wurden die Nitrocellulosemembranen für 5 min bei RT in Ponceau S-Lösung (0,1% (w/v) in 5% Essigsäure-Lösung) inkubiert und dann für mindestens weitere 5 min mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Die dadurch sichtbar gewordenen Proteinbanden des Markers und oberes und unteres Ende der Membranen wurden markiert, bevor die Membranen an der Kodak Image Station ausgelesen wurden. Anschließend wurde der Farbstoff für ca. 20 min durch Inkubation mit TBST (10 mM Tris-Hydrochlorid, 150 mM NaCl in H<sub>2</sub>O pH 7.4, 0,1% Tween-20) entfernt.

#### 2.5.5.2 Antikörper-Inkubation auf Western-Blot-Membranen

Zunächst wurden die Membranen 1 h bei RT auf dem Taumelroller mit 50 ml Blockierlösung (TBST, 3% BSA) inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Anschließend wurden die Blots bis zur Antikörper-Inkubation bei RT an der Luft getrocknet und lichtgeschützt aufbewahrt. Blot-Membranen von 1-well-2D-Gelen wurden, sobald sie getrocknet waren, der Länge nach in 2 mm breite Streifen geschnitten und mit Streifen von Blots anderer Proben für vergleichende Antigen-Analysen zu sogenannten „Pseudoblots“ zusammengefügt. Die Inkubation der Membranen bzw. „Pseudoblots“ erfolgte in der gewählten Primärantikörper-Lösung (in 2,5 ml TBST, 1% BSA) über Nacht bei 4-8°C. Im Anschluss wurden die Membranen 6x für 5 min mit 5 ml Waschlösung (TBST, 1% BSA) gewaschen und dann für 1 h bei RT mit der entsprechenden Sekundärantikörper-Lösung (in 2,5 ml TBST, 1% BSA) inkubiert.

Nach erneutem sechsmaligem Waschen wurden die Membranen für 5 min mit Entwicklungslösung behandelt, bevor sie ausgelesen wurden. Das resultierende Bild wurde mit der geräteeigenen Software Kodak Digital Science 1D analysiert. Im Folgenden (s. Tabelle 2.3, 2.4, 2.5) werden die eingesetzten Antikörper und ihre Verdünnungen aufgeführt.

**Tabelle 2.3:** Für Immunoassays verwendete PrimärAK

<b>Antigen</b>	<b>Spezies</b>	<b>Hersteller/ Referenz</b>
Actin	Kaninchen	Sigma-Aldrich
Adipophilin	Maus	PROGEN
Apolipoprotein 1	Kaninchen	SantaCruz Biotechnology
Atg12	Kaninchen	Abgent
Atg12	Kaninchen	Zytomed
Atg3	Kaninchen	Abgent
Atg4	Kaninchen	Abgent
Atg5	Maus	Abnova
Atg7	Kaninchen	Abgent
Atg7	Kaninchen	Rockland
Atg8	Maus	Medical & Biological Laboratories
Atg8	Kaninchen	Abgent
Beclin-1	Kaninchen	Cell Signaling Technology
$\beta$ -2-Mikroglobulin	Kaninchen	DakoZytomation
Carboanhydrase IX (CA9)	Kaninchen	SantaCruz Biotechnology
cMET	Kaninchen	Cell Signaling Technology
Cyclin D1	Maus	Cell Signaling Technology
EGFR	Kaninchen	Cell Signaling Technology
Erk, p44/42 MAP Kinase	Kaninchen	Cell Signaling Technology
GAPDH	Kaninchen	Abcam
Guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3	Ziege	SantaCruz Biotechnology
Harmonin	Ziege	SantaCruz Biotechnology
Histone deacetylase	Kaninchen	Cell Signaling Technology
Histone H3	Kaninchen	Cell Signaling Technology
HLA-A (HCA2)	Maus	H.L.Ploegh, USA
HLA-B, -C (HC10)	Maus	H.L.Ploegh, USA
HLA-DR (L243)	Maus	ATCC HB-55
IGFBP3 (H-98)	Kaninchen	SantaCruz Biotechnology
JNK/SAPK	Kaninchen	Cell Signaling Technology
Ki67	Kaninchen	SantaCruz Biotechnology
Matrix Metalloprotease 7 (Matrilysin)	Kaninchen	LabVision
Matrix Metalloprotease 7 (Matrilysin)	Maus	R&D
Matrix Metalloprotease 7 (Matrilysin)	Maus	oncogene
Matrix Metalloprotease 7 (Matrilysin)	Maus	US Biological
mTOR	Kaninchen	Cell Signaling Technology

Tabelle 2.3 – Fortsetzung

Antigen	Spezies	Hersteller/ Referenz
Muc-1	Maus	Chemicon
Nicotinamide N-methyltransferase	Maus	Abnova
phospho-ERK	Kaninchen	Cell Signaling Technology
phospho-JNK	Kaninchen	Cell Signaling Technology
phospho-mTOR (Ser2448)	Kaninchen	Cell Signaling Technology
phospho-mTOR (Ser2481)	Kaninchen	Cell Signaling Technology
RecQL1 (H-110)	Kaninchen	SantaCruz Biotechnology
Regulator of G-protein signalling 1	Kaninchen	SantaCruz Biotechnology
Regulator of G-protein signalling 5	Ziege	SantaCruz Biotechnology
SAP130	Ziege	Abcam
Survivin	Maus	Cell Signaling Technology
Ubiquitin D	Kaninchen	Chemicon
Vimentin	Maus	Chemicon
WIPI	Maus	Abnova
WIPI	Kaninchen	Tassula Proikas-Cezanne
Zytokeratin-18	Maus	Chemicon

Tabelle 2.4: Für Immunoassays verwendete Sekundärantikörper

Spezifität	Spezies (Isotyp)	Konjugation	Hersteller	Anwendung
Kaninchen IgG	Ziege (IgG)	HRP	Jackson Dianova	Western Blot
Maus IgG	Ziege (IgG)	HRP	Jackson Dianova	Western Blot
Ziege IgG	Esel (IgG)	HRP	Jackson Dianova	Western Blot
Kaninchen IgG	Ziege (IgG)	Alexa 647	Molecular Probes	Protein-Mikroarray
Maus IgG	Ziege (IgG)	Alexa 647	Molecular Probes	Protein-Mikroarray
Ziege IgG	Ziege (IgG)	Alexa 647	Molecular Probes	Protein-Mikroarray

Tabelle 2.5: Für Immunoassays eingesetzte Antikörperkonzentrationen

Antigen	Verdünnung/ Konzentration Western Blot	Verdünnung/ Konzentration Protein- Micorarray
<b>Primärantikörper</b>		
Actin		1:1000
Adipophilin	1:1000	1:500
Apolipoprotein 1	1:100, 1:200, 1:1000	
Atg12, Abgent	1:500	



Tabelle 2.5 – Fortsetzung

<b>Antigen</b>	<b>Verdünnung/ Konzentration Western Blot</b>	<b>Verdünnung/ Konzentration Protein- Micorarray</b>
Atg12, Invitrogen	1:100	1:100
Atg3	1:500	1:250
Atg4	1:500	1:250
Atg5	1:1000	1:500
Atg7, Abgent	1:500	
Atg7, Rockland	1:2000	
Atg8, Abgent	1:100	1:250
Atg8, MBL	1:1000	1:500
Beclin-1	1:1000	1:500
$\beta_2$ Mikroglobulin		1 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Carboanhydrase IX (CA9)		1:200
cMET		1:200
Cyclin D1	1:2000	1:1000
EGFR		1:500
Erk		1:500
GAPDH	1:20000	
Guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3	1:1000	
Harmonin		1:200
Histone deacetylase	1:1000	1:1000
Histone H3	1:1000	
HLA-A (HCA2)		0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$
HLA-B, -C (HC10)		1 $\mu\text{g}/\text{ml}$
HLA-DR (L243)		1:200
IGFBP3 (H-98)		1:200
JNK		1:500
Ki67		1:200
Matrix Metalloprotease 7 (R&D)	1:500	
Matrix Metalloprotease 7 (oncogene)	1:1000	
Matrix Metalloprotease 7 (USBiological)	1:1000	
Matrix Metalloprotease 7 (Labvision)	0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	
mTOR	1:1000	1:500
Muc-1	1:100	1:200
Nicotinamide N-methyltransferase		1:500
phospho-ERK		1:500
phospho-JNK		1:500
phospho-mTOR (Ser2448)	1:1000	1:500

Tabelle 2.5 – Fortsetzung

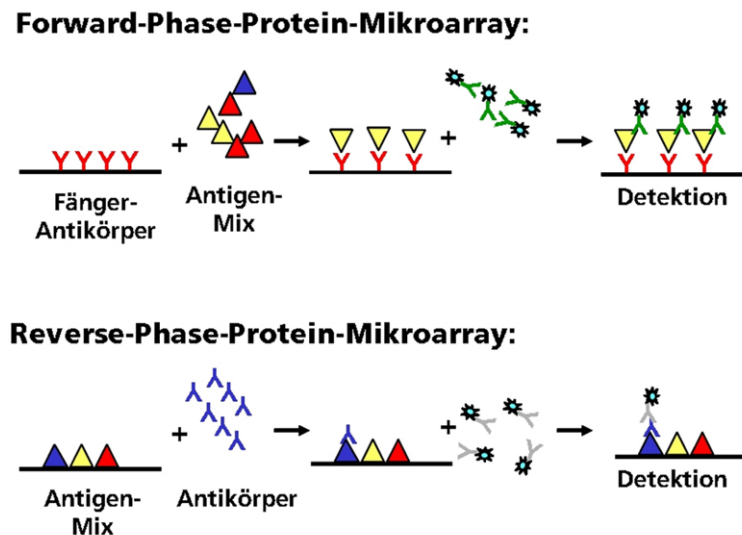
<b>Antigen</b>	<b>Verdünnung/ Konzentration Western Blot</b>	<b>Verdünnung/ Konzentration Protein- Micorarray</b>
phospho-mTOR (Ser2481)	1:1000	
RecQL1 (H-110)		1:500
Regulator of G-protein signalling 1	1:200, 1:1000	1:500
Regulator of G-protein signalling 5	1:1000	1:500
SAP130		1:500
Survivin		1:500
Ubiquitin D	1:1000	
Vimentin	1:1000	1:1000
WIPI, Abnova	1:1000	1:500
WIPI, T. Proikas-Cezanne	1:5000	
Zytokeratin-18		1:500
<b><u>Sekundärantikörper</u></b>		
anti-Kaninchen IgG-HRP	1:2000	
anti-Maus IgG-HRP	1:5000	
anti-Ziege IgG-HRP	1:5000	
anti-Kaninchen IgG (Fc-spezifisch)-Alexa 647		1:500
anti-Maus IgG (Fc-spezifisch)-Alexa 647		1:500
anti-Ziege IgG (Fc-spezifisch)-Alexa 647		1:500

### 2.5.6 Protein-Mikroarray-Technologie

Im Vergleich zu DNA-Mikroarray-Technologien gibt es einige Faktoren, die die Entwicklung von Protein-Mikroarray-Technologien erschweren: 1. Proteine sind strukturell und funktionell komplexer, 2. Proteine zeigen eine größere Interaktionsbandbreite auf, 3. Proteine können nicht wie DNA vervielfältigt werden, 4. Proteine sind zum großen Teil co- oder posttranslational modifiziert. Trotzdem ist es mittlerweile möglich, mit den etablierten Technologien in einem einzigen Experiment gleichzeitig mehrere Parameter im Hochdurchsatz-Verfahren und bei gleichzeitig sehr geringen Mengen an eingesetzter Probe zu untersuchen. Die Protein-Mikroarray-Technologie dient sowohl der Expressions- und funktionellen Analyse als auch der Quantifizierung von Proteinen.

Es gibt zwei unterschiedliche Arten von Protein-Mikroarrays: Forward- und Reverse-Phase-Protein-Mikroarrays.

- Bei Forward-Phase-Protein-Mikroarrays (FPPMs) werden hochaffine Fängermoleküle (z.B. Antikörper) auf einer festen Phase (z.B. auf einer modifizierten Glasoberfläche) immobilisiert und mit der zu analysierenden Probe inkubiert. Die Fluoreszenz-basierte Detektion wird mit Hilfe eines zweiten Fängermoleküls gegen den gleichen Analyten durchgeführt. Vorteil dieser Methode ist die große Analytenmenge, die in der eingeschränkten Probenmenge analysiert werden kann.



**Abbildung 2.1:** Schematischer Aufbau von Forward-Phase- und Reverse-Phase-Protein-Mikroarrays. Protein-Mikroarrays können in zwei unterschiedlichen Formaten aufgebaut werden. Bei Forward-Phase-Protein-Mikroarrays werden Fänger-moleküle (z.B. Antikörper) auf Substraten (auch Glasobjektträger genannt) immobilisiert und mit der zu untersuchenden Probe inkubiert. Der Detektionsschritt erfolgt durch Verwendung eines zweiten Antigen-spezifischen Antikörpers, der mit einem Fluoreszenz-basierten Detektionssystem gekoppelt ist und unter Ausbildung eines Immunosandwich die Erkennung des Analyts ermöglicht. Bei Reverse-Phase-Protein-Mikroarrays werden die Proteinlösungen direkt auf das Substrat aufgebracht und der Analyt über ein Antigen-spezifisches Fängermolekül untersucht. Die Detektion erfolgt hier über einen Spezies-spezifischen, Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper. Abbildung nach Stefan Kramer [299]

- Bei den Reverse-Phase-Protein-Mikroarrays (RPPMs) werden die zu analysierenden Proben auf der festen Phase immobilisiert und dann mit den Fängermolekülen inkubiert. In diesem Fall erfolgt die Detektion über Fluorochrom-markierte Fängermoleküle, die gegen die primären Fängermoleküle gerichtet sind. Vorteil dieser Methode ist die große Probenmenge, die untersucht werden kann und der Einsatz nur eines einzigen Analyt-spezifischen Fängermoleküls.

In Abbildung 2.1 ist schematisch der Aufbau beider Formate dargestellt.

Eingesetzt wurden in dieser Doktorarbeit RPPMs.

### 2.5.6.1 Verwendetes Gewebe für Proteinmikroarrays

Zelllysate wurden aus den gleichen Zelllinien und Geweben gewonnen wie unter 2.5.2.2 erwähnt.

### 2.5.6.2 Herstellung des Zelllysats für Proteinmikroarrays

Die Lyse der schockgefrorenen Gewebe erfolgte unter ständiger Kühlung aller Materialien durch flüssigen Stickstoff. Mit Hilfe von Mörser und Pistill wurden von den Gewebeproben Bruchstücke mit einer Masse von 8 - 80 mg abgeschlagen, in vorgekühlten Kryoröhrchen eingewogen und in flüssigem Stickstoff bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. Die Gewebepulverisierung erfolgte im Mikrodismembrator. Dazu wurde jedem Gewebestück im Kryoröhrchen eine Edelmahlkugel zugegeben. Die Kryoröhrchen wurden in den vorgekühlten Mikrodismembratoreinsatz eingesetzt und darin für 1,5 min bei 2000 rpm

im Mikrodismembrator geschüttelt. Anschließend wurde den Proben CLB1-Lysepuffer zugegeben. Die  $\mu\text{l}$ -Menge an Lysepuffer ergab sich aus der Masse der Bruchstücke multipliziert mit dem Faktor 8. Die Lyse erfolgte für 30 min bei RT auf einem Taumelroller. Nach Überführung der Lysate in neue Reaktionsgefäße wurde zur Entfernung von Zell-/ Gewebetrümmern zentrifugiert (13000 rpm; RT; 5 min, Eppendorf Centrifuge 5415R). Sowohl Pellets als auch Überstand-Aliquots wurden bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Lyse der Zellpellets wurde eine ungefähre Proteinkonzentration von 0,2 ng Protein/ Zelle vorausgesetzt. Es wurde jeweils soviel CLB1-Lysepuffer eingesetzt, dass eine theoretische Proteinkonzentration von 8-12 mg Protein/ml Lysat erreicht wurde. Die weiteren Lyseschritte erfolgten analog zur Gewebelyse.

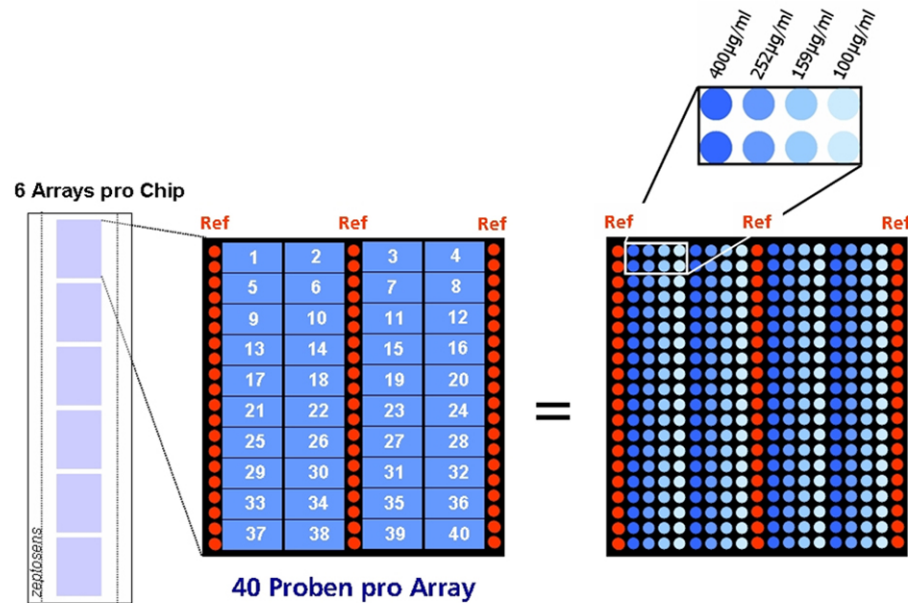
### 2.5.6.3 Herstellung von Protein-Mikroarrays

Zellysate wurden bei RT mit CLB1-Lysepuffer in einer 96-well-Platte jeweils auf eine Konzentration von 4 mg/ml verdünnt. Mit Hilfe eines Pipettierroboters wurden die Proben 1:10 mit CSBL1-Druckpuffer verdünnt. Anschließend wurden die Proben in eine 384-well-Platte (Greiner) transferiert, wobei jede Probe mit CLB2 (10% CLB1, 90% CSBL1, Zeptosens) in 4 Verdünnungen mit den Konzentrationen 0,4 - 0,252 - 0,159 - 0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  jeweils in 25  $\mu\text{l}$ -Duplikaten überführt wurde. Anschließend wurden die Proben in der 384-well-Platte für 30 min bei  $20^{\circ}\text{C}$  mit 1400 rpm auf dem Thermomixer inkubiert, bevor sie bis zur weiteren Verarbeitung bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden.

Alexa647-markierte BSA-Referenzen wurden für jeden Druck frisch angesetzt aus 14  $\mu\text{l}$  CLB1-Lysepuffer, 4  $\mu\text{l}$  acetyliertem BSA (10 mg/ml in  $\text{H}_2\text{O}$ ), 180  $\mu\text{l}$  CSBL1-Druckpuffer und 2  $\mu\text{l}$  BSA-Alexa647 (1:1000 verdünnt mit PBS, 0,005%  $\text{NaN}_3$ ). Jeweils 30  $\mu\text{l}$  der Referenz wurden in zwei leere wells der 384-well-Probenplatte pipettiert.

Alle folgenden Schritte fanden unter Reinraumbedingungen (Klasse 100) bei konstant gehaltener Luftfeuchtigkeit (65%) und  $20^{\circ}\text{C}$  statt. Die 384-well-Probenplatte sowie die gewünschte Anzahl an Zeptosens-Mikroarray-Substraten wurde in das Nanoplotter-System eingesetzt. Dieses Nanoplotter-System ist ein piezoelektrisches Mikrodosiersystem, ein sogenannter Mikroarrayer, mit dessen Hilfe die Proben in der in Abbildung 2.2 festgelegten Probenanordnung auf die Träger gespottet wurden. Der Spot-Durchmesser betrug 160  $\mu\text{m}$  und umfasste ca. 0,4 nl Probenvolumen. Der Abstand zwischen den einzelnen Spots betrug in x-Dimension 280  $\mu\text{m}$  und in y-Dimension 300  $\mu\text{m}$ . Es waren entweder 40 Proben in sechs identischen Subarrays oder 80 Proben in 3x zwei identischen Subarrays angeordnet, wobei jede Probe in Duplikaten mit 4 Verdünnungsstufen mit konstantem Verdünnungsfaktor gespottet wurde. Die Signale aller acht Spots wurden zur Auswertung einer Probe herangezogen und miteinander verrechnet. Zusätzlich wurden in jedem Subarray drei Spalten mit der Referenz für die Verrechnung der Laserlicht-Abschwächung bei der Fluoreszenzdetektion gespottet. Das Prinzip der planaren Wellenleitertechnologie, bei der die Laserlicht-Abschwächung auftritt, wird in Abschnitt 2.5.6.6 erläutert. Zur Beobachtung der Druckqualität wurde weiterhin ein mit Gelbpapier bedeckter Träger bedruckt.

Im Anschluss an den Druck wurden die Zeptosens-Mikroarray-Substrate für 1 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  gelagert, bevor sie mit Hilfe eines Ultraschallverneblers für 30 min bei RT blockiert wurden. Die Mikroarray-Substrate, die für die Antikörper-Inkubation bestimmt waren, wurden mit Zeptosens-Blockierungspuffer (ZSBB, 3% (w/v) BSA in ZSAB (Zeptosens-Assaypuffer, 50 mM Imidazol, 0,15 M NaCl, 0,005% NaAzid, pH 7,4) benetzt. Die Mikroarray-Substrate, die zur Proteinbestimmung herangezogen werden sollten, wurden mit ZSBB(T20) (1% (v/v) Tween20 in ZSAB) blockiert. Anschließend wurden die bedruckten



**Abbildung 2.2:** Probenanordnung der in dieser Arbeit untersuchten Proteinlösungen auf einem Zeptosens-Mikroarray-Substrat. Ein Mikroarray-Substrat (in der Abbildung links als Chip dargestellt) beinhaltet 6 Sub-Arrays, in denen 40 Proben angeordnet werden. Jede Probe wird in Duplikaten in 4 verschiedenen Verdünnungsstufen (Konzentrationen im rechten, oberen Teil der Abbildung angegeben) immobilisiert. Die in rot dargestellten Spots („Ref“) repräsentieren die BSA-Cy5-haltigen Referenzspots zur Berechnung der Abschwächung des Laserlichts im evaneszenten Feld. Abbildung nach Stefan Kramer [299]

und blockierten Träger mit  $H_2O$  gespült, mit  $N_2$  trockengeblasen und bis zur weiteren Verwendung lichtgeschützt und trocken bei  $4^\circ C$  gelagert.

#### 2.5.6.4 Anfärbung von Proteinen auf Mikroarray-Substraten

Die Proteinbestimmung und die Antikörper-Inkubation der Zeptosens-Mikroarray-Substrate wurde bei RT in speziellen Halterungsvorrichtungen (ZeptoCARRIER) durchgeführt. In den Carriern konnten immer jeweils sechs Träger gleichzeitig behandelt werden. Auf die bedruckte Seite der Träger wurden Flusszellen gelegt, an deren Unterseite O-Ringe jeden der Mikroarray-Subarrays dicht abschloss, so dass jeder Subarray über Öffnungen in der Flusszelle individuell mit Puffern und Antikörper-Lösungen befüllt werden konnte.

Um auf Mikroarray-Substraten immobilisierte Proteine mit einem Fluorophor zu markieren, wurde jede Inkubationskammer mit je  $100 \mu l$  NHS-Alexa647 (0,83 mg/ml) für 30 min bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Zuvor wurden die Subarrays mit je  $100 \mu l$  ZSBB(BSA,T20) (5% BSA, 0.1% Tween in ZSAB, pH 7.4) gewaschen und rehydriert. Über eine Absaugvorrichtung wurde der Puffer wieder entfernt. Mit dem gleichen Puffer wurde nach der Inkubation mit dem NHS-Alexa647-Farbstoff je 3x mit  $100 \mu l$  gewaschen, bevor die Träger ausgelesen wurden.

#### 2.5.6.5 Assaysysteme auf Mikroarray-Substraten

In einem ersten Schritt wurde den Subarrays je 100  $\mu\text{l}$  ZSBB(BSA,T20) zur Rehydrierung zugegeben und gleich wieder abgesaugt. Anschließend wurden die Kammern mit 120  $\mu\text{l}$  Primärantikörper-Lösung (Verdünnungen s. 2.5 in ZSBB(BSA,T20)) befüllt und über Nacht bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Danach wurden die Subarrays zweimal mit je 100  $\mu\text{l}$  ZSBB(BSA,T20) gewaschen, wobei zwischen allen Schritten die Lösungen wieder abgesaugt wurden. Die Sekundärantikörper-Inkubation verlief mit anschließendem Waschen analog zur Primärantikörper-Inkubation, jedoch nur für 45 min. Zum Schluss wurden alle Subarrays zum Auslesen mit je 100  $\mu\text{l}$  ZSBB(BSA,T20) befüllt.

#### 2.5.6.6 Verfahren zur Fluoreszenzdetektion von planaren Protein-Mikroarrays

Für das Auslesen wurde der ZeptoCARRIER in den ZeptoREADER eingelegt. In diesem Gerät wurden die Mikroarray-Substrate mit Hilfe der planaren Wellenleitertechnologie (Planar Waveguide (PWG) oder Evaneszent-Feld-Technologie) ausgelesen. Bei dieser Technologie wird monochromatisches Licht über ein Beugungsgitter in eine 150 - 300 nm dünne, transparente und hochbrechende Schicht aus Tantalpentoxid ( $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ) eingekoppelt, die auf einem Mikroarray-Substrat aus Glas (niedrigerer Brechungsindex) aufgebracht ist [144, 417]. Alle Biomoleküle (Antigen + Primärantikörper + Fluorophor-gekoppelter Sekundärantikörper), die sich auf der Träger-Oberfläche innerhalb des evaneszenten Feldes befinden, werden vom Laserlicht angeregt. Zur Fluoreszenzangeregung ist der ZeptoREADER mit Laserlichtquellen bei 635 nm („rot“) und 532 nm („grün“) ausgestattet. Ausgelesen wurde bei jedem Subarray zunächst ein Kontrollbild ohne Anregung bei einer Graufiltereinstellung von 0,01 und einer Belichtungszeit von 0,3 sek. Anschließend wurden mehrere Bilder bei 635 nm mit Graufilterstufen von 0,5 bis 1 und einer schrittweisen Verdopplung der Belichtungszeiten von 0,5 - 16 sek gemacht. Die Fluoreszenz-Signale wurden als Vollbild durch eine CCD-Kamera im ZeptoREADER aufgenommen und als 16-bit-Tiff-Datei abgespeichert.

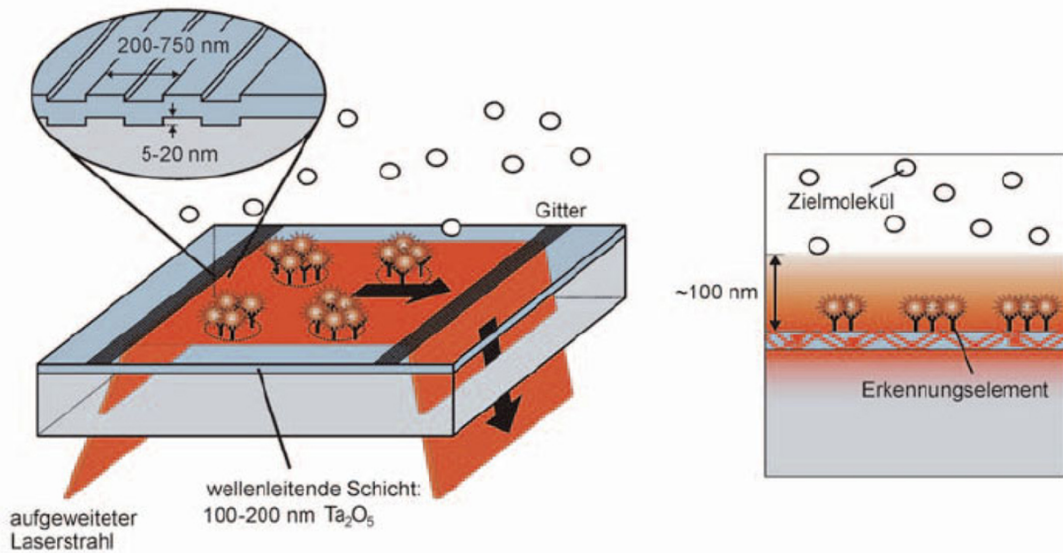
#### 2.5.6.7 Datenanalyse und statistische Verfahren

Die Bildanalyse und Auswertung erfolgte mit der Auswertungs-Software ZeptoVIEW. Zur Erleichterung der bildhaften Analyse wurden zu jedem Subarray Falschfarbenbilder generiert. Dazu wurden die 16-bit Tiff-Dateien auf 8-bit Tiff-Dateien komprimiert und auf eine Falschfarben-Skala bezogen (siehe Abbildung 2.4).

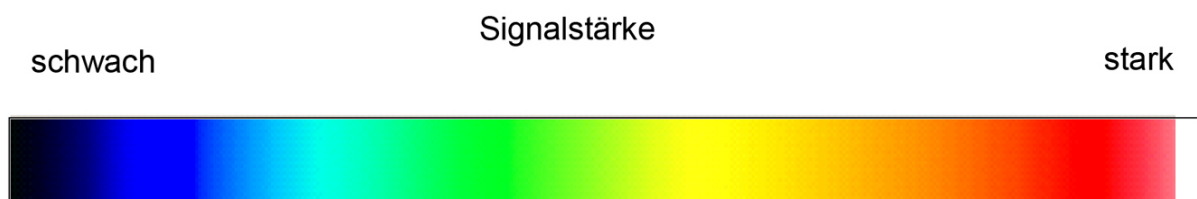
Für jeden Analysepunkt (Spot) wurde der Mittelwert der relativen Fluoreszenzeinheiten (MFU, median fluorescence units) gebildet. Dann wurde mit Hilfe der Referenz-Signale die Laserlicht-Abschwächung bei der Fluoreszenzdetektion berechnet und dieser Faktor auf die Probensignalwerte umgerechnet. Anschließend wurden die Mittelwerte der referenzierten Signalwerte von allen acht Spots einer Probe gebildet. Diese Berechnungen wurden für die Protein- als auch für die Antikörper-Detektionssignale aufgestellt, bevor zum Schluss die Antikörper-Detektionssignale auf die dazugehörigen Protein-Detektionssignale normiert werden konnten.

#### 2.5.6.8 Bestimmung der Fehlerfortpflanzung

Bei der Bestimmung der proteinnormierten Signale der Zell- oder Gewebeproben wurden verschiedene fehlerbehaftete Größen miteinander verrechnet. Deshalb war es notwendig, den resultierenden Fehler



**Abbildung 2.3:** Schematischer Aufbau eines Dünnschichtwellenleiters mit Verlauf des Laserstrahls (PWG-Technologie). Das über ein Beugungsgitter auf der linken Seite des Zeptosens-Mikroarray-Substrats eingekoppelte Laserlicht läuft in einem sich bildenden, evaneszenten Feld in einer wellenleitenden Schicht (Dicke ca. 100-300 nm) aus Tantalpentoxid zum rechten Beugungsgitter und wird dort ausgekoppelt (linker Teil der Abbildung). Nur Erkennungselemente (Fluorophore), die innerhalb des evaneszenten Feldes lokalisiert sind, werden vom Laserlicht angeregt und über eine geräteinterne CCD-Kamera (im ZeptoREADER, Zeptosens) gemessen (rechter Teil der Abbildung). (Abbildung verändert nach Pawlak et al. 2002) [418]



**Abbildung 2.4:** Falschfarbenskala. Die Übersetzung starker Assay-Signale in eine so genannte Falschfarbe ergibt weiße bzw. rote Farben, schwache Signale ergeben blaue bzw. grüne Farben.

durch die Fehlerfortpflanzung zu ermitteln. Um den Einfluss einer fehlerbehafteten Größe  $x$  auf das Endergebnis zu ermitteln, wird das Endergebnis als Funktion der fehlerbehafteten Größe betrachtet, nach dieser abgeleitet und mit dem absoluten Fehler der fehlerbehafteten Größe multipliziert:

$$y = y(x) \Rightarrow \Delta y = \left| \frac{dy}{dx} \right| \cdot \Delta x$$

Sobald mehrere fehlerbehaftete Größen  $x_i$  auf das Endergebnis einwirken, müssen deren Einflüsse quadratisch addiert werden:

$$y = y(x_1, x_2, \dots, x_n) \Rightarrow \Delta y^2 = \sum_{i=1}^n \left( \frac{y}{x_i} \right)^2 \cdot \Delta x_i^2 \Rightarrow \Delta y = \sqrt{\sum_{i=1}^n \left( \frac{y}{x_i} \right)^2 \cdot \Delta x_i^2}$$

Bei dieser Berechnung wird allerdings davon ausgegangen, dass die Fehler der verschiedenen Größen  $x_i$  sich nicht gegenseitig beeinflussen.

### 2.6 Modifizierung von Peptiden

Um mittels Massenspektrometrie (s. Abschnitt 2.7.2) eine relative Quantifizierung der analysierten Peptide vornehmen zu können, wurden die  $\alpha$ -Aminogruppen der Peptide mit NicNHS-Ester modifiziert (s. Abbildung 2.5). Es konnten immer nur zwei Peptidgemische miteinander verglichen werden, von denen das eine mit  $^1\text{H}_4$ -NicNHS-Ester (NIC), das andere mit  $^2\text{D}_4$ -NicNHS-Ester (dNIC) modifiziert wurde. Auf diese Weise wiesen Peptide der einen Gruppe immer eine Massendifferenz von 4 Da zu identischen Peptiden der anderen Gruppe bei gleicher Retentionszeit in der vorgeschalteten HPLC auf. Damit bei der Modifizierung der  $\alpha$ -Aminogruppen nicht auch gleichzeitig die  $\epsilon$ -Aminogruppen von Lysinresten nicotinyliert wurden, mussten diese zuvor mit einem Guanidin-Rest versehen werden.

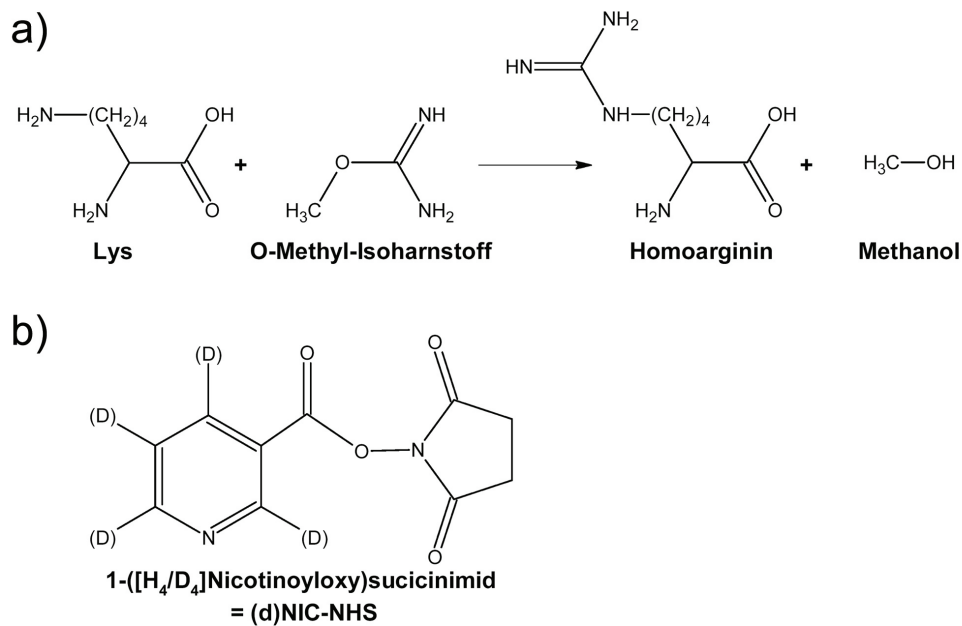
#### 2.6.0.9 Selektive Guanidierung der $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysinresten in Peptiden

Die zu guanidinylierenden lyophilisierten Peptide wurden zunächst in 500  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen, und die Peptidlösung mittels 10 M NaOH auf pH 10,5 gebracht. Der pH wurde mit pH-Papier überprüft. Dann wurden 92  $\mu\text{l}$  GUA-Reagenz (100 mg O-Methyl-Isoharnstoff-Hemisulfat in 102  $\mu\text{l}$  dd $\text{H}_2\text{O}$ ; Endkonzentration 1,1 M) zugegeben. Die Guanidierung fand für 10 min bei 65°C statt. Gestoppt wurde die Reaktion durch pH-Reduzierung auf pH 3-4 mit 11  $\mu\text{l}$  konzentrierter Ameisensäure.

#### 2.6.0.10 Nicotinylierung der $\alpha$ -Aminogruppe von guanidinylierten Peptiden

Die N-terminale Nicotinylierung der guanidinylierten Peptide fand auf zentrifugentauglichen Säulchen statt, die mit C-18-reversed-phase-Säulenmaterial gefüllt waren. Nach jedem der im folgenden genannten Schritte wurden die Säulchen bei RT mit 2000 rpm für 15 sec zentrifugiert (Biofuge fresco). Das Säulenmaterial wurde zunächst je dreimal mit 200  $\mu\text{l}$  Elutionslösung (50% AcN, 1% Ameisensäure) aktiviert und dann je dreimal mit 200  $\mu\text{l}$  dd $\text{H}_2\text{O}$ , 0,1% TFA (v/v) äquilibriert. Anschließend wurden die guanidinylierten Peptide in drei 200  $\mu\text{l}$ -Portionen auf die Säulchen geladen. Nach dem Laden der Probe wurden die Säulchen je dreimal mit 200  $\mu\text{l}$  dd $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen, bevor die eigentliche Nicotinylierung stattfand. Diese wurde durch Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  der jeweiligen  $^1\text{H}_4$ - bzw.  $^2\text{D}_4$ -NicNHS-Ester-Lösung durchgeführt, wobei - anstelle des Zentrifugationsschrittes - die Säulchen auf gekappte 1 ml-Spritzen





**Abbildung 2.5:** a) Modifizierung von Lysin mit O-Methyl-Isoharnstoff. b) Strukturformel von (d)NIC. Abbildung nach A. Weinzierl [626]

gesteckt wurden und mit Hilfe des Kolbens alle 1,5 min je 50  $\mu\text{l}$  Lösung aus den Säulchen gesaugt wurden. Danach fanden wieder drei Waschgänge statt. Um eventuelle Bindungen zwischen dem Nic-Ester und Tyrosinresten zu lösen, wurden erneut je 500  $\mu\text{l}$  50%ige Hydroxylamin-Lösung auf die Säulchen gegeben und wieder mit Hilfe der Spritzen-Konstruktion in 1 min-Schritten eluiert. Nach weiteren drei Waschgängen wurden die modifizierten Peptide je viermal mit 50  $\mu\text{l}$  Elutionslösung eluiert und die Eluate gepoolt.

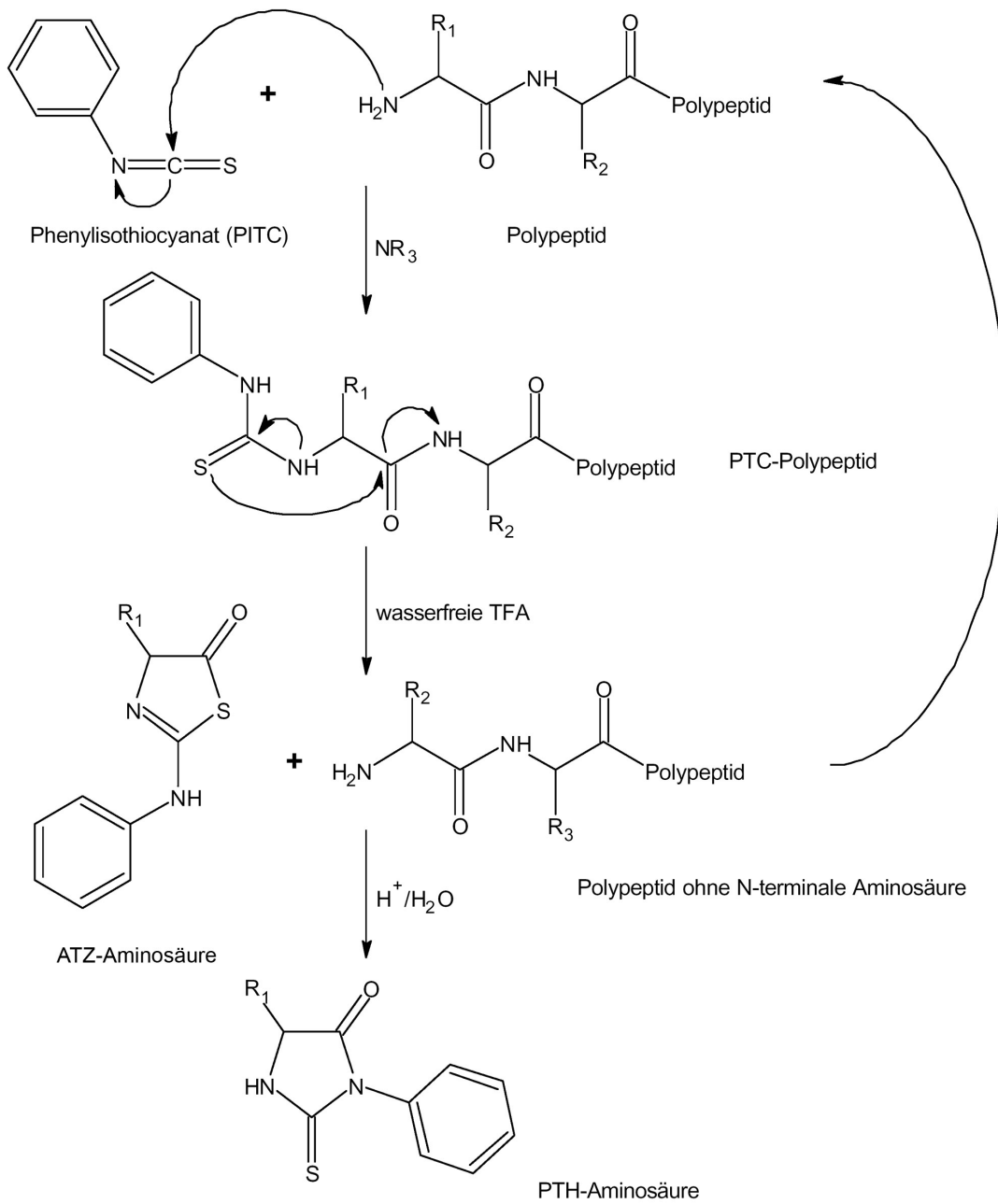
Für die massenspektrometrische Analyse wurden jeweils frisch modifizierte Peptide eingesetzt. Damit eine relative Quantifizierung durch den Vergleich zweier Proben möglich war, mussten die Proben in gleichen Verhältnissen eingesetzt werden. Die dazu nötige Konzentrationsbestimmung fand durch Absorptionmessung bei 260 nm statt.

## 2.7 Analytische Methoden

### 2.7.1 Sequenzanalyse und Quantifizierung von Peptiden durch Edman-Abbau

Der Edman-Abbau ist eine zyklische Reaktionskette zur Sequenzierung und Quantifizierung von Peptiden und Proteinen. Dazu wird pro Reaktionszyklus eine Aminosäure vom N-Terminus abgespalten und detektiert. Der Edman-Sequenzierung liegen folgende drei Reaktionen zu Grunde: Kupplung, Spaltung und Konvertierung [148].

Bei der Kupplung kommt es zu einem nukleophilen Angriff der  $\alpha$ -Aminogruppe des N-Terminus am positivierten Kohlenstoff der Isothiocyanatgruppe von Phenylisothiocyanat; es entsteht ein PTC-Peptid (Phenylthiocarbamoylpeptid). Damit das Elektronenpaar des N-terminalen Stickstoffs in freier, unprotonierter Form vorliegt, muss diese Reaktion unter alkalischen Reaktionsbedingungen stattfinden. Unter



**Abbildung 2.6:** Reaktionsschema der Edman-Sequenzierung. PTC: Phenylthiocarbonyl, ATZ: Anilinothiazolinon, PTH: Phenylthiohydantoin. Darstellung nach A. Weinzierl [626]

Absenkung des pH-Wertes mit Hilfe von wasserfreier TFA kommt es zu einem intramolekularen nukleophilen Angriff des Schwefels an der Carbonylgruppe der ersten Peptidbindung und damit zum zweiten Schritt, der Abspaltung. Es resultieren eine um eine Aminosäure gekürzte Peptidkette und eine ATZ (Anilinothiazolinon)-Aminosäure, die durch hydrophobe Extraktion vom Restpeptid abgetrennt wird. Im dritten Schritt, der Konvertierung, wird mit wässriger Säure die instabile ATZ-Aminosäure zur stabilen PTH-Aminosäure konvertiert. Die restliche Peptidkette steht einem erneuten Abbau-Zyklus zur Verfügung.

Im Anschluss an die Konvertierung werden die PTH-Aminosäuren chromatographisch getrennt (hier über Reversed-Phase-HPLC) und ihre Absorption bei 269 nm gemessen. Im Vergleich mit den Retentionszeiten einer Referenzprobe, die die PTH-Derivate aller bekannten Aminosäuren enthält, werden die PTH-Aminosäuren identifiziert und über die Peakhöhe ihrer Absorption quantifiziert. Die Nachweisgrenze bei Edmansequenzierungen liegt im Picomolbereich.

Prinzipiell ist eine Quantifizierung der PTH-Aminosäuren durch Integration des zur Aminosäure gehörenden UV-Absorptions-Peaks und durch Verrechnung der Hintergrund-Signale vorheriger Abbauzyklen möglich. Jedoch muss dabei bedacht werden, dass Aminosäuren mit funktionellen Gruppen in der Seitenkette durch Nebenreaktionen bei der PTH-Aminosäure-Erzeugung schlechtere Ausbeuten erzielen als Aminosäuren mit aliphatischen Seitenketten. Andererseits können Hintergrundsignale und der „Lag“-Effekt durch unsynchrone Reaktionsschritte die Quantifizierung verfälschen.

### 2.7.2 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie dient der Bestimmung von Molekülmassen. Dafür werden bei allen massenspektrometrischen Methoden die folgenden drei Schritte durchlaufen: Ionisierung der Proben in der Ionenquelle, Auftrennung der Ionen im Hinblick auf ihr Masse/ Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) im Massenanalysator und Detektion der Ionen im Detektor, der die Informationen in ein Massenspektrum umwandelt.

Um von großen, nicht flüchtigen Biomolekülen Ionen zu bilden, ohne sie dabei zu zerstören, braucht man besonders schonende Ionisierungsmethoden. Dazu zählen die *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation* (MALDI), bei der die Probe mit Photonen beschossen wird, oder die *Electrospray Ionisation* (ESI), die Ionen durch Versprühen der Probe im elektrischen Feld erzeugt. Diese beiden Methoden sind die am häufigsten eingesetzte Ionisierungstechniken bei der Peptid- und Proteinanalytik in der Massenspektrometrie.

Die Auftrennung der Ionen im Analysator kann wiederum durch verschiedene Methoden erfolgen. Quadrupolinstrumente beispielsweise trennen Ionen im Hochfrequenzfeld. Hier stehen vier stabförmige Metallelektroden parallel zueinander und bilden einen Massenfilter, indem sie ein kombiniertes Wechsel- und Gleichspannungsfeld aufbauen, durch das nur Ionen definierter  $m/z$ -Verhältnisse zum Detektor durchgelassen werden. *Time of flight (TOF)*-Instrumente dagegen trennen Ionen nach ihrer Flugzeit im Hochvakuum eines Messrohres auf. Dazu werden die Ionen zuvor auf die gleiche kinetische Energie beschleunigt, bevor sie in eine feldfreie Driftstrecke eintreten, in der sie aufgrund verschiedener  $m/z$ -Werte verschiedene Geschwindigkeiten erreichen.

Zur Detektion werden Sekundärelektronenvervielfacher eingesetzt. Hier erzeugt der auf die Konversionsdynode auftreffende Ionenstrom einen Sekundärionenstrom, der seinerseits durch eine Elektronenkaskade an weiteren Dynoden verstärkt wird.

Im Gegensatz zur Edman-Sequenzierung liegt die Nachweisgrenze massenspektrometrischer Verfahren im Femtomolbereich oder darunter.

### 2.7.2.1 Elektrospray-Ionisation

Bei der Elektrospray-Ionisation wird die Analytlösung durch eine enge Kapillare kontinuierlich in ein elektrisches Feld versprüht. An die Kapillare wird ein hohes Potential (1000-2000 V) angelegt, das für eine Potentialdifferenz zwischen der Kapillare und dem Eingang des Massenspektrometers sorgt. Durch das starke elektrische Feld wird die Analytlösung in ein Spray aus kleinen geladenen Tröpfchen umgewandelt, die entlang des Potential- und Druckgradienten durch einen senkrecht zur Flugrichtung stehenden geheizten Stickstoffstrom (*curtain gas*) in den Analysator des Massenspektrometers wandern. Das *curtain gas* hat die Aufgabe, eine Zone hohen Drucks aufzubauen, wodurch verhindert werden soll, dass auch Neutralteilchen in das Hochvakuum des Massenspektrometers gesaugt werden. Durch Lösungsmittelverdunstung und „Coulomb-Explosionen“ werden die Tröpfchen auf dem Weg zum Analysator immer kleiner [28, 270, 635]. Der Übergang der Ionen in die Gasphase beruht auf vier Schritten: der Bildung kleiner geladener Tröpfchen aus Elektrolyten, der Zunahme an Ladungsdichte auf der Tröpfchenoberfläche durch Verdampfen des Lösungsmittels, dem spontanen Zerfall der Tröpfchen in Mikrotröpfchen (Coulomb-Explosion) und der Desolvatisierung der Analytmoleküle beim Eintritt in das Massenspektrometer [247, 507]. Charakteristisch für die durch Elektrospray erzeugten Ionen ist das Auftreten von unterschiedlichen Ladungszuständen einer Molekülart.

Zwei Techniken wurden bei der Elektrospray-Ionisation eingesetzt: die von Wilm und Mann entwickelte Nanoflow-Elektrospray-Methode [636] und der Mikroflow-Modus.

- Der Nanoflow-Modus wurde bei *offline*-Messungen angewandt. Hier wurden wenige Mikroliter Probe in speziell mit Metall beschichtete dünne ausgezogene Glaskapillaren gefüllt und mit Flussraten im Bereich von 20-50 nl/min im elektrischen Feld versprüht.
- Der Mikroflow-Modus wurde bei *online*-Messungen eingesetzt, also wenn ein HPLC-System an die Ionenquelle gekoppelt wurde. In diesem Fall wurden die Proben mit Flussraten von 5-1000 nl versprüht, was bei gleicher Analytkonzentration Flussraten von 5-1000  $\mu\text{l}/\text{min}$  in der herkömmlichen Elektrosprayionisation entspricht, da der Ionenstrom im Elektrosprayprozess mit der Probenkonzentration und nicht mit dem Lösungsmittelvolumen korreliert. Verwendet wurden dazu in der ESI-Quelle goldbeschichtete Glaskapillaren, sogenannte „Picotips“. Weitere Ausführungen über die *online*-Messungen s. Abschnitt 2.7.2.3.

### 2.7.2.2 Q-TOF-Massenspektrometer

In der vorliegenden Arbeit wurden die Proben an einem Q-Tof-Massenspektrometer gemessen, einem „Hybrid-Quadrupol-Tof-Massenspektrometer“, das aus zwei funktionellen Einheiten, MS1 und MS2 besteht (siehe Abb. 2.7). 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 durchqueren die Ionen den Quadrupol-Analysator und dabei auch die unter Hochvakuum stehende Hexapol-Kollisionszelle ohne Veränderung. Im Falle einer Fragmentierung, dem Tandem-MS-Experiment, werden von den vorgeschalteten Quadrupolen nur Ionen bestimmter  $m/z$ -Werte bis zur

Kollisionszelle durchgelassen. Diese ist nun mit einem inerten Gas, z.B. Argon, gefüllt. Durch Zusammenstöße zwischen den Ionen und den Gasmolekülen kann es aufgrund der übertragenen Energie zur Fragmentierung kommen (collisionally induced decomposition, CID). Abhängig von der Art des Kollisionsgases, der Molekülzusammensetzung und den Druckverhältnissen kann es allerdings zusätzlich notwendig sein, kurz vor Stoßaktivierung eine zusätzliche Beschleunigungsspannung (Kollisionsspannung, 20-60 V) anzulegen [212, 242, 413].

Am Ende der MS1-Einheit werden die Ionen über eine Hexapol-Transferlinse auf den „Pusher“ fokussiert. Der „Pusher“ lenkt mit maximaler Frequenz von 20 kHz den Ionenstrahl ab in Richtung des orthogonal angeordneten Reflekttron-Tof-Massenspektrometers (MS2). Bei Flugzeitmassenspektrometern (Time-of-flight-/TOF-Analysatoren) wird das Masse/ Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) der Ionen im Hochvakuum ( $p=3,8 \cdot 10^{-8}$  mbar) bestimmt. Dazu wird die Flugzeit  $t$  gemessen, die die Ionen brauchen vom Verlassen des Pushers durch die feldfreie Driftstrecke ( $L$ ) bis zum Auftreffen auf den Detektor. Die Quelle stellt das elektrische Feld ( $E$ ) dar, in dem die Ionen auf die gleiche kinetische Energie beschleunigt werden. Die Beschleunigungsspannung  $U$  liegt bei ungefähr 28 kV. Bei gleicher kinetischer Energie erreichen Ionen verschiedener  $m/z$ -Werte im feldfreien Raum verschiedene Geschwindigkeiten  $v$ . Das ( $m/z$ )-Verhältnis der Ionen ergibt sich also aus den unterschiedlichen Geschwindigkeiten und ihrer Elementarladung  $e$  und ist proportional zum Quadrat der Flugzeit.

$$E_{kin} = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2 = \frac{m \cdot L}{2 \cdot t^2} = z \cdot e \cdot U$$

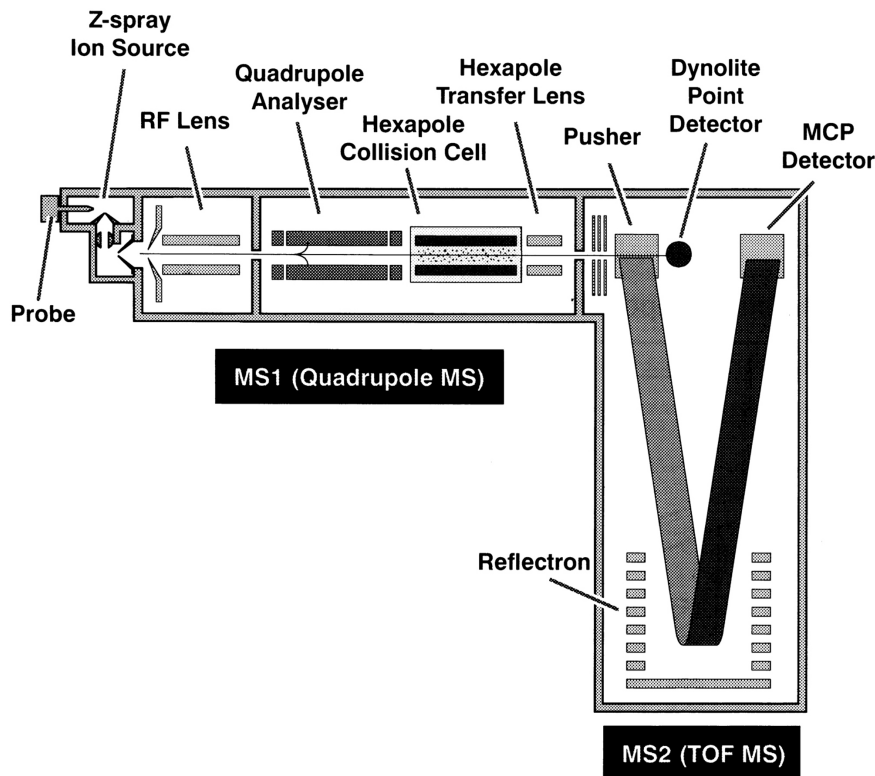
$$m/z = \frac{2 \cdot e \cdot U \cdot t^2}{L^2}$$

Die maximale Auflösung dieses Geräts liegt bei  $R = m/\Delta m = 5000$ . Dabei ist  $m$  die Masse des verwendeten monoisotopischen Peaks im unteren Massenbereich und  $\Delta m$  seine Halbwertsbreite (FWHM (*Full width at half maximum*)). Ab einem Wert von 2000 FWHM im Massenbereich der Peptidionen können damit einzelne Isotopenpeaks voneinander unterschieden werden. Der analysierbare Massenbereich liegt zwischen 2 und 4000 Da. Durch die Mehrfachladung der auftretenden Ionen können jedoch auch sehr viel größere Moleküle gemessen werden. Während der Ionenstrom aus MS2 am MCP gemessen wird, können die Ionen zur Optimierung des Ionenstroms aus MS1 am Punktdetektor analysiert werden.

Die Steuerung des Q-Tof-Massenspektrometers sowie die Datenaufnahme und Prozessierung erfolgte über die PC-Software MassLynx 4.0, über die auch die Datenaufnahme und Prozessierung stattfand. Als Integrationszeiten für den TOF Analysator wurden 1 s bzw. 4 s bei Tandem-MS-Experimenten und Interscanverzögerungen von 0,1 s eingestellt. Der Wechsel zwischen Übersichts-Modus und Fragmentierung der Vorläuferionen  $[M+2H]^{2+}$  erfolgte automatisch durch entsprechend eingestellte Parameter in der MassLynx 4.0 Software. In allen Läufen wurden bei Tandem-MS-Experimenten jeweils die vier Peptide mit der höchsten Intensität im Übersichtsscan zur Fragmentierung ausgewählt.

### 2.7.2.3 Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LCMS)-Kopplung

Zur Reduktion der Probenkomplexität können Proben vor dem Versprühen im elektrischen Feld über eine HPLC-Säule getrennt werden. Dabei wird die HPLC direkt (*online*) an die Elektrospray-Quelle gekoppelt (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry* (LCMS)-Kopplung). Diese Anordnung ermöglicht die kontinuierliche Aufnahme der Massenspektren aller von der HPLC eluierten Substanzen. Aufgrund



**Abbildung 2.7:** Schematischer Aufbau des verwendeten Massenspektrometers. RF-Lens: *radio frequency*-Linse, MCP-Detector: *multi channel plate*-Detektor. Abbildung aus dem Q-Tof Handbuch, Micromass.

ihrer Masse können auf diese Weise gesuchte Peptide zu einer bestimmten Elutionszeit im komplexen Gemisch detektiert, selektiv aus dem HPLC-Lauf heraus fragmentiert und somit charakterisiert werden. Außerdem werden die Peptide durch die Elution in relativ kleinen Volumina in konzentrierter Form analysiert, so dass hohe Sensitivitäten erreicht werden können.

#### 2.7.2.4 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)-Systeme

Im Verlauf dieser Arbeit wurden zwei verschiedene HPLC-Systeme eingesetzt, das UltiMate Micro Pump and Detection Module (Dionex) und das NanoLC-2D-System (Eksigent).

- Das Ultimate HPLC-System wurde mit einer Flussrate von etwa 150 - 200  $\mu\text{l}/\text{min}$  betrieben. Ein integriertes Splitsystem verringerte den Fluss noch vor der Probenschleife auf ca. 300  $\text{nl}/\text{min}$ . Zur Beladung der Mikrokapillarsäule wurden die Proben mit einem Volumen von maximal 150  $\mu\text{l}$  zunächst in eine 200  $\mu\text{l}$  Probenschleife eingespritzt, die in ein Pumpensystem integriert war. Von dort wurde die Probe für 30 min mit einer Flussrate von 20  $\mu\text{l}/\text{min}$  auf die in der HPLC-Probenschleife integrierte Vorsäule zur Volumenreduktion und Entsalzung geschickt. Nach dem Ladeprozess wurde die Vorsäule zur Peptidtrennung in den Fluss der Säule geschaltet. Die gebundenen Peptide wurden dann mittels eines Gradienten auf die Kapillarsäule eluiert und aufgetrennt.
- Im NanoLC-2D-System ist der Proben transfer integriert. Die Proben wurden über das Injektionsventil in die Probenschleife an Pumpe 1 gespritzt. Diese transportierte die Probe wie im o.g. Pumpensystem für 30 min mit einer Flussrate von 20  $\mu\text{l}/\text{min}$  auf die Probenschleife an Pumpe 2,

in der die Vorsäule eingebaut war. Die maximale Flussrate der Pumpe 1 betrug  $20 \mu\text{l}/\text{min}$  (*high flow*), die der Pumpe 2  $1000 \text{ nl}/\text{min}$  (*nanoflow*).

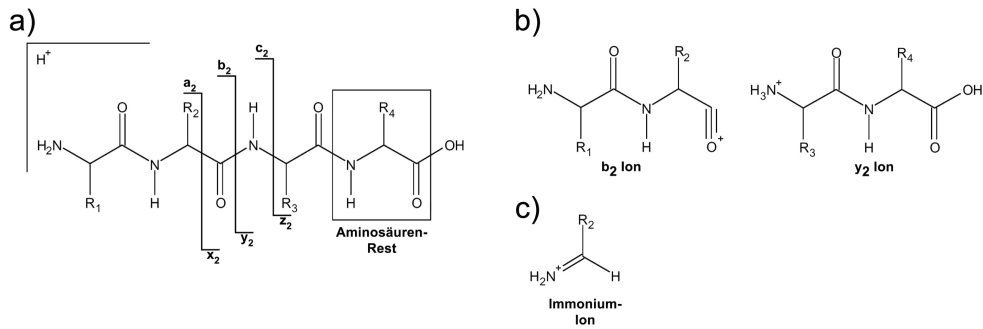
Der Gradient wurde in beiden Systemen gebildet aus folgenden beiden Lösungsmitteln: A:  $4 \text{ mM NH}_4\text{Ac}$  in  $\text{H}_2\text{O}$ , B:  $2 \text{ mM NH}_4\text{Ac}$  in  $80\% \text{ Acetonitril}$ ,  $30\% \text{ H}_2\text{O}$ , beide Lösungsmittel wurden auf  $\text{pH } 3,0$  mit Ameisensäure eingestellt. Insgesamt wurde vor jeder Elution das gesamte HPLC-System  $20 \text{ min}$  mit  $100\% \text{ Lösungsmittel B}$  gewaschen, bevor jeweils  $30\text{-}40 \text{ min}$  mit dem Ausgangsgradienten äquilibriert und anschließend weitere  $30\text{-}40 \text{ min}$  die in Lösungsmittel A gelöste Probe unter Äquilibrierungsverhältnissen geladen wurde. Zur Elution wurden Gradienten von  $12\text{-}15\%$  bis  $45\text{-}55\%$  über  $100\text{-}200 \text{ min}$  eingestellt, gefolgt von einem ca.  $20\text{-minütigen}$  letzten Waschschrift mit  $100\% \text{ Lösungsmittel B}$ .

### 2.7.2.5 Interpretation der Tandem-MS-Spektren von Peptiden

Bei der Elektrospray-Ionisation kann es oft zu mehrfach geladenen Ionen kommen, die zunächst nicht fragmentiert werden, da bei der Verdampfung des Lösungsmittels ihre innere Energie durch Abkühlung nachlässt. Die verschieden geladenen Ionen eines Moleküls bilden eine Serie von Ionensignalen mit  $m/z = (M+n\text{H}^+)/n$ , wobei  $n$  Werte von  $1$  bis zur maximalen Ladungszahl einnehmen kann. Die Basizität der Seitenketten von Arginin, Histidin und Lysin ist in der Gasphase so stark, dass die Protonen an diesen Stellen sogar bei Stoßaktivierung fixiert bleiben. Die Protonen, die an den N-terminalen Aminogruppen anlagern, können hingegen zu jeder der Peptidbindungen wandern (Migration durch interne Solvatisierung), wo sie an den Carbonylsauerstoff anlagern. Aus identischen Peptidmolekülen entsteht auf diese Weise eine heterogene Population von Ionen, die sich hinsichtlich der Lage der Protonen an den Amidbindungen unterscheiden [646].

Beim CID kommt es vor allem an den protonierten Stellen zur Fragmentierung, gefolgt von einem zyklischen Intermediat, das entweder in zwei einfach geladene oder je ein doppelt geladenes und ein neutrales Produkt-Ion zerfällt. Da die Fragmentierung durch die Protonierung beeinflusst wird, entstehen aus jeder Subpopulation von Vorläufer-Ionen Serien unterschiedlicher Produkt-Ionen. Die Gesamtheit der verschiedenen Fragmente eines Vorläufer-Ions ergibt die Peptid-Sequenz [242, 280].

Die Sequenzierung der Peptide durch Interpretation der CID-MSMS-Spektren wird also dadurch ermöglicht, dass die Fragmentierung der Peptide hauptsächlich an den Peptidbindungen (siehe 2.8) erfolgt [396, 585, 653]. Geladene N-terminale Fragmente werden a-, b- oder c-Ionen genannt, geladene C-terminale Fragmente gehören zur x-, y- oder z-Serie [43, 472]. Im Massenspektrum sind nur die geladenen Fragmente sichtbar. Ein Index gibt die Zahl der Aminosäurereste in einem Fragment-Ion an. Je höher die Kollisionsenergie desto mehr weitere Fragmentierungen außerhalb der Peptidbindung sind möglich. Der Verbleib der Ladung und die bevorzugten Fragmentierungsstellen sind von der Zusammensetzung und der Reihenfolge der einzelnen Aminosäuren eines Peptids abhängig. Die b- und y-Ionen bilden meist sehr starke Signale. Das a-Ion, das durch den Verlust von Kohlenmonoxid ( $\text{CO}$ ,  $\Delta m = -28 \text{ Da}$ ) entsteht, tritt auch häufig auf. Genauso sieht man oft begleitende Serien durch Massenverluste von  $\Delta m = -18 \text{ Da}$  (Verlust von Wasser bei Aspartat, Glutamat, Serin, Threonin und von b- bzw. y-Fragmenten),  $\Delta m = -17 \text{ Da}$  (Verlust von Ammoniak bei Arginin, Glutamin und Lysin) und -seltener-  $\Delta m = -64 \text{ Da}$  (Verlust von Methylsulfensäure,  $\text{HSOCH}_3$  bei oxidiertem Methionin). Einige Aminosäuren tendieren stark dazu, Immoniumionen ( $\text{H}_2\text{N}=\text{CHR}$ ) zu bilden, die durch Bruchkombination des a-Typs und des y-Typs entstehen. Dazu gehören Histidin, Isoleucin, Leucin, Phenylalanin,



**Abbildung 2.8:** Nomenklatur von Peptidfragment-Ionen nach Roepstorff und Fohlman und nach Biemann [44, 472], indiziert ist jeweils die Anzahl an Aminosäuren, die im Fragment enthalten sind. a) Nomenklatur der durch Brüche im Peptidrückgrat entstehenden Fragment-Ionen, b) Vereinfachte Struktur für b- und y-Ionen, c) Immoniumion der zweiten Aminosäure. Abbildung nach A. Weinzierl [626].

Prolin, Tryptophan und Tyrosin und, weniger stark, Glutamin, Lysin, Methionin, und Valin. Zusätzlich gibt es auch immer eine Reihe von Signalen aus internen Fragmenten, die durch zwei Brüche des Peptidrückgrats innerhalb des Moleküls entstehen. Der Abstand zwischen benachbarten Peaks einer Serie entspricht einer Aminosäure, deren Identität mit Hilfe der Differenz der für jede Aminosäure spezifischen  $m/z$ -Werte ermittelt werden kann. Immoniumionen geben zwar keinen Aufschluss über die Lage aber über die Gegenwart einer Aminosäure innerhalb einer Sequenz. In Tabelle 2.6 sind die Massen der üblichen Aminosäurereste und Immonium-Ionen aufgelistet.

Die vollständige *de novo*-Sequenzierung unbekannter natürlicher Peptide durch die manuelle Auswertung von Tandem-MS-Spektren kann sowohl komplex als auch zeitaufwendig sein. Aber meist reichen wenige Informationen eines Spektrums, wie die Gesamtmasse des Peptids, kurze Sequenzabschnitte (über die b- oder y-Serie) und enthaltene Aminosäuren (über Immoniumionen), um mit im Internet frei verfügbaren Programmen (z.B. dem MASCOT-Programm, <http://www.matrixscience.com>) verschiedene Protein- und Nukleotid-Datenbanken durchsuchen zu lassen und so eine Peptidsequenz und die Zuordnung zu ihrem Quellprotein zu ermitteln [422]. Zur eindeutigen Verifizierung der Sequenz können die untersuchten Spektren mit Spektren analoger synthetischer Peptide verglichen werden. Zur Ermittlung der Quell-Sequenz der identifizierten Peptide wurden zwei Datenbanken herangezogen: die NCBI-nr- (National Center for Biotechnology Information, non-redundant, <http://www.ncbi.nih.gov/>) und die EST-Datenbank (Expressed Sequence Tags, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/index.html>).

Zur differentiellen Quantifizierung von Peptiden wurden die Informationen aus drei LC-MS-Läufen verwertet: ein Übersichtslauf, in dem die Gesamtpeptidkonzentration zweier zu vergleichender Proben im Verhältnis 1:1 vorlag. Dieser diente der eigentlichen relativen Quantifizierung durch Vergleich der Signalintensitäten identischer Peptide, die zwar zur gleichen Zeit eluierten, jedoch aufgrund einer 4 Da-Massendifferenz ihrer jeweiligen Probe zuzuordnen waren. Für die Quantifizierung wurden die Signalintensitäten eines Molekülionenpeaks im Übersichtsspektrum nach Abzug des Hintergrundes herangezogen. Dazu wurde ein Massenchromatogramm für die Masse des Molekülions erstellt, dann wurden die Spektren all der Zeiten aufsummiert, in denen das Molekül eluierte. Als Hintergrund wurde ein gleichgroßes Zeitintervall möglichst dicht vor bzw. nach der Elution des Moleküls gewählt, in dem keine anderen Molekülionen gleicher Masse wie der des relevanten Molekülions enthalten waren. Zur



Identifizierung der Peptidsequenzen wurde jeweils ein Tandem-MS-Lauf der beiden einzelnen Proben durchgeführt.

**Tabelle 2.6:** Massen natürlicher und modifizierter Aminosäurereste in MS/MS-Spektren

Aminosäure	Ein-Buchstaben-Code	Masse Aminosäurerest	Masse Immoniumion
Alanin	A	71	44
Arginin	R	156	129
Asparagin	N	114	70
Aspartat	D	115	71
Cystein	C	103	76
Glutamat	E	129	102
Glutamin	Q	128	101
Glycin	G	57	30
Histidin	H	137	<b>110</b>
Isoleucin	I	113	<b>86</b>
Leucin	L	113	<b>86</b>
Lysin	K	128	101
Lysin <sub>GUA</sub>	K <sub>GUA</sub>	170	153
Methionin	M	131	104
Phenylalanin	F	147	<b>120</b>
Prolin	P	97	<b>70</b>
Serin	S	87	60
Threonin	T	101	74
Tryptophan	W	186	<b>159</b>
Tyrosin	Y	163	<b>136</b>
Valin	V	99	72

### 2.7.3 Genexpressionsanalysen von Oligonukleotid-Mikroarrays

Die Generierung biotinylierter gesamt-RNA-Proben aus RCC-Gewebe zum Beladen von Oligonukleotid-Mikroarrays für die Genexpressionsanalyse wurde durch Oliver Schoor und Mathias Schuler durchgeführt. Die gesamt-RNA gesunder Gewebe wurde kommerziell von verschiedenen Firmen (Ambion, Clontech, Stratagene) erworben.

Die Beladung und Datengenerierung fand in der Microarray Facility Tübingen nach Affymetrix-Protokollen (GeneChip Expression Analysis Technical Manual) statt. Die Rohdaten-Verarbeitung und die statistische Auswertung erfolgte mit der Software Affymetrix Microarray Suite 5.0 (MAS5). An dieser Stelle sei Herrn Dr. Bonin von der Microarray Facility in Tübingen für die Zusammenarbeit gedankt. Bei den Proben RCC044, RCC068, RCC070, RCC073, RCC075, RCC098, RCC103, RCC112, RCC115 und RCC116 wurde der Human Genome U133A-Array (Affymetrix) eingesetzt, bei allen anderen Proben und der Probe RCC068 zur Vergleichbarkeit der Daten beider Chips der Human Genome U133Plus

2.0-Array (Affymetrix). Diese Arrays tragen ca. 54000 verschiedene DNA-Probensätze aus 38500 humanen Genen. Pro Probensatz sind 11 verschiedene *perfect match* 25mer-DNA-Sonden über die Arrayfläche verteilt. Zusätzlich existiert zu jeder *perfect match*- eine *mismatch*-Sonde, in der jeweils das mittlere Nukleotid verändert ist und die zur statistischen Auswertung entsprechend hinzugezogen wird. Außerdem enthält der Array weitere Kontroll-Sonden bakterieller Transkripte. Sind die Werte der *mismatch*-Sonde im Verhältnis zu den Werten der *perfect match*-Sonde zu hoch, werden die jeweiligen Expressionswerte als „not detected“ oder „absent“ angegeben.

Das MAS5-Programm ermittelt nach Verrechnung der Signalintensitäten aller Sonden die Signalintensität für jeden einzelnen Probensatz. Zusätzlich gibt es dabei an, ob ein Gen als detektiert oder nicht detektiert gilt. Die Werte verschiedener Probensätze eines Gens können sowohl in ihrer Signalintensität als auch ihrer Detektierbarkeit stark variieren.

Da die Signalintensitäten verschiedener Tumore und Gewebe keiner Normalverteilung unterliegen, wurde bei gemittelten Werte-Angaben immer der Median angegeben:

Für  $n =$  ungerade Anzahl an Messwerten:  $\tilde{x} = x_{\frac{n+1}{2}}$  ,

für  $n =$  gerade Anzahl an Messwerten:  $\tilde{x} = \frac{1}{2} \cdot (x_{\frac{n}{2}} + x_{\frac{n+1}{2}})$ .

Der gesamte Datensatz wurde in allen Fällen gegen den Wert der Normalniere (als 1 definiert) normiert. Nur Überexpression um den Faktor 3 oder größer wurde bei dem Vergleich Tumor- zu Normalgewebe als relevant eingestuft.

## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 HLA-Liganden-Analyse von Tumorgewebe im Kontext der individuellen Peptidvakzinierung von Nierenzellkarzinom-Patienten

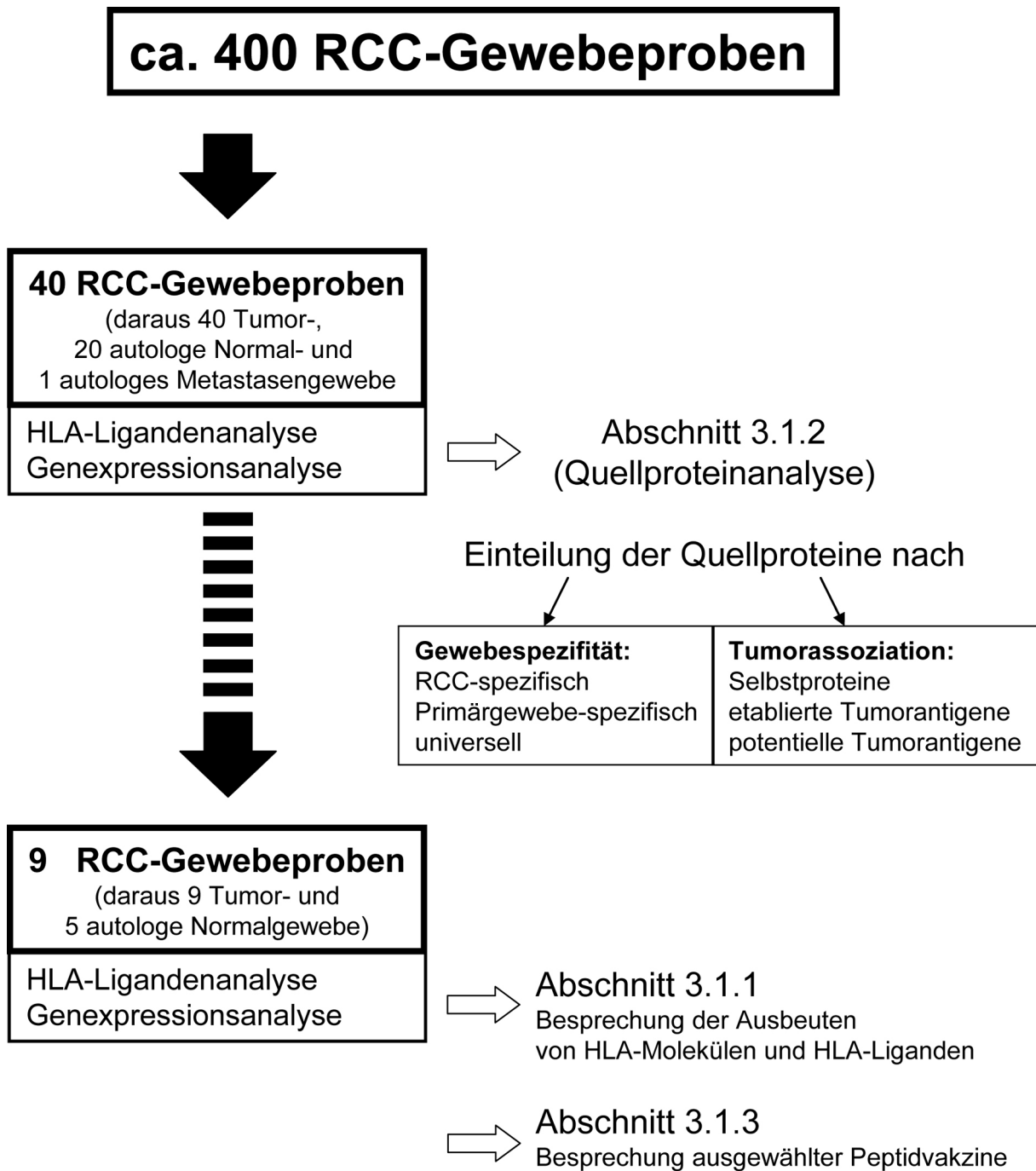
Im Rahmen einer klinischen Studie wurden von der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen (Prof. Dr. Stenzl) Nierenzellkarzinome (RCC) aquiriert. In unserem Labor fand die Analyse der Gewebe in bezug auf HLA-Ligandenpräsentation, Gen- und Protein-Expression (s. auch 3.2) statt. Außerdem wurden hier individuell abgestimmte Peptidvakzine synthetisiert. Stage III-Patienten wurden von der urologischen Abteilung im Studienarm „URO“, Stage IV-Patienten von der hämatologischen Abteilung (Prof. Dr. Brossart) im Studienarm „ONCO“ mit den jeweiligen Peptidvakzinen geimpft. Nähere Erläuterungen zu den beiden Studien finden sich im Abschnitt 3.1.3.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neun verschiedene RCC-Gewebe analysiert. Für die allgemeine Diskussion der auf RCC-Geweben identifizierten HLA-Liganden, ihrer zugrundeliegenden Quellproteine und deren Genexpression erschien es dagegen sinnvoller, das gesamte in dieser Abteilung bisher untersuchte RCC-Ligandom hinzuzuziehen. Bei der Besprechung der für die klinische Studie ausgewählten Peptidvakzine wurde zum Schluss jedoch wieder nur auf die neun im Rahmen dieser Arbeit analysierten RCC-Gewebe eingegangen. Zur besseren Übersichtlichkeit dieser Unterteilungen dient Abbildung 3.1. Eine detaillierte Beschreibung der jeweils hinzugezogenen Gewebe findet sich zu Beginn der Abschnitte 3.1.1 und 3.1.2.1.

#### 3.1.1 Eingesetzte Tumorgewebe und experimentelle Analysen zur Isolierung von HLA-Liganden

Die Analyse des Gewebes und die Auswahl patientenspezifischer Vakzine erfolgten nach dem in Abschnitt 1.2.3 beschriebenen Screening-Ansatz XPRESIDENT. Im Verlauf dieser Dissertation wurden insgesamt neun RCC-Gewebe bearbeitet. Die Aufbereitung der Gewebe erfolgte durch Gitsios Gitsioudis, Björn Krämer, Martin Kreutz, Anna Missiou und Margret Müller. HLA-Liganden wurden mittels *online* ESI-MS identifiziert. An der Daten-Aufnahme und -Auswertung waren beteiligt Florian Altenberend, Jörn Dengjel, Nina Hillen, Martin Kreutz, Verena Meyer, Margret Müller, Toni Weinschenk und Andreas Weinzierl. Die mRNA-Genexpressionsanalysen erfolgten mit der Affymetrix Mikroarray-Technologie durch Oliver Schoor und Mathias Schuler in Zusammenarbeit mit der Microarray Facility in Tübingen unter Herrn Dr. Bonin.

In Tabelle 3.1 sind alle im Rahmen dieser Arbeit analysierten RCC-Gewebe aufgeführt. Es wurden die Gewebe von zwei Frauen und sieben Männern untersucht. Bei den meisten RCCs handelte es sich um klarzellige Tumore, einer der Tumore war eosinophil und zwei weitere Tumore zeigten ein zu jeweils 50% klarzelliges und papilläres Erscheinungsbild. Die während des operativen Eingriffs ermittelten Tumorgrößen waren sehr unterschiedlich.



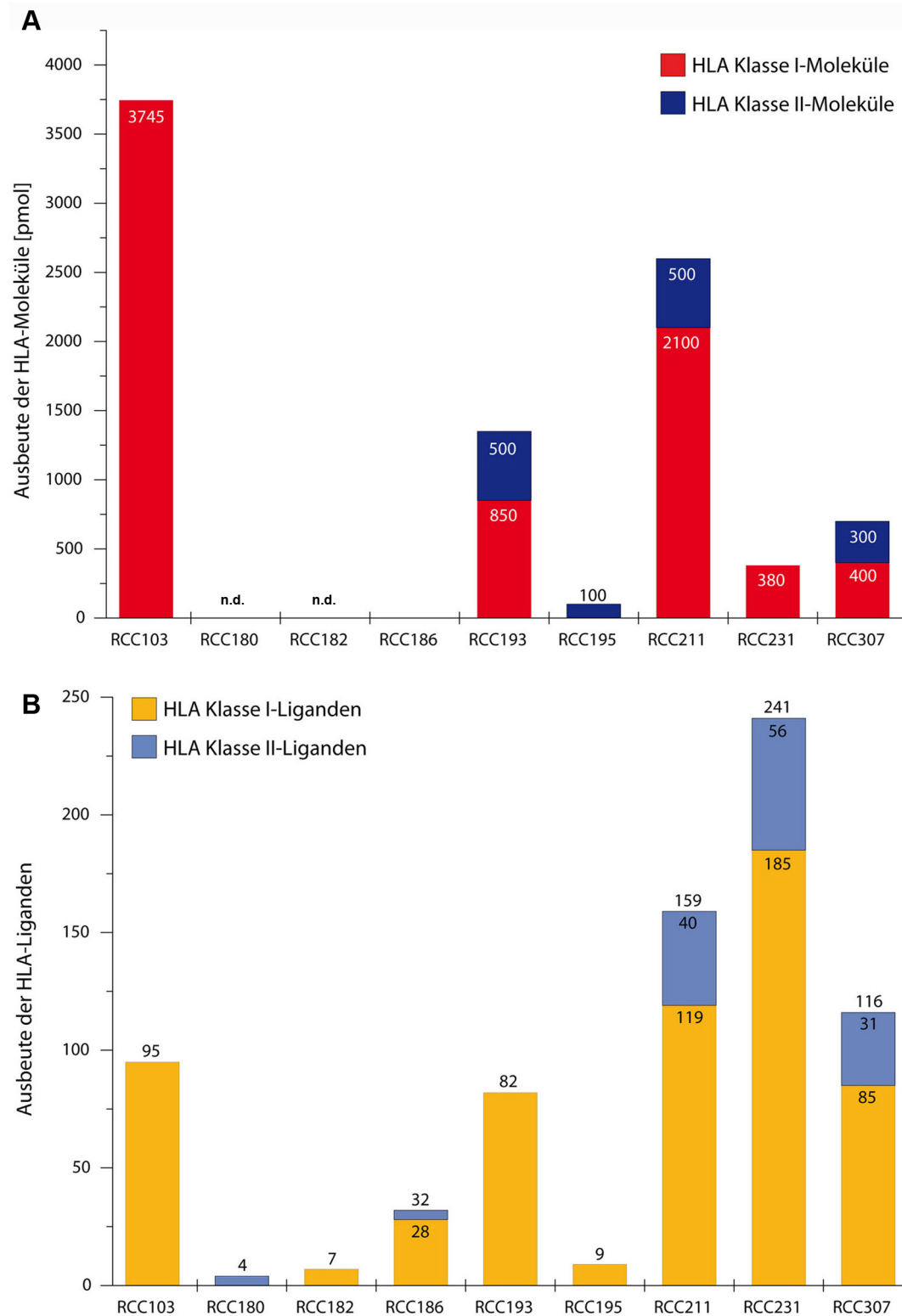
**Abbildung 3.1:** Zum Zeitpunkt des Abschlusses dieser Dissertation lagen unserer Abteilung an die 400 RCC-Gewebeproben (meist jeweils Tumor- und autologes Normalgewebe) vor, wobei von den meisten Proben jeweils ein Tumor- und ein autologes Normalgewebestück vorhanden waren. Von diesen Proben waren 40 im Hinblick auf ihre HLA-Ligandenpräsentation und/ oder ihre Genexpression analysiert worden. Die Analyse von neun dieser 40 Proben fand im Rahmen dieser Arbeit statt. Die Ausbeuten der HLA-Moleküle und HLA-Liganden dieser neun Proben werden im Abschnitt 3.1.1 dargestellt und besprochen. Zur ausführlichen Analyse des gesamten RCC-Ligandoms und seiner Quellproteine erscheint die Analyse eines größeren Datensatzes angebracht. Daher werden hierfür im anschließenden Abschnitt 3.1.2 die Daten aller 40 in unserem Labor analysierten RCC-Gewebe hinzugezogen. Zum Abschluss des Abschnittes 3.1 wird schließlich unter 3.1.3 auf den Einsatz von HLA-Liganden tumorassoziierter Antigene im Rahmen der Peptidvakzinierung eingegangen. Hierzu werden beispielhaft erneut nur die Datensätze der im Rahmen dieser Arbeit analysierten Gewebe hinzugezogen.

**Tabelle 3.1:** Nierenzellkarzinom-Gewebe, die im Rahmen dieser Dissertation analysiert wurden. (Zur Erläuterung der Staging-Angaben s. Abschnitt 1.1 und 3.1.3.)

RCC-ID	HLA-Typisierung	m/w	Histologie	Staging	Tumorgröße [cm]
RCC103	A*11 A*25 B*15 B*44	w	klarzellig	T3c N0 M0 G2	3,3
RCC180	A*01 A*31 B*18 B*55 DRB1*13 DRB1*14 DRB3	m	klarzellig	T1b G1	6,0
RCC182	A*03 A*30 B*07 B*40 DRB1*01 DRB1*13 DRB3	m	klarzellig	T3b G2	12,0
RCC186	A*11 A*24 B*15 DR4 DR11 DRB3 DRB4	m	klarzellig	T2 Nx M1 G3	9,0
RCC193	A*01 B*08 B*35 DRB1*03 DRB1*13 DRB3	m	klarzellig	T3b Nx M1 G3	7,0
RCC195	A*24 A*35 B*35 B*44 DRB1*04 DRB1*07 DRB4	m	klarzellig	T3b M0 G2-3	10,0
RCC211	A*03 B*13 B*35 DRB1*07 DRB1*08	w	50% klarzellig, 50% papillär	T3c G2	9,8
RCC231	A*24 B*35 B*37 DRB1*01 DRB1*15 DRB5	m	50% klarzellig, 50% papillär	T3a N0 G2	n.d.
RCC307	A*24 A*26 B*13 B*38 DRB1*01 DRB1*15 DRB5	m	klarzellig/ eosinophil	T3b Nx M0 G2	6,5

**Tabelle 3.2:** Ausbeuten der Nierenzellkarzinom-Gewebe, die im Rahmen dieser Dissertation analysiert wurden. Alle Angaben zu Liganden und Quellproteinen beziehen sich auf die Analyse des Tumorgewebes. Die Ausbeuten der HLA-Moleküle wurde mittels Edman-Sequenzierung ermittelt. n.d. = nicht determiniert.

	RCC103	RCC180	RCC182	RCC186	RCC193	RCC195	RCC211	RCC231	RCC307
Tumorgewebe-Masse [g]	10,0	4,15	5,4	33,0	4,72	60,0	20,65	6,32	1,6
Normalgewebe-Masse [g]	0	0	1,65	3,0	2,38	0	0,4	0	2,7
HLA Klasse I Moleküle auf Tumorgewebe [pmol]	3745	n.d.	n.d.	0	850	0	2100	380	400
HLA Klasse II Moleküle auf Tumorgewebe [pmol]	n.d.	n.d.	n.d.	0	500	100	500	0	300
HLA Klasse I Moleküle auf Normalgewebe [pmol]	n.d.	n.d.	n.d.	0	500	n.d.	0	n.d.	200
HLA Klasse II Moleküle auf Normalgewebe [pmol]	n.d.	n.d.	n.d.	0	200	n.d.	0	n.d.	100
Klasse I Liganden	95	0	7	28	82	9	119	185	85
Klasse II Liganden	n.d.	4	0	4	n.d.	0	40	56	31
Liganden insgesamt	<b>95</b>	<b>4</b>	<b>7</b>	<b>32</b>	<b>82</b>	<b>9</b>	<b>159</b>	<b>241</b>	<b>116</b>
Klasse I Quellproteine	91	0	7	25	78	8	106	159	79
Klasse II Quellproteine	n.d.	2	0	2	n.d.	0	24	34	15
ESTs	2	0	0	0	3	0	5	8	2
Quellproteine insgesamt	<b>91</b>	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>27</b>	<b>78</b>	<b>8</b>	<b>130</b>	<b>193</b>	<b>94</b>
Quellproteine mit mehreren Klasse I-Liganden	2	0	0	3	4	1	9	12	4
Quellproteine mit mehreren Klasse II-Liganden	n.d.	2	0	2	n.d.	0	7	12	7
Quellproteine mit mehreren Klasse I- und Klasse II-Liganden	2	2	0	3	4	1	15	23	10



**Abbildung 3.2:** Schematische Darstellung der Ausbeuten nach Analyse der Tumorgewebe. Bild A zeigt die Ausbeuten der HLA-Moleküle, Bild B die Ausbeuten der identifizierten HLA-Liganden. Bei RCC180 und RCC182 fand keine Ermittlung der HLA-Ausbeuten statt, in RCC186 und RCC195 konnten keine HLA Klasse I-Moleküle und in RCC186 und RCC231 keine HLA Klasse II-Moleküle detektiert werden. In RCC103 und RCC193 wurde keine Analyse der HLA Klasse II-Liganden vorgenommen, in RCC180 konnten keine HLA Klasse I-Liganden identifiziert werden, in RCC182 und RCC195 keine HLA Klasse II-Liganden. n.d. = nicht determiniert.

Wie aus Tabelle 3.2 und der zusammengefassten Darstellung der Tumorgewebe-Ausbeuten in Abbildung 3.2 zu ersehen ist, variierten die analysierten Tumormassen sehr stark und auch die detektierbaren Mengen an HLA-Molekülen und HLA-Liganden, die aus den Geweben gewonnen wurden. Wichtige Einflussfaktoren sind in diesem Zusammenhang vor allem die Aufarbeitung des Tumorgewebes, die eingesetzten HLA-spezifischen Antikörper bei der Immunpräzipitation und die individuell unterschiedlich stark ausgeprägte HLA-Expression.

Aus einem 10 g schweren Tumorgewebe konnten fast 4 nmol HLA Klasse I-Moleküle isoliert werden (RCC103) und selbst ein 1,6 g großes Tumorgewebestück ergab noch eine Ausbeute von 400 pmol (RCC307). Im Gegensatz dazu konnten nach der Aufarbeitung eines 60 g großen Gewebestücks gar keine HLA Klasse I-Moleküle nachgewiesen werden (RCC195), und auch über 6 g Tumormaterial lieferten eine Ausbeute unter 400 pmol (RCC231). Nur der Nachweis geringerer Mengen an HLA Klasse II-Molekülen im Gegensatz zu HLA Klasse I-Molekülen, vor allem auch auf Normal- im Vergleich zu Tumorgewebe war ein generelles Phänomen.

Weder aus den Gewebemassen noch aus den detektierten HLA-Molekül-Ausbeuten ließ sich die Ausbeute an detektierbaren HLA-Liganden ableiten. Beispielsweise ergab die Analyse von etwa 20 g Tumormaterial (RCC211) über 2 nmol HLA Klasse I-Moleküle und 108 identifizierte HLA Klasse I-Liganden, dagegen lieferte die Auswertung von etwa 6 g Tumormaterial (RCC231) zwar weniger als 400 pmol HLA Klasse I-Moleküle, dafür aber eine Ausbeute von 175 HLA Klasse I-Liganden.

Die geringe Korrelation zwischen der analysierten Tumormasse bzw. der Ausbeute an HLA-Molekülen und der Anzahl der identifizierten HLA-Liganden lässt sich, neben versuchstechnisch bedingten Einflüssen, auf mehrere Ursachen zurückführen. Ein wichtiger Faktor liegt in der HLA-Typisierung. Die Peptide tragen Allel-spezifische Ankerpositionen, und damit unterliegen die Peptidsequenzen gewissen restriktiven Vorgaben. Dies wiederum hat einen Einfluss auf ihre Detektierbarkeit im Massenspektrometer. Peptide mit geladenen Aminosäureresten lassen sich beispielsweise besser nachweisen als Peptide mit hauptsächlich hydrophoben Aminosäuren. Dieser Effekt kann verstärkt oder aufgehoben werden dadurch, dass bestimmte Allele verschieden stark exprimiert und auf der Zelloberfläche präsentiert werden.

Auch die Tatsache, dass ein Tumor so groß werden kann, wie beispielsweise im Fall von RCC195, lässt darauf schließen, dass der Tumor effektive Fluchtmechanismen entwickelt hat, um einer Erkennung und Bekämpfung durch das Immunsystem zu entgehen. Dazu zählt unter anderem die Herunterregulation der Oberflächenpräsentation der HLA-Moleküle. Entsprechend ist es nicht verwunderlich, wenn bei solch großer Gewebemasse so niedrige Ausbeuten an HLA-Molekülen nachweisbar sind. Es konnten jedoch auch größere HLA-Molekül-Ausbeuten auf großen Tumoren erzielt werden, wie zum Beispiel bei RCC211. In solch einem Fall können andere Faktoren bewirken, dass der Tumor sich der Immunabwehr entzieht. Dazu zählen sowohl alternative Formen von Fluchtmechanismen des Tumors als auch Faktoren auf Seiten des Immunsystems, wie regulatorische T-Zellen oder ein allgemein geschwächter Immunstatus.

Nachdem sowohl histologisch als auch durch biochemische Aufreinigung und massenspektrometrische Analysen gezeigt werden konnte, dass auch Tumorzellen HLA Klasse II-Moleküle exprimieren und Klasse II-Liganden präsentieren [130], wurde ebenfalls eine Analyse des Klasse II-Ligandoms des Tu-

mormaterials standardmäßig durchgeführt. Nur die Gewebe von RCC103 und RCC193 bilden hierbei eine Ausnahme.

Das Ligandom der Normalgewebeproben wurde in keinem der Fälle analysiert. Hierzu wäre eine vergleichende Paaranalyse nach dem Prinzip der relativen Quantifizierung sinnvoll gewesen [320]. Dies soll in Zukunft standardmäßig durchgeführt werden.

### 3.1.2 Diskussion des RCC-Ligandoms und seiner Quellproteine

#### 3.1.2.1 Eingesetzte Tumorgewebe und Bedingungen, die der Quellprotein-Analyse zugrunde liegen

Wie in Abschnitt 1.2.3 dargestellt, ist der Bedarf an der Identifizierung neuer T-Zellepitope für den Einsatz in der Immuntherapie immer noch sehr groß. Dazu ist eine ausführliche Analyse des HLA-Ligandoms notwendig. Zur Betrachtung des durch HLA-Liganden präsentierten Proteoms von RCC-Geweben wurden sowohl Liganden- als auch Genexpressionsdaten aller zum Zeitpunkt dieser Dissertation in unserem Labor untersuchten Nierenzellkarzinome herangezogen, um allgemeingültigere Aussagen treffen zu können. In früheren Arbeiten wurden bereits Liganden und die sich dahinter verbergenden Quellproteine in RCC-Geweben analysiert. Die Aufarbeitung der hierbei zugrundeliegenden Gewebe wurde zusätzlich zu den in Abschnitt 3.1.1 aufgeführten Personen von Ute Eberle, Maik Häntschel, Tobias Krüger, Christian Reichle, Juliane Stickel und Florian Obermayr durchgeführt. Die Datensätze dieser Analysen wurden ausführlich vor allem in den Dissertationen von Claudia Lemmel, Tobias Krüger und Toni Weinschenk besprochen [302, 319]. Hier sollen die Datensätze dieser früheren Arbeiten mit aufgenommen und zusammen mit den Datensätzen dieser Arbeit vergleichend analysiert werden. In Tabelle 3.3 werden alle hierfür untersuchten Gewebe und die entsprechenden Analysen, die mit ihnen durchgeführt wurden, aufgelistet. Ein Faktor, der die Vergleichbarkeit der aufgezeigten Daten einschränkt, ist die Tatsache, dass die HLA-Liganden-Analysen für die Gewebe der Patienten RCC001 - RCC075 mittels *offline*-MS durchgeführt wurden, d.h. die chromatographische Trennung der Peptidgemische wurde nicht direkt an die massenspektrometrische Analyse gekoppelt (genauere Ausführungen dazu in der Dissertation von Claudia Lemmel [319]). Alle folgenden Analysen fanden mittels *online*-MS statt.

**Tabelle 3.3:** Zur Quellprotein-Analyse hinzugezogene Gewebe von Nierenzellkarzinom-Patienten. Die Gewebemasse bezieht sich auf das für HLA-Ligandenanalysen eingesetzte Material. (T = Tumorgewebe, N = Gewebe der gesunden autologen Niere, NNM = Nebennieren-Metastase, n.d. = nicht determiniert, % = keine Angabe). \*Peptide wurden mittels *offline*-MS analysiert, \*\*Peptide wurden in Gewebepaarvergleichen mittels relativer Quantifizierung nach Lemmel et al. [320] analysiert.

RCC-ID	HLA-Typisierung	m/w	Histologie	Gewebemasse [g]	Klasse I Peptide	Klasse II Peptide	Gen Chip
RCC001T*	A*02; A*68; B18; B44	w	klarzellig	%	78	n.d.	
RCC013T*	A*02; A*24; B*07; B*40	m	klarzellig	%	21	n.d.	
RCC038T*	A*01, A*68, B*08, B*44	%	%	6.70	5	n.d.	
RCC044T*	A*03, A*11, B*27	w	papillär	20.00	17	n.d.	+
RCC044N	A*03, A*11, B*27	w					+
RCC068T*	A*02; A*29; B*1501; B*4501	m	klarzellig	20.00	101	n.d.	+



Tabelle 3.3 – Fortsetzung

RCC-ID	HLA-Typisierung	m/w	Histologie	Gewebe- masse [g]	Klasse I Peptide	Klasse II Peptide	Gen Chip
RCC068N	A*02; A*29; B*1501; B*4501	m					+
RCC070T	A*01, A*02, B*07, B*08	m	klarzellig	8.30			+
RCC070N	A*01, A*02, B*07, B*08	m					+
RCC073T*	A*02, A*03, B*07, B*57	m	klarzellig	10.00	8	n.d.	+
RCC073N	A*02, A*03, B*07, B*57	m					+
RCC075T*	A*03; B*0702; B*4001	m	papillär	16.00	101	n.d.	+
RCC075N	A*03; B*0702; B*4001	m					+
RCC098T	A*01; A*03; B*0702; B*1801	m	klarzellig	21.10	135	n.d.	+
RCC098N	A*01; A*03; B*0702; B*1801	m					+
RCC099T**	A*02, B*27, B*57	m	klarzellig	7.70	175	n.d.	
RCC099N**	A*02, B*27, B*57	m		12.40	134	n.d.	
RCC100T**	A*02; A*03; B*07; B*18	w	klarzellig	8.00	51	n.d.	+
RCC100N**	A*02; A*03; B*07; B*18	w		12.60	38	n.d.	+
RCC103T	A*11; A*25; B*15; B*44	w	klarzellig	10.00	94	n.d.	+
RCC103N	A*11; A*25; B*15; B*44	w					+
RCC110T**	A*02; B*18; B*27	w	klarzellig	7.00	52	n.d.	+
RCC110N**	A*02; B*18; B*27	w		4.90	50	n.d.	+
RCC112T	A*01, A*31, B*08, B*27	w	NNM eines klarzelligen RCCs	4.10	84	n.d.	+
RCC115T	A*02; A*03; B*15; B*18	m	klarzellig	27.20	112	n.d.	+
RCC116T	A*01; A*02; B*27; B*37	m	klarzellig	15.81	98	n.d.	+
RCC119T**	A*02; A*24; B*07	w	klarzellig	7.80	51	n.d.	+
RCC119N**	A*02; A*24; B*07	w					+
RCC121T**	A*26; A*29; B*35; B*45	m	klarzellig	10.40	27	n.d.	
RCC121N**	A*26; A*29; B*35; B*45	m		6.20	3	n.d.	
RCC130T	A*02; A*24; B*07; B*44	m	klarzellig	6.00	61	n.d.	+
RCC130N	A*02; A*24; B*07; B*44	m					+
RCC133T	A*02, A*24, B*15, B*44	w	klarzellig				+
RCC133N	A*02, A*24, B*15, B*44	w					+
RCC135T	A*02; A*03; B*4701; B*5101	m	klarzellig	3.00	59	n.d.	+
RCC135N	A*02; A*03; B*4701; B*5101	m		4.50			+
RCC146T	A*11, A*24, B*39, B*40	w	klarzellig				+
RCC146N	A*11, A*24, B*39, B*40	w					+
RCC149T	A*02, A*33, B*14, B*44	m	klarzellig	%	4	8	+
RCC155T	A*01, B*07, B*08, DRB1*02, DQB1*03, DRB1*03, DRB1*04, DRB3, DRB4	m	klarzellig	3.15	n.d.	29	
RCC157T	A*25, A*32, B*52, B*57, DRB1*07, DRB1*16, DRB4, DRB5	w	klarzellig	8.10	n.d.	32	
RCC157N	A*25, A*32, B*52, B*57, DRB1*07, DRB1*16, DRB4, DRB5	w		3.00	n.d.	4	
RCC158T	A*03, A*26, B*07, B*39, DRB1*01, DRB1*16, DRB5	w	klarzellig	1.00	n.d.	13	
RCC163T	A*24, A*33, B*13, B*14, DRB1*07, DRB1*13, DRB3, DRB4	m	klarzellig	17.80	n.d.	11	
RCC178T	A*02, A*24, B*13, B*4403, DRB1*07, DRB4	m	klarzellig				+
RCC180T	A*01, A*31, B*18, B*55, DRB1*13, DRB1*14, DRB3	m	klarzellig	4.15	0	4	+

Tabelle 3.3 – Fortsetzung

RCC-ID	HLA-Typisierung	m/w	Histologie	Gewebe- masse [g]	Klasse I Peptide	Klasse II Peptide	Gen Chip
RCC180N	A*01, A*31, B*18, B*55, DRB1*13, DRB1*14, DRB3	m					+
RCC182T	A*03, A*30, B*07, B*40, DRB1*01, DRB1*13, DRB3	m	klarzellig	1.65	8	0	+
RCC182N	A*03, A*30, B*07, B*40, DRB1*01, DRB1*13, DRB3	m					+
RCC186T	A*11, A*24, B*15, DR4, DR11, DRB3, DRB4	m	klarzellig	3.00	28	4	
RCC189T	A*02; B*0702; B*1801	m	klarzellig	%	92	n.d.	
RCC190T	A*02; A*23; B*2707; B*5001	m	klarzellig/ papillär	14.80	9	52	+
RCC190N	A*02; A*23; B*2707; B*5001	m					+
RCC193T	A*01, B*08, B*35, DRB1*03, DRB1*13, DRB3	m	klarzellig	4.72	83	n.d.	+
RCC195T	A*24, A*35, B*35, B*44, DRB1*04, DRB1*07, DRB4	m	klarzellig	60.00	9	0	+
RCC211T	A*03, B*13, B*35, DRB1*07, DRB1*08	w	klarzellig/ papillär	20.65	122	39	+
RCC226T	A*01, A*03, B*07, B*15, DRB1*01, DRB1*15, DRB5	w	klarzellig	6.79	n.d.	24	
RCC231T	A*24, B*35, B*37, DRB1*01, DRB1*15, DRB5	m	klarzellig/ papillär	6.32	184	57	
RCC307T	A*24, A*26, B*13, B*38, DRB1*01, DRB1*15, DRB5	m	klarzellig	1.60	87	32	
RCC399T**	A*01, A*02, B*08, B*50, DRB1*03, DRB3	m	klarzellig	13.80	77	n.d.	
RCC399M**	A*01, A*02, B*08, B*50, DRB1*03, DRB3	m	klarzellig	1.00	2	n.d.	

Eine Schwierigkeit, die bei der Auswertung der Quellproteine auftritt, besteht darin, dass nicht jeder Ligand nur einem Quellprotein zugeordnet werden kann. In seltenen Fällen kann ein und dieselbe Peptidsequenz in zwei völlig verschiedenen Proteinen vorkommen, meist resultieren jedoch mehrere Quellprotein-Zuordnungen aus ähnlichen Proteinen. Zu letzteren zählen entweder verschiedene Isoformen eines Proteins oder verschiedene Proteine mit ähnlicher Funktion, Lokalisation oder Struktur wie beispielsweise verschiedene ATPasen oder ribosomale Proteine. Um den Fehler bei der Vernachlässigung alternativer Quellproteinvarianten konsistent zu halten und eine sinnvolle Auswertung der Daten vorzunehmen, wurde grundsätzlich als Quellprotein dasjenige mit der kleinsten GeneID in der NCBI Datenbank *Entrez Gene* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>) [348] ausgewählt.

Bei der Auswertung der Genexpressionsdaten wurde ähnlich verfahren. Hier stehen für einige Gene mehrere *probesets* zur Auswahl (s. Kapitel 2.7.3). Zum Teil enthalten die *probeset*-IDs ein „s“, falls Spleißvarianten des entsprechenden Gens in dem *probeset* enthalten sein können, oder ein „x“, falls die *probeset*-Sequenz auf Kreuzreaktivität bzw. Ähnlichkeit mit dem entsprechenden Gen beruht. Es wurden mit absteigender Priorität *probeset*-IDs ohne Zusatz, mit dem Zusatz „s“ oder dem Zusatz „x“ und immer jeweils mit der niedrigsten *probeset*-ID ausgewählt.

Zur Genexpressionsanalyse soll an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass Signalwerte für gesunde Gewebe durch kommerziell erhältliche gesamt-RNA-Proben generiert wurden. Auf den Wert der hierbei eingesetzten „Normaliere“ wurden alle weiteren Signalwerte normiert. Dies wurde zur besseren

Vergleichbarkeit auch in den Fällen so durchgeführt, in denen eine RNA-Probe des autologen gesunden Nierengewebes eines Patienten vorlag. Von einer potentiellen Tumorassoziation eines Antigens wurde in den Fällen ausgegangen, in denen das entsprechende Genprodukt im Tumorgewebe eine Überexpression um mindestens den Faktor 3 über der „Normaliere“ aufwies und gleichzeitig in den weiteren gesunden Geweben keine relevante Überexpression nachzuweisen war.

Auf den 61 untersuchten Geweben wurden insgesamt 2530 Liganden mit 1675 verschiedenen Sequenzen identifiziert. 1998 der Liganden konnten eindeutig einem Klasse I-Allel zugeordnet werden, 279 einem Klasse II-Molekül, und 253 Liganden konnten nicht eindeutig zugeordnet werden. (Aufgrund der Identifizierung einiger Liganden sowohl auf HLA Klasse I- als auch HLA Klasse II-Molekülen ergibt die Summe der einzelnen Angaben nicht die der Gesamtligandenzahl.)

Nicht jeder Ligand resultiert aus einem anderen Quellprotein. Hinter den 1675 verschiedenen Peptidsequenzen verbergen sich nur 1053 verschiedene Quellproteine und weitere 48 verschiedene ESTs. Zum Teil kann dies dadurch erklärt werden, dass bei HLA Klasse II-Liganden mehrere Längenvarianten eines Proteinfragments präsentiert werden. Längenvarianten kommen zwar auch bei Klasse I-Liganden vor. Allerdings kann man in diesem Fall eher davon ausgehen, dass eine Fragmentierung einer längeren Peptidvariante entweder bei der Probenvorbereitung oder in der Quelle des Massenspektrometers zur Verkürzung geführt hat. Dies kann auch bei Klasse II-Längenvarianten vorkommen, doch durch die Promiskuität der HLA Klasse II-Moleküle ist eine natürliche Varianz der Fragmentlängen eines Peptids auf den Klasse II-Molekülen gegeben, die den Klasse I-Liganden fehlt.

In den meisten Fällen kann die Diskrepanz zwischen Liganden- und Quellprotein-Anzahl jedoch auf komplett unterschiedliche Peptidsequenzen aus einem Protein zurückgeführt werden. Dies liegt vor allem daran, dass die gleichen Quellproteine auf Geweben mit verschiedenen HLA-Typisierungen und damit unterschiedlichen Liganden-Präferenzen präsentiert werden. Aber auch auf ein- und demselben Gewebe können verschiedene Abschnitte eines Quellproteins auf MHC-Moleküle geladen werden. Verdeutlicht wird dies durch die Betrachtung der 71 Quellproteine, die mehrfach in einem oder auch mehreren Geweben nachgewiesen wurden. Zum Teil lagen von den gleichen Quellproteinen sowohl Längenvarianten als auch komplett verschiedene Peptidsequenzen innerhalb der Gruppe der sie repräsentierenden Liganden vor. Insgesamt resultierte die Mehrfachpräsentation in nur 29 Fällen aus einer oder mehreren Längenvarianten und in 4 Fällen aus Fragmenten, dafür aber 55 mal aus Liganden mit verschiedenen Peptidsequenzen.

In bezug auf ihre Gewebespezifität kann man die Quellproteine der auf RCC detektierten HLA-Liganden in verschiedene Gruppen einteilen: die Gruppe der Proteine, die bisher nur durch einen Liganden auf einem einzigen Gewebe präsentiert wurden, die Gruppe der RCC-spezifischen, die Gruppe der Primärgewebe-spezifischen und die Gruppe der universell auf verschiedenen Geweben und Zelltypen vorkommenden Quellproteine. Zu Primärgeweben zählen in diesem Fall Gewebeproben aus Glioblastomen, Oncocytomen, Colon-, Pancreas- und Urothelkarzinomen. Von 492 Quellproteinen konnte nur jeweils ein Ligand aus einem einzigen RCC-Gewebe detektiert werden, 141 Quellproteine wurden auf mehreren, jedoch ausschließlich RCC-Geweben identifiziert, 58 Quellproteine wurden auf mehreren, jedoch nur Primärgeweben identifiziert und Liganden der restlichen 362 Quellproteine wurden von vielen verschiedenen Gewebetypen präsentiert. Unter die letztgenannten Quellproteine fielen 62 Quellproteine, deren auf RCC-Geweben identifizierte Liganden zwar RCC-spezifisch waren, von denen jedoch

weitere Liganden anderer Sequenzabschnitte auf weiteren Geweben nachgewiesen worden waren. Eine Auflistung der nach den Kriterien RCC-spezifisch oder Primärgewebe-spezifisch eingeteilten Peptide und ihrer Quellproteine findet sich in den Tabellen 5.1 und 5.2 im Listenanhang.

Bei all diesen Angaben darf nicht übersehen werden, dass mit den eingesetzten Methoden nur abundante Peptide detektiert werden und die Tatsache, dass ein Peptid nicht detektiert wird, nicht bedeutet, dass es nicht präsentiert wird.

Von den 560 Quellproteinen, die durch mehrere Liganden präsentiert wurden, waren 7 Proteine, die mehrfach in nur einem Gewebe nachgewiesen wurden, 53 Proteine, die auf mehreren Geweben, zum Teil auch mehrfach präsentiert wurden, und 500 Proteine, die auf mehreren Geweben, auf den darin eingeschlossenen RCC-Geweben aber jeweils nur einmal vorkamen. Sechs der 48 EST-Sequenzen konnten auf mehreren Geweben, und zwar in allen Fällen auch nicht-RCC-Geweben, identifiziert werden.

Bei der Peptid-Analyse aller Proben wurde das Massenspektrometer so eingestellt, dass ein Peptid, das bereits detektiert worden war, für 60 Sekunden nicht erneut fragmentiert wurde. Damit sollte verhindert werden, dass ein Peptid mit besonders hohen Signalwerten und einem breiten Retentionszeitpeak dauernd zur Fragmentierung ausgewählt würde und andere Peptide mit weniger intensiven Signalen dadurch nicht fragmentiert bzw. detektiert würden. Die Tatsache, dass einige Peptide trotz dieser Einstellungen mehrfach auf einem Gewebe nachgewiesen wurden, spricht dafür, dass es besonders abundante Liganden waren. Man geht davon aus, dass ohnehin nur ein Bruchteil der Peptide, die tatsächlich präsentiert werden - schätzungsweise 10.000 verschiedene HLA-Liganden [547] mit einer Kopienzahl von 1-10.000, mit den eingesetzten Methoden und Geräten detektiert werden kann. Dazu zählen vor allem die besonders stark präsentierten Peptide mit hoher Kopienzahl.

#### 3.1.2.2 Allgemeine Analyse der Hauptquellproteine

Die Interpretation der bei der Betrachtung der identifizierten Liganden und ihrer zugrunde liegenden Quellproteine aufgeworfenen Fragen und Erkenntnisse ist entscheidend bei der Suche nach neuen Peptidvakzinen. Aber auch grundlegende Informationen zu den Zusammenhängen zwischen Ligandom und Proteom sowie Gewebespezifitäten können darüber gewonnen werden. Fragen, die in diesem Kontext auftauchen, sind beispielsweise: Welches sind die Haupt-Quellproteine, die wiederholt in einem oder verschiedenen Geweben auftauchen, und gibt es Gemeinsamkeiten in ihrer Funktion oder Lokalisation? Werden diese Haupt-Quellproteine bei gleicher Typisierung durch die gleichen oder durch verschiedene Liganden präsentiert? Gibt es Auffälligkeiten in den Sequenzabschnitten der Quellproteine, die durch Liganden präsentiert werden bzw. die gerade nicht präsentiert werden? Lässt sich also aufgrund von Quellproteinsequenzen vorhersagen, ob ein Protein präsentiert werden wird oder nicht? Oder wird die Präsentation einiger Quellproteine durch bestimmte HLA-Typisierungen und die dadurch vorbestimmte Ligandenauswahl eingeschränkt oder bevorzugt? Werden also beispielsweise sonst abundant präsentierte Quellproteine auf anderen Geweben aufgrund deren HLA-Typisierung gar nicht präsentiert? Wird bei mehreren Liganden pro Quellprotein die gesamte Proteinsequenz oder eine bestimmte Region, beispielsweise der N- oder C-Terminus, ein aktives Zentrum, Bereiche, die posttranslational modifiziert werden oder mit Bindungspartnern interagieren, abgedeckt? Werden die Quellproteine auf Klasse I- oder Klasse II-Molekülen oder sogar auf beiden präsentiert? Kann man aufgrund vergleichender Analysen aller in unserem Labor bekannten HLA-Liganden einen gewebespezifischen Pool an Liganden bzw. Quellproteinen feststellen? Weisen Gewebe mit einer großen Zahl an gemeinsamen iden-

tischen Quellproteinen noch weitere Gemeinsamkeiten auf, die sie von anderen Geweben unterscheiden, gibt es also eine Korrelation zwischen dem Ligandom bzw. dem durch das Ligandom präsentierten Proteom und weiteren Zell-spezifischen Eigenschaften? Weisen Quellproteine, die mehrfach auftreten, prominente Funktionen im Zellstoffwechsel oder im Kontext der Tumorummunologie auf? Finden sich Tumor-assoziierte Antigene unter den Quellproteinen und - wenn ja - befinden sie sich in der Gruppe der mehrfach oder der individuell präsentierten? Gibt es Tumor-assoziierte Antigene unter den Quellproteinen, die aufgrund ihres Genexpressionsprofils für eine Impfung in Frage kommen?

Nicht alle diese Fragestellungen werden hier erschöpfend bearbeitet und geklärt, zumal die statistische Analyse aufgrund der unterschiedlichen Ausbeuten und kleinen Anzahl zugrundeliegenden Gewebes mit verschiedenen histologischen Subtypen und HLA-Typisierungen erschwert wird. Einige der grundlegenden Fragen, vor allem in bezug auf die Antigenpräsentation, wurden ohnehin bereits ausgewertet und führten zu der Erstellung von Vorhersagematrices, die in der Dissertation von S. Tenzer ausführlich besprochen wurden [575] und in Datenbanken wie SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de/>) eingegangen sind. Auf andere Fragen wird im Verlauf der folgenden Diskussion beispielhaft eingegangen.

**Tabelle 3.4:** Universelle RCC-Hauptquellproteine. Quellproteine, die auf 10 oder mehr verschiedenen Geweben von RCC-Patienten (aber auch nicht-RCC-Geweben oder Zelllinien) präsentiert wurden. Aufgeführt sind die Namen und Abkürzungen aus der *Entrez Gene* Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>) [348] und ihr Genexpressionsprofil für die in diesem Labor untersuchten RCC-Gewebe (M = Median, R = Range).

universelle RCC-Hauptquellproteine	Entrez GeneID	RCC- Gewebe- Anzahl
<b>hemoglobin, beta (HBB)</b> (M 0,1; R 0,0 - 0,5)	3043	25
<b>vimentin (VIM)</b> (M 3,5; R 0,2 - 6,5)	7431	23
<b>adipose differentiation-related protein (ADFP)</b> (M 3,0; R 0,1 - 6,5)	123	21
<b>major histocompatibility complex, class I, A (HLA-A)</b> (M 1,0; R 0,5 - 2,1)	3105	19
<b>actin, beta (ACTB)</b> (M 1,6; R 0,6 - 4,3)	60	14
<b>major histocompatibility complex, class I, B (HLA-B)</b> (M 2,6; R 0,5 - 5,3)	3106	13
<b>spectrin, beta, non-erythrocytic 1 (SPTBN1)</b> (M 0,3; R 0,0 - 1,7)	6711	13
<b>ribosomal protein S27a (RPS27A)</b> (M 1,1; R 0,8 - 1,7)	6233	12
<b>aldolase A, fructose-bisphosphate (ALDOA)</b> (M 1,5; R 0,4 - 3,2)	226	11
<b>coatamer protein complex, subunit gamma (COPG)</b> (M 0,8; R 0,2 - 1,3)	22820	11
<b>signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor) (STAT3)</b> (M 0,6; R 0,3 - 1,1)	6774	11
<b>keratin 18 (KER18)</b> (M 0,8; R 0,3 - 3,0)	3875	11
<b>myosin, light polypeptide 6, alkali, smooth muscle and non-muscle (MYL6)</b> (M 0,7; R 0,3 - 1,5)	4637	11

Tabelle 3.4 – Fortsetzung

universelle RCC-Hauptquellproteine	Entrez GeneID	RCC- Gewebe- Anzahl
<b>clathrin, heavy polypeptide (Hc) (CLTC)</b> (M 1,2; R 0,8 - 2,0)	1213	11
<b>protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform (PPP1CA)</b> (M 0,7; R 0,4 - 1,1)	5499	10
<b>EH-domain containing 2 (EHD2)</b> (M 3,0; R 0,6 - 19,7)	30846	10

**Tabelle 3.5:** Spezielle RCC-Hauptquellproteine. Quellproteine, die auf 5 oder mehr verschiedenen Geweben von RCC-Patienten präsentiert wurden. Peptide aus diesen Proteinen konnten bisher auf keinem weiteren Gewebe detektiert werden. Aufgeführt sind die Namen und Abkürzungen aus der *Entrez Gene* Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>) [348] und ihr Genexpressionsprofil für die in diesem Labor untersuchten RCC-Gewebe (M = Median, R = Range).

spezielle RCC-Hauptquellproteine	Entrez GeneID	RCC- Gewebe- Anzahl
<b>annexin A4 (ANXA4)</b> (M 2,8; R 0,5 - 6,5)	307	7
<b>N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1)</b> (M 1,3; R 0,2 - 1,9)	10397	6
<b>solute carrier family 3 cystine, dibasic and neutral amino acid transporters, activator of cystine, dibasic and neutral amino acid transport, member 1 (SLC3A1)</b> (M 0,5; R 0,1 - 1,5)	6519	6
<b>caldesmon 1 (CALD1)</b> (M 0,8; R 0,4 - 1,7)	800	5
<b>complement component 1, q subcomponent, B chain (C1QB)</b> (M 9,8; R 0,8 - 55,7)	713	5
<b>EF-hand domain family, member D1 (EFHD1)</b> (M 0,1; R 0,0 - 0,7)	80303	5
<b>major histocompatibility complex, class II, DO alpha (HLA-DOA)</b> (M 1,6; R 0,4 - 5,7)	3111	5
<b>plexin B2 (PLXNB2)</b> (M 0,3; R 0,1 - 0,7)	23654	5
<b>Sec61 alpha 1 subunit (S. cerevisiae) (SEC61A1)</b> (M 0,9; R 0,4 - 2,3)	29927	5
<b>src family associated phosphoprotein 2 (SKAP2)</b> (M 2,0; R 0,5 - 4,6)	8935	5
<b>transmembrane protein 66 (TMEM66)</b> (M 1,4; R 0,7 - 3,5)	51669	5

In der Tabelle 3.4 sind exemplarisch jeweils die Hauptquellproteine, die auf 10 oder mehr verschiedenen RCC-Geweben, zum Teil aber auch noch weiteren Geweben präsentiert wurden, dargestellt. Sie werden im folgenden „universelle Hauptquellproteine“ genannt. In Tabelle 3.5 sind Quellproteine angegeben, aus denen Peptide auf 5 oder mehr verschiedenen RCC-Geweben, aber keinen anderen Gewebe- oder Zelltypen identifiziert wurden. Auf sie wird im folgenden als „RCC-spezifische Hauptquellproteine“ Bezug genommen. In den Tabellen 5.1 und 5.2 im Listenanhang finden sich die Listen der nur auf RCC- oder Primärgewebe identifizierten Peptide und der dazu gehörigen Quellproteine.

Um die Frage zu beantworten, ob die Quellproteine der identifizierten Peptide RCC-spezifische Besonderheiten aufweisen, wurde die Datenbank *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) 2007 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) [179], Rubrik *Gene Ontology* eingesetzt. Dabei wurde untersucht, an welchen funktionellen Kategorien basierend auf dem *Gene Ontology* (GO) Klassifizierungssystem [17] die untersuchten Quellproteine im Vergleich zu allen menschlichen Proteinen verstärkt beteiligt sind und in welchen zellulären Kompartimenten man sie besonders vorfindet. Hierfür wurden alle 91 auf mehr als 2 verschiedenen RCCs identifizierten Proteine der universellen Hauptquellproteine und alle 88 RCC-spezifischen Hauptquellproteine, die auf mehr als 2 verschiedenen RCCs präsentiert wurden, herangezogen. Zur Auswertung wurde immer dasjenige Level (nach einer vom *Gene Ontology Consortium* aufgestellten Pseudo-Hierarchie) ausgesucht, bei dem aus beiden Listen jeweils mehr als 80% aller Proteine in die sich ergebenden Funktions- oder Lokalisations-Kategorien fielen. Betrachtet wurden nur statistisch signifikante Ergebnisse mit einem p-Wert  $< 0,05$ . Dabei ergab sich eine einzige RCC-Quellprotein-spezifisch hochregulierte Eigenschaft: eine erhöhte RNA-Polymerase II Transkriptionsfaktor-Aktivität.

Setzt man demgegenüber die Liste sämtlicher auf mindestens zwei Geweben aller in unserem Labor identifizierten Quellproteine als Referenzpopulation ein und untersucht daraufhin die hochregulierten Eigenschaften der RCC-spezifischen Hauptquellproteine, kann kaum eine signifikante Hochregulation biologischer Prozesse und auch keine deutliche RCC-abhängige Kompartimentverteilung der Quellproteine festgestellt werden. Zumindest konnten in den Kategorien *Biological Process* und *Cellular Compartment* nie mehr als 80% aller RCC-spezifischen Proteine in eine der genannten Gruppeneigenschaften einbezogen werden. Allerdings wiesen die Kategorien *Biological Process* und *Molecular Function* jeweils eine deutliche Tendenz zu Ionentransport- und Ionenbindungsprozessen auf und die kompartimentelle Verteilung einen deutlichen Schwerpunkt zu Membranverankerung.

Setzt man dagegen die Liste aller auf mindestens drei RCCs identifizierten universellen Hauptquellproteine als Vergleichspopulation zur RCC-spezifischen Quellproteinliste ein, kann eine Hochregulation folgender biologischer Prozesse festgestellt werden: die DNA-abhängige Transkriptionsregulation, die DNA-abhängige Transkription und die Transkription des RNA Polymerase II Promotors. Allerdings wurden bei der Analyse der biologischen Prozesse höchstens 77% aller RCC-spezifischen Proteine in die Ergebnisaufstellung aufgenommen.

Insgesamt kann sich - wenn überhaupt - damit nur eine leichte Tendenz erhöhter Transkriptions- und wahrscheinlich auch Signalkaskaden-Aktivität, an denen membranverankerte Proteine und Ionen als Signalmoleküle beteiligt sind, in RCC-Geweben herleiten lassen. Diese Ergebnisse würden sich mit den Proteomanalysen einer RCC-Zelllinie von Seliger et al. [525] decken, bei denen 48% aller Quellproteine an der Expressionskontrolle beteiligt sind. Auch in diesem Fall wurden die Quellproteine durch die Elution und MS-Analyse MHC-gebundener Peptidliganden identifiziert. Die Ergebnisse klassischer Proteomanalysen von Tumorbiopsien und Serumproben aus RCC-Patienten, die in derselben Gruppe durchgeführt wurde, wies jedoch eine weitaus andere Verteilung der Funktionen der identifizierten Quellproteine auf.

Dies zeigt vor allem die Abhängigkeit der Ergebnisse von der eingesetzten Methode zur Identifizierung der Quellproteine, aber auch der eingesetzten Auswerteprogramme und Datenbanken auf. Ein weiterer wichtiger Faktor, der bei der Auswertung der Ergebnisse von Seliger et al. bedacht werden muss, ist die stark eingeschränkte Vergleichbarkeit der verschiedenen Ursprungsgewebe. Wie bereits in

der Dissertation von Tobias Krüger beschrieben [302], konnten bei der Analyse einer Zelllinie und des entsprechenden Tumorgewebes weniger als ein Viertel der identifizierten Liganden in beiden Geweben identifiziert werden. Ein weiterer limitierender Faktor ist die relativ geringe Reproduzierbarkeit der in dieser Arbeit eingesetzten massenspektrometrischen Analyse. Denn nach Untersuchungen von Nina Hillen ergeben zwei massenspektrometrische Läufe derselben Probe mit dem in dieser Arbeit eingesetzten Gerät nur 50 - 60% identische Peptidsequenzen [227].

Betrachtet man beispielhaft die kleine Gruppe der im Rahmen dieser Dissertation bearbeiteten Gewebe, wird ersichtlich, dass ein weiterer Punkt bedacht werden muss, nämlich die stark schwankenden Ausbeuten der untersuchten Gewebe. In den Geweben RCC180, RCC182 bzw. RCC195 konnten insgesamt jeweils nur zwei, sieben bzw. neun Quellproteine identifiziert werden. Unter dieser geringen Ausbeute befand sich in allen drei Fällen *hemoglobin, beta* (HBB, Entrez GeneID: 3043) RCC182 teilte sich außerdem mit vier weiteren der neun Gewebe das Quellprotein *vimentin* (VIM, Entrez GeneID: 7431). RCC195 präsentierte außerdem unter seinen wenigen Quellproteinen die Hauptquellproteine *actin, beta* (ACTB, Entrez GeneID: 60) (neben weiteren Aktin-Proteinen) und *adipose differentiation-related protein* (ADFP, Entrez GeneID: 123; im Folgenden als „Adipophilin“ bezeichnet).

In diesem Sinne war es eher auffällig, wenn in einem Gewebe eines der Hauptquellproteine *nicht* nachgewiesen wurde. In dieser kleinen Gewebegruppe konnte nur in RCC186 kein Hämoglobin nachgewiesen werden. Trotz der hohen Ligandenzahlen konnten in RCC231 und RCC307 kein Adipophilin-Ligand detektiert werden, und in RCC211 und RCC307 war kein Aktin nachweisbar. Dies findet seine Ursache wohl vor allem darin, dass bei großen Peptidausbeuten die Zahl weiterer abundanter Peptide steigt und damit schwächere Ligandensignale im Massenspektrometer durch Signale abundanter Liganden überlagert werden.

Die Präsentation eines Quellproteins auf mehreren Geweben bzw. die fehlende Detektion seiner Liganden auf anderen Geweben wird darüber hinaus sehr stark durch die HLA-Typisierung bedingt. Denn die HLA-Typisierung beeinflusst durch die Präferenz bestimmter Ankerreste die Auswahl an möglichen Liganden mit entsprechender Bindungsaffinität zu den jeweiligen HLA-Allelen.

Auf den 21 verschiedenen RCC-Geweben, in denen Adipophilin nachgewiesen werden konnte, war es durch 9 verschiedene Peptide auf 7 verschiedenen HLA Klasse I-Allelen präsentiert. Aber auch die RCC-spezifischen Hauptquellproteine waren meist durch mehrere Liganden und auf mehreren verschiedenen HLA-Allelen repräsentiert. Von *signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)* (STAT3; Entrez GeneID: 6774) konnten beispielsweise auf jeweils 4 verschiedenen HLA-Allelen 4 verschiedene Liganden nachgewiesen werden.

Die Kenntnis mehrerer Liganden eines Quellproteins ist im Kontext der Peptid-basierten Immuntherapie von besonderem Interesse, vor allem, wenn die Liganden verschiedene HLA-Allelen-Restriktionen aufweisen. Denn so können Patienten mit verschiedenen HLA-Typisierungen mit Peptiden aus den gleichen Quellproteinen geimpft werden.

Es gab aber auch Fälle unter den RCC-spezifischen Hauptquellproteinen, bei denen nur jeweils eine einzige Sequenz auf einem einzigen HLA-Allel detektiert werden konnte. Dazu zählten *caldesmon 1* (CALD1; Entrez GeneID: 800), *EF-hand domain family, member D1* (EFHD1; Entrez GeneID: 80303) und *Src family associated phosphoprotein 2* (SKAP2; Entrez GeneID: 8935), obwohl alle drei Proteine



auf jeweils fünf verschiedenen Geweben präsentiert wurden. Dies führt zu der Überlegung, ob etwa bestimmte Quellproteine Sequenzen aufweisen, die die Präsentation auf einer breit gefächerten Gruppe von HLA-Allelen einschränken. Mit den in dieser Arbeit eingesetzten Mitteln und Probenzahlen war diese Frage in keiner statistisch relevanten Form zu klären. In den meisten Fällen deckte sich jedoch die Zahl der verschiedenen Peptidsequenzen mit der Zahl der verschiedenen HLA-Allele, auf denen diese Sequenzen präsentiert wurden. Nur in einem einzigen Fall, bei dem Quellprotein HLA-DOA, wurde die gleiche Peptidsequenz auf drei verschiedenen HLA-Allelen (HLA-A\*03, -A\*11 und -A\*31) präsentiert. Viele der bisher in unserem Labor analysierten RCC-Gewebe tragen ein oder auch mehrere identische HLA-Allele. Man könnte also davon ausgehen, dass alle Gewebe mit Allelen, auf denen Liganden der RCC-spezifischen Hauptquellproteine detektiert wurden, diese Liganden auch präsentieren. Betrachtet man jedoch die Auswertung der RCC-spezifischen Hauptquellproteine und der HLA-Allele, auf denen die entsprechenden Liganden präsentiert wurden, so fällt auf, dass in fast nie mehr als 30% aller Gewebe mit den entsprechenden HLA-Allelen die darauf identifizierten RCC-spezifischen Liganden gefunden wurden bzw. fast nur in Fällen kleiner Fallgruppen mit nur zwei oder drei Geweben der gleichen Typisierung mehr als die Hälfte der Gewebe die entsprechenden Liganden präsentiert. Es ist naheliegend, dass bei Aufsummierung aller ein Quellprotein präsentierender Liganden und damit Vergrößerung der Gruppe der präsentierenden HLA-Allele die Gewebeabdeckung besser wird. Aber auch hier werden nur die drei Proteine *annexin A4*, *caldesmon 1* und *transmembrane protein 66* durch mehr als 50% aller aufgrund ihrer Typisierung in Frage kommenden Gewebe präsentiert.

Wie bereits erwähnt, heißt die Tatsache, dass ein Ligand nicht detektiert wurde, nicht, dass er nicht präsentiert wurde. Daher müssen diese Betrachtungen mit Vorsicht interpretiert werden. Allerdings weist die Tendenz der geringen Gewebeabdeckung trotz gleicher Typisierung darauf hin, dass auch die Zugehörigkeit zu den Hauptquellproteinen nicht den Schluss zulässt, dass ein Protein in jedem der Gewebe abundant präsentiert wird. Vielmehr lässt sich damit verdeutlichen, wie wichtig eine Patientenindividuelle Analyse des Gewebematerials zur Erstellung von Peptid-„Impfcocktails“ ist.

### 3.1.2.3 Besprechung einzelner Quellproteine

In Anlehnung an die Dissertation von Tobias Krüger [302] werden in der folgenden Besprechung individueller Quellproteine die identifizierten Peptide bzw. ihre Quellproteine in drei Gruppen eingeteilt:

1. „Selbstproteine“
2. „Etablierte Tumorantigene“
3. „Potentielle Tumorantigene“

Vorweg sollen jedoch noch zwei Ausnahmefälle angeführt werden, die nicht in diese drei Gruppen eingeordnet werden.

Das am öftesten detektierbare Quellprotein war *hemoglobin, beta* (HBB). Dies entspricht allgemeinen Daten aus unserem Labor. Danach steht Hämoglobin mit 28 verschiedenen Peptidsequenzen an Position 8 aller bisher identifizierten Quellproteine. In über 40% der untersuchten RCC-Gewebe konnte dieses Protein nachgewiesen werden. Es wurde durch 24 verschiedene Peptidsequenzen identifiziert, sieben davon als Klasse I- und 21 als Klasse II-Ligand, wobei in beiden Gruppen Längenvarianten vorkamen. Die Gesamtdatenbank aller in unserem Labor identifizierten Peptide weist Hämoglobin-assoziierte Peptide

fast ausschließlich auf Primärgewebe auf. Das Genexpressionsprofil von HBB zeigte bei den untersuchten Geweben keine erhöhten Expressionswerte (Median 0,1; Range 0,0 - 0,5; Median- und Range-Angaben beziehen sich hier und im Folgenden immer nur auf die untersuchten RCC-Gewebe und nicht auf die gesunden.). Daher ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um eine Kontamination handelt, die durch das stark durchblutete Tumorgewebe leicht zu erklären ist.

Dasselbe könnte auch für die Peptide aus Complement Faktoren gelten. Denn alle in unserem Labor bisher identifizierten Peptide aus den diversen Complement Proteinen kommen ausschließlich auf Primärgeweben, also nicht auf Zelllinien oder Suspensionszellen vor. Allerdings unterscheiden sich die Hämoglobin- von den Complement Proteinen deutlich darin, dass zum Beispiel das Genexpressionsprofil von *complement component 1, q subcomponent, B chain* (C1QB; Entrez GeneID: 713) eine starke Überexpression in Tumorgeweben aufweist (Median 9,8; Range 0,8 - 55,7).

**3.1.2.3.1 "Selbstproteine"** sind Proteine des allgemeinen Zellstoffwechsels, die meist konstitutiv in den meisten Zelltypen exprimiert werden und daher im Rahmen der tumorbasierten Immuntherapie keine Rolle spielen.

In Krebszellen ist die Expression von MHC-Molekülen oft herunterreguliert, eine Eigenschaft, die mit aggressiverem Wachstum korreliert [182, 226, 284]. In der Literatur wurde dieses Phänomen in 15 - 35% der Fälle beschrieben [75, 184, 284]. Bei den in unserer Abteilung untersuchten Geweben lagen die Genexpressionwerte nie höher als in weiteren untersuchten Normalgeweben (HLA-A: Median 1,0; Range 0,5 - 2,1. HLA-B: Median 2,6; Range 0,5 - 5,3. HLA-C Median 1,1; Range 0,7 - 2,3). Doch bei HLA-B fällt auf, dass die Expressionswerte in den Tumorgeweben in den meisten Fällen etwa zwei- bis drei-fach höher sind als im autologen Normalnierengewebe. Wie in den Tabellen 3.4 und 3.5 zu sehen ist, gehören HLA-Moleküle außerdem in den hier beschriebenen Analysen zu den häufigsten durch HLA-Liganden präsentierten Quellproteinen. Es ist nicht auszuschließen, dass dies auch an der Fragmentierung der eluierten MHC-Moleküle während der Aufarbeitung der Gewebe liegen kann. Denn MHC-Moleküle gehören auch auf allen anderen in unserem Labor analysierten Geweben zu den am häufigsten identifizierten Quellproteinen und belegen mit den drei Allelen B, A und C Platz 1-3 aller über HLA-Liganden identifizierten Quellproteine: *major histocompatibility complex, class I, B* mit 85 verschiedenen Peptiden, *major histocompatibility complex, class I, A* mit 60 Peptiden und *major histocompatibility complex, class I, C* mit 57 Peptiden. Auch histologische Untersuchungen zeigten, dass selbst HLA Klasse II-Moleküle abundant auf Tumorzellen exprimiert und präsentiert werden können [130].

Alle detektierten MHC Moleküle zusammen wurden durch 54 verschiedene Klasse I- und durch 22 verschiedene Klasse II-Liganden auf insgesamt 28 RCC-Tumorgeweben präsentiert. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die MHC-Moleküle bereits direkt nach ihrer Synthese und ihrem Transport ins ER dort oder auch im Lysosom abgebaut und ihre Fragmente auf weitere MHC-Moleküle beladen wurden. Hauptursache wird jedoch die Aufnahme gelöster extrazellulärer MHC-Fragmente sein; die Halbwertszeit von MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche beträgt einige Stunden und wird durch die Bindung mit dem Liganden und durch Interaktionen mit dem T-Zellrezeptor beeinflusst; löst sich der Ligand vom MHC-Molekül, so verringert sich auch dessen Stabilität, und es dissoziiert von der Zel-

loberfläche [92]. Daneben kann ein anderer Mechanismus die Aufnahme Membran-verankerter MHC-Moleküle durch Endocytoseprozesse sein. Dies kann unspezifisch geschehen oder gezielt beispielsweise als Flucht-Mechanismus [266, 356, 461, 524].

Ein weiterer Faktor, der zur Präsentation von MHC-Molekülen beiträgt, ist die Präsentation durch HLA-E. HLA-E ist ein nicht-klassisches MHC Klasse I-Molekül, welches von den NK Zell-Rezeptoren NKG2A (inhibierend) und NKG2C (aktivierend) sowie über den T-Zellrezeptor (TCR) erkannt wird. Es bindet vor allem Peptide aus der Signalsequenz anderer MHC Klasse I-Moleküle [316]. Liganden aus der MHC-Signalsequenz MAVMAPRTL L L L L L S G A L A L T Q T W A (Sequenz aus HLA-A\*01010101, leichte Abweichungen einzelner Aminosäuren in den verschiedenen Allelen sind möglich) werden daher mit großer Wahrscheinlichkeit auf HLA-E präsentiert. Dazu zählten in diesem Fall 4 Liganden auf 14 verschiedenen Geweben, die mit VMAPRT- begannen, vier Liganden, die mit APRT- begannen und auf vier verschiedenen Geweben präsentiert wurden, der Ligand APRALLLLL auf zwei und RV-MAPRALL auf vier Geweben, wobei jedoch die Möglichkeit besteht, dass diese Liganden auch von klassischen MHC-Molekülen präsentiert wurden.

Interessanterweise findet sich unter den RCC-Hauptquellproteinen auch das HLA-DO Protein *major histocompatibility complex, class II, DO alpha* (HLA-DOA, Entrez GeneID: 3111). Dieses Protein ist ein negativer Regulator der HLA-DM-vermittelten Peptid-Beladung von MHC Klasse II-Molekülen [602]. Es ist unwahrscheinlich, dass diese vermehrte Präsentation von HLA-DO auf einer erhöhten Konzentration beruht. Das Genexpressionsprofil weist jedenfalls keine erhöhte Expression auf (Median 1,6; Range 0,4 - 5,7). Außerdem würde bei erhöhter Konzentration, wie von van Ham et al. beschrieben, auch die Präsentation von CLIPs (*class-II-associated invariant chain peptide*) ansteigen [602]. Es ist daher wahrscheinlicher, dass es zu einem verstärkten Abbau von HLA-DO in RCC kommt.

*Beta-2-microglobulin* (B2M, Entrez Gene ID: 567) fällt fast unter die Gruppe der in unserem Labor meist identifizierten Quellproteine - mit 23 Peptiden steht es an Position 11 aller Quellproteine unserer Datenbank - und gehört damit zu den „Selbstproteinen“. Allerdings konnte keines der auf sechs verschiedenen RCC identifizierten Peptide bisher auf anderen Zell- und Gewebetypen detektiert werden. B2M zeigt Wachstums-stimulierende Aktivität [484] und ist als lösliches Protein in Serum und Urin bei verschiedenen Krebsarten in erhöhter Konzentration nachgewiesen und als prognostischer Faktor identifiziert worden [2, 72, 450]. Es ist nicht nur an der Antigenpräsentation in Zusammenhang mit MHC-Molekülen beteiligt. B2M stimuliert auch das Überleben und das Zellwachstum in RCC durch die Aktivierung von PKA/ CREB, als Signalmolekül für VEGF und über weitere Signalwege wie den PI3K/ Akt- und MAPK-Signalweg [397]. In RCC wurde laut Literaturangaben eine verstärkte B2M-Expression nachgewiesen [75, 184]. Dies konnte mit Genexpressionsanalysen aus unserem Labor jedoch nicht bestätigt werden (Median 1,0; Range 0,7 - 1,9).

Unter den „Selbstproteinen“ können sich auch Proteine finden, die als Tumormarker bekannt sind. Ein prominentes Beispiel hierfür ist eines der universellen Hauptquellproteine *vimentin* (VIM, Entrez Gene ID: 7431). Es wurde auf 23 der 61 untersuchten Gewebe identifiziert.

Vimentin ist ein Protein des Cytoskeletts und sowohl als diagnostischer und prognostischer Marker beim Nierenzellkarzinom [276, 370, 428, 538, 666] als auch als Autoantigen bei der Rheumatoiden Arthritis [31, 358] bekannt. Bei den hier untersuchten Geweben wurde Vimentin durch 24 verschiedene Liganden, darunter 2 Klasse II-Peptide präsentiert. Die Sequenz FGGPGTASRPSSS wurde sowohl auf Klasse I-

als auch auf Klasse II-Molekülen detektiert, und die zweite Klasse II-Sequenz YASSPGGVYATR wurde als längere Variante SLYASSPGGVYATR zwei mal als HLA-Klasse I-Ligand in zwei verschiedenen Geweben detektiert. Von der Sequenz FGGPGTASRPSS liegen außerdem kürzere Längenvarianten vor, die Klasse I-Liganden FGGPGTASRPSS und FGGPGTASRPS. Die meisten Längenvarianten wurden auf RCC186 identifiziert. Dabei ist jedoch aufgrund der Peptidlänge die Frage, ob es sich bei den Klasse I-Liganden nicht eher um eine Klasse II-Kontamination der Klasse I-Probe handelt, was bei der gemeinsamen Lyophilisierung der Proben im Anschluss an die Immunpräzipitation vorkommen kann. Eine relativ große Zahl an langen Peptiden in dem Lauf der Probe RCC186 legen diese Vermutung nahe.

Das Genexpressionsprofil von Vimentin zeigte in den untersuchten Proben eine Überexpression im Vergleich zur Normalniere (Median 3,5, Range 0,2 - 6,5). Aber auch vor allem dendritische Zellen, arterielles Gewebe und weitere Organe und Gewebe wiesen ähnlich hohe Werte auf (s. Abbildung 3.1.2.3.1).

Weitere Proteine unter den abundant präsentierten universellen Hauptquellproteinen, die zu den „Selbstproteinen“ gehören, waren Transkriptions- und Translations-assoziierte Proteine, wie das *ribosomal protein S27a* (RPS27A, Entrez Gene ID: 6233) und *signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)* (STAT3, Entrez Gene ID: 6774), außerdem Proteine, die an zellulären Membran- und Transport-assoziierten Prozessen beteiligt sind, wie *clathrin, heavy polypeptide (Hc)* (CLTC, Entrez Gene ID: 1213), der *coatomer protein complex, subunit gamma* (COPG, Entrez Gene ID: 22820) und *EH-domain containing 2* (EHD2, Entrez Gene ID: 30846) und vor allem Proteine des Cytoskeletts, wie *actin, beta* (ATCB, Entrez GeneID: 60), *spectrin, beta, non-erythrocytic 1* (SPTBN1, Entrez GeneID: 6711) oder *myosin, light polypeptide 6, alkali, smooth muscle and non-muscle* (MYL6, Entrez Gene ID: 4637).

Das *ribosomal protein S27a* (RPS27A) wird zunächst als ein Fusionsprotein mit Ubiquitin synthetisiert und erst posttranslational gespalten. Danach wird es zum Bestandteil der 40S-Unterheit des Ribosoms. Laut Literaturangaben konnte eine Überexpression des Fusionsproteins bei Darmkrebs festgestellt werden [33, 641]. In der Expressionsanalyse der hier beschriebenen Gewebe war jedoch keine RCC-abhängig erhöhte Expression feststellbar (Median 1,1; Range 0,8 - 1,7) und auch die abundante Präsentation (10 verschiedene HLA-Liganden auf 30 verschiedenen Geweben und Zelllinien), die in unserem Labor nachgewiesen wurde, weist auf keine Tumorassoziation hin.

*Clathrin heavy polypeptide* (CLTC) ist zwar bekannt für seine Wirkung auf die Internalisation des T-Zellrezeptors (TCR) in T-Zellen [116], jedoch ist nicht beschrieben, ob gleiches beispielsweise auch für den MHC:Peptid-Komplex in den Zielzellen gilt. Die Hauptfunktion von Clathrin ist in jedem Fall die Endocytose-Induktion über die *coated pit-* bzw. *coated vesicle*-Bildung [170, 419], wodurch natürlich auch MHC:Peptid-Komplexe internalisiert werden können. Dies würde die Tatsache erklären, warum in den Zellen, in denen Clathrin so häufig identifiziert werden kann, auch mehr als in anderen Zellen MHC-Moleküle zum Liganden-Pool beitragen. Laut Literaturangaben konnte Clathrin auch im Zellkern nachgewiesen werden [152]. Dort entfaltet CLTC keine Endocytose-Funktionen, sondern beeinflusst positiv die p53-abhängige Transkription. Ein verstärkter Abbau von CLTC in den Tumorzellen könnte diese Funktion unterbinden.

*Actin, beta* (ACTB) steht mit 35 Peptiden an Position 4 und ist nach den MHC-Molekülen das zweithäufigste Quellprotein aller in unserem Labor identifizierten Peptidliganden. Es ist eines von zwei Aktin Proteinen, die zu den nicht-muskulären cytoskelettalen Aktinen gehören. Weder aus der Literatur noch aus den Genexpressionsprofilen ist eine Tumorassoziation ersichtlich. Vielmehr gehört *actin, beta* zu den konstitutiven Strukturproteinen wie Vimentin, Spektrin und Myosin.

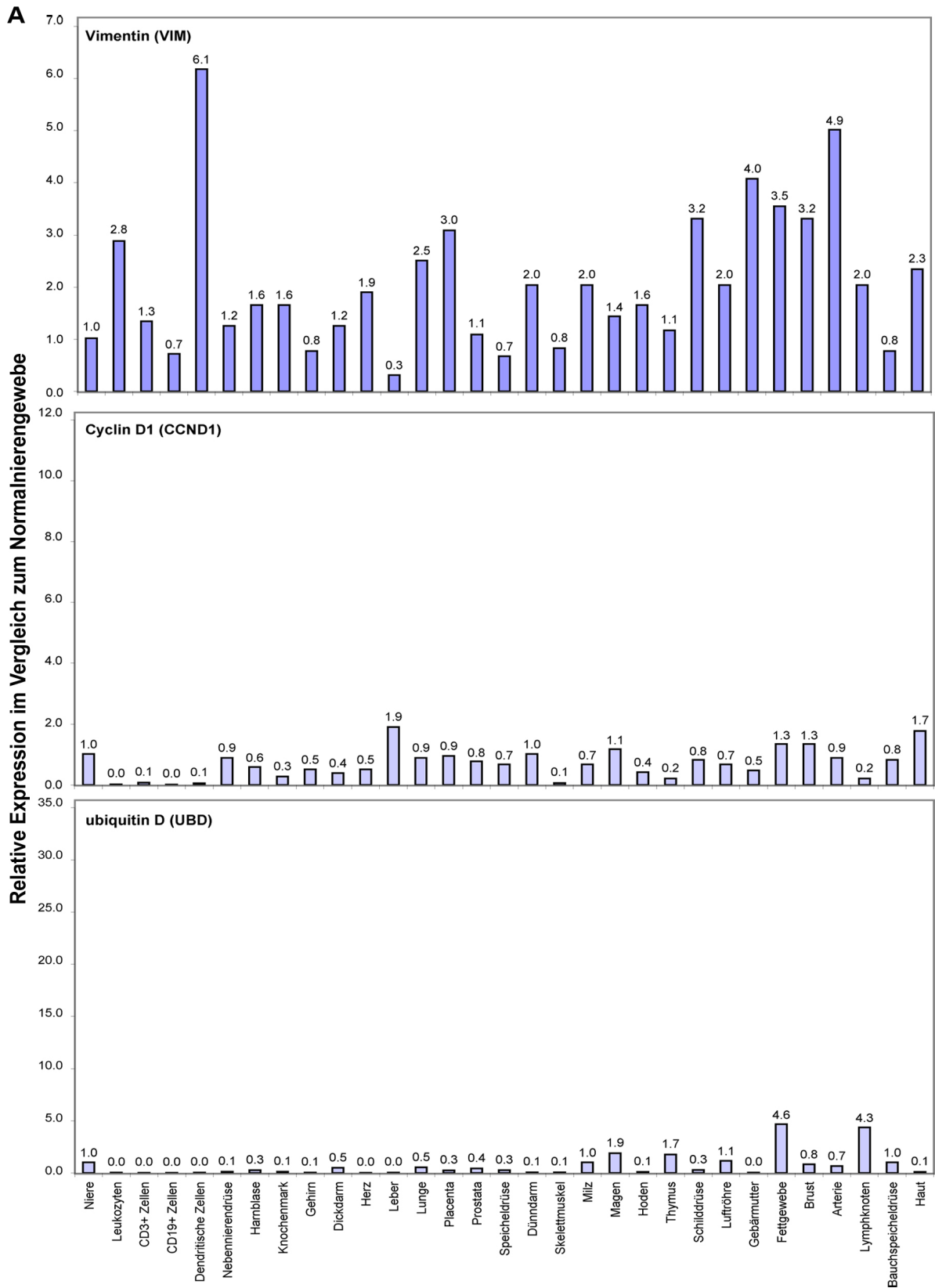
Auch das Glykolyse-Enzym *aldolase A, fructose-bisphosphate* (ALDOA, Entrez Gene ID: 226) befand sich unter den universellen Hauptquellproteinen. Es wird vor allem in der Leber, der Niere und im Dünndarm exprimiert. Erhöhte Expression scheint aber auch ein Biomarker für Karzinome zu sein, da ALDOA zusammen mit anderen Glykolyseenzymen im Serum eines Xenograftmodells mit menschlichen Prostatakarzinomzellen identifiziert werden konnte [599] und auch in Seren von RCC-Patienten erhöhte Mengen von ALDOA detektiert wurden [563]. Ebenso wurden Antikörper gegen ALDOA in Seren von Lungenkrebspatienten nachgewiesen [205].

*Signal transducer and activator of transcription* (STAT)-Proteine dienen als Transkriptionsaktivatoren, die auf Cytokine und Wachstumsfaktoren reagieren. STAT3 ist vor allem an zellulären Prozessen wie Wachstum und Apoptose beteiligt. In verschiedenen Krebsarten konnte ein erhöhtes Invasions- und Metastaserisiko auf erhöhte STAT3-Expression zurückgeführt werden [58, 344, 441]. Daher wird STAT3 auch als Onkogen eingestuft [65] und ist damit ein potentielles Tumorantigen für die Immuntherapie. Auch in RCC wurde STAT3 als ursächlich für erhöhte IL-6-bedingte Proliferation beschrieben [237]. In unseren Analysen konnten STAT3-Peptide bisher nur auf Primärgewebe, nicht jedoch auf einer Zelllinie oder anderen Gewebetypen detektiert werden. Die Expressionswerte wiesen jedoch in keinem Fall eine Veränderung im Vergleich zur Normalniere auf (Median 0,6; Range 0,3 - 1,1).

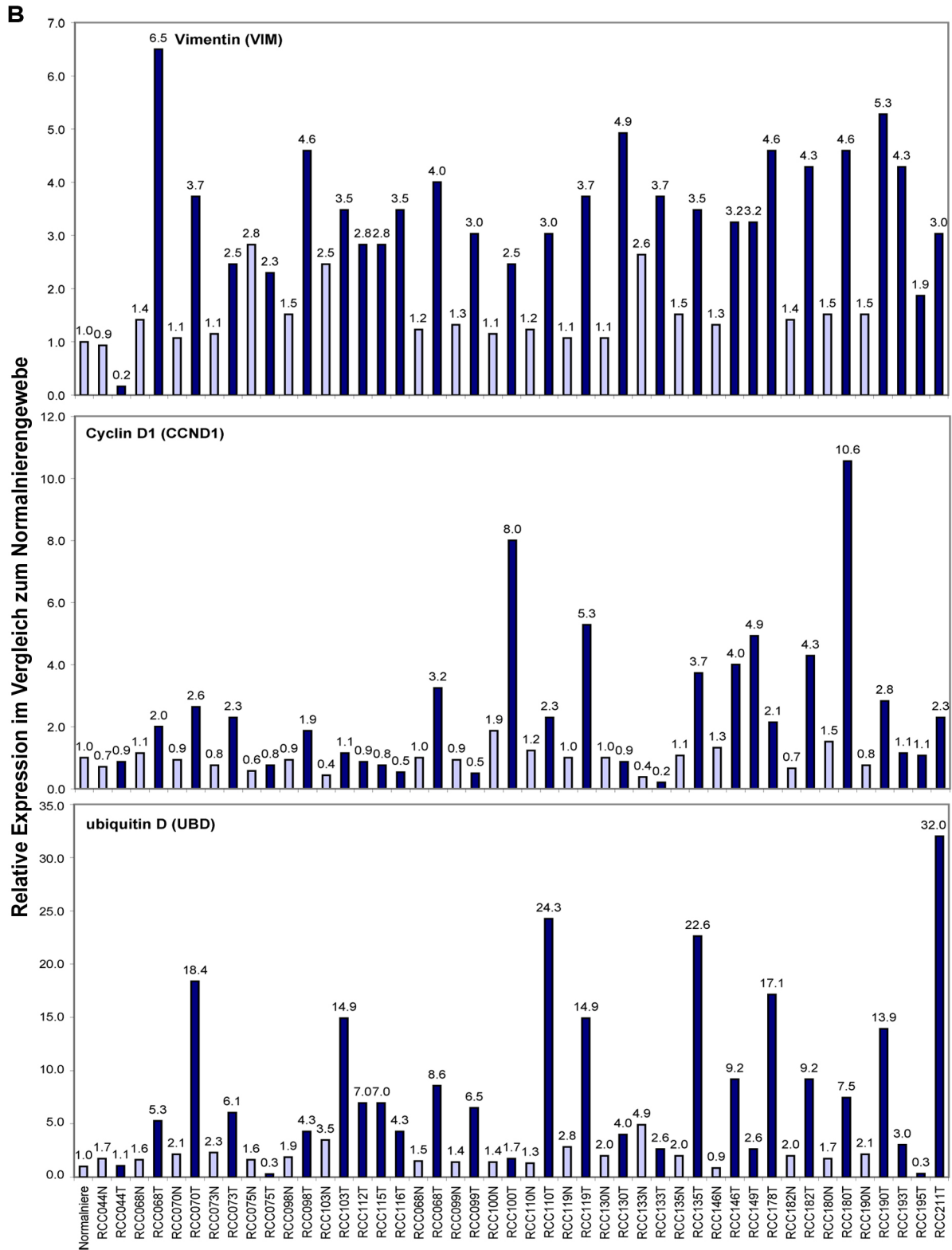
Auch unter den RCC-spezifischen Hauptquellproteinen gehörten die meisten Proteine zu den „Selbstproteinen“ und wiesen eine ähnliche Funktionsbandbreite auf wie die universellen RCC-Hauptquellproteine. Vor allem eine Assoziation mit Membranen und Transportfunktionen konnten nachgewiesen werden, zum Beispiel bei *annexin A4* (ANXA4, Entrez GeneID: 307), *solute carrier family 3 cystine, dibasic and neutral amino acid transporters, activator of cystine, dibasic and neutral amino acid transport, member 1* (SLC3A1, Entrez GeneID: 6519), *transmembrane protein 66* (TMEM66 Entrez GeneID: 51669) und *Sec61 alpha 1 subunit* (SEC61A1 Entrez Gene ID: 29927). Die Proteine *EF-hand domain family, member D1* (EFHD1 Entrez GeneID: 80303), *Src family associated phosphoprotein 2* (KAP2, Entrez GeneID: 8935) und das *N-myc downstream regulated gene 1* (NDRG1 Entrez GeneID: 10397) weisen Signalfunktionen auf. Nur ein Protein, *caldesmon 1* (CALD1, Entrez Gene ID: 800), stellte ein weiteres Protein des Cytoskeletts dar.

Liganden aus *annexin A4* (ANXA4) konnten bisher nur auf den Geweben von RCC001, RCC098, RCC100, RCC110, RCC189 und RCC307 identifiziert werden, jedoch auf keiner weiteren Zelllinie und keinem anderen Gewebe.

Die genaue Funktion der Annexine ist noch nicht ganz geklärt. Die meisten scheinen in Membran-abhängigen Prozessen, wie Endo- oder Exocytose, involviert zu sein. Über ANXA4 ist zusätzlich bekannt, dass es fast nur in Epithelzellen exprimiert wird. Eine Überexpression wurde in RCC und auch in



**Abbildung 3.3:** Exemplarische Darstellung der Genexpressionsprofile eines Selbstproteins (Vimentin), eines etablierten Tumorantigens (Cyclin D1) und eines potentiellen Tumorantigens (Ubiquitin D). In Abbildung A (linke Seite) sind die Normalgewebe, in Abbildung B (rechte Seite) die Tumor- und autologen Normalnierengewebe dargestellt. Fortsetzung s. Folgeseite.



In beiden Abbildungen sind zum Vergleich die Werte der Referenz-Normaliere eingeschlossen. Es wurden zwei verschiedene Chips, U133A und U133APlus, eingesetzt. Zur Vergleichbarkeit der Daten wurde die Expression von RCC068 auf beiden Chips analysiert. Alle Werte rechts der zweiten RCC068-Werte wurden auf U133APlus, alle anderen auf U133A gemessen.

anderen Tumorarten bereits beschrieben [529, 530, 674]. Dies konnte in einigen RCC-Geweben, vor allem bei RCC070, RCC149, RCC178 und RCC211, bestätigt werden (Median 2,8; Range 0,5 - 6,5). Auch die Gewebe, aus denen Liganden isoliert und Genexpressionsanalysen durchgeführt wurden - RCC098, RCC100 und RCC110, zeigen erhöhte Expression sowohl gegenüber der „Normalniere“ als auch ihrem autologen gesunden Nierengewebe. Von den Geweben RCC100 und RCC110 wurden jeweils Paarvergleiche bei der HLA-Ligandenanalyse mittels relativer Quantifizierung durchgeführt. Dabei wurde der Ligand DEVKFLTV, der aus RCC001, RCC100 und RCC110 im Tumorgewebe isoliert wurde, auch auf dem Normalgewebe von RCC100 detektiert.

Unter den gesunden Geweben liegen erhöhte Expressionswerte nur in der Harnblase (6,1) und Bauchspeicheldrüse (2,8) vor.

*Sec61 alpha 1* (SEC61A1) ist involviert in den Proteintransport in das ER. Während für SEC61G in unserem Labor eine Tumorassoziation im Glioblastom besprochen wurde [454], kommt SEC61A1 aufgrund seiner niedrigen Expressionwerte (Median 0,9; Range 0,4 - 2,3) dafür nicht in Frage.

*N-myc downstream regulated gene 1* (NDRG1) wird vor allem unter Stress- und Zellwachstumsbedingungen hochreguliert. Dabei steht es unter anderem unter dem Einfluss von Tumorsuppressoren wie p53 und PTEN [30, 543, 588], HIF1 [496] und Androgenen [594]. Eine Überexpression wurde bereits in mehreren Krebsarten beschrieben [30, 80] sowie eine negative Korrelation zwischen Tumordinvasivität und -Metastasierung und NDRG1-Expression [29, 30]. In den hier analysierten Geweben konnte eine Überexpression nicht nachgewiesen werden (Median 1,3; Range 0,2 - 1,9).

*Caldesmon 1* (CALD1) ist ein negativer Regulator der Podosomenbildung und damit von Zellinvasion [664]. In RCC wurde eine Überexpression von CALD1 beschrieben [567], die jedoch in unserem Labor nicht bestätigt werden konnte (Median 0,8; Range 0,4 - 1,7).

Auch wenn viele dieser Proteine im Kontext von Zellproliferation und Invasion als überexprimiert oder als Markerprotein in diversen Krebsarten beschrieben wurden, so stellen sie doch in ihrer Gesamtheit ein Netzwerk dar, das für die Homöostase und den allgemeinen Stoffwechsel der Zelle notwendig ist. Dadurch kommen sie für den Einsatz in der Peptid-basierten Immuntherapie nicht in Frage.

**3.1.2.3.2 „Etablierte Tumorantigene“** sind Tumor-assoziierte Antigene, die bereits als Quellen immunogener Peptide beschrieben wurden.

In Tabelle 3.6 werden alle bislang bekannten Tumor-assoziierten Antigene, die in RCC von T-Zellen erkannt wurden, aufgeführt. Eine ausführliche Auflistung aller Tumor-assoziierten Antigene mit bekannten T-Zellepitopen findet sich in der hier zugrundeliegenden Quelle, der „*Peptide Database*“ des Journals *Cancer Immunity* <http://www.cancerimmunity.org/peptidedatabase/potential.htm> und in den entsprechenden Referenzen von Novellino et al. und Parmiani et al. [398, 414, 601].

Im Folgenden werden einige der hier genannten Tumorantigene beispielhaft besprochen.



**Tabelle 3.6:** Etablierte Tumorantigene. Aufgeführt sind die Namen und Abkürzungen aus der *Entrez Gene* Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>) [348] und ihr Genexpressionsprofil für die in diesem Labor untersuchten RCC-Gewebe (M = Median, R = Range). \*diese T-Zellepitope wurden in unserem Labor als HLA-Liganden detektiert.

RCC-assoziierte Tumorantigene	Entrez GeneID	HLA-Restriktion	bekannte T-Zellepitope	Literatur	Anzahl in unserem Labor identifizierter HLA-Liganden (RCC-Gewebe, auf denen TAA-Liganden identifiziert wurden)
<b>v-abl</b> Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1 ( <b>ABL1</b> ) (M 0,5; R 0,2 - 0,9)	25	A*02 B*08 DR4, DR9	SSKALQRPV GFKQSSKAL ATGFKQSSKALQRPVAS	[665] [665] [350, 574]	1
<b>actinin, alpha 4 (ACTN4)</b> (M 0,8; R 0,4 - 1,7)	81	A*02	FIASNGVKLV	[147]	3 (RCC116)
<b>adipose differentiation-related protein (ADFP)</b> (M 3,0; R 0,1 - 6,5)	123	A*02	SVASTITGV*	[511]	10 (RCC001, RCC098, RCC099, RCC100, RCC103, RCC110, RCC112, RCC115, RCC186, RCC190, RCC195, RCC211, RCC399)
<b>baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin) (BIRC5)</b> (M 0,8; R 0,1 - 9,2)	332	A*02	ELTLGEFLKL	[512]	
<b>cancer/testis antigen 1B (CTAG1B)</b> (M 0,7; R 0,4 - 2,6)	1485	A*0201	SLLMWITQC	[251]	
<b>cancer/testis antigen 2 (CTAG2)</b> (M 0,4; R 0,3 - 0,9)	30848	A*02	MLMAQEALAFL u.v.a.	[1]	1
<b>carbonic anhydrase IX (CA9)</b> (M 4,6; R 0,2 - 34,3)	768	A*02 A*24 A*24 A*24 DR	HLSTAFARV EYRALQLHL AYEQLLSRL RYFQYEGSL EIHVVHLSTAFARVDEALGR	[608] [591] [591] [591] [609]	2 (RCC130)
<b>carboxylesterase 2 (CES2)</b> (M 0,5; R 0,1 - 1,6)	8824	B*07	SPRWWP TCL	[477]	
<b>catenin, beta 1 (CTNNB1)</b> (M 0,7; R 0,2 - 1,2)	1499	A*24	SYLDSGIHF	[467]	7 (RCC068, RCC099, RCC112, RCC193, RCC399)
<b>cell division cycle 27 homolog (CDC27)</b> (M 0,4; R 0,3 - 0,9)	996	DR4	FSWAMDLDPKGA	[621]	3
<b>chondroitin sulfate proteoglycan 4 (CSPG4)</b> (M 1,1; R 0,1 - 9,2)	1464	DR11	VGQDVSVLFRVTGALQ	[153]	1 (RCC100)
<b>cleavage and polyadenylation specific factor 1 (CPSF1)</b> (M 0,4; R 0,3 - 0,9)	29894	A*02 A*02	KVHPVIWSL LMLQNALTTM	[346] [346]	
<b>colony stimulating factor 1 (CSF1)</b> (M 1,6; R 0,5 - 16,0)	1435	B*35	LPAVVGLSPGEQEY	[435]	

Tabelle 3.6 – Fortsetzung

RCC-assoziierte Tumorantigene	Entrez GeneID	HLA-Restriktion	bekannte T-Zellepitope	Literatur	Anzahl in unserem Labor identifizierter HLA-Liganden (RCC-Gewebe, auf denen TAA-Liganden identifiziert wurden)
<b>cyclin D1 (CCND1)</b> (M 2,1; R 0,2 - 10,6)	595	DR4 A*02 A*02	NPPSMVAAGSVVAAV* RLTRFLSRV LLGATCMFV	[128] [489]	5 (RCC001, RCC149)
<b>cyclin-dependent kinase 4 (CDK4)</b> (M 0,9; R 0,5 - 1,5)	1019	A*02	ACDPHSGHFV	[640]	1 (RCC075)
<b>DEK oncogene (DNA binding) (DEK)</b> (M 0,4; R 0,3 - 0,9)	7913	DR53	TMKQICKKEIRRLHQY	[350]	2 (RCC075)
<b>doublecortin domain containing 2 (DCDC2)</b> (M 2,8; R 0,4 - 14,9)	51473	B*07	LPRWPPPQL	[155]	
<b>elongation factor Tu GTP binding domain containing 2 (EFTUD2)</b> (M 0,7; R 0,3 - 2,0)	9343	A*03	KILDAVVAQK	[321]	4 (RCC116)
<b>EPH receptor A3 (EPHA3)</b> (M 0,4; R 0,3 - 0,9)	2042	DR11	DVTFNIICKKCG	[99]	
<b>eukaryotic translation elongation factor 2 (EEF2)</b> (M 0,7; R 0,5 - 1,0)	1938	A*68	ETVSEQSNV	[232]	13 (RCC068, RCC075, RCC099, RCC110, RCC193, RCC211, RCC231)
<b>fibronectin 1 (FN1)</b> (M 2,0; R 0,2 - 97)	2335	DR2	MIFEKHGFRRTTPP	[618]	8 (RCC211)
<b>folate hydrolase 1 (prostate-specific membrane antigen) (FOLH1)</b> (M 0,9; R 0,1 - 10,6)	2346	A*24	NYARTEDFF	[238]	2 (RCC099, RCC199)
<b>glycoprotein nmb (GPNMB)</b> (M 0,4; R 0,3 - 0,9)	10457	A*03	TLDWLLQTPK	[321]	1 (RCC112)
<b>heat shock 70kDa protein 2 (HSPA2)</b> (kein Probeset)	3306	A*02	SLFEGIDIYT	[185]	14 (RCC068)
<b>insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3)</b> (M 6,1; R 1,0 - 13,9)	3486	DR	HSKIIIIKKGHAK*	[130]	5 (RCC098, RCC190)
<b>keratin 18 (KRT18)</b> (M 0,8; R 0,3 - 3,0)	3875	A*02	ALLNIKVKL*	[625]	13 (RCC001, RCC013, RCC073, RCC099, RCC100, RCC110, RCC119, RCC231, RCC307)
<b>matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine) (MMP7)</b> (M 2,1; R 0,2 - 18,4)	4316	DR	SQDDIKGIQKLYGKRS*	[130]	4 (RCC075, RCC098)
<b>melanoma antigen family A, 1 (MAGEA1)</b> (M 0,4; R 0,3 - 0,9)	4100	A*01	EADPTGHSY u.v.a.	[584]	2

Tabelle 3.6 – Fortsetzung

RCC-assoziierte Tumorantigene	Entrez GeneID	HLA-Restriktion	bekannte T-Zellepitope	Literatur	Anzahl in unserem Labor identifizierter HLA-Liganden (RCC-Gewebe, auf denen TAA-Liganden identifiziert wurden)
<b>melanoma antigen family A, 4 (MAGEA4)</b> (M 0,7; R 0,2 - 8,6)	4103	A*01 A*02 A*24 B*37	EVDPASNTY GVYDGREHTV NYKRCPFVI SESLKMIF	[293] [142] [359, 407] [673]	1
<b>met proto-oncogene (MET)</b> (M 13,0; R 0,7 - 32,0)	4233	A*02	YVDPVITSI*	[500]	1 (RCC001, RCC013)
<b>mucin 1, cell surface associated (MUC1)</b> (M 0,3; R 0,0 - 1,7)	4582	DR3 DR A*02 A*0201	PGSTAPPAHGVT PDTRPAPGSTAPPAHGVTSA LLLLTVLTV* STAPPVHNV*	[228] [255] [67] [13, 67]	1 (RCC121N)
<b>myosin IB (MYO1B)</b> (M 0,4; R 0,3 - 0,9)	4430	A*03	KINKNPKYK	[675]	1
<b>O-linked N-acetylglucosamine transferase (OGT)</b> (M 0,9; R 0,5 - 2,1)	8473	A*02	SLYKFSPFPL	[466]	3 (RCC098T)
<b>peroxiredoxin 5 (PRDX5)</b> (M 0,6; R 0,4 - 1,2)	25824	A*02	LLDDLLVSI	[527]	1
<b>preferentially expressed antigen in melanoma (PRAME)</b> (M 0,4; R 0,3 - 0,9)	23532	A*02 A*02 A*02 A*02 A*02	SLLQHLIGL ALYVDSLFFL VLDGLDVLL SLYSFPEPEA LYVDSLFFL	[271] [271] [271] [271] [245]	
<b>regulator of G-protein signaling 5 (RGS5)</b> (M 0,4; R 0,3 - 0,9)	8490	A*02 A*03	LAALPHSCL* GLASFKSFLK*	[56] [56]	3 (RCC075, RCC098, RCC115)
<b>renal tumor antigen (RAGE)</b> (M 0,4; R 0,1 - 1,6)	5891	A*02 A*02 B*08 B*07	LKLSGVVRL PLPPARNGGL PASKKTDPQK SPSSNRIRNT	[400] [400] [168] [186]	
<b>small nuclear ribonucleoprotein D1 polypeptide 16kDa (SNRPD1)</b> (M 0,9; R 0,4 - 1,5)	6632	B*38	SHETVIEL	[321]	1
<b>SRY (sex determining region Y)-box 10 (SOX10)</b> (M 0,6; R 0,1 - 2,0)	6663	A*02 A*02	AWISKPPGV SAWISKPPGV	[273] [273]	1
<b>tumor-associated calcium signal transducer 1 (TACSTD1)</b> (M 0,4; R 0,3 - 0,9)	4072	A*24	RYQLDPKFI	[560]	
<b>tumor protein p53 (TP53)</b> (M 1,2; R 0,3 - 2,6)	7157	A*02	VVPCEPPEV u.v.a.	[249]	1 (RCC307)
<b>ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 4 (UBR4)</b> (M 0,8; R 0,2 - 4,6)	23352	B*07	RPHVPESAF	[321]	3
<b>WD repeat domain 46 (WDR46)</b> (M 0,4; R 0,3 - 0,9)	9277	A*02	CQWGRLWQL	[480]	2

Tabelle 3.6 – Fortsetzung

RCC-assoziierte Tumorantigene	Entrez GeneID	HLA-Restriktion	bekannte T-Zellepitope	Literatur	Anzahl in unserem Labor identifizierter HLA-Liganden (RCC-Gewebe, auf denen TAA-Liganden identifiziert wurden)
<b>WT1</b> (M 0,2; R 0,0 - 2,0)	7490	A*24	CMTWNQMNL	[403]	
		DP5	LSHLQMHSRKH	[204]	
		DR4	KRYFKLSHLQMHSRKH	[174]	
		A*02	RMFPNAPYL	[139, 405]	
		A*01	TSEKRPFMCAY	[16]	

Ein prominentes Beispiel für ein „etabliertes Tumorantigen“ ist das RCC-Hauptquellprotein *adipose differentiation-related protein* (ADFP, Entrez Gene ID: 123). Es wurde auf 16 der 61 untersuchten Gewebe identifiziert.

Adipophilin ist ein Membran-gebundenes Protein, das an die Oberfläche von Lipidtröpfchen bindet [485, 572], ist an der Adipocyten-Differenzierung beteiligt [62, 256] und wird generell mit Lipidakkumulation und -metabolismus assoziiert [62, 180, 181, 221]. Auch die laktierende Mamma weist erhöhte ADFP-Expressionswerte auf [220]. Seine Expression kann durch Sauerstoffmangel induziert werden [487], und es stellt einen potentiellen diagnostischen und prognostischen Biomarker für das klarzellige Nierenzellkarzinom dar [657]. Genexpressionsanalysen in unserem Labor weisen keine relevant erhöhten Werte im gesunden Gewebe, dafür aber in den meisten Tumorgeweben auf (Median 3,0; Range 0,1 - 6,5).

ADFP kommt auffällig oft als HLA-Ligand vor. In unserem Labor konnten neun verschiedene ADFP-Peptide auf den HLA-Allelen A\*02, A\*03, A\*31, A\*68, B\*07, B\*27 und B\*50 identifiziert werden. Auf RCC001 und auf RCC098 wurden jeweils drei der neun insgesamt identifizierten Liganden aus Adipophilin detektiert. Während jedoch die drei Liganden aus RCC001, MAGDIYSVFR, MTSALPIIQK und SVASTITGV, auf keinem weiteren Gewebe nachgewiesen werden konnten, teilt sich RCC098 seine drei Liganden (IARNLTQQL, SLLTSSKGQLQK und TSALPIIQK) mit mehreren anderen Geweben. Nur in RCC112 konnte ein Ligand, VQKPSYYVR, gefunden werden, der seither nicht mehr nachgewiesen wurde. Die beiden weiteren Liganden, IESRTLAI A und VRLGSLSTK, wurden mindestens auf zwei Geweben nachgewiesen. Es ist bemerkenswert, dass das Adipophilin-Peptid IARNLTQQL einer von nur neun verschiedenen nachweisbaren Liganden auf RCC195 war. Auch auf einer Metastase eines RCC (RCC399M) konnte ein Adipophilin-Ligand gefunden werden, sowie auf dem korrespondierenden Tumorgewebe.

All diese Phänomene sprechen dafür, dass Adipophilin äußerst abundant auf der Zelloberfläche präsentiert wird und hiermit trotz der Expression auch in gesunden Geweben ein geeignetes Tumorantigen für die Peptidvakzinierung darstellt.

Bisher wurden in unserem Labor fünf Tumor- und Normalgewebe von RCC-Patienten in Paarvergleichen mittels relativer Quantifizierung analysiert. In zwei dieser fünf Gewebepaare, RCC099 und RCC110, konnte der Adipophilin-Ligand VRLGSLSTK sowohl in Tumor- als auch im korrespondierenden Normalgewebe identifiziert werden, jedoch in keinem weiteren Gewebe. Ein weiterer Ligand, SLLTSSKGQLQK, konnte in einer weiteren solchen Gewebepaaranalyse von RCC100 nur auf dem Tumorgewebe, aber nicht im dazugehörigen Normalgewebe identifiziert werden. Eine Korrelation zwischen

Genexpressions- und Peptidpräsentations-Verhältnissen lag in keinem der Fälle vor [628], jedoch wies das autologe Normalnierengewebe von RCC099 eine deutlich erhöhte Expression auf.

Eine weitere Einschränkung in der Eignung für die Peptidvakzinierung erfährt Adipophilin dadurch, dass auf einer EBV-transformierten B-Zelllinie in unserem Labor ein weiteres Peptid aus Adipophilin mit der Sequenz QKIQDAQDKLY gefunden werden konnte. Dieser Ligand wurde auf keiner weiteren Zelllinie und keinem weiteren Gewebe detektiert. Es besteht die Frage, ob die Präsentation von Adipophilin auf einer B-Zelllinie daraus resultiert, dass Adipophilin ein im normalen Zellstoffwechsel der Ursprungszellen benötigtes Protein ist, oder aber aufgrund von Veränderungen, die mit der EBV-Transformation oder Zellkultivierung einhergehen, erst in dem artifiziellen System der Zelllinie exprimiert wird.

Alle Sequenzen, ob die der B-Zelllinie, diejenige, die auf Tumor- und Normalgewebe oder die, die nur von einem einzigen RCC-Gewebe präsentiert wurden, finden sich völlig zufallsbedingt in der Gesamtproteinsequenz. Es kann also nicht davon ausgegangen werden, dass hier verschiedene Proteinbereiche in verschiedenem Gewebekontext präsentiert werden. Eine völlig uneingeschränkte Eignung als Vakzinierungsantigen kann dem Adipophilin damit nicht zugeschrieben werden. Bereits beschriebene T-Zellantworten gegen Peptid-beladene Zielzellen sowie ADFP-exprimierende Tumorzellen mit dem T-Zellepitop SVASTITGV [511], selbst im Fall einer Vakzinierung gegen andere Tumorantigene [634], unterstützen jedoch wiederum die Auswahl einzelner Peptide zur Impfung.

Vergleicht man das „Selbstprotein“ Vimentin und das „etablierte Tumorantigen“ Adipophilin, so sind hiermit zwei Beispiele abundant präsentierter Quellproteine genannt, die beide eine deutliche Tumorassoziation aufweisen, jedoch aufgrund ihrer Genexpressionsprofile unterschiedlich in ihrer Eignung als Vakzinierungsantigene eingestuft wurden. Dieser Unterschied wird außerdem dadurch unterstrichen, dass die Ligandenanalyse aller in unserer Abteilung untersuchten Gewebe Vimentin an Platz sechs der Quellproteine nach den MHC Klasse I- und zwei Aktin-Proteinen setzt. Identifiziert wurde es auf diversen Zelllinien und Primärgeweben. Während von Vimentin 33 verschiedene Peptidsequenzen detektiert werden konnten, wurden von Adipophilin 10 verschiedene Sequenzen identifiziert. Adipophilin kommt damit an Platz 63 aller über 3500 zum Zeitpunkt dieser Dissertation in unserer Abteilung identifizierten Quellproteine. Dies ist unter Berücksichtigung der Tatsache, dass Adipophilin fast ausschließlich auf RCC-Gewebe vorkommt, beachtlich.

Unter den universellen RCC-Hauptquellproteinen fand sich ein weiteres Antigen, das bereits als Tumorassoziiert und aus dem ein T-Zellepitop beschrieben wurde: *keratin 18* (KRT18, Entrez Gene ID: 3875). Während Vimentin vor allem in mesenchymalen Zellen vorzufinden ist, gehören Cytokeratine zu den Intermediärfilamenten von Epithelzellen. Die Koexpression dieser beiden Filamente führt zu verstärkter Zellbeweglichkeit und damit erhöhtem Metastasierisiko [104]. Während normale Zellen vor allem KRT5, KRT6, KRT7, KRT14 und KRT17 exprimieren, zählen KRT8, KRT18 und KRT19 zu den Tumorzell-spezifischen Cytokeratinen [583]. Sie werden von vielen Karzinomarten exprimiert und freigesetzt [548, 598]. Ein Fragment aus KRT18 ist das Tumorantigen Tissue-polypeptide-specific antigen (TPA) [46, 486, 624], das in Serum von Karzinompatienten zirkuliert. Vor allem in apoptotischen Zellen steigt die Konzentration von KRT18-Fragmenten, die durch erhöhte Caspaseaktivität entstehen [89, 306]. Aber auch in proliferierenden Zellen liegt vermehrt lösliches KRT18 vor [102]. Über einen

allgemein bekannten Expressions- oder Konzentrationsanstieg von KRT18 in RCC ist keine Angabe in der Literatur zu finden. Dafür konnten in unserem Labor KRT18-spezifische T-Zellen im normalen CD8 T-Zellrepertoire identifiziert werden [625].

Peptide aus diesem Protein konnten bisher nur auf Primärgewebe, einer aus RCC068 abgeleiteten Zelllinie und einer mit einem Ii-Keratin 18-Fusionsprotein transfizierten B-Zelllinie detektiert werden. Interessanterweise befanden sich die drei Liganden ALLNIKVKL, RLLEDGEDFNL und RYALQMEQL, die nur auf RCC-Gewebe und der RCC068-abgeleiteten Zelllinie präsentiert wurden, in dem Bereich, aus dem das TPA-Fragment resultiert (ca. Position 284-396), während die beiden anderen Liganden, RLASYLDRV und SHYFKIIEDLRAQL, die jeweils zusätzlich bzw. ausschließlich auf der mit dem Keratin 18-Ii-Fusionsprodukt transfizierten Zelllinie identifiziert wurden, außerhalb dieses Bereiches lagen. All diese Phänomene ließen die Keratin 18-Liganden, die auf RCC identifiziert wurden, als geeignete Vakzinierungspeptide für die Immuntherapie erscheinen, doch die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse boten keine eindeutige Grundlage für die Auswahl von Keratin 18 als Vakzinierungsantigen. Alle erzielten Werte wiesen ein „*absent*“ auf, was bedeutet, dass die Expressionswerte der jeweiligen *mismatch*-Sonden des Mikroarrays im Vergleich zu den *perfect match*-Sonden zu hoch waren, um die generierten Werte als spezifisch anzuerkennen. Betrachtet man gleichwohl das Ergebnis, so zeigten nur vier der analysierten Tumorgewebe Expressionswerte über denen der Normalniere (Median 0,8; Range 0,3 - 3,0). Im Gegensatz dazu konnte eine deutliche Überexpression in einigen autologen Normalnieregeweben und auch folgenden gesunden Geweben nachgewiesen werden: Leukocyten (13,0), Milz (9,8), Dünndarm (7,5), Luftröhre (6,1) und Harnblase (5,7).

Die Membran-gebundene *carbonic anhydrase IX* oder auch G250 (CA9, Entrez Gene ID: 768) wird seit einiger Zeit als spezifischer Marker für RCC eingestuft. Dabei wird diesem Antigen sowohl in prognostischer und diagnostischer als auch in therapeutischer Sicht eine wichtige Rolle zugesprochen [69, 330, 590]. In Maus-Experimenten wurde bereits erfolgreich mit Peptiden gegen RCC geimpft [532]. Auch in der Antikörper-basierten Immuntherapie wurden monoklonale G250-Antikörper in mehreren klinischen Studien eingesetzt [120, 310]. Der Einsatz CA9-Peptid-gepulster Dendritischer Zellen war bisher jedoch nicht erfolgreich [50].

In unserem Labor konnten bisher nur zwei HLA-Liganden aus CA9 isoliert werden, von denen einer, der Ligand QSPVALRPL, auf einer LCL-Zelllinie, der andere, der Ligand SPRAAEPVQL, auf RCC130 identifiziert wurde. Unsere Genexpressionsdaten decken sich mit in der Literatur bereits beschriebenen [310], wonach eine starke Tumor-spezifische Überexpression, jedoch auch eine Hochregulation in Epithelzellen der Magenschleimhaut nachgewiesen werden kann.

*Catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa* (CTNNB1, Entrez Gene ID: 1499) hat zahlreiche Interaktionspartner und Funktionen, als Zelladhäsionsmolekül vor allem aber auch in Zusammenhang mit dem Wnt-Signalweg [229, 336, 577]. Dabei kann  $\beta$ -Catenin als Transkriptions-Cofaktor auch onkogene Eigenschaften einnehmen [589]. All diese Eigenschaften erklären unter anderem den Zusammenhang von  $\beta$ -Catenin-Aktivitäten und der Onkogenese beim Nierenzellkarzinom [95, 424, 531, 586].

Sieben HLA-Liganden konnten aus  $\beta$ -Catenin in unserem Labor isoliert werden, vier davon auf RCC-Gewebe. Dabei war der Ligand AQNAVRLHY der einzige, der nur auf einem Tumorgewebe (RCC068) identifiziert werden konnte. Der Ligand TTSRVLKVL wurde sowohl auf Normal- als auch Tumorgewebe

von RCC099 nachgewiesen. Die Liganden TVGLIRNL und VGLIRNLAL wurden jeweils aus verschiedenen RCC-Geweben und Zelllinien, alle weiteren Liganden auf weiteren Zelllinien oder Primärgeweben isoliert. Die Tatsache der universellen Liganden-Präsentation spiegelt sich auch im Genexpressionsprofil von CTNNB1 wider. Hier kann weder in gesunden Geweben noch in RCC-Geweben eine Überexpression nachgewiesen werden.

*Cyclin D1* (CCND1, Entrez Gene ID: 595) reguliert vor allem den Übergang von der G1- in die S-Phase [458]. Dabei interagiert es auch mit dem Tumorsuppressorprotein Rb und kann auf diese Weise die Zellproliferation verstärken [211, 257]. Eine Überexpression ist demzufolge ein häufig beobachtetes Phänomen auch in RCC [219].

Insgesamt wurden in unserem Labor bisher fünf HLA-Liganden aus CCND1 isoliert. Die zwei HLA-Liganden DRVLRAML und ETIPLTAEKL konnten ausschließlich jeweils auf RCC149 und RCC001 identifiziert werden. Der Ligand NPPSMVAAGSVVAAV wurde auf einer mit dem Ii-CCND1-Fusionskonstrukt transfizierten B-Zelllinie nachgewiesen. Mit diesem Ligand wurden in unserem Labor auch erfolgreich T-Zell-Stimulationen durchgeführt [128]. Zwei weitere Liganden fanden sich auf einem Glioblastom und einer Melanomzelllinie. Viele der untersuchten Tumorgewebe wiesen im Genexpressionsprofil eine deutliche Überexpression auf. In fast allen Fällen lag die Expression über der des autologen Normalnierengewebes. In den gesunden Geweben konnte keine Überexpression nachgewiesen werden (s. Abbildung 3.1.2.3.1).

*Eukaryotic translation elongation factor 2* (EEF2, Entrez Gene ID: 1938) ist, wie der Name schon andeutet, an der Proteinbiosynthese und damit an universellen Zellprozessen beteiligt. In einigen Fällen wurde jedoch eine Assoziation mit verschiedenen Krebsarten beschrieben [107, 327]. Unter Sauerstoffmangel wird unter anderem die Translation von EEF2 herunterreguliert [335]. Bei der Genexpressionsanalyse wiesen weder die gesunden noch die Tumor- oder autologen Normalnierengewebe einen Expressionswert über 1,3 auf. Die Tatsache, dass HLA-Liganden aus EEF2 auf 8 RCC-Geweben nachgewiesen wurde, resultiert unter anderem wohl daraus, dass es eine zentrale Aufgabe in den meisten Zelltypen hat, denn auch auf 17 weiteren Zelllinien konnten EEF2-Liganden nachgewiesen werden.

*Insulin-like growth factors* (IGFs) stimulieren die Zellteilung und -differenzierung und haben damit auch einen Einfluss auf die Carcinogenese [200, 449]. Ihre Aktivität kann reguliert werden durch Bindeproteine (IGFBPs). Es wurde mehrfach beschrieben, dass erhöhte Expression von IGF1 und verminderte Expression von *Insulin-like growth factor binding protein 3* (IGFBP3, entrez Gene ID 3486) mit verstärktem Krebsrisiko bei Prostata-, Brust-, Lungen-, Leber- und colorektalen Karzinomen einherging [177, 243, 670]. In RCC-Zellen wurde dagegen eine erhöhte IGFBP3-Expression nachgewiesen [98, 562]. Dies deckt sich mit dem Genexpressionsprofil, das mit den hier untersuchten Geweben erstellt wurde. Danach weist IGFBP3 in fast allen untersuchten Tumorgeweben eine deutliche Überexpression über dem autologen Normalnierengewebe auf sowie gegenüber den meisten gesunden Geweben. Nur in der Placenta konnte eine relevante Überexpression (8,6) gegenüber Normalnierengewebe nachgewiesen werden. Die starke Hochregulierung dieses Antigens geht allerdings nicht mit einer deutlich vermehrten HLA-Präsentation einher. Von vier insgesamt in unserem Labor identifizierten HLA-Liganden aus IGFBP3 konnten bisher nur zwei auf RCCs nachgewiesen werden: der HLA Klasse II-Ligand HPLHS-

KIIIIKKGHAK auf RCC190 und der Ligand RPTLWAAAL auf RCC098, der von RCC068 abgeleitet und einer B-Zelllinie. Zwei weitere Längenvarianten des HLA Klasse II-Liganden wurden auf einem Urothelkarzinom identifiziert.

Matrix Metalloproteinasen (MMPs) sind wichtige Faktoren beim Abbau extrazellulärer Matrix und damit auch bei Invasionsvorgängen von Tumorzellen [287]. *Matrix metalloproteinase 7* (MMP7, Entrez Gene ID: 4316) wird als Reaktion auf Sauerstoffmangel oder mikrobielle Produkte von Zellen des angeborenen Immunsystems ausgeschüttet [74]. Neben dem angeborenen Immunsystem wurde es bisher hauptsächlich in Krebszellen nachgewiesen [637]. In den Krebsarten, in denen vermehrt IGF1 vorliegt, konnte MMP7 als Ursache dafür durch den verstärkten Abbau von IGFBP3 identifiziert werden [360]. In RCC wurden verstärkte Tumorentwicklung und Angiogenese auf eine erhöhte MMP7-Expression zurückgeführt [361].

Eine erhöhte Genexpression konnte auch bei einem Drittel der hier untersuchten Tumorgewebe nachgewiesen werden. Allerdings wiesen auch über die Hälfte der autologen Normalnierengewebe eine deutliche Hochregulation auf. Während damit in sieben Fällen die Expression im Tumorgewebe höher war als im entsprechenden autologen gesunden Nierengewebe, war in zwölf Fällen das Verhältnis genau umgekehrt. HLA-Liganden aus MMP7 wurden bisher vor allem auf Primärgeweben gefunden, zwei von den vier Liganden auf RCCs, FPNSPKWTSK auf RCC075 und SLFPNSPKWTSK auf RCC075, RCC098 und einer B-Zelllinie. Die beiden anderen Liganden auf jeweils einem Colon- und einem Urothelkarzinom.

*Mucin-1* (MUC1, Entrez Gene ID: 4582) ist ein glykosyliertes Phosphoprotein, das über eine Transmembrandomäne an der Oberfläche vieler Epithelzellen sitzt. Es besitzt extrazellulär eine 20 Aminosäure lange VNTR (*variable number tandem repeat*) Domäne [187, 314]. Je nach Zelltyp kann sowohl die Anzahl und Art an Glykosylierungen als auch an Tandemwiederholungen stark variieren [241, 497]. Eine Überexpression und auch veränderte Glykosylierungsmuster sind oft assoziiert mit Karzinomen, und bereits Ende der 80er Jahre wurden die ersten T-Zellreaktionen gegen das Tumorantigen MUC1 nachgewiesen - interessanterweise mit MHC-unrestringierten CTL [34]. Durch monoklonale Antikörper konnte gezeigt werden, dass in gesundem Gewebe eine Kernsequenz aus MUC1 wahrscheinlich durch Glykosylierungen maskiert wird, deren Epitop in Brust-, Lungen-, Darm- und Eierstock-Krebsgeweben detektiert werden konnte [73, 189].

Beide MUC1-Peptide, die im Rahmen klinischer Studien von unserem Labor eingesetzt wurden, liegen jeweils außerhalb der VNTR-Domäne mit der Kernsequenz PAPGSTAPPAHGVTSPDTR. Das Peptid LLLLTVLTV liegt am N-Terminus, das Peptid STAPPVHNV direkt im C-terminalen Anschluss an die VNTR-Domäne, beide jedoch im extrazellulären Bereich. Beide Sequenzen umfassen damit weder die immunogene Sequenz SAPDTRPAP, die von Anti-Brustkrebs- bzw. Anti-Ovarialkrebs-Antikörpern erkannt wird [647], noch das CTL-Epitop der VNTR-Kernsequenz [246].

Eine erhöhte Expression von MUC1 wurde in RCCs bisher nur mit immunhistochemischen Methoden beschrieben [176, 300, 322]. Bei Genexpressionsanalysen von Blasen- und Urothelkarzinomen konnte keine MUC1-Überexpression nachgewiesen werden [460]. Genexpressionsanalysen in unserem Labor wiesen auch keine relevante Überexpression von MUC1 in den untersuchten Geweben auf, und in den meisten Fällen lagen die Expressionswerte der autologen Normalnierengewebe über denen der entsprechenden Tumorgewebe. In den gesunden Geweben war lediglich eine Überexpression im Magen (3,5)



nachzuweisen. Die Sequenz des einzigen HLA-Liganden, der aus MUC1 - allerdings auf dem autologen Normalnierengewebe von RCC121 - nachgewiesen wurde, VVQLTLAFR, befindet sich C-terminal der VNTR-Region, jedoch noch im extrazellulären Bereich. Es bleibt jedoch zu hoffen, dass mit der Entwicklung von Nachweismethoden glykosylierter HLA-Liganden weitere Liganden aus MUC1 identifiziert werden können, nachdem eine Kolo-kalisation von MUC1-Glykopeptiden mit HLA Klasse I- und vor allem Klasse II-Kompartimenten nachgewiesen werden konnte [387].

Erhöhte Genexpressionswerte für *regulator of G-protein signaling 5* (RGS5, entrez Gene: 8490) in Herz, Lunge, Muskel und Dünndarm, vor allem aber in Arterien, die bereits früher beschrieben wurden [5, 522], konnten in Analysen in unserem Labor bestätigt werden (Arterien 22,6; alle weiteren Werte unter 5,3). In der Literatur ist beschrieben, dass die hohen Expressionswerte von RGS5 in arteriellem Gewebe auf die verstärkte Vaskularisierung des Tumorgewebes zurückzuführen seien und sich von Expressionswerten arterieller Gewebe aus gesunden Geweben deutlich unterscheiden [178]. Dies, die Tatsache, dass RGS5 generell als Angiogenesemarker beschrieben wurde [41] und die deutliche Überexpression in den meisten in unserem Labor untersuchten Geweben bildeten die Grundlage für die Auswahl der einzigen beiden in unserem Labor identifizierten HLA-Liganden aus RGS5, GLASFKS-FLK und LAALPHSCL, zu CTL-Stimulationsversuchen. Dabei kam es zu einer erfolgreichen Induktion von CTL-Antworten gegen beide Epitope [56]. Beide Liganden wurden jeweils nur auf RCC-Gewebe identifiziert, GLASFKSFLK auf RCC075 und RCC098 und LAALPHSCL auf RCC115.

Nach den dieser Arbeit zugrunde liegenden Auswahlkriterien von Antigenen bzw. Peptiden als Impfkandidaten müssen zwei bzw. idealerweise drei Kriterien erfüllt sein: Es sollten HLA-Liganden des entsprechenden Antigens, möglichst auch auf dem betreffenden Tumor, identifiziert worden sein. Das Genexpressionsprofil des Antigens sollte möglichst eine Überexpression im entsprechenden Tumor, vor allem aber *keine* relevante Überexpression im dazu gehörigen autologen Normalnieren- oder sonstigen gesunden Gewebe aufweisen. Die Auswahl kann außerdem positiv beeinflusst werden, wenn eine natürliche T-Zellreaktion gegen das betreffende Antigen bekannt ist. Das letztere Kriterium ist in Anbetracht des zeitlichen Aufwands der dafür nötigen Experimente jedoch zunächst keine zwingende Voraussetzung bei der Auswahl neuer Tumorantigene für die Immuntherapie.

Bei den etablierten Tumorantigenen sind per Definition bereits T-Zellreaktionen beschrieben und in allen Fällen der hier exemplarisch besprochenen Auswahl auch HLA-Liganden bekannt. Allerdings bestehen bereits hier einige deutliche Unterschiede zwischen den genannten Quellproteinen. Während ADFP und EEF2 mit jeweils 10 bzw. 13 verschiedenen Liganden auf 7 bzw. 5 verschiedenen Tumorgeweben nachgewiesen wurden, konnten von allen anderen Quellproteinen bisher nur ein oder zwei Liganden auf Tumorgewebe nachgewiesen werden. RGS5 ist dabei das einzige Quellprotein, von dem auf keinem anderen als RCC-Tumorgewebe HLA-Liganden isoliert wurden. Von MUC1 dagegen ist bisher nur ein einziger Ligand, und dieser auf dem autologen Normalnierengewebe eines RCCs, gefunden worden. Von allen anderen Antigenen wurden auch Liganden auf Zelllinien oder anderem Primärgewebe gefunden, wobei nur die Liganden von CA9 und CCND1 RCC-spezifisch waren. Da Zelllinien immer ein artifizielles System darstellen, lassen sie keine Rückschlüsse darauf zu, ob ein Antigen auch im Ursprungsgewebe der entsprechenden Zelllinie so stark präsentiert wird. Ein deutlich negativer Faktor bei der Auswahl

von Impfpeptiden ist jedoch der Fund von HLA-Liganden auf autologem Normalnierengewebe. Liganden aus ADFP, KRT18, CTNNB1, EEF2 und MUC1 wurden auch auf autologem Normalnierengewebe identifiziert. In diesem Fall sollte sich, falls sonst alle weiteren Kriterien für eine Auswahl eines Antigens als Vakzinierungskandidat sprechen, die Wahl auf alternative Liganden beschränken.

Betrachtet man die besprochenen Antigene in bezug auf ihre Genexpression, so kann man folgende vergleichende Analysen aufstellen:

Zunächst können die gesunden Gewebe daraufhin geprüft werden, dass keine Überexpression vorliegen soll. Dabei stellen nur CCND1, CTNNB1 und EEF2 vollkommen unbedenkliche Antigene dar. ADFP, CA9, IGFBP3, MMP7 und MUC1 weisen in einzelnen gesunden Geweben eine mehr oder weniger starke Überexpression auf. Je nach Gewebeart und Stärke der Überexpression müssen hier individuelle Entscheidungen über die Relevanz oder mögliche Einschränkungen getroffen werden. So kann zum Beispiel bei der Überexpression in geschlechtsspezifischen Organen ein Antigen prinzipiell als Vakzinierungskandidat in Frage kommen, nur eben spezifisch für Patienten des jeweils anderen Geschlechts. Kritisch aufgrund zum Teil sehr hoher und weit verbreiteter Überexpression oder fehlender spezifischer Expressionswerte waren die Genexpressionsprofile der gesunden Gewebe bei KRT18 und RGS5.

Der zweite Schritt in der Genexpressionsanalyse ist die Betrachtung der Tumor- und ihrer jeweiligen autologen Normalnierengewebe. Auch hier sind die Expressionswerte bei CTNNB1 und EEF2 unauffällig. Sie bewegen sich alle etwa auf dem Niveau der Normalniere. Die Expressionsprofile von ADFP, MMP7 und RGS5 weisen mit einzelnen Ausnahmen und die von CA9, CCND1 und IGFBP3 einschränkungslos deutliche Tumorassoziation auf. Im Gegensatz dazu weisen KRT18 und MUC1 wenn überhaupt nur im autologen Normalnierengewebe eine Überexpression auf.

Zusammenfassend lassen sich aus den HLA-Präsentations- und Genexpressions-Daten folgende Schlüsse ziehen:

Eindeutig ungeeignet für den Einsatz in der Immuntherapie ist das Antigen KRT18, zumindest solange keine spezifischen Expressionsdaten vorliegen, die die hohen, jedoch unspezifischen mittels Mikroarray erzielten Expressionswerte widerlegen.

Einen Sonderstatus nimmt das Antigen MUC1 ein. Sein Expressionsprofil weist zunächst keine relevante Überexpression in gesunden Geweben auf außer leicht erhöhte Werte im Magen. Dafür konnte bisher nur ein einziger Ligand auf autologem Normalnierengewebe sowie eine höhere Expression in den meisten autologen Normalnierengeweben im Vergleich zu den jeweiligen Tumorgeweben nachgewiesen werden. Es ist jedoch, wie bereits erläutert, aus vielen Krebsarten bekannt, dass MUC1 ein deutlich Tumor-assoziiertes Antigen ist. Seine Tumor-Assoziation wurde bisher jedoch vor allem durch Antikörperfärbungen nachgewiesen, bei denen Epitope erkannt werden, die in gesundem Gewebe durch Glykosylierungen maskiert werden. Das heißt, dass eventuell in allen Geweben gleichermaßen MUC1 exprimiert werden könnte, jedoch der Nachweis mit den entsprechenden Antikörpern nur in Krebsgeweben möglich ist. Dies würde die Ergebnisse unserer Genexpressionsanalysen erklären. Das Phänomen der variierenden Glykosylierungsmuster kann außerdem einen Einfluss auf die Antigenprozessierung und -präsentation haben, der dazu führt, dass mit unseren Methoden keine weiteren HLA-Liganden detektiert werden konnten. Die Tatsache, dass bereits vermehrt T-Zellreaktionen gegen MUC1 nachgewiesen werden konnten und MUC1-Peptide auch in klinischen Studien mit Peptid-gepulsten DCs erfolgreich

eingesetzt wurden [634], spricht jedoch insgesamt für den Einsatz von MUC1 in der Immuntherapie. Die Expressionsprofile von CTNNB1 und EEF2 sind nicht sehr überzeugend. Doch die Tatsache, dass bereits T-Zellreaktionen gegen beide Antigene beschrieben wurden, keine Überexpression in gesundem Gewebe nachgewiesen werden konnte und in beiden Fällen je zwei RCC-spezifische Liganden detektiert werden konnten, schließen beide Antigene als Impfkandidaten nicht prinzipiell aus. Andererseits werden beide Antigene mit jeweils sieben (CTNNB1) und 13 (EEF2) HLA-Liganden offensichtlich auch auf vielen anderen Geweben präsentiert, RCC-spezifische Liganden konnten nicht nachgewiesen werden. Daher ist die Eignung dieser beiden Antigene für die Immuntherapie fraglich.

Die Expressionsprofile von CA9, MMP7 und RGS5 sind für Vakzinierungsantigene nicht optimal. Bei MMP7 sind jedoch keine größeren Probleme zu befürchten, da eine Reaktion gegen Fettgewebe unwahrscheinlich ist und erhöhte Expressionswerte in der Harnblase oft in Expressionsprofilen RCC-assoziierter Antigene auftreten. Daher ist MMP7 ein guter Kandidat für die Immuntherapie, solange man nur in den Fällen impft, in denen das Tumorgewebe höhere Expressionswerte aufweist als das autologe Normalnierengewebe. Die Auswahl von CA9 als Impfantigen beruht vor allem auch auf vielen in der Literatur beschriebenen Phänomenen, bei denen CA9 eine deutliche Tumorassoziation aufweist. Aufgrund seiner Überexpression im Magen ist eine Auswahl jedoch nur mit gewisser Einschränkung auf diejenigen Gewebe zu empfehlen, in denen die Expression noch über der vom Magen liegt, was immer noch in fast der Hälfte der Gewebe zutrifft. Das Phänomen der Überexpression von RGS5 in arteriellem Gewebe kann in Anbetracht der Tatsache, dass zwei HLA-Liganden aus RGS5 bisher nur aus Tumorgewebe isoliert und gegen beide auch CTL-Antworten nachgewiesen wurden, bedeuten, dass im Fall einer Immuntherapie nicht nur erfolgreich das Tumorgewebe, sondern auch das Gefäßsystem des Tumors angegriffen wird. Der Einsatz dieses Antigens muss daher mit großer Vorsicht durchgeführt werden, kann aber auch durchaus erfolgversprechend sein.

Wie bereits erwähnt, stellen ADFP und IGFBP3 zwei Antigene dar, die geschlechtsspezifische Genexpressionsmuster aufweisen, ADFP vor allem in Placenta und Brustgewebe und IGFBP3 in Placenta und Gebärmutter. Die Placenta stellt für die Immuntherapie kein relevantes Gewebe dar und in der Gebärmutter weist IGFBP3 auch keine Expression über 3 im Vergleich zur Normalniere auf. Außerdem konnten aus IGFBP3 bisher nur HLA-Liganden aus Primärgewebe gewonnen werden. Daher wird dieses Antigen uneingeschränkt in der Immuntherapie eingesetzt. Von ADFP ist jedoch auch in der Literatur eindeutig eine Expression in der laktierenden Mamma beschrieben, so dass in diesem Fall von einer Impfung weiblicher Patienten abgesehen werden sollte.

Das eindeutig überzeugendste Tumorantigen in dieser Auswahl an Antigenen ist CCND1. Es weist keine Überexpression in gesunden Geweben auf, dafür eine deutliche Überexpression in Tumorgeweben. Bisher wurden nur HLA-Liganden aus CCND1 auf Primärgewebe identifiziert, von denen einer, NPPSMVAAGSVVAAV, auch als T-Zellepitop beschrieben wurde. Hiermit stellt CCND1 einen optimalen Kandidaten für die Immuntherapie dar.

Interessanterweise sind die Vakzinierungskandidaten IGFBP3, MMP7 und CCND1 neben KRT18 die einzigen Quellproteine innerhalb dieser Auswahl besprochener Antigene, aus denen auch HLA Klasse II-Liganden gefunden werden konnten.

**3.1.2.3.3 „Potentielle Tumorantigene“** sind Quellproteine, von denen jeweils HLA-Liganden isoliert wurden und deren Expressionsprofil in der Hauptzahl aller oder in individuellen RCCs die Kriterien

einer Zuordnung zu den TAA erfüllen, die aber noch nicht als tumorassoziierte Antigene bzw. gegen die noch keine T-Zellreaktionen beschrieben wurden.

Die Suche nach neuen Tumorantigenen kommt der Suche nach der sprichwörtlichen Stecknadel im Heuhaufen gleich. Die massenspektrometrische Analyse einer Gewebeprobe nach Immunpräzipitation der HLA-Moleküle und Aufreinigung der Peptide ergibt in den meisten Fällen und beim jetzigen Stand der Methoden eine Ligandenausbeute im dreistelligen Bereich. Im Idealfall befindet sich unter all diesen Peptiden einer Tumorprobe etwa eine Handvoll Sequenzen, deren Quellproteine eine Tumorassoziation möglich erscheinen lassen. Darunter wiederum sind mittlerweile oft bereits bekannte Kandidaten, also bereits etablierte Tumorantigene. Dies stellt bereits einen Erfolg dar, vor allem, wenn es sich um neue Liganden bekannter Tumorantigene handelt, im besten Fall mit neuen HLA-Restriktionen. Denn dadurch wird die Zahl der Patienten, die gegen solch ein Tumorantigen geimpft werden können, deutlich vergrößert. In nur sehr seltenen Fällen können auch neue potentielle Tumorantigene auf diese Weise identifiziert werden.

HLA-Liganden aus sieben der hier besprochenen „potentiellen Tumorantigene“ (s. Tabelle 3.7) wurden unter den im Rahmen dieser Dissertation bearbeiteten und analysierten Geweben (s. Tabelle 3.1) isoliert. Einige davon sind bereits in klinischen Studien zum Einsatz gekommen, mit anderen wurden T-Zell-Stimulationsversuche durchgeführt.

**Tabelle 3.7:** Potentielle Tumorantigene. Aufgeführt sind die Namen und Abkürzungen aus der *Entrez Gene* Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>) [348] und ihr Genexpressionsprofil für die in diesem Labor untersuchten RCC-Gewebe (M = Median, R = Range). n.a. = nicht annotiert - eine HLA-Allel-Zuordnung war in diesen Fällen nicht möglich. \*diese Peptide wurden in klinischen Studien eingesetzt. \*\*diese Peptide wurden für T-Zell-Stimulationsversuche eingesetzt.

RCC-assoziierte Tumorantigene	Entrez GeneID	HLA-Restriktion	Peptidsequenz	Anzahl in unserem Labor identifizierter HLA-Liganden (RCC-Gewebe, auf denen TAA-Liganden identifiziert wurden)
<b>Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 (ACSL4)</b> (M 1,6; R 04, - 7,0)	2182	A*03	KLFDHAVSKF*	5 (RCC075, RCC098, RCC211)
		Cw*0401	LFDHAVSKF	1
<b>Apolipoprotein L, 1 (ApoL1)</b> (M 6,5; R 1,1 - 55,7)	8542	B*07	VPNQKRLTLL*	2 (RCC075, RCC130)
		A*02	ALADGVQKV*	11 (RCC013, RCC068, RCC099, RCC110, RCC110, RCC130)
<b>Egl nine homolog 3 (C. elegans) (EGLN3)</b> (M 6,1; R 0,4 - 17,1)	112399	A*02	FLGENISNFL*	2 (RCC013, RCC115)
		B*13	KLHGGILRI	1 (RCC211)
		B*35	MPLGHIMRL	2 (RCC121, RCC193)
<b>melanoma antigen family D, 4B (MAGED4B)</b> (M 0,7; R 0,1 - 52,0)	81557	A*02	YIVPCLHEV**	1
		A*25	NIGDEALIGRW*	1 (RCC103)
<b>nicotinamide N-methyltransferase (NNMT)</b> (M 39,4; R 0,3 - 168,9)	4837	DR	EGLFSLVARKLSRP	1
		DR	SSTMANNGLFSLVARKLSRPL	1 (RCC226)
		A*24	YYMIGEQQKF**	3 (RCC013, RCC130, RCC231)

Tabelle 3.7 – Fortsetzung

RCC-assoziierte Tumorantigene	Entrez GeneID	HLA-Restriktion	Peptidsequenz	Anzahl in unserem Labor identifizierter HLA-Liganden (RCC-Gewebe, auf denen TAA-Liganden identifiziert wurden)
<b>Plexin B2 (PLXNB2)</b> (M 0,3; R 0,1 - 0,7)	23654	A*25	TVVERMLSNW	1 (RCC103)
		A*24, n.a.	TYTDRVFFL*	4 (RCC110, RCC130, RCC231, RCC307)
<b>ubiquitin D (UBD)</b> (M 7,0; R 0,3 - 32,0)	10537	A*24	YYTDIMHTL	1 (RCC231)
		B*5101	DANPYDSVKKI*	1
		B*35, B*5101	NPYDSVKKI*	4 (RCC135, RCC231)
<b>Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1)</b> (M 5,7; R 0,1 - 19,7)	7412	B*35	FPRDPEIEM	1 (RCC211)
		A*03	IIFARKANMK	1 (RCC211)
		A*03	QIDSPLNGK	2 (RCC211, RCC135)
		DR	TPESRYLAQIGDSVSLT	1 (RCC231)

*Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4* (ACSL4; Entrez Gene ID: 2182) ist eines der Antigene, die schon einmal in einer Impfstudie zum Einsatz kamen. In diesem Fall wurden jedoch Dendritische Zellen mit den zwei Peptiden KLFDHAVSKF und VPNQKRLTLL beladen und damit auch nur ein einziger Patient, RCC075, geimpft. Bei diesen Patienten zeigte das Genexpressionsprofil der Tumorprobe auch eine deutliche Überexpression sowohl gegenüber dem entsprechenden autologem Normalnierengewebe als auch gegenüber dem gesunden Gewebe. Nur in zwei weiteren Fällen, bei RCC119 und RCC133, konnte eine Überexpression im Tumorgewebe detektiert werden, die aber in beiden Fällen niedriger war als die Expression im autologen Normalnierengewebe. Aus diesen beiden Gewebeproben konnten auch keine ACSL4-Liganden gewonnen werden. Die beiden Peptide wurden aber auch auf anderen Geweben detektiert: KLFDHAVSKF auf RCC075, RCC098, RCC211, einer Zelllinie und einem Glioblastom, VPNQKRLTLL auf RCC075 und RCC130. Während in Leber- und Darmkrebs eine Überexpression von ACSL4 beschrieben wurde [81, 557], deutet das Genexpressionsprofil von ACSL4 nicht auf eine generelle Tumorassoziation in Nierenzellkarzinomen hin. Damit stellt dieses Antigen nur im Fall von RCC075 ein geeignetes Tumorantigen dar.

*Apolipoprotein L, 1* (ApoL1, Entrez GeneID: 8542) bindet an das Hauptapoprotein, Apolipoprotein A1, in *high density lipoproteins* (HDLs). Eine Tumorassoziation ist in der Literatur nicht beschrieben. In unserem Labor konnten jedoch zwei verschiedene HLA-A\*02-Liganden aus mehreren RCC isoliert werden, und auch das Genexpressionsprofil weist eine deutliche Tumorassoziation auf (Median 6,5; Range 1,1 - 55,7). In fast allen Tumorgeweben lagen die Expressionswerte deutlich über denen der autologen Normalnierengewebe. Eine relevante Überexpression in gesundem Gewebe konnte nur in Lunge (4,9) und Placenta (3,7) festgestellt werden. Erhöhte Expressionswerte von Leber (5,3) und Magen (3,7) waren gleichzeitig als „absent“ gekennzeichnet, also, wie bei Keratin 18, nicht spezifisch genug, um Rückschlüsse auf deren tatsächliche Expression zuzulassen. Es muss hinzugefügt werden, dass der Ligand ALADGVQKV auch in den autologen Normalnierengeweben von RCC099 und RCC110 gefunden wurde. Trotzdem wurden beide Peptide in Vakzinierungsstudien zum Teil erfolgreich eingesetzt.

Prolylhydroxylasen der *egl nine homolog* (EGLN)-Familie spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des *hypoxia inducible factors 1* (HIF-1). HIF-1 ist ein konstitutiv exprimierter Transkriptionsfaktor,

der sich aus einer alpha- und beta-Untereinheit zusammensetzt. Sauerstoff ist ein starker Einflussfaktor für HIF-1. Zum einen führt er zu einer verstärkten Polyubiquitinierung der regulatorischen Untereinheit HIF1 $\alpha$  durch das von Hippel-Lindau (VHL)-Protein. Zum anderen wird die Interaktion zwischen VHL und HIF-1 durch die post-translationale Hydroxylierung von HIF durch EGLN-Enzyme Sauerstoff-abhängig reguliert. Unter Sauerstoffmangelbedingungen oder bei einem defekten VHL nimmt die Abbaurate von HIF1 $\alpha$  daher ab. Dies führt zu Veränderungen des Zellstoffwechsels auf Transkriptionsebene. Zielgene von HIF-1 sind vor allem involviert in der Regulation der Angiogenese und des Zellwachstums [86, 279]. Das bedeutet, dass auch die EGLN-Enzyme wichtige regulatorische Funktionen bei der meist mit Sauerstoffmangel einhergehenden Cancerogenese einnehmen.

HLA-Liganden aus dem *egl nine homolog 3 (C. elegans)* (EGLN3, Entrez GeneID: 112399) wurden in unserem Labor bisher nur auf RCC-Gewebe und einer Zelllinie aus RCC068 gefunden. Eine RCC-spezifische Überexpression wurde bereits beschrieben [8] und konnte bei Genexpressionsanalysen in unserem Labor eindeutig bestätigt werden (Median 6,1; Range 0,4 - 17,1). T-Zell-Stimulationsversuche gegen den Liganden YIVPCLHEV aus der Zelllinie RCC068ZL wurden bereits durchgeführt, leider bisher ohne Erfolg [302].

Die bereits in 1.2.2 beschriebenen MAGE-Antigene gehören zu den ersten, die überhaupt als Tumorantigene beschrieben und gegen die T-Zellreaktionen nachgewiesen wurden [600]. Während jedoch die Isoformen A-C eine rein Tumor-spezifische Expression aufweisen, konnten die Isoformen D-H auch in normalem Gewebe nachgewiesen werden [101]. Über die Isoform *melanoma antigen family D, 4B* (MAGED4B, Entrez Gene ID: 81557) ist bekannt, dass sie im Gehirn, vor allem bei Glioblastomen exprimiert wird [499] und zu erhöhten Proliferationsraten in nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen führen kann [250]. Entsprechend konnte bei Genexpressionsanalysen in vier Tumorgeweben, RCC068 (52,0), RCC075 (13,0), RCC103 (18,4), RCC116 (11,3) sowie im Gehirn (48,5) und Uterus (13,9) eine deutliche Überexpression nachgewiesen werden. Auch viele weitere gesunde Gewebe wiesen hohe Expressionswerte auf. Jedoch waren diese Werte alle mit dem Zusatz „absent“ versehen. Da die Expression in der Gebärmutter ähnlich hohe Werte ausweist wie alle weiteren als „absent“ detektierten gesunden Gewebe, ist nicht eindeutig zu bestimmen, ob dieser Wert relevant ist oder nicht. Die Ergebnisse der Mikroarray-basierten Expressionsdaten wurden daher mittels quantitativer Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) überprüft und bestätigten dabei die deutlich erhöhten Expressionswerte im Gehirn, den Tumorproben und auch zwei Glioblastomen [304]. Daher wurde der in RCC103 identifizierte Ligand NIGDEALIGRW als Impfpeptid bei dem entsprechenden Patienten eingesetzt. Von einer allgemeinen Einsetzbarkeit ist jedoch aufgrund der Expressionswerte aller weiteren Tumorgewebe (außer RCC068, RC075 und RCC116) abzusehen.

Das Antigen *nicotinamide N-methyltransferase* (NNMT, Entrez Gene ID: 4837) ist ein Leberenzym, das für die Verstoffwechslung von Arzneimitteln und xenobiotischen Stoffen zuständig ist. Es wurde bereits beschrieben, dass NNMT in verschiedenen Krebsarten hochreguliert ist [331, 473, 648] und dass diese erhöhte Expression auf die Promotorregulation durch STAT3 zurückgeführt werden kann [581]. Auch in RCC wurde eine Überexpression von NNMT bereits beschrieben [656]. Dies konnte bei Genexpressionsanalysen in unserem Labor mit deutlich erhöhten Werten in fast allen Tumorgeweben bestätigt werden (Median 39,4; Range 0,3 - 168,9). Die Tatsache, dass NNMT seine Hauptaktivität im gesunden

Organismus in der Leber ausführt, führt allerdings dazu, dass auch die Leber sehr hohe Expressionswerte aufweist (84,4). Auch in T-Zell-Stimulationsversuchen konnten in unserem Labor keine spezifischen T-Zellen gegen NNMT generiert werden [301]. Da jedoch HLA-Liganden bisher nur auf Primärgewebe detektiert wurden - EGLFSLVARKLSRP auf einem Urothelkarzinom, SSTMANNEGLFSLVARKLSRPL auf RCC226 und YYMIGEQQKF auf RCC013, RCC130, RCC231 - das Expressionsprofil der Tumorgewebe eine so deutliche Tumorassoziation aufweist und dies auch in weiteren Quellen bestätigt wird, handelt es sich bei NNMT in jedem Fall um ein attraktives Tumorantigen für die Immuntherapie. Eine Peptidvakzinierung, die gegen alle NNMT-exprimierenden Gewebe gerichtet wäre, ist hierbei sicher nicht zu empfehlen. Doch aufgrund der Tatsache, dass NNMT krebsspezifisch post-translational modifiziert zu sein scheint [331], könnte beispielsweise eine gegen das modifizierte Antigen gerichtete Therapie mit spezifischen Antikörpern oder Fusionsproteinen erfolgversprechend sein.

Nur ein einziges der RCC-spezifischen Hauptquellproteine wurde bereits im Rahmen der hier besprochenen RCC-Impfstudien eingesetzt. Dabei handelte es sich um *plexin B2* (PLXNB2 Entrez Gene ID: 23654).

Plexine sind Transmembranrezeptoren, die besonders in neuronalem Verkehr und Zellmigration sowie bei der Proliferation und Zelldifferenzierung eine Rolle spielen und vor allem während bestimmter Entwicklungsstadien im Nervensystem und auch nicht-neuronalen Organen epithelialen Ursprungs exprimiert werden [127, 171, 202, 423, 643]. Auch Plexin B2 wurde mit proliferativen Zelltypen in Verbindung gebracht [555]. Zudem scheint es involviert zu sein in der T-Zellabhängigen B-Zellselektion und Gedächtnis- und Plasmazellentwicklung in Keimzentren [669]. Plexin B2 enthält in seinem extrazellulären Segment 3 Cystein-Cluster, die Homologien zu der Cystein-reichen Domäne des *c-met* proto-Onkogens (MET) aufweisen und ist, wie alle B-Plexine, durch Interaktion mit MET an der Regulation von Zellinvasion und Tumorwachstum beteiligt [108, 404]. In unserem Labor konnten bei Genexpressionsanalysen weder in gesundem noch in RCC-Gewebe spezifische Daten generiert werden - alle Expressionswerte waren als „*absent*“ markiert. Dieser Vermerk beruht darauf, dass durch Kreuzreaktionen mit unspezifischen Sonden höhere Werte erzielt wurden als mit spezifischen. Es konnte jedoch in keinem Gewebe eine Überexpression detektiert werden (Median 0,3; Range 0,1 - 0,7). Aufgrund seiner bekannten proliferationsfördernden Eigenschaften und der Tatsache, dass es auch in keinem gesunden Gewebe hochexprimiert vorliegt, wurde es als Impfpeptid bei RCC307 eingesetzt.

Ein weiteres Antigen, aus dem HLA-Liganden gewonnen werden konnten und dessen Genexpressionsprofil eine sehr deutliche Tumorassoziation auswies (s. Abbildung 3.1.2.3.1), war *ubiquitin D* (UBD, Entrez GeneID: 10537). Fettgewebe und Lymphocyten wiesen zwar auch eine Überexpression auf, doch die fiel im Vergleich zu den Expressionswerten der meisten Tumorgewebe kaum ins Gewicht. Bisher konnten allerdings nur zwei Peptide insgesamt in unserem Labor aus UBD identifiziert werden, und nur eines von beiden, NPYDSVKKI, auf RCC-Geweben, RCC135 und RCC231, und einer B-Zelllinie. Das UBD-Gen liegt in der MHC Klasse I-Genregion, daher ist seine Expression und Aktivität durch  $\text{IFN}\gamma$  und auch durch  $\text{TNF}\alpha$  induzierbar [337]. Unter UBD-Expression konnte eine erhöhte Apoptoserate nachgewiesen werden [443] sowie ein Ubiquitin-unabhängiger irreversibler proteasomaler Abbau von UBD-Fusionsproteinen [230]. Auch in anderen Tumorarten epithelialen Ursprungs wurde bereits eine erhöhte Expression beschrieben [315]. Aufgrund der eindeutigen Tumorassoziation wurde der auf

RCC-Geweben identifizierte Ligand als Impfpeptid ausgewählt und auch schon in klinischen Studien eingesetzt.

Unter den RCC-spezifischen Quellproteinen ist *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM1, Entrez GeneID: 7412) ein weiterer Kandidat, der viele der nötigen Eigenschaften für neue Tumorantigene erfüllt. VCAM1 ist ein endotheliales Adhäsionsmolekül, das normalerweise die Leukocytenwanderung zu Inflammationsherden induziert. Die Überexpression von VCAM1 auf Tumorzellen könnte einen effektiven Fluchtmechanismus darstellen, durch den sich der Tumor der T-Zellimmunität entzieht [332, 644].

Aus VCAM1 konnten auf drei verschiedenen RCCs vier verschiedene Liganden gewonnen werden, wobei RCC211 allein drei der Liganden präsentierte. Auf Expressionsebene konnte die in der Literatur beschriebene Überexpression von VCAM1 auf Tumorgewebe gegenüber autologem Normalnieren- und fast allen gesunden Geweben bestätigt werden (Median 5,7; Range 0,1 - 19,7). Allerdings war erwartungsgemäß auch die Expression in der Milz erhöht (4,9). Dies verhindert bisher den Einsatz von VCAM1-Peptiden in der Immuntherapie.

#### 3.1.3 Patienten-individuelle Peptidvakzine

Wie in Abschnitt 3.1.1 bereits erläutert, fand im Rahmen der erwähnten klinischen Studie eine Einteilung der Patienten in die zwei Studienarme URO und ONCO aufgrund ihres Stagings statt. Insgesamt wurden von den Patienten der im Rahmen dieser Dissertation analysierten Tumore zwei innerhalb des URO-Studienarms und zwei im Rahmen des ONCO-Studienarms behandelt.

Der Ansatz der klinischen Studie ist es, eine patienten-individuelle Immuntherapie durchzuführen. Dazu wurden Liganden- und Genexpressions-Analysen durchgeführt. Da die Fallzahlen der hier beschriebenen Patienten und der analysierten Gewebe sehr klein sind und die Studie zum Zeitpunkt der Beendigung dieser Dissertation noch nicht abgeschlossen war, können hier keine Schlüsse aus den beschriebenen klinischen Verläufen der Patienten gezogen werden. Im Folgenden wird lediglich auf die eingesetzten sogenannten „Impfcocktails“ eingegangen.

Zuvor sollen die Angaben zum *Staging* der Patienten aus Tabelle 3.1 etwas näher erläutert werden, da sie die Grundlage für die Einteilung in die beiden oben genannten Studienarme bildeten. In den URO Studienarm wurden nur Patienten mit fortgeschrittenem RCC aufgenommen, wenn sie metastasenfrem waren. In den ONCO-Studienarm wurden Patienten mit fortgeschrittenem metastasiertem RCC aufgenommen, wobei die Diagnose der Metastasen metachron, also frühestens sechs Monate nach Diagnose des Primärtumors erfolgt sein durfte.

Bei den Patienten RCC103 und RCC307 führte das TNM-*Staging* zur Einteilung in den URO-Studienarm, da beide Patienten metastasenfrem waren. Patient RCC180 hatte bereits zuvor ein Nierenzellkarzinom gehabt, gefolgt von einigen Metastasen. Das in Tabelle 3.1 angegebene *Staging* bezieht sich auf ein Rezidiv in der zweiten Niere. Gleichzeitig trat eine metachrone Lungenmetastase auf, daher wird, falls dieser Patient seine Bereitschaft dazu äußert, die jedoch zum Zeitpunkt dieser Dissertation noch nicht vorlag, dieser Patient dem ONCO-Studienarm zugeteilt. Bei Patient RCC182 liegen keine Angaben zu Fern- oder Lymphknotenmetastasen beim Primärtumor-*Staging* vor. Aufgrund eines Lokalrezidivs und gleichzeitiger metachroner Lungenmetastase wurde auch dieser Patient in den ONCO-Studienarm eingeteilt. Die Patienten RCC186 und RCC193 wiesen beide Lungenmetastasen auf, Patient RCC193



zudem eine Hepatitis B. Beide Patienten verstarben, bevor sie in eine Studie hätten aufgenommen werden können. Bei den Patienten RCC195 und RCC211 lagen keinerlei Angaben zu Lymphknoten- bzw. Fern- und Lymphknoten-Metastasen beim *Staging* vor. Patient RCC195 hat sich gegen eine Aufnahme in die klinische Studie entschieden. Patient RCC211 ist wegen einer metachronen Lebermetastase in den ONCO-Studienarm aufgenommen worden. Patient RCC231 hatte bereits zuvor eine Nephrektomie aufgrund eines RCCs gehabt. Auf diesen Primärtumor beziehen sich die *Staging*-Angaben. Aufgenommen wurde dieser Patient als RCC231 jedoch mit einem Lokalrezidiv und metachronem Lungen- und Leberbefall. Auch dieser Patient hat sich gegen die Aufnahme in die klinische Studie entschieden.

Der einzige Patient, der ohne Progress alle 18 Vakzinierungen empfangen hat, war Patient RCC103. Der Patient RCC307 wies zum Abschluss dieser Dissertation noch einen stabilen Zustand auf, die Impfungen waren jedoch noch nicht abgeschlossen. Die Patienten RCC182 und RCC211 waren fast bis zum Schluss stabil, RCC211 entwickelte aber nach der letzten Vakzinierung eine allergische Reaktion, RCC182 musste aufgrund eines progredienten Zustands nach der 17. Vakzinierung aus der Studie genommen werden, da Krankheitsprogress ein Ausschlusskriterium der Impfstudie darstellt.

Im Folgenden sind die für die einzelnen Patienten ausgewählten Impfpeptide aufgeführt. Dabei fand die Auswahl nach den in Abschnitt 3.1.2.3.2 erläuterten Kriterien der HLA-Präsentation und genetischen Überexpression statt. Die ausgewählten Peptide wurden dabei im Idealfall auf dem autologen Tumorgewebe identifiziert, wie im Fall der Klasse I-Liganden aus RCC103 (s. Tabelle 3.8).

Zusätzlich wurden Peptide ausgewählt, die entweder aus Geweben anderer Patienten isoliert worden waren oder als etablierte Tumorantigene beschrieben waren und die natürlich zu der HLA-Ausstattung des entsprechenden Patienten passen mussten, bei dem sie eingesetzt wurden. So wurden beispielsweise in dem Gewebe von RCC182 keine für die Immuntherapie geeigneten Peptide gefunden. Da dieser Patient aber die in der kaukasischen Population häufigen Allele A\*03 und B\*07 trägt, für die in unserem Labor viele Tumor-assoziierte Liganden bekannt sind, wurde für ihn ein Impfcocktail mit mehreren HLA-A\*03- und -B\*07-restringierten Peptiden zusammengestellt (s. Tabelle 3.8).

**Tabelle 3.8:** Impfpeptide für die Nierenzellkarzinompatienten RCC103, RCC182, RCC211 und RCC307. Angegeben ist zu jedem Patienten seine HLA-Typisierung und die jeweilige Einteilung in den Studienarm ONCO oder URO (genauere Erläuterungen s. Text). Zu den Quellproteinen der Impfpeptide wurden Namen und Abkürzungen aus der *Entrez Gene* Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>) [348] entnommen. Als Quellgewebe sind diejenigen Gewebe aufgeführt, aus denen in unserem Labor die entsprechenden Liganden isoliert wurden (B-ZL = B-Zelllinie, Awells-Ii-CCND1 = B-Zelllinie transfiziert mit Ii-CCND1-Fusionskonstrukt, TCC = Urothelkarzinom, RCC-ZL = Zelllinie aus Nierenzellkarzinom-Gewebe, CCA-ZL = Zelllinie aus Colonkarzinom-Gewebe). Fettdruck bei Isolierung des Liganden aus dem Gewebe desjenigen Patienten, der mit diesem Peptid geimpft wurde.

Peptidsequenz	HLA-Restriktion	Quellprotein	Quellgewebe
<b>RCC103, A*11, A*25, B*15, B*44, URO</b>			
GQYGNPLNK	A*11	ADAM metalloproteinase domain 10 (ADAM10)	B-ZL
TSALPIIQK	A*11	adipose differentiation-related protein (ADFP)	RCC098, <b>RCC103</b> , RCC115, RCC186, RCC211

### 3 Ergebnisse und Diskussion

NIGDEALIGRW	A*25	melanoma antigen, family D, 4 (MAGED4B)	<b>RCC103</b>
NPPSMVAAGSVVAAV	DR	cyclin D1 (CCND1)	Awells-Ii-CCND1
HSKIIIIKKGHAK	DR	insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3)	TCC
SQDDIKGIQKLYGKRS	DR	matrix metalloproteinase 7 (MMP7)	(Längenvariante auf RCC190) TCC
<b>RCC182, A*03, A*30, B*07, B*40, ONCO</b>			
SLLTSSKGQLQK	A*03	adipose differentiation-related protein (ADFP)	RCC098, RCC100, RCC115
TSALPIIQK	A*03	adipose differentiation-related protein (ADFP)	RCC098, RCC103, RCC115, RCC186, RCC211
SLFPNSPKWTSK	A*03	matrix metalloproteinase 7 (MMP7)	RCC075, RCC098, B-ZL
GLAFKSFLLK	A*03	regulator of G-protein signaling 5 (RGS5)	RCC075, RCC098, B-ZL
IARNLTQQL	B*07	adipose differentiation-related protein (ADFP)	RCC098, RCC195
SPRAAEPVQL	B*07	carbonic anhydrase IX (CA9)	RCC130
RPTLWAAAL	B*07	insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3)	RCC098, RCC-ZL, B-ZL
NPPSMVAAGSVVAAV	DR	cyclin D1 (CCND1)	Awells-Ii-CCND1
HSKIIIIKKGHAK	DR	insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3)	TCC
SQDDIKGIQKLYGKRS	DR	matrix metalloproteinase 7 (MMP7)	(Längenvariante auf RCC190) TCC
<b>RCC211, A*03, B*13, B*35, ONCO</b>			
SLLTSSKGQLQK	A*03	adipose differentiation-related protein (ADFP)	RCC098, RCC100, RCC115
TSALPIIQK	A*03	adipose differentiation-related protein (ADFP)	RCC098, RCC103, RCC115, RCC186, <b>RCC211</b>
SLFPNSPKWTSK	A*03	matrix metalloproteinase 7 (MMP7)	RCC075, RCC098, B-ZL
GLAFKSFLLK	A*03	regulator of G-protein signaling 5 (RGS5)	RCC075, RCC098, B-ZL
NPPSMVAAGSVVAAV	DR	cyclin D1 (CCND1)	Awells-Ii-CCND1
HSKIIIIKKGHAK	DR	insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3)	TCC
SQDDIKGIQKLYGKRS	DR	matrix metalloproteinase 7 (MMP7)	(Längenvariante auf RCC190) TCC
<b>RCC307, A*24, A*26, B*13, B*38, URO</b>			
TYTDRVFFL	A*24	plexin B2 (PLXNB2)	RCC110, RCC130, RCC231, <b>RCC307</b>
VYPDGIIRHI	A*24	splicing factor 3b, subunit 3, 130kDa (SF3B3)	RCC130, RCC231, <b>RCC307</b> , CCA-ZL
NPPSMVAAGSVVAAV	DR	cyclin D1 (CCND1)	Awells-Ii-CCND1
HSKIIIIKKGHAK	DR	insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3)	TCC
SQDDIKGIQKLYGKRS	DR	matrix metalloproteinase 7 (MMP7)	(Längenvariante auf RCC190) TCC

Die Häufigkeitsverteilung der HLA-Allele in verschiedenen Bevölkerungsgruppen hat dazu geführt, dass von bestimmten Allelen, wie HLA-A\*01, -A\*02, -A\*03 und HLA-B\*07 und -B\*08 sehr viel mehr Liganden bekannt sind als von anderen. Zu diesen fünf genannten Allelen liegen daher auch eine ganze Reihe von Liganden aus Tumorantigenen vor, auf die zurückgegriffen werden kann, falls, wie bei Patient RCC182, keine oder nur sehr wenig Impfkandidaten unter den identifizierten HLA-Liganden auszumachen sind.

Aus diesem Grund wurde bei den beiden Patienten RCC182 und RCC211 auf bereits vorliegende A\*03- und B\*07-Impfcocktails zurückgegriffen, während bei den Patienten RCC103 und RCC307 eine Auswahl an individuellen Impfpeptiden möglich war. Die HLA Klasse II-Impfpptide aus CCND1, IGFBP3 und MMP7 werden den Impfcocktails standardmäßig zugefügt.

Natürlich ist ein Patienten-spezifischer Impfcocktail einem vorgefertigten rein HLA-Allel-spezifischen aufgrund der individuellen Tumorbiologie vorzuziehen. Denn im Fall universeller Impfcocktails kommt

zu der Unsicherheit der Induzierbarkeit einer Immunantwort noch die Tatsache hinzu, dass nicht sicher ist, ob diese Antigene in dem entsprechenden Gewebe überhaupt prozessiert und präsentiert werden. Dies erklärt auch, warum in solchen Fällen gerne mehrere verschiedene Liganden ein- und desselben Antigens eingesetzt werden. Es ist schon oft beschrieben worden, dass die Verabreichung einer Mischung von Peptiden dazu beitragen kann, den Verlust einzelner Epitope im Tumorgewebe auszugleichen [78, 340, 597]. Daher wird angestrebt, eine PeptidAuswahl zu treffen, in der möglichst mehrere verschiedene Antigene, Peptide, HLA-Restriktionen und sowohl HLA Klasse I- als auch Klasse II-Liganden enthalten sind, um auf diese Weise die möglichen Fluchtmechanismen des Tumorgewebes zu minimieren und auf die möglicherweise ungleiche Proteinexpression heterogener Tumorgewebe einzugehen. Ermöglicht wird eine größere Bandbreite an Impfkandidaten unter anderem dadurch, dass dieselben Peptidsequenzen auch auf verschiedenen HLA-Allelen präsentiert sein können, solange sie die Kriterien der entsprechenden Ankerreste erfüllen. So konnte beispielsweise aus dem Quellprotein HLA-DOA die gleiche Peptidsequenz, GTYVSSVPR, auf drei verschiedenen HLA-Allelen, HLA-A\*03, -A\*11 und -A\*31, identifiziert werden. Die Liganden TSALPIIQK und IARNLTQQL aus ADFP wurden jeweils auf A\*03 und A\*11 bzw. auf B\*07 und auf B\*35 identifiziert. Dies legitimiert die Auswahl von Liganden, die zwar von anderen HLA-Allelen isoliert wurden, aber aufgrund ihrer Ankerreste auf weiteren HLA-Allele präsentiert werden könnten.

Auf einigen Tumorarten konnte mittlerweile die Expression von HLA Klasse II-Molekülen und die Erkennung durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden [130, 667].

Die Identifizierung und der Einsatz weiterer HLA Klasse II-Liganden aus Tumorantigenen könnte für die Peptid-basierte Immuntherapie zu entscheidenden Fortschritten führen. Denn Vakzinierungsstudien haben bereits gezeigt, dass mit verlängerten Peptiden die Zeitspanne und Effektivität einer Antitumor-Antwort sowohl bei CD4<sup>+</sup> als auch durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen erhöht werden kann [45, 399, 629]. Andererseits wurde eine CD4<sup>+</sup>-Antwort nur in solchen Fällen als erstrebenswert bezeichnet, in denen sie präventiv ausgelöst wird und nicht erst, wenn bereits ein Tumor vorhanden ist [124]. Dies mag damit zusammenhängen, dass zu CD4<sup>+</sup>-Antworten auch immer immunsuppressive Reaktionen von T<sub>reg</sub> zählen können, die die Wirksamkeit von Anti-Tumor-Vakzinen einschränken [558].

Bevor Peptide, bei denen eine potentielle Tumorassoziation festgestellt wurde, als Vakzine eingesetzt werden, sollte ihre Immunogenität in T-Zell-Stimulationsversuchen analysiert werden. Dies wurde mit einigen, jedoch nicht allen aufgeführten Peptiden durchgeführt. Dabei müsste im Idealfall nicht nur die Immunogenität einzelner Peptide allein getestet werden, sondern auch ihre Immunogenität im Kontext des gesamten Impfcocktails. Denn ein Nachteil solcher Impfcocktails ist, dass verschiedene Liganden um die Bindung zu MHC-Molekülen wetteifern und daher in einer Mischung eine unterschiedlich starke Immundominanz zeigen [658]. Dies kann durch kompetitive Bindungseigenschaften zu den MHC-Molekülen bedingt sein sowie durch die Induktion unspezifischer Entzündungsreaktionen an der Applikationsstelle [481]. Andererseits ist nur eine kleine Anzahl von Peptid:MHC-Komplexen nötig, um eine effektive CTL-Antwort zu generieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Erkennung niedrig-affiner Peptide durch CTL aufrecht erhalten werden konnte, selbst wenn sie sich in einer Mischung mit hoch-affinen Peptiden befanden, und dass die CTL-Reaktionen gegen mehrere Peptide in einer Mischung genauso stark ausfallen können wie bei der Stimulation mit jedem einzelnen Peptid allein [576]. Die Abhängigkeit

der benötigten Peptid:MHC-Komplexe zur Aktivierung wirksamer CTL-Antworten hängt jedoch von verschiedenen Kombinationen aus Peptid:MHC-Komplexen und CTL-Klonen ab, die immer individuell verschieden sind [103, 264].

Durch die Analyse des individuellen Ligandoms und der Genexpressionsprofile individuell in Frage kommender Tumorantigene kann gezielt auf die Tumorbiologie jedes einzelnen Patienten eingegangen werden. Dies ermöglicht zumindest theoretisch, Peptidvakzine aus genau solchen Antigenen zusammenzustellen, die im Idealfall aufgrund ihrer Detektion als HLA-Ligand, zumindest jedoch aufgrund ihrer HLA-spezifischen Ankerreste und ihres zugrundeliegenden Genexpressionsprofils individuell auf einen Patienten zugeschnitten sind. Die hierfür eingesetzte Diagnostik ist mit großem zeitlichen und finanziellen Aufwand verbunden. Kaum eine andere Methode der Vakzinentwicklung geht jedoch so gezielt auf die patientenindividuelle Tumorbiologie ein. Außerdem ist die detaillierte Diagnostik sowohl der HLA-Liganden und Genexpressionsprofile aber auch der T-Zellreaktivität ausgewählter Peptidvakzine in Anbetracht vieler noch nicht so gut beschriebener Ligandome seltener HLA-Typisierungen als auch der immer noch begrenzten Zahl bekannter Tumorantigene weiterhin notwendig.

Die Darstellung und Diskussion der Datensätze, auf die in diesem und im folgenden Kapitel eingegangen wird, unterstreicht die Notwendigkeit einer validen statistischen Auswertung, die mit der immer weiter steigenden Probenzahl immer besser möglich wird und damit nicht nur Schlussfolgerungen zu patientenindividuellen, sondern auch zu allgemeinen tumorimmunologischen oder RCC-spezifischen Zusammenhängen zulässt. Gleichzeitig wächst in diesem Kontext zum einen die Notwendigkeit verstärkter Gewebeanalysen mit der Methode der relativen Quantifizierung, um größere Datensätze für die patientenindividuellen Analysen von Tumor *und* Normalgewebe zu erhalten und weitere Informationen zur Vergleichbarkeit der Informationen aus Transkriptom-, Proteom- und Ligandom-Analysen zu gewinnen. Außerdem machen Antigene wie MUC1 deutlich, wie wichtig die methodische Erweiterung der Ligandenanalyse in bezug auf modifizierte Liganden, wie Glyko- oder Phosphopeptide ist.

Die in diesem Kapitel aufgeführte Analyse der identifizierten Hauptquellproteine zeigt viele Beispiele auf, bei denen Veränderungen der betrachteten Quellproteine nicht nur allein, sondern auch im Zusammenspiel mit anderen der Hauptquellproteine zur Entartung von Zellen führen. Dies liegt im Hinblick auf die unter 1.2.1 beschriebenen Karzinogenese-Mechanismen nahe, nach denen erst durch iterative Mutationen verschiedener Kontrollstellen ein malignes Wachstum einsetzt. Deshalb ist bei der Bekämpfung von Krebs eine Therapie, die gegen viele Ziele gerichtet ist, erfolgversprechender als eine solche, bei der nur einzelne Ziele angegriffen werden. Die größere Bandbreite an Zielantigenen ist daher ein weiterer Vorteil der hier beschriebenen Impfcocktails.

### **3.2 Protein-Expressionsanalysen ausgewählter Tumorantigene in Tumorgeweben aus Nierenzellkarzinomen**

Die Identifizierung RCC-assoziiierter Marker wird sowohl aus prognostischen als auch therapeutischen Gründen angestrebt. Aus diesem Grund wurde in diversen Studien das Expressionsprofil von RCCs auf genetischer Ebene analysiert [334, 339, 561, 656]. Im Gegensatz dazu wurden nur wenige Studien durch-

geführt, in denen außerdem zusätzliche Informationen über den molekularen Status von RCC-Zellen gewonnen wurden, die sich aus Genexpressionsanalysen nicht erschließen, wie zum Beispiel posttranslationale Modifizierungen oder die Aktivierung einzelner Antigene [112]. Durch den Fortschritt in der Entwicklung Protein-basierter Mikroarray-Technologien könnten weitere Marker-Kandidaten bei einem höheren Probendurchsatz identifiziert werden.

Wie unter 1.2.3 aufgeführt, besteht zudem oft ein großer Unterschied zwischen mRNA- und Protein-Expression. Daher war von Interesse, wie die Expression ausgewählter TAA in verschiedenen Gewebeproben von RCC-Patienten auf Proteinebene aussah. Zur folgenden Analyse wurde die in Abschnitt 2.5.6 beschriebene Protein-Mikroarray-Technologie eingesetzt. Die hierfür ausgewählten Gewebeproben und Antigene werden in den Tabellen 3.9 und 3.10 aufgeführt.

**Tabelle 3.9:** Zur Proteinexpressions-Analyse hinzugezogene Gewebe von Nierenzellkarzinom-Patienten. Mit Angaben, von welchen Geweben außerdem HLA-Liganden- und Genexpressionsanalysen durchgeführt wurden. (T = Tumorgewebe, N = Gewebe der gesunden autologen Niere, MS = Massenspektrometrie)

RCC-ID	HLA-Typisierung	m/w	Histologie	MS-Analyse	Gen Chip
RCC098N	A*01; A*03; B*0702; B*1801	m	klarzellig		+
RCC098T	A*01; A*03; B*0702; B*1801	m	klarzellig	+	+
RCC103N	A*11; A*25; B*15; B*44	w	klarzellig		+
RCC103T	A*11; A*25; B*15; B*44	w	klarzellig	+	+
RCC135N	A*02; A*03; B*4701; B*5101	m	klarzellig		+
RCC135T	A*02; A*03; B*4701; B*5101	m	klarzellig	+	+
RCC150N	A*01, A*02, B*08	m	klarzellig		
RCC150T	A*01, A*02, B*08	m	klarzellig		
RCC182N	A*03, A*30, B*07, B*40, DRB1*01, DRB1*13, DRB3	m	klarzellig		+
RCC182T	A*03, A*30, B*07, B*40, DRB1*01, DRB1*13, DRB3	m	klarzellig		+
RCC187N	A*11, A*24, B*8, B*13	m	klarzellig		
RCC187T	A*11, A*24, B*8, B*13	m	klarzellig		
RCC193N	A*01, B*08, B*35, DRB1*03, DRB1*13, DRB3	m	klarzellig		
RCC193T	A*01, B*08, B*35, DRB1*03, DRB1*13, DRB3	m	klarzellig	+	+
RCC197N	A*02, A*03, B*35, B*45, DRB1*01, DRB1*04, DRB4	m	klarzellig		
RCC197T	A*02, A*03, B*35, B*45, DRB1*01, DRB1*04, DRB4	m	klarzellig		
RCC199N	A*02, A*03, B*07, B*27, DRB1*11, DRB1*15	m	klarzellig		
RCC199T	A*02, A*03, B*07, B*27, DRB1*11, DRB1*15	m	klarzellig		
RCC201T	A*02, A*68, B*35, B*51, DRB1*03, DRB1*08	w	chromophob		
RCC211N	A*03, B*13, B*35, DRB1*07, DRB1*08	w	klarzellig/ papillär		
RCC211T	A*03, B*13, B*35, DRB1*07, DRB1*08	w	klarzellig/ papillär	+	+
RCC243N	A*02, A*11, B*4402, DRB1*07, DRB1*12, DRB3, DRB4	w	klarzellig/ papillär		

Tabelle 3.9 – Fortsetzung

RCC-ID	HLA-Typisierung	m/w	Histologie	MS-Analyse	Gen Chip
RCC243T	A*02, A*11, B*4402, DRB1*07, DRB1*12, DRB3, DRB4	w	klarzellig/ papillär		
RCC258N	A*02, A*23, B*15, B*4403, DRB1*04, DRB1*07, DRB4	m	klarzellig		
RCC258T	A*02, A*23, B*15, B*4403, DRB1*04, DRB1*07, DRB4	m	klarzellig		
RCC260N	A*02, A*25, B*18, B*38, DRB1*04, DRB1*07, DRB4	m	klarzellig		
RCC260T	A*02, A*25, B*18, B*38, DRB1*04, DRB1*07, DRB4	m	klarzellig		
RCC285N	A*01, B*08, DRB1*11, DRB1*15, DRB3, DRB5	m	klarzellig		
RCC285T	A*01, B*08, DRB1*11, DRB1*15, DRB3, DRB5	m	klarzellig		
RCC294N	A*02, A*24, B*27, B*40, DRB1*12, DRB1*14, DRB3	m	klarzellig		
RCC294T	A*02, A*24, B*27, B*40, DRB1*12, DRB1*14, DRB3	m	klarzellig		
RCC307N	A*24, A*26, B*13, B*38, DRB1*01, DRB1*15, DRB5	m	klarzellig		
RCC307T	A*24, A*26, B*13, B*38, DRB1*01, DRB1*15, DRB5	m	klarzellig	+	
RCC314N	A*02, A*24, B*18, B*45, DRB1*04, DRB1*07, DRB4	w	papillär		
RCC314T	A*02, A*24, B*18, B*45, DRB1*04, DRB1*07, DRB4	w	papillär		
RCC364N	A*02, B*14, B*51, DRB1*01, DRB1*16, DRB5	w	klarzellig		
RCC364T	A*02, B*14, B*51, DRB1*01, DRB1*16, DRB5	w	klarzellig		
RCC381N	A*02, A*26, B*39, B*57, DRB1*07, DRB1*08, DRB4	m	klarzellig		
RCC381T	A*02, A*26, B*39, B*57, DRB1*07, DRB1*08, DRB4	m	klarzellig		

Die Auswahl der Antigene (s. Tabelle 3.10) beruhte auf folgenden Kriterien: Aus einer umfassenden Liste von Tumorantigenen oder Antigenen, zu denen eine potentielle Tumorasoziation bekannt war, wurden all diejenigen Antigene ausgewählt, zu denen Antikörper verfügbar und mittels Western Blot-Analysen mit einer RCC-Zelllinie eindeutig validiert worden waren (Daten nicht gezeigt).

**Tabelle 3.10:** Bei der Proteinexpressions-Analyse untersuchte Tumorantigene. Aufgeführt sind die Namen und Abkürzungen aus der *Entrez Gene* Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>) [348].

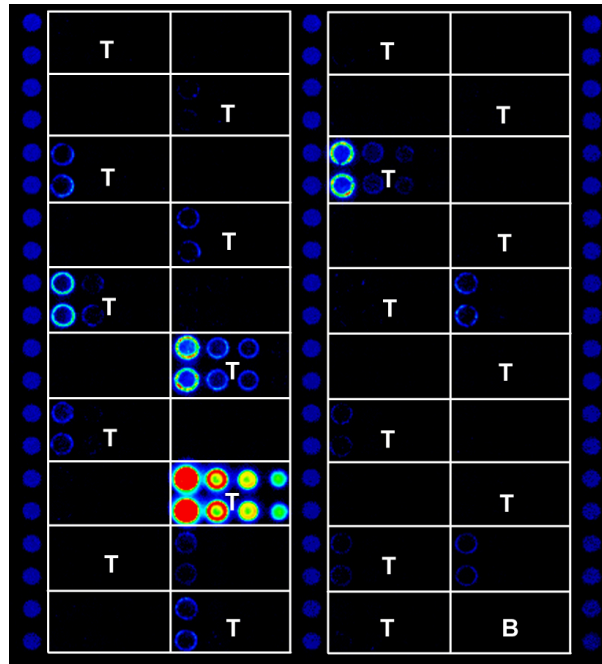
Tumorantigen	Entrez GeneID	Anzahl in unserem Labor identifizierter HLA-Liganden (RCC-Gewebe, auf denen TAA-Liganden identifiziert wurden)
adipose differentiation-related protein (ADFP)	123	10 (RCC001, RCC098, RCC099, RCC100, RCC103, RCC110, RCC112, RCC115, RCC186, RCC190, RCC195, RCC211, RCC399)
epidermal growth factor receptor (EGFR)	1956	3 (RCC189)
mucin 1, cell surface associated (MUC1)	4582	1 (RCC121N)
insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3)	3486	5 (RCC098, RCC190)
baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin) (BIRC5)	332	0
met proto-oncogene (MET)	4233	1 (RCC001, RCC013)
keratin 18 (KRT18)	3875	13 (RCC001, RCC013, RCC073, RCC099, RCC100, RCC110, RCC119, RCC231, RCC307)
carbonic anhydrase IX (CA9)	768	2 (RCC130)
histone deacetylase 1 (HDAC1)	3065	2 (RCC099, RCC100, RCC110, RCC121)
cyclin D1 (CCND1)	595	5 (RCC001, RCC149)
nicotinamide N-methyltransferase (NNMT)	4837	3 (RCC013, RCC130, RCC226, RCC231)
regulator of G-protein signaling 1 (RGS1)	5996	0
regulator of G-protein signaling 5 (RGS5)	8490	3 (RCC075, RCC098, RCC115)
RecQ protein-like (DNA helicase Q1-like) (RECQL)	5965	1 (RCC116)

Beim Druck der Mikroarrays traten zweierlei Probleme auf. Zum einen kam es teilweise, wie in Abbildung 3.4 zu sehen ist, statt zu einer homogenen Probenverteilung zur Ringbildung in einigen Spots. Die Generierung korrekter Signalwerte beim Auslesen solcher Spots ist entsprechend eingeschränkt. Dieses Phänomen war wahrscheinlich Antikörper-abhängig, da es nur auf einzelnen Mikroarrays auftrat. Eine zweite Einschränkung bei der Probenauswertung entstand dadurch, dass die Mikroarrays mit den Protein-Färbungen, gegen deren Werte die Antikörpersignalwerte normalisiert werden müssten, nicht auslesbar waren. Daher bezieht sich die Auswertung der im Folgenden beschriebenen Signale auf nur gegen den Nullwert korrigierte Werte. Alternativ hätte gegen einen aufgrund allgemeiner Erfahrungen angenommenen Proteinwert normalisiert werden können, dann jedoch ohne die Angabe von Standardabweichungen.

Die in Abbildung 3.4 sichtbare größtenteils schachbrettartige Verteilung der Signale, die mit der Verteilung der Tumor- bzw. autologen Normalnieren-Proben korrelierte, war ein Phänomen, das nur in wenigen Fällen auftrat, und dies auch nur deutlich bei einzelnen Probenpaaren.

Generell waren die Signale, die generiert wurden, sehr schwach und lagen, bis auf einen einzigen Fall, immer unter dem relativen Signalwert 5. Trotzdem kann man die Antigene aufgrund ihrer Proteinexpression in vier Gruppen einteilen: Bereits erwähnt wurden die Antigene, bei denen eine deutliche Proben-individuelle Tumorassoziation abzulesen war. Bei den drei anderen Gruppen schwankten die Werte nur zwischen sehr engen Grenzwertbereichen. Allerdings gab es eine Gruppe, bei der die Signalwerte größtenteils in den Tumorproben höher lagen, und eine andere Gruppe mit höheren Signalintensitäten in den autologen Normalnierengeweben. Die größte Gruppe stellten die Antigene dar, bei denen keinerlei Probenspezifität auszumachen war. Eine Gewebespezifität aufgrund von Geschlechtsunterschieden oder histologischen Subtypen konnte nicht bemerkt werden.

Abbildung 3.5 stellt jeweils ein Beispiel für ein Antigen mit Proben-individueller Tumorassoziation



**Abbildung 3.4:** Falschfarbenbild des mit einem Adipophilin-Antikörper inkubierten Mikroarrays. Die mit „T“ markierten Felder zeigen die jeweils 4 Verdünnungsduplikate von Tumorproben an, die schachbrettmusterartig aufgetragen worden waren. In allen nicht markierten Feldern befanden sich die Probenspots der autologen Normalnieren. B = Blank. Die drei senkrechten, nicht markierten Spalten stellen die BSA-Referenzproben dar.

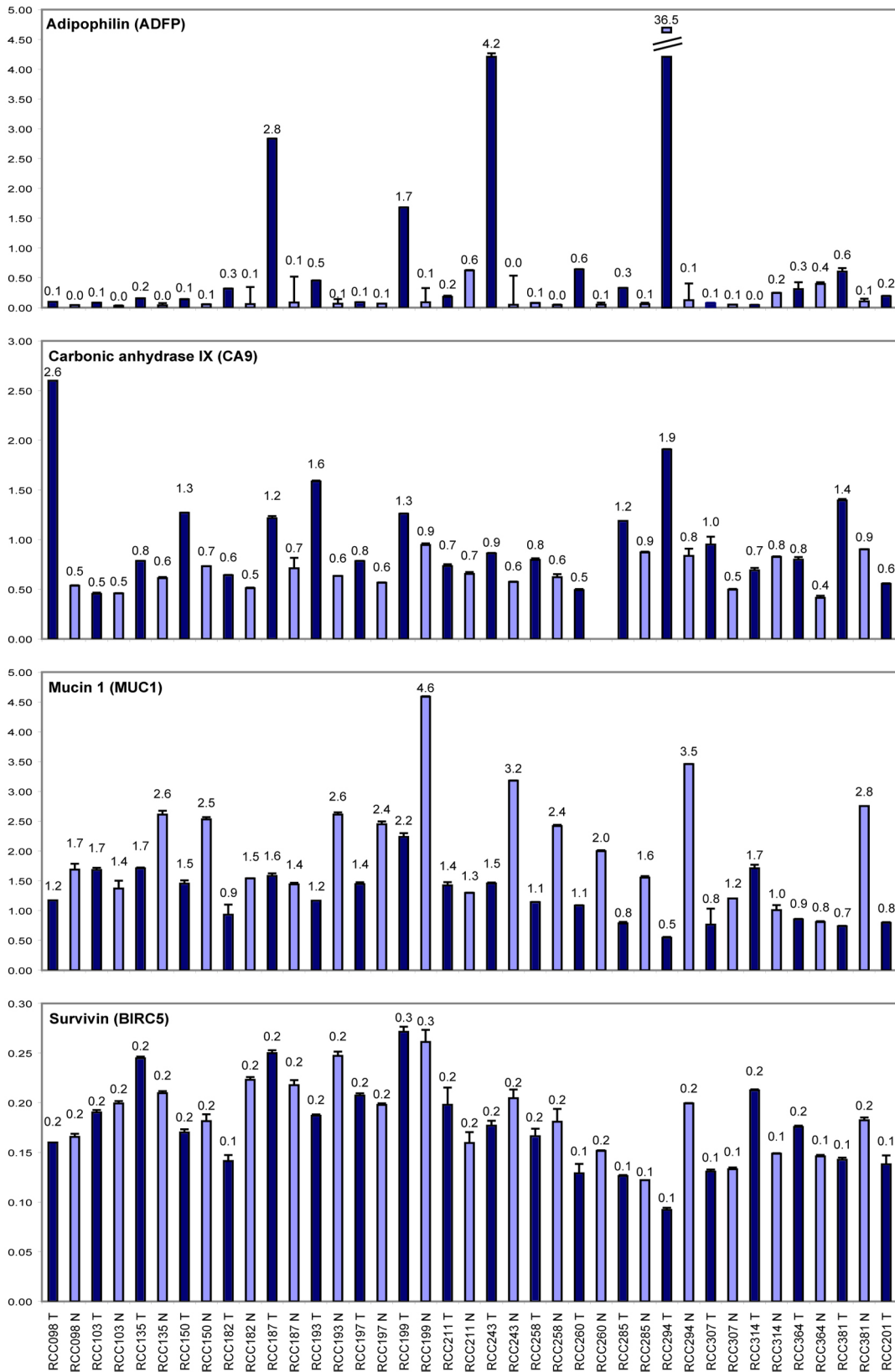
(Adipophilin), ein Antigen mit schwacher allgemeiner Tumorassoziation (Carboanhydrase 9), eines mit schwacher allgemeiner Normalgewebe-Assoziation (Mucin 1) und eines ohne jegliche Proben- oder Antigen-spezifische Proteinexpression (Survivin) dar.

Alle hier untersuchten Antigene waren in unserem Labor aufgrund von Genexpressionsdaten, zum Teil bestärkt durch HLA-Liganden und/oder bekannte T-Zellreaktionen als tumorassoziiert eingestuft worden. Unter den mittels Proteinmikroarray untersuchten Antigenen waren jedoch nur drei, deren Expression auch auf Proteinebene zumindest eine Proben-individuelle Tumorassoziation deutlich werden lies: *adipose differentiation-related protein* (ADFP), *insulin-like growth factor binding protein 3* (IGFBP3) und *nicotinamide N-methyltransferase* (NNMT). In allen drei Fällen gab es einzelne Probenpaare, bei denen jeweils die Tumorgewebe eine sehr starke Überexpression aufwiesen. Während jedoch bei ADFP und NNMT auch in fast allen weiteren Probenpaaren die Expressionswerte in den Tumorproben höher lagen, war die IGFBP3-Expression außer in den „Ausreißern“ oft im Gewebe der autologen Normalnieren höher als im Tumorgewebe.

Unter den Antigenen, deren Expressionswerte und damit auch die Unterschiede zwischen Tumor- und Normalnierengewebe nur schwach waren, gab es zwei, bei denen in den meisten Fällen die Tumorgewebe eine höhere Expression aufzeigten. Bei *carbonic anhydrase IX* (CA9) waren alle Werte, die über dem allgemeinen Expressionsniveau lagen, Tumor-assoziiert, bei *RecQ protein-like (DNA helicase Q1-like)* (RECQL) lagen die Expressionswerte im Tumorgewebe nur in drei der 19 Gewebepaare unter denen der Normalgewebe.

Eine größere Gruppe von Antigenen stellte diejenige dar, bei denen die Proteinexpression im Normal-





**Abbildung 3.5:** Relative Signalintensitäten der Proteinexpression von Adipophilin (ADFP), Carbonic anhydrase IX (CA9), Mucin 1 (MUC1) und Survivin (BIRC5). Der CA9-Signalwert von RCC260 N konnte aufgrund eines Störsignals nicht ausgewertet werden. Weitere Erläuterungen s. Text.

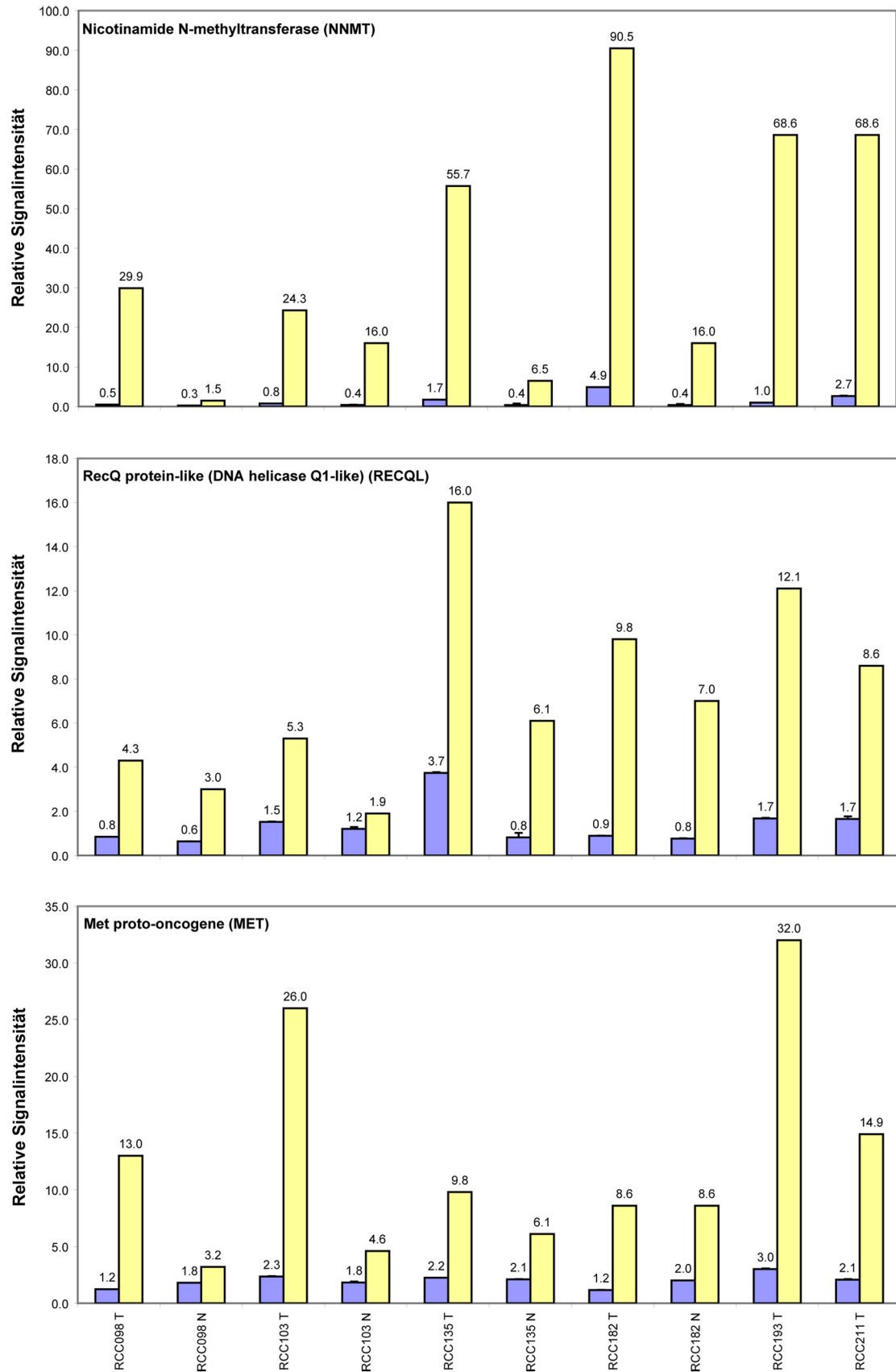
nierengewebe in den meisten Fällen über der der Tumorgewebe lag. Dazu gehörten *epidermal growth factor receptor* (EGFR), *Keratin 18* (KRT18), *Mucin 1* (MUC1) und *regulator of G-protein signaling 1* (RGS1). In KRT18 und RGS1 gab es nur vier bzw. drei Gewebepaare, bei denen das Expressionsniveau im Normalnierengewebe nicht deutlich über dem der Tumorgewebe lag. Gemäß den Ausführungen in Abschnitt 3.1.2.3.2 sollte davon ausgegangen werden, dass während Genexpressionsanalysen keine Tumorassoziation bei MUC1 aufzeigen konnten, dies mit einem Antikörper gegen die extrazelluläre VNTR-Domäne möglich sein sollte. Der hier eingesetzte Antikörper war zwar gegen das 12-mer Epitop GVTSAPDTRPAP aus der VNTR-Domäne gerichtet, erzielte jedoch ein ähnliches Expressionsmuster auf Proteinebene wie die Genexpressionsanalyse. Danach muss davon ausgegangen werden, dass MUC1 nicht im Tumor-, sondern Normalgewebe hochreguliert wird. Eine alternative Erklärung könnte sein, dass dieser Antikörper, der gegen eine Brustkrebszelllinie entwickelt wurde, Glykosylierungsmuster erkennt, die bei Brustkrebs aber nicht in Nierenzellkarzinomen tumorspezifisch auftreten.

Die Proteinexpressionswerte aller weiteren Antigene lagen immer ca. zwischen 0,1 und 0,4. Nur RGS5 zeigte stärkere Schwankungen zwischen den einzelnen Gewebeproben, jedoch ohne ersichtliche Korrelation zu einer Gewebespezifität, und das *Met proto-oncogene* (MET) wies Expressionswerte zwischen ca. 1 und 3,5 auf, mit einem einzigen Ausreißerwert von 5,7 in RCC314 T.

Der Vergleich mit Genexpressionswerten fällt insofern schwer, als nur von wenigen Proben sowohl Gen- als auch Protein-Expressionswerte vorliegen. In Abbildung 3.6 werden beispielhaft die Gen- und Proteinexpressionswerte von NNMT, RECQL und MET, also jeweils einem Vertreter der Gruppe mit deutlicher, mit schwacher und mit gar keiner Tumorassoziation der Proteinexpressionswerte, dargestellt. Sowohl bei NNMT als auch bei Adipophilin zeigten die Gen- und Proteinexpressionswerte zumindest eine tendenzielle Ähnlichkeit auf, d.h. die Expressionsverteilung war innerhalb der Gewebepaare meist gleichgerichtet. In bezug auf ihre Größenordnung waren jedoch die Verhältnisse zueinander in keinem Fall vergleichbar. Im Fall von IGFBP3 war selbst die Gewebeverteilung der Hochregulation innerhalb der Paare auf genetischer und auf Proteinebene meist gegensätzlich. Andererseits ist eine Probenindividuelle Tumorassoziation auf Genexpressionsebene für ADFP und IGFBP3 bekannt (s. Abschnitt 3.1.2.1), was sich mit den Proteinexpressionsdaten deckt. Im Gegensatz dazu weist NNMT eine Proben-Spezifität bei der Proteinexpression auf, die in den Daten der Genexpression aller in Abschnitt 3.1.2.1 aufgeführten Gewebe nicht nachzuvollziehen ist. Dort ist eine generelle tumorassoziierte Hochregulation ablesbar (Daten nicht gezeigt).

Die schwache Tumorassoziation der RECQL-Expression ist dagegen in Abbildung 3.6 sowohl auf genetischer als auch auf Proteinebene zu sehen. Hier decken sich die jeweils alle Proben umfassenden Daten der Genexpressionsanalyse aus Abschnitt 3.1.2.1 und den in diesem Abschnitt besprochenen Proteinexpressionsanalysen. MET wiederum zeigte in Genexpressionsanalysen eine allgemein deutliche Tumorassoziation, die bei den Daten der Proteinexpressionsanalyse nicht vorliegt.

Es liegt auf der Hand, dass alle Ausführungen dieses Abschnitts zwar allgemein beschreibbare Phänomene sind, diese aber aufgrund der schwachen Signalwerte der Proteinexpression und relativ geringen Probenzahlen keine signifikanten Aussagen darstellen. Trotzdem darf auch aufgrund dieser Ergebnisse in Frage gestellt werden, ob eine mittels Genexpression detektierte Hochregulation immer auch ein erhöhtes Maß an Proteinexpression und damit ein angemessenes Auswahlkriterium von Impfkandidaten,



**Abbildung 3.6:** Relative Signalintensitäten der Gen- und Proteinexpression von Nicotinamide N-methyltransferase (NNMT), RecQ protein-like (DNA helicase Q1-like) (RECQL) und Met proto-oncogene (MET). Helle Balken stellen die Genexpressionswerte, dunkle Balken die Proteinexpressionswerte dar. Weitere Erläuterungen s. Text.

die gegen proteinogene Ziele gerichtet sind, darstellt. Andersherum kann ein niedriger Genexpressionswert eine geringe Proteinkonzentration suggerieren, die vor allem bei langlebigen Proteinen nicht immer entsprechend vorliegt.

Expressionsanalysen müssen generell kritisch betrachtet werden, unabhängig davon, ob es sich um Gen- oder Proteinexpressionsanalysen handelt. Bei den Proteinexpressionsanalysen zeigt bereits die Diskussion über das MUC-Epitop in diesem und in Abschnitt 3.1.2.1 deutlich, wie stark die generierten Werte von der Wahl eines geeigneten Antikörpers bzw. Epitops abhängt. Wahrscheinlich würden in einigen der hier aufgeführten Antigene Antikörper gegen verschiedene Epitope desselben Antigens auch zu sehr unterschiedlichen Signalwerten führen. Ein weiterer Faktor ist die Probenherstellung. Auch wenn das Protokoll für die Gewebelyse und den Probendruck in optimierter Form vorliegt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es beim Lysieren der Proben oder bei Interaktionen der Proben mit der Chip-Oberfläche oder den eingesetzten Puffern zu Verlust, Veränderung oder Maskierung der entsprechenden Epitope kommt. Viele dieser Probleme treten in gleicher oder ähnlicher Weise bei den alternativen Methoden wie der Western Blot- und 2D-Gel-Analyse oder dem *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) auf. Im Übrigen gibt es kaum bekannte alternative Methoden, die die hier aufgeführten Einschränkungen kompensieren können, ohne dabei auf den Vorteil des großen Probendurchsatzes zu verzichten. Zudem führt die Verrechnung von acht Spots pro Probe bei dem hier eingesetzten Protokoll der Proteinmikroarray-Technologie zu einer sehr hohen Genauigkeit .

Ähnliche Einschränkungen wie die Protein- erfahren auch die Genexpressionsanalysen durch die Auswahl der Sonden oder Primer bei Mikroarray-basierten Analysen oder bei qRT-PCR. Sowohl die Antikörper bei der Protein- als auch die Sonden bei Genexpressionsanalysen können unterschiedlich gut an ihr Zielmolekül binden, was zu unterschiedlichen Signalstärken führen kann. Dies wird zwar möglichst dahingehend optimiert, dass zumindest bei der Antikörperauswahl die eingesetzte Menge an dieses Phänomen angepasst wird, doch geschah beispielsweise bei den hier zugrundeliegenden Experimenten diese Optimierung aufgrund von Western Blot-Analysen, die andere Einflüsse auf die Bindungseigenschaften der Antikörper aufweisen könnten als die Proteinmikroarray-Technologie.

Ein weiteres Phänomen, das nicht außer Acht gelassen werden darf, ist die Heterogenität der Proben. Aus ein- und demselben Tumor können theoretisch verschiedene Areale mit verschiedenen histologischen Erscheinungsbildern und Expressionsmustern isoliert werden. Für die Gen- und Proteinexpressionsanalysen werden nur minimale Gewebemengen benötigt. Wird dabei von einem Gewebestück ein jeweils histologisch oder molekularbiologisch unterschiedlicher Anteil bei den verschiedenen Analysen eingesetzt, kann dies zu Unterschieden führen, die selbst dann auftreten würden, wenn Gen- mit Gen- oder Protein- mit Proteinexpressionsanalysen verglichen würden.

Generell ist die Frage nach der optimalen Analyseverfahren auf der Suche nach neuen Tumorantigenen sicher nicht eindeutig zu beantworten. Einen sehr starken Einfluss auf die Wahl der Analyseverfahren haben sicherlich die Schlussfolgerungen, die daraus gezogen werden sollen. Ist man lediglich auf der Suche nach allgemeingültigen diagnostischen Markern, reichen Genexpressionsanalysen aus, um ein umfassendes Bild zu erhalten. Dafür geben sie aber keinen Aufschluss über den Proteingehalt der Zelle, der beispielsweise aufgrund von unterschiedlichen Halbwertszeiten der translatierten Produkte oder

postranslationalen Modifikationen ein ganz anderes Bild wiedergibt, als man es aus Genexpressionsanalysen ableiten würde.

Auf der Suche nach Antigenen, gegen die mit Hilfe der T-Zellimmunität gekämpft werden soll, sind immunhistochemische oder Proteinexpressionsanalysen der entsprechenden Zellen naheliegender. Denn der Protein-Status müsste besseren Aufschluss darüber geben, welche Antigene potentiell vermehrt in die Antigenprozessierung eingeschleust und damit den T-Zellen präsentiert werden. Andererseits wurde keines der Antigene, von denen Liganden auf einem der ausgewählten RCC-Gewebe präsentiert wurden, mittels Proteinmikroarray-Technologie auf Proteinebene als hochreguliert detektiert. Dies wiederum unterstreicht die Notwendigkeit weiterer Analysen des HLA-Ligandoms und der Suche nach weiteren T-Zellepitopen.

Zusammenfassend ist daher die kombinierte Analyse von Genexpressionsdaten - zumal um erhöhte Antigen-Expression in gesundem Gewebe auszuschließen - zusammen mit der Analyse des HLA-Ligandoms - idealerweise im Gewebepaarvergleich - immer noch die zuverlässigste Methode bei der Auswahl von Vakzinierungskandidaten. Mit einer steigenden Zahl an spezifischen Mikroarray-tauglichen Antikörpern gewinnt jedoch auch aufgrund des hohen Probendurchsatzes die Proteinexpressionsanalyse zunehmend an Attraktivität sowohl auf der Suche nach neuen Biomarkern als auch als künftige potentielle schnelle Voranalyse der Expression bekannter Antigene.

### 3.3 Autophagie-Einflüsse auf das HLA-Ligandom und die Proteinexpression ausgesuchter Antigene

Nachdem in unserem Labor gezeigt worden war, dass die Induktion von Autophagie zu einer Veränderung des HLA Klasse II-Ligandoms auf Awells führt [129], sollte untersucht werden, ob dieser Effekt auch auf einer Tumorzelllinie und beim HLA Klasse I-Ligandom nachzuweisen war. Außerdem wurde die Proteinexpression ausgewählter Proliferations- und Tumorantigene unter dem Einfluss von Autophagie betrachtet. Für diese Untersuchungen wurden die B-Zelllinie Awells und eine Zelllinie, die aus RCC068 von Cécile Gouttefanges generiert worden war RCC068ZL, eingesetzt.

Zur Autophagie-Induktion wurde sowohl die Methode der Aminosäure-Depletion durch Inkubation in HBSS-Mangelmedium eingesetzt als auch die Inhibition von mTOR durch Zugabe von Rapamycin. In einzelnen Fällen wurden Autophagosomen durch Inhibition des lysosomalen Abbaus angereichert. Dafür wurden die lysosomalen Inhibitoren Chloroquin und Concanamycin A eingesetzt.

Um die erzielten Phänomene eindeutig dem Mechanismus der Autophagie zuordnen zu können, war ein stringenter Nachweis nötig. Wie bereits in Abschnitt 1.3.2 erläutert, weisen die diversen bisher etablierten Nachweismethoden mehr oder weniger große Einschränkungen auf.

Die Nachweismethode, die am meisten verbreitet und akzeptiert ist, ist der mikroskopische Nachweis transfizierter GFP-LC3-Konstrukte. Dies war mit den eingesetzten Zelllinien nicht möglich, da diese auch ohne transfizierten Vektor in Selektionsmedium wuchsen und daher eine Selektion der Transfektanten nicht möglich war. Eine Umklonierung wäre theoretisch zwar möglich gewesen, wurde praktisch jedoch aus zeitlichen Gründen ausgeschlossen. Stattdessen wurde eine Reihe anderer Nachweisexperimente durchgeführt, die im folgenden Abschnitt aufgeführt werden.

#### 3.3.1 Autophagie-Nachweise

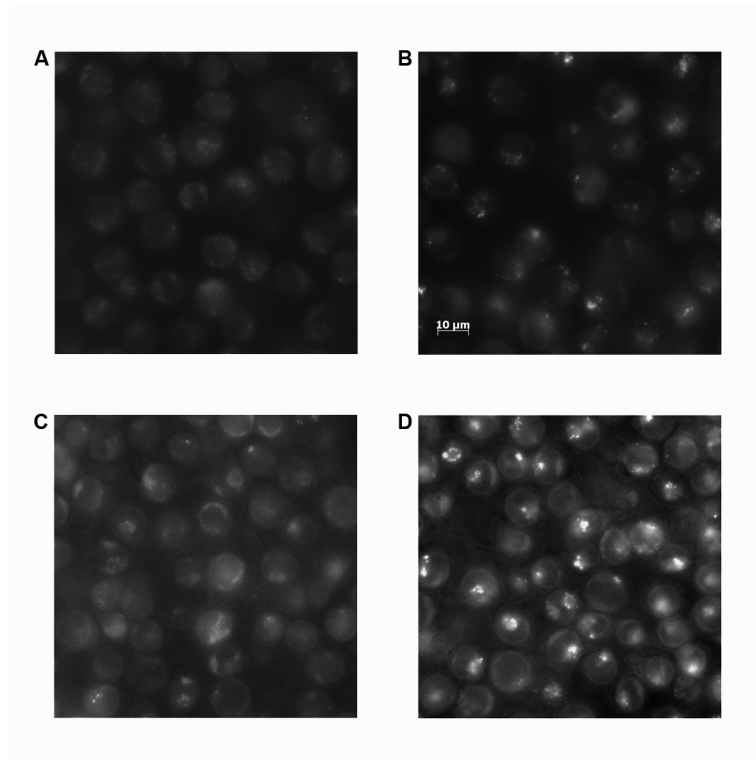
##### 3.3.1.1 Nachweis mittels Monodansylcadaverin

Mitte der 90er Jahre beschrieben Biderbick et al. einen Autophagienachweis mit dem Fluoreszenzfarbstoff Monodansylcadaverin (MDC), der lange Zeit als spezifischer Nachweis anerkannt war [42]. Da auch Dengjel et al. diese Methode als Autophagienachweis einsetzten [129] und diese Arbeit die Grundlage für die Experimente dieser Dissertation bildete, wurde sie auch hier durchgeführt.

In Abbildung 3.7 werden die Ergebnisse einer Monodansylcadaverin-Färbung von Awells-Zellen nach Autophagie-Induktion mit Mangelmedium gezeigt. Die obere Reihe (A, B) zeigt Zellen, die in normalem Medium gehalten wurden (Kontrollzellen), in der unteren Reihe (C, D) sind Zellen nach sechsstündiger Autophagie-Induktion mit HBSS-Mangelmedium dargestellt (Hungerzellen). Abbildung A und C zeigen Zellen, die nicht mit MDC gefärbt wurden (Negativkontrollen), in Abbildung B und D sind die mit MDC gefärbten Zellen zu sehen.

Gegen die Autofluoreszenz in den Negativkontrollen hob sich die eigentliche Fluoreszenzfärbung in den Kontrollzellen kaum ab, die der Hungerzellen jedoch deutlich. Zwar waren auch in den Kontrollzellen vereinzelt fluoreszierende Strukturen auszumachen, die Hungerzellen wiesen aber eine deutlich höhere Anzahl dieser Aggregate auf.

Dies war das einzige von mehreren Experimenten mit Awells Zellen, bei dem die Ergebnisse den Er-



**Abbildung 3.7:** Awells Zellen wurden in einer Konzentration von  $1 \cdot 10^5$ /ml für sechs Stunden in DMEM inkubiert (Kontrollzellen) (A, B) oder in HBSS Mangelmedium (Hungerzellen) (C, D). Ungefärbte Zellen dienten als Negativkontrollen (A, C), Färbungen erfolgten mit dem Fluoreszenzfarbstoff Monodansylcadaverin (MDC) (B, D).

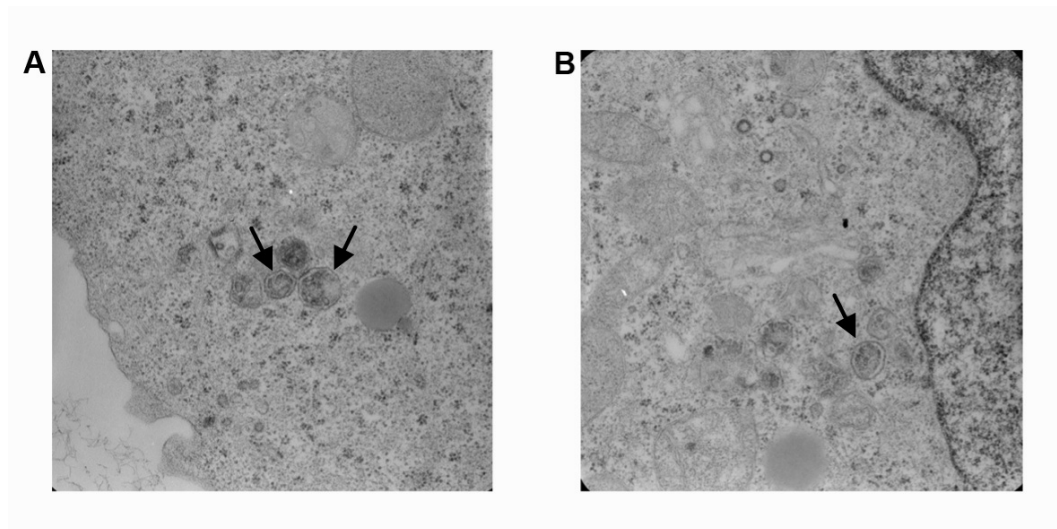
Autophagosomen wurden mit 0,05 mM MDC in PBS für 10 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  markiert. Anschließend wurden sie dreimal mit PBS gewaschen, in 8-well-Kammerdeckgläser überführt und direkt mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Dabei wurde das Epifluoreszenzmikroskop Axiovert 100 M mit DAPI-Filter eingesetzt.

wartungen entsprechend eine erhöhte Anzahl an Autophagosomen in Autophagie-behandelten Zellen zeigten. In allen weiteren Experimenten waren diese Ergebnisse nicht reproduzierbar. Mit RCC068ZL-Zellen wurden keine MDC-Färbungen durchgeführt.

Die Schwierigkeiten bei der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse beruhten vor allem darauf, dass MDC sehr schnell wieder aus den Zellen herausdiffundiert. Außerdem konnte von Munafo und Colombo gezeigt werden, dass MDC entgegen den Behauptungen von Biederbick et al. nicht nur Autophagosomen-spezifisch ist, sondern auch späte endosomale und lysosomale, also vor allem saure Kompartimente allgemein anfärbt [362, 382]. Weitere Vorhaben, Autophagie mittels MDC-Färbung nachzuweisen, wurden daher verworfen.

### 3.3.1.2 Elektronenmikroskopischer Nachweis

Der erste Autophagienachweis überhaupt ergab sich aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen, die Ashford und Porter 1962 von Hepatocyten aus Rattenlebern nach Glucagon-Behandlung machten, wobei der Begriff „Autophagosom“ damals noch nicht eingesetzt wurde und lediglich der Einschluss cytoplasmatischen Inhalts und ganzer Organellen beschrieben wurde [18]. Erst einige Jahre später wur-



**Abbildung 3.8:** Awells-Zellen wurden in einer Konzentration von  $1 \cdot 10^5$ /ml für sechs Stunden in DMEM inkubiert (Kontrollzellen) (A) oder in  $0,2 \mu\text{g/ml}$  Rapamycin in DMEM (B). Pfeile markieren Autophagosom-ähnliche Strukturen. Zur Fixierung, Kryosektion und Mikroskopie wurden wie Zellen abgegeben an Y. Stierhof (ZMBP, Universität Tübingen)

den genauere Untersuchungen angestellt, bei denen die Doppelmembran-Struktur der Autophagosomen verdeutlicht wurde [408]. Dieses Phänomen ist mittlerweile ein anerkanntes Kriterium auf der Suche nach autophagosomalen Strukturen. Daher lag es nahe, diese Methode für den Nachweis von Autophagie einzusetzen.

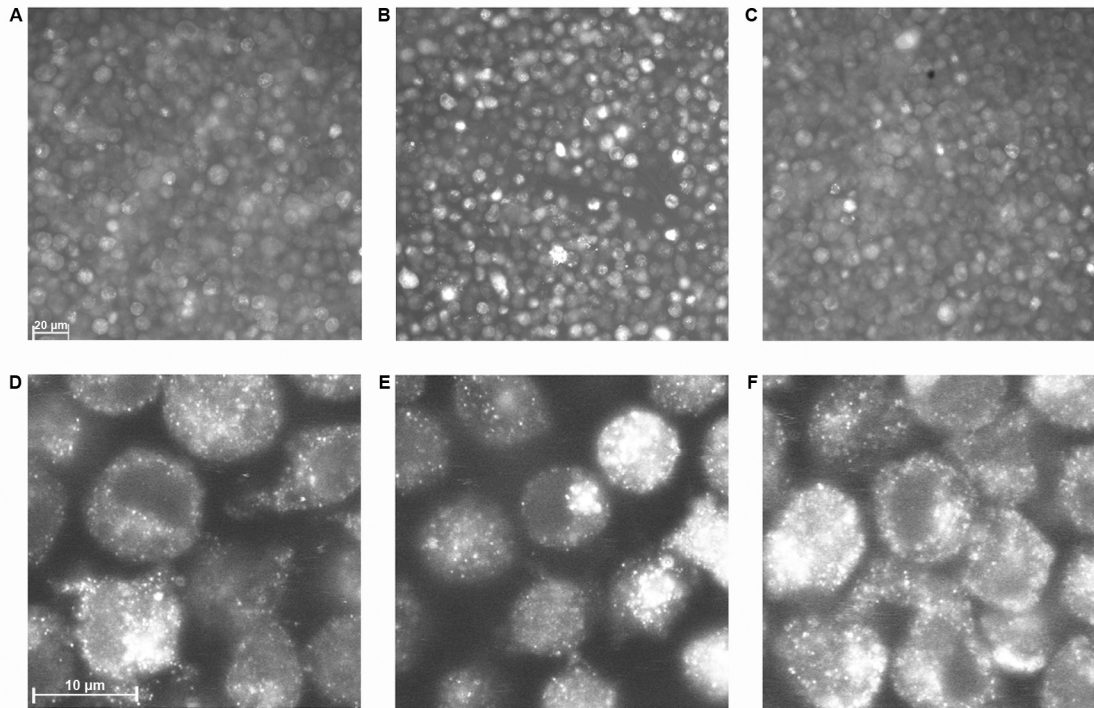
In Abbildung 3.8 werden elektronenmikroskopische Bilder von Awells-Zellen nach Autophagie-Induktion mit Rapamycin gezeigt. Abbildung A zeigt eine Kontrollzelle, die in normalem Medium gehalten wurde, Abbildung B den Ausschnitt einer Zelle, deren Medium  $0,2 \mu\text{g/ml}$  Rapamycin zugefügt worden war. Weder bei den hier dargestellten Awells-Zellen noch bei RCC068ZL-Zellen konnte eine eindeutige Autophagie-Induktion aufgrund erhöhter Autophagosomenzahlen in den Rapamycin-behandelten Zellen oder aufgrund sonstiger Veränderungen des Zellinhalts ausgemacht werden. Die wenigen Autophagosom-ähnlichen Strukturen (s. Pfeile) konnten als solche außerdem nicht völlig zweifelsfrei zugeordnet werden, da keine Markierung, z.B. durch LC3-gerichtete Antikörper, durchgeführt worden war.

Eine Markierung wäre durchaus erstrebenswert gewesen, wurde aber erschwert durch die begrenzte Anzahl Mikroskopie-tauglicher Autophagie-spezifischer Antikörper bzw. in diesem Fall durch das Unvermögen, die hier eingesetzten Zelllinien mit einem GFP-Konstrukt zu transfizieren, das immunhistochemisch markiert hätte werden können.

Alternativ wurde versucht, Autophagosomen anzureichern, indem der lysosomale Abbau der Autophagosomen durch die zusätzliche Inkubation in  $2 \text{ nM}$  Concanamycin A verhindert werden sollte (Daten nicht gezeigt). Doch auch dieser Versuch erbrachte keine erhöhte Anzahl an Autophagosomen.

Im Falle einer erhöhten Anzahl Autophagosomen-ähnlicher Strukturen wäre der Nachweis einer erhöhten Autophagie-Induktion zusätzlich mit einem sehr hohen Aufwand verbunden gewesen. Zum einen





**Abbildung 3.9:** Awells-Zellen wurden in einer Konzentration von  $1 \cdot 10^5$ /ml für sechs Stunden in DMEM inkubiert (Kontrollzellen) (A, D), in HBSS-Mangelmedium (B, E) oder in  $0,2 \mu\text{g/ml}$  Rapamycin in DMEM (C, F). Zellen, die nur mit Zweitantikörper inkubiert worden waren, dienten als Negativkontrollen (nicht dargestellt), Färbungen erfolgten mit einem Maus-anti-LC3-Antikörper als Erst- und einem Rhodamin-markierten Ziege-anti-Maus-Antikörper als Zweitantikörper.

Die fixierten Zellen wurden mit dem Maus-anti-LC3-Antikörper (MabLC3-5F10, 1:200 in Saponinpuffer) für 1 h inkubiert, nachdem sie mit Saponinpuffer permeabilisiert worden waren. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit dem Ziege-anti-Maus Antikörper (Alexa Fluor 546 goat-anti-mouse, 1:500 in Saponinpuffer). Die Zellen wurden nach der Behandlung in 8-well-Kammerdeckgläser überführt und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Dabei wurde sowohl das Epifluoreszenzmikroskop Axiovert 100 M (Abb. A-C, 10-fache Vergrößerung) als auch das LSM510 Laser Scanning Mikroskop (Abb. D-F, 63-fache Vergrößerung) jeweils mit Rhodamin-Filter eingesetzt.

hätte idealerweise mit vielen benachbarten seriellen Schnitten bewiesen werden müssen, dass es sich hierbei tatsächlich um Autophagosomen und nicht um Zellein- bzw. -ausstülpungen handelt. Vor allem aber hätten hohe Zellzahlen ausgewertet werden müssen, um ein eindeutiges Verhältnis zwischen Kontroll- und Autophagie-induzierten Zellen ablesen zu können.

### 3.3.1.3 Nachweis mittels LC3-Detektion in der Fluoreszenzmikroskopie

Das *Microtubule-associated protein 1 light chain 3* (MAP1LC3), kurz LC3, ist ein Molekül, das von Beginn der Autophagosomenbildung bis zum Verschmelzen mit dem Lysosom mit der autophagosomalen Membran assoziiert ist [281]. Daher ist es ein attraktives Zielobjekt für den Nachweis der Autophagie-Induktion mittels Mikroskopie.

Abbildung 3.9 zeigt Awells-Zellen, die für sechs Stunden in normalem Medium (Kontrollzellen) (A, D),

in HBSS-Mangelmedium (B, E) oder in Rapamycin-haltigem Medium (C, F) gehalten wurden. Autophagosomen wurden in diesem Fall mit einem Maus-anti-LC3-Antikörper markiert, der durch einen Rhodamin-markierten Zweitantikörper detektiert wurde. Als Negativkontrollen wurden Zellen der jeweiligen Probe eingesetzt, die nur mit Zweitantikörper inkubiert worden waren (Daten nicht gezeigt). Die Aufnahmen der oberen Reihe wurden am Epifluoreszenzmikroskop Axiovert 100 M, die der unteren Reihe am LSM510 Laser Scanning Mikroskop erstellt.

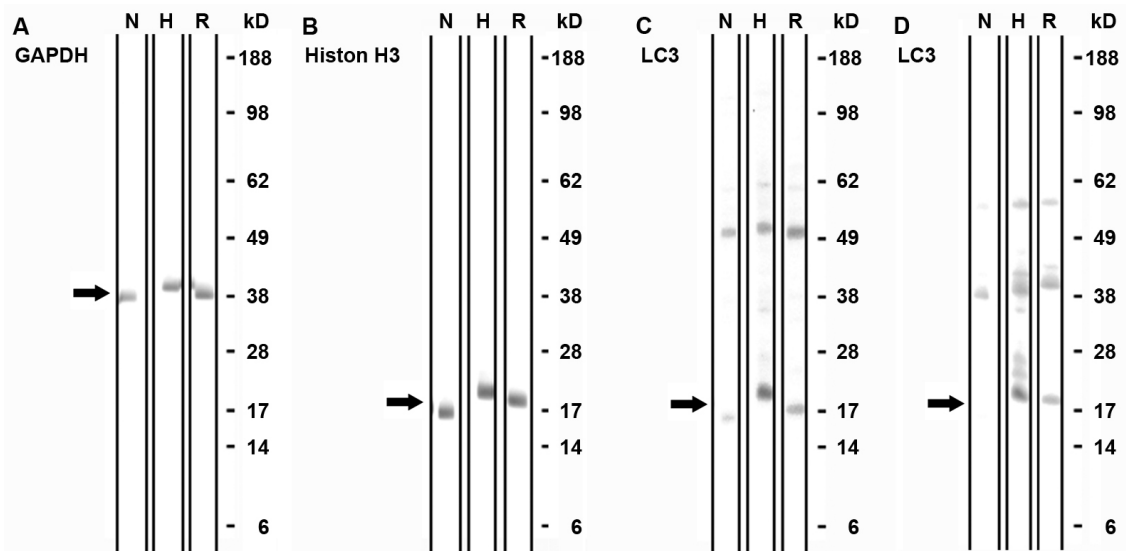
In den Übersichtsbildern (A-C) wird eine Zunahme der Fluoreszenzdichte in der HBSS-behandelten Probe (B) deutlich. Die erwartete Zunahme an autophagosomalen Strukturen in den mTOR-inhibierten Zellen blieb aus (C). Bei Betrachtung der Zellen in größerem Maßstab konnte erwartungsgemäß in allen drei Proben eine über das ganze Cytoplasma verteilte LC3-positive Körnung detektiert werden. Die Bildung größerer LC3-positiver Aggregate und eine damit verbundene intensivere Fluoreszenz war jedoch hauptsächlich in den Rapamycin- und HBSS-behandelten Zellen detektierbar. Ausserdem fiel bei dieser Vergrößerung den Erwartungen entsprechend auf, dass die Hungerzellen im Vergleich zu den beiden anderen Proben deutlich kleiner waren. Ähnliche Resultate wurden mit RCC068ZL Zellen erzielt (Daten nicht gezeigt).

Die hier dargestellten Ergebnisse bieten einen ersten sicheren Nachweis der Autophagie-Induktion in den genannten Proben. Denn ein Aggregieren des sonst diffus verteilten LC3 entspricht einer gesteigerten Bildung autophagosomaler Strukturen. In jedem Fall darf jedoch bei allen mikroskopischen Nachweisen nicht übersehen werden, dass eine Auswertung der Autophagie-Rate durch Auswertung der Autophagosomenzahl, -fläche oder des -volumens im Verhältnis zu der gesamten Anzahl, Fläche oder dem Volumen der Zellen unumgänglich ist. Hierfür müsste eine große Anzahl an Zellen und mikroskopischen Aufnahmen ausgewertet werden, wie beispielsweise von Proikas-Cezanne et al. durchgeführt [437], wodurch alle mikroskopischen Nachweise sehr zeitaufwändig werden. Jede mikroskopische Aufnahme muss außerdem als Momentaufnahme wahrgenommen werden, die nicht unbedingt eine Aussage über den allgemeinen Autophagie-Status aussagt. Das Phänomen der Anhäufung von Autophagosomen könnte beispielsweise lediglich aufgrund eingeschränkter lysosomaler Fusion anstatt aufgrund hochregulierter Autophagie auftreten [297]. Bei einer mikroskopischen Auswertung müssen deshalb alle verschiedenen autophagosomalen Strukturen mit in Betracht gezogen werden.

Jede Zelle hat eine andere basale Rate an Autophagie. Produktionsraten, Halbwertszeiten und Größen der autophagosomalen Strukturen sind von Zelltyp zu Zelltyp unterschiedlich [362, 369, 661]. Daher gibt es hierfür keine generellen Richtlinien.

#### 3.3.1.4 Nachweis mittels LC3-Bandenverschiebung im Western Blot

Ein nicht-mikroskopischer, allgemein anerkannter Autophagie-Nachweis ist die Bandenverschiebung von LC3 im Western Blot. LC3 liegt zunächst als LC3-I in freier cytoplasmatischer Form vor. Durch Induktion von Autophagie wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die unter anderem dazu führt, dass LC3-I C-terminal zu LC3-II gespalten und anschließend mit Phosphatidylethanolamin (PE) konjugiert wird. Diese posttranslationale Modifikation ist als Bandenverschiebung im Western Blot nachweisbar. In Abbildung 3.10 sind die „Pseudoblots“ von jeweils drei Proben dargestellt, die entweder für sechs Stunden in normalem Medium (Kontrollzellen) (N), in HBSS Mangelmedium (H) oder in normalem



**Abbildung 3.10:** RCC Zellen wurden in einer Konfluenz unter 60% für sechs Stunden in RPMI inkubiert (Kontrollzellen) (N), in HBSS-Mangelmedium (Autophagiezellen) (H) oder in 0,2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Rapamycin in RPMI (R). Nach der Proteinauftrennung und -übertragung durch SDS-PAGE und Western Blot wurden die Membranen in Streifen geschnitten. Von jeder Probe wurde jeweils einer dieser sogenannten „Pseudoblots“ mit den entsprechenden Erst- und Zweitantikörpern markiert. Als Auftragskontrolle wurden GAP-DH (Abcam, 1:20000) (A) und Histon H3 (CST, 1:1000) (B) gefärbt. Es wurden zwei verschiedene Antikörper gegen LC3 eingesetzt, ein polyklonaler Kaninchenantikörper (Abgent, 1:500) (C) und ein monoklonaler Mausantikörper (MBL, 1:1000) (D), die beide sowohl LC3-I als auch LC3-II erkennen sollten. Die Pfeile signalisieren die ungefähre Laufhöhe, auf der die entsprechenden Banden erwartet wurden. In den beiden LC3-gefärbten Proben wurde bei Autophagie-Induktion eine stärkere Bande bei 16 kD (LC3-II) und eine schwächere Bande bei 18 kD (LC3-I) erwartet.

Medium gehalten wurden, dem 0,2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Rapamycin zugefügt war (R). Als Auftragskontrolle wurde jeweils ein Pseudoblot jeder Probe mit einem Antikörper gegen GAP-DH (A) bzw. gegen Histon H3 (B) inkubiert. Getestet wurden zwei verschiedene Antikörper gegen LC3 (C, D). Dabei wurde eine Bandenverschiebung von ca. 18 auf 16 kD bei Autophagie-Induktion, also in den Proben H und R erwartet. Deutlich zu sehen war zunächst einmal eine starke Intensitätserhöhung aller Bandensignale in den beiden Autophagie-Proben bei beiden LC3-Antikörpern im Vergleich zu den Auftragskontrollen. In allen Fällen liefen die Banden der HBSS-behandelten Probe etwas über den vergleichbaren Banden der beiden anderen Proben, vor allem im unteren Massenbereich. Dies konnte jedoch auf leicht variierende Zeiten bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zurückgeführt werden. Zwar konnten Banden in dem Massenbereich von LC3 detektiert werden, doch war keine Massenverschiebung sichtbar. Stattdessen war eine starke Hintergrundfärbung mit weiteren unspezifischen Banden bei ca. 50 kD (C) bzw. ca. 40 und 55 kD (D) zu sehen, die nicht weiter erklärt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Gleiche Experimente mit Awells-Zellen führten in beiden LC3-Antikörperfärbungen lediglich zu einer unspezifischen Bande bei ca. 50 kD.

Wie bereits in den Abschnitten 1.3.1 und 1.3.2 erwähnt, gibt es von LC3 drei Isoformen mit individuell sehr verschiedenen Eigenschaften. Dies betrifft sowohl ihre Gewebespezifität als auch ihre Laufeigen-

schaften in der SDS-PAGE [217]. Danach weisen LC3A und LC3B eine relativ hohe RNA-Expression in Herz, Gehirn, Skelettmuskel, Hoden und Niere auf, während die Expression von LC3C vor allem auf Placenta, Lunge und Eierstöcke beschränkt und selbst in diesen Geweben sehr viel niedriger ist. Ein deutlicher Unterschied zwischen LC3A und LC3B besteht darin, dass LC3A fast am stärksten in der Leber exprimiert wird, wo LC3B nur geringe Expression aufweist, dafür aber LC3B auch in peripheren Blutlymphocyten (PBL) exprimiert wird, wo gar kein LC3A nachweisbar ist.

Auch im Western Blot werden Unterschiede zwischen den drei Isoformen deutlich: LC3A und LC3C werden posttranslational auf gleiche Weise modifiziert, was die im Western Blot detektierbare Bandenverschiebung ausmacht, bei LC3A von 18 zu 16 kD, bei LC3C von 16 zu 15,5 kD. Die genaue Art der posttranslationalen Modifikation von LC3B ist dagegen nicht genau bekannt; in jedem Fall ergibt diese Isoform im Western Blot jedoch nur eine Bande bei 16 kD.

In den eingesetzten RCC068ZL-Zellen konnten, da es sich hier ja ursprünglich um Nierenzellen handelt, nach diesen Angaben potentiell die beiden Isoformen LC3A und LC3B nachgewiesen werden. Im Western Blot hätte also eine Bandenverschiebung detektierbar sein müssen. Falls jedoch in dieser Zelllinie nur die Isoform LC3B vorliegen würde, würde das erklären, warum jeweils nur eine Bande auf der entsprechenden Höhe detektierbar war. Dies trifft in jedem Fall für die Awells-Zellen zu, bei denen es sich um eine B-Zelllinie handelt, in denen nur die LC3B-Isoform exprimiert wird. Die Ursache dafür, dass bei den Awells-Zellen gar keine spezifische Bande detektierbar war, ist damit also nicht geklärt. Vielmehr zeigen diese Ergebnisse ein generelles Problem auf, das im Mangel spezifischer Autophagie-spezifischer und Western Blot-tauglicher Antikörper besteht.

Alle hier aufgeführten Nachweis-Bemühungen, die in dieser Dissertation zum Einsatz kamen, zeigen, dass durch Behandlung mit HBSS und Rapamycin eine Autophagie-Induktion in den behandelten Zellen zum Teil zwar tendenziell, jedoch nicht eindeutig nachweisbar war. Die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse sind daher zunächst nur als durch Autophagie-Behandlung induzierte, jedoch nicht als Autophagie-spezifische Phänomene zu betrachten.

#### 3.3.2 Protein-Expressionsanalysen Autophagie-assoziiierter Antigene

Da ein stringenter Nachweis für Autophagie im Kontext dieser Dissertation nicht möglich war, entstand die Idee, ein Screening zu entwickeln, in dem Autophagie-spezifische Protein-Expressions-Muster analysiert werden sollten. Ziel war, auf diese Weise ein Nachweisverfahren zu entwickeln, das auf Autophagie-spezifischen Expressionsmustern beruhen würde.

Man kann zwar annehmen, dass die Expression der meisten Autophagie-assoziierten Antigene sich bei erhöhter Autophagie-Aktivität nicht oder nur in geringem Maße ändert und es vielmehr zu einer Rekrutierung oder Aktivierung vorliegender Proteine kommt. Doch in *Arabidopsis thaliana* wurde als Reaktion auf Stresskonditionen bereits an einer ganzen Reihe von Autophagie-assoziierten Genen eine transiente Hochregulation festgestellt [478, 662]. Auch die Gewebeverteilung der Atg4B-Expression in Ratten und die Tatsache, dass Atg4B zusammen mit Atg8 in Stress-sensitiven Hefemutanten entsprechend hochreguliert wird, deuten darauf hin, dass die Expression von Atg4B mit der Autophagie-Rate korreliert [595, 663]. Von Atg5 ist bekannt, dass eine Überexpression zu erhöhter Autophagie-Aktivität

führt [440], und Grand et al. konnten nach Behandlung mit verschiedenen Stimuli eine erhöhte Proteinkonzentration von Atg5 feststellen, die zwar auf Apoptose zurückgeführt wurde, jedoch unter anderem durch Serumentzug induziert wurde, der auch Autophagie hervorrufen kann [198]. Schließlich konnten Prigione et al. zeigen, dass die Atg12-Expression durch Stressbedingungen wie Deletionsmutationen mitochondrialer DNA induziert wird. Dies führten sie auf folgenden Mechanismus zurück: durch Inhibition mitochondrialer Proteinsynthese oder Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) kommt es über die Hemmung des proteasomalen Abbaus zur Aminosäuredepletion und damit zu Autophagie-Induktion, die mit erhöhter Atg12-Expression einhergeht [434].

Bisher wurden die meisten dieser Untersuchungen zur Expression auf genetischer und nicht auf Proteinebene durchgeführt und vor allem hauptsächlich in Pflanzen. Dies rechtfertigt die Analyse der Proteinexpression Autophagie-assoziiierter Antigene im humanen System, da einerseits Expressionsveränderungen auf genetischer Ebene bekannt sind, andererseits im humanen System kaum Informationen zu Expressionsdaten nach Autophagie-Induktion vorliegen.

Zwei Gruppen von Proben wurden bei der Proteinexpressionsanalyse eingesetzt: eine „Verdünnungsgruppe“ und eine „Autophagie-Induktionsgruppe“.

Für die „Verdünnungsgruppe“ wurden in einem Gesamtzeitraum von etwa einem Monat immer nach einer Woche Zellen in verschiedenen Verdünnungen geerntet, um mit Hilfe der Expressionsdaten festzustellen, ob ein Autophagie-Anstieg bereits aufgrund erhöhter Zelldichten ohne weitere Behandlung erkennbar würde. Die Anzahl der Replikate richtete sich dabei nach Verfügbarkeit der Zellzahlen. Geerntet wurden Zellen in Verdünnungen von  $1 \cdot 10^3$ /ml bis  $5 \cdot 10^5$ /ml bei RCC068ZL-Überständen bzw. bis  $1 \cdot 10^6$ /ml bei Awells.

Zur „Autophagie-Induktionsgruppe“ wurden jeweils Triplikate folgender Proben der beiden Zelllinien Awells und RCC068ZL eingesetzt:

- N: Zellen in Normalmedium
- N-C: Zellen in Normalmedium mit  $40 \mu\text{M}$  Chloroquin
- H: Zellen in HBSS Mangelmedium
- H-C: Zellen in HBSS Mangelmedium  $40 \mu\text{M}$  Chloroquin
- R: Zellen in Normalmedium mit  $0,2 \mu\text{g}/\text{ml}$  Rapamycin
- R-C: Zellen in Normalmedium mit  $0,2 \mu\text{g}/\text{ml}$  Rapamycin und  $40 \mu\text{M}$  Chloroquin

Alle Zellen waren jeweils eine Woche vor und in den sechs Stunden während der entsprechenden Inkubation in einer Dichte von höchstens  $1 \cdot 10^5$ /ml bzw. etwa 30-50% Konfluenz gehalten worden.

Zellen, die in Normalmedium gehalten wurden (N), dienten als Kontrollzellen. In Zellen, die in HBSS-Mangelmedium gehalten wurden (H), wurde Autophagie durch Aminosäure- und Serumentzug induziert. In Zellen, deren Medium Rapamycin zugefügt wurde (R), erfolgte die Autophagie-Induktion durch die Inhibition von mTOR. Allen drei Behandlungen wurde jeweils eine Kontrollbehandlung mit dem lysosomalen Inhibitor Chloroquin gegenüber gestellt (N-C, H-C, R-C), um Autophagosomen vor ihrem Abbau zu bewahren und damit anzureichern.

Für das Screening wurden eine ganze Reihe von Antigenen, die im Autophagie-Signalweg involviert

sind, in Betracht gezogen. Antikörper gegen die zu untersuchenden Autophagie-assoziierten Antigene wurden zuvor in Western Blot-Analysen validiert. Dazu wurden Blots mit den Proben N, H, H-C und R der Zelllinie Awells und Pseudoblots jeder der sechs Behandlungsproben der Zelllinie RCC068ZL aus der Autophagie-Induktionsgruppe eingesetzt. Getestet wurden 15 verschiedene Antikörper gegen Atg3, Atg4, Atg5, Atg7, Atg8/ LC3, Atg12, Beclin-1, WIPI und mTOR, die unter anderem in der Tabelle 2.3 aufgeführt sind (Daten nicht gezeigt). Zur Proteinexpressionsanalyse eingesetzt wurden schließlich Antikörper gegen folgende in Tabelle 3.11 aufgeführte Antigene.

**Tabelle 3.11:** Autophagie-assoziierte Antigene, die mittels Proteinexpressions-Analyse nach Autophagie-Induktion untersucht wurden. Aufgeführt sind die Namen und Abkürzungen aus der *Entrez Gene* Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>) [348]. Weitere Ausführungen zur Funktion der einzelnen Antigene s. 1.3.1.

Antigen	Entrez GeneID	Funktion
ATG3, autophagy related 3 homolog (ATG3)	64422	E2-Homolog, konjugiert PE mit LC3-II
ATG4, autophagy related 4 homolog B (ATG4B)	23192	Cys-Protease, prozessiert C-Terminus von LC3-I
ATG5, autophagy related 5 homolog (ATG5)	9474	Adapter-Protein, beteiligt am Atg12-Atg5-Atg16-Konjugationssystem an der sich bildenden Autophagosomenmembran
ATG8, microtubule-associated protein 1 light chain 3 (MAP1LC3)	84557 (A), 81631 (B), 440738 (C)	Mikrotubuli-assoziiertes Protein, bindet als Lipoprotein an die Autophagosomenmembran
ATG12, autophagy related 12 homolog (ATG12)	9140	Ubiquitin-ähnliches Protein, beteiligt am Atg12-Atg5-Atg16-Konjugationssystem an der sich bildenden Autophagosomenmembran
ATG6, beclin 1, autophagy related (BECN1)	8678	Tumorsuppressorprotein, beteiligt an der Klasse III PI3K/p150-Komplex-induzierten Autophagie
ATG18, WD repeat domain, phosphoinositide interacting 1 (WIPI1)	55062	WD40 repeat protein, Proteinrekrutierung an (Autophagosomen-)Membranen
mTOR, FK506 binding protein 12-rapamycin associated protein 1 (FRAP1)	2475	Ser/Thr-Proteinkinase, inhibiert Autophagie
mTOR, FK506 binding protein 12-rapamycin associated protein 1 (FRAP1), pSer2448	2475	Ser2448 wird im Rahmen des PI3K/Akt Signalwegs phosphoryliert. Dies führt zur mTOR-Aktivierung und damit Autophagie-Hemmung.

Gegen ATG8/ LC3 wurden zwei verschiedene Antikörper eingesetzt. Gegen mTOR wurde sowohl ein Antikörper gegen die unphosphorylierte Autophosphorylierungsstelle Ser2481, also gegen das Gesamtprotein, eingesetzt als auch gegen das über den PI3K/ Akt Signalweg phosphorylierte Ser2448. Insgesamt wurde damit die Proteinexpression acht verschiedener Antigene mit zehn verschiedenen Antikörpern in 73 verschiedenen Proben getestet.

Die Erwartungen in diesem Experiment waren folgende: ab einer bestimmten Zelldichte und durch die Behandlung von HBSS oder Rapamycin müsste Autophagie induziert werden. Die Behandlung mit Chloroquin sollte zu einer Akkumulation von Autophagosomen führen. Das wiederum könnte entweder zur Folge haben, dass es zu einer negativen Rückkopplung und damit verminderter Autophagie-Induktion oder aufgrund des verminderten Abbaus des Autophagosomeninhalts zu verringerter Aminosäure-Verfügbarkeit und damit zu erhöhter Autophagie-Induktion käme.

Entsprechend wurde erwartet, dass mit zunehmender Zelldichte bzw. unter HBSS- oder Rapamycin-

Einfluss die Expression zumindest einiger Autophagie-assoziiierter Antigene steigen müsste bzw. im Fall von mTOR die Expression oder Aktivierung - dargestellt durch die Phosphorylierung an Position Ser2448 - sinken müsste. Bei den Chloroquin-behandelten Proben wurde ein Anstieg der ATG8/ LC3-Konzentration erwartet, da dieses Antigen mit Autophagosomenmembranen assoziiert ist und seine Konzentration daher zusammen mit der Autophagosomendichte hätte steigen müssen. Da der Einfluss von Chloroquin auf die Autophagie-Induktion generell nicht sicher war, konnten keine Erwartungen in bezug auf einen Anstieg oder Abfall der Konzentrationen der anderen Antigene aufgestellt werden. In jedem Fall bestand die Hypothese, dass mit entsprechender Behandlung zumindest in einzelnen Antigenen ein Expressionsmuster zu sehen sein könnte, das mit Autophagie-Induktion korrelieren würde. Dieses Muster sollte in beiden Zelllinien zu sehen sein, um eindeutig als Zelltyp-unabhängig interpretiert zu werden.

Weder die Auswertung der Proben der „Verdünnungsgruppe“ noch die der „Autophagie-Induktionsgruppe“ ergab jedoch für die untersuchten Antigene ein eindeutig signifikantes Autophagie-spezifisches Muster.

In der „Verdünnungsgruppe“ war weder bei RCC068ZL noch bei Awells Zellen ein konzentrationsabhängiger Proteinexpressionsanstieg auszumachen. In der „Autophagie-Induktionsgruppe“ wurde bei kaum einem Antigen durch HBSS- oder Rapamycin-Behandlung eine erhöhte Konzentration hervorgerufen. Nur bei ATG8/ LC3 konnte mit beiden Antikörpern eine sehr schwache, durch HBSS- bzw. Rapamycin-Behandlung induzierte Konzentrationssteigerung hervorgerufen werden (s. Abbildung 3.11). Dagegen kam es erwartungsgemäß zu einer deutlichen Deaktivierung von mTOR, was durch die Antikörperfärbung gegen die Phosphorylierungsstelle Ser2448 ersichtlich wurde. Diese Färbung wies sowohl deutlich niedrigere Signalwerte für die HBSS- und Rapamycin-behandelten Proben als für die Kontrollzellen auf als auch eine verringerte Phosphorylierung pro Gesamtprotein, die mit der Autophagie-Induktion korrelierte (s. Abbildung 3.11).

Ein Chloroquin-abhängiger Effekt war kaum auszumachen. Nur der mit dem ATG8/ LC3-Antikörper der Firma Abgent inkubierte Mikroarray wies eine Chloroquin-abhängige Steigerung der Signalintensität auf, die jedoch aufgrund der hohen Standardabweichungen nur wenig überzeugend war (s. Abbildung 3.11).

Ein weiterer Effekt, der bei der Auswertung sowohl der „Verdünnungsgruppe“, vor allem aber der „Autophagie-Induktionsgruppe“ auffiel, war die Zelllinien-Abhängigkeit der Expression von mTOR und Beclin 1. In der „Autophagie-Induktionsgruppe“ beispielsweise lagen die Signalwerte für mTOR in RCC068ZL mit 0,7 - 0,8 deutlich über denen von Awells mit 0,35 - 0,5. Im Gegensatz dazu war die Expression von Beclin 1 in RCC068ZL mit 0,4 - 0,6 niedriger als in Awells mit 0,7 - 1,0.

Die Hochregulation des mTOR-Signalwegs ist ein bekanntes Phänomen in verschiedenen Krebsarten, auch in RCC [311, 412] und führt unter anderem auch zur Aktivierung von HIF1 $\alpha$  [526]. Neben den Tyrosinkinase-Inhibitoren Sorafenib und Sunitinib ist daher seit 2005 auch der mTOR-Kinaseinhibitor Temsirolimus (Rapamycin) in den USA in der Bekämpfung gegen RCC zugelassen [19, 379].

Das Tumorsuppressorantigen Beclin 1 ist monoallelisch in einem hohen Prozentsatz verschiedener Krebsarten deletiert [6]. Die Identifizierung von Beclin 1 als Bestandteil Autophagie-assoziiierter Prozesse hat bereits vor einiger Zeit zu der Vermutung geführt, dass Autophagie in der Kontrolle des Zellwachs-

tums assoziiert sei [328, 442]. Doch während eine Tumorzell-Assoziation aufgrund der hier vorliegenden Ergebnisse sowohl für mTOR als auch für Beclin 1 bestätigt wurde, konnte eine Autophagie-Assoziation für beide Antigene nicht festgestellt werden.

Bei der Auswertung der Proben der „Autophagie-Induktionsgruppe“ mussten die Probenwerte aller sechs verschiedenen Behandlungs-Proben, die an einem bestimmten Tag geerntet worden waren, und auch eine N-Probe der RCC068ZL Zelllinie außer Acht gelassen werden, da sie extrem von den Probenwerten aller anderen Werte abwichen und hohe Proben-interne Standardabweichungen zeigten. Da von der Zelllinie Awells nur zwei N-Proben genommen worden waren, lag für die Gesamtauswertung damit nur eine einzige Kontrollzell-Probe vor.

Die starke Schwankung der Werte innerhalb von Probengruppen, deren Proben jeweils die gleiche Behandlung erfahren hatten oder in der gleichen Verdünnung gehalten worden waren, war ein generelles Phänomen. Typische Beispiele für diese Schwankungen sind in Abbildung 3.12 zu sehen, und auch die Standardabweichungen der gemittelten Werte in Abbildung 3.11 weisen auf große Expressionsunterschiede innerhalb der einzelnen Behandlungsgruppen hin. Allein diese Tatsache beeinträchtigt die Auswertung bzw. die Ziehung von Rückschlüssen auf eine Autophagie-Abhängigkeit der Autophagie-assoziierten Antigenexpression erheblich.

Es waren jedoch nicht nur Schwankungen innerhalb fast aller Behandlungsgruppen auffällig, sondern auch die Tatsache, dass die Proteinexpression einzelner Antigene zueinander sehr ähnlich sein konnte, wie beispielsweise in ATG3 und ATG8/ LC3 (s. Abbildung 3.12). Dieses Phänomen trat jedoch nur mit dem ATG8/ LC3-Antikörper der Firma Abgent auf, während das Expressionsmuster, das der Antikörper der Firma MBL erzeugte, ein vollkommen abweichendes Expressionsmuster aufwies. Die Ähnlichkeit der Expressionsprofile von ATG3 und ATG8/ LC3 weist jedoch daraufhin, dass es ganz offensichtlich Proben- bzw. Behandlungs-spezifische Einflüsse auf die Expression dieser beiden Antigene gibt. Nur die genaue Definition der Ursachen, die hinter diesen Einflüssen stecken, ist aufgrund der starken Abweichungen innerhalb der Behandlungsgruppen nicht ersichtlich. Trotzdem wird damit die Theorie unterstützt, dass Autophagie-assoziierte Antigene auf bestimmte Einflüsse mit einer Expressionsregulation reagieren.

Die großen Unterschiede zwischen den Expressionsprofilen der beiden ATG8/ LC3-Antikörper weisen erneut auf die Einschränkungen aller Antikörper-basierten Methoden zur Protein-Expressionsanalyse hin. Hier wurden zwei Antikörper gegen ATG8/ LC3 eingesetzt, von denen der eine ein polyklonaler Antikörper war, der durch Immunisierung von Kaninchen mit einem KLH (*Keyhole limpet hemocyanin*)-konjugierten synthetischen Peptid gegen den N-Terminus der Isoform MAP1LC3A generiert wurde. Der andere Antikörper war ein monoklonaler Antikörper, der nach der Immunisierung von Mäusen mit einem GST-Gesamtlängen-LC3-Fusionsprotein aufgereinigt worden war. Da Reaktivität sowohl gegen LC3-I als auch gegen LC3-II nachweisbar war, war auch dieser Antikörper offensichtlich gegen den N-Terminus gerichtet. Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die Epitope der beiden Antikörper unterschiedlich waren, zumal zu dem monoklonalen Antikörper keine weitere Information zu der zugrundeliegenden Isoform vorlag. Neben unterschiedlichen Epitopen haben jedoch auch die Generierung und Aufreinigung der Antikörper sowie die verschiedenen



Zweitantikörper, die zur Detektion dieser beiden Primärantikörper eingesetzt wurden, Einfluss auf die erzielten abweichenden Ergebnisse.

In der Arbeit von Dengjel et al. [129] wurden die RNA-Expressionswerte der jeweils in normalem bzw. in HBSS Mangelmedium inkubierten Awells aufgenommen. In diesem Kontext liegt die Frage nahe, ob eine Korrelation zwischen den RNA- und den Protein-Expressionsdaten herrscht. Dazu wurden jeweils all diejenigen Werte untersucht, die nach sechststündiger Inkubation in dem jeweiligen Medium erzielt wurden (s. Tabelle 3.12).

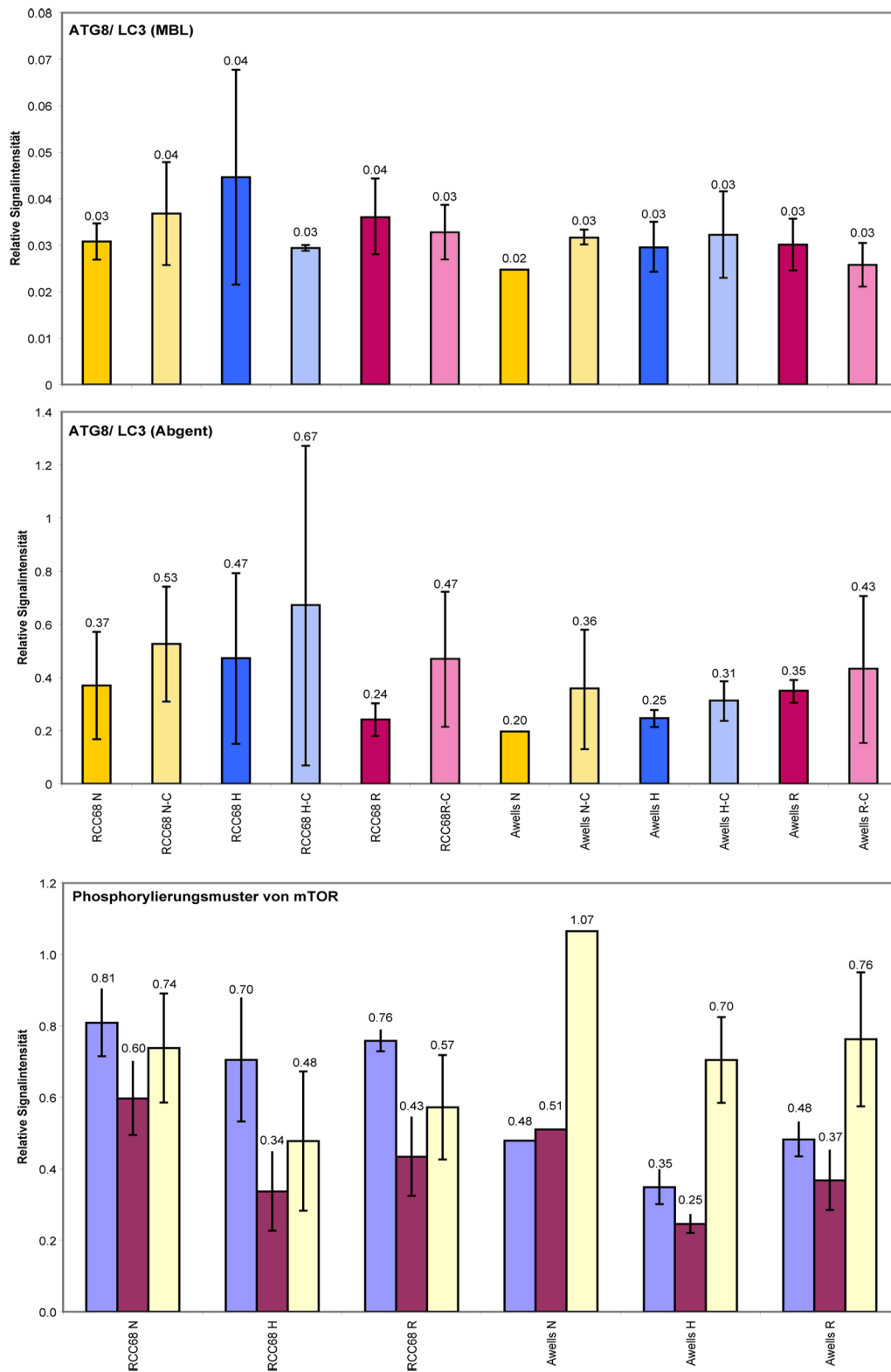
**Tabelle 3.12:** Vergleich der RNA- und der Protein-Expressionsdaten von Awells. Dargestellt ist jeweils die x-fache Expression bei Autophagie-Behandlung im Vergleich zur Expression in Kontrollzellen. Die RNA-Werte wurden von Dengjel et al. [129] generiert. Die Protein-Werte beziehen sich auf die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Werte ohne Berücksichtigung der Standardabweichungen. N = 6 Stunden Inkubation in Normalmedium, H = 6 Stunden Inkubation in HBSS Mangelmedium, R = 6 Stunden Inkubation in Normalmedium mit 0,2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Rapamycin. \* Der erste Wert bezieht sich auf Isoform MAP1LC3A, der zweite auf MAP1LC3B. \*\* Der erste Wert bezieht sich auf den Antikörper der Firma MBL, der zweite Wert auf den Antikörper der Firma Abgent.

Antigen	RNA (H vs N)	Protein (H vs N)	Protein (R vs N)
<b>ATG3</b>	1,23	0.83	1.07
<b>ATG4B</b>	0,87	0.96	1.10
<b>ATG5</b>	1,32	0.96	1.33
<b>ATG8/ LC3</b>	1,23/ 1,74*	1.19/ 1.26**	1.22/ 1.78**
<b>ATG12</b>	1,32	1.39	1.11
<b>ATG6/ Beclin 1</b>	1,00	0.86	1.23
<b>ATG18/ WIPI1</b>	0,93	0.92	1.05
<b>mTOR</b>	0,76	0.73	1.01

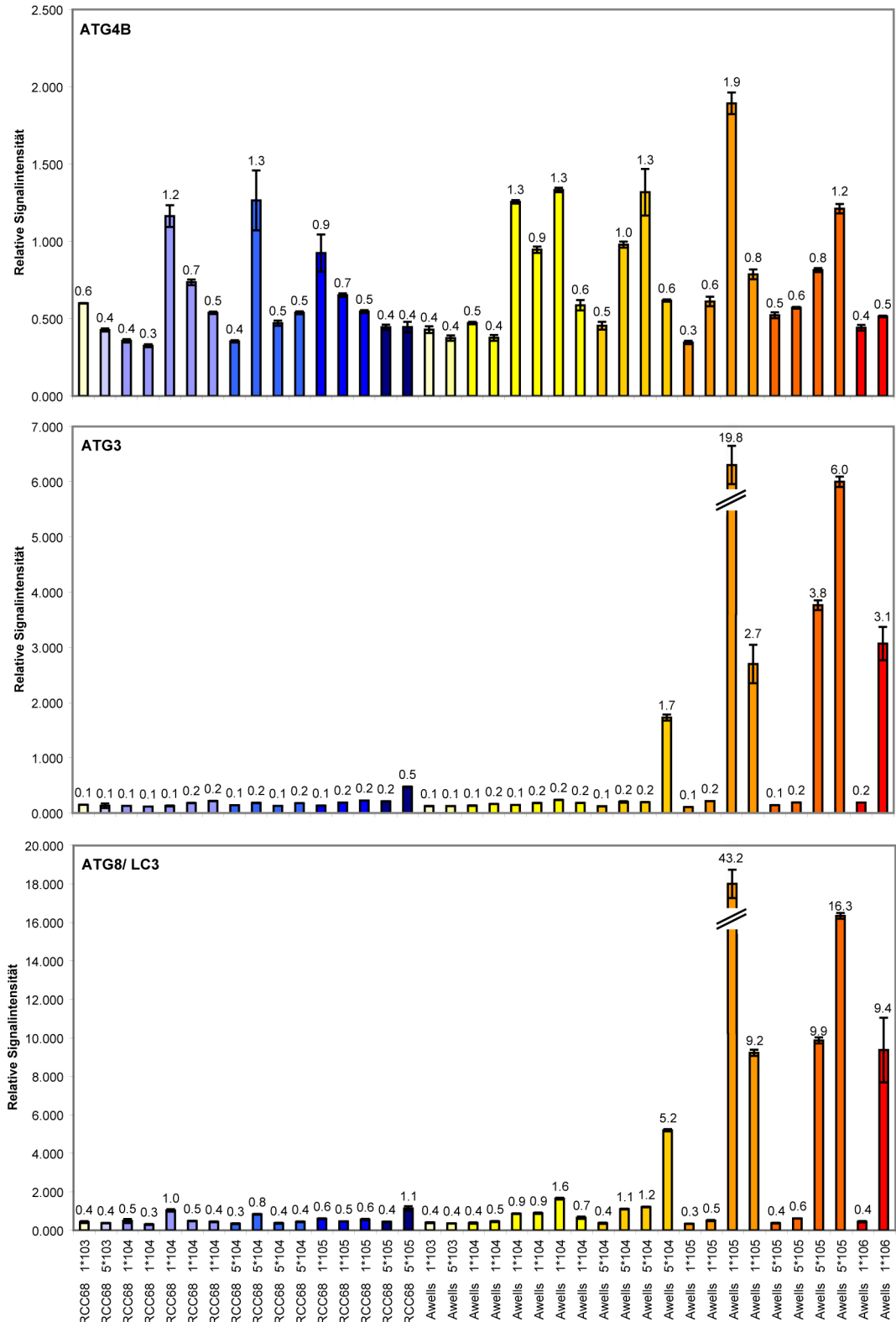
Bedenkt man die großen Standardabweichungen, die sich hinter den Proteinexpressionswerten verbergen und hier außer Acht gelassen wurden, müssen diese Ergebnisse natürlich mit großer Vorsicht interpretiert werden. Auch die Tatsache, dass die RNA-Expressionswerte in anderen Experimenten und mit anderen Proben gewonnen wurden als die der Proteinexpressionsdaten, schränkt die Vergleichbarkeit ein. Es ist jedoch auffällig, dass nur in einem einzigen Antigen alle drei Vergleiche zu dem gleichen Ergebnis kommen. Danach wird die Expression von ATG8/ LC3 unabhängig von der betrachteten Isoform und dem eingesetzten Antikörper durch Autophagie-Induktion immer gesteigert.

Ein weiterer Effekt, der unter diesen Betrachtungen auffällt, ist die Tatsache, dass durch HBSS-Behandlung nur die Proteinexpression von ATG8/ LC3 und ATG12 hochreguliert wird, während durch Rapamycin-Behandlung die Proteinkonzentration aller Antigene steigt. Die RNA- und Proteinexpression von WIPI1 und mTOR in Autophagie-induzierten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen weist in allen drei Fällen eher niedrige Werte auf.

Nach all diesen Betrachtungen liegt der Schluss nahe, dass Autophagie-Induktion größtenteils eine Rekrutierung vorhandener Autophagie-assoziiierter Antigene anstatt eine Steigerung der jeweiligen Proteinexpression hervorruft. Dies gilt zumindest für die hier untersuchten Antigene bis auf für ATG8/ LC3.



**Abbildung 3.11:** Relative Signalintensitäten der durch verschiedene Antikörper gegen ATG8/ LC3 generierten Signale und des Phosphorylierungsmusters von mTOR in den Proben der „Autophagie-Induktionsgruppe“ der Zelllinien RCC068ZL und Awells. Alle angegebenen Werte beziehen sich auf die gegen die Proteinexpression normalisierten und gegen den Nullwert korrigierten Werte, die sich aus der Verrechnung der vier Verdünnungsduplikate einer Probe ergaben. Beim Expressionsprofil des mTOR-Phosphorylierungsmusters stellen die blauen Balken die Signalwerte des gegen mTOR gerichteten Antikörpers und die violetten Balken die Signalwerte des gegen die Ser2448-Phosphorylierungsstelle von mTOR gerichteten Antikörpers dar. Die hellen Balken ergeben sich aus dem Verhältnis der Phosphorylierungs-Signale zu den mTOR-Expressionswerten.



**Abbildung 3.12:** Relative Signalintensitäten der Antigene ATG3, ATG4B und ATG8/ LC3 in den Proben der „Verdünnungsgruppe“ der Zelllinien RCC068ZL und Awells. Alle angegebenen Werte beziehen sich auf die gegen die Proteinexpression normalisierten und gegen den Nullwert korrigierten Werte, die sich aus der Verrechnung der vier Verdünnungsduplikate einer Probe ergaben. Bei den Proteinexpressionswerten des Antigens ATG8/ LC3 handelt es sich um die mit dem Antikörper der Firma Abgent generierten Werte.

Auch wenn große Schwankungen und Standardabweichungen die Auswertung der erzielten Ergebnisse beeinträchtigen, kann man doch eine Tendenz aus den Werten herauslesen, die nahe legt, dass es durch Autophagie zu einer Hochregulation der ATG8/ LC3-Produktion kommen könnte.

Dies wurde für Hefe auch bereits von Gasch et al. beschrieben [183], wobei sogar von einer bis zu über 10-fachen Steigerung der ATG8/ LC3-Expression unter Hungerbedingungen die Rede ist. Im Gegensatz dazu heisst es in den Ausführungen von Kovacs et al. [295], dass in Säugerzellen der Pool diverser vorliegender Autophagie-assoziiierter Antigene für einen gewissen Zeitraum ausreicht, um ohne weitere Hochregulation der Gen- oder Proteinexpression Autophagie am Laufen zu halten. Diese Aussage wird durch die in dieser Dissertation erzielten Ergebnisse weitgehend unterstützt.

Für einige Antigene konnte ein Recycling bereits beschrieben werden. So postulierten Reggiori et al. dass es einen regelrechten Recycling-Mechanismus für Atg9 in Hefe gibt, der vor allem durch den Atg1-Atg13-Komplex reguliert wird [453]. Für andere Antigene, namentlich den Atg12-Atg5-Atg16-Komplex, war zwar die Dissoziation von der Phagophoren-Membran in Hefe beschrieben worden [366, 367], doch ohne Berücksichtigung ihres weiteren Schicksals. Ein Abbau solcher freien Komplexe wäre naheliegend und damit die nötige Expressions-Induktion für weitere Autophagie-Vorgänge. Dies konnte jedoch zumindest für die beiden Antigene ATG5 und ATG12 hier nicht belegt werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass insgesamt kein Autophagie-spezifisches Expressionsmuster mit der Methode der Protein-Mikroarray-Technologie detektiert werden kann. Tendenzen, die eine erhöhte ATG8/ LC3-Konzentration nach Autophagie-Induktion aufweisen, waren zum einen weder eindeutig noch besonders stark ausgeprägt, zum anderen muss der Rückschluss in Frage gestellt werden, ob eine erhöhte Proteinkonzentration notwendigerweise auf eine gesteigerte Proteinexpression zurückzuführen ist. Man kann davon ausgehen, dass während ATG8/ LC3 im Lysosom abgebaut wird, neues synthetisiert wird. Ein Konzentrationsanstieg muss also nicht mit gesteigerter Synthese zusammenhängen, sondern kann auch durch unterdrückten lysosomalen Abbau ausgelöst werden.

#### **3.3.3 Protein-Expressionsanalysen ausgewählter Tumorantigene und Proliferationsmarker nach Autophagie-Induktion**

Immer häufiger wird Autophagie im Kontext der Onkogenese betrachtet (s. Ausführungen in Abschnitt 1.3.3). Dies ist insofern naheliegend, als die Sauerstoff- und Nahrungszufuhr in Tumorgewebe anderen Bedingungen unterliegt als in gesunden Geweben, so dass damit auch die Autophagie-Aktivität von Tumorzellen sich stark ändern kann. Auch die Assoziation von mTOR sowohl mit der Regulation des Zellzyklus und damit proliferativen Eigenschaften der Zellen als auch mit Autophagie führt zu einer Vernetzung dieser Phänomene.

Aus diesem Grund kam die Frage auf, ob die Induktion von Autophagie einen Einfluss auf die Proteinexpression und Aktivität von Proliferationsmarkern oder Tumorantigenen haben könnte. Dazu wurden beispielhaft einige Antigene ausgewählt, die in Tabelle 3.13 aufgeführt sind und deren Konzentration und Aktivität mittels Protein-Mikroarray-Technologie ermittelt wurde. Die zu untersuchenden Proben waren identisch mit der in Abschnitt 3.3.2 eingesetzten „Autophagie-Induktionsgruppe“.

**Tabelle 3.13:** Proliferationsmarker und Tumor-assoziierte sowie MHC-Antigene, die mittels Proteinexpressions-Analyse nach Autophagie-Induktion untersucht wurden. Aufgeführt sind die Namen und Abkürzungen aus der *Entrez Gene* Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>) [348].

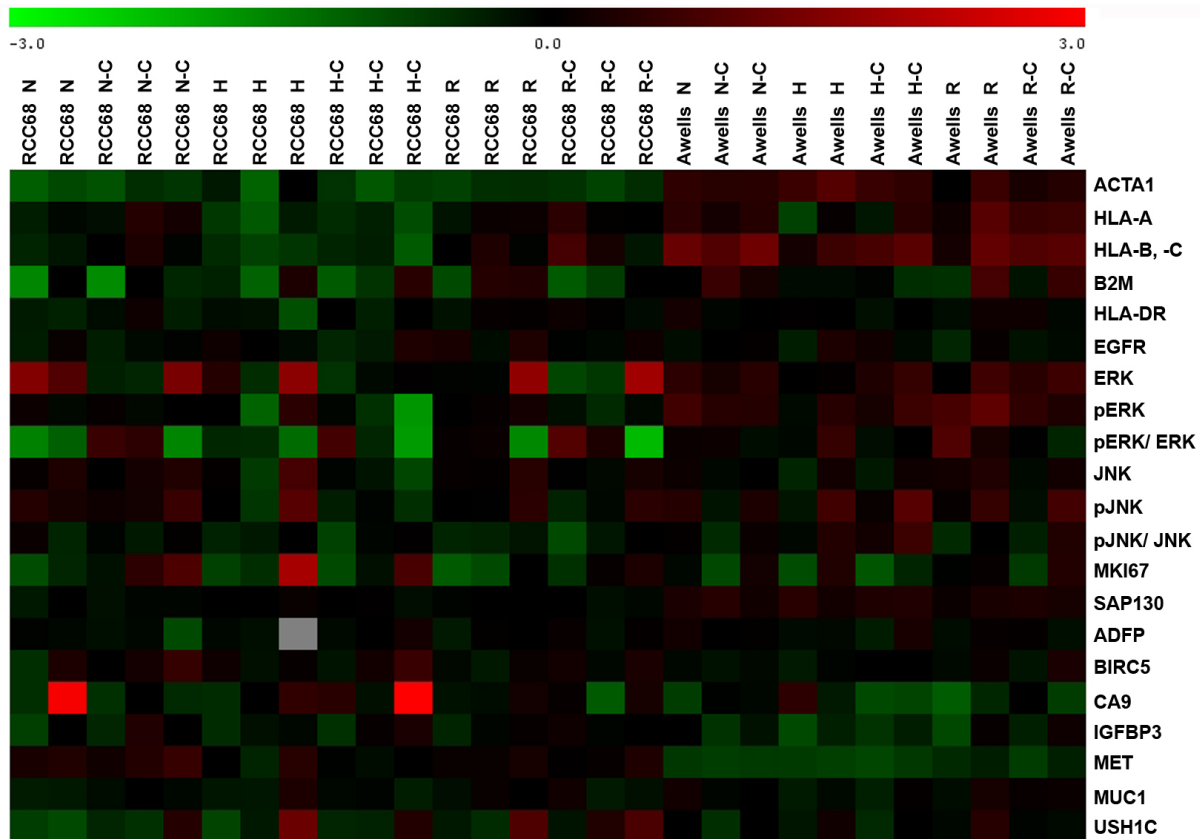
Antigen	Entrez GeneID	Funktion
Actin, alpha 1, skeletal muscle (ACTA1)	58	Protein des Cytoskeletts, als Kontrollantigen eingesetzt
Major histocompatibility complex, class I, A (HLA-A), Major histocompatibility complex, class I, B (HLA-B), Major histocompatibility complex, class I, C (HLA-C)	3105,3106,3107	HLA Klasse I-Peptid-Präsentation
Beta-2-microglobulin (B2M)	567	HLA Klasse I-Peptid-Präsentation
Major histocompatibility complex, class II, DR		HLA Klasse II-Peptid-Präsentation
Epidermal growth factor receptor (EGFR)	1956	Kontrolle des Zell-Wachstums und der Differenzierung
Mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1), Mitogen-activated protein kinase 3 (MAPK3)	5594,5595	Die MAP Kinasen MAPK1 und MAPK3 oder ERKs (extracellular signal-regulated kinases) sind an Zellwachstum, -Differenzierung und Proliferation beteiligt
Mitogen-activated protein kinase 8 (MAPK8), Mitogen-activated protein kinase 9 (MAPK9), Mitogen-activated protein kinase 10 (MAPK10)	5599,5601,5602	Die MAP Kinasen MAPK8-10 oder JNKs (c-Jun N-terminal kinases) sind an Zell-Differenzierung und Apoptose-Induktion beteiligt.
Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67 (MKI67)	4288	Reguliert die Zell-Proliferation
Sin3A-associated protein, 130kDa (SAP130)	79595	Beteiligt am RNA-Splicing
Adipose differentiation-related protein, Adipophilin (ADFP)	123	Tumorantigen
Baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin) (BIRC5)	332	Tumorantigen
Carbonic anhydrase IX (CA9)	768	Tumorantigen
Insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3)	3486	Tumorantigen
Met proto-oncogene (MET)	4233	Tumorantigen
Mucin 1 (MUC1)	4582	Tumorantigen
Usher syndrome 1C (USH1C)	10083	Harmonin bzw. NY-CO-38 ist an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt. Autoantikörper gegen Harmonin konnten in verschiedenen Krebsarten identifiziert werden.

Gegen die MAP-Kinasen gab es sowohl einen allgemeinen ERK (p42/44 MAPK)-spezifischen und einen JNK (SAPK/JNK)-spezifischen Antikörper. Um die Aktivität dieser Kinasen zu testen, wurde zusätzlich ein Antikörper gegen die jeweilige Phosphorylierungsstelle eingesetzt. Gegen die HLA-B und -C-Allele wurde ein gemeinsamer Antikörper eingesetzt.

Damit wurden insgesamt 21 verschiedene Antigene mit 18 verschiedenen Antikörpern in 35 verschiedenen Proben untersucht.

Unter den zu analysierenden Antigenen befanden sich nicht nur Proliferationsmarker und potentielle oder etablierte Tumorantigene, sondern auch Aktin als Referenzantigen, das in allen Zellen konstitutiv exprimiert wird, und MHC-Antigene. Die Proteinexpressionsanalyse der letzteren wurde deshalb durchgeführt, weil untersucht werden sollte, ob die MHC-basierte Antigen-Präsentation durch Autophagie-Induktion auf Ebene der MHC-Proteinexpression beeinflusst wird. Dies war auch im Hinblick auf die Untersuchungen des nächsten Abschnitts 3.3.4 von Interesse.

Daneben wurden Antigene untersucht, wie beispielsweise Ki67, das bereits als in diversen Krebsarten,



**Abbildung 3.13:** *Heatmap* der Proteinexpression ausgewählter Proliferationsmarker, Tumor-assoziiertes und MHC-Antigene in RCC068ZL und Awells nach Autophagie-Induktion. Die Relativen Signalintensitäten wurden logarithmiert. Unterexpression wird grün, Überexpression rot dargestellt, wobei als Grenzwerte -3,0 und 3,0 festgelegt wurden. Signale, die nicht auswertbar waren, wurden grau dargestellt.

unter anderem auch RCC, als Proliferationsmarker beschrieben wurde [123, 274, 444], oder die verschiedensten MAP (*mitogen-activated protein*) Kinasen, die als Reaktion auf Wachstumsfaktoren und diverse Stressoren eine große Bandbreite an Signalen induzieren.

Unter allen bekannten etablierten und potentiellen Tumorantigenen wurde auch nur eine beispielhafte Auswahl getroffen, unter anderem mit dem Tumorantigen MUC1, für das bereits eine Autophagie-Abhängigkeit seiner HLA Klasse II-Präsentation beschrieben wurde [138].

Auch in diesem Experiment beeinträchtigten wieder sehr starke Schwankungen und hohe Standardabweichungen innerhalb der gleichen Proben Gruppen die zuverlässige Auswertung der Daten. Alle Autophagie-assoziierten Effekte, die zu beobachten waren, lagen in einem Bereich von maximal Faktor 2 und waren daher vernachlässigbar.

Eine Kontrollstelle zu Beginn der Autophagie stellen die trimeren  $G_{i3}$  Proteine ( $\alpha_{i3}\beta\gamma$ ) dar: in GTP-gebundener Form senken sie die Autophagie-Rate, mit GDP steigern sie sie [401]. Das  $G_{\alpha}$  interagierende Protein (GAIP), das für die  $G_{i3}$  Protein-Aktivierung essentiell ist, ist gleichzeitig das cytoplasmatische Substrat von ERK (p42/44 MAPK). Seine Phosphorylierung ist unter Anwesenheit von Aminosäuren eingeschränkt. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass Aminosäuren die Raf-1 Kinase-Aktivität beein-

flussen, die im Signalzyklus oberhalb von ERK agiert [416].

Aufgrund dieser Aussagen war die Untersuchung des Einflusses der Autophagie-Induktion durch HBSS Mangelmedium auf die ERK-Phosphorylierung zusätzlich interessant. Der Effekt, der jedoch beobachtet werden konnte, lag, wie alle weiteren Autophagie-assoziierten Effekte, unter Faktor 2. Außerdem war die Steigerung der Phosphorylierungsrate in Rapamycin-behandelten Proben größer als in Proben, die in HBSS Mangelmedium inkubiert worden waren.

Die einzigen Effekte, die deutlicher hervortraten, waren erneut Zelltyp-spezifische: Aktin und auch die schweren Ketten der HLA Klasse I-Antigene wurden deutlich stärker in Awells, Tumorantigene wie CA9, IGFBP3 und MET deutlich stärker in RCC068ZL exprimiert. Diese Effekte setzten sich sogar über die starken Proben-internen Schwankungen hinweg durch (s. Abbildung 3.13).

Die Tatsache, dass in den antigenpräsentierenden B-Zellen eine höhere Konzentration an HLA-Molekülen vorlag, während gerade die Expression dieser Moleküle in den Tumorzellen verringert wurde, war zu erwarten gewesen. Auch die höhere Expression von Aktin in den mobilen B-Zellen ist nachvollziehbar. Mit den erhöhten Konzentrationen an Tumorantigenen in RCC068ZL wiederholt sich ein Phänomen, das bereits bei der Untersuchung der Autophagie-assoziierten Antigene Beclin 1 und mTOR zu beobachten war. Dass Tumorantigene in erhöhter bzw. das Tumorsuppressorprotein Beclin 1 in RCC-Zellen in geringerer Konzentration vorliegen als in einer B-Zelllinie, erfüllte die Erwartungen. Andererseits entspricht die Tatsache, dass nicht alle Tumorantigene solch eine Tumorzelllinien-Assoziation aufweisen, den Beobachtungen, die bei der Proteinexpressionsanalyse in Tumorgewebe aufgestellt wurden (s. Abschnitt 3.2).

Abschließend kann nach allen in dieser Dissertation durchgeführten Proteinexpressionsanalysen zu der Proteinmicroarray-Technologie festgestellt werden, dass diese Methode nicht nur von der Spezifität sondern auch sehr stark von der Qualität der eingesetzten Antikörper abhängig ist. Viele der Antikörper, die in den hier aufgeführten Experimenten eingesetzt worden waren, wiesen bei ihrer Validierung im Western Blot zwar Intensitätsmuster auf, die aufgrund der Probenvorbereitung naheliegender oder sogar erwartet worden waren. Doch ihre Spezifität oder Qualität kann aufgrund eines mehr oder weniger stark ausgeprägten Hintergrunds in einigen Fällen in Frage gestellt werden.

Einen vielleicht noch größeren Einfluss auf die Reproduzierbarkeit dieser Methode stellt die Art der Probenaufarbeitung dar. Die Probenaufarbeitung beginnt bereits bei der Zellkultur, bei der schon leichte Schwankungen der Temperatur oder Begasung, in der Medienzusammensetzung oder bei der Zelldichte zu deutlichen Effekten bei der Proteinzusammensetzung einer Zelle führen kann. Auch die Zellyse, angefangen von den eingesetzten Lysepuffern bis zur eigentlichen Lyse an sich, kann sehr variieren. Diese Effekte der Probenvorbereitung wurden bei den durchgeführten Experimenten durch die starken Abweichungen der Proteinkonzentrationen von vorsätzlich gleich behandelten Proben verdeutlicht.

### 3.3.4 HLA-Ligandenanalyse nach Autophagie-Induktion

Die Identifikation des Einflusses von Autophagie auf das HLA Klasse II-Ligandom auf der B-Zelllinie Awells [129] führte zu der Frage, ob solch ein Einfluss auch beim HLA Klasse I-Ligandom und vor allem auf einer Tumorzelllinie auszumachen sei. Dazu wurden erneut die beiden Zelllinien Awells und

RCC068ZL eingesetzt und jeweils in Normalmedium (Kontrollzellen), HBSS Mangelmedium oder Normalmedium mit  $0,2 \mu\text{g/ml}$  Rapamycin expandiert. Die Kontrollzellen wurden immer bei einer Dichte unter  $2 \cdot 10^5/\text{ml}$  bzw. unter 60% Konfluenz gehalten, um die basale Autophagie-Aktivität niedrig zu halten. Bei der adhärennten Tumorzelllinie war die Konfluenz in 2 l-Rollerflaschen jedoch nicht auszumachen; daher wurden auch hier Zelldichten aus dem Überstand bestimmt und sichergestellt, dass kein dichter Zellfilm an den Gefäßwänden entstand. Nach Erreichen eines Volumens von  $10 - 20 \cdot 1 \text{ l}$  bei Awells bzw.  $10 - 20 \cdot 300 \text{ ml}$  bei RCC068ZL-Zellen wurde eine sechsstündige Autophagie-Induktion mit den entsprechenden Medien durchgeführt, die Zellen direkt anschließend geerntet und bis zur weiteren Analyse weggefroren.

Mit Awells wurden zwei Expansionsdurchgänge durchgeführt. Bei dem ersten Durchgang war eine Autophagie-Induktion nur mit HBSS-Mangelmedium durchgeführt worden, bei denen die Zellen zur besseren Vergleichbarkeit in der gleichen Dichte gehalten worden waren wie die Kontrollzellen. Bei der zweiten Expansion wurde Autophagie sowohl mit HBSS-Mangelmedium als auch mit Rapamycin induziert. Die Zellpellets dieser zwei unterschiedlichen Expansionsdurchgänge wurden in getrennten Experimenten analysiert.

Im Anschluss an die Zellernte wurden die HLA-Liganden mittels Immunpräzipitation und Säurebehandlung aus den Zellpellets isoliert und massenspektrometrisch analysiert. Zum Paarvergleich mit anschließender relativer Quantifizierung nach Lemmel et al. [320] wurden die Peptide aller Proben modifiziert, Peptide der Kontrollzellen mit  $^1\text{H}_4$ -NicNHS-Ester (NIC), Peptide der HBSS- und Rapamycin-behandelten Zellen mit  $^2\text{D}_4$ -NicNHS-Ester (dNIC). Von den beiden Proben der ersten Expansion der Awells-Zellen wurde zuvor jeweils ein MSMS-Lauf mit unmodifizierten Peptiden durchgeführt. An der massenspektrometrischen Auswertung der Peptide waren auch Nina Hillen und Andreas Weinzierl beteiligt.

Insgesamt lagen zur Auswertung die in Tabelle 3.14 aufgeführten Proben mit dazugehörigen Ausbeuten vor. Da es bei der Aufarbeitung der RCC068ZL-Proben zu einer Polyethylenglykol (PEG)-Kontamination kam, konnten massenspektrometrisch keine Liganden detektiert werden. Aus diesem Grund bezieht sich die folgende Diskussion des Ligandoms und seiner Quellproteine nur auf die mit Awells durchgeführten Versuche.

Die Behandlung mit HBSS führte in allen Fällen zu einer starken Veränderung der Adhärenzeigenschaften der Zellen. Sie ließen sich extrem schlecht pelletieren, auch ohne Bremseinsatz bei der Zentrifugation, und waren selbst mit harschen Bedingungen wie EDTA-, Trypsin- oder Zellschaber-Einsatz nur schlecht von den Gefäßwänden zu lösen. Dies schränkte die Ausbeuten bei der Zellernte oft erheblich ein.

Dieses Phänomen zeigt, dass Aminosäure- und Serum-Depletion Veränderungen in Zellen hervorruft, die außerhalb der untersuchten Variablen liegen. Es ist unwahrscheinlich, dass allein Autophagie direkt die Oberflächeneigenschaften von Zellen beeinflusst. Dies verdeutlicht erneut die generelle Einschränkung dieser Auswertungen, da die im Folgenden beschriebenen beobachteten Phänomene nicht eindeutig einer Autophagie-Induktion zugeordnet werden können. Hinzu kommt die Tatsache, dass eine veränderte Medienzusammensetzung immer das HLA Klasse I-Ligandom verändern wird und ein kausaler direkter Zusammenhang zwischen Autophagie und dem HLA-Ligandom kaum abzuleiten ist.



Wie auch bei der RCC-Gewebe-Analyse (s. Abschnitt 3.1.1) bestand weder zwischen eingesetzter Zellmenge und HLA-Molekül- oder HLA-Liganden-Ausbeuten noch zwischen den HLA-Molekül- und HLA-Liganden-Ausbeuten selbst eine Korrelation. Auch die Liganden-Ausbeuten mit modifizierten und unmodifizierten Peptiden unterschieden sich deutlich. Die Proben Awells-N1 und -H1 enthielten nur jeweils 11 bzw. 14 gemeinsame Peptidsequenzen in den beiden Läufen mit modifizierten und unmodifizierten Peptiden. Es ist in jedem Fall beachtenswert, dass selbst von einem einzigen Milliliter Zellpellet 60 Liganden identifiziert werden konnten. Diese hohe Ausbeute wurde allein durch die Paarvergleiche bei der relativen Quantifizierung ermöglicht und zeigt einen weiteren Vorteil der Modifikation und der Paaranalytik von Peptiden bei der massenspektrometrischen Analyse auf.

**Tabelle 3.14:** Ausbeuten der Autophagie-behandelten Zellpellets. Die Behandlung fand für sechs Stunden jeweils in Normalmedium (Normal), HBSS Mangelmedium (HBSS) oder mit  $0,2\mu\text{g}/\text{ml}$  Rapamycin-versetztem Normalmedium (Rapamycin) statt. Angaben der Zelldichten beziehen sich auf die maximale Zelldichte im Überstand. Die Ausbeuten der HLA-Moleküle nach Immunpräzipitation wurde mittels Edman-Sequenzierung ermittelt. Die Proben Awells-N1 und Awells-N2 wurden sowohl jeweils in einem normalen Tandem-MS-Lauf analysiert (unmodifiziert) als auch, wie alle anderen Proben, als Paarvergleich mittels der Methode der relativen Quantifizierung nach Lemmel et al. [320] (modifiziert). n.d. = nicht determiniert,\* bei diesen Proben waren massenspektrometrische Auswertungen nicht möglich (s. Text).

	Awells-N1	Awells-H1	Awells-N2	Awells-H2	Awells-R2	RCC-N	RCC-H	RCC-R
<b>Behandlung</b>	Normal	HBSS	Normal	HBSS	Rapamycin	Normal	HBSS	Rapamycin
<b>Zelldichte</b>	$1 \cdot 10^5/\text{ml}$	$1 \cdot 10^5/\text{ml}$	$1 \cdot 10^5/\text{ml}$	$5 \cdot 10^5/\text{ml}$	$5 \cdot 10^5/\text{ml}$	$1 \cdot 10^5/\text{ml}$	$5 \cdot 10^5/\text{ml}$	$5 \cdot 10^5/\text{ml}$
<b>Zellpellet [ml]</b>	7	4	1	9	15	2.5	2.5	2.5
<b>HLA Klasse I Moleküle [pmol]</b>	1450	400	120	750	630	150	150	300
<b>HLA Klasse II Moleküle [pmol]</b>	1130	450	190	440	870	30	n.a.	30
<b>HLA Klasse I Liganden (unmodifiziert)</b>	46	61	n.d.	n.d.	n.d.	*	*	*
<b>HLA Klasse I Liganden (modifiziert)</b>	96	68	60	120	88	*	*	*

Zur Analyse der Autophagie-Einflüsse auf Awells standen damit folgende Datensätze zur Verfügung:

Insgesamt	590 Liganden mit 233 verschiedenen Peptidsequenzen,
auf Kontrollzellen	186 Liganden mit 138 verschiedenen Peptidsequenzen,
auf HBSS-behandelten Zellen	306 Liganden mit 192 verschiedenen Peptidsequenzen,
auf allen Autophagie-induzierten Zellen	403 Liganden mit 196 verschiedenen Peptidsequenzen.

Dabei bestanden folgende Überlappungen:

In allen N-Läufen gab es 5 gemeinsame Peptidsequenzen,  
in allen H-Läufen gab es 15 gemeinsame Peptidsequenzen,  
in allen Autophagie-Läufen gab es 44 gemeinsame Peptidsequenzen,  
in den beiden H2- und R2-Läufen gab es 79 gemeinsame Peptidsequenzen.

Die Tatsache, dass die Gemeinsamkeiten zwischen den beiden HBSS-behandelten Proben geringer waren, als die zwischen den beiden Autophagie-behandelten Proben H2 und R2, verdeutlicht, wie auch bei der Proteinmikroarray-Technologie die Abhängigkeit der Probenaufarbeitung von den erzielten Ergebnissen. Welche spezifischen Faktoren die Reproduzierbarkeit konkret besonders drastisch beeinflussen, kann nicht ermittelt werden. Aber die stark abweichenden Ausbeuten bei der Zellernte sowie die bei den Expansionen unterschiedlich eingestellten Zelldichten werden sicherlich wichtige Faktoren gewesen sein. Doch auch Unterschiede bei der jeweils relativ zeitaufwendigen Zellernte der großen Volumina dürften mit eine Rolle gespielt haben und auch die Tatsache, dass aufgrund der zwei getrennten Expansionsdurchgänge mit anderen Chargen der gleichen Zelllinie gearbeitet wurde.

Generell waren die Gemeinsamkeiten bei der Peptidpräsentation zwischen den MS-Läufen der beiden Proben H2 und R2 im Vergleich zu allen anderen Läufen, unabhängig von quantitativen Effekten am größten: etwa 80% der in der H2-Probe identifizierten Liganden konnte auch in der R2-Probe detektiert werden und sogar fast 90% der in der R2-Probe identifizierten Liganden in der H2-Probe. Nur in der H1-Probe wurden sogar noch mehr als 90% der in der N1-Probe identifizierten Peptide gefunden, dafür lag der umgekehrte Wert bei knapp über 61%. In allen weiteren Proben lag die Überlappung zwischen 35% und 70%, wobei diese Werte natürlich stark von der unterschiedlichen Ausbeute beeinflusst wurden.

Im Folgenden sind all diejenigen Peptide mit ihren Quellproteinen gelistet, die jeweils in allen Proben, die die gleiche Behandlung erfahren hatten, vorkamen. Eine komplette Auflistung aller im Rahmen dieser Experimente identifizierten Peptide findet sich im Listenanhang in Tabelle 5.3.

**Tabelle 3.15:** Peptide, die jeweils auf allen jeweiligen Proben der Kontrollzellen (Normal-Peptide), der HBSS-behandelten Zellen (HBSS-Peptide) oder der HBSS- und Rapamycin-behandelten Zellen (Autophagie-Peptide) isoliert wurden. Aufgeführt sind die Namen der Quellproteine aus der *Entrez Gene* Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>) [348]. In der letzten Spalte wird auf weitere Proben verwiesen, in denen die entsprechenden Liganden außerdem identifiziert werden konnten.

Normal-Peptide	Quellprotein	Entrez GeneID	weitere Proben
AEGIHTGQFVY	ribosomal protein L8	6132	H1, H2, R2
AEINNIKI	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa	7153	H2, R2
AEKLITQTF	nuclear distribution gene C homolog (A. nidulans)	10726	H1, H2, R2
AEMGKGSFRY	DENN/MADD domain containing 1B	163486	H1, H2, R2
AESLIAKKI	chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta)	10576	H1, H2, R2
AETPDIKLF	ribosomal protein S5	6193	H1, H2, R2
AIVDKVPSV	coatomer protein complex, subunit gamma	22820	H1, H2, R2
DEALIGKKF	chromodomain helicase DNA binding protein 2	1106	H2
EEFGRAFSF	major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1	3113	H1, H2, R2
EEFGRFASF	major histocompatibility complex, class II, DR alpha	3122	H1, H2, R2
EEIAIPSKKL	ribosomal protein S17	6218	alle
ILDQKINEV	ornithine decarboxylase 1	4953	H1, R2

Tabelle 3.15 – Fortsetzung

ILMEHIHKL	ribosomal protein L19	6143	H1, H2, R2
KILPTLEAV	interleukin enhancer binding factor 2, 45kDa	3608	H2
KLHGVNINV	RNA binding motif protein 4	5936	H1, H2
LLGPRLVLA	T-cell acute lymphocytic leukemia 1	6886	H1, H2, R2
NEIEDTFRQF	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 14kDa, V1 subunit F	9296	alle
NLYPFVKTV	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/ IMP cyclohydrolase	471	H1, H2, R2
QEAASLLGKKY	nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding)	4678	alle
SENLLGKQF	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	4288	H1, H2, R2
SEPDFVAKF	chromosome 14 open reading frame 119	55017	H2, R2
SEVILHHEY	activating signal cointegrator 1 complex subunit 3-like 1	23020	H1, H2, R2
SLSEKTVLL	CD59 molecule, complement regulatory protein	966	H1
TEAAHPIRLF	PRP8 pre-mRNA processing factor 8 homolog (yeast)	10594	H1, H2, R2
TLADLVHHV	transformation/transcription domain-associated protein	8295	H1, H2, R2
TLFPGKVHSL	WD repeat domain 6	11180	H1, H2, R2
VLALFVYVA	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 3	9603	H1
YLGRLAHEV	tetraspanin 9	10867	H1

HBSS-Peptide	Quellprotein	Entrez GeneID	weitere Proben
AEADKTIKVY	pleiotropic regulator 1 (PRL1 homolog, Arabidopsis)	5356	N1
AEDPLGAIHL	pleckstrin	5341	N2, R2
AEELFARKF	clathrin, heavy polypeptide (Hc)	1213	N2, R2
AEGIHTGQFVY	ribosomal protein L8	6132	N1, N2, R2
AEIISRRGF	adenosine deaminase, RNA-specific	103	R2
AEKEVKGAVY	damage-specific DNA binding protein 1, 127kDa	1642	N1
AEKLITQTF	nuclear distribution gene C homolog ( <i>A. nidulans</i> )	10726	N1, N2, R2
AELEGKLRVF	TNF receptor-associated factor 1	7185	R2
AEMGKGSFRY	DENN/MADD domain containing 1B	163486	N1, N2, R2
AESLIAKKI	chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta)	10576	N1, N2, R2
AETPDIKLF	ribosomal protein S5	6193	N1, N2, R2
AIVDKVPSV	coatomer protein complex, subunit gamma	22820	N1, N2, R2
ALAEIAKAEL	splicing factor proline/glutamine-rich (polypyrimidine tract binding protein associated)	6421	R2
ALDKATVLL	programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor)	27250	N1, R2
ALSDHHIYL	aldolase A, fructose-bisphosphate	226	N2, R2
EEAEIIRKY	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1	142	N1, R2
EEAQFETKKLY	15 kDa selenoprotein	9403	N1, N2
EEFELLGKAY	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 8, 110kDa	8663	N2, R2
EEFGRAFSF	major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1	3113	H1, H2, R2
EEFGRFASF	major histocompatibility complex, class II, DR alpha	3122	N1, N2, R2
EEIAIIPSKKL	ribosomal protein S17	6218	alle
EELDAQFPEGY	EST		N2, R2
EENTNILKF	tropomodulin 3 (ubiquitous)	29766	N1, R2
EEPTVIKKY	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2	8854	N1
EEQKNLHFF	nuclear receptor binding protein 1	29959	R2
FLASESLIKQI	bone marrow stromal cell antigen 1	683	R2
FLLDGFPRTV	adenylate kinase 2	204	R2
GEASRLAHY	histone 1, H1e	3008	N1
HEAEVLKQL	stathmin 1/oncoprotein 18	3925	N1, R2
HEIEALKSF	nardilysin (N-arginine dibasic convertase)	4898	R2
ILMEHIHKL	ribosomal protein L19	6143	N1, N2, R2
ILTDITKGV	eukaryotic translation elongation factor 2	1938	N2, R2
KLHGVNINV	RNA binding motif protein 4	5936	H1, H2
LLGPRLVLA	transmembrane emp24-like trafficking protein 10 (yeast)	10972	N1, N2, R2
LLLPGELAKHAV	histone 1, H1e	3008	N2
MEPSTAARAW	dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase	1650	N1
NEIEDTFRQF	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 14kDa, V1 subunit F	9296	alle

Tabelle 3.15 – Fortsetzung

NELNIIHKF	PRP31 pre-mRNA processing factor 31 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	26121	R2
NLYPFVKTV	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/ IMP cyclohydrolase	471	N1, N2, R2
QEASLLGKKY	nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding)	4678	alle
QEAGIKTAF	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase	10606	N1, R2
QEDLRTFSW	catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa	1499	N1, R2
QELQEINRVY	annexin A2	302	R2
RMLPHAPGV	histone deacetylase 1	3065	R2
SEAPSGSRKF	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 8, 110kDa	8663	N1
SEASRLAHY	histone 1, H2bl	8340	N1
SEEAEIIRKY	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1	142	N1
SEMPAAKRL	general transcription factor IIF, polypeptide 1, 74kDa	2962	N1
SENLLGKQF	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	4288	N1, N2, R2
SENPAKRLY	Williams Beuren syndrome chromosome region 22	114049	N1
SEPDFVAKFY	chromosome 14 open reading frame 119	55017	N2, R2
SEPESIRKW	clathrin, light polypeptide (Lca)	1211	N1
SESAQSKML	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1	3119	N1
SEVILHHEY	activating signal cointegrator 1 complex subunit 3-like 1	23020	N1, N2, R2
SIIGRLLEV	protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform	5499	N2
TEAAHPIRLF	PRP8 pre-mRNA processing factor 8 homolog (yeast)	10594	N1, N2, R2
TELPKAEKW	ISY1 splicing factor homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	57461	N1
TEVTGHRW	hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 2	610	N1
TLADLVHHV	transformation/transcription domain-associated protein	8295	N1, N2, R2
TLFPGKVHSL	WD repeat domain 6	11180	N1, N2, R2
VEDELVKKY	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1B	9031	R2
VEIYDRREY	integrin, beta 7	3695	N1, R2
YLLPAIVHI	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5	1655	N2

Autophagie-Peptide	Quellprotein	Entrez GeneID	weitere Proben
AEDPLGAIHL	pleckstrin	5341	N2
AELLFARKF	clathrin, heavy polypeptide (Hc)	1213	N2
AEGIHTGQFVY	ribosomal protein L8	6132	N1, N2
AEIISRGRF	adenosine deaminase, RNA-specific	103	
AEKLITQTF	nuclear distribution gene C homolog ( <i>A. nidulans</i> )	10726	N1, N2
AELEGKLRVF	TNF receptor-associated factor 1	7185	
AEMGKGSFRY	DENN/MADD domain containing 1B	163486	N1, N2
AESLIAKKI	chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta)	10576	N1, N2
AETPDIKLF	ribosomal protein S5	6193	N1, N2
AIVDKVPSV	coatomer protein complex, subunit gamma	22820	N1, N2
ALAEIAKAEL	splicing factor proline/glutamine-rich (polypyrimidine tract binding protein associated)	6421	
ALDKATVLL	programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor)	27250	N1
ALSDHHIYL	aldolase A, fructose-bisphosphate	226	N2
EEAEIIRKY	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1	142	N1
EEFELLGKAY	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 8, 110kDa	8663	N2
EEFGRFASF	major histocompatibility complex, class II, DR alpha	3122	N1, N2
EEIAIPSKKL	ribosomal protein S17	6218	alle
EELDAQFPEGY	EST		N2
EENTNILKF	tropomodulin 3 (ubiquitous)	29766	N1
EEQKNLHFF	nuclear receptor binding protein 1	29959	
FLASESLIKQI	bone marrow stromal cell antigen 1	683	
FLLDGFPRTV	adenylate kinase 2	204	
HEAEVLKQL	stathmin 1/oncoprotein 18	3925	N1
HEIEALKSF	nardilysin (N-arginine dibasic convertase)	4898	
ILMEHIHKL	ribosomal protein L19	6143	N1, N2
ILTDITKGV	eukaryotic translation elongation factor 2	1938	N2
LLGPRVLVA	transmembrane emp24-like trafficking protein 10 (yeast)	10972	N1, N2

Tabelle 3.15 – Fortsetzung

NEIEDTFRQF	ATPase, H+ transporting, lysosomal 14kDa, V1 subunit F	9296	alle
NELNIIHKF	PRP31 pre-mRNA processing factor 31 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	26121	
NLYPFVKTV	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/ IMP cyclohydrolase	471	N1, N2
QEAASLLGKKY	nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding)	4678	alle
QEAGIKTAF	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase	10606	N1 H1
QEDLRTFSW	catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa	1499	N1
QELQEINRVY	annexin A2	302	
SEEAEIIRKY	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1	142	N1
SEFFRSGKY	enolase 1, (alpha)	2023	N1
SENLLGKQF	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	4288	N1, N2
SEPDFVAKFY	chromosome 14 open reading frame 119	55017	N2
SEVILHHEY	activating signal cointegrator 1 complex subunit 3-like 1	23020	N1, N2
TEAAHPIRLF	PRP8 pre-mRNA processing factor 8 homolog (yeast)	10594	N1, N2
TLADLVHHV	transformation/transcription domain-associated protein	8295	N1, N2
TLFPGKVHSL	WD repeat domain 6	11180	N1, N2
VEDELVKKY	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1B	9031	

Alle Liganden, die in allen Proben mit Kontrollzellen identifiziert wurden, scheinen zu Autophagie-unabhängigen allgemein abundanten Liganden zu gehören. Denn fünf der Liganden wurden auf einer, alle weiteren in mindestens zwei der drei Autophagie-behandelten Proben gefunden. Damit wurde kein einziger spezifisch Kontrollzell-assoziiertes Ligand unter den abundanten Kontrollzell-Liganden identifiziert.

Auch unter den Peptiden, die in allen HBSS-behandelten vorkamen, fand sich keines, dass für diese Behandlungen spezifisch war.

Dafür gab es drei Liganden, die nur in der Rapamycin- und in keiner weiteren Probe nachgewiesen wurden: DSSGHILVPG, VLDELVRP und EEIAFLKKL. Letzterer stammt jedoch aus Vimentin und ist damit in jedem Fall kein Rapamycin-spezifischer Ligand. Die beiden anderen Liganden sind dagegen noch nie auf einer anderen Zelllinie oder einem anderen Gewebe in unserem Labor identifiziert worden. DSSGHILVPG ist ein Sequenzfragment der *carnosine dipeptidase 1 (metallopeptidase M20 family)* (CNDP1, Entrez GeneID: 84735), eine Dipeptidase, die vor allem im Gehirn exprimiert wird. VLDELVRP stammt aus dem Transkriptionsfaktor *hepatocyte nuclear factor 4, gamma* (HNF4G, Entrez GeneID: 3174).

Von den 43 Sequenzen, die in allen Autophagie-induzierten Proben detektiert worden waren, konnten zehn ausschließlich in den Autophagie-behandelten Proben detektiert werden, während alle weiteren Liganden auch zumindest in einer, meist jedoch in zwei MS-Läufen der Kontrollzellen nachweisbar waren. Allerdings muss einschränkend hinzugefügt werden, dass nur sechs der Liganden auch auf keiner weiteren Zelllinie und keinem Primärgewebe in unserem Labor identifiziert worden waren, nämlich die Liganden AEIISRRGF, AELEGKLRVF, EEQKNLHFF, NELNIIHKF, QELQEINRVY, VEDELVKKY.

Betrachtet man alle zehn „Autophagie-spezifischen“ Liganden im Pärchenvergleich der modifizierten Peptide, fällt auf, dass wiederum nur drei von ihnen, die zwei rein Autophagie-spezifischen Liganden AELEGKLRVF, AELEGKLRVF und der Ligand HEIEALKSF, der außerdem auf U937-Lymphomzellen

identifiziert worden war, auch in allen Autophagie-behandelten Proben überpräsentiert waren.

Im Gegensatz dazu waren die Liganden AEIISRRGF, NELNIIHKF, QELQEINRVY, die ausschließlich in Läufen der Autophagie-induzierten Proben fragmentiert wurden, und der Ligand FLASESLIKQI, der außerdem bereits auf einer RCC-Zelllinie detektiert worden war, sogar in allen drei Paarvergleichen zwischen Kontroll- und Autophagie-behandelten Zellen auf den Kontrollproben überpräsentiert.

Von allen anderen Liganden lagen meist widersprüchliche vergleichende Präsentationswerte je nach Probenvergleich - N1 im Vergleich zu H1, N2 im Vergleich zu H2 oder zu R2 - vor.

Diese Diskrepanz lässt sich dadurch erklären, dass viele Vorläuferionen der Peptide zwar in einer Probe sogar abundant vorkommen können, doch dass gleichzeitig auch mehrere andere Vorläuferionen zur gleichen Zeit von der HPLC ins Massenspektrometer eluieren, die stattdessen zur Fragmentierung ausgewählt werden. Erst durch den Paarvergleich der Vorläuferionen wird das Vorkommen derselben dann erst offensichtlich. Da in den hier aufgeführten Beispielen keine Fragmentspektren der dabei identifizierten Vorläuferionen in den Kontrollzell-Proben vorliegen, kann nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass hier Vorläuferionen verschiedener Peptidsequenzen mit identischen  $m/z$ -Werten und identischer Retentionszeit zwischen den Kontrollzellen und den Autophagie-behandelten Proben verglichen werden. Doch diese Möglichkeit ist relativ unwahrscheinlich.

Es kann zusammenfassend trotz all dieser Einschränkungen festgestellt werden, dass von zehn Liganden, die in Autophagie-behandelten und keiner Kontrollzell-Probe identifiziert wurden, sechs Liganden auch im Abgleich mit allen in unserem Labor identifizierten Peptiden Autophagie-spezifisch sind und drei Liganden auch auf Autophagie-behandelten Zellen im Vergleich zu Normalzellen überpräsentiert sind. Diese drei Liganden sollen im Folgenden etwas ausführlicher besprochen werden.

AELEGKLRVF ist ein Peptidfragment aus dem Adapterprotein *TNF receptor-associated factor 1* (TRAF1, Entrez GeneID: 7185). TRAF1 ist an den antiapoptotischen TNF-Rezeptor-Signalwegen beteiligt, also vor allem bei der Aktivierung der MAP Kinase JNK und NF $\kappa$ B [615]. Dabei bildet es mit TRAF2 einen Komplex, der mit *inhibitor-of-apoptosis* Proteinen (IAPs) interagiert [482]. Dieser antiapoptotische Einfluss von TRAF1 könnte die Überpräsentation dieses Peptids auf Autophagie-behandelten Zellen erklären. Allerdings kann eine Überexpression auch durch den Epstein-Barr Virus (EBV) hervorgerufen werden [377], und Awells sind eine EBV-transformierte B-Zelllinie.

VEDELVKKY stammt aus dem *bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1B* (BAZ1B, Entrez GeneID: 9031). Wie alle Bromodomänen-Proteine ist auch dieses beteiligt an der Chromatin-abhängigen Regulation der Transkription [260] und, als Komponente des *WSTF-ISWI chromatin remodeling complex* (WICH) bei der DNA Replikation [60].

Das Quellprotein des Liganden HEIEALKSF ist schließlich *nardilysin (N-arginine dibasic convertase)* (NRD1, Entrez GeneID: 4898). Dieser Ligand wurde, wie bereits erwähnt, auch schon auf U937-Lymphomzellen gefunden. NRD1 ist eine cytosolische Metalloendopeptidase [239], die an der Polyadenylierungs-unabhängigen RNA-Prozessierung beteiligt ist [544].

Es fällt auf, dass die meisten der in Tabelle 3.15 genannten Quellproteine v.a. am mRNA-Stoffwechsel und der Protein-Biosynthese beteiligt sind oder Membran- und Transport-assoziierte Proteine darstellen. Dies sind bei erhöhter Autophagie sicherlich Proteine, die tatsächlich hochreguliert werden könnten,

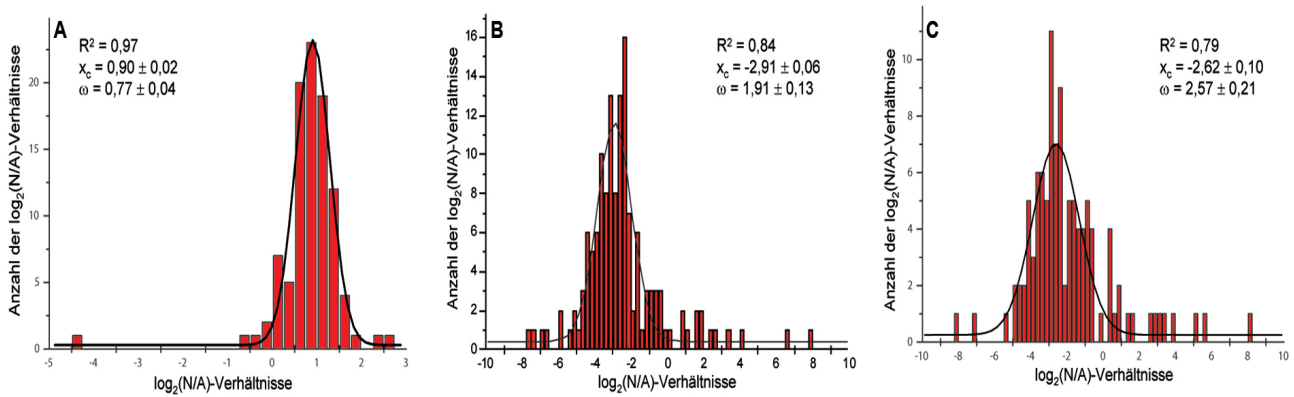
da ein verstärkter Proteinabbau zu erhöhter Syntheserate führt, die mit einer Hochregulation mRNA-assoziiierter Proteine einhergeht. Genauso spielen bei der Autophagie Transport-Prozesse eine wichtige Rolle, so dass auch die erhöhte Abundanz der damit verbundenen Proteine bei induzierter Autophagie leicht nachzuvollziehen ist. Da jedoch, bis auf die zehn genannten Liganden, alle weiteren Sequenzen auch mindestens in einer Kontrollzell-Probe gefunden wurden, und all diese Prozesse auch zu der normalen homöostatischen Aktivität jeder Zelle gehören, kann kaum von Autophagie-Spezifität die Rede sein. Vielmehr kann man hier von „Selbstproteinen“ sprechen, die ohnehin in allen Zellen vorkommen. Dies wird auch dadurch verdeutlicht, dass die meisten der in Tabelle 3.15 genannten Quellproteine zum Teil durch andere, oft jedoch auch durch dieselben Liganden aus weiteren Geweben in unserem Labor isoliert werden konnten. Drei Liganden, EEIAIIPSKKL aus einem ribosomalen Protein, NEIEDTFRQF aus einer vakuolären ATPase und QEAASLLGKKY aus einem Histon H1-bindenden Protein, kommen sogar in allen hier untersuchten Proben vor.

Ein interessanter Kandidat befand sich jedoch unter den in Tabelle 3.15 genannten Quellproteinen: der Proliferationsmarker Ki67. Seine Proteinexpression war in den Autophagie-behandelten Zellen nicht hochreguliert (Vgl. Abschnitt 3.3.3). Außerdem konnte er auch in beiden Kontrollzell-Proben als Ligand identifiziert werden. Es scheint sich hier also um einen für die Zelllinie allgemein recht ausgeprägt exprimierten Proliferationsmarker zu handeln.

Insgesamt lagen fünf MS-Läufe vor, in denen eine relative Quantifizierung modifizierter Peptide in folgenden Paarvergleichen möglich war: Awells-N1 versus Awells-H1, Awells-N2 versus Awells-H2 und Awells-N2 versus Awells-R2. Zur relativen Quantifizierung war das Mischungsverhältnis der jeweiligen Proben densitometrisch bestimmt worden. Da diese Methode zu keinem exakten Mischungsverhältnis führt, mussten alle im Übersichtslauf ermittelten Verhältnisse zusätzlich normiert werden. Dazu wurde von allen Verhältnissen, bei denen Paarsignale detektiert werden konnten, der binäre Logarithmus gebildet. Von diesen Logarithmen wurde eine Häufigkeitsverteilung aufgestellt, die, unter Annahme einer Normalverteilung der Verhältnisse, einer Gauß-Funktion angenähert wurde. Das Peakzentrum ( $x_c$ ) dieser Funktion wurde bestimmt und zur Normierung der Peptid-Verhältnisse von allen logarithmierten Verhältnissen subtrahiert. 98, 141 bzw. 108 Peak-Verhältnisse wurden damit jeweils für die Kalkulation des Modus in den Paarvergleichen N1-H1, N2-H2, bzw. N2-R2 bestimmt. Abbildung 3.14 gibt einen Überblick über die Qualität der Regression und der für die einzelnen Proben bestimmten Peakzentren und Kurvenbreiten.

Nur das Mischungsverhältnis der Proben N1 und H1 war offensichtlich gut gewählt gewesen. Hier rechtfertigt der  $R^2$ -Wert der Regression über 0,96 die Annahme der Normalverteilung der Peptidverhältnisse. Im Gegensatz dazu ergaben sowohl niedrige  $R^2$ -Werte als auch weite Abweichungen der Peakzentren vom Nullwert in den beiden anderen Paarvergleichen keine Daten, die eine Normalverteilung der Proben überzeugend belegen. Dies lag wahrscheinlich hauptsächlich an Ungenauigkeiten bei der Durchführung der  $OD_{262}$ -Bestimmung.

Geht man trotzdem von einer Normalverteilung der Peptidverhältnisse aus, kann mit Hilfe des Wertes  $\omega$  berechnet werden, innerhalb welcher Grenzen sich ein bestimmter Prozentsatz aller Verhältniswerte befindet. Dieser Prozentsatz wurde hier willkürlich auf 97,5% festgelegt. Danach lagen nach Korrektur



**Abbildung 3.14:** Häufigkeitsverteilung der binär logarithmierten Verhältnisse Normal/Autophagie (N/A) identifizierter NIC/dNIC-Paare aus den Paarvergleichen N1 versus H1 (A), N2 versus H2 (B) und N2 versus R2 (C) sowie Näherung dieser Verteilung durch eine Gauß-Funktion. Angegeben sind die Regression der Kurve  $R^2$ , das Peakzentrum, nach dem die Verhältnisswerte korrigiert wurden ( $x_c$ ), und die Kurvenbreite bei halbmaximaler Peakhöhe ( $\omega$ ).

der Kurvenverschiebung im Paarvergleich N1-H1 97,5% der Peptidverhältnisse innerhalb von  $\pm 0,83$ , bei N2-H2 innerhalb von  $\pm 2,23$  und bei N2-R2 innerhalb von  $\pm 2,88$ . Aufgrund dieser Angaben wurden alle Peptidpaare, deren Verhältnisse außerhalb der Werte  $\pm 1$  bei N1-H1,  $\pm 2,5$  bei N2-H2 und  $\pm 3$  bei N2-R2 lagen, als potentiell über- oder unterrepräsentiert betrachtet (s. Tabelle 3.16).

Es muss hierbei erwähnt werden, dass bei Untersuchungen der biologischen Varianz innerhalb gleich behandelter Proben eine Über- oder Unterrepräsentation um den Faktor 1,4 in 95% der Peptidverhältnisse als üblich angesehen werden kann [627]. Die Tatsache, dass in diesem Fall die vorliegenden Proben unterschiedliche Behandlungen erfuhren, beeinflusst diesen Faktor jedoch wahrscheinlich ähnlich nachhaltig wie die hier beobachtete Streuung der Verhältnisswerte.

**Tabelle 3.16:** Peptide, die entsprechend relativer Quantifizierung in den Paarvergleichen zwischen Normal (N)- oder Autophagie (H bzw. R)-behandelten Proben über- oder unterrepräsentiert waren. Dazu sind die binären logarithmischen Werte der Intensitätsverhältnisse angegeben. Positive Werte entsprechen einer Über-, negative Werte einer Unterrepräsentation in Autophagie-behandelten Zellen. Als Quellproteine sind die Namen und Abkürzungen aus der *Entrez Gene* Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>) [348] aufgeführt. \* Peptid wurde in beiden N2-Paarläufen als unterrepräsentiert identifiziert. \*\* Peptid wurde in N2-H2 als überrepräsentiert, in N2-R2 als unterrepräsentiert identifiziert.

**Paarvergleich zwischen Awells-N1 und Awells-H1**

Log2 (Intensität [dNIC/ NIC])	Peptidsequenz	Quellprotein	Entrez GeneID
5.33	GFVIPVIII	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 10 (P2RY10)	27334
1.48	RLEQVYFSELD	spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (sacin) (SACS)	26278
1.37	QEDLRTFSW	GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 1 (G3BP1)	10146
1.11	FLQLLVLIK	modulator of apoptosis 1 (MOAP1)	64112
-1.40	VMAPRTLVL	HLA-A major histocompatibility complex, class I, A (HLA-A)	3105
-1.75	TLADLVHHV	transformation/transcription domain-associated protein (TRRAP)	8295



Tabelle 3.16 – Fortsetzung

<b>Paarvergleich zwischen Awells-N2 und Awells-H2</b>			
<b>Log2 (Intensität [dNIC/ NIC])</b>	<b>Peptidsequenz</b>	<b>Quellprotein</b>	<b>Entrez GeneID</b>
4.61	AELDRQIKSF**	spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (alpha-fodrin) (SPTAN1)	6709
4.41	SESAQSKML	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 2 (HLA-DQB2)	3120
4.01	SEMQRHYVMY	amino-terminal enhancer of split (AES)	166
3.63	SEEDLKVLF	polypyrimidine tract binding protein 1 (PTBP1)	5725
3.06	AEAIYVTRHLF	nucleoporin 43kDa (NUP43)	348995
2.94	SEINERVVQHF	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 1 (ITPR1)	3708
2.55	KENPLQFKF	radixin (RDX)	5962
-2.81	ALKDLINEA	proliferating cell nuclear antigen (PCNA)	5111
-3.71	KLGEIVTTI	ADP-ribosylation factor 1 (ARF1)	375
-3.86	SLSEKTVLL*	CD59 molecule, complement regulatory protein (CD59)	966
-3.92	NQVFKKIF	EST	
-4.44	ALDKATVLL*	programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor) (PDCD4)	27250
-4.59	LLGPRLVLA*	transmembrane emp24-like trafficking protein 10 (yeast) (TMED10)	10972
-4.69	RIIDVVYNA*	ribosomal protein S8 (RPS8)	6202
-4.72	LLLPGELAKHAV*	histone cluster 1, H2bd (HIST1H2BD)	3017
-5.22	EEIAIIPSKKL	ribosomal protein S17 (RPS17)	6218
-5.62	RGSVGAHLLY	TCR delta chain (VJ)	
-6.33	TLTSKLYSL*	ubiquinol-cytochrome c reductase complex (7.2 kD) (UCRC)	29796
-7.03	VLALFVYVA*	hypothetical protein LOC203547 (LOC203547)	203547
-9.44	TYEAVREV	ribosomal protein L10a (RPL10A)	4736
-10.75	RLDDAIHVL	transcription factor 4 (TCF4)	6925
<b>Paarvergleich zwischen Awells-N2 und Awells-R2</b>			
<b>Log2 (Intensität [dNIC/ NIC])</b>	<b>Peptidsequenz</b>	<b>Quellprotein</b>	<b>Entrez GeneID</b>
5.45	AEKLITQTF	nuclear distribution gene C homolog (A. nidulans) (NUDC)	10726
4.58	AEFTKSIAKF	signal peptidase complex subunit 2 homolog (S. cerevisiae) (SPCS2)	9789
-3.06	SLSEKTVLL*	CD59 molecule, complement regulatory protein (CD59)	966
-3.10	VEIYDRREY	ITGB7 integrin, beta 7 (ITGB7)	3695
-3.32	ALDKATVLL*	programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor) (PDCD4)	27250
-3.44	LLGPRLVLA*	transmembrane emp24-like trafficking protein 10 (yeast) (TMED10)	10972
-3.56	LLLPGELAKHAV*	histone cluster 1, H2bd (HIST1H2BD)	3017
-4.03	RGSVGAHLLY	TCR delta chain (VJ)	
-4.23	TLTSKLYSL*	ubiquinol-cytochrome c reductase complex (7.2 kD) (UCRC)	29796
-5.33	DEALIGKKF	chromodomain helicase DNA binding protein 2 (CHD2)	1106
-5.66	VLALFVYVA*	hypothetical protein LOC203547 (LOC203547)	203547
-5.96	AELDRQIKSF**	spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (alpha-fodrin) (SPTAN1)	6709
-6.49	AEMGKGSFRY	EST	
-8.22	YLGRLAHEV	ribosomal protein L13a (RPL13A)	23521
-10.68	RIIDVVYNA*	ribosomal protein S8 (RPS8)	6202

Zunächst einmal fiel auf, dass eine weitaus größere Anzahl an Peptiden auf Kontroll- gegenüber Auto-phagie-Zellen überpräsentiert waren als umgekehrt. Eine weitere Auffälligkeit war die Tatsache, dass mehrere Peptide bzw. Quellproteine in mehreren Paarvergleichen auf den Kontroll-Proben überprä-

sentiert waren, während keines der Peptide bzw. Quellproteine, die in Autophagie-behandelten Zellen überpräsentiert waren, dies in verschiedenen Behandlungen oder Experimenten bestätigte.

Eine besondere Ausnahme unter den Autophagie-überpräsentierten Peptiden bildete das Spektrin-Peptid AELDRQIKSF, das im HBSS-Kontrollzell-Vergleich (N2-H2) Autophagie-spezifisch überpräsentiert war, während es im Rapamycin-Kontrollzell-Vergleich (N2-R2) unter den unterpräsentierten Peptiden zu finden war. In beiden Fällen war der Faktor der Über- bzw. Unterpräsentation mit 4,61 bzw. 5,96 recht deutlich ausgeprägt und daher glaubwürdig. Dieses Phänomen deutet auf die doch relativ großen Unterschiede zwischen den beiden Autophagie-Induktionsformen der Aminosäure-Depletion und mTOR-Inhibition hin. Diese Unterschiede waren bereits in der Zellkultur zu beobachten; auf die Veränderungen der Oberflächeneigenschaften in HBSS-behandelten Zellen wurde bereits eingegangen. Aber auch die Zellvitalität ging bei HBSS- im Vergleich zu Rapamycin-Behandlung deutlicher zurück. So ist es nicht verwunderlich, wenn Spektrin in diesen Zellen hochreguliert zu sein scheint, da dieses Protein sowohl in der Verstärkung von Zelladhäsions-Komplexen als auch bei der DNA Reparatur beteiligt ist.

Andererseits ähnelten sich, wie bereits erwähnt, die Ligandome der beiden Proben H2 und R2 im Vergleich zu allen anderen Läufen am meisten. Dies wiederum wurde durch die vielen gemeinsamen unterpräsentierten Peptide unterstrichen.

Zum Schluss mag verwundern, dass zwar einerseits viel mehr Peptide auf Kontrollzellen überpräsentiert gefunden wurden als auf Autophagie-behandelten, dass aber andererseits in der Einzel-Ligandenanalyse die meisten auf Kontrollzellen identifizierten Peptide auf mindestens zwei, meist jedoch auf allen Autophagie-behandelten Zellen vorkamen. Im Gegensatz dazu teilten einige der Autophagie-behandelten Proben ihre Liganden nur mit einer und in drei Fällen sogar mit keiner Kontrollzellprobe. In diesem Zusammenhang fällt der unterschiedliche Informationsgehalt der Einzel-Liganden- bzw. Fragmentspektren-Analyse im Vergleich zur der Paarvergleichs- bzw. Vorläuferionen-Analyse auf.

Die Bandbreite der Quellproteine der in Autophagie-behandelten Zellen überpräsentierten Peptide ist recht groß. Über eines dieser Quellproteine ist jedoch bereits eine Assoziation mit Autophagie bekannt: der *inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 1* (ITPR1). Der Entzug intrazellulären 1,4,5-Inositoltrisphosphats (IP(3)) stimuliert die Autophagie-Signalkaskade. Criollo et al. konnten zeigen, dass es durch Blockierung des IP(3) Rezeptors (ITPR1) in gleicher Weise zu Autophagie-Stimulation kam wie durch Nahrungs-Depletion [115].

Aber auch die anderen Quellproteine der Autophagie-assoziierten überpräsentierten Peptide könnten bisher noch nicht bekannte Funktionen im Autophagie-Signalweg ausüben. Dazu könnten Nukleinsäure-assoziierte Prozesse zählen, bei denen vielleicht das *nuclear distribution gene C homolog* (NUDC), das *GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 1* (G3BP1) oder das *polypyrimidine tract binding protein 1* (PTBP1) eine Rolle spielen könnten. Auch Proteine des Cytoskeletts, wie *radixin* (RCX), Nukleoporine, wie das *nucleoporin 43kDa* (NUP43) oder Chaperone, wie *sacsin* (SACS), und schließlich G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, wie der *purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 10* (P2RY10) könnten in Zusammenhang mit Autophagie-assoziierten Prozessen stehen. Doch solche Rückschlüsse sind aufgrund der alleinigen Information aus dem Ligandom nicht möglich und werden daher nicht weiter verfolgt.

Eine Quellproteinanalyse in der Datenbank *Database for Annotation, Visualization and Integrated Dis-*

covery (DAVID) 2007 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) [179] war aufgrund der kleinen Anzahl an Quellproteinen mit der Gruppe der überpräsentierten Peptide nicht möglich. Die Gruppe der unterpräsentierten Peptide war zwar kaum auf eine größere Anzahl verschiedener Quellproteine zurückzuführen. Doch hier konnten im Gegensatz zu der Gruppe der überpräsentierten Quellproteine bei der Datenbank-Analyse mit mehr als nur 20% der gesamten Proteingruppe signifikante Werte in den *Gene Ontology* Rubriken „Cellular Compartment“, „Biological Process“ und „Molecular Function“ erreicht werden.

Unter den Proteinen der unterpräsentierten Peptide fanden sich hauptsächlich ribosomale und Transkriptions-assoziierte Proteine. Dies führte in der DAVID-Auswertung zur Angabe der in Tabelle 3.17 Kategorien.

**Tabelle 3.17:** Einteilung der Quellproteine der unterpräsentierten Peptide in die *Gene Ontology*-Kategorien „Cellular Compartment“, „Biological Process“ und „Molecular Function“. (Nur Kategorien, die von mehr als 20% der untersuchten Quellproteine erfüllt wurden und einen p-Werte  $< 0,05$  ergaben, wurden beachtet)

<i>Gene Ontology</i> -Kategorie	% der Proteine, die diesem Kriterium entsprachen
<b>Cellular Compartment</b>	
intracellular	73,7
organelle	73,7
intracellular organelle	73,7
non-membrane-bound organelle	42,1
intracellular non-membrane-bound organelle	42,1
protein complex	42,1
ribosome	21,1
ribonucleoprotein complex	21,1
<b>Biological Process</b>	
cell organization and biogenesis	31,6
DNA metabolism	21,1
<b>Molecular Function</b>	
structural molecule activity	26,3
structural constituent of ribosome	21,1

Es fällt auf, dass sowohl in der Einzel-Ligandenanalyse als auch unter den über- und unterpräsentierten Peptiden Peptide aus Apoptose-assoziierten Quellproteinen auftauchen (z.B. ALDKATVLL aus *programmed cell death 4* (PDCD4) oder FLQLLVLIK aus dem *modulator of apoptosis 1* (MOAP1)). ALDKATVLL war nach der Einzel-Ligandenanalyse deutlich Autophagie-assoziiert, wurde jedoch in zwei Paaranalysen auf Autophagiezellen als unterpräsentiert nachgewiesen. Die Beteiligung von PDCD4 an Apoptose ist auch noch nicht eindeutig erwiesen. Vielmehr ist PDCD4 als Tumorsuppressor bekannt [97], unter anderem als Invasionsinhibitor und durch Beeinflussung der Genexpression [323, 654]. MOAP1 dagegen ist an der Induktion Caspase-abhängiger Apoptose durch Interaktion mit Bax beteiligt [564].

Hier wird die Notwendigkeit eines stringenten Autophagie-Nachweises erneut verdeutlicht bzw. die

Notwendigkeit, Apoptose-assoziierte Prozesse in den Autophagie-behandelten Zellen auszuschließen. Da dies in der vorliegenden Arbeit nicht erbracht wurde, kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass viele der beobachteten Phänomene vielmehr auf Apoptose- als auf Autophagie-assoziierten Prozessen beruhen. Vor allem in den HBSS-behandelten Proben, wo bereits vor der Zellernte die Vitalität relativ gering war, mögen die toten Zellen, die mit geerntet wurden, einen Einfluss auf das analysierte Ligandom und darin detektierbare Apoptose-Prozesse gehabt haben, die eventuell in den lebenden Zellen nicht relevant waren.

Vergleicht man die Daten, die bei der Untersuchung des HLA Klasse II-Ligandoms gewonnen wurden, mit den hier generierten, so fallen relativ wenig Übereinstimmungen auf. Lediglich die Beobachtung, dass zelluläre Prozesse, die an der Nukleinsäure- und Proteinsynthese beteiligt sind, herabreguliert wurden, konnte bei der Analyse der relativen Quantifizierung wiederholt festgestellt werden. Im Gegensatz dazu wurden beispielsweise bei der Analyse des HLA Klasse II-Ligandoms vermehrt Quellproteine, die an Vesikeltransport- oder Membranverkehr-assoziierten Prozessen beteiligt sind, nach Autophagie-Induktion nachgewiesen, was sich nur bei der Einzelligandenanalyse bestätigte. Quellproteine, die am Sphingosid- oder Ceramid-Metabolismus oder inhibitorischen Apoptose-Mechanismen beteiligt waren, konnten in den hier durchgeführten Ligandenanalysen gar nicht als Autophagie-induziert identifiziert werden. Diese Unterschiede mögen jedoch vor allem darauf zurückzuführen sein, dass sich nicht nur die Ligandome von HLA Klasse I- und Klasse II-Molekülen sondern auch deren Antigenprozessierungsmechanismen stark unterscheiden.

Es ist nicht auszuschließen, dass in Awells eine relativ hohe basale Autophagie-Aktivität vorherrscht, wodurch die Unterschiede zwischen den Behandlungen, unabhängig von der Zelldichte, weniger stark ausgeprägt erscheinen. Es könnte daher durchaus sein, dass einige der Liganden, die beispielsweise auf allen Autophagie-behandelten Proben und nur vereinzelt auf Kontrollzellen präsentiert waren, in einer anderen Zelllinie deutlichere Autophagie-Assoziationen aufweisen würden.

Ein weiterer Faktor, der bisher noch nicht zur Sprache kam, jedoch auch einen großen Einfluss auf das Autophagie-beeinflusste HLA-Ligandom hat, ist die Behandlungszeit. Bei Dengjel et al. konnte eine deutliche Steigerung der Autophagie-bedingten Veränderungen durch Verlängerung der Inkubationszeit in HBSS Mangelmedium gezeigt werden [129]. Man kann davon ausgehen, dass auch in dem hier untersuchten HLA Klasse I-Ligandom solch eine Steigerung bei verlängerter Inkubationszeit sowohl durch Aminosäure-Depletion als auch durch Rapamycin hätte beobachtet werden können.

Die Tatsache, dass Autophagie im HLA Klasse II-Ligandom Veränderungen verursacht, liegt auf der Hand. Denn das Lysosom als Endstation der Autophagie und als Zwischenstation in der HLA Klasse II-Antigenprozessierung bietet eine offensichtliche Schnittstelle.

Die Frage kann sich aber auch stellen, ob denn Autophagie als zelleigener Prozess einen Einfluss auf das HLA Klasse I-Ligandom haben kann. Denn verstärkte Autophagie kann nicht nur in verändertem lysosomalen Inhalt resultieren sondern auch in veränderter cytoplasmatischer Zusammensetzung, die sich durch eine andere Zusammensetzung proteasomaler Abbauprodukte äußern kann.

Ein weiterer Mechanismus, der dazu führen könnte, dass das MHC Klasse I-Ligandom Autophagie-

assoziierte Änderungen aufweist, wäre die Kreuzpräsentation. Hier besteht jedoch die Frage, ob die in diesen Untersuchungen eingesetzten Zellen überhaupt zu Kreuzpräsentation fähig sind.

Schwierig wird es, wenn die Veränderungen des HLA Klasse I-Ligandoms der Autophagie-Induktion zugeordnet werden sollen. Dabei ist die erste Einschränkung darin zu sehen, dass in dieser Arbeit nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte, dass die angewandten Behandlungen tatsächlich eine verstärkte Autophagie induziert hatten. Es kommt hinzu, dass jegliche Veränderung in der Zellkultur, unabhängig, ob sie zu Autophagie-Induktion führt oder nicht, eine Veränderung des HLA Klasse I-Ligandoms herbeiführen kann. So können die beobachteten Effekte sowohl auf Autophagie als auch auf unterschiedliche Zelldichten, auf Aminosäure- und Serumentzug und auf die diversen Einflüsse von Rapamycin auf mTOR und damit etliche verschiedene Signalkaskaden zurückzuführen sein.

Um diese Einschränkungen auszuschließen, müsste zunächst einmal ein stringenter Nachweis für Autophagie erbracht werden, ohne diesen weitere Diskussionen über den direkten oder indirekten Einfluss der Autophagie-Behandlungen müßig erscheinen.

Zwar konnte in dieser Arbeit nicht eindeutig nachgewiesen werden, dass die untersuchten Zellen tatsächlich unter dem Einfluss erhöhter Autophagie standen, die erzielten Ergebnisse sind dennoch insofern von Interesse, als sie Situationen widerspiegeln, die im Rahmen der Tumorimmunologie eine Rolle spielen. Die Behandlung mit HBSS Mangelmedium induziert eine Situation, die vergleichbar ist mit der Nahrungsknappheit eines Tumors im Anfangsstadium. Rapamycin gehört mit Sorafenib und Sunitinib zu den drei Chemotherapeutika, die seit einiger Zeit verstärkt in klinischen Studien und anerkannten Therapien gegen RCC eingesetzt werden [38, 445]. Was für Konsequenzen diese Behandlung für die Antigenpräsentation hat, ist noch nicht beschrieben worden. Eine Untersuchung der Peptidpräsentation auf einer Tumorzelllinie wie RCC068ZL ist daher in diesem Kontext weiterhin erstrebenswert.

## 4 Zusammenfassung

Die Erkennung maligner Zellen durch T-Zellen beruht auf HLA-präsentierten Peptiden. Im Kontext der Auswahl von Impfpeptiden zur Immuntherapie des Nierenzellkarzinoms (RCC) war die Zielsetzung dieser Arbeit vor allem die Charakterisierung des HLA-Ligandoms von RCC mittels massenspektrometrischer Peptidsequenzierung und die Analyse zugrundeliegender Quellproteine aufgrund von Mikroarray-basierten Gen- und Proteinexpressionsanalysen. Es ergaben sich zwei Einteilungen der 1675 identifizierten HLA-Liganden und ihrer 1053 Quellproteine. Zum einen die der Gewebespezifität - es konnten Peptide identifiziert werden, die nur auf RCC- oder nur auf Primärgewebe präsentiert wurden, und solche, die universell auf diversen Geweben und Zelltypen vorkommen. Unter diesen drei Gruppen wurde im Hinblick auf die Immuntherapie eine weitere Einteilung in abundante Selbstproteine, potentielle und etablierte Tumorantigene getroffen. Desweiteren wurden in einer Reihe von RCC-Geweben von ausgewählten Tumorantigenen Expressionsanalysen mit der Technologie Mikroarray-basierter Proteinexpressionsanalysen durchgeführt. Diese moderne Technologie befindet sich zwar noch im Stadium der Etablierung, liefert aber schon jetzt vielversprechende Ergebnisse vor allem bei der Suche nach Biomarkern. Die hier erzielten Daten der Proteinexpression zeigten, dass weder eine Korrelation mit allgemeinen Daten zur RNA-Expression der entsprechenden Tumorantigene vorliegt noch ergaben sie aufgrund ihrer Expressionsprofile einen Hinweis auf eine allgemein RCC-spezifische Hochregulation der Proteinexpression. Die Analysen verdeutlichten insgesamt die starken Unterschiede der Informationen, die aus Analysen des HLA-Ligandoms, Gen- und Proteinexpressionen gewonnen werden. Unter den identifizierten Tumorantigenen fanden sich einige hoffnungsvolle Kandidaten für die Immuntherapie in der Gruppe der im Rahmen dieser Dissertation analysierten Gewebe, so zum Beispiel verschiedene Liganden aus dem bereits bekannten Tumorantigen Adipophilin, aus *insulin-like growth factor binding protein 3* sogar HLA Klasse I- und Klasse II-Liganden oder ein Ligand aus dem potentiellen Tumorantigen Plexin B2. Mit Hilfe der Liganden-basierten Quellproteinanalyse wurde eine spezifische, Patienten-individuelle Tumoranalytik durchgeführt, so dass eine Vakzinierung optimal auf die Patienten-eigene Tumorbiologie zugeschnitten werden konnte. Andererseits verhalf die Analyse des gesamten RCC-Ligandoms zur Auswahl bekannter Tumorantigene in solchen Fällen, in denen bei der Liganden-basierten Quellproteinanalyse keine geeigneten patienten-individuellen Impfkandidaten identifiziert werden konnten.

Der zweite Abschnitt dieser Dissertation untersuchte verschiedene durch Autophagie-Induktion beeinflusste Phänomene. Neben der Untersuchung verschiedener Nachweisverfahren wurden Mikroarray-basierte Proteinexpressionsanalysen sowohl Autophagie-assoziiierter Antigene als auch von Proliferationsmarkern und Tumorantigenen durchgeführt. Das Hauptinteresse lag auf der HLA-Ligandenanalyse der 186 HLA-Liganden aus Kontrollzellen im Vergleich zu 403 HLA-Liganden Autophagie-behandelter Zellen. Im Kontext der Onkogenese und Krebstherapie sind die beobachteten Effekte insofern von Interesse, als die Behandlung von Zellen mit Mangelmedium zumindest teilweise eine Situation widerspiegelt, die der von Tumorzellen im Gewebeverband entspricht, bevor verstärkte Angiogenese ein genau Gegenteiliges Verhältnis aufbaut. Die Effekte einer Rapamycin-Behandlung entsprechen denen, die durch immer häufiger angewandte Tumorthherapie mit Temsirolimus (Rapamycin) ausgelöst und noch lange nicht abschließend untersucht worden sind. Ob die beobachteten Phänomene jedoch auf einer Autophagie-Induktion oder -Assoziation beruhen, konnte in den hier zugrundeliegenden Experimenten nicht eindeutig geklärt werden.

## 5 Listenanhang

**Tabelle 5.1:** Komplette Auflistung aller Quellproteine, die ausschließlich auf RCC-Gewebe identifiziert wurden. Aufgeführt sind die Namen und Abkürzungen aus der *Entrez Gene* Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>) [348].

Peptidsequenz	HLA- Restriktion	Entrez GeneID	Quellprotein	RCC-Gewebe, auf denen derselbe Ligand identifiziert wurde
AGKYVPAIAHLJH	DR	54504	(carboxypeptidase, vitellogenic-like)	RCC307T
AGKYVPAIAHLJHS	DR	54504	(carboxypeptidase, vitellogenic-like)	RCC307T
AHDQNSNLL	B*38	7052	(transglutaminase 2 (C polypeptide, protein-glutamine-gamma-glutamyltransferase))	RCC307T
ALFDIESKV	A*02	2346	(folate hydrolase (prostate-specific membrane antigen) 1)	RCC099N, RCC099T
ALMPVLNQV	A*02	118460	(exosome component 6)	RCC099N, RCC099T
APAPIHNQF	B*35	9709	(homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1)	RCC211T
APKRPPSAF	B*07	3146	(high-mobility group box 1)	RCC130T
AQNRFLLEL	B*13	6050	(ribonuclease/angiogenin inhibitor 1)	RCC211T
ARFSGNLLV	B*27	29927	(Sec61 alpha 1 subunit ( <i>S. cerevisiae</i> ))	RCC044T
ARVKMQVTM	B*27	57572	(dedicator of cytokinesis 6)	RCC099N, RCC099T
ARYGHALVL	B*27	10786	(solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 3)	RCC112T, RCC193T,
ATDYHVRVY	A*01	64778	(fibronectin type III domain containing 3B)	RCC399T
AVIVLVENFYK	A*03, A*11	140576	(S100 calcium binding protein A16)	RCC098T, RCC103T,
AVQRTLLEK	A*11	4267	(CD99 molecule)	RCC211T
AYPHNLMTF	A*24	23471	(translocation associated membrane protein 1)	RCC103T, RCC186T
DEAAFLERL	B*18	800	(caldesmon 1)	RCC231T
DEFHNPLAY	B*1801	9785	(DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 38)	RCC001T, RCC098T,
DEGKVIRF	n.a., B*18	51663	(zinc finger RNA binding protein)	RCC110N, RCC115T,
DEKSIITY	B*1801	5339	(plectin 1, intermediate filament binding protein 500kDa)	RCC189T
DELELHQRF	B*18	10771	(zinc finger, MYND domain containing 11)	RCC189T
DELQQPLEL	B*1801	6773	(signal transducer and activator of transcription 2, 113kDa)	RCC098T
DERKMAEQY	B*1801	4629	(myosin, heavy polypeptide 11, smooth muscle)	RCC189T
DETEAVKRY	B*1801	51593	(ARS2 protein)	RCC189T
DEVDIKRAAY	B*1801	79068	(fatso)	RCC098T
DEVELIHF	B*18	11198	(suppressor of Ty 16 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> ))	RCC001T, RCC189T
DEVFHDIAI	B*1801	8671	(solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 4)	RCC189T

Tabelle 5.1 – Fortsetzung RCC-spezifische Quellproteine

Peptidsequenz	HLA- Restriktion	Entrez GeneID	Quellprotein	RCC-Gewebe, auf denen derselbe Ligand identifiziert wurde
DEVKFLTV	B*18	307	(annexin A4)	RCC001T, RCC100N, RCC100T, RCC110T
DEVKFLTVL	B*1801	307	(annexin A4)	RCC098T, RCC189T
DEVQVVRGHI	B*1801	6154	(ribosomal protein L26)	RCC098T, RCC115T, RCC189T
DEWLKPELF	B*1801	51071	(2-deoxyribose-5-phosphate aldolase homolog ( <i>C. elegans</i> ))	RCC098T, RCC115T, RCC189T
DNELQEMSNQGSK	DR	1191	(clusterin)	RCC155T
DTVHHMLLF	A*26	5066	(peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase)	RCC121T, RCC307T
DVKDYIQEY	A*25, A*26	57674	(chromosome 17 open reading frame 27)	RCC103T, RCC307T
EEAKKFLAP	B*45	7520	(X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5 (double-strand-break rejoining; Ku autoantigen, 80kDa))	RCC121T
EEIKEILRF	B44- Supertype	6519	(solute carrier family 3 (cystine, dibasic and neutral amino acid transporters, activator of cystine, dibasic and neutral amino acid transport), member 1)	RCC119T
EEVLIPDQKY	B*18	26224	(F-box and leucine-rich repeat protein 3)	RCC001T, RCC098T, RCC189T
ELEDSTLRY	A*01	5339	(plectin 1, intermediate filament binding protein 500kDa)	RCC116T
ELVKIYK	A*03	51110	(lactamase, beta 2)	RCC211T
ESIDRTVMYY	A*26	6519	(solute carrier family 3 (cystine, dibasic and neutral amino acid transporters, activator of cystine, dibasic and neutral amino acid transport), member 1)	RCC307T
ETTSTTLRW	A*25	1573	(cytochrome P450, family 2, subfamily J, polypeptide 2)	RCC103T
EVKKEVAFF	A*26	51593	(ARS2 protein)	RCC121T
EYTLMRATF	A*24	8660	(insulin receptor substrate 2)	RCC231T
FGEHLLSDFL	n.a.	1410	(crystallin, alpha B)	RCC115T, RCC399T
FIWENIHIL	A*02	667	(dystonin)	RCC116T
FLDGNEMTL	A*02	25932	(chloride intracellular channel 4)	RCC001T, RCC099N, RCC099T
FLDPIKAYL	A*02	221395	(G protein-coupled receptor 116)	RCC115T
FLDPIKAYL	A*02	221395	(G protein-coupled receptor 116)	RCC116T
FLEKLLPPV	A*02	11313	(lysophospholipase II)	RCC099N, RCC099T
FPAGPPSHSL	B*35	60681	(FK506 binding protein 10, 65 kDa)	RCC193T
FPRDPEIEM	B*35	7412	(vascular cell adhesion molecule 1)	RCC211T
FSNKITIQSKE	DR	205	(adenylate kinase 3-like 1)	RCC231T
FSNKITIQSKEAY	DR	205	(adenylate kinase 3-like 1)	RCC226T
GHDSQIRQW	n.a.	23345	(spectrin )	RCC103T



Tabelle 5.1 – Fortsetzung RCC-spezifische Quellproteine

Peptidsequenz	HLA-Restriktion	Entrez GeneID	Quellprotein	RCC-Gewebe, auf denen derselbe Ligand identifiziert wurde
GIMKKAYEL	A *02	6722	(serum response factor (c-fos serum response element-binding transcription factor))	RCC099N, RCC099T, RCC110N
GLASFKSFLK	A *03	8490	(regulator of G-protein signalling 5)	RCC075T, RCC098T
GLFEVAGWIGK	A *03	3295	(hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4)	RCC098T, RCC211T
GLMGFIVYK	A *03	9556	(chromosome 14 open reading frame 2)	RCC075T
GLMKKAYEL (variant)	A *02	4205	(MADS box transcription enhancer factor 2, polypeptide A (myocyte enhancer factor 2A))	RCC099N, RCC099T, RCC110N
GLNDETYGY	n.a.	481	(ATPase, Na+/K+ transporting, beta 1 polypeptide)	RCC068T
GQHHIFSFF	B*15	287	(ankyrin 2, neuronal)	RCC103T
GQPGSVLRV	B*13	6050	(ribonuclease/angiogenin inhibitor 1)	RCC307T
GRAMVARLGL	B*27	934	(CD24 molecule)	RCC112T
GRFDVKIEV	B*27	481	(ATPase, Na+/K+ transporting, beta 1 polypeptide)	RCC044T, RCC112T
GRIGQAIAR	B*27	9380	(glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase)	RCC099N, RCC099T
GRKGVAINF	B*27	1974	(eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 2)	RCC099N, RCC099T, RCC110N, RCC110T
GRDLQYAKL	B*27	5339	(plectin 1, intermediate filament binding protein 500kDa)	RCC112T
GRMENLASYR	B*27	5507	(protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3C)	RCC099T, RCC112T
GRTGGSWFK	B*27	481	(ATPase, Na+/K+ transporting, beta 1 polypeptide)	RCC044T, RCC099T
GRVGVITNR	B*27	6192	(ribosomal protein S4, Y-linked 1)	RCC099N, RCC099T
GRWRGWYTY	B*27	27013	(chromosome 2 open reading frame 24)	RCC099N, RCC099T, RCC110T
GSHFISHLS	n.a.	149421	(hypothetical protein FLJ32206)	RCC099N, RCC099T
GTLDYILQR	A *11	79068	(fatsa)	RCC103T
GTYVSSVPR	A *11	3111	(major histocompatibility complex, class II, DO alpha)	RCC103T, RCC112T, RCC135T, RCC186T, RCC211T
GVLAWVKEK	A *03	9235	(interleukin 32)	RCC098T, RCC115T
HASDRIAL	n.a., B*08	7086	(transketolase (Wernicke-Korsakoff syndrome))	RCC075T, RCC193T
HEMILKL	B*1801	57674	(chromosome 17 open reading frame 27)	RCC098T
HPKEYGALSMPVAK	DR	2028	(glutamyl aminopeptidase (aminopeptidase A))	RCC231T
IDDAFALARAQLLDYK	DR	2028	(glutamyl aminopeptidase (aminopeptidase A))	RCC231T
IDFLSHHL	B*4701	8660	(insulin receptor substrate 2)	RCC135T
IIMPHNIYL	A *02	6556	(solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 1)	RCC115T
IIFYFARKANMK	A *03	7412	(vascular cell adhesion molecule 1)	RCC211T
ILDVTGIQL	A *02	9027	(N-acetyltransferase 8 (camello like))	RCC001T, RCC099N, RCC099T

Tabelle 5.1 – Fortsetzung RCC-spezifische Quellproteine

Peptidsequenz	HLA- Restriktion	Entrez GeneID	Quellprotein	RCC-Gewebe, auf denen derselbe Ligand identifiziert wurde
IQDYLLQQTGARTVPR	DR	2745	(glutaredoxin (thioltransferase))	RCC226T, RCC231T
IRSKIITYI	B*27	3735	(lysyl-tRNA synthetase)	RCC116T
IRSQAIHQQL	n.a.	3735	(lysyl-tRNA synthetase)	RCC399T
ITILGTVKPNANRIAL	DR	3958	(lectin, galactoside-binding, soluble, 3 (galectin 3))	RCC211T
IVALILSTK	A*03	527	(ATPase, H+ transporting, lysosomal 16kDa, V0 subunit c)	RCC0075T, RCC115T
IYVKIRAADKRSKALKASA- PAPGHH	DR	9556	(chromosome 14 open reading frame 2)	RCC307T
IYQRDPLKL	A*24	6778	(signal transducer and activator of transcription 6, interleukin-4 induced)	RCC231T
KEFPGFLEN	B*50	6281	(S100 calcium binding protein A10 (annexin II ligand, calpactin I, light polypeptide (p11)))	RCC399M, RCC399T
KFIDPIYQVW	A*24	54700	(RRN3 RNA polymerase I transcription factor homolog ( <i>S. cerevisiae</i> ))	RCC130T
KGWDGYDVQW	B*57	51669	(transmembrane protein 66)	RCC009N, RCC009T
KIAFSATRTINVPL	DR	713	(complement component 1, q subcomponent, B chain)	RCC211T
KLDPTKTTL	A*02	10397	(N-myc downstream regulated gene 1)	RCC009N, RCC009T, RCC110N, RCC110T, RCC115T, RCC135T
KLDQVIHV	A*02	80896	(N-acetylneuraminate pyruvate lyase (dihydrodipicolinate synthase))	RCC009N, RCC009T
KLGSVPVTV	A*02	9747	(KIAA0738 gene product)	RCC009N, RCC009T
KLLDEVTYL	A*02	1573	(cytochrome P450, family 2, subfamily J, polypeptide 2)	RCC009T
KLLDPEDVAVQL	A*02	7402	(utrophin (homologous to dystrophin))	RCC009N, RCC009T
KLLEGESRL (variant)	B*13	3855	(keratin 7)	RCC211T, RCC307T
KLPGGSYMAK	A*03	3127	(major histocompatibility complex, class II, DR beta 5)	RCC100N, RCC100T
KLSEIDVAL	A*02	80303	(EF-hand domain family, member D1)	RCC009N, RCC009T, RCC100T, RCC110N, RCC115T
KLSELEAAL	A*02	3856	(keratin 8)	RCC009T, RCC075T, RCC098T
KMPEINAKV	B*13	9709	(homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1)	RCC211T
KNPKFMETVAEKALQ	DR	1191	(clusterin)	RCC211T
KPNANRIAL	B*0702	3958	(lectin, galactoside-binding, soluble, 3 (galectin 3))	RCC075T
KQMEQVAQF	B*1501	6876	(transgelin)	RCC068T
KQYAGKYVLF	n.a.	2878	(glutathione peroxidase 3 (plasma))	RCC211T
KRGDVIVIL	n.a.	8935	(src family associated phosphoprotein 2)	RCC100N, RCC100T, RCC110N, RCC110T, RCC112T

Tabelle 5.1 – Fortsetzung RCC-spezifische Quellproteine

Peptidsequenz	HLA-Restriktion	Entrez GeneID	Quellprotein	RCC-Gewebe, auf denen derselbe Ligand identifiziert wurde
KRLGTLVVTY	B*27	115361	(guanylate binding protein 4)	RCC099N, RCC112T, RCC116T
KRTLIAEGY	B*27	64764	(cAMP responsive element binding protein 3-like 2)	RCC099N, RCC110N, RCC110T
KTKEIEQVY	B*57	51535	(periphilin 1)	RCC099N, RCC099T
KTRLINQVL	A*02	60592	(short coiled-coil protein)	RCC099T
KTSPYFPTTARKL	DR	8671	(solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 4)	RCC211T
KVIEINPYL	A*02	5693	(proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 5)	RCC099T, RCC110T
KVKTLEVEI	A*02	83483	(plasmalemma vesicle associated protein)	RCC099N, RCC099T
KYADKIYSI	A*24	2346	(folate hydrolase (prostate-specific membrane antigen) 1)	RCC119T
KYPSFPFVF	A*24	1660	(DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 9)	RCC130T, RCC231T
KYQKGFSLW	A*24	23471	(translocation associated membrane protein 1)	RCC119T, RCC130T, RCC307T
KYTKIFNDF	A*24	10771	(zinc finger, MYND domain containing 11)	RCC119T, RCC231T
KYVPAIAHLIHS	DR	54504	(carboxypeptidase, vitellogenin-like)	RCC231T, RCC307T
LAALPHSCL	A*02	8490	(regulator of G-protein signalling 5)	RCC115T
LEDVIERI	n.a.	60681	(FK506 binding protein 10, 65 kDa)	RCC098T
LLAERDLYL	A*02	7052	(transglutaminase 2 (C polypeptide, protein-glutamine-gamma-glutamyltransferase))	RCC068T
LLYPTETIV	A*02	3675	(integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor))	RCC068T
LMHPDALEEPDDQNRI	DR	2213	(Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32))	RCC211T, RCC231T
LPSEIEVKY	B*35	51434	(anaphase promoting complex subunit 7)	RCC193T
LPVDIRQYL	B*35	6773	(signal transducer and activator of transcription 2, 113kDa)	RCC112T, RCC193T, RCC399T
LTDRGVMSY	A*01	3661	(interferon regulatory factor 3)	RCC099T
LVHAVQALW	B*57	9235	(interleukin 32)	RCC098T, RCC189T
MEHAMETMMF	B*1801	6281	(S100 calcium binding protein A10 (annexin II ligand, calpactin I, light polypeptide (p11)))	RCC098T, RCC189T
MENLFNRF	B*1801	240	(arachidonate 5-lipoxygenase)	RCC211T, RCC226T
MHPDALEEPDDQNRI	DR	2213	(Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32))	RCC193T, RCC211T
MPSASMTRL	B*35	10397	(N-nyc downstream regulated gene 1)	RCC193T
MPVDVAMRL	B*35	5507	(protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3C)	RCC099T, RCC112T
MRHLGAFLF	B*27	6948	(transcobalamin II; macrocytic anemia)	RCC121T, RCC307T
MVKDVIQSY	A*26	4692	(neccin homolog (mouse))	RCC155T
NELQEMSNOGSK	DR	1191	(clusterin)	RCC189T
NEVEAVKV	B*1801	5034	(procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), beta polypeptide)	RCC226T
NLPLPGVVPR	DR	3958	(lectin, galactoside-binding, soluble, 3 (galectin 3))	RCC211T
PYFPTTARKL	DR	8671	(solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 4)	RCC211T

Tabelle 5.1 – Fortsetzung RCC-spezifische Quellproteine

Peptidsequenz	HLA-Restriktion	Entrez GeneID	Quellprotein	RCC-Gewebe, auf denen derselbe Ligand identifiziert wurde
QAKKVITMF	B*57	7520	(X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5 (double-strand-break rejoining; Ku autoantigen, 80kDa))	RCC099T
QDVARVLGF	B*37	9240	(paraneoplastic antigen MA1)	RCC116T, RCC231T
QIDSPLNGK	A*03	7412	(vascular cell adhesion molecule 1)	RCC211T
QIDSPLSGK	A*03	7412	(vascular cell adhesion molecule 1)	RCC135T
QISIPFLK	A*03	64855	(chromosome 9 open reading frame 88)	RCC075T
QQKLSRLQY	B*1501	3675	(integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor))	RCC068T
QVDPLSALKY	A*01	4289	(muskelin 1, intracellular mediator containing kelch motifs)	RCC098T, RCC112T, RCC193T
RADGNFLY	A*01	23313	(chromosome 22 open reading frame 9)	RCC193T, RCC399T
RAFSSLGLLK	A*03	7369	(uromodulin (uromucoïd, Tamm-Horsfall glycoprotein))	RCC100N, RCC182T
RAMVARLGL	n.a.	934	(CD24 molecule)	RCC100T
RDFTELEKL	B*4701	115361	(guanylate binding protein 4)	RCC135T
RFDHVITNM	A*24	713	(complement component 1, q subcomponent, B chain)	RCC119T, RCC193T, RCC231T
RIRPTAVTL	A*02	25777	(unc-84 homolog B (C. elegans))	RCC100N, RCC100T
RLFPPLRQR	A*03	337867	(phosphoglycerate dehydrogenase like 1)	RCC100N, RCC100T, RCC211T
RLINQVLEL	B*13	60592	(short coiled-coil protein)	RCC211T
RLAQASCLL	B*13	2878	(glutathione peroxidase 3 (plasma))	RCC211T, RCC307T
RLQLKHL	A*02	8701	(dynein, axonemal, heavy polypeptide 11)	RCC119T
RLQMEQMQL	A*02	64793	(coiled-coil domain containing 21)	RCC100N, RCC100T, RCC119T
RLRLGGAAL	A*02	754	(pituitary tumor-transforming 1 interacting protein)	RCC100N, RCC100T
RPAALRLLL	B*07	10266	(receptor (calcitonin) activity modifying protein 2)	RCC100N, RCC100T
RQIQESVTF	B*15	287	(ankyrin 2, neuronal)	RCC115T
RRAIYQATY	B*27	5693	(proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 5)	RCC099T
RRFFPYVY	B*27	5689	(proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 1)	RCC099N, RCC099T, RCC110N
RRLDPIQL	B*27	51669	(transmembrane protein 66)	RCC099N, RCC099T, RCC110N, RCC110T, RCC116T
RRSSIQSTF	B*27	23385	(nicastatin)	RCC099N, RCC099T, RCC110T

Tabelle 5.1 – Fortsetzung RCC-spezifische Quellproteine

Peptidsequenz	HLA-Restriktion	Entrez GeneID	Quellprotein	RCC-Gewebe, auf denen derselbe Ligand identifiziert wurde
RRVLVQVSY	B*27	4143	(methionine adenosyltransferase I, alpha)	RCC099T, RCC110N, RCC110T
RTKSTGGAPTF	B*57	5216	(profilin 1)	RCC099N, RCC099T
RVLNKLGGVK	A*03	475	(ATX1 antioxidant protein 1 homolog (yeast))	RCC100N, RCC100T
RYIPTAAAF	A*24	29927	(Sec61 alpha 1 subunit ( <i>S. cerevisiae</i> ))	RCC119T, RCC130T, RCC231T, RCC307T
RYLQTLTTI	A*24	2040	(stomatin)	RCC119T, RCC231T
RYSSMAASF	A*24	10158	(PDZK1 interacting protein 1)	RCC130T, RCC231T, RCC307T
SDHHIAL	B*37	55611	(OTU domain, ubiquitin aldehyde binding 1)	RCC116T, RCC231T
SELISTRF	B*1801	51646	(yippee-like 5 ( <i>Drosophila</i> ))	RCC189T
SEREAIEVF	B*1801	2633	(guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kDa)	RCC098T, RCC189T
SEVQDRVML	B*4001	51646	(yippee-like 5 ( <i>Drosophila</i> ))	RCC075T
SIDRTVMYY	A*01	6519	(solute carrier family 3 (cystine, dibasic and neutral amino acid transporters, activator of cystine, dibasic and neutral amino acid transport), member 1)	RCC098T, RCC112T, RCC193T, RCC399T
SLGGDVS	A*02	1831	(TSC22 domain family, member 3)	RCC001T, RCC068T
SPRKGLLML	B*07	94	(activin A receptor type II-like 1)	RCC100N, RCC100T
SPVYVGRV	n.a.	7052	(transglutaminase 2 (C polypeptide, protein-glutamine-gamma-glutamyltransferase))	RCC068T
SQKDIEQSI	B*13	307	(annexin A4)	RCC307T
SRFGGAVR	B*27	7422	(vascular endothelial growth factor)	RCC099N, RCC099T
SRVKLLEY	B*27	10980	(COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 6 ( <i>Arabidopsis</i> ))	RCC099N, RCC099T
SRWEKVVQR	B*27	667	(dystonin)	RCC099N, RCC099T, RCC110N
SSLPTQLFK	A*11	3479	(insulin-like growth factor 1 (somatomedin C))	RCC044T, RCC186T
STDKAEYTFY	A*01	3516	(recombining binding protein suppressor of hairless ( <i>Drosophila</i> ))	RCC098T, RCC116T
STDKFKTDFY	A*01	10980	(COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 6 ( <i>Arabidopsis</i> ))	RCC112T, RCC116T
STDPVSLGKY	A*01	3280	(hairy and enhancer of split 1, ( <i>Drosophila</i> ))	RCC112T, RCC116T, RCC193T
SVAGKHTV	A*02	11037	(stonin 1)	RCC099N, RCC099T
SVAKTILKR	A*03	55233	(MOB1, Mps One Binder kinase activator-like 1B (yeast))	RCC100N, RCC100T, RCC182T
SVYDVLQK	A*03	23345	(spectrin)	RCC075T
SYILRPVAF	A*24	9154	(solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter), member 1)	RCC231T, RCC307T
SYTHIQYLF	A*24	10044	(SH2 domain containing 3C)	RCC231T
TDNQRILEF	B*37	5034	(procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), beta polypeptide)	RCC231T
TDYHVRVY	A*01	64778	(fibronectin type III domain containing 3B)	RCC193T

Tabelle 5.1 – Fortsetzung RCC-spezifische Quellproteine

Peptidsequenz	HLA- Restriktion	Entrez GeneID	Quellprotein	RCC-Gewebe, auf denen derselbe Ligand identifiziert wurde
TEHGVEVVL	B*4001	10044	(SH2 domain containing 3C)	RCC075T
TGYGRPRQI	n.a.	6876	(transgelin)	RCC099N, RCC099T, RCC399T
TIIDIITHR	A*68	309	(annexin A6)	RCC001T, RCC038T
TLADLLALR	A*03	8701	(dynein, axonemal, heavy polypeptide 11)	RCC115T
TLIDLPGITKV	A*02	1785	(dynamitin 2)	RCC099N, RCC099T
TPESTRYLAQIGDSVSLT	DR	7412	(vascular cell adhesion molecule 1)	RCC231T
TSPSQSLFY	n.a.	6556	(solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 1)	RCC098T
TSPFYFPTTARKL	DR	8671	(solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 4)	RCC211T
TSVVYDVAW	B*57	79819	(WD repeat domain 78)	RCC099N, RCC099T
TMELVKIYYK	A*03	51110	(lactamase, beta 2)	RCC073T, RCC098T, RCC103T, RCC211T
TVTEVLLKY	A*26	54700	(RRN3 RNA polymerase I transcription factor homolog ( <i>S. cerevisiae</i> ))	RCC121T
TVVERMLSNW	n.a.	23654	(plexin B2)	RCC103T
TYTDRVFFL	A*24	23654	(plexin B2)	RCC110T, RCC130T, RCC231T, RCC307T
VAKKLGEMW	B*57	3146	(high-mobility group box 1)	RCC099N, RCC099T
VELPHINLL	B*37	54707	(ATP binding domain 1 family, member B)	RCC116T, RCC231T
VEPDHFKVA	B*4501	3958	(lectin, galactoside-binding, soluble, 3 (galectin 3))	RCC068T
VGLPAAGKTTW	B*57	11100	(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 1)	RCC099N, RCC099T
VLFGLLREV	A*02	9785	(DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 38)	RCC099N, RCC099T, RCC116T
VLPKSRVEL	n.a.	3111	(major histocompatibility complex, class II, DO alpha)	RCC112T
VLSSRLAFA	A*02	3125	(major histocompatibility complex, class II, DR beta 3)	RCC099N, RCC099T, RCC110T, RCC135T, RCC399T
VPLDERIVF	B*35	64855	(chromosome 9 open reading frame 88)	RCC231T
VQRTLIMAL	B*1501	6876	(transgelin)	RCC068T
VTELHVISY	A*01	57674	(chromosome 17 open reading frame 27)	RCC193T
VTTGGMVLK	A*11	713	(complement component 1, q subcomponent, B chain)	RCC186T
VTVNQSLSPVL	n.a.	3856	(keratin 8)	RCC231T
VYPARTQTL	A*24	3127	(major histocompatibility complex, class II, DR beta 5)	RCC231T
YAGKYVPAIAHLJHS	DR	54504	(carboxypeptidase, vitellogenic-like)	RCC307T
YLADFLITK	A*03	10786	(solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 3)	RCC115T
YLRPFSF	fragment	1410	(crystallin, alpha B)	RCC399T
YQRDPLKL	fragment	6778	(signal transducer and activator of transcription 6, interleukin-4 induced)	RCC231T

Tabelle 5.1 – Fortsetzung RCC-spezifische Quellproteine

Peptidsequenz	HLA-Restriktion	Entrez GeneID	Quellprotein	RCC-Gewebe, auf denen derselbe Ligand identifiziert wurde
YRFMGTEAY	B*27	6519	(solute carrier family 3 (cystine, dibasic and neutral amino acid transporters, activator of cystine, dibasic and neutral amino acid transport), member 1)	RCC112T
YSEEECRQY	A*01	2771	(guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 2)	RCC098T, RCC116T
YSEKIVDMY	A*01	4629	(myosin, heavy polypeptide 11, smooth muscle)	RCC098T, RCC112T
YYEEQHPEL	A*24	9235	(interleukin 32)	RCC231T
YYTDIMHTL		23654	(plexin B2)	RCC231T

**Tabelle 5.2:** Komplette Auflistung aller Quellproteine, die ausschließlich auf Primärgeweben identifiziert wurden. Aufgeführt sind die Namen und Abkürzungen aus der *Entrez Gene* Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>) [348]. CCA = Colon Carcinom, LCA = Lungen Carcinom, MET = Metastase eines RCCs, NCh = Glioblastom, PaCa = Pancreas Carcinom, RCC108 und RCC263 = Urothel Carcinome, RCC132 = Oncocytom, N = autologes Normalgewebe, T = Tumor.

Peptidsequenz	HLA-Restriktion	Entrez GeneID	Quellprotein	Gewebe, auf denen derselbe Ligand identifiziert wurde
AAPFGASLY	A*26, n.a.	9802	(DAZ associated protein 2)	NCh361, RCC068T
ADQLRFSYL	B*37	5770	(protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1)	CCA136T, RCC231T
ADVLKVEVF	B*37	3692	(integrin beta 4 binding protein)	CCA136T, RCC116T, RCC231T
AEWVKSQP	B*50	93663	(Rho GTPase activating protein 18)	RCC263T
AGPHFNLSRKHGGPK	DR	6647	(superoxide dismutase 1, soluble (amyotrophic lateral sclerosis 1 (adult)))	CCA164T, RCC108T, RCC190T
AGYALAQMGRLKGPLL	DR	718	(complement component 3)	RCC108T
AIDLHLEY	A*01	81	(actinin, alpha 4)	MET002, RCC116T
ALPSRILLWK	A*03	54587	(matrix-remodelling associated 8)	CCA172T, LCA002T, RCC115T
APGYLAITKKVAVPY	DR	1363	(carboxypeptidase E)	RCC108T, RCC190T
APPSGGPGFLSIERPDSRPP	DR	720	(complement component 4A (Rodgers blood group))	CCA164T, RCC108T, RCC190T
APPSGGPGFLSIERPDSRPPR	DR	720	(complement component 4A (Rodgers blood group))	RCC108T, RCC190T
APRIITGPAPVL	B*0702	9444	(quaking homolog, KH domain RNA binding (mouse))	RCC075T
APSAILPLPGQSVVER	DR	3700	(inter-alpha (globulin) inhibitor H4 (plasma Kallikrein-sensitive glycoprotein))	CCA156T, RCC108T, RCC149T, RCC231T

Tabelle 5.2 – Fortsetzung Primärgewebe-spezifische Quellproteine

Peptidsequenz	HLA- Restriktion	Entrez GeneID	Quellprotein	Gewebe, auf denen derselbe Ligand identifiziert wurde
APTLLYVGKKQJVEIEK	DR	3240	(haptoglobin)	RCC132T
ASDFITKMDY	A*01	2934	(gelsoolin (amyloidosis, Finnish type))	RCC098T
ASFDKAKLK	A*11	9168	(thymosin, beta 10)	CCA129T, RCC103T
ASVDLKNKTGREEF	DR	8857	(Fc fragment of IgG binding protein)	CCA156T, CCA164T, CCA165T, RCC108T, RCC231T
ASVDLKNKTGREEFFL	DR	8857	(Fc fragment of IgG binding protein)	CCA156T, CCA164T, CCA165T, RCC108T
ASVDLKNKTGREEFFLTA	DR	8857	(Fc fragment of IgG binding protein)	CCA164T, CCA165T, RCC157T, RCC190T, RCC211T
ASVDLKNKTGREEFFLTAF	DR	8857	(Fc fragment of IgG binding protein)	CCA156T, CCA164T, CCA165T, RCC108T
ATDPNILGR	A*03	5591	(protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide)	RCC115T
AVYSHVIQKL	B*13	10993	(serine dehydratase)	RCC211T
DAENAMRYI	B*5101, n.a.	22916	(nuclear cap binding protein subunit 2, 20kDa)	PaCa001T, RCC135T
DDIIVNWVNETLRE	DR	3936	(lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin))	RCC108T
DEFKIGELF	B*18	5591	(protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide)	CCA060T, RCC100T, RCC115T, RCC189T
DIIVNWVNETLRE	DR	3936	(lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin))	RCC231T
DLQNFLKKNKNEK	DR	6280	(S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B))	RCC132T
DLQNFLKKNKNEKV	DR	6280	(S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B))	RCC132T
DLQNFLKKNKNEKVI	DR	6280	(S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B))	RCC132T
DLQNFLKKNKNEKVIE	DR	6280	(S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B))	RCC132T
DLVKELDRTD	DR	5265	(serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin, antitrypsin), member 1)	RCC211T
DTSYVSLKAPLTK	DR	1401	(C-reactive protein, pentraxin-related)	CCA156T, RCC108T
EELQKQVSY	B*1801	6774	(signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor))	RCC098T, RCC110N, RCC189T
EERIVELF	B*18	6774	(signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor))	RCC001T, RCC098T, RCC100N, RCC100T, RCC110N, RCC115T, RCC189T
EEVKLIKIM	B44- Supertype	2512	(ferritin, light polypeptide)	RCC001T
EGLFSLVARKLSRP	DR	4837	(nicotinamide N-methyltransferase)	RCC108T
EGLTFQMKKNAEELK	DR	337	(apolipoprotein A-IV)	RCC132T



Tabelle 5.2 – Fortsetzung Primärgewebe-spezifische Quellproteine

Peptidsequenz	HLA-Restriktion	Entrez GeneID	Quellprotein	Gewebe, auf denen derselbe Ligand identifiziert wurde
EGLTFQMKKNAEELKA	DR	337	(apolipoprotein A-IV)	RCC132T
EPGTWKISARFSDG	DR	720	(complement component 4A (Rodgers blood group))	RCC132T
EPYYKMQTRAGSR	DR	715	(complement component 1, r subcomponent)	RCC108T
EPYYKMQTRAGSRE	DR	715	(complement component 1, r subcomponent)	CCA164T, RCC108T, RCC190T
EQLGEYKFNALLVRYT	DR	213	(albumin)	RCC231T
EQLGEYKFNALLVRYTK	DR	213	(albumin)	RCC231T
EVIDLMIKEY	A*26, A*25	55274	(PHD finger protein 10)	NCh361, RCC103T
FGPIYNYKDTIVFK	DR	722	(complement component 4 binding protein, alpha)	RCC108T, RCC190T, RCC231T
FHQYSVKLGHPDT	DR	6280	(S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B))	RCC132T
FKGSEMVVAGKLDQDRGPDV	DR	3700	(inter-alpha (globulin) inhibitor H4 (plasma Kallikrein-sensitive glycoprotein))	RCC132T
FLIETGPRGV	A*02	7145	(tensin 1)	RCC099T, RCC263T
FPDLDRIVY	B*35	1363	(carboxypeptidase E)	RCC231T
FPKAFAEVSCLVTD	DR	213	(albumin)	RCC132T
FQVDNNRLL	DR	2	(alpha-2-macroglobulin)	RCC163T
FRVGNVQJEL	unsure	1293	(collagen, type VI, alpha 3)	RCC399T
GATYNIIVEALKDQ	DR	2335	(fibronectin 1)	RCC108T
GELTGEVRM (variant)	B*4001	2318	(filamin C, gamma (actin binding protein 280))	CCA172T, RCC075T
GFGPIYNYKDTIVFK	DR	722	(complement component 4 binding protein, alpha)	RCC108T, RCC190T, RCC231T
GGPGLSIERPDSRPP	DR	720	(complement component 4A (Rodgers blood group))	CCA164T, RCC108T
GKIVDLVKELDR	DR	5265	(serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiprotease, antitrypsin), member 1)	RCC211T
GKPMIYKGGTSR	DR	2934	(gelsolin (amyloidosis, Finnish type))	RCC108T
GLATDVQTV	A*02	5691	(proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 3)	CCA061T, RCC068T
GLTFQMKKNAEELK	DR	337	(apolipoprotein A-IV)	RCC132T, RCC211T
GLTFQMKKNAEELKA	DR	337	(apolipoprotein A-IV)	RCC132T
GNRIAQWQSFQJL	DR	2	(alpha-2-macroglobulin)	RCC231T
GNRIAQWQSFQJLEG	DR	2	(alpha-2-macroglobulin)	RCC307T
GNRIAQWQSFQJLEGG	DR	2	(alpha-2-macroglobulin)	RCC108T
GPHFNPISRKHGGPK	DR	6647	(superoxide dismutase 1, soluble (amyotrophic lateral sclerosis 1 (adult)))	RCC108T, RCC190T
GPIYNYKDTIVFK	DR	722	(complement component 4 binding protein, alpha)	RCC108T
GRLDAVLQR	B*27	5371	(promyelocytic leukemia)	RCC112T, RCC116T
GSEMVVAGKLDQDRGPD	DR	3700	(inter-alpha (globulin) inhibitor H4 (plasma Kallikrein-sensitive glycoprotein))	RCC132T, RCC211T
GSEMVVAGKLDQDRGPDV	DR	3700	(inter-alpha (globulin) inhibitor H4 (plasma Kallikrein-sensitive glycoprotein))	RCC132T
GSSDVIHR	A*11	57661	(CTD-binding SR-like protein rA9)	CCA129T, RCC186T

Tabelle 5.2 – Fortsetzung Primärgewebe-spezifische Quellproteine

Peptidsequenz	HLA- Restriktion	Entrez GeneID	Quellprotein	Gewebe, auf denen derselbe Ligand identifiziert wurde
GSYNKVFLAK	A*03	5714	(proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 8)	RCC075T
GTDELRLLY	A*01	81887	(LASI-like ( <i>S. cerevisiae</i> ))	MET002, RCC098T, RCC112T
GTQGKIVDIVKELDR	DR	5265	(serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1)	RCC132T, RCC211T
GTQGKIVDIVKELDRDT	DR	5265	(serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1)	RCC132T, RCC211T
GVAPFTIAR	A*11	1293	(collagen, type VI, alpha 3)	RCC186T
GVIHMLDGILLPP	DR	23166	(stabilin 1)	RCC231T
GVIHMLDGILLPPT	DR	23166	(stabilin 1)	RCC231T
GVSHFFRELAEEKREG	DR	2512	(ferritin, light polypeptide)	RCC190T
HAKVLEFGW	B*57	7145	(tensin 1)	RCC099N, RCC099T
HHGEEVETF	B*38		EST	CCA172T, RCC307T
HHSDGSVSL	B*38	6892	(TAP binding protein (tapasin))	RCC307T
HQITVLHVY	B*1501	60481	(ELOVL family member 5, elongation of long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3-like, yeast))	RCC068T
HQYSVKLGHPDT	DR	6280	(S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B))	RCC132T
IETIINTF	B44- Supertype	6280	(S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B))	RCC001T
IHDDFVITF	B*38	165	(AE binding protein 1)	CCA172T, NCh361, RCC307T
IYKGGTSR	A*03	2934	(gelsoin (amyloidosis, Finnish type))	RCC115T
IKGKINSITVDNCKK	DR	10487	(CAP, adenylate cyclase-associated protein 1 (yeast))	RCC132T
IMDATNILV	A*02	6774	(signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor))	RCC100N, RCC100T
INEQWLLTTAKNL	DR	3240	(haptoglobin)	RCC163T, RCC211T
IPGHLNSYTIKGLKPG	DR	2335	(fibrinectin 1)	RCC132T
IQPGAVKVY	B*15	718	(complement component 3)	RCC115T
ITGYIHKYEKPGSPP	DR	2335	(fibrinectin 1)	RCC132T
IVDLVKELDR	DR	5265	(serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1)	RCC132T
IVDLVKELDRDT	DR	5265	(serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1)	RCC132T
KAVALTIDEKGTGA	DR	5265	(serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1)	RCC108T, RCC155T, RCC211T
KAVALTIDEKGTGTEA	DR	5265	(serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1)	RCC155T, RCC211T
KGSEMVVAGKIQDRGPD	DR	3700	(inter-alpha (globulin) inhibitor H4 (plasma Kallikrein-sensitive glycoprotein))	RCC132T
KGSEMVVAGKIQDRGPDV	DR	3700	(inter-alpha (globulin) inhibitor H4 (plasma Kallikrein-sensitive glycoprotein))	RCC132T
KIVDLVKELDRDT	DR	5265	(serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1)	RCC211T
KLLEGEESRI	B*13	1674	(desmin)	RCC211T, RCC307T

Tabelle 5.2 – Fortsetzung Primärgewebe-spezifische Quellproteine

Peptidsequenz	HLA-Restriktion	Entrez GeneID	Quellprotein	Gewebe, auf denen derselbe Ligand identifiziert wurde
KYITQGQLLQF	A*24	60481	(ELOVL family member 5, elongation of long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3-like, yeast))	CCA060T, RCC130T, RCC231T
LGEYKFNALLVR	DR	213	(albumin)	RCC231T
LGEYKFNALLVRYT	DR	213	(albumin)	RCC231T, RCC307T
LKKYLEIARRHP	DR	213	(albumin)	CCA165T, RCC190T, RCC307T
LKKYLEIARRHPY	DR	213	(albumin)	RCC307T
LLDEEISRV	A*02	9444	(quaking homolog, KH domain RNA binding (mouse))	PaCa001T, RCC068T
LMIDQTKSPLFMGKVVNPTQK	DR	5265	(serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiprotease, antitrypsin), member 1)	RCC190T
LMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK	DR	5265	(serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiprotease, antitrypsin), member 1)	RCC263T
LNSYTIKGLKPG	DR	2335	(fibronectin 1)	RCC132T
LPGETLTYVWKIPER	DR	1356	(ceruloplasmin (ferroxidase))	RCC132T
LRPIQALGTEY	n.a.	8857	(Fc fragment of IgG binding protein)	RCC231T
LSALEEYTKKLTNTQ	DR	335	(apolipoprotein A-1)	RCC211T, RCC231T, RCC263T, RCC307T
LTGYRVRVTPKEKTGP	DR	2335	(fibronectin 1)	RCC132T
LTLYVGKKQLVEIEK	DR	3240	(haptoglobin)	RCC211T
LTSVSFVDHHLAPS	DR	720	(complement component 4A (Rodgers blood group))	RCC190T
LVAYYTLIGASGQR	DR	718	(complement component 3)	CCA156T, RCC108T
MIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK	DR	5265	(serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiprotease, antitrypsin), member 1)	RCC190T
MVPPVQVSFLIKLGRYSAL	DR	521	(ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit E)	RCC231T
MVAGKLQDRGPD	DR	3700	(inter-alpha (globulin) inhibitor H4 (plasma Kallikrein-sensitive glycoprotein))	RCC132T
NDDIIVWVNETLRE	DR	3936	(lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin))	RCC108T
NEADVHGIFY	B*1801	1356	(ceruloplasmin (ferroxidase))	RCC098T, RCC189T
NEFPVPEQF	B*1801	10487	(CAP, adenylate cyclase-associated protein 1 (yeast))	RCC189T
NEVTTEIRF	B*1801	1293	(collagen, type VI, alpha 3)	RCC189T
NLRFLLATTPNSL	DR	2335	(fibronectin 1)	RCC211T
PKAEFAEVSKLVTD	DR	213	(albumin)	RCC132T
PTLVEVSRNLGKVG	DR	213	(albumin)	RCC108T
QGGKIVDLVKELDR	DR	5265	(serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiprotease, antitrypsin), member 1)	RCC132T
QGGKIVDLVKELDRDT	DR	5265	(serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiprotease, antitrypsin), member 1)	RCC132T
QLGEYKFNALLVRYT	DR	213	(albumin)	RCC231T, RCC307T
QVAEIVSKY	A*26	3685	(integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51))	NCh361, RCC068T, RCC121T
RILFFNTPK	A*03	5714	(proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 8)	RCC075T
RPAGLPEKY	B*35	6288	(serum amyloid A1)	RCC211T

Tabelle 5.2 – Fortsetzung Primärgewebe-spezifische Quellproteine

Peptidsequenz	HLA- Restriktion	Entrez GeneID	Quellprotein	Gewebe, auf denen derselbe Ligand identifiziert wurde
RYLDKTEQW	A*24	720	(complement component 4A (Rodgers blood group))	RCC231T, RCC307T
RYLEKPMEI	A*24	6774	(signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor))	RCC119T, RCC231T
RYLEQLHQL	A*24	6774	(signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor))	RCC119T, RCC231T
SAFLLGLFK	A*11	6892	(TAP binding protein (tapasin))	RCC103T
SAPGLAITKKVAVPY	DR	1363	(carboxypeptidase E)	RCC108T
SDTSYVSLKAPLTKPL	DR	1401	(C-reactive protein, pentraxin-related)	RCC226T
SGTLVLLQGARGFA	DR	929	(CD14 molecule)	RCC149T, RCC307T
SLADLMAKR (variant)	A*68		EST	CCA128N, CCA128T, RCC001T
SPMYSIITPNILR	DR	718	(complement component 3)	CCA156T, RCC108T, RCC158T, RCC231T, RCC307T
SPMYSIITPNILRL	DR	718	(complement component 3)	CCA156T, RCC108T, RCC158T, RCC231T
SPMYSIITPNILRE	DR	718	(complement component 3)	RCC231T, RCC307T
SSTMANNEGLFSIVARKLSRPL	DR	4837	(nicotinamide N-methyltransferase)	RCC226T
STPTLVEVSRNLGKVG	DR	213	(albumin)	CCA164T, RCC108T, RCC190T
STPTLVEVSRNLGKVGVS	DR	213	(albumin)	RCC190T
STPTLVEVSRNLGKVGSK	DR	213	(albumin)	RCC108T
TDNQRLFF	B*37	7145	(tensin 1)	RCC231T
TENDIRVMF	B*18	10658	(CUG triplet repeat, RNA binding protein 1)	PaCa001T, RCC001T, RCC098T, RCC189T
TERIIAVSF	B*1801	7145	(tensin 1)	RCC189T
TFQMKNKNAEELK	DR	337	(apolipoprotein A-IV)	RCC132T
TGDAYVILKTVQLRNG	DR	2934	(gelsolin (amyloidosis, Finnish type))	CCA156T, RCC108T
TGYRVRVTPKEKTGPM	DR	2335	(fibronectin 1)	RCC132T
THSLPVVVI	B*38	6774	(signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor))	CCA172T, NCh361, RCC307T
TLVEVSRNLGKVG	DR	213	(albumin)	RCC190T
TPDAMKAAMALEKK	DR	2512	(ferritin, light polypeptide)	RCC108T, RCC190T, RCC307T
TPPTLVEVSRNLGK	DR	213	(albumin)	RCC132T
TPPTLVEVSRNLGKVG	DR	213	(albumin)	CCA164T, RCC108T, RCC190T
TPPTLVEVSRNLGKVGVS	DR	213	(albumin)	RCC190T

Tabelle 5.2 – Fortsetzung Primärgewebe-spezifische Quellproteine

Peptidsequenz	HLA-Restriktion	Entrez GeneID	Quellprotein	Gewebe, auf denen derselbe Ligand identifiziert wurde
TPTLVEVSRNLGKVGSK	DR	213	(albumin)	CCA164T, RCC190T
TQGKIVDLVKELDR	DR	5265	(serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1)	RCC132T, RCC211T
TQGKIVDLVKELDRD	DR	5265	(serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1)	RCC132T
TQGKIVDLVKELDRDT	DR	5265	(serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1)	RCC132T
TVDQVKDLY	A*01	1356	(ceruloplasmin (ferroxidase))	RCC112T, RCC116T
TYMKDLYQL	A*24	93663	(Rho GTPase activating protein 18)	RCC231T
VDLKNTGREF	DR	8857	(Fc fragment of IgG-binding protein)	CCA156T, CCA165T, RCC108T
VDLKNTGREFL	DR	8857	(Fc fragment of IgG-binding protein)	RCC108T
VPAQLLVGALRVLAYS	DR	929	(CD14 molecule)	CCA156T, RCC108T
VPPVQVSPLIKLGYSAL	DR	521	(ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit E)	RCC211T, RCC231T, RCC263T
VPYVIVPLKTGLQE	DR	718	(complement component 3)	RCC155T
VSGTLVLLQGARG	DR	929	(CD14 molecule)	RCC149T
VSGTLVLLQGARGFA	DR	929	(CD14 molecule)	CCA156T, RCC108T, RCC149T, RCC231T
VSHFFRELAEEKREG	DR	2512	(ferritin, light polypeptide)	RCC190T
VSTPTLVEVSRNLGKVG	DR	213	(albumin)	RCC108T, RCC190T
VTYNYPVHY	A*03	55754	(transmembrane protein 30A)	CCA172T, RCC307T
VYIKHPVSL	A*24	5714	(proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 8)	MET002, RCC119T, RCC231T, RCC307T
VYLKHPVSL (variant)	A*24	2157	(coagulation factor VIII, procoagulant component (hemophilia A))	MET002, RCC119T, RCC231T, RCC307T
VYSHVIQKL	A*24	10993	(serine dehydratase)	MET002, RCC307T
WAAEVISDARENIQR	DR	6288	(serum amyloid A1)	MET002, RCC307T
YIKHPVSL	n.a.	5714	(proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 8)	CCA156T, RCC108T
YLEQLHQJLY	A*01	6774	(signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor))	RCC186T
YMLVLPSSLHTE	DR	2	(alpha-2-macroglobulin)	RCC193T
YSIFSATKRQDNE	DR	1401	(C-reactive protein, pentraxin-related)	RCC231T
YSIITPNILR	DR	718	(complement component 3)	RCC211T
YSIITPNILRL	DR	718	(complement component 3)	CCA156T, RCC108T, RCC116T, RCC158T, RCC231T, RCC307T
				CCA156T, RCC108T, RCC115T, RCC211T, RCC231T, RCC307T, RCC399T

Tabelle 5.2 – Fortsetzung Primärgewebe-spezifische Quellproteine

Peptidsequenz	HLA- Restriktion	Entrez GeneID	Quellprotein	Gewebe, auf denen derselbe Ligand identifiziert wurde
YSITPNILRLLE	DR	718	(complement component 3)	RCC231T
YTDPVVFYKY	A*01	5740	(prostaglandin I2 (prostaacyclin) synthase)	MET002, RCC116T, RCC193T
YVDPVITSI	n.a.	4233	(met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor))	NCh361, RCC001T, RCC013T
YVGKQLVEIEK	DR	3240	(haptoglobin)	RCC132T
YVSLKAPLTKP	DR	1401	(C-reactive protein, pentraxin-related)	RCC226T
YYMIGEQQKF	A*24	4837	(nicotinamide N-methyltransferase)	RCC013T, RCC130T, RCC231T
YYPRVEYGF	A*24	720	(complement component 4A (Rodgers blood group))	RCC231T

**Tabelle 5.3:** Komplette Auflistung aller Quellproteine, die im Rahmen der Ligandenanalyse von Autophagie-induzierten bzw. Kontrollzellen (Awells-N1 und -N2) identifiziert wurden. Zur Autophagie-Induktion wurde entweder HBSS Mangelmedium (Awells-H1 und -H2) oder Rapamycin (Awells-R2) eingesetzt. Aufgeführt sind die Namen und Abkürzungen aus der *Entrez Gene* Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>) [348].

Liganden der Probe Awells-N1 (unmodifiziert)				
Peptidsequenz	HLA- Restriktion	Entrez GeneID	Quellprotein	Proben, auf denen derselbe Ligand identifiziert wurde
AEDLNTRVAYW	B*4402	51014	(transmembrane emp24 protein transport domain containing 7)	Awells-H2, Awells-R2
AEDMETKIKNY	B*4402	1340	(cytochrome c oxidase subunit Vlb polypeptide 1 (ubiquitous))	Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
AEEKAIYQQW	B*4402	9521	(eukaryotic translation elongation factor 1 epsilon 1)	
AEESDLSRQY	B*4402	2975	(general transcription factor IIIC, polypeptide 1, alpha 220kDa)	
AEIGEGAYGKVF	B*4402	1021	(cyclin-dependent kinase 6)	
AEIIRFLTNY	B*4402	3071	(NCK-associated protein 1-like)	
AEINNIKI	B*4402	7153	(topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa)	
AEITDKLGLHSL	B*4402	375	(ADP-ribosylation factor 1)	
AELMQTLRF	B*4402	51650	(mitochondrial ribosomal protein S33)	
AEVDNRSQKQF	B*4402	79596	(chromosome 13 open reading frame 7)	
AEVLGLLRY	B*4402	5591	(protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide)	
AEYNSDLHQF	B*4402	699	(BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (yeast))	
DEQTPHISW	B*4402	1033	(cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDK2-associated dual specificity phosphatase))	

Tabelle 5.3 – Fortsetzung

Peptidsequenz	HLA-Restriktion	Entrez GeneID	Quelleprotein	Proben, auf denen derselbe Ligand identifiziert wurde
EDWIRGVEW	B*4402	55250	(signal transducer and activator of transcription 3 interacting protein 1)	Awells-N1(mod)
EAAQFETKKLY	B*4402	9403	(15 kDa selenoprotein)	Awells-H1, Awells-H2
EEFDARWVVTY	B*4402	9377	(cytochrome c oxidase subunit Va)	Awells-H2, Awells-N2,
EEFGRAFSE	B*4402	3113	(major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1)	Awells-R2
EEIAIIPSKKL	B*4402	6218	(ribosomal protein S17)	Awells-N1(mod),
EELGFRPEY	B*4402	142	(poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1)	Awells-H1, Awells-H2,
EEMPATKGGFSF	B*4402	9972	(nucleoporin 153kDa)	Awells-N2, Awells-R2
EEVHDLERKY	B*4403	4673	(nucleosome assembly protein 1-like 1)	Awells-N1(mod),
EEVRQGLKAY	B*4402	10539	(thioredoxin-like 2)	Awells-H1, Awells-H2,
EEWLPRELW	B*4402	4913	(nth endonuclease III-like 1 (E. coli))	Awells-N2, Awells-R2
GEWASGGVRSF	B*4402	25824	(peroxiredoxin 5)	
GEWIRQNGGW	B*4402	597	(BCL2-related protein A1)	
IEDPQIQAHW	B*4402	9440	(cofactor required for Sp1 transcriptional activation, subunit 6, 77kDa)	
ILDQKINEV	A*0201	4953	(ornithine decarboxylase 1)	Awells-N1(mod),
LLIENVASL	A*0201	2876	(glutathione peroxidase 1)	Awells-H1, Awells-N2,
MEPSTAARAW	B*4402	1650	(dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase)	Awells-R2
NEDNGIHKAF	B*4402	6124	(ribosomal protein L4)	Awells-H2
NEIEDTFRQF	B*4402	9296	(ATPase, H+ transporting, lysosomal 14kDa, V1 subunit F)	Awells-N1(mod),
NEILGSLRW	B*4402	23195	(MDN1, midasin homolog (yeast))	Awells-H1
NENPLRALY	B*4402	5058	(p21/Cdc42/Rac1-activated kinase 1 (STE20 homolog, yeast))	Awells-N1(mod),
QEAASLLGKKY	B*4402	4678	(nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding))	Awells-H1, Awells-H2,
QEDLRTFSW	B*4402	10146	(Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein)	Awells-N2, Awells-R2
QEGHLEVTQY	B*4402	83715	(espin)	Awells-N1(mod),
QELDSTDGAKVF	B*4402	6729	(signal recognition particle 54kDa)	Awells-H1, Awells-H2,

Tabelle 5.3 – Fortsetzung

Peptidsequenz	HLA-Restriktion	Entrez GeneID	Quellprotein	Proben, auf denen derselbe Ligand identifiziert wurde
SEAPSGESRKF	B*4402	8663	(eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 8, 110kDa)	Awells-N1(mod), Awells-H1, Awells-H2
SEFIDSQRVW	B*4402	10594	(PRP8 pre-mRNA processing factor 8 homolog (yeast))	
SEIDQLFRIF	B*4402	983	(cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M)	Awells-H1
SEIELFRVF	B*4402	23020	(activating signal cointegrator 1 complex subunit 3-like 1)	
SEINKPNFY	B*4402	30836	(deoxynucleotidyltransferase, terminal, interacting protein 2)	
SEPDFVAKF	B*4402	55017	(chromosome 14 open reading frame 119)	Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
SEVILHHEY	B*4402	23020	(activating signal cointegrator 1 complex subunit 3-like 1)	Awells-N1(mod), Awells-H1, Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
TLWGIQKEL	A*0201	3939	(lactate dehydrogenase A)	
YEILATHPTW	B*4402	23420	(NODAL modulator 1)	
<b>Liganden der Probe Awells-N1 (modifiziert)</b>				
AEADKTIKVV	B*4402	5356	(pleiotropic regulator 1 (PRL1 homolog, Arabidopsis))	Awells-H1, Awells-H2
AEEKQTKSF	B*4402	3069	(high density lipoprotein binding protein (vigilin))	Awells-H1
AEGHHTGQFVY	B*4402	6132	(ribosomal protein L8)	Awells-H1, Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
AEHDVTVKY	B*4402	135293	(aminoacylase 1-like 2)	Awells-H1
AEKEVKGAVY	B*4402	1642	(damage-specific DNA binding protein 1, 127kDa)	Awells-H1, Awells-H2
AEKLITQTF	B*4402	10726	(nuclear distribution gene C homolog (A. nidulans))	Awells-H1, Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
AELQGFHRSF	B*4402	2872	(MAP kinase interacting serine/threonine kinase 2)	Awells-H1, Awells-H2, Awells-R2
AEMGKGSFRY	B*4402		EST	Awells-H1, Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
AEPYGKIKNY	B*4402	9782	(matrin 3)	Awells-H1
AERLPRDIAY	B*4402	732307	(similar to zinc finger protein 36-like 3)	Awells-H1, Awells-H2
AESIVVHTY	B*4402	1434	(CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast))	Awells-H1, Awells-H2, Awells-R2
AESLIAKKI	B*4402	10576	(chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta))	Awells-H1, Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
AETPDIKLF	B*4402	6193	(ribosomal protein S5)	Awells-H1, Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2



Tabelle 5.3 – Fortsetzung

Peptidsequenz	HLA-Restriktion	Entrez GeneID	Quelleprotein	Proben, auf denen derselbe Ligand identifiziert wurde
AETPQAKKI	B*4402	9221	(nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1)	Awells-H1
AIVDKVPSV	A*0201	22820	(coatamer protein complex, subunit gamma)	Awells-H1, Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
ALDKATVLL	A*0201	27250	(programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor))	Awells-H1, Awells-H2, Awells-R2
DEALIGKKF	B*4402	1106	(chromodomain helicase DNA binding protein 2)	Awells-H1, Awells-H2, Awells-N2
DENSVIKSF	B*4402	25926	(nucleolar protein 11)	Awells-H1
EEAEIRKY	B*4402	142	(poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1)	Awells-H1, Awells-H2, Awells-R2
EEAQFETKKLY	B*4402	9403	(15 kDa selenoprotein)	Awells-N1(unmod), Awells-H1, Awells-H2
EEFGRFASF	B*4402	3122	(major histocompatibility complex, class II, DR alpha)	Awells-H1, Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
EEIAIIPSKKL	B*4402	6218	(ribosomal protein S17)	Awells-N1(unmod), Awells-H1, Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
EENTNILKF	B*4402	29766	(tropomodulin 3 (ubiquitous))	Awells-H1, Awells-H2, Awells-R2
EEPTVIKKY	B*4402	27131	(sorting nexin 5)	Awells-H1, Awells-H2
EEQSHPARLY	B*4402	10641	(tumor suppressor candidate 4)	Awells-H1
ELLQKY	fragment	386617	(potassium channel tetramerisation domain containing 8)	Awells-H1
ELLRKY	fragment	2551	(GA binding protein transcription factor, alpha subunit 60kDa)	Awells-H1, Awells-H2
GEASRLAHY	B*4402	3017	(histone 1, H2bd)	Awells-H1, Awells-H2, Awells-R2
HEAEVLKQL	B*4402	3925	(stathmin 1/oncoprotein 18)	Awells-H1, Awells-H2, Awells-R2
ILDQKINEV	A*0201	4953	(ornithine decarboxylase 1)	Awells-N1(unmod), Awells-H1, Awells-N2, Awells-R2
ILMEHIHKL	A*0201	6143	(ribosomal protein L19)	Awells-H1, Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
KESTLHLVL	B*4402	6233	(ribosomal protein S27a)	Awells-H1, Awells-H2, Awells-R2
KILPTLEAV	A*0201	3608	(interleukin enhancer binding factor 2, 45kDa)	Awells-H1, Awells-H2, Awells-N2
KIYEGQVEV	A*0201	6125	(ribosomal protein L5)	Awells-H1, Awells-R2

Tabelle 5.3 – Fortsetzung

Peptidsequenz	HLA-Restriktion	Entrez GeneID	Quellprotein	Proben, auf denen derselbe Ligand identifiziert wurde
KLHGVNINV	A*0201	5936	(RNA binding motif protein 4)	Awells-H1, Awells-H2, Awells-N2
LLDVLYY	fragment	4217	(mitogen-activated protein kinase kinase 5)	Awells-H1
LLGPRVLA	A*0201	10972	(transmembrane emp24-like trafficking protein 10 (yeast))	Awells-H1, Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
NEDNGIHKAF	B*4402	6124	(ribosomal protein L4)	Awells-N1(unmod), Awells-H1
NEIEDTFRQF	B*4402	9296	(ATPase, H+ transporting, lysosomal 14kDa, V1 subunit F)	Awells-N1(unmod), Awells-H1, Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
NLLPKLHIV	A*0201	1192	(chloride intracellular channel 1)	Awells-H1
NLYPFVKTV	A*0201	471	(5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase)	Awells-H1, Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
PQAPGIVTNW	unsure		EST	Awells-H1
QEAAALLGKKY	B*4402	4678	(nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding))	Awells-N1(unmod), Awells-H1, Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
QEAGIKTAF	B*4402	10606	(phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthetase)	Awells-H1, Awells-H2, Awells-R2
QELIGKKEY	B*4402	55320	(chromosome 14 open reading frame 106)	Awells-H1
QESNVRLKL	B*4402	23157	(septin 6)	Awells-H1, Awells-H2
SEAPSGESRKF	B*4402	8663	(eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 8, 110kDa)	Awells-N1(unmod), Awells-H1, Awells-H2
SEASRLAHY	B*4402	8340	(histone 1, H2bl)	Awells-H1, Awells-H2
SEEAELIRKY	B*4402	142	(poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1)	Awells-H1, Awells-H2, Awells-R2
SEFFRSGBKY	B*4402	2023	(enolase 1, (alpha))	Awells-H1, Awells-H2, Awells-R2
SEMPAAKRL	B*4402	2962	(general transcription factor IIF, polypeptide 1, 74kDa)	Awells-H1, Awells-H2
SENLHGKQF	B*4402	4288	(antigen identified by monoclonal antibody Ki-67)	Awells-H1, Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
SENPARKLY	B*4402	114049	(Williams Beuren syndrome chromosome region 22)	Awells-H1, Awells-H2
SEPEIRKRW	B*4402	1211	(clathrin, light polypeptide (Lca))	Awells-H1, Awells-H2
SEPIHVVRKY	B*4402	9156	(exonuclease 1)	Awells-H1
SESAQSKML	B*4402	3119	(major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1)	Awells-H1, Awells-H2
SETDMVVRQI	B*4402	738	(chromosome 11 open reading frame2)	Awells-H1

Tabelle 5.3 – Fortsetzung

Peptidsequenz	HLA-Restriktion	Entrez GeneID	Quellprotein	Proben, auf denen derselbe Ligand identifiziert wurde
SEVILHHEY	B*4402	23020	(activating signal cointegrator 1 complex subunit 3-like 1)	Awells-N1 (unmod), Awells-H1, Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
SLSEKTVLL	A*0201	966	(CD59 molecule, complement regulatory protein)	Awells-N2, Awells-R2
TEAAHPIRLF	B*4402	10594	(PRP8 pre-mRNA processing factor 8 homolog (yeast))	Awells-H1, Awells-N2 Awells-H1, Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
TELPKAEKW	B*4402	57461	(ISY1 splicing factor homolog (S. cerevisiae))	Awells-H1, Awells-H2
TEVTGHRW	B*4402	682	(basigin (Ok blood group))	Awells-H1, Awells-H2
TLADLVHHV	A*0201	8295	(transformation/transcription domain-associated protein)	Awells-H1, Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
TLFPGKVHSL	A*0201	11180	(WD repeat domain 6)	Awells-H1, Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
VEIYDRREY	B*4402	3695	(integrin, beta 7)	Awells-H1, Awells-H2, Awells-R2
VLALFVYVA	A*0201	203547	(hypothetical protein LOC203547)	Awells-H1, Awells-N2
VMAPRTLVL	E	3105	(major histocompatibility complex, class I, A)	Awells-H1
YLGRLAHEV	A*0201	23521	(ribosomal protein L13a)	Awells-H1, Awells-N2
<b>Liganden der Probe Awells-N2 (modifiziert)</b>				
AEAFEAIPRAL	B*4402	10694	(chaperonin containing TCPI, subunit 8 (theta))	Awells-H2, Awells-R2
AEDPLGAIHL	B*4402	5341	(pleckstrin)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-R2
AEELFARKF	B*4402	1213	(clathrin, heavy polypeptide (Hc))	Awells-N1, Awells-H2, Awells-R2
AEELPHIHAF	B*4402	552900	(boLA-like 2 (E. coli))	Awells-H2, Awells-R2
AEGHTGQFVY	B*4402	6132	(ribosomal protein L8)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-R2
AEGPRLAI	B*4402	8079	(myeloid leukemia factor 2)	Awells-R2
AEINNIKI	B*4402	7153	(topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa)	Awells-N1, Awells-H2, Awells-R2
AEKLITQTF	B*4402	10726	(nuclear distribution gene C homolog (A. nidulans))	Awells-R2
AELDRQIKSF	B*4402	6709	(spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (alpha-fodrin))	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-R2
AEMKGSFRY	B*4402		EST	Awells-H2
				Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-R2

Tabelle 5.3 – Fortsetzung

Peptidsequenz	HLA- Restriktion	Entrez GeneID	Quellprotein	Proben, auf denen derselbe Ligand identifiziert wurde
AESLIAKKI	B*4402	10576	(chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta))	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-R2
AESLRYKLL	B*4402	6188	(ribosomal protein S3)	Awells-H2, Awells-R2
AETPDIKLF	B*4402	6193	(ribosomal protein S5)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-R2
AEVLDLRRLY	B*4402	25885	(polymerase (RNA) I polypeptide A, 194kDa)	Awells-H2, Awells-R2
AIVDKVPSV	A*0201	22820	(coatomer protein complex, subunit gamma)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-R2
ALFQRPLI	A*0201	1736	(dyskeratosis congenita 1, dyskerin)	Awells-N1
ALKDLINEA	A*0201	5111	(proliferating cell nuclear antigen)	Awells-N1
ALLDKLYAL	A*0201	55272	(IMP3, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, homolog (yeast))	Awells-H2
ALSDHHIYL	A*0201	226	(aldolase A, fructose-bisphosphate)	Awells-N1, Awells-H2, Awells-R2
DEALIGKKF	B*4402	1106	(chromodomain helicase DNA binding protein 2)	Awells-H1, Awells-H2
EEFELLGKAY	B*4402	8663	(eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 8, 110kDa)	Awells-N1, Awells-H2, Awells-R2
EEFGRAFVSF	B*4402	3113	(major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1)	Awells-N1, Awells-H2, Awells-R2
EEFGRFASF	B*4402	3122	(major histocompatibility complex, class II, DR alpha)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-R2
EEIAIIPSKKL	B*4402	6218	(ribosomal protein S17)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-R2
EEIREAFRVF	B*4402	801	(calmodulin 1 (phosphorylase kinase, delta))	Awells-H2, Awells-R2
EELDAQFPEGY	B*4402		EST	Awells-N1, Awells-H2, Awells-R2
FLLDKKIGV	A*0201	10576	(chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta))	Awells-H2, Awells-R2
ILDQKINEV	A*0201	4953	(ornithine decarboxylase 1)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-R2
ILMEHIHKL	A*0201	6143	(ribosomal protein L19)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-R2
ILTDITKGV	A*0201	1938	(eukaryotic translation elongation factor 2)	Awells-H1, Awells-H2, Awells-R2
KILPTLEAV	A*0201	3608	(interleukin enhancer binding factor 2, 45kDa)	Awells-H1, Awells-H2
KLGEIVTTI	A*0201	375	(ADP-ribosylation factor 1)	Awells-H2, Awells-R2
KLHGVNINV	A*0201	5936	(RNA binding motif protein 4)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2

Tabelle 5.3 – Fortsetzung

Peptidsequenz	HLA-Restriktion	Entrez GeneID	Quelleprotein	Proben, auf denen derselbe Ligand identifiziert wurde
LLGPRVLVLA	A *0201	10972	(transmembrane emp24-like trafficking protein 10 (yeast))	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-R2
LLLPGELAKHAV	A *0201	3017	(histone 1, H2bd)	Awells-H1, Awells-H2
NADAIVVKL	A *0201	27044	(staphylococcal nuclease domain containing 1)	Awells-H2, Awells-R2
NEIEDTRRQF	B *4402	9296	(ATPase, H+ transporting, lysosomal 14kDa, V1 subunit F)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-R2
NLLVPSSFLV	A *0201	170572	(5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3, family member C)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-R2
NLYPFVKTV	A *0201	471	(5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-R2
NQVFKKIF	unsure		EST	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-R2
QEAAASLLGKKY	B *4402	4678	(nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding))	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-R2
RGVSGAHLLY	unsure		TCR delta chain (VJ), kein Entrez Gene Eintrag	Awells-N1
RIIDVVYNA	A *0201	6202	(ribosomal protein S8)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-R2
RLDDAIHVL	A *0201	6925	(transcription factor 4)	Awells-N1, Awells-H2, Awells-R2
SENLLGKQF	B *4402	4288	(antigen identified by monoclonal antibody Ki-67)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-R2
SEPDFVAKF	B *4402	55017	(chromosome 14 open reading frame 119)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-R2
SEPDFVAKFY	B *4402	55017	(chromosome 14 open reading frame 119)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-R2
SEVDLTRSF	B *4402	51292	(guanosine monophosphate reductase 2)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-R2
SEVILHHEY	B *4402	23020	(activating signal cointegrator 1 complex subunit 3-like 1)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-R2
SIIGRLLEV	A *0201	5499	(protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform)	Awells-N1, Awells-H2
SLSEKTVLL	A *0201	966	(CD59 molecule, complement regulatory protein)	Awells-N1, Awells-H1
TEAAHPIRLF	B *4402	10594	(PRP8 pre-mRNA processing factor 8 homolog (yeast))	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-R2
TLADLVHHV	A *0201	8295	(transformation/transcription domain-associated protein)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-R2
TLFPGKVHSL	A *0201	11180	(WD repeat domain 6)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-R2
TLTSKLYSL	A *0201	29796	(ubiquinol-cytochrome c reductase complex (7.2 kD))	Awells-H1
TLYEAVREV	A *0201	4736	(ribosomal protein L10a)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-R2
VLALFVYVA	A *0201	203547	(hypothetical protein LOC203547)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-R2
VRDNVSVDY	unsure	652231	(L1 protein)	Awells-N1, Awells-H1

Tabelle 5.3 – Fortsetzung

Peptidsequenz	HLA-Restriktion	Entrez GeneID	Quellprotein	Proben, auf denen derselbe Ligand identifiziert wurde
YLGRLAHEV	A*0201	23521	(ribosomal protein L13a)	Awells-N1, Awells-H1
YLLPAIVHI	A*0201	1655	(DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2
<b>Liganden der Probe Awells-H1 (unmodifiziert)</b>				
AEAERVGLHKVF	B*4402	7153	(topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa)	Awells-N1, Awells-H1 (mod) Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
AEDPLGAIHL	B*4402	5341	(pleckstrin)	Awells-N1, Awells-H1 (mod) Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
AEFKEAFQLF	B*4402	4637	(myosin, light polypeptide 6, alkali, smooth muscle and non-muscle)	Awells-N1, Awells-H1 (mod) Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
AEGIHTGQFVY	B*4402	6132	(ribosomal protein L8)	Awells-N1, Awells-H1 (mod) Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
AEIRIIPAKKY	B*4402	1718	(24-dehydrocholesterol reductase)	Awells-N1, Awells-H1 (mod) Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
AEKLITQTF	B*4402	10726	(nuclear distribution gene C homolog (A. nidulans))	Awells-N1, Awells-H1 (mod) Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
AELEGKLRVF	B*4402	7185	(TNF receptor-associated factor 1)	Awells-N1, Awells-H1 (mod) Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
AEMAQNAVRL	B*4402	1499	(catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa)	Awells-N1, Awells-H1 (mod) Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
AETPDIKLF	B*4402	6193	(ribosomal protein S5)	Awells-N1, Awells-H1 (mod) Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
AIPSKKL	A*0201	6218	(ribosomal protein S17)	Awells-N1, Awells-H1 (mod) Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
ALLDRIVSV	A*0201	23165	(nucleoporin 205kDa)	Awells-N1, Awells-H1 (mod) Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
CLPESNNQVK	unsure	114826	(SET and MYND domain containing 4)	Awells-N1, Awells-H1 (mod) Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
DEIERKFDKW	B*4402	26121	(PRP31 pre-mRNA processing factor 31 homolog (S. cerevisiae))	Awells-N1, Awells-H1 (mod) Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
EEDAALFKAW	B*4402	3662	(interferon regulatory factor 4)	Awells-N1, Awells-H1 (mod) Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
EEIAIIPSKKL	B*4402	6218	(ribosomal protein S17)	Awells-N1, Awells-H1 (mod) Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
EEKSIDLIQKW	B*4402	5130	(phosphate cytidylyltransferase 1, choline, alpha)	Awells-N1, Awells-H1 (mod) Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
FLASESLIKQI	A*0201	4736	(ribosomal protein L10a)	Awells-N1, Awells-H1 (mod) Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
FLFELPSRL	A*0201	738	(chromosome 11 open reading frame2)	Awells-N1, Awells-H1 (mod) Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
FLITILDHL	A*0201	8776	(myotubularin related protein 1)	Awells-N1, Awells-H1 (mod) Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
FLLDGFPRTV	A*0201	204	(adenylate kinase 2)	Awells-N1, Awells-H1 (mod) Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2

Tabelle 5.3 – Fortsetzung

Peptidsequenz	HLA-Restriktion	Entrez GeneID	Quellprotein	Proben, auf denen derselbe Ligand identifiziert wurde
IENPALIRW ant)	(vari- B*4402	402175	(hypothetical gene supported by AF044957; NM004547)	
IENPALLRW	B*4402	4710	(NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 4, 15kDa)	
ILMEHIHKL	A*0201	6143	(ribosomal protein L19)	Awells-N1, Awells-H1 (mod) Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
ILTDITKGV	A*0201	1938	(eukaryotic translation elongation factor 2)	Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
IMLEALERV	A*0201	6637	(small nuclear ribonucleoprotein polypeptide G)	Awells-N1, Awells-H1 (mod)
KLLEPVLLL	A*0201	6217	(ribosomal protein S16)	Awells-H1 (mod)
LEGNPDTHSW	B*4402	9898	(ubiquitin associated protein 2-like)	Awells-N1, Awells-H1 (mod)
LLFDRPMHV	A*0201	4670	(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M)	Awells-N1, Awells-H2, Awells-N2
LLGPRVLVA	A*0201	10972	(transmembrane emp24-like trafficking protein 10 (yeast))	Awells-H2, Awells-N2
LLLPGELAKHAV	A*0201	3017	(histone 1, H2bd)	Awells-N1, Awells-H1 (mod)
LMEHIHK	fragment	6143	(ribosomal protein L19)	Awells-N1, Awells-H2, Awells-N2
NEDNGIHKAF	B*4402	6124	(ribosomal protein L4)	Awells-N1, Awells-H1 (mod)
NEIEDTFRQF	B*4402	9296	(ATPase, H+ transporting, lysosomal 14kDa, V1 subunit F)	Awells-N1, Awells-H1 (mod) Awells-N2, Awells-H2, Awells-R2
NELNIIHKF	B*4402	26121	(PRP31 pre-mRNA processing factor 31 homolog (S. cerevisiae))	Awells-N1, Awells-H1 (mod) Awells-H2, Awells-R2
NLLPKLHIV	A*0201	1192	(chloride intracellular channel 1)	Awells-N1, Awells-H1 (mod)
QEAASLLGKKY	B*4402	4678	(nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding))	Awells-N1, Awells-H1 (mod) Awells-H2, Awells-R2
QEDLRTFSW	B*4402	10146	(Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein)	Awells-N1, Awells-H1 (mod) Awells-H2, Awells-R2
QELQEIINRVY	B*4402	302	(annexin A2)	Awells-N1, Awells-H1 (mod) Awells-H2, Awells-R2
RLLSFVVLVA	A*0201	6746	(signal sequence receptor, beta (translocon-associated protein beta))	Awells-N1, Awells-H1 (mod) Awells-H2, Awells-R2

Tabelle 5.3 – Fortsetzung

Peptidsequenz	HLA- Restriktion	Entrez GeneID	Quellprotein	Proben, auf denen derselbe Ligand identifiziert wurde
RLPEIYIQL	A*0201	30844	(EH-domain containing 4)	Awells-N1,
SEIELFRVF	B*4402	23020	(activating signal cointegrator 1 complex subunit 3-like 1)	Awells-N1, Awells-
SENLLGKQF	B*4402	4288	(antigen identified by monoclonal antibody Ki-67)	H1 (mod) Awells-H2,
SEPDFVAKFY	B*4402	55017	(chromosome 14 open reading frame 119)	Awells-N2, Awells-R2
SESLLRGIYAY	B*4402	1973	(eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 1)	Awells-N1, Awells-
SLIKQIPRI	A*0201	4736	(ribosomal protein L10a)	H1 (mod) Awells-H2,
SLLDRFLATV	A*0201	10983	(cyclin I)	Awells-N2, Awells-R2
TEAAHPIRLF	B*4402	10594	(PRP8 pre-mRNA processing factor 8 homolog (yeast))	Awells-N1, Awells-
TLFDYEVRL	A*0201	29128	(ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1)	H1 (mod) Awells-H2,
TLFPGKVHSL	A*0201	11180	(WD repeat domain 6)	Awells-N2, Awells-R2
TLLHAGGLARA	A*0201	392617	(similar to slit homolog 1)	Awells-N1, Awells-
TLSDLRVYL	A*0201	140809	(sulfiredoxin 1 homolog (S. cerevisiae))	H1 (mod) Awells-H2,
TLYEAVREV	A*0201	4736	(ribosomal protein L10a)	Awells-N2, Awells-R2
VLIPKLPQL	A*0201	94103	(ORM1-like 3 (S. cerevisiae))	Awells-N1, Awells-
VLLKARLVPA	A*0201	165215	(KIAA1946)	H1 (mod)
VMAPRTLVL	E	3105	(major histocompatibility complex, class I, A)	Awells-N1, Awells-
YLDIKGLLDV	A*0201	6500	(S-phase kinase-associated protein 1A (p19A))	H1 (mod)
YLIPLLERL	A*0201	1656	(DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 6)	Awells-N1, Awells-
YLITLLEHL	A*0201	699	(BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (yeast))	H1 (mod) Awells-H2,
YLLPAIVHI	A*0201	1655	(DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5)	Awells-N2
YMAELJERL	A*0201	51053	(geminin, DNA replication inhibitor)	Awells-N1, Awells-
YPMQSLSWRT	unsure	2149	(coagulation factor II (thrombin) receptor)	H1 (mod) Awells-H2,
				Awells-N2



Tabelle 5.3 – Fortsetzung

Peptidsequenz	HLA-Restriktion	Entrez GeneID	Quellprotein	Proben, auf denen derselbe Ligand identifiziert wurde
<b>Liganden der Probe Awells-H1 (modifiziert)</b>				
AHADKTIKVV	B*4402	5356	(pleiotropic regulator 1 (PRL1 homolog, Arabidopsis))	Awells-N1, Awells-H2
AEDPLGAIHL	B*4402	5341	(pleckstrin)	Awells-N1, Awells-H1 (unmod), Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
AEEKATGKLF	B*4402	57118	(calcium/calmodulin-dependent protein kinase ID)	Awells-N1, Awells-R2
AEEKQTKSF	B*4402	3069	(high density lipoprotein binding protein (vigilin))	Awells-N1
AEELFARKF	B*4402	1213	(clathrin, heavy polypeptide (Hc))	Awells-N1, Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
AEGHHTGQFVY	B*4402	6132	(ribosomal protein L8)	Awells-N1, Awells-H1 (unmod), Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
AHDVTVKY	B*4402	135293	(aminoacylase 1-like 2)	Awells-N1, Awells-R2
AEIISRRGF	B*4402	103	(adenosine deaminase, RNA-specific)	Awells-N1, Awells-H2, Awells-R2
AEKEVKGAVY	B*4402	1642	(damage-specific DNA binding protein 1, 127kDa)	Awells-N1, Awells-H2
AEKLITQTF	B*4402	10726	(nuclear distribution gene C homolog (A. nidulans))	Awells-N1, Awells-H1 (unmod), Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
AEMGKGSFRY	B*4402		EST	Awells-N1, Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
AEPYGKIKNY	B*4402	9782	(matrin 3)	Awells-N1
AESLIAKKI	B*4402	10576	(chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta))	Awells-N1, Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
AETPDIKLF	B*4402	6193	(ribosomal protein S5)	Awells-N1, Awells-H1 (unmod), Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
AETPQAKKI	B*4402	9221	(nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1)	Awells-N1
AIVDKVPSV	A*0201	22820	(coatamer protein complex, subunit gamma)	Awells-N1, Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2

Tabelle 5.3 – Fortsetzung

Peptidsequenz	HLA-Restriktion	Entrez GeneID	Quellprotein	Proben, auf denen derselbe Ligand identifiziert wurde
ALAEIAKAEEL	A*0201	6421	(splicing factor proline/glutamine-rich (polypyrimidine tract binding protein associated))	Awells-N1, Awells-H2, Awells-R2
ALDKATVLL	A*0201	27250	(programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor))	Awells-N1, Awells-H2, Awells-R2
ALFQRPLLI	A*0201	1736	(dyskeratosis congenita 1, dyskerin)	Awells-N1, Awells-H2, Awells-R2
ALKDLINEA	A*0201	5111	(proliferating cell nuclear antigen)	Awells-N1, Awells-N2
ALSDHHIYL	A*0201	226	(aldolase A, fructose-bisphosphate)	Awells-N1, Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
DENSVIKSF	B*4402	25926	(nucleolar protein 11)	Awells-N1
EEAEIIRKY	B*4402	142	(poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1)	Awells-N1, Awells-H2, Awells-R2
EEAQFETKKLY	B*4402	9403	(15 kDa selenoprotein)	Awells-N1, Awells-H2
EEFELLGKAY	B*4402	8663	(eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 8, 110kDa)	Awells-N1, Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
EEFGRAFSF	B*4402	3113	(major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1)	Awells-N1, Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
EEFGRFASF	B*4402	3122	(major histocompatibility complex, class II, DR alpha)	Awells-N1, Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
EEIAIIPSKKL	B*4402	6218	(ribosomal protein S17)	Awells-N1, Awells-H1 (unmod), Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
EELDAQFPEGY	B*4402	EST	EST	Awells-R2
EENTNILKF	B*4402	29766	(tropomodulin 3 (ubiquitous))	Awells-N1, Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
EEPTVIKKY	B*4402	27131	(sorting nexin 5)	Awells-N1, Awells-H2
EEQKNLHFF	B*4402	29959	(nuclear receptor binding protein 1)	Awells-N1, Awells-H2, Awells-R2
EEQSHPARLY	B*4402	10641	(tumor suppressor candidate 4)	Awells-N1
ELLQKY	fragment			Awells-N1
ELLRKY	fragment	2551	(GA binding protein transcription factor, alpha subunit 60kDa)	Awells-N1
FLQLLVLIK	A*0201	64112	(modulator of apoptosis 1)	Awells-N1
GEASRLAHY	B*4402	3017	(histone 1, H2bd)	Awells-N1, Awells-H2
GFVIPVHII	A*0201	27334	(purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 10)	Awells-N1

Tabelle 5.3 – Fortsetzung

Peptidsequenz	HLA-Restriktion	Entrez GeneID	Quellprotein	Proben, auf denen derselbe Ligand identifiziert wurde
HEAEVLKQL	B*4402	3925	(stathmin 1/oncoprotein 18)	Awells-N1, Awells-H2, Awells-R2
HEIEALKSF	B*4402	4898	(nardilysin (N-arginine dibasic convertase))	Awells-N1, Awells-H2, Awells-R2
HIENIVAV	A*0201	26156	(ribosomal L1 domain containing 1)	Awells-N1
ILDPHVLL	A*0201	4927	(nucleoporin 88kDa)	Awells-N1
ILDQKINEV	A*0201	4953	(ornithine decarboxylase 1)	Awells-N1, Awells-N2, Awells-R2
ILMEHIHKL	A*0201	6143	(ribosomal protein L19)	Awells-N1, Awells-H1 (unmod), Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
KIYEGQVEV	A*0201	6125	(ribosomal protein L5)	Awells-N1, Awells-R2
KLHGVNINV	A*0201	5936	(RNA binding motif protein 4)	Awells-N1, Awells-H2, Awells-N2
KLLEPVLLL	A*0201	6217	(ribosomal protein S16)	Awells-N1, Awells-H1 (unmod)
LLAQERLLV	A*0201	EST	EST	Awells-N1
LLDVLYY	fragment	4217	(mitogen-activated protein kinase kinase 5)	Awells-N1
LLGPRVLA	A*0201	10972	(transmembrane emp24-like trafficking protein 10 (yeast))	Awells-N1, Awells-H1 (unmod), Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
LLLDVPTAAVQA	A*0201	10437	(interferon, gamma-inducible protein 30)	Awells-N1
MEPSTAARAW	B*4402	1650	(dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase)	Awells-N1, Awells-H2
NEDNGHIKAF	B*4402	6124	(ribosomal protein L4)	Awells-N1, Awells-H1 (unmod)
NEIEDTFRQF	B*4402	9296	(ATPase, H+ transporting, lysosomal 14kDa, V1 subunit F)	Awells-N1, Awells-H1 (unmod), Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
NELNIHKF	B*4402	26121	(PRP31 pre-mRNA processing factor 31 homolog (S. cerevisiae))	Awells-N1, Awells-H1 (unmod), Awells-H2, Awells-R2
NLLPKLHIV	A*0201	1192	(chloride intracellular channel 1)	Awells-N1, Awells-H1 (unmod)

Tabelle 5.3 – Fortsetzung

Peptidsequenz	HLA-Restriktion	Entrez GeneID	Quellprotein	Proben, auf denen derselbe Ligand identifiziert wurde
NLYPFVKTV	A*0201	471	(5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase)	Awells-N1, Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
PQAPGIVTNW	unsure		EST	Awells-N1
QEAAASLLGKKY	B*4402	4678	(nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding))	Awells-N1, Awells-H1 (unmod), Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
QEAGIKTAF	B*4402	10606	(phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthetase)	Awells-N1, Awells-H2, Awells-R2
QEDLRTFSW	B*4402	10146	(Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein)	Awells-N1, Awells-H1 (unmod), Awells-H2, Awells-R2
QELIGKKEY	B*4402	55320	(chromosome 14 open reading frame 106)	Awells-N1
RUIDVVYNA	A*0201	6202	(ribosomal protein S8)	Awells-N1, Awells-N2
RLEQVYFSELD	unsure	26278	(spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (sacsin))	Awells-N1
RMLPHAPGV	A*0201	3065	(histone deacetylase 1)	Awells-N1, wells-H2
SEAPSGESRKF	B*4402	8663	(eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 8, 110kDa)	Awells-N1, Awells-H2
SEASRLAHY	B*4402	8340	(histone 1, H2b)	Awells-N1, Awells-H2
SEEAELIRKY	B*4402	142	(poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1)	Awells-N1, Awells-H2, Awells-R2
SEFFRSGBKY	B*4402	2023	(enolase 1, (alpha))	Awells-N1, Awells-H2, Awells-R2
SEGYPGKRYY	B*4402	6472	(serine hydroxymethyltransferase 2 (mitochondrial))	Awells-N1
SEMPAAKRL	B*4402	2962	(general transcription factor IIF, polypeptide 1, 74kDa)	Awells-N1
SENLLGKQF	B*4402	4288	(antigen identified by monoclonal antibody Ki-67)	Awells-N1, Awells-H1 (unmod), Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
SENPARKLY	B*4402	114049	(Williams Beuren syndrome chromosome region 22)	Awells-N1, Awells-H2
SEPDFVAKFY	B*4402	55017	(chromosome 14 open reading frame 119)	Awells-N1, Awells-H1 (unmod), Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
SEPEIRKW	B*4402	1211	(clathrin, light polypeptide (Lca))	Awells-N1, Awells-H2
SEPIHVRYKY	B*4402	9156	(exonuclease 1)	Awells-N1
SESAQSKML	B*4402	3119	(major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1)	Awells-N1, Awells-H2

Tabelle 5.3 – Fortsetzung

Peptidsequenz	HLA-Restriktion	Entrez GeneID	Quellprotein	Proben, auf denen derselbe Ligand identifiziert wurde
SETDMVVRQI	B*4402	738	(chromosome 11 open reading frame2)	Awells-N1
SEVILHHEY	B*4402	23020	(activating signal cointegrator 1 complex subunit 3-like 1)	Awells-N1, Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
SIIGRLLEV	A*0201	5499	(protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform)	Awells-N1, Awells-N2
SLLEEQKL	A*0201	5253	(PHD finger protein 2)	Awells-N1
SLSSEKTVLL	A*0201	966	(CD59 molecule, complement regulatory protein)	Awells-N1, Awells-N2
TEAAHPIRLF	B*4402	10594	(PRP8 pre-mRNA processing factor 8 homolog (yeast))	Awells-N1, Awells-H1 (unmod), Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
TELPKAEKW	B*4402	57461	(ISY1 splicing factor homolog ( <i>S. cerevisiae</i> ))	Awells-N1, Awells-H2
TEVTGHRW	B*4402	682	(basigin (Ok blood group))	Awells-N1, Awells-H2
TLADLVHHV	A*0201	8295	(transformation/transcription domain-associated protein)	Awells-N1, Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
TLFPGKVHSL	A*0201	11180	(WD repeat domain 6)	Awells-N1, Awells-H1 (unmod), Awells-H2, Awells-N2, Awells-R2
TLLEDVLPVTA	A*0201		EST	Awells-N1
VEDELVKKY	B*4402	9031	(bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1B)	Awells-N1, Awells-H2, Awells-R2
VEIYDRREY	B*4402	3695	(integrin, beta 7)	Awells-N1, Awells-H2, Awells-R2
VLADALKSI	A*0201	6210	(ribosomal protein S15a)	Awells-N1
VLALFVYVA	A*0201	203547	(hypothetical protein LOC203547)	Awells-N1, Awells-N2
VLIPKLPQL	A*0201	94103	(ORM1-like 3 ( <i>S. cerevisiae</i> ))	Awells-N1, Awells-H1 (unmod)
VMAPRTLVL	E	3105	(major histocompatibility complex, class I, A)	Awells-N1, Awells-H1 (unmod)
YLGRLAHEV	A*0201	23521	(ribosomal protein L13a)	Awells-N1, Awells-N2
YLLPAIVHI	A*0201	1655	(DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5)	Awells-N1, Awells-H1 (unmod), Awells-H2, Awells-N2

Tabelle 5.3 – Fortsetzung

Peptidsequenz	HLA- Restriktion	Entrez GeneID	Quellprotein	Proben, auf denen derselbe Ligand identifiziert wurde
AEAAGLHKVF	B*4402	7155	(topoisomerase (DNA) II beta 180kDa)	Awells-R2
AEADKTKVY	B*4402	5356	(pleiotropic regulator 1 (PRL1 homolog, Arabidopsis))	Awells-N1, Awells-H1
AEAFEAIPRAL	B*4402	10694	(chaperonin containing TCP1, subunit 8 (theta))	Awells-N2, Awells-R2
AEAIRKIGF	B*4402	196743	(polyamine oxidase (exo-N4-amino))	Awells-R2
AEAITLAERKY	B*4402	9950	(golgi autoantigen, golgin subfamily a, 5)	Awells-R2
AEAIYVTRHLF	B*4402	348995	(nucleoporin 43kDa)	Awells-R2
AEDPLGAIHL	B*4402	5341	(pleckstrin)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-N2, Awells-R2
AEEELFARKF	B*4402	1213	(clathrin, heavy polypeptide (Hc))	Awells-N1, Awells-H1, Awells-N2, Awells-R2
AEEELPHIHF	B*4402	552900	(boIA-like 2 (E. coli))	Awells-N1, Awells-H1, Awells-N2, Awells-R2
AEFKQIRSI	B*4402	2185	(PTK2B protein tyrosine kinase 2 beta)	Awells-N2, Awells-R2
AEFTKSIKAF	B*4402	9789	(signal peptidase complex subunit 2 homolog (S. cerevisiae))	Awells-R2
AEGHHTGQFVY	B*4402	6132	(ribosomal protein L8)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-N2, Awells-R2
AEHFLEQQM	B*4402	7203	(chaperonin containing TCP1, subunit 3 (gamma))	Awells-N1, Awells-R2
AEIGEGAYGKVF	B*4402	1021	(cyclin-dependent kinase 6)	Awells-N1, Awells-R2
AEISRRGF	B*4402	103	(adenosine deaminase, RNA-specific)	Awells-N1, Awells-N2, Awells-R2
AEINNIKI	B*4402	7153	(topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa)	Awells-R2
AEKAPTIVY	B*4402	6118	(replication protein A2, 32kDa)	Awells-R2
AEKEVKGAVY	B*4402	1642	(damage-specific DNA binding protein 1, 127kDa)	Awells-N1, Awells-H1
AEKLITQTF	B*4402	10726	(nuclear distribution gene C homolog (A. nidulans))	Awells-N1, Awells-H1, Awells-N2, Awells-R2
AELDRQIKSF	B*4402	6709	(spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (alpha-fodrin))	Awells-N2
AELGKLRVF	B*4402	7185	(TNF receptor-associated factor 1)	Awells-H1, Awells-R2
AELQGFHRSF	B*4402	2872	(MAP kinase interacting serine/threonine kinase 2)	Awells-H1, Awells-R2
AELRYDLPASY	B*4402	29081	(methyltransferase like 5)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-N2, Awells-R2
AEMCKGSFRY	B*4402	EST	EST	Awells-N1, Awells-H1, Awells-N2, Awells-R2
AEQYTPKAKY	B*4402	2194	(fatty acid synthase)	Awells-H1,
AERLPRDIAY	B*4402	732307	(similar to zinc finger protein 36-like 3)	Awells-H1, Awells-R2
AESIVVHTY	B*4402	1434	(CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast))	Awells-H1, Awells-R2
AESKEIVRGY	B*4402	29085	(phosphohistidine phosphatase 1)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-N2, Awells-R2
AESLIAKKI	B*4402	10576	(chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta))	Awells-N1, Awells-H1, Awells-N2, Awells-R2

Tabelle 5.3 – Fortsetzung

Peptidsequenz	HLA-Restriktion	Entrez GeneID	Quellprotein	Proben, auf denen derselbe Ligand identifiziert wurde
AESLRYKLL	B*4402	6188	(ribosomal protein S3)	Awells-N2, Awells-R2
AESVLEHRSY	B*4402	66005	(chitinase domain containing 1)	Awells-N1, Awells-H1,
AETPDIKLF	B*4402	6193	(ribosomal protein S5)	Awells-N2, Awells-R2
AEVLDLRRLY	B*4402	25885	(polymerase (RNA) I polypeptide A, 194kDa)	Awells-N2, Awells-R2
AIVDKVPSV	A*0201	22820	(coatamer protein complex, subunit gamma)	Awells-N1, Awells-H1,
ALAEIAKAEI	A*0201	6421	(splicing factor proline/glutamine-rich (polypyrimidine tract binding protein associated))	Awells-N2, Awells-R2
ALDKATVLL	A*0201	27250	(programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor))	Awells-N1, Awells-H1,
ALLDKLYAL	A*0201	55272	(IMP3, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, homolog (yeast))	Awells-R2
ALSDHHIYL	A*0201	226	(aldolase A, fructose-bisphosphate)	Awells-N1, Awells-N2,
DEALIGKKF	B*4402	1106	(chromodomain helicase DNA binding protein 2)	Awells-R2
EAEIIRKY	B*4402	142	(poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1)	Awells-H1, Awells-N2
EEAQFETKKLY	B*4402	9403	(15 kDa selenoprotein)	Awells-N1, Awells-H1
EEFELLGKAY	B*4402	8663	(eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 8, 110kDa)	Awells-N1, Awells-N2,
EEFGRAFVSF	B*4402	3113	(major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1)	Awells-R2
EEFGRFASF	B*4402	3122	(major histocompatibility complex, class II, DR alpha)	Awells-N1, Awells-N2,
EEIAIILSKKL	B*4402	6218	EST	Awells-H1, Awells-R2
EEIAIIPSKKL	B*4402	6218	(ribosomal protein S17)	Awells-R2
EEIAIIPSQKL	B*4402	801	EST	Awells-N1, Awells-H1,
EEIREAFRVF	B*4402	801	(calmodulin 1 (phosphorylase kinase, delta))	Awells-N2, Awells-R2
EELALLNGSTVVF	B*4402	801	EST	Awells-R2
EELDAQFPEGY	B*4402	801	EST	Awells-N2, Awells-R2
EELKELKEY	B*4402	80011	(NEFA-interacting nuclear protein NIP30)	Awells-N1, Awells-N2,
EENTNILKF	B*4402	29766	(tropomodulin 3 (ubiquitous))	Awells-R2
EEPTVIKKY	B*4402	27131	(sorting nexin 5)	Awells-N1, Awells-H1,
EEQKNLHFF	B*4402	29959	(nuclear receptor binding protein 1)	Awells-R2

Tabelle 5.3 – Fortsetzung

Peptidsequenz	HLA-Restriktion	Entrez GeneID	Quellprotein	Proben, auf denen derselbe Ligand identifiziert wurde
FEQVLQFGCSA	B*4402		EST	Awells-R2
FLASESLIKQI	A*0201	4736	(ribosomal protein L10a)	Awells-H1, Awells-R2
FLLDGFPRIV	A*0201	204	(adenylate kinase 2)	Awells-H1, Awells-R2
FLLDKKIGV	A*0201	10576	(chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta))	Awells-N2, Awells-R2
GEASRLAHY	B*4402	3017	(histone 1, H2bd)	Awells-N1, Awells-H1
GEAVVNRVF	B*4402	5698	(proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9 (large multifunctional peptidase 2))	Awells-R2
GEMPRNLREY	B*4402	6713	(squalene epoxidase)	
HEAEVLKQL	B*4402	3925	(stathmin 1/oncoprotein 18)	Awells-N1, Awells-H1
HEIEALKSF	B*4402	4898	(nardilysin (N-arginine dibasic convertase))	Awells-N1, Awells-R2
ILMEHIHKL	A*0201	6143	(ribosomal protein L19)	Awells-N2, Awells-R2
ILTDITKGV	A*0201	1938	(eukaryotic translation elongation factor 2)	Awells-H1, Awells-N2, Awells-R2
KENPLQFKF	B*4402	5962	(radixin)	Awells-R2
KESTLHLVL	B*4402	6233	(ribosomal protein S27a)	Awells-H1, Awells-R2
KILEDVGV	A*0201	22974	(TPX2, microtubule-associated, homolog (Xenopus laevis))	
KILPTLEAV	A*0201	3608	(interleukin enhancer binding factor 2, 45kDa)	Awells-H1, Awells-N2
KLGEIVTTI	A*0201	375	(ADP-ribosylation factor 1)	Awells-N2, Awells-R2
KLHGVNINV	A*0201	5936	(RNA binding motif protein 4)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-N2
LLGPRLVLA	A*0201	10972	(transmembrane emp24-like trafficking protein 10 (yeast))	Awells-N1, Awells-H1, Awells-N2, Awells-R2
LLLPGELAKHAV	A*0201	3017	(histone 1, H2bd)	Awells-H1, Awells-N2
MEPSTAARAW	B*4402	1650	(dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase)	Awells-N1
NADAIVVKL	A*0201	27044	(staphylococcal nuclease domain containing 1)	Awells-N2, Awells-R2
NEIEDTFRQF	B*4402	9296	(ATPase, H+ transporting, lysosomal 14kDa, V1 subunit F)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-N2, Awells-R2
NELNIIHKF	B*4402	26121	(PRP31 pre-mRNA processing factor 31 homolog (S. cerevisiae))	Awells-N1, Awells-H1, Awells-R2
NLYPFVKTV	A*0201	471	(5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-N2, Awells-R2
QEAAASLLGKKY	B*4402	4678	(nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding))	Awells-N1, Awells-H1, Awells-N2, Awells-R2
QEAGIKTAF	B*4402	10606	(phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthetase)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-R2



Tabelle 5.3 – Fortsetzung

Peptidsequenz	HLA-Restriktion	Entrez GeneID	Quellprotein	Proben, auf denen derselbe Ligand identifiziert wurde
QEDLRTFSW	B*4402	10146	(Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-R2
QELQEINRVY	B*4402	302	(annexin A2)	Awells-H1, Awells-R2
QESNVRLKL	B*4402	23157	(septin 6)	Awells-H1
QLVDIEKV	A*0201	10197	(proteasome (prosome, macropain) activator subunit 3 (PA28 gamma; Ki))	Awells-R2
RLAQHITYV	A*0201	4176	(MCM7 minichromosome maintenance deficient 7 ( <i>S. cerevisiae</i> ))	
RLFSSIVTV	A*0201	54920	(dihydrouridine synthase 2-like, SMM1 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> ))	Awells-R2
RLLDYVVNI	A*0201	25959	(ankyrin repeat domain 25)	
RMLPHAPGV	A*0201	3065	(histone deacetylase 1)	Awells-N1
SEADARIFKAW	B*4402	3665	(interferon regulatory factor 7)	Awells-R2
SEAGSHIQRMV	B*4402	3106	(major histocompatibility complex, class I, B)	Awells-N1, Awells-H1
SEAPSGESRKF	B*4402	8663	(eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 8, 110kDa)	Awells-N1, Awells-H1
SEASRLAHY	B*4402	8340	(histone 1, H2bl)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-R2
SEAEHIRKY	B*4402	142	(poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1)	
SEEDLKVLF	B*4402	5725	(polypyrimidine tract binding protein 1)	Awells-R2
SEFELLSY	B*4402	8723	(sorting nexin 4)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-R2
SEFFRSGBKY	B*4402	2023	(enolase 1, (alpha))	
SEHSIIKDF	B*4402	4174	(MCM5 minichromosome maintenance deficient 5, cell division cycle 46 ( <i>S. cerevisiae</i> ))	
SEINERVVQHF	B*4402	3708	(inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 1)	Awells-R2
SEKALIVHY	B*4402	22920	(kinesin-associated protein 3)	Awells-N1, Awells-H1
SEMPAAKRL	B*4402	2962	(general transcription factor IIF, polypeptide 1, 74kDa)	Awells-R2
SEMQRHYVMY	B*4402	166	(amino-terminal enhancer of split)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-R2
SENLLGKQF	B*4402	4288	(antigen identified by monoclonal antibody Ki-67)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-R2
SENPAKRLY	B*4402	114049	(Williams Beuren syndrome chromosome region 22)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-R2
SEPDFVAKF	B*4402	55017	(chromosome 14 open reading frame 119)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-R2
SEPDFVAKFY	B*4402	55017	(chromosome 14 open reading frame 119)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-R2
SEPEIRKW	B*4402	1211	(clathrin, light polypeptide (Lca))	Awells-N1, Awells-H1
SESAQSKML	B*4402	3119	(major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1)	Awells-N1, Awells-H1
SEVDLRSF	B*4402	51292	(guanosine monophosphate reductase 2)	Awells-N2, Awells-R2
SEVILHHEY	B*4402	23020	(activating signal cointegrator 1 complex subunit 3-like 1)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-N2, Awells-R2

Tabelle 5.3 – Fortsetzung

Peptidsequenz	HLA-Restriktion	Entrez GeneID	Quellprotein	Proben, auf denen derselbe Ligand identifiziert wurde
SIIGRLLEV	A*0201	5499	(protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform)	Awells-N1, Awells-N2
TEAAHPIRLF	B*4402	10594	(PRP8 pre-mRNA processing factor 8 homolog (yeast))	Awells-N1, Awells-H1, Awells-N2, Awells-R2
TELPKAEKW	B*4402	57461	(ISY1 splicing factor homolog ( <i>S. cerevisiae</i> ))	Awells-N1, Awells-H1, Awells-N2
TEVTGHRW	B*4402	682	(basigin (Ok blood group))	Awells-N1, Awells-H1, Awells-N2
TIIDLPGITRV (variant)	A*0201	4600	(myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse))	Awells-N1, Awells-H1, Awells-R2
TLADLVHHV	A*0201	8295	(transformation/transcription domain-associated protein)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-N2, Awells-R2
TLFPGKVHSL	A*0201	11180	(WD repeat domain 6)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-N2, Awells-R2
VEDELVKKY	B*4402	9031	(bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1B)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-N2, Awells-R2
VEINIDHKF	B*4402	3069	(high density lipoprotein binding protein (vigilin))	Awells-N1, Awells-H1, Awells-N2, Awells-R2
VEYDRREY	B*4402	3695	(integrin, beta 7)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-R2
YLLPAIVHI	A*0201	1655	(DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-R2
<b>Liganden der Probe Awells-R2 (modifiziert)</b>				
AEAAGLHKVF	B*4402	7155	(topoisomerase (DNA) II beta 180kDa)	Awells-H2
AEAFEAIPRAL	B*4402	10694	(chaperonin containing TCPI, subunit 8 (theta))	Awells-H2, Awells-N2
AEAIRKIGF	B*4402	196743	(polyamine oxidase (exo-N4-amino))	Awells-H2
AEAITLAERKY	B*4402	9950	(golgi autoantigen, golgin subfamily a, 5)	Awells-H2
AEAIYVTRHLF	B*4402	348995	(nucleoporin 43kDa)	Awells-H2
AEDPLGAIHL	B*4402	5341	(pleckstrin)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-N2
AEKATGKLF	B*4402	57118	(calcium/calmodulin-dependent protein kinase ID)	Awells-H2, Awells-N2
AELFARKF	B*4402	1213	(clathrin, heavy polypeptide (Hc))	Awells-N1
AELPHIHAF	B*4402	552900	(boLA-like 2 ( <i>E. coli</i> ))	Awells-N2
AEFKQIRSI	B*4402	2185	(PTK2B protein tyrosine kinase 2 beta)	Awells-H2, Awells-N2
AFTKSIKAF	B*4402	9789	(signal peptidase complex subunit 2 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> ))	Awells-H2
AEGHTGQFVY	B*4402	6132	(ribosomal protein L8)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-N2
AEGPRLAI	B*4402	8079	(myeloid leukemia factor 2)	Awells-H2, Awells-N2

Tabelle 5.3 – Fortsetzung

Peptidsequenz	HLA-Restriktion	Entrez GeneID	Quellprotein	Proben, auf denen derselbe Ligand identifiziert wurde
AEIGEGAYGKVF	B*4402	1021	(cyclin-dependent kinase 6)	Awells-N1, Awells-H2
AEISRRGF	B*4402	103	(adenosine deaminase, RNA-specific)	Awells-N1, Awells-H2
AEINNIKI	B*4402	7153	(topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa)	Awells-N1, Awells-H2, Awells-N2
AEKAPTIVY	B*4402	6118	(replication protein A2, 32kDa)	Awells-H2
AEKLITQTF	B*4402	10726	(nuclear distribution gene C homolog (A. nidulans))	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-N2
AELEGKLRVF	B*4402	7185	(TNF receptor-associated factor 1)	Awells-H1, Awells-H2
AELQGFHRSF	B*4402	2872	(MAP kinase interacting serine/threonine kinase 2)	Awells-H1, Awells-H2
AEMGKGSFRY	B*4402		EST	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-N2
AESIVVHTY	B*4402	1434	(CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast))	Awells-H1, Awells-H2
AESLIAKKI	B*4402	10576	(chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta))	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-N2
AESLRYKLL	B*4402	6188	(ribosomal protein S3)	Awells-H2, Awells-N2
AETPDIKLF	B*4402	6193	(ribosomal protein S5)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-N2
AEVLDLRRLY	B*4402	25885	(polymerase (RNA) I polypeptide A, 194kDa)	Awells-H2, Awells-N2
AIVDKVPSV	A*0201	22820	(coatomer protein complex, subunit gamma)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-N2
ALAEIAKAEI	A*0201	6421	(splicing factor proline/glutamine-rich (polypyrimidine tract binding protein associated))	Awells-N1, Awells-H2
ALDKATVLL	A*0201	27250	(programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor))	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2
ALSDHHIYL	A*0201	226	(aldolase A, fructose-bisphosphate)	Awells-N1, Awells-H2, Awells-N2
DSSGHILVPG	A*0201	84735	(carnosine dipeptidase 1 (metallopeptidase M20 family))	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2
EEAEIIRKY	B*4402	142	(poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1)	Awells-H2
EEFELIGKAY	B*4402	8663	(eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 8, 110kDa)	Awells-N1, Awells-H2, Awells-N2
EEFGRAFVSF	B*4402	3113	(major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1)	Awells-N1, Awells-H2, Awells-N2
EEFGRFASF	B*4402	3122	(major histocompatibility complex, class II, DR alpha)	Awells-N1, Awells-H2, Awells-N2
EEIAPLKKL	B*4402	7431	(vimentin)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-N2
EEIAILSKKL	B*4402		EST	Awells-H2, Awells-N2

Tabelle 5.3 – Fortsetzung

Peptidsequenz	HLA-Restriktion	Entrez GeneID	Quellprotein	Proben, auf denen derselbe Ligand identifiziert wurde
EEIAIIPSKKL	B*4402	6218	(ribosomal protein S17)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-N2
EEIAIIPSQKL	B*4402		EST	Awells-H2
EEIREAFRVF	B*4402	801	(calmodulin 1 (phosphorylase kinase, delta))	Awells-H2, Awells-N2
EELDAQFPEGY	B*4402		EST	Awells-N1, Awells-H2, Awells-N2
EELKELKEY	B*4402	80011	(NEFA-interacting nuclear protein NIP30)	Awells-H2
EENTNILKF	B*4402	29766	(tropomodulin 3 (ubiquitous))	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2
EEQKNLHFF	B*4402	29959	(nuclear receptor binding protein 1)	Awells-N1, Awells-H2
FEQVLQFGCSA	B*4402		EST	Awells-H2
FLASESLIKQI	A*0201	4736	(ribosomal protein L10a)	Awells-H1, Awells-H2
FLLDGFPRIV	A*0201	204	(adenylate kinase 2)	Awells-H1, Awells-H2
FLLDKKIGV	A*0201	10576	(chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta))	Awells-H2, Awells-N2
GEAVVNRVF	B*4402	5698	(proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9 (large multifunctional peptidase 2))	Awells-H2
HEAEVLKQL	B*4402	3925	(stathmin 1/oncoprotein 18)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2
HEIEALKSF	B*4402	4898	(nardiysin (N-arginine dibasic convertase))	Awells-N1, Awells-H2
ILDQKINEV	A*0201	4953	(ornithine decarboxylase 1)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-N2
ILMEHIHKL	A*0201	6143	(ribosomal protein L19)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-N2
ILTDITKGV	A*0201	1938	(eukaryotic translation elongation factor 2)	Awells-H1, Awells-H2, Awells-N2
KENPLQFKF	B*4402	5962	(radixin)	Awells-H2
KESTLHLVL	B*4402	6233	(ribosomal protein S27a)	Awells-H1, Awells-H2
KIYEGQVEV	A*0201	6125	(ribosomal protein L5)	Awells-N1, Awells-H1
KLGEIVTTI	A*0201	375	(ADP-ribosylation factor 1)	Awells-H2, Awells-N2
LLGPRLVLA	A*0201	10972	(transmembrane emp24-like trafficking protein 10 (yeast))	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-N2
NADAIIVKL	A*0201	27044	(staphylococcal nuclease domain containing 1)	Awells-H2, Awells-N2
NEIEDTFRQF	B*4402	9296	(ATPase, H+ transporting, lysosomal 14kDa, V1 subunit F)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-N2
NELNIHKKF	B*4402	26121	(PRP31 pre-mRNA processing factor 31 homolog (S. cerevisiae))	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2

Tabelle 5.3 – Fortsetzung

Peptidsequenz	HLA-Restriktion	Entrez GeneID	Quellprotein	Proben, auf denen derselbe Ligand identifiziert wurde
NLYPFVKTV	A*0201	471	(5-aminimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-N2
QEASALGKKY	B*4402	4678	(nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding))	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-N2
QEAGIKTAF	B*4402	10606	(phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthetase)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2
QEDLRTFSW	B*4402	10146	(Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2
QELQEINRVY	B*4402	302	(annexin A2)	Awells-H1, Awells-H2
QLVDIEKV	A*0201	10197	(proteasome (prosome, macropain) activator subunit 3 (PA28 gamma; Ki))	Awells-H2
RLFSSIVTV	A*0201	54920	(dihydrouridine synthase 2-like, SMM1 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> ))	Awells-H2
SEAGSHIQRMV	B*4402	3106	(major histocompatibility complex, class I, B)	Awells-H2
SEEAHIRKY	B*4402	142	(poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2
SEFELLSY	B*4402	8723	(sorting nexin 4)	Awells-H2
SEFFRSGBKY	B*4402	2023	(enolase 1, (alpha))	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2
SEKALIVHY	B*4402	22920	(kinesin-associated protein 3)	Awells-H2
SEMQRHYVMY	B*4402	166	(amino-terminal enhancer of split)	Awells-H2
SENLLGKQF	B*4402	4288	(antigen identified by monoclonal antibody Ki-67)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-N2
SEPDFVAKF	B*4402	55017	(chromosome 14 open reading frame 119)	Awells-N1, Awells-H2, Awells-N2
SEPDFVAKFY	B*4402	55017	(chromosome 14 open reading frame 119)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-N2
SESLLRGIYAY	B*4402	1973	(eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 1)	Awells-H1
SEVDLRSF	B*4402	51292	(guanosine monophosphate reductase 2)	Awells-H2, Awells-N2
SEVILHHEY	B*4402	23020	(activating signal cointegrator 1 complex subunit 3-like 1)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-N2
TEAAHPIRLF	B*4402	10594	(PRP8 pre-mRNA processing factor 8 homolog (yeast))	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-N2
TIIDLPGITRV (variant)	A*0201	4600	(myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse))	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-N2
TLADLVHHV	A*0201	8295	(transformation/transcription domain-associated protein)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-N2

Tabelle 5.3 – Fortsetzung

Peptidsequenz	HLA-Restriktion	Entrez GeneID	Quellprotein	Proben, auf denen derselbe Ligand identifiziert wurde
TLFPGKVVHSL	A*0201	11180	(WD repeat domain 6)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2, Awells-N2
VEDELVKKY	B*4402	9031	(bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1B)	Awells-N1, Awells-H2
VEIYDRREY	B*4402	3695	(integrin, beta 7)	Awells-N1, Awells-H1, Awells-H2
VLDELVRP	unsure	3174	(hepatocyte nuclear factor 4, gamma)	

## 6 Abkürzungen

3-MA	3-Methyladenin
AEP	Asparagin Endopeptidase
AJCC	American Joint Committee on Cancer
APC	Antigen presenting cell (Antigen präsentierende Zelle)
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
CD	Cluster of Differentiation (Differenzierungscluster)
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester (Carboxyfluorescein Succinimidylester)
CHAPS	(3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propan sulfonat)
CLB1	Zeptosens Lysepuffer
CLIP	Class II-associated invariant chain peptide (Klasse II-assoziiertes Peptid der invarianten Kette)
CQ	Chloroquin
CTL	Cytotoxic T lymphocyte (Cytotoxische T-Killerzelle)
DC	Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DRiP	Defective ribosomal product (Defektes ribosomales Produkt)
EDTA	Ethylendiamintetra acetic acid (Ethylendiamintetra-Acetat)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Enzym-gekoppelter Antikörper-vermittelter Nachweis von Antigenen)
ELISPOT	Enzyme-linked Immunospot (Enzym-gekoppelter Antikörper-vermittelter Nachweis von Antigenen)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAAP	ER aminopeptidase associated with antigen processing (ER Aminopeptidase, die mit Antigenprozessierung assoziiert ist)
EST	Expressed Sequence Tags (Exprimierte Sequenzabschnitte)
FCS	Fetal calf serum (Fötales Kälberserum)
GFP	Green Fluorescent Protein (Grünes fluoreszierendes Protein)
H2	Histocompatibilitätsantigen 2
HBSS	Hank's buffered salt solution (Aminosäurefreies Mangelmedium)
HLA	Humanes Leukocytenantigen
ICAT	Isotope-coded affinity tags (Isotopen-Markierung)
ICS	Intracellular Cytokine Staining (Intrazelluläre Cytokin-Färbung)
IFA	Inkomplettes Freundsches Adjuvans
IFN	Interferon
Ii	Invariant chain (Invariante Kette)
IL	Interleukin
KLH	Keyhole limpet hemocyanin (Hämocyanin der Schlitzschnecke)
LSM	Laser Scanning Mikroskopie
MDC	Monodansylcadaverin
MHC	Major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
mRNA	messenger Ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle

NS	Nukleinsäuren
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAS	Pre-Autophagosomal Structure (Präautophagosomale Struktur)
PBL	Periphere Blutlymphocyten
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat gepufferte Saline)
PCD	Programmed cell death (Programmierter Zelltod)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PDGF	Platelet-derived growth factor (Plättchen-Wachstumsfaktor)
PE	Phosphatidylethanolamin
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PtdIns3P	Phosphatidylinositol-3-Phosphat
qRT-PCR	Quantitative real time polymerase chain reaction (Quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion)
RCC	Renal cell carcinoma (Nierenzellkarzinom)
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
ROS	Reactive oxygen species (Reaktive Sauerstoffspezies)
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SNAP	Soluble NSF attachment protein (Lösliches NSF Anheftungsprotein)
SNARE	Soluble NSF attachment receptor (Löslicher NSF Anheftungsrezeptor)
T <sub>H</sub> 1	T-Helferzelle, Typ 1
T <sub>H</sub> 2	T-Helferzelle, Typ 2
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TAP	Transporter associated with Antigen Processing (Transporter, der mit der Antigenprozessierung assoziiert ist)
TBS	Tris buffered saline (Tris-gepufferte Saline)
TBST	Tris buffered saline Tween-20 (Tris-gepufferte Saline, die mit Tween-20 versetzt ist)
TCR	T cell receptor (T-Zellrezeptor)
TFA	Trifluor acetic acid (Trifluorsäure)
TNM-Staging	Primärtumor-, Lymphknoten-, Metastasen-Staging
TRiC	T-complex 1 (TCP-1) ring complex (Chaperonringkomplex, der das Chaperonin TCP-1 enthält)
Ubl	Ubiquitin-like protein (Ubiquitin-ähnliches Protein)
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
VHL	von Hippel Lindau Tumorsuppressorgen
WIPI	WD-repeat protein Interacting with Phospho-Inosides (WD-Repeat-Protein, das mit Phosphoinosiden interagiert)
ZSAB	Zeptosens Assay Buffer
ZSBB	Zeptosens Blocking Buffer



## 7 Literatur

- [1] C. A. Aarnoudse, P. B. van den Doel, B. Heemskerk, and P. I. Schrier. Interleukin-2-induced, melanoma-specific T cells recognize CAMEL, an unexpected translation product of LAGE-1. *Int J Cancer*, 82(3):442–448, 1999.
- [2] M. Abdul and N. Hoosein. Changes in beta-2 microglobulin expression in prostate cancer. *Urol. Oncol.*, 5(4):168–172, 2000.
- [3] H. Abeliovich, J. W. A. Dunn, J. Kim, and D. J. Klionsky. Dissection of autophagosome biogenesis into distinct nucleation and expansion steps. *J. Cell Biol.*, 151(5):1025–1034, 2000.
- [4] A. L. Ackerman and P. Cresswell. Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nat. Immunol.*, 5(7):678–684, 2004.
- [5] L. D. Adams, R. L. Geary, B. McManus, and S. M. Schwartz. A comparison of aorta and vena cava medial message expression by cDNA array analysis identifies a set of 68 consistently differentially expressed genes, all in aortic media. *Circ. Res.*, 87(7):623–631, 2000.
- [6] V. M. Aita, X. H. Liang, V. V. Murty, D. L. Pincus, W. Yu, E. Cayanis, S. Kalachikov, T. C. Gilliam, and B. Levine. Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics*, 59(1):59–65, 1999.
- [7] J. D. Altman, P. A. Moss, P. J. Goulder, D. H. Barouch, M. G. McHeyzer-Williams, J. I. Bell, A. J. McMichael, and M. M. Davis. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science*, 274(5284):94–96, 1996.
- [8] S. Amatschek, U. Koenig, H. Auer, P. Steinlein, M. Pacher, A. Gruenfelder, G. Dekan, S. Vogl, E. Kubista, K. H. Heider, C. Stratowa, M. Schreiber, and W. Sommergruber. Tissue-wide expression profiling using cDNA subtraction and microarrays to identify tumor-specific genes. *Cancer Res.*, 64(3):844–856, 2004.
- [9] M. B. Amin, M. B. Amin, P. Tamboli, J. Javidan, H. Stricker, V. M. de Peralta, A. Deshpande, and M. Menon. Prognostic impact of histologic subtyping of adult renal epithelial neoplasms: an experience of 405 cases. *Am. J. Surg. Pathol.*, 26(3):281–291, 2002.
- [10] M. H. Andersen, L. O. Pedersen, B. Capeller, E. B. Brocker, J. C. Becker, and S. P. thor. Spontaneous cytotoxic T-cell responses against survivin-derived MHC class I-restricted T-cell epitopes in situ as well as ex vivo in cancer patients. *Cancer Res.*, 61(16):5964–5968, 2001.
- [11] M. S. Anderson and J. Miller. Invariant chain can function as a chaperone protein for class II major histocompatibility complex molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89(6):2282–2286, 1992.
- [12] E. Angevin, F. Kremer, C. Gaudin, T. Hercend, and F. Triebel. Analysis of T-cell immune response in renal cell carcinoma: polarization to type 1-like differentiation pattern, clonal T-cell expansion and tumor-specific cytotoxicity. *Int. J. Cancer*, 72(3):431–440, 1997.
- [13] V. Apostolopoulos, V. Karanikas, J. S. Haurum, and I. F. McKenzie. Induction of HLA-A2-restricted CTLs to the mucin 1 human breast cancer antigen. *J Immunol.*, 159(11):5211–5218, 1997.
- [14] S. Arico, A. Petiot, C. Bauvy, P. F. Dubbelhuis, A. J. Meijer, P. Codogno, and E. Ogier-Denis. The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J. Biol. Chem.*, 276(38):35243–35246, 2001.
- [15] K. Asanuma, I. Tanida, I. Shirato, T. Ueno, H. Takahara, T. Nishitani, E. Kominami, and Y. Tomino. MAP-LC3, a promising autophagosomal marker, is processed during the differentiation and recovery of podocytes from PAN nephrosis. *FASEB J.*, 17(9):1165–1167, 2003.
- [16] A. M. Asemissen, U. Keilholz, S. Tenzer, M. Müller, S. Walter, S. Stevanović, H. Schild, A. Letsch, E. Thiel, H. G. Rammensee, and C. Scheibenbogen. Identification of a highly immunogenic HLA-A\*01-binding T cell epitope of WT1. *Clin. Cancer Res.*, 12(24):7476–7482, 2006.

- [17] M. Ashburner, C. A. Ball, J. A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J. M. Cherry, A. P. Davis, K. Dolinski, S. S. Dwight, J. T. Eppig, M. A. Harris, D. P. Hill, L. Issel-Tarver, A. Kasarskis, S. Lewis, J. C. Matese, J. E. Richardson, M. Ringwald, G. M. Rubin, and G. Sherlock. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat. Genet.*, 25(1):25–29, 2000.
- [18] T. P. Ashford and K. R. Porter. Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. *J Cell Biol.*, 12:198–202, 1962.
- [19] M. B. Atkins, M. Hidalgo, W. M. Stadler, T. F. Logan, J. P. Dutcher, G. R. Hudes, Y. Park, S. H. Liou, B. Marshall, J. P. Boni, G. Dukart, and M. L. Sherman. Randomized phase II study of multiple dose levels of CCI-779, a novel mammalian target of rapamycin kinase inhibitor, in patients with advanced refractory renal cell carcinoma. *J Clin. Oncol.*, 22(5):909–918, 2004.
- [20] J. Atzpodien, H. Kirchner, U. Jonas, L. Bergmann, H. Schott, H. Heynemann, P. Fornara, S. A. Loening, J. Roigas, S. C. Muller, H. Bodenstern, S. Pomer, B. Metzner, U. Rebmann, R. Oberneder, M. Siebels, T. Wandert, T. Puchberger, and M. Reitz. Interleukin-2- and interferon alfa-2a-based immunochemotherapy in advanced renal cell carcinoma: a Prospectively Randomized Trial of the German Cooperative Renal Carcinoma Chemoimmunotherapy Group (DGCIN). *J. Clin. Oncol.*, 22(7):1188–1194, 2004.
- [21] J. Atzpodien, E. Schmitt, U. Gertenbach, P. Fornara, H. Heynemann, A. Maskow, M. Ecke, H. H. Woltjen, H. Jentsch, W. Wieland, T. Wandert, and M. Reitz. Adjuvant treatment with interleukin-2- and interferon-alpha2a-based chemoimmunotherapy in renal cell carcinoma post tumour nephrectomy: results of a prospectively randomised trial of the German Cooperative Renal Carcinoma Chemoimmunotherapy Group (DGCIN). *Br. J. Cancer*, 92(5):843–846, 2005.
- [22] D. Avigan. Dendritic cell-tumor fusion vaccines for renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 10(18 Pt 2):6347S–6352S, 2004.
- [23] D. E. Avigan, B. Vasir, D. J. George, W. K. Oh, M. B. Atkins, D. F. McDermott, P. W. Kantoff, R. A. Figlin, M. J. Vasconcelles, Y. Xu, D. Kufe, and R. M. Bukowski. Phase I/II study of vaccination with electrofused allogeneic dendritic cells/autologous tumor-derived cells in patients with stage IV renal cell carcinoma. *J Immunother. (1997. )*, 30(7):749–761, 2007.
- [24] O. Bakke and B. Dobberstein. MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments. *Cell*, 63(4):707–716, 1990.
- [25] A. B. Bakker, M. W. Schreurs, A. J. de Boer, Y. Kawakami, S. A. Rosenberg, G. J. Adema, and C. G. Figdor. Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma-derived tumor-infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 179(3):1005–1009, 1994.
- [26] F. Balkwill. Cancer and the chemokine network. *Nat. Rev. Cancer*, 4(7):540–550, 2004.
- [27] F. Balkwill, K. A. Charles, and A. Mantovani. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell*, 7(3):211–217, 2005.
- [28] K. D. Ballard and S. J. Gaskell. Dehydration of peptide [M+H]<sup>+</sup> ions in the gas phase. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 4(6):477–481, 1993.
- [29] S. Bandyopadhyay, S. K. Pai, S. C. Gross, S. Hirota, S. Hosobe, K. Miura, K. Saito, T. Commes, S. Hayashi, M. Watabe, and K. Watabe. The Drg-1 gene suppresses tumor metastasis in prostate cancer. *Cancer Res.*, 63(8):1731–1736, 2003.
- [30] S. Bandyopadhyay, S. K. Pai, S. Hirota, S. Hosobe, T. Tsukada, K. Miura, Y. Takano, K. Saito, T. Commes, D. Piquemal, M. Watabe, S. Gross, Y. Wang, J. Huggenvik, and K. Watabe. PTEN up-regulates the tumor metastasis suppressor gene Drg-1 in prostate and breast cancer. *Cancer Res.*, 64(21):7655–7660, 2004.
- [31] H. Bang, K. Egerer, A. Gauliard, K. Luthke, P. E. Rudolph, G. Fredenhagen, W. Berg, E. Feist, and G. R. Burmester. Mutation and citrullination modifies vimentin to a novel autoantigen for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 56(8):2503–2511, 2007.
- [32] P. A. Barker and A. Salehi. The MAGE proteins: emerging roles in cell cycle progression, apoptosis, and neurogenetic disease. *J. Neurosci. Res.*, 67(6):705–712, 2002.
- [33] G. F. Barnard, M. Mori, R. J. Staniunas, N. A. Begum, S. Bao, M. Puder, J. Cobb, K. L. Redman, J. G. D. Steele, and L. B. Chen. Ubiquitin fusion proteins are overexpressed in colon cancer but not in gastric cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, 1272(3):147–153, 1995.
- [34] D. L. Barnd, M. S. Lan, R. S. Metzgar, and O. J. Finn. Specific, major histocompatibility complex-unrestricted recognition of tumor-associated mucins by human cytotoxic T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 86(18):7159–7163, 1989.

- 
- [35] E. Barnea, I. Beer, R. Patoka, T. Ziv, O. Kessler, E. Tzehoval, L. Eisenbach, N. Zavazava, and A. Admon. Analysis of endogenous peptides bound by soluble MHC class I molecules: a novel approach for identifying tumor-specific antigens. *Eur. J. Immunol.*, 32(1):213–222, 2002.
- [36] C. J. Barnstable, W. F. Bodmer, G. Brown, G. Galfre, C. Milstein, A. F. Williams, and A. Ziegler. Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens—new tools for genetic analysis. *Cell*, 14(1):9–20, 1978.
- [37] P. Baudhuin. Lysosomes and cellular autophagy. *Brux. Med.*, 46(45):1059–1070, 1966.
- [38] M. Bayes, X. Rabasseda, and J. R. Prous. Gateways to clinical trials. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 27(9):665–677, 2005.
- [39] F. Belli, A. Testori, L. Rivoltini, M. Maio, G. Andreola, M. R. Sertoli, G. Gallino, A. Piris, A. Cattelan, I. Lazzari, M. Carrabba, G. Scita, C. Santantonio, L. Pilla, G. Tragni, C. Lombardo, F. Arienti, A. Marchiano, P. Queirolo, F. Bertolini, A. Cova, E. Lamaj, L. Ascani, R. Camerini, M. Corsi, N. Cascinelli, J. J. Lewis, P. Srivastava, and G. Parmiani. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous tumor-derived heat shock protein gp96-peptide complexes: clinical and immunologic findings. *J. Clin. Oncol.*, 20(20):4169–4180, 2002.
- [40] E. Bergamini, G. Cavallini, A. Donati, and Z. Gori. The anti-ageing effects of caloric restriction may involve stimulation of macroautophagy and lysosomal degradation, and can be intensified pharmacologically. *Biomed. Pharmacother.*, 57(5-6):203–208, 2003.
- [41] M. Berger, G. Bergers, B. Arnold, G. J. Hammerling, and R. Ganss. Regulator of G-protein signaling-5 induction in pericytes coincides with active vessel remodeling during neovascularization. *Blood*, 105(3):1094–1101, 2005.
- [42] A. Biederbick, H. F. Kern, and H. P. Elsasser. Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. *Eur. J. Cell Biol.*, 66(1):3–14, 1995.
- [43] K. Biemann. Appendix 6. Mass values for amino acid residues in peptides. *Methods Enzymol.*, 193:888, 1990.
- [44] K. Biemann. Mass spectrometry of peptides and proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 61:977–1010, 1992.
- [45] M. S. Bijker, S. J. van den Eeden, K. L. Franken, C. J. Melief, R. Offringa, and S. H. van der Burg. CD8+ CTL priming by exact peptide epitopes in incomplete freund’s adjuvant induces a vanishing CTL response, whereas long peptides induce sustained CTL reactivity. *J Immunol.*, 179(8):5033–5040, 2007.
- [46] B. Bjorklund. Tissue polypeptide antigen (TPA): Biology, biochemistry, improved assay methodology, clinical significance in cancer and other conditions, and future outlook. *Antibiot. Chemother.*, 22:16–31, 1978.
- [47] P. J. Bjorkman, M. A. Saper, B. Samraoui, W. S. Bennett, J. L. Strominger, and D. C. Wiley. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature*, 329(6139):512–518, 1987.
- [48] I. Bleumer, A. Knuth, E. Oosterwijk, R. Hofmann, Z. Varga, C. Lamers, W. Kruit, S. Melchior, C. Mala, S. Ullrich, P. D. Mulder, P. F. Mulders, and J. Beck. A phase II trial of chimeric monoclonal antibody G250 for advanced renal cell carcinoma patients. *Br. J. Cancer*, 90(5):985–990, 2004.
- [49] I. Bleumer, E. Oosterwijk, J. C. Oosterwijk-Wakka, M. C. Voller, S. Melchior, S. O. Warnaar, C. Mala, J. Beck, and P. F. Mulders. A clinical trial with chimeric monoclonal antibody WX-G250 and low dose interleukin-2 pulsing scheme for advanced renal cell carcinoma. *J. Urol.*, 175(1):57–62, 2006.
- [50] I. Bleumer, D. M. Tiemessen, J. C. Oosterwijk-Wakka, M. C. Voller, K. D. Weijer, P. F. Mulders, and E. Oosterwijk. Preliminary analysis of patients with progressive renal cell carcinoma vaccinated with CA9-peptide-pulsed mature dendritic cells. *J Immunother. (1997.)*, 30(1):116–122, 2007.
- [51] E. F. Blommaart, J. J. Luiken, P. J. Blommaart, G. M. van Woerkom, and A. J. Meijer. Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, 270(5):2320–2326, 1995.
- [52] E. F. Blommaart, U. Krause, J. P. Schellens, H. Vreeling-Sindelarova, and A. J. Meijer. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.*, 243(1-2):240–246, 1997.
- [53] E. F. Blommaart, J. J. Luiken, and A. J. Meijer. Autophagic proteolysis: control and specificity. *Histochem. J.*, 29(5):365–385, 1997.
- [54] T. Boon. Tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes: present perspectives for specific immunotherapy. *Int. J. Cancer*, 54(2):177–180, 1993.

- [55] L. K. Borysiewicz, A. Fiander, M. Nimako, S. Man, G. W. Wilkinson, D. Westmoreland, A. S. Evans, M. Adams, S. N. Stacey, M. E. Bournsnel, E. Rutherford, J. K. Hickling, and S. C. Inglis. A recombinant vaccinia virus encoding human papillomavirus types 16 and 18, E6 and E7 proteins as immunotherapy for cervical cancer. *Lancet*, 347(9014):1523–1527, 1996.
- [56] C. N. Boss, F. Grunebach, K. Brauer, M. Hantschel, V. Mirakaj, T. Weinschenk, S. Stevanović, H. G. Rammensee, and P. Brossart. Identification and characterization of T-cell epitopes deduced from RGS5, a novel broadly expressed tumor antigen. *Clin. Cancer Res.*, 13(11):3347–3355, 2007.
- [57] M. Bouvier and D. C. Wiley. Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of MHC class I molecules. *Science*, 265(5170):398–402, 1994.
- [58] T. Bowman, R. Garcia, J. Turkson, and R. Jove. STATs in oncogenesis. *Oncogene*, 19(21):2474–2488, 2000.
- [59] P. Boya, R. A. Gonzalez-Polo, N. Casares, J. L. Perfettini, P. Dessen, N. Larochette, D. Metivier, D. Meley, S. Souquere, T. Yoshimori, G. Pierron, P. Codogno, and G. Kroemer. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol. Cell Biol.*, 25(3):1025–1040, 2005.
- [60] L. Bozhenok, P. A. Wade, and P. Varga-Weisz. WSTF-ISWI chromatin remodeling complex targets heterochromatic replication foci. *EMBO J*, 21(9):2231–2241, 2002.
- [61] D. Brandle, F. Brasseur, P. Weynants, T. Boon, and E. B. V. den. A mutated HLA-A2 molecule recognized by autologous cytotoxic T lymphocytes on a human renal cell carcinoma. *J. Exp. Med.*, 183(6):2501–2508, 1996.
- [62] D. L. Brasaemle, T. Barber, N. E. Wolins, G. Serrero, E. J. Blanchette-Mackie, and C. Londos. Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *J Lipid Res.*, 38(11):2249–2263, 1997.
- [63] M. I. Brazil, S. Weiss, and B. Stockinger. Excessive degradation of intracellular protein in macrophages prevents presentation in the context of major histocompatibility complex class II molecules. *Eur. J. Immunol.*, 27(6):1506–1514, 1997.
- [64] C. M. Britten, S. Janetzki, S. H. van der Burg, C. Gouttefangeas, and A. Hoos. Toward the harmonization of immune monitoring in clinical trials: Quo vadis? *Cancer Immunol. Immunother.*, 2007.
- [65] J. F. Bromberg, M. H. Wrzeszczynska, G. Devgan, Y. Zhao, R. G. Pestell, C. Albanese, and J. J. E. Darnell. Stat3 as an oncogene. *Cell*, 98(3):295–303, 1999.
- [66] P. Brossart, G. Stuhler, T. Flad, S. Stevanović, H. G. Rammensee, L. Kanz, and W. Brugger. Her-2/neu-derived peptides are tumor-associated antigens expressed by human renal cell and colon carcinoma lines and are recognized by in vitro induced specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res.*, 58(4):732–736, 1998.
- [67] P. Brossart, K. S. Heinrich, G. Stuhler, L. Behnke, V. L. Reichardt, S. Stevanović, A. Muhm, H. G. Rammensee, L. Kanz, and W. Brugger. Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies. *Blood*, 93(12):4309–4317, 1999.
- [68] N. Buentig, S. Storkel, and J. Atzpodien. Molecular genetic changes in renal cell carcinomas. *Urologe A*, 41(5):475–481, 2002.
- [69] M. H. Bui, D. Seligson, K. R. Han, A. J. Pantuck, F. J. Dorey, Y. Huang, S. Horvath, B. C. Leibovich, S. Chopra, S. Y. Liao, E. Stanbridge, M. I. Lerman, A. Palotie, R. A. Figlin, and A. S. Belldegrun. Carbonic anhydrase IX is an independent predictor of survival in advanced renal clear cell carcinoma: implications for prognosis and therapy. *Clin. Cancer Res.*, 9(2):802–811, 2003.
- [70] R. M. Bukowski. Natural history and therapy of metastatic renal cell carcinoma: the role of interleukin-2. *Cancer*, 80(7):1198–1220, 1997.
- [71] R. M. Bukowski, W. Sharfman, S. Murthy, P. Rayman, R. Tubbs, J. Alexander, G. T. Budd, J. S. Sergi, L. Bauer, V. Gibson, and . Clinical results and characterization of tumor-infiltrating lymphocytes with or without recombinant interleukin 2 in human metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Res.*, 51(16):4199–4205, 1991.
- [72] R. A. Bunning, S. L. Haworth, and E. H. Cooper. Serum beta-2-microglobulin levels in urological cancer. *J Urol.*, 121(5):624–625, 1979.
- [73] J. Burchell, S. Gendler, J. Taylor-Papadimitriou, A. Girling, A. Lewis, R. Millis, and D. Lampion. Development and characterization of breast cancer reactive monoclonal antibodies directed to the core protein of the human milk mucin. *Cancer Res.*, 47(20):5476–5482, 1987.
- [74] B. Burke. The role of matrix metalloproteinase 7 in innate immunity. *Immunobiology*, 209(1-2):51–56, 2004.

- [75] H. Buszello and R. Ackermann. Immunohistochemical studies on the expression of HLA class I antigens in renal cell carcinoma: comparison of primary and metastatic tumor tissue. *Eur. Urol.*, 25(2):158–163, 1994.
- [76] M. P. Byfield, J. T. Murray, and J. M. Backer. hVps34 is a nutrient-regulated lipid kinase required for activation of p70 S6 kinase. *J. Biol. Chem.*, 280(38):33076–33082, 2005.
- [77] R. S. Bystry, V. Aluvihare, K. A. Welch, M. Kallikourdis, and A. G. Betz. B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. *Nat. Immunol.*, 2(12):1126–1132, 2001.
- [78] J. C. L. Slingluff, G. R. Petroni, K. A. Chianese-Bullock, M. E. Smolkin, S. Hibbitts, C. Murphy, N. Johansen, W. W. Grosh, G. V. Yamshchikov, P. Y. Neese, J. W. Patterson, R. Fink, and P. K. Rehm. Immunologic and Clinical Outcomes of a Randomized Phase II Trial of Two Multi-peptide Vaccines for Melanoma in the Adjuvant Setting. *Clin. Cancer Res.*, 13(21):6386–6395, 2007.
- [79] M. Campoli, S. Ferrone, A. H. Zea, P. C. Rodriguez, and A. C. Ochoa. Mechanisms of tumor evasion. *Cancer Treat. Res.*, 123:61–88, 2005.
- [80] H. Cangul, K. Salnikow, H. Yee, D. Zagzag, T. Commes, and M. Costa. Enhanced expression of a novel protein in human cancer cells: a potential aid to cancer diagnosis. *Cell Biol. Toxicol.*, 18(2):87–96, 2002.
- [81] Y. Cao, K. B. Dave, T. P. Doan, and S. M. Prescott. Fatty acid CoA ligase 4 is up-regulated in colon adenocarcinoma. *Cancer Res.*, 61(23):8429–8434, 2001.
- [82] G. Cardi, J. A. Heaney, A. R. Schned, D. M. Phillips, M. T. Branda, and M. S. Ernstoff. T-cell receptor zeta-chain expression on tumor-infiltrating lymphocytes from renal cell carcinoma. *Cancer Res.*, 57(16):3517–3519, 1997.
- [83] L. H. Caro, P. J. Plomp, E. J. Wolvetang, C. Kerkhof, and A. J. Meijer. 3-Methyladenine, an inhibitor of autophagy, has multiple effects on metabolism. *Eur. J. Biochem.*, 175(2):325–329, 1988.
- [84] J. P. Carralot, J. Probst, I. Hoerr, B. Scheel, R. Teufel, G. Jung, H. G. Rammensee, and S. Pascolo. Polarization of immunity induced by direct injection of naked sequence-stabilized mRNA vaccines. *Cell Mol. Life Sci.*, 61(18):2418–2424, 2004.
- [85] J. P. Carralot, B. Weide, O. Schoor, J. Probst, B. Scheel, R. Teufel, I. Hoerr, C. Garbe, H. G. Rammensee, and S. Pascolo. Production and characterization of amplified tumor-derived cRNA libraries to be used as vaccines against metastatic melanomas. *Genet. Vaccines. Ther.*, 3:6, 2005.
- [86] V. A. Carroll and M. Ashcroft. Targeting the molecular basis for tumour hypoxia. *Expert. Rev. Mol. Med.*, 7(6):1–16, 2005.
- [87] P. Cascio, C. Hilton, A. F. Kisselev, K. L. Rock, and A. L. Goldberg. 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. *EMBO J.*, 20(10):2357–2366, 2001.
- [88] M. M. Caudill and Z. Li. HSPPC-96: a personalised cancer vaccine. *Expert. Opin. Biol. Ther.*, 1(3):539–547, 2001.
- [89] C. Caulin, G. S. Salvesen, and R. G. Oshima. Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J Cell Biol.*, 138(6):1379–1394, 1997.
- [90] E. Celis, V. Tsai, C. Crimi, R. DeMars, P. A. Wentworth, R. W. Chesnut, H. M. Grey, A. Sette, and H. M. Serra. 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(6):2105–2109, 1994.
- [91] C. M. Celluzzi, J. I. Mayordomo, W. J. Storkus, M. T. Lotze, and J. L. D. Faló. Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity. *J. Exp. Med.*, 183(1):283–287, 1996.
- [92] V. Cerundolo, T. Elliott, J. Elvin, J. Bastin, H. G. Rammensee, and A. Townsend. The binding affinity and dissociation rates of peptides for class I major histocompatibility complex molecules. *Eur. J Immunol.*, 21(9):2069–2075, 1991.
- [93] A. E. Chang, Q. Li, G. Jiang, D. M. Sayre, T. M. Braun, and B. G. Redman. Phase II trial of autologous tumor vaccination, anti-CD3-activated vaccine-primed lymphocytes, and interleukin-2 in stage IV renal cell cancer. *J. Clin. Oncol.*, 21(5):884–890, 2003.
- [94] P. J. Chefaló and C. V. Harding. Processing of exogenous antigens for presentation by class I MHC molecules involves post-Golgi peptide exchange influenced by peptide-MHC complex stability and acidic pH. *J. Immunol.*, 167(3):1274–1282, 2001.
- [95] Q. Chen, N. Shinohara, T. Abe, T. Harabayashi, and K. Nonomura. Impact of cyclooxygenase-2 gene expression on tumor invasiveness in a human renal cell carcinoma cell line. *J Urol.*, 172(6 Pt 1):2153–2157, 2004.

- [96] W. Chen, C. C. Norbury, Y. Cho, J. W. Yewdell, and J. R. Bennink. 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(11):1319–1326, 2001.
- [97] Y. Chen, T. Knosel, G. Kristiansen, A. Pietas, M. E. Garber, S. Matsushashi, I. Ozaki, and I. Petersen. Loss of PDCD4 expression in human lung cancer correlates with tumour progression and prognosis. *J Pathol.*, 200(5):640–646, 2003.
- [98] C. W. Cheung, D. A. Vesey, D. L. Nicol, and D. W. Johnson. The roles of IGF-I and IGFBP-3 in the regulation of proximal tubule, and renal cell carcinoma cell proliferation. *Kidney Int*, 65(4):1272–1279, 2004.
- [99] R. Chiari, G. Hames, V. Stroobant, C. Texier, B. Maillere, T. Boon, and P. G. Coulie. Identification of a tumor-specific shared antigen derived from an Eph receptor and presented to CD4 T cells on HLA class II molecules. *Cancer Res.*, 60(17):4855–4863, 2000.
- [100] R. Childs, A. Chernoff, N. Contentin, E. Bahceci, D. Schrupp, S. Leitman, E. J. Read, J. Tisdale, C. Dunbar, W. M. Linehan, N. S. Young, and A. J. Barrett. Regression of metastatic renal-cell carcinoma after nonmyeloablative allogeneic peripheral-blood stem-cell transplantation. *N. Engl. J. Med.*, 343(11):750–758, 2000.
- [101] P. Chomez, O. D. Backer, M. Bertrand, E. D. Plaen, T. Boon, and S. Lucas. An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family. *Cancer Res.*, 61(14):5544–5551, 2001.
- [102] C. F. Chou, C. L. Riopel, L. S. Rott, and M. B. Omary. A significant soluble keratin fraction in 'simple' epithelial cells. Lack of an apparent phosphorylation and glycosylation role in keratin solubility. *J Cell Sci.*, 105 ( Pt 2):433–444, 1993.
- [103] E. R. Christinck, M. A. Luscher, B. H. Barber, and D. B. Williams. Peptide binding to class I MHC on living cells and quantitation of complexes required for CTL lysis. *Nature*, 352(6330):67–70, 1991.
- [104] Y. W. Chu, R. B. Runyan, R. G. Oshima, and M. J. Hendrix. Expression of complete keratin filaments in mouse L cells augments cell migration and invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90(9):4261–4265, 1993.
- [105] I. A. Ciechomska and A. M. Tolkovsky. Non-autophagic GFP-LC3 puncta induced by saponin and other detergents. *Autophagy.*, 3(6):586–590, 2007.
- [106] P. G. Clarke. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embryol. (Berl)*, 181(3):195–213, 1990.
- [107] E. Connolly, S. Braunstein, S. Formenti, and R. J. Schneider. Hypoxia inhibits protein synthesis through a 4E-BP1 and elongation factor 2 kinase pathway controlled by mTOR and uncoupled in breast cancer cells. *Mol. Cell Biol.*, 26(10):3955–3965, 2006.
- [108] P. Conrotto, S. Corso, S. Gamberini, P. M. Comoglio, and S. Giordano. Interplay between scatter factor receptors and B plexins controls invasive growth. *Oncogene*, 23(30):5131–5137, 2004.
- [109] G. Consogno, S. Manici, V. Facchinetti, A. Bachi, J. Hammer, B. M. Conti-Fine, C. Rugarli, C. Traversari, and M. P. Protti. Identification of immunodominant regions among promiscuous HLA-DR-restricted CD4+ T-cell epitopes on the tumor antigen MAGE-3. *Blood*, 101(3):1038–1044, 2003.
- [110] P. G. Coulie, V. Brichard, A. V. Pel, T. Wolfel, J. Schneider, C. Traversari, S. Mattei, E. D. Plaen, C. Lurquin, J. P. Szikora, J. C. Renauld, and T. Boon. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J. Exp. Med.*, 180(1):35–42, 1994.
- [111] A. L. Cox, J. Skipper, Y. Chen, R. A. Henderson, T. L. Darrow, J. Shabanowitz, V. H. Engelhard, D. F. Hunt, and J. C. L. Slingluff. Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science*, 264(5159):716–719, 1994.
- [112] R. A. Craven, A. J. Stanley, S. Hanrahan, J. Dods, R. Unwin, N. Totty, P. Harnden, I. Eardley, P. J. Selby, and R. E. Banks. Proteomic analysis of primary cell lines identifies protein changes present in renal cell carcinoma. *Proteomics.*, 6(9):2853–2864, 2006.
- [113] P. Cresswell. Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell*, 84(4):505–507, 1996.
- [114] P. Cresswell, A. L. Ackerman, A. Giodini, D. R. Peaper, and P. A. Wearsch. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. *Immunol. Rev.*, 207:145–157, 2005.

- [115] A. Criollo, M. C. Maiuri, E. Tasdemir, I. Vitale, A. A. Fiebig, D. Andrews, J. Molgo, J. Diaz, S. Lavandro, F. Harper, G. Pierron, D. di Stefano, R. Rizzuto, G. Szabadkai, and G. Kroemer. Regulation of autophagy by the inositol trisphosphate receptor. *Cell Death. Differ.*, 14(5):1029–1039, 2007.
- [116] V. L. Crotzer, A. S. Mabardy, A. Weiss, and F. M. Brodsky. T cell receptor engagement leads to phosphorylation of clathrin heavy chain during receptor internalization. *J Exp. Med.*, 199(7):981–991, 2004.
- [117] A. M. Cuervo. Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol.*, 14(2):70–77, 2004.
- [118] T. J. Curiel, G. Coukos, L. Zou, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram, M. Evdemon-Hogan, J. R. Conejo-Garcia, L. Zhang, M. Burow, Y. Zhu, S. Wei, I. Kryczek, B. Daniel, A. Gordon, L. Myers, A. Lackner, M. L. Disis, K. L. Knutson, L. Chen, and W. Zou. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat. Med.*, 10(9):942–949, 2004.
- [119] C. C. Czerkinsky, L. A. Nilsson, H. Nygren, O. Ouchterlony, and A. Tarkowski. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J. Immunol. Methods*, 65(1-2):109–121, 1983.
- [120] I. D. Davis, G. A. Wiseman, F. T. Lee, D. N. Gansen, W. Hopkins, A. T. Papenfuss, Z. Liu, T. J. Moynihan, G. A. Croghan, A. A. Adjei, E. W. Hoffman, J. N. Ingle, L. J. Old, and A. M. Scott. A phase I multiple dose, dose escalation study of cG250 monoclonal antibody in patients with advanced renal cell carcinoma. *Cancer Immun.*, 7:13, 2007.
- [121] A. D. de Grey. A proposed refinement of the mitochondrial free radical theory of aging. *Bioessays*, 19(2):161–166, 1997.
- [122] K. Degenhardt, R. Mathew, B. Beaudoin, K. Bray, D. Anderson, G. Chen, C. Mukherjee, Y. Shi, C. Gelinas, Y. Fan, D. A. Nelson, S. Jin, and E. White. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell*, 10(1):51–64, 2006.
- [123] B. Delahunt, P. B. Bethwaite, and J. N. Nacey. Outcome prediction for renal cell carcinoma: evaluation of prognostic factors for tumours divided according to histological subtype. *Pathology*, 39(5):459–465, 2007.
- [124] A. T. den Boer, G. J. van Mierlo, M. F. Franssen, C. J. Melief, R. Offringa, and R. E. Toes. CD4+ T cells are able to promote tumor growth through inhibition of tumor-specific CD8+ T-cell responses in tumor-bearing hosts. *Cancer Res.*, 65(15):6984–6989, 2005.
- [125] J. M. den Haan, S. M. Lehar, and M. J. Bevan. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J. Exp. Med.*, 192(12):1685–1696, 2000.
- [126] L. E. V. den Hove, S. W. V. Gool, H. V. Poppel, L. Baert, L. Coorevits, B. V. Damme, and J. L. Ceuppens. Phenotype, cytokine production and cytolytic capacity of fresh (uncultured) tumour-infiltrating T lymphocytes in human renal cell carcinoma. *Clin. Exp. Immunol.*, 109(3):501–509, 1997.
- [127] S. Deng, A. Hirschberg, T. Worzfeld, J. Y. Penachioni, A. Korostylev, J. M. Swiercz, P. Vodrazka, O. Mauti, E. T. Stoeckli, L. Tamagnone, S. Offermanns, and R. Kuner. Plexin-B2, but not Plexin-B1, critically modulates neuronal migration and patterning of the developing nervous system in vivo. *J Neurosci.*, 27(23):6333–6347, 2007.
- [128] J. Dengjel, P. Decker, O. Schoor, F. Altenberend, T. Weinschenk, H. G. Rammensee, and S. Stevanović. Identification of a naturally processed cyclin D1 T-helper epitope by a novel combination of HLA class II targeting and differential mass spectrometry. *Eur. J Immunol.*, 34(12):3644–3651, 2004.
- [129] J. Dengjel, O. Schoor, R. Fischer, M. Reich, M. Kraus, M. Müller, K. Kreymborg, F. Altenberend, J. Brandenburg, H. Kalbacher, R. Brock, C. Driessen, H. G. Rammensee, and S. Stevanović. Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102(22):7922–7927, 2005.
- [130] J. Dengjel, M. D. Nastke, C. Gouttefangeas, G. Gitsioudis, O. Schoor, F. Altenberend, M. Müller, B. Krämer, A. Missiou, M. Sauter, J. Hennenlotter, D. Wernet, A. Stenzl, H. G. Rammensee, K. Klingel, and S. Stevanović. Unexpected abundance of HLA class II presented peptides in primary renal cell carcinomas. *Clin. Cancer Res.*, 12(14 Pt 1):4163–4170, 2006.
- [131] P. B. Dennis, A. Jaeschke, M. Saitoh, B. Fowler, S. C. Kozma, and G. Thomas. Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science*, 294(5544):1102–1105, 2001.
- [132] L. K. Denzin and P. Cresswell. HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading. *Cell*, 82(1):155–165, 1995.
- [133] T. P. Dick, T. Ruppert, M. Groettrup, P. M. Kloetzel, L. Kuehn, U. H. Koszinowski, S. Stevanović, H. Schild, and H. G. Rammensee. Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands. *Cell*, 86(2):253–262, 1996.

- [134] W. X. Ding and X. M. Yin. Sorting, recognition and activation of the misfolded protein degradation pathways through macroautophagy and the proteasome. *Autophagy*, 4(2), 2007.
- [135] N. Domenech, R. A. Henderson, and O. J. Finn. Identification of an HLA-A11-restricted epitope from the tandem repeat domain of the epithelial tumor antigen mucin. *J. Immunol.*, 155(10):4766–4774, 1995.
- [136] F. Donskov, K. M. Bennedsgaard, M. H. von der, N. Marcussen, R. Fisker, J. J. Jensen, P. Naredi, and M. Hokland. Intratumoural and peripheral blood lymphocyte subsets in patients with metastatic renal cell carcinoma undergoing interleukin-2 based immunotherapy: association to objective response and survival. *Br. J. Cancer*, 87(2):194–201, 2002.
- [137] F. Donskov, M. H. von der, N. Marcussen, S. Hamilton-Dutoit, H. H. Madsen, J. J. Jensen, and M. Hokland. Fas ligand expression in metastatic renal cell carcinoma during interleukin-2 based immunotherapy: no in vivo effect of Fas ligand tumor counterattack. *Clin. Cancer Res.*, 10(23):7911–7916, 2004.
- [138] D. Dorfel, S. Appel, F. Grunebach, M. M. Weck, M. R. Muller, A. Heine, and P. Brossart. Processing and presentation of HLA class I and II epitopes by dendritic cells after transfection with in vitro-transcribed MUC1 RNA. *Blood*, 105(8):3199–3205, 2005.
- [139] E. S. Doubrovina, M. M. Doubrovin, S. Lee, J. H. Shieh, G. Heller, E. Pamer, and R. J. O’Reilly. In vitro stimulation with WT1 peptide-loaded Epstein-Barr virus-positive B cells elicits high frequencies of WT1 peptide-specific T cells with in vitro and in vivo tumoricidal activity. *Clin. Cancer Res.*, 10(21):7207–7219, 2004.
- [140] S. K. Dove, R. C. Piper, R. K. McEwen, J. W. Yu, M. C. King, D. C. Hughes, J. Thuring, A. B. Holmes, F. T. Cooke, R. H. Michell, P. J. Parker, and M. A. Lemmon. Svp1p defines a family of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate effectors. *EMBO J.*, 23(9):1922–1933, 2004.
- [141] B. C. Duckworth and L. C. Cantley. Conditional inhibition of the mitogen-activated protein kinase cascade by wortmannin. Dependence on signal strength. *J. Biol. Chem.*, 272(44):27665–27670, 1997.
- [142] M. T. Duffour, P. Chaux, C. Lurquin, G. Cornelis, T. Boon, and B. P. van der. A MAGE-A4 peptide presented by HLA-A2 is recognized by cytolytic T lymphocytes. *Eur. J Immunol.*, 29(10):3329–3337, 1999.
- [143] C. D. Duve and R. Wattiaux. Functions of lysosomes. *Annu. Rev. Physiol*, 28:435–492, 1966.
- [144] G. L. Duveneck, M. Pawlak, D. Neuschäfer, E. Bär, W. Budach, U. Pielers, and M. Ehrat. Novel bioaffinity sensors for trace analysis based on luminescence excitation by planar waveguides. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 38(1-3):88–95, 1997.
- [145] R. e Sousa and R. N. Germain. Major histocompatibility complex class I presentation of peptides derived from soluble exogenous antigen by a subset of cells engaged in phagocytosis. *J. Exp. Med.*, 182(3):841–851, 1995.
- [146] J. D. Eaton, M. J. Perry, S. Nicholson, M. Guckian, N. Russell, M. Whelan, and R. S. Kirby. Allogeneic whole-cell vaccine: a phase I/II study in men with hormone-refractory prostate cancer. *BJU. Int.*, 89(1):19–26, 2002.
- [147] H. Echchakir, F. Mami-Chouaib, I. Vergnon, J. F. Baurain, V. Karanikas, S. Chouaib, and P. G. Coulie. A point mutation in the alpha-actinin-4 gene generates an antigenic peptide recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human lung carcinoma. *Cancer Res.*, 61(10):4078–4083, 2001.
- [148] P. Edman and G. Begg. A protein sequenator. *Eur. J. Biochem.*, 1(1):80–91, 1967.
- [149] B. Ehring, T. H. Meyer, C. Eckerskorn, F. Lottspeich, and R. Tampe. 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(1-2):404–415, 1996.
- [150] el C. Ibrahim, Y. Allory, F. Commo, B. Gattegno, P. Callard, and P. Paul. Altered pattern of major histocompatibility complex expression in renal carcinoma: tumor-specific expression of the nonclassical human leukocyte antigen-G molecule is restricted to clear cell carcinoma while up-regulation of other major histocompatibility complex antigens is primarily distributed in all subtypes of renal carcinoma. *Am. J. Pathol.*, 162(2):501–508, 2003.
- [151] D. M. Elaraj, D. E. White, S. M. Steinberg, L. Haworth, S. A. Rosenberg, and J. C. Yang. A pilot study of antiangiogenic therapy with bevacizumab and thalidomide in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J. Immunother. (1997. )*, 27(4): 259–264, 2004.
- [152] M. Enari, K. Ohmori, I. Kitabayashi, and Y. Taya. Requirement of clathrin heavy chain for p53-mediated transcription. *Genes Dev.*, 20(9):1087–1099, 2006.



- [153] C. Erfurt, Z. Sun, I. Haendle, B. Schuler-Thurner, C. Heirman, K. Thielemans, B. P. van der, G. Schuler, and E. S. Schultz. Tumor-reactive CD4+ T cell responses to the melanoma-associated chondroitin sulphate proteoglycan in melanoma patients and healthy individuals in the absence of autoimmunity. *J Immunol.*, 178(12):7703–7709, 2007.
- [154] B. Escudier, T. Eisen, W. M. Stadler, C. Szczylik, S. Oudard, M. Siebels, S. Negrier, C. Chevreau, E. Solska, A. A. Desai, F. Rolland, T. Demkow, T. E. Hutson, M. Gore, S. Freeman, B. Schwartz, M. Shan, R. Simantov, and R. M. Bukowski. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.*, 356(2):125–134, 2007.
- [155] B. J. V. D. Eynde, B. Gaugler, M. Probst-Kepper, L. Michaux, O. Devuyt, F. Lorge, P. Weynants, and T. Boon. A new antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human kidney tumor results from reverse strand transcription. *J. Exp. Med.*, 190(12):1793–1800, 1999.
- [156] K. Falk, O. Rotzschke, S. Stevanović, G. Jung, and H. G. Rammensee. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*, 351(6324):290–296, 1991.
- [157] M. Fengsrud, M. L. Sneve, A. Øverbye, and P. O. Seglen. *Autophagy*, volume chapter 2 of *Structural aspects of mammalian autophagy*. Landes Bioscience, Georgetown, TX, 2004.
- [158] R. G. Fenton, R. G. Steis, K. Madara, A. H. Zea, A. C. Ochoa, J. E. Janik, J. W. Smith, B. L. Gause, W. H. Sharfman, W. J. Urba, M. G. Hanna, R. L. DeJager, M. X. Coyne, R. D. Crouch, P. Gray, J. Beveridge, S. P. Creekmore, J. Holmlund, B. D. Curti, M. Sznol, and D. L. Longo. A phase I randomized study of subcutaneous adjuvant IL-2 in combination with an autologous tumor vaccine in patients with advanced renal cell carcinoma. *J. Immunother. Emphasis. Tumor Immunol.*, 19(5):364–374, 1996.
- [159] G. Ferrari, A. M. Knight, C. Watts, and J. Pieters. Distinct intracellular compartments involved in invariant chain degradation and antigenic peptide loading of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules. *J. Cell Biol.*, 139(6):1433–1446, 1997.
- [160] V. Ficarra, R. Righetti, S. Piloni, A. D’amico, N. Maffei, G. Novella, L. Zanolla, G. Malossini, and G. Mobilio. Prognostic factors in patients with renal cell carcinoma: retrospective analysis of 675 cases. *Eur. Urol.*, 41(2):190–198, 2002.
- [161] R. A. Figlin. Renal cell carcinoma: management of advanced disease. *J. Urol.*, 161(2):381–386, 1999.
- [162] R. A. Figlin, W. C. Pierce, R. Kaboo, C. L. Tso, N. Moldawer, B. Gitlitz, J. deKernion, and A. Belldegrun. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with nephrectomy, interleukin-2 and cytokine-primed or CD8(+) selected tumor infiltrating lymphocytes from primary tumor. *J. Urol.*, 158(3 Pt 1):740–745, 1997.
- [163] R. A. Figlin, J. A. Thompson, R. M. Bukowski, N. J. Vogelzang, A. C. Novick, P. Lange, G. D. Steinberg, and A. S. Belldegrun. Multicenter, randomized, phase III trial of CD8(+) tumor-infiltrating lymphocytes in combination with recombinant interleukin-2 in metastatic renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, 17(8):2521–2529, 1999.
- [164] R. Finney. The value of radiotherapy in the treatment of hypernephroma—a clinical trial. *Br. J. Urol.*, 45(3):258–269, 1973.
- [165] G. H. Fisher, F. J. Rosenberg, S. E. Straus, J. K. Dale, L. A. Middleton, A. Y. Lin, W. Strober, M. J. Lenardo, and J. M. Puck. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell*, 81(6):935–946, 1995.
- [166] R. I. Fisher, S. A. Rosenberg, and G. Fyfe. Long-term survival update for high-dose recombinant interleukin-2 in patients with renal cell carcinoma. *Cancer J. Sci. Am.*, 6 Suppl 1:S55–S57, 2000.
- [167] B. Fisk, T. L. Blevins, J. T. Wharton, and C. G. Ioannides. Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines. *J. Exp. Med.*, 181(6):2109–2117, 1995.
- [168] T. Flad, B. Spengler, H. Kalbacher, P. Brossart, D. Baier, R. Kaufmann, P. Bold, S. Metzger, M. Bluggel, H. E. Meyer, B. Kurz, and C. A. Müller. 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(24):5803–5811, 1998.
- [169] S. Fleming and M. O’Donnell. Surgical pathology of renal epithelial neoplasms: recent advances and current status. *Histopathology*, 36(3):195–202, 2000.
- [170] A. Fotin, Y. Cheng, P. Sliz, N. Grigorieff, S. C. Harrison, T. Kirchhausen, and T. Walz. Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy. *Nature*, 432(7017):573–579, 2004.
- [171] R. H. Friedel, G. Kerjan, H. Rayburn, U. Schuller, C. Sotelo, M. Tessier-Lavigne, and A. Chedotal. Plexin-B2 controls the development of cerebellar granule cells. *J Neurosci.*, 27(14):3921–3932, 2007.

- [172] M. Fritsch, S. A. Rosenberg, and P. H. Duray. Immunohistologic responses within dermal metastatic melanoma lesions of patients treated with a synthetic peptide vaccine. *J. Immunother.* (1997. ), 23(5):557–569, 2000.
- [173] G. Fuertes, J. J. M. D. Llano, A. Villarroya, A. J. Rivett, and E. Knecht. Changes in the proteolytic activities of proteasomes and lysosomes in human fibroblasts produced by serum withdrawal, amino-acid deprivation and confluent conditions. *Biochem. J.*, 375(Pt 1):75–86, 2003.
- [174] F. Fujiki, Y. Oka, A. Tsuboi, M. Kawakami, M. Kawakatsu, H. Nakajima, O. A. Elisseeva, Y. Harada, K. Ito, Z. Li, N. Tatsumi, N. Sakaguchi, T. Fujioka, T. Masuda, M. Yasukawa, K. Udaka, I. Kawase, Y. Oji, and H. Sugiyama. Identification and characterization of a WT1 (Wilms Tumor Gene) protein-derived HLA-DRB1\*0405-restricted 16-mer helper peptide that promotes the induction and activation of WT1-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Immunother.* (1997. ), 30(3):282–293, 2007.
- [175] J. Fujita, S. K. Srivastava, M. H. Kraus, J. S. Rhim, S. R. Tronick, and S. A. Aaronson. Frequency of molecular alterations affecting ras protooncogenes in human urinary tract tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 82(11):3849–3853, 1985.
- [176] K. Fujita, K. Denda, M. Yamamoto, T. Matsumoto, M. Fujime, and T. Irimura. Expression of MUC1 mucins inversely correlated with post-surgical survival of renal cell carcinoma patients. *Br. J Cancer*, 80(1-2):301–308, 1999.
- [177] G. Furstenberger, E. Senn, R. Morant, B. Bolliger, and H. J. Senn. Serum levels of IGF-1 and IGFBP-3 during adjuvant chemotherapy for primary breast cancer. *Breast*, 15(1):64–68, 2006.
- [178] M. Furuya, M. Nishiyama, S. Kimura, T. Suyama, Y. Naya, H. Ito, T. Nikaido, and H. Ishikura. Expression of regulator of G protein signalling protein 5 (RGS5) in the tumour vasculature of human renal cell carcinoma. *J Pathol.*, 203(1):551–558, 2004.
- [179] J. G. Dennis, B. T. Sherman, D. A. Hosack, J. Yang, W. Gao, H. C. Lane, and R. A. Lempicki. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol.*, 4(5):3, 2003.
- [180] J. Gao and G. Serrero. Adipose differentiation related protein (ADRP) expressed in transfected COS-7 cells selectively stimulates long chain fatty acid uptake. *J Biol. Chem.*, 274(24):16825–16830, 1999.
- [181] J. Gao, H. Ye, and G. Serrero. Stimulation of adipose differentiation related protein (ADRP) expression in adipocyte precursors by long-chain fatty acids. *J Cell Physiol*, 182(2):297–302, 2000.
- [182] F. Garrido, T. Cabrera, A. Concha, S. Glew, F. Ruiz-Cabello, and P. L. Stern. Natural history of HLA expression during tumour development. *Immunol. Today*, 14(10):491–499, 1993.
- [183] A. P. Gasch, P. T. Spellman, C. M. Kao, O. Carmel-Harel, M. B. Eisen, G. Storz, D. Botstein, and P. O. Brown. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell*, 11(12):4241–4257, 2000.
- [184] G. Gastl, T. Ebert, C. L. Finstad, J. Sheinfeld, A. Gomahr, W. Aulitzky, and N. H. Bander. Major histocompatibility complex class I and class II expression in renal cell carcinoma and modulation by interferon gamma. *J Urol.*, 155(1):361–367, 1996.
- [185] C. Gaudin, F. Kremer, E. Angevin, V. Scott, and F. Triebel. A hsp70-2 mutation recognized by CTL on a human renal cell carcinoma. *J. Immunol.*, 162(3):1730–1738, 1999.
- [186] B. Gaugler, N. Brouwenstijn, V. Vantomme, J. P. Szikora, C. W. V. der Spek, J. J. Patard, T. Boon, P. Schrier, and B. J. V. D. Eynde. A new gene coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human renal carcinoma. *Immunogenetics*, 44(5):323–330, 1996.
- [187] S. J. Gendler, C. A. Lancaster, J. Taylor-Papadimitriou, T. Duhig, N. Peat, J. Burchell, L. Pemberton, E. N. Lalani, and D. Wilson. Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin. *J Biol. Chem.*, 265(25):15286–15293, 1990.
- [188] H. J. Geuze. The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning. *Immunol. Today*, 19(6):282–287, 1998.
- [189] A. Girling, J. Bartkova, J. Burchell, S. Gendler, C. Gillett, and J. Taylor-Papadimitriou. A core protein epitope of the polymorphic epithelial mucin detected by the monoclonal antibody SM-3 is selectively exposed in a range of primary carcinomas. *Int J Cancer*, 43(6):1072–1076, 1989.
- [190] B. J. Gitlitz, A. S. Beldegrun, A. Zisman, D. H. Chao, A. J. Pantuck, A. Hinkel, P. Mulders, N. Moldawer, C. L. Tso, and R. A. Figlin. A pilot trial of tumor lysate-loaded dendritic cells for the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *J. Immunother.* (1997. ), 26(5):412–419, 2003.

- [191] M. K. Gjertsen, T. Buanes, A. R. Rosseland, A. Bakka, I. Gladhaug, O. Soreide, J. A. Eriksen, M. Moller, I. Baksaas, R. A. Lothe, I. Saeterdal, and G. Gaudernack. 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(3):441–450, 2001.
- [192] S. Gnjatic, D. Atanackovic, E. Jager, M. Matsuo, A. Selvakumar, N. K. Altorki, R. G. Maki, B. Dupont, G. Ritter, Y. T. Chen, A. Knuth, and L. J. Old. Survey of naturally occurring CD4+ T cell responses against NY-ESO-1 in cancer patients: correlation with antibody responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100(15):8862–8867, 2003.
- [193] J. Gong, D. Chen, M. Kashiwaba, and D. Kufe. Induction of antitumor activity by immunization with fusions of dendritic and carcinoma cells. *Nat. Med.*, 3(5):558–561, 1997.
- [194] P. B. Gordon, A. L. Kovacs, and P. O. Seglen. Temperature dependence of protein degradation, autophagic sequestration and mitochondrial sugar uptake in rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 929(2):128–133, 1987.
- [195] P. B. Gordon, I. Holen, M. Fosse, J. S. Rotnes, and P. O. Seglen. Dependence of hepatocytic autophagy on intracellularly sequestered calcium. *J. Biol. Chem.*, 268(35):26107–26112, 1993.
- [196] C. Gouttefangeas, A. Stenzl, S. Stevanović, and H. G. Rammensee. Immunotherapy of renal cell carcinoma. *Cancer Immunol. Immunother.*, 56(1):117–128, 2007.
- [197] K. Grabmaier, J. L. Vissers, M. C. D. Weijert, J. C. Oosterwijk-Wakka, A. V. Bokhoven, R. H. Brakenhoff, E. Noessner, P. A. Mulders, G. Merckx, C. G. Figdor, G. J. Adema, and E. Oosterwijk. Molecular cloning and immunogenicity of renal cell carcinoma-associated antigen G250. *Int. J. Cancer*, 85(6):865–870, 2000.
- [198] R. J. Grand, A. E. Milner, T. Mustoe, G. D. Johnson, D. Owen, M. L. Grant, and C. D. Gregory. A novel protein expressed in mammalian cells undergoing apoptosis. *Exp. Cell Res.*, 218(2):439–451, 1995.
- [199] Greene. *AJCC Cancer Staging Handbook*. Springer, New York, 6 edition, 2002.
- [200] A. Grimberg and P. Cohen. Role of insulin-like growth factors and their binding proteins in growth control and carcinogenesis. *J Cell Physiol*, 183(1):1–9, 2000.
- [201] M. Groettrup, A. Soza, U. Kuckelkorn, and P. M. Kloetzel. Peptide antigen production by the proteasome: complexity provides efficiency. *Immunol. Today*, 17(9):429–435, 1996.
- [202] F. Guan, G. Villegas, J. Teichman, P. Mundel, and A. Tufro. Autocrine class 3 semaphorin system regulates slit diaphragm proteins and podocyte survival. *Kidney Int*, 69(9):1564–1569, 2006.
- [203] N. Guerra, M. Guillard, E. Angevin, H. Echchakir, B. Escudier, A. Moretta, S. Chouaib, and A. Caignard. Killer inhibitory receptor (CD158b) modulates the lytic activity of tumor-specific T lymphocytes infiltrating renal cell carcinomas. *Blood*, 95(9):2883–2889, 2000.
- [204] Y. Guo, H. Niya, T. Azuma, N. Uchida, Y. Yakushijin, I. Sakai, T. Hato, M. Takahashi, S. Senju, Y. Nishimura, and M. Yasukawa. Direct recognition and lysis of leukemia cells by WT1-specific CD4+ T lymphocytes in an HLA class II-restricted manner. *Blood*, 106(4):1415–1418, 2005.
- [205] A. O. Gure, N. K. Altorki, E. Stockert, M. J. Scanlan, L. J. Old, and Y. T. Chen. Human lung cancer antigens recognized by autologous antibodies: definition of a novel cDNA derived from the tumor suppressor gene locus on chromosome 3p21.3. *Cancer Res.*, 58(5):1034–1041, 1998.
- [206] M. G. Gutierrez, S. S. Master, S. B. Singh, G. A. Taylor, M. I. Colombo, and V. Deretic. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell*, 119(6):753–766, 2004.
- [207] S. P. Gygi, Y. Rochon, B. R. Franza, and R. Aebersold. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol. Cell Biol.*, 19(3):1720–1730, 1999.
- [208] I. H. J. Zeh and M. T. Lotze. Addicted to death: invasive cancer and the immune response to unscheduled cell death. *J. Immunother. (1997.)*, 28(1):1–9, 2005.
- [209] N. Habal, R. K. Gupta, A. J. Bilchik, R. Yee, Z. Leopoldo, W. Ye, R. M. Elashoff, and D. L. Morton. CancerVax, an allogeneic tumor cell vaccine, induces specific humoral and cellular immune responses in advanced colon cancer. *Ann. Surg. Oncol.*, 8(5):389–401, 2001.
- [210] J. D. Hainsworth, J. A. Sosman, D. R. Spigel, D. L. Edwards, C. Baughman, and A. Greco. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with a combination of bevacizumab and erlotinib. *J. Clin. Oncol.*, 23(31):7889–7896, 2005.

- [211] F. L. Hall, R. T. Williams, L. Wu, F. Wu, D. A. Carbonaro-Hall, J. W. Harper, and D. Warburton. Two potentially oncogenic cyclins, cyclin A and cyclin D1, share common properties of subunit configuration, tyrosine phosphorylation and physical association with the Rb protein. *Oncogene*, 8(5):1377–1384, 1993.
- [212] I. Haller, U. A. Mirza, and B. T. Chait. Collision Induced Decomposition of Peptides. Choice of Collision Parameters. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 7(7):677–681, 1996.
- [213] K. Hanada, J. W. Yewdell, and J. C. Yang. Immune recognition of a human renal cancer antigen through post-translational protein splicing. *Nature*, 427(6971):252–256, 2004.
- [214] D. Hanahan and R. A. Weinberg. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1):57–70, 2000.
- [215] J. T. Hartmann and C. Bokemeyer. Chemotherapy for renal cell carcinoma. *Anticancer Res.*, 19(2C):1541–1543, 1999.
- [216] D. Haussinger, F. Schliess, F. Dombrowski, and D. S. Vom. Involvement of p38MAPK in the regulation of proteolysis by liver cell hydration. *Gastroenterology*, 116(4):921–935, 1999.
- [217] H. He, Y. Dang, F. Dai, Z. Guo, J. Wu, X. She, Y. Pei, Y. Chen, W. Ling, C. Wu, S. Zhao, J. O. Liu, and L. Yu. Post-translational modifications of three members of the human MAP1LC3 family and detection of a novel type of modification for MAP1LC3B. *J. Biol. Chem.*, 278(31):29278–29287, 2003.
- [218] W. R. Heath and F. R. Carbone. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, 19:47–64, 2001.
- [219] Y. Hedberg, B. Ljungberg, G. Roos, and G. Landberg. Expression of cyclin D1, D3, E, and p27 in human renal cell carcinoma analysed by tissue microarray. *Br. J Cancer*, 88(9):1417–1423, 2003.
- [220] H. W. Heid, M. Scholzer, and T. W. Keenan. Adipocyte differentiation-related protein is secreted into milk as a constituent of milk lipid globule membrane. *Biochem. J.*, 320 ( Pt 3):1025–1030, 1996.
- [221] H. W. Heid, R. Moll, I. Schwetlick, H. R. Rackwitz, and T. W. Keenan. Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. *Cell Tissue Res.*, 294(2):309–321, 1998.
- [222] A. Heiser, M. A. Maurice, D. R. Yancey, D. M. Coleman, P. Dahm, and J. Vieweg. Human dendritic cells transfected with renal tumor RNA stimulate polyclonal T-cell responses against antigens expressed by primary and metastatic tumors. *Cancer Res.*, 61(8):3388–3393, 2001.
- [223] A. Heiser, D. Coleman, J. Dannull, D. Yancey, M. A. Maurice, C. D. Lallas, P. Dahm, D. Niedzwiecki, E. Gilboa, and J. Vieweg. Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. *J. Clin. Invest.*, 109(3):409–417, 2002.
- [224] K. B. Hendil, A. M. Lauridsen, and P. O. Seglen. Both endocytic and endogenous protein degradation in fibroblasts is stimulated by serum/amino acid deprivation and inhibited by 3-methyladenine. *Biochem. J.*, 272(3):577–581, 1990.
- [225] J. Hernandez and I. M. Thompson. Prostate-specific antigen: a review of the validation of the most commonly used cancer biomarker. *Cancer*, 101(5):894–904, 2004.
- [226] D. J. Hicklin, Z. Wang, F. Arienti, L. Rivoltini, G. Parmiani, and S. Ferrone. beta2-Microglobulin mutations, HLA class I antigen loss, and tumor progression in melanoma. *J Clin. Invest.*, 101(12):2720–2729, 1998.
- [227] N. Hillen. *Nachweis einer ausgeprägten Individualität von HLA-Ligandomen durch massenspektrometrische Analysen*. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie, 2008.
- [228] E. M. Hiltbold, P. Ciborowski, and O. J. Finn. Naturally processed class II epitope from the tumor antigen MUC1 primes human CD4+ T cells. *Cancer Res.*, 58(22):5066–5070, 1998.
- [229] S. Hino, C. Tanji, K. I. Nakayama, and A. Kikuchi. Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase stabilizes beta-catenin through inhibition of its ubiquitination. *Mol. Cell Biol.*, 25(20):9063–9072, 2005.
- [230] M. S. Hipp, B. Kalveram, S. Raasi, M. Groettrup, and G. Schmidtke. FAT10, a ubiquitin-independent signal for proteasomal degradation. *Mol. Cell Biol.*, 25(9):3483–3491, 2005.
- [231] Y. Hirohashi, T. Torigoe, A. Maeda, Y. Nabeta, K. Kamiguchi, T. Sato, J. Yoda, H. Ikeda, K. Hirata, N. Yamanaka, and N. Sato. An HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope of a tumor-associated protein, survivin. *Clin. Cancer Res.*, 8(6):1731–1739, 2002.

- [232] K. T. Hogan, D. P. Eisinger, I. S. B. Cupp, K. J. Lekstrom, D. D. Deacon, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, V. H. Engelhard, J. C. L. Slingluff, and M. M. Ross. The peptide recognized by HLA-A68.2-restricted, squamous cell carcinoma of the lung-specific cytotoxic T lymphocytes is derived from a mutated elongation factor 2 gene. *Cancer Res.*, 58(22):5144–5150, 1998.
- [233] I. Holen, P. B. Gordon, and P. O. Seglen. Inhibition of hepatocytic autophagy by okadaic acid and other protein phosphatase inhibitors. *Eur. J. Biochem.*, 215(1):113–122, 1993.
- [234] T. M. Holm, A. Braun, B. L. Trigatti, C. Brugnara, M. Sakamoto, M. Krieger, and N. C. Andrews. Failure of red blood cell maturation in mice with defects in the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Blood*, 99(5):1817–1824, 2002.
- [235] L. Holtl, C. Zelle-Rieser, H. Gander, C. Papesh, R. Ramoner, G. Bartsch, H. Rogatsch, A. L. Barsoum, J. J. H. Coggin, and M. Thurnher. Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with tumor lysate-pulsed autologous dendritic cells. *Clin. Cancer Res.*, 8(11):3369–3376, 2002.
- [236] S. Hori, T. Nomura, and S. Sakaguchi. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 299(5609):1057–1061, 2003.
- [237] A. Horiguchi, M. Oya, K. Marumo, and M. Murai. STAT3, but not ERKs, mediates the IL-6-induced proliferation of renal cancer cells, ACHN and 769P. *Kidney Int*, 61(3):926–938, 2002.
- [238] Y. Horiguchi, I. Nukaya, K. Okazawa, I. Kawashima, J. Fikes, A. Sette, M. Tachibana, K. Takesako, and M. Murai. Screening of HLA-A24-restricted epitope peptides from prostate-specific membrane antigen that induce specific antitumor cytotoxic T lymphocytes. *Clin. Cancer Res.*, 8(12):3885–3892, 2002.
- [239] V. Hospital, V. Chesneau, A. Balogh, C. Joulie, N. G. Seidah, P. Cohen, and A. Prat. N-arginine dibasic convertase (nardilysin) isoforms are soluble dibasic-specific metalloendopeptidases that localize in the cytoplasm and at the cell surface. *Biochem. J*, 349(Pt 2):587–597, 2000.
- [240] T. H. Huang, K. R. Chintalacharuvu, and S. L. Morrison. Targeting IFN-alpha to B Cell Lymphoma by a Tumor-Specific Antibody Elicits Potent Antitumor Activities. *J. Immunol.*, 179(10):6881–6888, 2007.
- [241] S. R. Hull, A. Bright, K. L. Carraway, M. Abe, D. F. Hayes, and D. W. Kufe. Oligosaccharide differences in the DF3 sialomucin antigen from normal human milk and the BT-20 human breast carcinoma cell line. *Cancer Commun.*, 1(4):261–267, 1989.
- [242] D. F. Hunt, I. J. R. Yates, J. Shabanowitz, S. Winston, and C. R. Hauer. Protein sequencing by tandem mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 83(17):6233–6237, 1986.
- [243] H. Huynh, P. K. Chow, L. L. Ooi, and K. C. Soo. A possible role for insulin-like growth factor-binding protein-3 autocrine/paracrine loops in controlling hepatocellular carcinoma cell proliferation. *Cell Growth Differ.*, 13(3):115–122, 2002.
- [244] Y. Ichimura, T. Kirisako, T. Takao, Y. Satomi, Y. Shimonishi, N. Ishihara, N. Mizushima, I. Tanida, E. Kominami, M. Ohsumi, T. Noda, and Y. Ohsumi. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*, 408(6811):488–492, 2000.
- [245] H. Ikeda, B. Lethe, F. Lehmann, N. van Baren, J. F. Baurain, C. de Smet, H. Chambost, M. Vitale, A. Moretta, T. Boon, and P. G. Coulie. Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity.*, 6(2):199–208, 1997.
- [246] C. G. Ioannides, B. Fisk, K. R. Jerome, T. Irimura, J. T. Wharton, and O. J. Finn. Cytotoxic T cells from ovarian malignant tumors can recognize polymorphic epithelial mucin core peptides. *J Immunol.*, 151(7):3693–3703, 1993.
- [247] J. V. Iribarne and B. A. Thompson. . *J. Chem. Phys.*, 64:2287, 1976.
- [248] K. Isahara, Y. Ohsawa, S. Kanamori, M. Shibata, S. Waguri, N. Sato, T. Gotow, T. Watanabe, T. Momoi, K. Urase, E. Kominami, and Y. Uchiyama. Regulation of a novel pathway for cell death by lysosomal aspartic and cysteine proteinases. *Neuroscience*, 91(1):233–249, 1999.
- [249] D. Ito, C. Visus, T. K. Hoffmann, V. Balz, H. Bier, E. Appella, T. L. Whiteside, R. L. Ferris, and A. B. DeLeo. Immunological characterization of missense mutations occurring within cytotoxic T cell-defined p53 epitopes in HLA-A\*0201+ squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Cancer*, 120(12):2618–2624, 2007.
- [250] S. Ito, Y. Kawano, H. Katakura, K. Takenaka, M. Adachi, M. Sasaki, K. Shimizu, K. Ikenaka, H. Wada, and F. Tanaka. Expression of MAGE-D4, a novel MAGE family antigen, is correlated with tumor-cell proliferation of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 51(1):79–88, 2006.

- [251] E. Jager, Y. T. Chen, J. W. Drijfhout, J. Karbach, M. Ringhoffer, D. Jager, M. Arand, H. Wada, Y. Noguchi, E. Stockert, L. J. Old, and A. Knuth. 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(2):265–270, 1998.
- [252] E. Jager, Y. Nagata, S. Gnjatic, H. Wada, E. Stockert, J. Karbach, P. R. Dunbar, S. Y. Lee, A. Jungbluth, D. Jager, M. Arand, G. Ritter, V. Cerundolo, B. Dupont, Y. T. Chen, L. J. Old, and A. Knuth. Monitoring CD8 T cell responses to NY-ESO-1: correlation of humoral and cellular immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97(9):4760–4765, 2000.
- [253] T. R. Jeffries, S. K. Dove, R. H. Michell, and P. J. Parker. PtdIns-specific MPR pathway association of a novel WD40 repeat protein, WIPI49. *Mol. Biol. Cell*, 15(6):2652–2663, 2004.
- [254] A. Jemal, R. Siegel, E. Ward, T. Murray, J. Xu, and M. J. Thun. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J. Clin.*, 57(1):43–66, 2007.
- [255] K. R. Jerome, N. Domenech, and O. J. Finn. Tumor-specific cytotoxic T cell clones from patients with breast and pancreatic adenocarcinoma recognize EBV-immortalized B cells transfected with polymorphic epithelial mucin complementary DNA. *J Immunol.*, 151(3):1654–1662, 1993.
- [256] H. P. Jiang and G. Serrero. Isolation and characterization of a full-length cDNA coding for an adipose differentiation-related protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89(17):7856–7860, 1992.
- [257] W. Jiang, Y. J. Zhang, S. M. Kahn, M. C. Hollstein, R. M. Santella, S. H. Lu, C. C. Harris, R. Montesano, and I. B. Weinstein. Altered expression of the cyclin D1 and retinoblastoma genes in human esophageal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90(19):9026–9030, 1993.
- [258] S. Jin, R. S. DiPaola, R. Mathew, and E. White. Metabolic catastrophe as a means to cancer cell death. *J. Cell Sci.*, 120(Pt 3):379–383, 2007.
- [259] D. Jocham, A. Richter, L. Hoffmann, K. Iwig, D. Fahlenkamp, G. Zakrzewski, E. Schmitt, T. Dannenberg, W. Lehmacher, J. von Wietersheim, and C. Doehn. Adjuvant autologous renal tumour cell vaccine and risk of tumour progression in patients with renal-cell carcinoma after radical nephrectomy: phase III, randomised controlled trial. *Lancet*, 363(9409):594–599, 2004.
- [260] M. H. Jones, N. Hamana, J. Nezu, and M. Shimane. A novel family of bromodomain genes. *Genomics*, 63(1):40–45, 2000.
- [261] H. Juusela, K. Malmio, O. Alfthan, and K. J. Oravisto. Preoperative irradiation in the treatment of renal adenocarcinoma. *Scand. J. Urol. Nephrol.*, 11(3):277–281, 1977.
- [262] Y. Kabeya, N. Mizushima, T. Ueno, A. Yamamoto, T. Kirisako, T. Noda, E. Kominami, Y. Ohsumi, and T. Yoshimori. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *EMBO J.*, 19(21):5720–5728, 2000.
- [263] Y. Kabeya, N. Mizushima, A. Yamamoto, S. Oshitani-Okamoto, Y. Ohsumi, and T. Yoshimori. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J. Cell Sci.*, 117(Pt 13):2805–2812, 2004.
- [264] S. Kageyama, T. J. Tsomides, Y. Sykulev, and H. N. Eisen. Variations in the number of peptide-MHC class I complexes required to activate cytotoxic T cell responses. *J Immunol.*, 154(2):567–576, 1995.
- [265] U. S. Kammula, K. H. Lee, A. I. Riker, E. Wang, G. A. Ohnmacht, S. A. Rosenberg, and F. M. Marincola. Functional analysis of antigen-specific T lymphocytes by serial measurement of gene expression in peripheral blood mononuclear cells and tumor specimens. *J. Immunol.*, 163(12):6867–6875, 1999.
- [266] W. Kamp, M. B. Berk, C. J. Visser, and H. S. Nottet. Mechanisms of HIV-1 to escape from the host immune surveillance. *Eur. J Clin. Invest*, 30(8):740–746, 2000.
- [267] V. Karantza-Wadsworth, S. Patel, O. Kravchuk, G. Chen, R. Mathew, S. Jin, and E. White. Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes Dev.*, 21(13):1621–1635, 2007.
- [268] Y. Kawakami and S. A. Rosenberg. T-cell recognition of self peptides as tumor rejection antigens. *Immunol. Res.*, 15(3):179–190, 1996.
- [269] Y. Kawakami, P. F. Robbins, and S. A. Rosenberg. Human melanoma antigens recognized by T lymphocytes. *Keio J. Med.*, 45(2):100–108, 1996.
- [270] P. Kebarle. A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 35(7):804–817, 2000.

- [271] J. H. Kessler, N. J. Beekman, S. A. Bres-Vloemans, P. Verdijk, P. A. van Veelen, A. M. Kloosterman-Joosten, D. C. Vissers, G. J. ten Bosch, M. G. Kester, A. Sijts, D. J. Wouter, F. Ossendorp, R. Offringa, and C. J. Melief. 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(1):73–88, 2001.
- [272] R. Khattri, T. Cox, S. A. Yasayko, and F. Ramsdell. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat. Immunol.*, 4(4):337–342, 2003.
- [273] H. T. Khong and S. A. Rosenberg. The Waardenburg syndrome type 4 gene, SOX10, is a novel tumor-associated antigen identified in a patient with a dramatic response to immunotherapy. *Cancer Res.*, 62(11):3020–3023, 2002.
- [274] M. H. Khouja, M. Baekelandt, J. M. Nesland, and R. Holm. The clinical importance of Ki-67, p16, p14, and p57 expression in patients with advanced ovarian carcinoma. *Int J Gynecol. Pathol.*, 26(4):418–425, 2007.
- [275] A. Kihara, Y. Kabeya, Y. Ohsumi, and T. Yoshimori. Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep.*, 2(4):330–335, 2001.
- [276] H. L. Kim, D. Seligson, X. Liu, N. Janzen, M. H. Bui, H. Yu, T. Shi, A. S. Belldegrun, S. Horvath, and R. A. Figlin. Using tumor markers to predict the survival of patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Urol.*, 173(5):1496–1501, 2005.
- [277] J. Kim and D. J. Klionsky. Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. *Annu. Rev. Biochem.*, 69:303–342, 2000.
- [278] J. J. Kim, J. S. Yang, K. Dang, K. H. Manson, and D. B. Weiner. Engineering enhancement of immune responses to DNA-based vaccines in a prostate cancer model in rhesus macaques through the use of cytokine gene adjuvants. *Clin. Cancer Res.*, 7(3 Suppl):882s–889s, 2001.
- [279] W. Y. Kim and W. G. Kaelin. Role of VHL gene mutation in human cancer. *J Clin. Oncol.*, 22(24):4991–5004, 2004.
- [280] M. Kinter and N. E. Sherman. *Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry*. Wiley, 2000.
- [281] T. Kirisako, M. Baba, N. Ishihara, K. Miyazawa, M. Ohsumi, T. Yoshimori, T. Noda, and Y. Ohsumi. Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *J. Cell Biol.*, 147(2):435–446, 1999.
- [282] A. F. Kirkin, K. N. Dzhandzhugazyan, and J. Zeuthen. Cancer/testis antigens: structural and immunobiological properties. *Cancer Invest*, 20(2):222–236, 2002.
- [283] A. F. Kisselev, T. N. Akopian, and A. L. Goldberg. Range of sizes of peptide products generated during degradation of different proteins by archaeal proteasomes. *J. Biol. Chem.*, 273(4):1982–1989, 1998.
- [284] H. Kitamura, I. Honma, T. Torigoe, H. Asanuma, N. Sato, and T. Tsukamoto. Down-regulation of HLA class I antigen is an independent prognostic factor for clear cell renal cell carcinoma. *J Urol.*, 177(4):1269–1272, 2007.
- [285] M. Kjaer, P. L. Frederiksen, and S. A. Engelholm. Postoperative radiotherapy in stage II and III renal adenocarcinoma. A randomized trial by the Copenhagen Renal Cancer Study Group. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 13(5):665–672, 1987.
- [286] E. Klein, S. Becker, E. Svedmyr, M. Jondal, and F. Vanky. Tumor infiltrating lymphocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 276:207–216, 1976.
- [287] D. E. Kleiner and W. G. Stetler-Stevenson. Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 43 Suppl:S42–S51, 1999.
- [288] D. J. Klionsky and S. D. Emr. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*, 290(5497):1717–1721, 2000.
- [289] D. J. Klionsky and Y. Ohsumi. Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 15:1–32, 1999.
- [290] D. J. Klionsky, J. M. Cregg, J. W. A. Dunn, S. D. Emr, Y. Sakai, I. V. Sandoval, A. Sibirny, S. Subramani, M. Thumm, M. Veenhuis, and Y. Ohsumi. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev. Cell*, 5(4):539–545, 2003.
- [291] D. J. Klionsky, A. M. Cuervo, and P. O. Seglen. Methods for monitoring autophagy from yeast to human. *Autophagy.*, 3(3):181–206, 2007.
- [292] H. Kobayashi, M. Wood, Y. Song, E. Appella, and E. Celis. Defining promiscuous MHC class II helper T-cell epitopes for the HER2/neu tumor antigen. *Cancer Res.*, 60(18):5228–5236, 2000.

- [293] T. Kobayashi, C. Lonchay, D. Colau, N. Demotte, T. Boon, and B. P. van der. New MAGE-4 antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on HLA-A1 tumor cells. *Tissue Antigens*, 62(5):426–432, 2003.
- [294] E. P. Koroleva, M. A. Lagarkova, A. A. Mesheryakov, M. J. Scanlan, L. J. Old, S. A. Nedospasov, and D. V. Kuprash. Serological identification of antigens associated with renal cell carcinoma. *Russ. J. Immunol.*, 7(3):229–238, 2002.
- [295] A. L. Kovacs and P. O. Seglen. Inhibition of hepatocytic protein degradation by methylaminopurines and inhibitors of protein synthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 676(2):213–220, 1981.
- [296] A. L. Kovacs, B. Grinde, and P. O. Seglen. Inhibition of autophagic vacuole formation and protein degradation by amino acids in isolated hepatocytes. *Exp. Cell Res.*, 133(2):431–436, 1981.
- [297] A. L. Kovacs, A. Reith, and P. O. Seglen. Accumulation of autophagosomes after inhibition of hepatocytic protein degradation by vinblastine, leupeptin or a lysosomotropic amine. *Exp. Cell Res.*, 137(1):191–201, 1982.
- [298] G. Kovacs, M. Akhtar, B. J. Beckwith, P. Bugert, C. S. Cooper, B. Delahunt, J. N. Eble, S. Fleming, B. Ljungberg, L. J. Medeiros, H. Moch, V. E. Reuter, E. Ritz, G. Roos, D. Schmidt, J. R. Srigley, S. Storkel, B. E. van den, and B. Zbar. The Heidelberg classification of renal cell tumours. *J. Pathol.*, 183(2):131–133, 1997.
- [299] S. Kramer. *Mikroarray-basierende Proteomanalyse zur Detektion tumorspezifischer Markerproteine in Nierenzellkarzinomen*. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 2006.
- [300] S. Kraus, P. D. Abel, C. Nachtmann, H. J. Linsenmann, W. Weidner, G. W. Stamp, K. S. Chaudhary, S. E. Mitchell, F. E. Franke, and el Lalani. MUC1 mucin and trefoil factor 1 protein expression in renal cell carcinoma: correlation with prognosis. *Hum. Pathol.*, 33(1):60–67, 2002.
- [301] K. Kreymborg. *In vitro Stimulation, Expansion und Analyse Nicotinamid N-Methyltransferase-peptidspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen*. Diplomarbeit, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie, 2004.
- [302] T. Krüger. *HLA-Ligandom-, Genexpressions- und T-Zell-Analysen zur Identifizierung tumorassoziierter Peptide des Nierenzellkarzinoms und der Akuten Myeloischen Leukämie*. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie, 2007.
- [303] T. Krüger, O. Schoor, C. Lemmel, B. Krämer, C. Reichle, J. Dengjel, T. Weinschenk, M. Müller, J. Hennenlotter, A. Stenzl, H. G. Rammensee, and S. Stevanović. Lessons to be learned from primary renal cell carcinomas: novel tumor antigens and HLA ligands for immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.*, 54(9):826–836, 2005.
- [304] B. F. Krämer, O. Schoor, T. Krüger, C. Reichle, M. Müller, T. Weinschenk, J. Hennenlotter, A. Stenzl, H. G. Rammensee, and S. Stevanović. MAGED4-expression in renal cell carcinoma and identification of an HLA-A\*25-restricted MHC class I ligand from solid tumor tissue. *Cancer Biol. Ther.*, 4(9):943–948, 2005.
- [305] H. Kropshofer, A. B. Vogt, C. They, E. A. Armandola, B. C. Li, G. Moldenhauer, S. Amigorena, and G. J. Hammerling. A role for HLA-DO as a co-chaperone of HLA-DM in peptide loading of MHC class II molecules. *EMBO J.*, 17(11):2971–2981, 1998.
- [306] N. O. Ku, J. Liao, and M. B. Omary. Apoptosis generates stable fragments of human type I keratins. *J Biol. Chem.*, 272(52):33197–33203, 1997.
- [307] A. Kuma, N. Mizushima, N. Ishihara, and Y. Ohsumi. Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. *J. Biol. Chem.*, 277(21):18619–18625, 2002.
- [308] A. Kuma, M. Matsui, and N. Mizushima. LC3, an autophagosome marker, can be incorporated into protein aggregates independent of autophagy: caution in the interpretation of LC3 localization. *Autophagy.*, 3(4):323–328, 2007.
- [309] J. Kunisawa and N. Shastri. The group II chaperonin TRiC protects proteolytic intermediates from degradation in the MHC class I antigen processing pathway. *Mol. Cell*, 12(3):565–576, 2003.
- [310] J. S. Lam, A. J. Pantuck, A. S. Belldegrun, and R. A. Figlin. G250: a carbonic anhydrase IX monoclonal antibody. *Curr. Oncol. Rep.*, 7(2):109–115, 2005.
- [311] J. S. Lam, A. J. Pantuck, A. S. Belldegrun, and R. A. Figlin. Protein expression profiles in renal cell carcinoma: staging, prognosis, and patient selection for clinical trials. *Clin. Cancer Res.*, 13(2 Pt 2):703s–708s, 2007.
- [312] J. E. Lamborghini. Disappearance of Rohon-Beard neurons from the spinal cord of larval *Xenopus laevis*. *J. Comp Neurol.*, 264(1):47–55, 1987.



- [313] L. A. Lampson and R. Levy. Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line. *J Immunol.*, 125(1):293–299, 1980.
- [314] C. A. Lancaster, N. Peat, T. Duhig, D. Wilson, J. Taylor-Papadimitriou, and S. J. Gendler. Structure and expression of the human polymorphic epithelial mucin gene: an expressed VNTR unit. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 173(3):1019–1029, 1990.
- [315] C. G. Lee, J. Ren, I. S. Cheong, K. H. Ban, L. L. Ooi, T. S. Yong, A. Kan, I. Nuchprayoon, R. Jin, K. H. Lee, M. Choti, and L. A. Lee. Expression of the FAT10 gene is highly upregulated in hepatocellular carcinoma and other gastrointestinal and gynecological cancers. *Oncogene*, 22(17):2592–2603, 2003.
- [316] N. Lee, D. R. Goodlett, A. Ishitani, H. Marquardt, and D. E. Geraghty. HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences. *J Immunol.*, 160(10):4951–4960, 1998.
- [317] P. J. Lehner and P. Cresswell. Processing and delivery of peptides presented by MHC class I molecules. *Curr. Opin. Immunol.*, 8(1):59–67, 1996.
- [318] J. J. Lemasters, A. L. Nieminen, T. Qian, L. C. Trost, S. P. Elmore, Y. Nishimura, R. A. Crowe, W. E. Cascio, C. A. Bradham, D. A. Brenner, and B. Herman. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta*, 1366(1-2):177–196, 1998.
- [319] C. Lemmel. *Qualitative und quantitative Analyse krankheitsassoziierter MHC-Klasse-I-Liganden durch massenspektrometrische Verfahren*. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie, 2004.
- [320] C. Lemmel, S. Weik, U. Eberle, J. Dengjel, T. Kratt, H. D. Becker, H. G. Rammensee, and S. Stevanović. Differential quantitative analysis of MHC ligands by mass spectrometry using stable isotope labeling. *Nat. Biotechnol.*, 22(4):450–454, 2004.
- [321] V. Lennerz, M. Fatho, C. Gentilini, R. A. Frye, A. Lifke, D. Ferel, C. Wolfel, C. Huber, and T. Wolfel. The response of autologous T cells to a human melanoma is dominated by mutated neoantigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102(44):16013–16018, 2005.
- [322] X. Leroy, F. Zerimech, L. Zini, M. C. Copin, M. P. Buisine, B. Gosselin, J. P. Aubert, and N. Porchet. MUC1 expression is correlated with nuclear grade and tumor progression in pT1 renal clear cell carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.*, 118(1):47–51, 2002.
- [323] J. H. Leupold, H. S. Yang, N. H. Colburn, I. Asangani, S. Post, and H. Allgayer. Tumor suppressor Pcdcd4 inhibits invasion/intravasation and regulates urokinase receptor (u-PAR) gene expression via Sp-transcription factors. *Oncogene*, 26(31):4550–4562, 2007.
- [324] A. J. Levine, Z. Feng, T. W. Mak, H. You, and S. Jin. Coordination and communication between the p53 and IGF-1-AKT-TOR signal transduction pathways. *Genes Dev.*, 20(3):267–275, 2006.
- [325] B. Levine and D. J. Klionsky. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev. Cell*, 6(4):463–477, 2004.
- [326] B. Levine and J. Yuan. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J. Clin. Invest.*, 115(10):2679–2688, 2005.
- [327] L. Li, S. H. Chen, C. H. Yu, Y. M. Li, and S. Q. Wang. Identification of Hepatocellular-Carcinoma-Associated Antigens and Autoantibodies by Serological Proteome Analysis Combined with Protein Microarray. *J. Proteome. Res.*, 2007.
- [328] X. H. Liang, S. Jackson, M. Seaman, K. Brown, B. Kempkes, H. Hibshoosh, and B. Levine. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, 402(6762):672–676, 1999.
- [329] J. C. Liao, P. Gregor, J. D. Wolchok, F. Orlandi, D. Craft, C. Leung, A. N. Houghton, and P. J. Bergman. Vaccination with human tyrosinase DNA induces antibody responses in dogs with advanced melanoma. *Cancer Immunol.*, 6:8, 2006.
- [330] S. Y. Liao, O. N. Aurelio, K. Jan, J. Zavada, and E. J. Stanbridge. Identification of the MN/CA9 protein as a reliable diagnostic biomarker of clear cell carcinoma of the kidney. *Cancer Res.*, 57(14):2827–2831, 1997.
- [331] B. H. Lim, B. I. Cho, Y. N. Kim, J. W. Kim, S. T. Park, and C. W. Lee. Overexpression of nicotinamide N-methyltransferase in gastric cancer tissues and its potential post-translational modification. *Exp. Mol. Med.*, 38(5):455–465, 2006.
- [332] K. Y. Lin, D. Lu, C. F. Hung, S. Peng, L. Huang, C. Jie, F. Murillo, J. Rowley, Y. C. Tsai, L. He, D. J. Kim, E. Jaffee, D. Pardoll, and T. C. Wu. Ectopic expression of vascular cell adhesion molecule-1 as a new mechanism for tumor immune evasion. *Cancer Res.*, 67(4):1832–1841, 2007.

- [333] M. Linnebacher, J. Gebert, W. Rudy, S. Woerner, Y. P. Yuan, P. Bork, and D. M. von Knebel. Frameshift peptide-derived T-cell epitopes: a source of novel tumor-specific antigens. *Int J Cancer*, 93(1):6–11, 2001.
- [334] L. S. Liou, T. Shi, Z. H. Duan, P. Sadhukhan, S. D. Der, A. A. Novick, J. Hissong, M. Skacel, A. Almasan, and J. A. DiDonato. Microarray gene expression profiling and analysis in renal cell carcinoma. *BMC. Urol.*, 4:9, 2004.
- [335] L. Liu, T. P. Cash, R. G. Jones, B. Keith, C. B. Thompson, and M. C. Simon. Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth. *Mol. Cell*, 21(4):521–531, 2006.
- [336] X. Liu, J. S. Rubin, and A. R. Kimmel. Rapid, Wnt-induced changes in GSK3beta associations that regulate beta-catenin stabilization are mediated by Galpha proteins. *Curr. Biol.*, 15(22):1989–1997, 2005.
- [337] Y. C. Liu, J. Pan, C. Zhang, W. Fan, M. Collinge, J. R. Bender, and S. M. Weissman. A MHC-encoded ubiquitin-like protein (FAT10) binds noncovalently to the spindle assembly checkpoint protein MAD2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96(8):4313–4318, 1999.
- [338] J. Lokich. Spontaneous regression of metastatic renal cancer. Case report and literature review. *Am. J. Clin. Oncol.*, 20(4):416–418, 1997.
- [339] J. A. Lovisolo, B. Casati, L. Clerici, E. Marafante, A. V. Bono, N. Celato, and M. Salvatore. Gene expression profiling of renal cell carcinoma: a DNA macroarray analysis. *BJU. Int.*, 98(1):205–216, 2006.
- [340] J. Lu, Y. Higashimoto, E. Appella, and E. Celis. Multiepitope Trojan antigen peptide vaccines for the induction of antitumor CTL and Th immune responses. *J Immunol.*, 172(7):4575–4582, 2004.
- [341] J. J. Lum, D. E. Bauer, M. Kong, M. H. Harris, C. Li, T. Lindsten, and C. B. Thompson. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*, 120(2):237–248, 2005.
- [342] R. Lupetti, P. Pisarra, A. Verrecchia, C. Farina, G. Nicolini, A. Anichini, C. Bordignon, M. Sensi, G. Parmiani, and C. Traversari. Translation of a retained intron in tyrosinase-related protein (TRP) 2 mRNA generates a new cytotoxic T lymphocyte (CTL)-defined and shared human melanoma antigen not expressed in normal cells of the melanocytic lineage. *J Exp. Med.*, 188(6):1005–1016, 1998.
- [343] A. B. Lyons and C. R. Parish. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J. Immunol. Methods*, 171(1):131–137, 1994.
- [344] X. T. Ma, S. Wang, Y. J. Ye, R. Y. Du, Z. R. Cui, and M. Somsouk. Constitutive activation of Stat3 signaling pathway in human colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol.*, 10(11):1569–1573, 2004.
- [345] D. R. Madden, D. N. Garboczi, and D. C. Wiley. The antigenic identity of peptide-MHC complexes: a comparison of the conformations of five viral peptides presented by HLA-A2. *Cell*, 75(4):693–708, 1993.
- [346] Y. Maeda, M. Ito, N. Harashima, T. Nakatsura, N. Hida, N. Imai, Y. Sato, S. Shichijo, S. Todo, and K. Itoh. Cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF)-derived peptides can induce HLA-A2-restricted and tumor-specific CTLs in the majority of gastrointestinal cancer patients. *Int J Cancer*, 99(3):409–417, 2002.
- [347] E. Maggi, P. Parronchi, R. Manetti, C. Simonelli, M. P. Piccinni, F. S. Rugiu, M. D. Carli, M. Ricci, and S. Romagnani. Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. *J. Immunol.*, 148(7):2142–2147, 1992.
- [348] D. Maglott, J. Ostell, K. D. Pruitt, and T. Tatusova. Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. *Nucleic Acids Res.*, 33(Database issue):D54–D58, 2005.
- [349] A. E. Majeski and J. F. Dice. Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 36(12):2435–2444, 2004.
- [350] M. Makita, T. Azuma, H. Hamaguchi, H. Niiya, K. Kojima, S. Fujita, M. Tanimoto, M. Harada, and M. Yasukawa. Leukemia-associated fusion proteins, dek-can and bcr-abl, represent immunogenic HLA-DR-restricted epitopes recognized by fusion peptide-specific CD4+ T lymphocytes. *Leukemia*, 16(12):2400–2407, 2002.
- [351] S. Mandruzzato, F. Brasseur, G. Andry, T. Boon, and B. P. van der. A CASP-8 mutation recognized by cytolytic T lymphocytes on a human head and neck carcinoma. *J. Exp. Med.*, 186(5):785–793, 1997.

- [352] A. Marten, D. Flieger, S. Renoth, S. Weineck, P. Albers, M. Compes, B. Schottker, C. Ziske, S. Engelhart, P. Hanfland, L. Krizek, C. Faber, A. von Ruecker, S. Muller, T. Sauerbruch, and I. G. Schmidt-Wolf. Therapeutic vaccination against metastatic renal cell carcinoma by autologous dendritic cells: preclinical results and outcome of a first clinical phase I/II trial. *Cancer Immunol. Immunother.*, 51(11-12):637–644, 2002.
- [353] S. J. Marygold and S. J. Leever. Growth signaling: TSC takes its place. *Curr. Biol.*, 12(22):R785–R787, 2002.
- [354] R. Mathew, S. Kongara, B. Beaudoin, C. M. Karp, K. Bray, K. Degenhardt, G. Chen, S. Jin, and E. White. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev.*, 21(11):1367–1381, 2007.
- [355] V. Mazzaferro, J. Coppa, M. G. Carrabba, L. Rivoltini, M. Schiavo, E. Regalia, L. Mariani, T. Camerini, A. Marchiano, S. Andreola, R. Camerini, M. Corsi, J. J. Lewis, P. K. Srivastava, and G. Parmiani. Vaccination with autologous tumor-derived heat-shock protein gp96 after liver resection for metastatic colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.*, 9(9):3235–3245, 2003.
- [356] R. E. Means, S. Ishido, X. Alvarez, and J. U. Jung. Multiple endocytic trafficking pathways of MHC class I molecules induced by a Herpesvirus protein. *EMBO J.*, 21(7):1638–1649, 2002.
- [357] A. J. Meijer and P. Codogno. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 36(12):2445–2462, 2004.
- [358] D. Mewar and A. G. Wilson. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: a review. *Biomed. Pharmacother.*, 60(10):648–655, 2006.
- [359] Y. Miyahara, H. Naota, L. Wang, A. Hiasa, M. Goto, M. Watanabe, S. Kitano, S. Okumura, T. Takemitsu, A. Yuta, Y. Majima, F. A. Lemonnier, T. Boon, and H. Shiku. Determination of cellularly processed HLA-A2402-restricted novel CTL epitopes derived from two cancer germ line genes, MAGE-A4 and SAGE. *Clin. Cancer Res.*, 11(15):5581–5589, 2005.
- [360] S. Miyamoto, K. Yano, S. Sugimoto, G. Ishii, T. Hasebe, Y. Endoh, K. Kodama, M. Goya, T. Chiba, and A. Ochiai. Matrix metalloproteinase-7 facilitates insulin-like growth factor bioavailability through its proteinase activity on insulin-like growth factor binding protein 3. *Cancer Res.*, 64(2):665–671, 2004.
- [361] Y. Miyata, T. Iwata, K. Ohba, S. Kanda, M. Nishikido, and H. Kanetake. Expression of matrix metalloproteinase-7 on cancer cells and tissue endothelial cells in renal cell carcinoma: prognostic implications and clinical significance for invasion and metastasis. *Clin. Cancer Res.*, 12(23):6998–7003, 2006.
- [362] N. Mizushima. Methods for monitoring autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 36(12):2491–2502, 2004.
- [363] N. Mizushima, T. Noda, T. Yoshimori, Y. Tanaka, T. Ishii, M. D. George, D. J. Klionsky, M. Ohsumi, and Y. Ohsumi. A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*, 395(6700):395–398, 1998.
- [364] N. Mizushima, H. Sugita, T. Yoshimori, and Y. Ohsumi. A new protein conjugation system in human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy. *J. Biol. Chem.*, 273(51):33889–33892, 1998.
- [365] N. Mizushima, T. Noda, and Y. Ohsumi. Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway. *EMBO J.*, 18(14):3888–3896, 1999.
- [366] N. Mizushima, A. Yamamoto, M. Hatano, Y. Kobayashi, Y. Kabeya, K. Suzuki, T. Tokuhiisa, Y. Ohsumi, and T. Yoshimori. Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J. Cell Biol.*, 152(4):657–668, 2001.
- [367] N. Mizushima, A. Kuma, Y. Kobayashi, A. Yamamoto, M. Matsubae, T. Takao, T. Natsume, Y. Ohsumi, and T. Yoshimori. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J. Cell Sci.*, 116(Pt 9):1679–1688, 2003.
- [368] N. Mizushima, A. Yamamoto, M. Matsui, T. Yoshimori, and Y. Ohsumi. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol. Biol. Cell*, 15(3):1101–1111, 2004.
- [369] C. Münz. Autophagy and antigen presentation. *Cell Microbiol.*, 8(6):891–898, 2006.
- [370] H. Moch, P. Schraml, L. Bubendorf, M. Mirlacher, J. Kononen, T. Gasser, M. J. Mihatsch, O. P. Kallioniemi, and G. Sauter. Identification of prognostic parameters for renal cell carcinoma by cDNA arrays and cell chips. *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.*, 83:225–232, 1999.
- [371] S. Morel, F. Levy, O. Burlet-Schiltz, F. Brasseur, M. Probst-Kepper, A. L. Peitrequin, B. Monsarrat, R. V. Velthoven, J. C. Cerottini, T. Boon, J. E. Gairin, and B. J. V. D. Eynde. Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity.*, 12(1):107–117, 2000.

- [372] G. E. Mortimore and M. Kadowaki. *Cellular proteolytic systems*. Autophagy: Its mechanism and regulation. Wiley & Liss, New York, 1994.
- [373] G. E. Mortimore and C. M. Schworer. Induction of autophagy by amino-acid deprivation in perfused rat liver. *Nature*, 270(5633):174–176, 1977.
- [374] G. E. Mortimore, A. R. Poso, and B. R. Lardeux. Mechanism and regulation of protein degradation in liver. *Diabetes Metab Rev.*, 5(1):49–70, 1989.
- [375] D. L. Morton, D. S. Hoon, J. A. Nizze, L. J. Foshag, E. Famatiga, L. A. Wanek, C. Chang, R. F. Irie, R. K. Gupta, and R. Elashoff. Polyvalent melanoma vaccine improves survival of patients with metastatic melanoma. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 690:120–134, 1993.
- [376] D. L. Morton, E. C. Hsueh, R. Essner, L. J. Foshag, S. J. O’Day, A. Bilchik, R. K. Gupta, D. S. Hoon, M. Ravindranath, J. A. Nizze, G. Gammon, L. A. Wanek, H. J. Wang, and R. M. Elashoff. Prolonged survival of patients receiving active immunotherapy with Canvaxin therapeutic polyvalent vaccine after complete resection of melanoma metastatic to regional lymph nodes. *Ann. Surg.*, 236(4):438–448, 2002.
- [377] G. Mosialos, M. Birkenbach, R. Yalamanchili, T. VanArsdale, C. Ware, and E. Kieff. The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell*, 80(3):389–399, 1995.
- [378] T. R. Mosmann, H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin, and R. L. Coffman. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.*, 136(7):2348–2357, 1986.
- [379] R. J. Motzer and R. M. Bukowski. Targeted therapy for metastatic renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, 24(35):5601–5608, 2006.
- [380] R. J. Motzer, R. Amato, M. Todd, W. J. Hwu, R. Cohen, J. Baselga, H. Muss, M. Cooper, R. Yu, M. S. Ginsberg, and M. Needle. Phase II trial of antiepidermal growth factor receptor antibody C225 in patients with advanced renal cell carcinoma. *Invest New Drugs*, 21(1):99–101, 2003.
- [381] R. J. Motzer, T. E. Hutson, P. Tomczak, M. D. Michaelson, R. M. Bukowski, O. Rixe, S. Oudard, S. Negrier, C. Szczylik, S. T. Kim, I. Chen, P. W. Bycott, C. M. Baum, and R. A. Figlin. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.*, 356(2):115–124, 2007.
- [382] D. B. Munafo and M. I. Colombo. A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation. *J. Cell Sci.*, 114(Pt 20):3619–3629, 2001.
- [383] I. Nakagawa, A. Amano, N. Mizushima, A. Yamamoto, H. Yamaguchi, T. Kamimoto, A. Nara, J. Funao, M. Nakata, K. Tsuda, S. Hamada, and T. Yoshimori. Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus. *Science*, 306(5698):1037–1040, 2004.
- [384] T. Nakagawa, W. Roth, P. Wong, A. Nelson, A. Farr, J. Deussing, J. A. Villadangos, H. Ploegh, C. Peters, and A. Y. Rudensky. Cathepsin L: critical role in Ii degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science*, 280(5362):450–453, 1998.
- [385] T. Y. Nakagawa, W. H. Brissette, P. D. Lira, R. J. Griffiths, N. Petrushova, J. Stock, J. D. McNeish, S. E. Eastman, E. D. Howard, S. R. Clarke, E. F. Rosloniec, E. A. Elliott, and A. Y. Rudensky. Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice. *Immunity.*, 10(2):207–217, 1999.
- [386] O. Nakano, M. Sato, Y. Naito, K. Suzuki, S. Orikasa, M. Aizawa, Y. Suzuki, I. Shintaku, H. Nagura, and H. Ohtani. Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. *Cancer Res.*, 61(13):5132–5136, 2001.
- [387] C. Napoletano, A. Rughetti, M. P. A. Tarp, J. Coleman, E. P. Bennett, G. Picco, P. Sale, K. Denda-Nagai, T. Irimura, U. Mandel, H. Clausen, L. Frati, J. Taylor-Papadimitriou, J. Burchell, and M. Nuti. Tumor-associated Tn-MUC1 glycoform is internalized through the macrophage galactose-type C-type lectin and delivered to the HLA class I and II compartments in dendritic cells. *Cancer Res.*, 67(17):8358–8367, 2007.
- [388] J. J. Neefjes, F. Momburg, and G. J. Hammerling. Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science*, 261(5122):769–771, 1993.
- [389] S. Negrier, B. Escudier, C. Lasset, J. Y. Douillard, J. Savary, C. Chevreau, A. Ravaud, A. Mercatello, J. Peny, M. Mousseau, T. Philip, and T. Tursz. Recombinant human interleukin-2, recombinant human interferon alfa-2a, or both in metastatic renal-cell carcinoma. Groupe Francais d’Immunotherapie. *N. Engl. J. Med.*, 338(18):1272–1278, 1998.

- [390] T. Nemoto, I. Tanida, E. Tanida-Miyake, N. Minematsu-Ikeguchi, M. Yokota, M. Ohsumi, T. Ueno, and E. Kominami. The mouse APG10 homologue, an E2-like enzyme for Apg12p conjugation, facilitates MAP-LC3 modification. *J. Biol. Chem.*, 278(41):39517–39526, 2003.
- [391] F. O. Nestle, S. Aljagic, M. Gilliet, Y. Sun, S. Grabbe, R. Dummer, G. Burg, and D. Schadendorf. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat. Med.*, 4(3):328–332, 1998.
- [392] D. C. Nice, T. K. Sato, P. E. Stromhaug, S. D. Emr, and D. J. Klionsky. Cooperative binding of the cytoplasm to vacuole targeting pathway proteins, Cvt13 and Cvt20, to phosphatidylinositol 3-phosphate at the pre-autophagosomal structure is required for selective autophagy. *J. Biol. Chem.*, 277(33):30198–30207, 2002.
- [393] F. Nimmerjahn, S. Milosevic, U. Behrends, E. M. Jaffee, D. M. Pardoll, G. W. Bornkamm, and J. Mautner. Major histocompatibility complex class II-restricted presentation of a cytosolic antigen by autophagy. *Eur. J. Immunol.*, 33(5):1250–1259, 2003.
- [394] T. Nobukuni, M. Joaquin, M. Rocco, S. G. Dann, S. Y. Kim, P. Gulati, M. P. Byfield, J. M. Backer, F. Natt, J. L. Bos, F. J. Zwartkruis, and G. Thomas. Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102(40):14238–14243, 2005.
- [395] T. Nobukuni, S. C. Kozma, and G. Thomas. hvps34, an ancient player, enters a growing game: mTOR Complex1/S6K1 signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 19(2):135–141, 2007.
- [396] M. J. Nold, C. Wesdemiotis, T. Yalcin, and A. G. Harrison. Amide bond dissociation in protonated peptides. Structures of the N-terminal ionic and neutral fragments. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 164(1):137–153, 1997.
- [397] T. Nomura, W. C. Huang, H. E. Zhau, D. Wu, Z. Xie, H. Mimata, M. Zayzafoon, A. N. Young, F. F. Marshall, M. N. Weitzmann, and L. W. Chung. Beta2-microglobulin promotes the growth of human renal cell carcinoma through the activation of the protein kinase A, cyclic AMP-responsive element-binding protein, and vascular endothelial growth factor axis. *Clin. Cancer Res.*, 12(24):7294–7305, 2006.
- [398] L. Novellino, C. Castelli, and G. Parmiani. A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. *Cancer Immunol. Immunother.*, 54(3):187–207, 2005.
- [399] K. Odunsi, F. Qian, J. Matsuzaki, P. Mhawech-Fauceglia, C. Andrews, E. W. Hoffman, L. Pan, G. Ritter, J. Villella, B. Thomas, K. Rodabaugh, S. Lele, P. Shrikant, L. J. Old, and S. Gnjatic. Vaccination with an NY-ESO-1 peptide of HLA class I/II specificities induces integrated humoral and T cell responses in ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104(31):12837–12842, 2007.
- [400] N. Oehlrich, G. Devitt, M. Linnebacher, Y. Schwitalle, S. Grosskinski, S. Stevanović, and M. Zoller. Generation of RAGE-1 and MAGE-9 peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte lines for transfer in patients with renal cell carcinoma. *Int. J. Cancer*, 117(2):256–264, 2005.
- [401] E. Ogier-Denis, J. J. Houri, C. Bauvy, and P. Codogno. Guanine nucleotide exchange on heterotrimeric Gi3 protein controls autophagic sequestration in HT-29 cells. *J. Biol. Chem.*, 271(45):28593–28600, 1996.
- [402] E. Ogier-Denis, S. Pattingre, J. E. Benna, and P. Codogno. Erk1/2-dependent phosphorylation of Galpha-interacting protein stimulates its GTPase accelerating activity and autophagy in human colon cancer cells. *J. Biol. Chem.*, 275(50):39090–39095, 2000.
- [403] H. Ohminami, M. Yasukawa, and S. Fujita. HLA class I-restricted lysis of leukemia cells by a CD8(+) cytotoxic T-lymphocyte clone specific for WT1 peptide. *Blood*, 95(1):286–293, 2000.
- [404] K. Ohta, A. Mizutani, A. Kawakami, Y. Murakami, Y. Kasuya, S. Takagi, H. Tanaka, and H. Fujisawa. Plexin: a novel neuronal cell surface molecule that mediates cell adhesion via a homophilic binding mechanism in the presence of calcium ions. *Neuron*, 14(6):1189–1199, 1995.
- [405] Y. Oka, K. Uda, A. Tsuboi, O. A. Elisseeva, H. Ogawa, K. Aozasa, T. Kishimoto, and H. Sugiyama. Cancer immunotherapy targeting Wilms' tumor gene WT1 product. *J. Immunol.*, 164(4):1873–1880, 2000.
- [406] B. Ortman, J. Copeman, P. J. Lehner, B. Sadasivan, J. A. Herberg, A. G. Grandea, S. R. Riddell, R. Tampe, T. Spies, J. Trowsdale, and P. Cresswell. A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes. *Science*, 277(5330):1306–1309, 1997.

- [407] S. Ottaviani, D. Colau, B. P. van der, and B. P. van der. A new MAGE-4 antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on HLA-A24 carcinoma cells. *Cancer Immunol. Immunother.*, 55(7):867–872, 2006.
- [408] L. G. Paavola. The corpus luteum of the guinea pig. III. Cytochemical studies on the Golgi complex and GERL during normal postpartum regression of luteal cells, emphasizing the origin of lysosomes and autophagic vacuoles. *J Cell Biol.*, 79(1):59–73, 1978.
- [409] C. Paludan, D. Schmid, M. Landthaler, M. Vockerodt, D. Kube, T. Tuschl, and C. Münz. Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science*, 307(5709):593–596, 2005.
- [410] M. C. Panelli, J. Wunderlich, J. Jeffries, E. Wang, A. Mixon, S. A. Rosenberg, and F. M. Marincola. Phase I study in patients with metastatic melanoma of immunization with dendritic cells presenting epitopes derived from the melanoma-associated antigens MART-1 and gp100. *J. Immunother. (1997. )*, 23(4):487–498, 2000.
- [411] A. J. Pantuck, A. Zisman, and A. S. Beldegrun. The changing natural history of renal cell carcinoma. *J. Urol.*, 166(5):1611–1623, 2001.
- [412] A. J. Pantuck, D. B. Seligson, T. Klatter, H. Yu, J. T. Leppert, L. Moore, T. O’Toole, J. Gibbons, A. S. Beldegrun, and R. A. Figlin. Prognostic relevance of the mTOR pathway in renal cell carcinoma: implications for molecular patient selection for targeted therapy. *Cancer*, 109(11):2257–2267, 2007.
- [413] I. A. Papayannopoulos. The interpretation of collision-induced dissociation tandem mass spectra of peptides. *Mass Spectrometry Reviews*, 14(1):49–73, 1995.
- [414] G. Parmiani, A. D. Filippo, L. Novellino, and C. Castelli. Unique human tumor antigens: immunobiology and use in clinical trials. *J Immunol.*, 178(4):1975–1979, 2007.
- [415] S. Pascolo, M. Schirle, B. Gückel, T. Dumrese, S. Stumm, S. Kayser, A. Moris, D. Wallwiener, H. G. Rammensee, and S. Stevanović. A MAGE-A1 HLA-A A\*0201 epitope identified by mass spectrometry. *Cancer Res.*, 61(10):4072–4077, 2001.
- [416] S. Pattingre, C. Bauvy, and P. Codogno. Amino acids interfere with the ERK1/2-dependent control of macroautophagy by controlling the activation of Raf-1 in human colon cancer HT-29 cells. *J Biol. Chem.*, 278(19):16667–16674, 2003.
- [417] M. Pawlak, E. Schick, M. A. Bopp, M. J. Schneider, P. Oroszlan, and M. Ehrat. Zeptosens’ protein microarrays: A novel high performance microarray platform for low abundance protein analysis. *PROTEOMICS*, 2(4):383–393, 2002.
- [418] M. Pawlak, M. Schneider, E. Schick, G. M. Kresbach, and M. Ehrat. DNA und Protein-Microarrays - Höchste Empfindlichkeit durch Planare Wellenleitertechnologie. *Laborwelt*, 3:44–48, 2002.
- [419] B. M. Pearse. Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 73(4):1255–1259, 1976.
- [420] I. Penn. Primary kidney tumors before and after renal transplantation. *Transplantation*, 59(4):480–485, 1995.
- [421] S. A. Perez, P. A. Sotiropoulou, N. N. Sotiriadou, A. Mamalaki, A. D. Gritzapis, H. Echner, W. Voelter, G. Pawelec, M. Papamichail, and C. N. Baxevanis. HER-2/neu-derived peptide 884-899 is expressed by human breast, colorectal and pancreatic adenocarcinomas and is recognized by in-vitro-induced specific CD4(+) T cell clones. *Cancer Immunol. Immunother.*, 50(11):615–624, 2002.
- [422] D. N. Perkins, D. J. Pappin, D. M. Creasy, and J. S. Cottrell. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 20(18):3551–3567, 1999.
- [423] V. Perrot, J. Vazquez-Prado, and J. S. Gutkind. Plexin B regulates Rho through the guanine nucleotide exchange factors leukemia-associated Rho GEF (LARG) and PDZ-RhoGEF. *J Biol. Chem.*, 277(45):43115–43120, 2002.
- [424] B. Peruzzi, G. Athauda, and D. P. Bottaro. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene product represses oncogenic beta-catenin signaling in renal carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103(39):14531–14536, 2006.
- [425] A. Petiot, E. Ogier-Denis, E. F. Blommaert, A. J. Meijer, and P. Codogno. Distinct classes of phosphatidylinositol 3’-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J. Biol. Chem.*, 275(2):992–998, 2000.
- [426] J. Pieters. MHC class II restricted antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.*, 9(1):89–96, 1997.
- [427] J. Pieters, O. Bakke, and B. Dobberstein. The MHC class II-associated invariant chain contains two endosomal targeting signals within its cytoplasmic tail. *J. Cell Sci.*, 106 ( Pt 3):831–846, 1993.

- [428] S. Pitz, R. Moll, S. Storkel, and W. Thoenes. Expression of intermediate filament proteins in subtypes of renal cell carcinomas and in renal oncocytomas. Distinction of two classes of renal cell tumors. *Lab Invest*, 56(6):642–653, 1987.
- [429] A. Pivarcsi, A. Muller, A. Hippe, J. Rieker, A. van Lierop, M. Steinhoff, S. Seeliger, R. Kubitzka, U. Pippirs, S. Meller, P. A. Gerber, R. Liersch, E. Buenemann, E. Sonkoly, U. Wiesner, T. K. Hoffmann, L. Schneider, R. Piekorz, E. Enderlein, J. Reifenberger, U. P. Rohr, R. Haas, P. Boukamp, I. Haase, B. Nurnberg, T. Ruzicka, A. Zlotnik, and B. Homey. Tumor immune escape by the loss of homeostatic chemokine expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2007.
- [430] P. J. Plomp, E. J. Wolvetang, A. K. Groen, A. J. Meijer, P. B. Gordon, and P. O. Seglen. Energy dependence of autophagic protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.*, 164(1):197–203, 1987.
- [431] P. J. Plomp, P. B. Gordon, A. J. Meijer, H. Hoyvik, and P. O. Seglen. Energy dependence of different steps in the autophagic-lysosomal pathway. *J. Biol. Chem.*, 264(12):6699–6704, 1989.
- [432] J. L. Pooley, W. R. Heath, and K. Shortman. Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8-dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells. *J. Immunol.*, 166(9):5327–5330, 2001.
- [433] J. Pouyssegur, F. Dayan, and N. M. Mazure. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature*, 441(7092):437–443, 2006.
- [434] A. Prigione and G. Cortopassi. Mitochondrial DNA deletions and chloramphenicol treatment stimulate the autophagic transcript ATG12. *Autophagy*, 3(4):377–380, 2007.
- [435] M. Probst-Kepper, V. Stroobant, R. Kridel, B. Gaugler, C. Landry, F. Brasseur, J. P. Cosyns, B. Weynand, T. Boon, and B. J. V. D. Eynde. An alternative open reading frame of the human macrophage colony-stimulating factor gene is independently translated and codes for an antigenic peptide of 14 amino acids recognized by tumor-infiltrating CD8 T lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 193(10):1189–1198, 2001.
- [436] T. Proikas-Cezanne, S. Waddell, A. Gaugel, T. Frickey, A. Lupas, and A. Nordheim. WIPI-1alpha (WIPI49), a member of the novel 7-bladed WIPI protein family, is aberrantly expressed in human cancer and is linked to starvation-induced autophagy. *Oncogene*, 23(58):9314–9325, 2004.
- [437] T. Proikas-Cezanne, S. Ruckerbauer, Y. D. Stierhof, C. Berg, and A. Nordheim. Human WIPI-1 puncta-formation: a novel assay to assess mammalian autophagy. *FEBS Lett.*, 581(18):3396–3404, 2007.
- [438] C. Prussin and D. D. Metcalfe. Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. *J. Immunol. Methods*, 188(1):117–128, 1995.
- [439] E. L. Punnonen, V. S. Marjomaki, and H. Reunanen. 3-Methyladenine inhibits transport from late endosomes to lysosomes in cultured rat and mouse fibroblasts. *Eur. J. Cell Biol.*, 65(1):14–25, 1994.
- [440] J. O. Pyo, M. H. Jang, Y. K. Kwon, H. J. Lee, J. I. Jun, H. N. Woo, D. H. Cho, B. Choi, H. Lee, J. H. Kim, N. Mizushima, Y. Ohsumi, and Y. K. Jung. Essential roles of Atg5 and FADD in autophagic cell death: dissection of autophagic cell death into vacuole formation and cell death. *J Biol. Chem.*, 280(21):20722–20729, 2005.
- [441] Z. Qiu, C. Huang, J. Sun, W. Qiu, J. Zhang, H. Li, T. Jiang, K. Huang, and J. Cao. RNA interference-mediated signal transducers and activators of transcription 3 gene silencing inhibits invasion and metastasis of human pancreatic cancer cells. *Cancer Sci.*, 98(7):1099–1106, 2007.
- [442] X. Qu, J. Yu, G. Bhagat, N. Furuya, H. Hibshoosh, A. Troxel, J. Rosen, E. L. Eskelinen, N. Mizushima, Y. Ohsumi, G. Cat-toretto, and B. Levine. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin. Invest*, 112(12):1809–1820, 2003.
- [443] S. Raasi, G. Schmidtke, and M. Groettrup. The ubiquitin-like protein FAT10 forms covalent conjugates and induces apoptosis. *J Biol. Chem.*, 276(38):35334–35343, 2001.
- [444] S. Radovic, M. Babic, M. Doric, A. Hukic, S. Kuskunovic, A. Hadzismajlovic, and F. Serdarevic. Non-small cell lung carcinoma: cyclin D1, bcl-2, p53, Ki-67 and HER-2 proteins expression in resected tumors. *Bosn. J Basic Med. Sci.*, 7(3):205–211, 2007.
- [445] S. Radulovic and S. K. Bjelogrljic. Sunitinib, sorafenib and mTOR inhibitors in renal cancer. *J BUON.*, 12 Suppl 1:S151–S162, 2007.
- [446] H. Rammensee, J. Bachmann, N. P. Emmerich, O. A. Bachor, and S. Stevanović. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics*, 50(3-4):213–219, 1999.

- [447] H. G. Rammensee, K. Falk, and O. Rötzschke. MHC molecules as peptide receptors. *Curr. Opin. Immunol.*, 5(1):35–44, 1993.
- [448] H.-G. Rammensee, J. Bachmann, and S. Stevanović. *MHC ligands and peptide motifs*. Landes Bioscience, USA, 1997.
- [449] M. B. Ranke and M. Elmlinger. Functional role of insulin-like growth factor binding proteins. *Horm. Res.*, 48 Suppl 4:9–15, 1997.
- [450] T. Rasmuson, K. Grankvist, and B. Ljungberg. Serum beta 2-microglobulin and prognosis of patients with renal cell carcinoma. *Acta Oncol.*, 35(4):479–482, 1996.
- [451] B. Ravikumar, C. Vacher, Z. Berger, J. E. Davies, S. Luo, L. G. Oroz, F. Scaravilli, D. F. Easton, R. Duden, C. J. O’Kane, and D. C. Rubinsztein. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat. Genet.*, 36(6):585–595, 2004.
- [452] F. Reggiori and D. J. Klionsky. Autophagosomes: biogenesis from scratch? *Curr. Opin. Cell Biol.*, 17(4):415–422, 2005.
- [453] F. Reggiori, K. A. Tucker, P. E. Stromhaug, and D. J. Klionsky. The Atg1-Atg13 complex regulates Atg9 and Atg23 retrieval transport from the pre-autophagosomal structure. *Dev. Cell*, 6(1):79–90, 2004.
- [454] C. Reichle. *Patientenspezifische Analyse von Tumorantigenen*. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie, 2006.
- [455] E. A. Reits, J. C. Vos, M. Gromme, and J. Neefjes. The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature*, 404(6779):774–778, 2000.
- [456] S. Reker, J. C. Becker, I. M. Svane, E. Ralfkiaer, P. T. Straten, and M. H. Andersen. HLA-B35-restricted immune responses against survivin in cancer patients. *Int. J. Cancer*, 108(6):937–941, 2004.
- [457] N. Renkvist, C. Castelli, P. F. Robbins, and G. Parmiani. A listing of human tumor antigens recognized by T cells. *Cancer Immunol. Immunother.*, 50(1):3–15, 2001.
- [458] D. Resnitzky, M. Gossen, H. Bujard, and S. I. Reed. Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol. Cell Biol.*, 14(3):1669–1679, 1994.
- [459] M. E. Rensing, A. Sette, R. M. Brandt, J. Ruppert, P. A. Wentworth, M. Hartman, C. Oseroff, H. M. Grey, C. J. Melief, and W. M. Kast. Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity studies of HLA-A\*0201-binding peptides. *J. Immunol.*, 154(11):5934–5943, 1995.
- [460] M. Retz, J. Lehmann, C. Roder, B. Plotz, J. Harder, J. Eggers, J. Pauluschke, H. Kalthoff, and M. Stockle. Differential mucin MUC7 gene expression in invasive bladder carcinoma in contrast to uniform MUC1 and MUC2 gene expression in both normal urothelium and bladder carcinoma. *Cancer Res.*, 58(24):5662–5666, 1998.
- [461] U. Reusch, W. Muranyi, P. Lucin, H. G. Burgert, H. Hengel, and U. H. Koszinowski. A cytomegalovirus glycoprotein re-routes MHC class I complexes to lysosomes for degradation. *EMBO J*, 18(4):1081–1091, 1999.
- [462] B. I. Rini and E. J. Small. Biology and clinical development of vascular endothelial growth factor-targeted therapy in renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, 23(5):1028–1043, 2005.
- [463] B. I. Rini, T. M. Zimmerman, T. F. Gajewski, W. M. Stadler, and N. J. Vogelzang. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation for metastatic renal cell carcinoma. *J. Urol.*, 165(4):1208–1209, 2001.
- [464] B. I. Rini, T. Zimmerman, W. M. Stadler, T. F. Gajewski, and N. J. Vogelzang. Allogeneic stem-cell transplantation of renal cell cancer after nonmyeloablative chemotherapy: feasibility, engraftment, and clinical results. *J. Clin. Oncol.*, 20(8):2017–2024, 2002.
- [465] B. I. Rini, S. Halabi, J. Taylor, E. J. Small, and R. L. Schilsky. Cancer and Leukemia Group B 90206: A randomized phase III trial of interferon-alpha or interferon-alpha plus anti-vascular endothelial growth factor antibody (bevacizumab) in metastatic renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 10(8):2584–2586, 2004.
- [466] E. Ripberger, M. Linnebacher, Y. Schwitalle, J. Gebert, and D. M. von Knebel. Identification of an HLA-A0201-restricted CTL epitope generated by a tumor-specific frameshift mutation in a coding microsatellite of the OGT gene. *J. Clin. Immunol.*, 23(5):415–423, 2003.
- [467] P. F. Robbins, M. E. Gamil, Y. F. Li, Y. Kawakami, D. Loftus, E. Appella, and S. A. Rosenberg. A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 183(3):1185–1192, 1996.



- [468] C. J. Robson. Radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *J. Urol.*, 89:37–42, 1963.
- [469] C. J. Robson, B. M. Churchill, and W. Anderson. The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma. 1969. *J. Urol.*, 167(2 Pt 2):873–875, 2002.
- [470] P. A. Roche and P. Cresswell. Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature*, 345(6276):615–618, 1990.
- [471] K. L. Rock. A new foreign policy: MHC class I molecules monitor the outside world. *Immunol. Today*, 17(3):131–137, 1996.
- [472] P. Roepstorff and J. Fohlman. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom*, 11(11):601, 1984.
- [473] M. Roessler, W. Rollinger, S. Palme, M. L. Hagmann, P. Berndt, A. M. Engel, B. Schneidinger, M. Pfeffer, H. Andres, J. Karl, H. Bodenmuller, J. Ruschoff, T. Henkel, G. Rohr, S. Rossol, W. Rosch, H. Langen, W. Zolg, and M. Tacke. Identification of nicotinamide N-methyltransferase as a novel serum tumor marker for colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.*, 11(18):6550–6557, 2005.
- [474] J. Rohde, J. Heitman, and M. E. Cardenas. The TOR kinases link nutrient sensing to cell growth. *J. Biol. Chem.*, 276(13):9583–9586, 2001.
- [475] J. Roigas and G. Massenkeil. Nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation in metastatic renal cell carcinoma: a new therapeutic option or just a clinical experiment? *World J. Urol.*, 23(3):213–220, 2005.
- [476] S. Romagnani. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu. Rev. Immunol.*, 12:227–257, 1994.
- [477] C. Ronsin, V. Chung-Scott, I. Poullion, N. Aknouche, C. Gaudin, and F. Triebel. A non-AUG-defined alternative open reading frame of the intestinal carboxyl esterase mRNA generates an epitope recognized by renal cell carcinoma-reactive tumor-infiltrating lymphocytes in situ. *J. Immunol.*, 163(1):483–490, 1999.
- [478] T. L. Rose, L. Bonneau, C. Der, D. Marty-Mazars, and F. Marty. Starvation-induced expression of autophagy-related genes in Arabidopsis. *Biol. Cell*, 98(1):53–67, 2006.
- [479] S. A. Rosenberg, J. C. Yang, D. J. Schwartztruber, P. Hwu, F. M. Marincola, S. L. Topalian, N. P. Restifo, M. Sznol, S. L. Schwarz, P. J. Spiess, J. R. Wunderlich, C. A. Seipp, J. H. Einhorn, L. Rogers-Freezer, and D. E. White. Impact of cytokine administration on the generation of antitumor reactivity in patients with metastatic melanoma receiving a peptide vaccine. *J. Immunol.*, 163(3):1690–1695, 1999.
- [480] S. A. Rosenberg, P. Tong-On, Y. Li, J. P. Riley, M. E. Gamil, M. R. Parkhurst, and P. F. Robbins. Identification of BING-4 cancer antigen translated from an alternative open reading frame of a gene in the extended MHC class II region using lymphocytes from a patient with a durable complete regression following immunotherapy. *J Immunol.*, 168(5):2402–2407, 2002.
- [481] S. A. Rosenberg, R. M. Sherry, K. E. Morton, J. C. Yang, S. L. Topalian, R. E. Royal, U. S. Kammula, N. P. Restifo, M. S. Hughes, S. L. Schwarz, L. T. Ngo, S. A. Mavroukakis, and D. E. White. Altered CD8(+) T-cell responses when immunizing with multiepitope peptide vaccines. *J Immunother. (1997. )*, 29(2):224–231, 2006.
- [482] M. Rothe, M. G. Pan, W. J. Henzel, T. M. Ayres, and D. V. Goeddel. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell*, 83(7):1243–1252, 1995.
- [483] E. K. Rowinsky, G. H. Schwartz, J. A. Gollob, J. A. Thompson, N. J. Vogelzang, R. Figlin, R. Bukowski, N. Haas, P. Lockbaum, Y. P. Li, R. Arends, K. A. Foon, G. Schwab, and J. Dutcher. Safety, pharmacokinetics, and activity of ABX-EGF, a fully human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in patients with metastatic renal cell cancer. *J. Clin. Oncol.*, 22(15):3003–3015, 2004.
- [484] D. R. Rowley, T. D. Dang, L. McBride, M. J. Gerdes, B. Lu, and M. Larsen. Beta-2 microglobulin is mitogenic to PC-3 prostatic carcinoma cells and antagonistic to transforming growth factor beta 1 action. *Cancer Res.*, 55(4):781–786, 1995.
- [485] T. D. Russell, C. A. Palmer, D. J. Orlicky, A. Fischer, M. C. Rudolph, M. C. Neville, and J. L. McManaman. Cytoplasmic lipid droplet accumulation in developing mammary epithelial cells: roles of adipophilin and lipid metabolism. *J Lipid Res.*, 48(7):1463–1475, 2007.
- [486] L. Rydlander, E. Ziegler, T. Bergman, E. Schoberl, G. Steiner, A. C. Bergman, A. Zetterberg, M. Marberger, P. Bjorklund, T. Skern, R. Einarsson, and H. Jornvall. Molecular characterization of a tissue-polypeptide-specific-antigen epitope and its relationship to human cytokeratin 18. *Eur. J Biochem.*, 241(2):309–314, 1996.

- [487] S. T. Saarikoski, S. P. Rivera, and O. Hankinson. Mitogen-inducible gene 6 (MIG-6), adipophilin and tuftelin are inducible by hypoxia. *FEBS Lett.*, 530(1-3):186–190, 2002.
- [488] B. Sadasivan, P. J. Lehner, B. Ortmann, T. Spies, and P. Cresswell. Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity.*, 5(2):103–114, 1996.
- [489] E. Sadovnikova, L. A. Jopling, K. S. Soo, and H. J. Stauss. Generation of human tumor-reactive cytotoxic T cells against peptides presented by non-self HLA class I molecules. *Eur. J Immunol.*, 28(1):193–200, 1998.
- [490] I. Saeterdal, J. Bjorheim, K. Lislerud, M. K. Gjertsen, I. K. Bukholm, O. C. Olsen, J. M. Nesland, J. A. Eriksen, M. Moller, A. Lindblom, and G. Gaudernack. Frameshift-mutation-derived peptides as tumor-specific antigens in inherited and spontaneous colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98(23):13255–13260, 2001.
- [491] U. Sahin, O. Tureci, H. Schmitt, B. Cochlovius, T. Johannes, R. Schmits, F. Stenner, G. Luo, I. Schobert, and M. Pfreundschuh. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 92(25):11810–11813, 1995.
- [492] H. A. Saka, M. G. Gutierrez, J. L. Bocco, and M. I. Colombo. The autophagic pathway: a cell survival strategy against the bacterial pore-forming toxin *Vibrio cholerae* cytolysin. *Autophagy.*, 3(4):363–365, 2007.
- [493] S. Sakaguchi. Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.*, 22:531–562, 2004.
- [494] S. Sakaguchi, N. Sakaguchi, J. Shimizu, S. Yamazaki, T. Sakihama, M. Itoh, Y. Kuniyasu, T. Nomura, M. Toda, and T. Takahashi. Immunologic tolerance maintained by CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol. Rev.*, 182:18–32, 2001.
- [495] M. L. Salgaller, F. M. Marincola, J. N. Cormier, and S. A. Rosenberg. Immunization against epitopes in the human melanoma antigen gp100 following patient immunization with synthetic peptides. *Cancer Res.*, 56(20):4749–4757, 1996.
- [496] K. Salnikow, M. Costa, W. D. Figg, and M. V. Blagosklonny. Hyperinducibility of hypoxia-responsive genes without p53/p21-dependent checkpoint in aggressive prostate cancer. *Cancer Res.*, 60(20):5630–5634, 2000.
- [497] F. Santos-Silva, A. Fonseca, T. Caffrey, F. Carvalho, P. Mesquita, C. Reis, R. Almeida, L. David, and M. A. Hollingsworth. Thomsen-Friedenreich antigen expression in gastric carcinomas is associated with MUC1 mucin VNTR polymorphism. *Glycobiology*, 15(5):511–517, 2005.
- [498] M. A. Saper, P. J. Bjorkman, and D. C. Wiley. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 219(2):277–319, 1991.
- [499] M. Sasaki, K. Nakahira, Y. Kawano, H. Katakura, T. Yoshimine, K. Shimizu, S. U. Kim, and K. Ikenaka. MAGE-E1, a new member of the melanoma-associated antigen gene family and its expression in human glioma. *Cancer Res.*, 61(12):4809–4814, 2001.
- [500] K. Schag, S. M. Schmidt, M. R. Müller, T. Weinschenk, S. Appel, M. M. Weck, F. Grünebach, S. Stevanović, H. G. Rammensee, and P. Brossart. Identification of C-met oncogene as a broadly expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T-lymphocytes. *Clin. Cancer Res.*, 10(11):3658–3666, 2004.
- [501] B. Scheel, S. Braedel, J. Probst, J. P. Carralot, H. Wagner, H. Schild, G. Jung, H. G. Rammensee, and S. Pascolo. Immunostimulating capacities of stabilized RNA molecules. *Eur. J. Immunol.*, 34(2):537–547, 2004.
- [502] C. Scheibenbogen, A. Schmittel, U. Keilholz, T. Allgauer, U. Hofmann, R. Max, E. Thiel, and D. Schadendorf. Phase 2 trial of vaccination with tyrosinase peptides and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with metastatic melanoma. *J. Immunother. (1997.)*, 23(2):275–281, 2000.
- [503] C. Scheibenbogen, D. Schadendorf, N. E. Bechrakis, D. Nagorsen, U. Hofmann, F. Servetopoulou, A. Letsch, A. Philipp, M. H. Foerster, A. Schmittel, E. Thiel, and U. Keilholz. 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(2):188–194, 2003.
- [504] J. P. Schellens, H. Vreeling-Sindelarova, P. J. Plomp, and A. J. Meijer. Hepatic autophagy and intracellular ATP. A morphometric study. *Exp. Cell Res.*, 177(1):103–108, 1988.
- [505] H. Schild and H. G. Rammensee. Perfect use of imperfection. *Nature*, 404(6779):709–710, 2000.

- [506] M. Schirle, W. Keilholz, B. Weber, C. Gouttefangeas, T. Dumrese, H. D. Becker, S. Stevanović, and H. G. Rammensee. Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T cell-independent approach. *Eur. J. Immunol.*, 30(8):2216–2225, 2000.
- [507] G. Schmelzeisen-Redeker, L. Bütfering, and F. W. Röhlgen. *Int J Mass Spectrom Ion Processes*, 90:139–150, 1989.
- [508] D. Schmid and C. Münz. Immune surveillance of intracellular pathogens via autophagy. *Cell Death. Differ.*, 12 Suppl 2:1519–1527, 2005.
- [509] D. Schmid and C. Münz. Innate and adaptive immunity through autophagy. *Immunity.*, 27(1):11–21, 2007.
- [510] D. Schmid, J. Dengjel, O. Schoor, S. Stevanović, and C. Münz. Autophagy in innate and adaptive immunity against intracellular pathogens. *J. Mol. Med.*, 84(3):194–202, 2006.
- [511] S. M. Schmidt, K. Schag, M. R. Müller, T. Weinschenk, S. Appel, O. Schoor, M. M. Weck, F. Grünebach, L. Kanz, S. Stevanović, H. G. Rammensee, and P. Brossart. Induction of adipophilin-specific cytotoxic T lymphocytes using a novel HLA-A2-binding peptide that mediates tumor cell lysis. *Cancer Res.*, 64(3):1164–1170, 2004.
- [512] M. Schmitz, P. Diestelkoetter, B. Weigle, F. Schmachtenberg, S. Stevanović, D. Ockert, H. G. Rammensee, and E. P. Rieber. Generation of survivin-specific CD8+ T effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides. *Cancer Res.*, 60(17):4845–4849, 2000.
- [513] A. J. Schrader, Z. Varga, A. Hegele, S. Pfoertner, P. Olbert, and R. Hofmann. Second-line strategies for metastatic renal cell carcinoma: classics and novel approaches. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 132(3):137–149, 2006.
- [514] R. Schroers, L. Shen, L. Rollins, C. M. Rooney, K. Slawin, G. Sonderstrup, X. F. Huang, and S. Y. Chen. Human telomerase reverse transcriptase-specific T-helper responses induced by promiscuous major histocompatibility complex class II-restricted epitopes. *Clin. Cancer Res.*, 9(13):4743–4755, 2003.
- [515] U. Schubert, L. C. Anton, J. Gibbs, C. C. Norbury, J. W. Yewdell, and J. R. Bennink. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*, 404(6779):770–774, 2000.
- [516] E. S. Schultz, J. Chapiro, C. Lurquin, S. Claverol, O. Burlet-Schiltz, G. Warnier, V. Russo, S. Morel, F. Levy, T. Boon, B. J. V. D. Eynde, and B. P. van der. The production of a new MAGE-3 peptide presented to cytolytic T lymphocytes by HLA-B40 requires the immunoproteasome. *J. Exp. Med.*, 195(4):391–399, 2002.
- [517] J. U. Schweichel and H. J. Merker. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology*, 7(3):253–266, 1973.
- [518] C. M. Schworer and G. E. Mortimore. Glucagon-induced autophagy and proteolysis in rat liver: mediation by selective deprivation of intracellular amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 76(7):3169–3173, 1979.
- [519] P. O. Seglen and P. Bohley. Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanisms. *Experientia*, 48(2):158–172, 1992.
- [520] P. O. Seglen and P. B. Gordon. 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 79(6):1889–1892, 1982.
- [521] U. Seifert, C. Maranon, A. Shmueli, J. F. Desoutter, L. Wesoloski, K. Janek, P. Henklein, S. Diescher, M. Andrieu, S. H. de la, T. Weinschenk, H. Schild, D. Laderach, A. Galy, G. Haas, P. M. Kloetzel, Y. Reiss, and A. Hosmalin. An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope. *Nat. Immunol.*, 4(4):375–379, 2003.
- [522] N. Seki, S. Sugano, Y. Suzuki, A. Nakagawara, M. Ohira, M. Muramatsu, T. Saito, and T. Hori. Isolation, tissue expression, and chromosomal assignment of human RGS5, a novel G-protein signaling regulator gene. *J Hum. Genet.*, 43(3):202–205, 1998.
- [523] B. Seliger. Strategies of tumor immune evasion. *BioDrugs.*, 19(6):347–354, 2005.
- [524] B. Seliger, U. Ritz, and S. Ferrone. Molecular mechanisms of HLA class I antigen abnormalities following viral infection and transformation. *Int J Cancer*, 118(1):129–138, 2006.
- [525] B. Seliger, S. P. Dressler, R. Lichtenfels, and R. Kellner. Candidate biomarkers in renal cell carcinoma. *Proteomics.*, 7(24):4601–4612, 2007.
- [526] G. L. Semenza. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol. Med.*, 8(4 Suppl):S62–S67, 2002.

- [527] M. Sensi, G. Nicolini, M. Zanon, C. Colombo, A. Molla, I. Bersani, R. Lupetti, G. Parmiani, and A. Anichini. Immunogenicity without immunoselection: a mutant but functional antioxidant enzyme retained in a human metastatic melanoma and targeted by CD8(+) T cells with a memory phenotype. *Cancer Res.*, 65(2):632–640, 2005.
- [528] T. Serwold, F. Gonzalez, J. Kim, R. Jacob, and N. Shastri. ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature*, 419(6906):480–483, 2002.
- [529] J. Shen, M. D. Person, J. Zhu, J. L. Abbruzzese, and D. Li. Protein expression profiles in pancreatic adenocarcinoma compared with normal pancreatic tissue and tissue affected by pancreatitis as detected by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Cancer Res.*, 64(24):9018–9026, 2004.
- [530] T. Shi, F. Dong, L. S. Liou, Z. H. Duan, A. C. Novick, and J. A. DiDonato. Differential protein profiling in renal-cell carcinoma. *Mol. Carcinog.*, 40(1):47–61, 2004.
- [531] H. Shiina, M. Igawa, J. Breault, L. Ribeiro-Filho, D. Pookot, S. Urakami, M. Terashima, M. Deguchi, M. Yamanaka, M. Shirai, M. Kaneuchi, C. J. Kane, and R. Dahiya. The human T-cell factor-4 gene splicing isoforms, Wnt signal pathway, and apoptosis in renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 9(6):2121–2132, 2003.
- [532] K. Shimizu, H. Uemura, M. Yoshikawa, K. Yoshida, Y. Hirao, K. Iwashima, S. Saga, and K. Yoshikawa. Induction of antigen specific cellular immunity by vaccination with peptides from MN/CA IX in renal cell carcinoma. *Oncol. Rep.*, 10(5):1307–1311, 2003.
- [533] N. Shinojima, T. Yokoyama, Y. Kondo, and S. Kondo. Roles of the Akt/mTOR/p70S6K and ERK1/2 signaling pathways in curcumin-induced autophagy. *Autophagy.*, 3(6):635–637, 2007.
- [534] T. Shintani and D. J. Klionsky. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*, 306(5698):990–995, 2004.
- [535] T. Shintani, N. Mizushima, Y. Ogawa, A. Matsuura, T. Noda, and Y. Ohsumi. Apg10p, a novel protein-conjugating enzyme essential for autophagy in yeast. *EMBO J.*, 18(19):5234–5241, 1999.
- [536] J. W. Shiver, L. Su, and P. A. Henkart. Cytotoxicity with target DNA breakdown by rat basophilic leukemia cells expressing both cytolysin and granzyme A. *Cell*, 71(2):315–322, 1992.
- [537] J. W. Simons, B. Mikhak, J. F. Chang, A. M. DeMarzo, M. A. Carducci, M. Lim, C. E. Weber, A. A. Baccala, M. A. Goemann, S. M. Clift, D. G. Ando, H. I. Levitsky, L. K. Cohen, M. G. Sanda, R. C. Mulligan, A. W. Partin, H. B. Carter, S. Piantadosi, F. F. Marshall, and W. G. Nelson. Induction of immunity to prostate cancer antigens: results of a clinical trial of vaccination with irradiated autologous prostate tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using ex vivo gene transfer. *Cancer Res.*, 59(20):5160–5168, 1999.
- [538] B. F. Skinnider and M. B. Amin. An immunohistochemical approach to the differential diagnosis of renal tumors. *Semin. Diagn. Pathol.*, 22(1):51–68, 2005.
- [539] E. S. Smith, A. Mandokhot, E. E. Evans, L. Mueller, M. A. Borrello, D. M. Sahasrabudhe, and M. Zauderer. Lethality-based selection of recombinant genes in mammalian cells: application to identifying tumor antigens. *Nat. Med.*, 7(8):967–972, 2001.
- [540] G. D. Snell. Methods for the study of histocompatibility genes. *J. Genet.*, 49:87–108, 1948.
- [541] M. T. Spiotto and H. Schreiber. Rapid destruction of the tumor microenvironment by CTLs recognizing cancer-specific antigens cross-presented by stromal cells. *Cancer Immun.*, 5:8, 2005.
- [542] R. Stan, J. D. Wolchok, and A. D. Cohen. DNA vaccines against cancer. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, 20(3):613–636, 2006.
- [543] S. Stein, E. K. Thomas, B. Herzog, M. D. Westfall, J. V. Rocheleau, R. S. Jackson, M. Wang, and P. Liang. NDRG1 is necessary for p53-dependent apoptosis. *J Biol. Chem.*, 279(47):48930–48940, 2004.
- [544] E. J. Steinmetz, N. K. Conrad, D. A. Brow, and J. L. Corden. RNA-binding protein Nrd1 directs poly(A)-independent 3'-end formation of RNA polymerase II transcripts. *Nature*, 413(6853):327–331, 2001.
- [545] L. J. Stern, J. H. Brown, T. S. Jardetzky, J. C. Gorga, R. G. Urban, J. L. Strominger, and D. C. Wiley. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature*, 368(6468):215–221, 1994.
- [546] S. Stevanović. Identification of tumour-associated T-cell epitopes for vaccine development. *Nat. Rev. Cancer*, 2(7):514–520, 2002.

- [547] S. Stevanović and H. Schild. Quantitative aspects of T cell activation–peptide generation and editing by MHC class I molecules. *Semin. Immunol.*, 11(6):375–384, 1999.
- [548] T. Stigbrand. The versatility of cytokeratins as tumor markers. *Tumour. Biol.*, 22(1):1–3, 2001.
- [549] L. Stoltze, T. P. Dick, M. Deeg, B. Pömmel, H. G. Rammensee, and H. Schild. Generation of the vesicular stomatitis virus nucleoprotein cytotoxic T lymphocyte epitope requires proteasome-dependent and -independent proteolytic activities. *Eur. J. Immunol.*, 28(12):4029–4036, 1998.
- [550] L. Stoltze, M. Schirle, G. Schwarz, C. Schroter, M. W. Thompson, L. B. Hersh, H. Kalbacher, S. Stevanović, H. G. Rammensee, and H. Schild. Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nat. Immunol.*, 1(5):413–418, 2000.
- [551] S. Storkel, J. N. Eble, K. Adlakha, M. Amin, M. L. Blute, D. G. Bostwick, M. Darson, B. Delahunt, and K. Iczkowski. Classification of renal cell carcinoma: Workgroup No. 1. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer*, 80(5):987–989, 1997.
- [552] P. E. Stromhaug, F. Reggiori, J. Guan, C. W. Wang, and D. J. Klionsky. Atg21 is a phosphoinositide binding protein required for efficient lipidation and localization of Atg8 during uptake of aminopeptidase I by selective autophagy. *Mol. Biol. Cell*, 15(8):3553–3566, 2004.
- [553] Z. Su, J. Dannull, A. Heiser, D. Yancey, S. Pruitt, J. Madden, D. Coleman, D. Niedzwiecki, E. Gilboa, and J. Vieweg. Immunological and clinical responses in metastatic renal cancer patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritic cells. *Cancer Res.*, 63(9):2127–2133, 2003.
- [554] T. Suda, T. Takahashi, P. Golstein, and S. Nagata. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*, 75(6):1169–1178, 1993.
- [555] X. Sun, M. Gulyas, and A. Hjerpe. Mesothelial differentiation as reflected by differential gene expression. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 30(4):510–518, 2004.
- [556] Y. Sun, M. Song, S. Stevanović, C. Jankowiak, A. Paschen, H. G. Rammensee, and D. Schadendorf. Identification of a new HLA-A(\*)0201-restricted T-cell epitope from the tyrosinase-related protein 2 (TRP2) melanoma antigen. *Int. J. Cancer*, 87(3):399–404, 2000.
- [557] Y. K. Sung, S. Y. Hwang, M. K. Park, H. I. Bae, W. H. Kim, J. C. Kim, and M. Kim. Fatty acid-CoA ligase 4 is overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci.*, 94(5):421–424, 2003.
- [558] R. P. Suttmuller, L. M. van Duivenvoorde, A. van Elsas, T. N. Schumacher, M. E. Wildenberg, J. P. Allison, R. E. Toes, R. Offringa, and C. J. Melief. Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J. Exp. Med.*, 194(6):823–832, 2001.
- [559] K. Suzuki, T. Kirisako, Y. Kamada, N. Mizushima, T. Noda, and Y. Ohsumi. The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J.*, 20(21):5971–5981, 2001.
- [560] K. Tajima, A. Demachi, Y. Ito, K. Nishida, Y. Akatsuka, K. Tsujimura, H. Kuwano, T. Mitsudomi, T. Takahashi, and K. Kuzushima. Identification of an epitope from the epithelial cell adhesion molecule eliciting HLA-A\*2402-restricted cytotoxic T-lymphocyte responses. *Tissue Antigens*, 64(6):650–659, 2004.
- [561] M. Takahashi, X. J. Yang, J. Sugimura, J. Backdahl, M. Tretiakova, C. N. Qian, S. G. Gray, R. Knapp, J. Anema, R. Kahnoski, D. Nicol, N. J. Vogelzang, K. A. Furge, H. Kanayama, S. Kagawa, and B. T. Teh. Molecular subclassification of kidney tumors and the discovery of new diagnostic markers. *Oncogene*, 22(43):6810–6818, 2003.
- [562] M. Takahashi, V. Papavero, J. Yuhas, E. Kort, H. O. Kanayama, S. Kagawa, R. C. Baxter, X. J. Yang, S. G. Gray, and B. T. Teh. Altered expression of members of the IGF-axis in clear cell renal cell carcinoma. *Int J Oncol.*, 26(4):923–931, 2005.
- [563] M. Takashi, Y. Zhu, Y. Nakano, K. Miyake, and K. Kato. Elevated levels of serum aldolase A in patients with renal cell carcinoma. *Urol. Res.*, 20(4):307–311, 1992.
- [564] K. O. Tan, K. M. Tan, S. L. Chan, K. S. Yee, M. Bevort, K. C. Ang, and V. C. Yu. MAP-1, a novel proapoptotic protein containing a BH3-like motif that associates with Bax through its Bcl-2 homology domains. *J. Biol. Chem.*, 276(4):2802–2807, 2001.
- [565] N. Tanahashi, C. Tsurumi, T. Tamura, and K. Tanaka. Molecular structure of 20S and 26S proteasomes. *Enzyme Protein*, 47(4-6):241–251, 1993.

- [566] K. Tanaka and M. Kasahara. The MHC class I ligand-generating system: roles of immunoproteasomes and the interferon-gamma-inducible proteasome activator PA28. *Immunol. Rev.*, 163:161–176, 1998.
- [567] T. Tanaka, S. Kondo, Y. Iwasa, H. Hiai, and S. Toyokuni. Expression of stress-response and cell proliferation genes in renal cell carcinoma induced by oxidative stress. *Am. J. Pathol.*, 156(6):2149–2157, 2000.
- [568] K. Tani, M. Azuma, Y. Nakazaki, N. Oyaizu, H. Hase, J. Ohata, K. Takahashi, M. Oiwamonna, K. Hanazawa, Y. Wakumoto, K. Kawai, M. Noguchi, Y. Soda, R. Kunisaki, K. Watari, S. Takahashi, U. Machida, N. Satoh, A. Tojo, T. Maekawa, M. Eriguchi, S. Tomikawa, H. Tahara, Y. Inoue, H. Yoshikawa, Y. Yamada, A. Iwamoto, H. Hamada, N. Yamashita, K. Okumura, T. Kakizoe, H. Akaza, M. Fujime, S. Clift, D. Ando, R. Mulligan, and S. Asano. Phase I study of autologous tumor vaccines transduced with the GM-CSF gene in four patients with stage IV renal cell cancer in Japan: clinical and immunological findings. *Mol. Ther.*, 10(4):799–816, 2004.
- [569] I. Tanida, N. Mizushima, M. Kiyooka, M. Ohsumi, T. Ueno, Y. Ohsumi, and E. Kominami. Apg7p/Cvt2p: A novel protein-activating enzyme essential for autophagy. *Mol. Biol. Cell*, 10(5):1367–1379, 1999.
- [570] I. Tanida, E. Tanida-Miyake, M. Komatsu, T. Ueno, and E. Kominami. Human Apg3p/Aut1p homologue is an authentic E2 enzyme for multiple substrates, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3, and facilitates the conjugation of hApg12p to hApg5p. *J. Biol. Chem.*, 277(16):13739–13744, 2002.
- [571] I. Tanida, N. Minematsu-Ikeguchi, T. Ueno, and E. Kominami. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy*, 1(2):84–91, 2005.
- [572] P. Targett-Adams, D. Chambers, S. Gledhill, R. G. Hope, J. F. Coy, A. Girod, and J. McLauchlan. Live cell analysis and targeting of the lipid droplet-binding adipocyte differentiation-related protein. *J. Biol. Chem.*, 278(18):15998–16007, 2003.
- [573] A. Tassa, M. P. Roux, D. Attaix, and D. M. Bechet. Class III phosphoinositide 3-kinase–Beclin1 complex mediates the amino acid-dependent regulation of autophagy in C2C12 myotubes. *Biochem. J.*, 376(Pt 3):577–586, 2003.
- [574] G. J. ten Bosch, A. C. Toornvliet, T. Friede, C. J. Melief, and O. C. Leeksa. Recognition of peptides corresponding to the joining region of p210BCR-ABL protein by human T cells. *Leukemia*, 9(8):1344–1348, 1995.
- [575] S. Tenzer. *To cleave or not to cleave - Das Schnittverhalten des 20S-Proteasoms: von der in vitro Analyse zur in silico Modellierung*. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie, 2004.
- [576] L. W. Thompson, C. F. Garbee, S. Hibbitts, L. H. Brinckerhoff, R. A. Pierce, K. A. Chianese-Bullock, D. H. Deacon, V. H. Engelhard, and J. C. L. Slingluff. Competition among peptides in melanoma vaccines for binding to MHC molecules. *J. Immunother. (1997. )*, 27(6):425–431, 2004.
- [577] M. D. Thompson and S. P. Monga. WNT/beta-catenin signaling in liver health and disease. *Hepatology*, 45(5):1298–1305, 2007.
- [578] R. H. Thompson, M. D. Gillett, J. C. Chevillat, C. M. Lohse, H. Dong, W. S. Webster, L. Chen, H. Zincke, M. L. Blute, B. C. Leibovich, and E. D. Kwon. Costimulatory molecule B7-H1 in primary and metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Cancer*, 104(10):2084–2091, 2005.
- [579] M. Thumm, R. Egner, B. Koch, M. Schlumpberger, M. Straub, M. Veenhuis, and D. H. Wolf. Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, 349(2):275–280, 1994.
- [580] R. E. Toes, A. K. Nussbaum, S. Degermann, M. Schirle, N. P. Emmerich, M. Kraft, C. Laplace, A. Zwinderman, T. P. Dick, J. Müller, B. Schonfisch, C. Schmid, H. J. Fehling, S. Stevanović, H. G. Rammensee, and H. Schild. Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J. Exp. Med.*, 194(1):1–12, 2001.
- [581] M. Tomida, H. Ohtake, T. Yokota, Y. Kobayashi, and M. Kurosumi. Stat3 up-regulates expression of nicotinamide N-methyltransferase in human cancer cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2007.
- [582] S. L. Topalian, D. Solomon, F. P. Avis, A. E. Chang, D. L. Freerksen, W. M. Linehan, M. T. Lotze, C. N. Robertson, C. A. Seipp, P. Simon, and . Immunotherapy of patients with advanced cancer using tumor-infiltrating lymphocytes and recombinant interleukin-2: a pilot study. *J. Clin. Oncol.*, 6(5):839–853, 1988.
- [583] D. K. Trask, V. Band, D. A. Zajchowski, P. Yaswen, T. Suh, and R. Sager. Keratins as markers that distinguish normal and tumor-derived mammary epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 87(6):2319–2323, 1990.

- [584] C. Traversari, B. P. van der, I. F. Luescher, C. Lurquin, P. Chomez, A. V. Pel, E. D. Plaen, A. Amar-Costesec, and T. Boon. A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E. *J Exp. Med.*, 176(5):1453–1457, 1992.
- [585] G. Tsaprailis, H. Nair, A. Somogyi, V. H. Wysocki, W. Zhong, J. H. Futrell, S. G. Summerfield, and S. J. GASKELL. Influence of Secondary Structure on the Fragmentation of Protonated Peptides. *J. Am. Chem. Soc.*, 121(22):5142–5154, 1999.
- [586] E. Tsuji, Y. Tsuji, T. Fujiwara, S. Ogata, K. Tsukamoto, and K. Saku. Splicing variant of Cdc42 interacting protein-4 disrupts beta-catenin-mediated cell-cell adhesion: expression and function in renal cell carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 339(4):1083–1088, 2006.
- [587] M. Tsukada and Y. Ohsumi. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, 333(1-2):169–174, 1993.
- [588] L. C. Tu, X. Yan, L. Hood, and B. Lin. Proteomics analysis of the interactome of N-myc downstream regulated gene 1 and its interactions with the androgen response program in prostate cancer cells. *Mol. Cell Proteomics.*, 6(4):575–588, 2007.
- [589] G. Udhayakumar, V. Jayanthi, N. Devaraj, and H. Devaraj. Interaction of MUC1 with beta-catenin modulates the Wnt target gene cyclinD1 in *H. pylori*-induced gastric cancer. *Mol. Carcinog.*, 46(9):807–817, 2007.
- [590] H. Uemura, Y. Nakagawa, K. Yoshida, S. Saga, K. Yoshikawa, Y. Hirao, and E. Oosterwijk. MN/CA IX/G250 as a potential target for immunotherapy of renal cell carcinomas. *Br. J Cancer*, 81(4):741–746, 1999.
- [591] H. Uemura, K. Fujimoto, M. Tanaka, M. Yoshikawa, Y. Hirao, S. Uejima, K. Yoshikawa, and K. Itoh. A phase I trial of vaccination of CA9-derived peptides for HLA-A24-positive patients with cytokine-refractory metastatic renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 12(6):1768–1775, 2006.
- [592] J. B. Ulmer, J. J. Donnelly, S. E. Parker, G. H. Rhodes, P. L. Felgner, V. J. Dwarki, S. H. Gromkowski, R. R. Deck, C. M. DeWitt, A. Friedman, and . Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*, 259(5102):1745–1749, 1993.
- [593] J. B. Ulmer, R. R. Deck, C. M. DeWitt, J. J. Donnelly, A. Friedman, D. L. Montgomery, A. M. Yawman, I. M. Orme, O. Denis, J. Content, K. Huygen, and M. A. Liu. Induction of immunity by DNA vaccination: application to influenza and tuberculosis. *Behring Inst. Mitt.*, 98:79–86, 1997.
- [594] W. Ulrix, J. V. Swinnen, W. Heyns, and G. Verhoeven. The differentiation-related gene 1, *Drg1*, is markedly upregulated by androgens in LNCaP prostatic adenocarcinoma cells. *FEBS Lett.*, 455(1-2):23–26, 1999.
- [595] K. Unno, P. R. Juvvadi, H. Nakajima, K. Shirahige, and K. Kitamoto. Identification and characterization of *rns4/vps32* mutation in the RNase T1 expression-sensitive strain of *Saccharomyces cerevisiae*: Evidence for altered ambient response resulting in transportation of the secretory protein to vacuoles. *FEMS Yeast Res.*, 5(9):801–812, 2005.
- [596] J. Vakkila and M. T. Lotze. Inflammation and necrosis promote tumour growth. *Nat. Rev. Immunol.*, 4(8):641–648, 2004.
- [597] D. Valmori, V. Dutoit, M. Ayyoub, D. Rimoldi, P. Guillaume, D. Lienard, F. Lejeune, J. C. Cerottini, P. Romero, and D. E. Speiser. Simultaneous CD8+ T cell responses to multiple tumor antigen epitopes in a multi-peptide melanoma vaccine. *Cancer Immun.*, 3:15, 2003.
- [598] A. van Dalen. Significance of cytokeratin markers TPA, TPA (cyk), TPS and CYFRA 21.1 in metastatic disease. *Anticancer Res.*, 16(4B):2345–2349, 1996.
- [599] G. J. van den Bemd, J. Krijgsveld, T. M. Luider, A. L. van Rijswijk, J. A. Demmers, and G. Jenster. Mass spectrometric identification of human prostate cancer-derived proteins in serum of xenograft-bearing mice. *Mol. Cell Proteomics.*, 5(10):1830–1839, 2006.
- [600] B. P. van der, C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, E. D. Plaen, E. B. V. den, A. Knuth, and T. Boon. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, 254(5038):1643–1647, 1991.
- [601] B. P. van der, Y. Zhang, P. Chaux, V. Stroobant, C. Panichelli, E. S. Schultz, J. Chapiro, B. J. V. D. Eynde, F. Brasseur, and T. Boon. Tumor-specific shared antigenic peptides recognized by human T cells. *Immunol. Rev.*, 188:51–64, 2002.
- [602] S. M. van Ham, E. P. Tjin, B. F. Lillemeier, U. Gruneberg, K. E. van Meijgaarden, L. Pastoors, D. Verwoerd, A. Tulp, B. Canas, D. Rahman, T. H. Ottenhoff, D. J. Pappin, J. Trowsdale, and J. Neefjes. HLA-DO is a negative modulator of HLA-DM-mediated MHC class II peptide loading. *Curr. Biol.*, 7(12):950–957, 1997.

- [603] S. van Nocker and P. Ludwig. The WD-repeat protein superfamily in Arabidopsis: conservation and divergence in structure and function. *BMC. Genomics*, 4(1):50, 2003.
- [604] D. A. van Sluijters, P. F. Dubbelhuis, E. F. Blommaart, and A. J. Meijer. Amino-acid-dependent signal transduction. *Biochem. J.*, 351 Pt 3:545–550, 2000.
- [605] H. Veelken, A. Mackensen, M. Lahn, G. Kohler, D. Becker, B. Franke, U. Brennscheidt, P. Kulmburg, F. M. Rosenthal, H. Keller, J. Hasse, W. Schultze-Seemann, E. H. Farthmann, R. Mertelsmann, and A. Lindemann. 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(3):269–277, 1997.
- [606] N. Verra, D. de Jong, A. Bex, D. Batchelor, T. DelleMijn, J. Sein, W. Nooijen, W. Meinhardt, S. Horenblas, G. de Gast, and F. Vyth-Dreese. Infiltration of activated dendritic cells and T cells in renal cell carcinoma following combined cytokine immunotherapy. *Eur. Urol.*, 48(3):527–533, 2005.
- [607] N. Vigneron, V. Stroobant, J. Chapiro, A. Ooms, G. Degiovanni, S. Morel, B. P. van der, T. Boon, and B. J. V. D. Eynde. An antigenic peptide produced by peptide splicing in the proteasome. *Science*, 304(5670):587–590, 2004.
- [608] J. L. Vissers, I. J. D. Vries, M. W. Schreurs, L. P. Engelen, E. Oosterwijk, C. G. Figdor, and G. J. Adema. 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(21):5554–5559, 1999.
- [609] J. L. Vissers, I. J. D. Vries, L. P. Engelen, N. M. Scharenborg, J. Molkenboer, C. G. Figdor, E. Oosterwijk, and G. J. Adema. Renal cell carcinoma-associated antigen G250 encodes a naturally processed epitope presented by human leukocyte antigen-DR molecules to CD4(+) T lymphocytes. *Int J Cancer*, 100(4):441–444, 2002.
- [610] R. H. Vonderheide, W. C. Hahn, J. L. Schultze, and L. M. Nadler. The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity.*, 10(6):673–679, 1999.
- [611] J. W. A. Dunn. Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends Cell Biol.*, 4(4):139–143, 1994.
- [612] P. R. Walker, P. Saas, and P. Y. Dietrich. Role of Fas ligand (CD95L) in immune escape: the tumor cell strikes back. *J. Immunol.*, 158(10):4521–4524, 1997.
- [613] Y. Wan, J. Bramson, R. Carter, F. Graham, and J. Gauldie. Dendritic cells transduced with an adenoviral vector encoding a model tumor-associated antigen for tumor vaccination. *Hum. Gene Ther.*, 8(11):1355–1363, 1997.
- [614] C. W. Wang and D. J. Klionsky. The molecular mechanism of autophagy. *Mol. Med.*, 9(3-4):65–76, 2003.
- [615] C. Y. Wang, M. W. Mayo, R. G. Korneluk, D. V. Goeddel, and J. A. S. Baldwin. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*, 281(5383):1680–1683, 1998.
- [616] F. Wang, E. Bade, C. Kuniyoshi, L. Spears, G. Jeffery, V. Marty, S. Groshen, and J. Weber. Phase I trial of a MART-1 peptide vaccine with incomplete Freund’s adjuvant for resected high-risk melanoma. *Clin. Cancer Res.*, 5(10):2756–2765, 1999.
- [617] H. Y. Wang and R. F. Wang. Regulatory T cells and cancer. *Curr. Opin. Immunol.*, 19(2):217–223, 2007.
- [618] H. Y. Wang, J. Zhou, K. Zhu, A. I. Riker, F. M. Marincola, and R. F. Wang. Identification of a mutated fibronectin as a tumor antigen recognized by CD4+ T cells: its role in extracellular matrix formation and tumor metastasis. *J Exp. Med.*, 195(11):1397–1406, 2002.
- [619] H. Y. Wang, D. A. Lee, G. Peng, Z. Guo, Y. Li, Y. Kiniwa, E. M. Shevach, and R. F. Wang. Tumor-specific human CD4+ regulatory T cells and their ligands: implications for immunotherapy. *Immunity.*, 20(1):107–118, 2004.
- [620] R. F. Wang, M. R. Parkhurst, Y. Kawakami, P. F. Robbins, and S. A. Rosenberg. Utilization of an alternative open reading frame of a normal gene in generating a novel human cancer antigen. *J. Exp. Med.*, 183(3):1131–1140, 1996.
- [621] R. F. Wang, X. Wang, A. C. Atwood, S. L. Topalian, and S. A. Rosenberg. Cloning genes encoding MHC class II-restricted antigens: mutated CDC27 as a tumor antigen. *Science*, 284(5418):1351–1354, 1999.
- [622] M. P. Washburn, A. Koller, G. Oshiro, R. R. Ulaszek, D. Plouffe, C. Deciu, E. Winzeler, and I. J. R. Yates. Protein pathway and complex clustering of correlated mRNA and protein expression analyses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100(6):3107–3112, 2003.



- [623] C. Watts, C. X. Moss, D. Mazzeo, M. A. West, S. P. Matthews, D. N. Li, and B. Manoury. Creation versus destruction of T cell epitopes in the class II MHC pathway. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 987:9–14, 2003.
- [624] K. Weber, M. Osborn, R. Moll, B. Wiklund, and B. Luning. Tissue polypeptide antigen (TPA) is related to the non-epidermal keratins 8, 18 and 19 typical of simple and non-squamous epithelia: re-evaluation of a human tumor marker. *EMBO J*, 3(11):2707–2714, 1984.
- [625] T. Weinschenk, C. Gouttefangeas, M. Schirle, F. Obermayr, S. Walter, O. Schoor, R. Kurek, W. Loeser, K. H. Bichler, D. Wernet, S. Stevanović, and H. G. Rammensee. Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. *Cancer Res.*, 62(20):5818–5827, 2002.
- [626] A. O. Weinzierl. Quantitativer Vergleich von Transkriptom und HLA-Ligandom in Tumoren. 2004.
- [627] A. O. Weinzierl. *Neue Ansätze in der Tumorimmunologie: Implikationen aus der massenspektrometrischen Analyse von HLA-Liganden*. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie, 2008.
- [628] A. O. Weinzierl, C. Lemmel, O. Schoor, M. Müller, T. Krüger, D. Wernet, J. Hennenlotter, A. Stenzl, K. Klingel, H. G. Rammensee, and S. Stevanović. Distorted relation between mRNA copy number and corresponding major histocompatibility complex ligand density on the cell surface. *Mol. Cell Proteomics.*, 6(1):102–113, 2007.
- [629] M. J. Welters, M. S. Bijker, S. J. van den Eeden, K. L. Franken, C. J. Melief, R. Offringa, and S. H. van der Burg. Multiple CD4 and CD8 T-cell activation parameters predict vaccine efficacy in vivo mediated by individual DC-activating agonists. *Vaccine*, 25(8):1379–1389, 2007.
- [630] T. Wenzel, C. Eckerskorn, F. Lottspeich, and W. Baumeister. Existence of a molecular ruler in proteasomes suggested by analysis of degradation products. *FEBS Lett.*, 349(2):205–209, 1994.
- [631] B. Werf-Messing, R. O. van der Heul, and R. C. Ledebor. Renal cell carcinoma trial. *Strahlentherapie. [Sonderb. ]*, 76:169–175, 1981.
- [632] W. Wickner. Yeast vacuoles and membrane fusion pathways. *EMBO J.*, 21(6):1241–1247, 2002.
- [633] J. Wierecky, M. Müller, and P. Brossart. Dendritic cell-based cancer immunotherapy targeting MUC-1. *Cancer Immunol. Immunother.*, 55(1):63–67, 2006.
- [634] J. Wierecky, M. R. Müller, S. Wirths, E. Halder-Oehler, D. Dörfel, S. M. Schmidt, M. Häntschel, W. Brugger, S. Schroder, M. S. Horgler, L. Kanz, and P. Brossart. Immunologic and clinical responses after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells in metastatic renal cancer patients. *Cancer Res.*, 66(11):5910–5918, 2006.
- [635] M. S. Wilm and M. Mann. Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole’s beam of macromolecules at last? *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 136(2-3):167–180, 1994.
- [636] M. S. Wilm and M. Mann. Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal. Chem.*, 68(1):1–8, 1996.
- [637] C. L. Wilson and L. M. Matrisian. Matrilysin: an epithelial matrix metalloproteinase with potentially novel functions. *Int J Biochem. Cell Biol.*, 28(2):123–136, 1996.
- [638] A. M. Wolf, D. Wolf, M. Steurer, G. Gastl, E. Gunsilius, and B. Grubeck-Loebenstein. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin. Cancer Res.*, 9(2):606–612, 2003.
- [639] T. Wolfel, A. V. Pel, V. Brichard, J. Schneider, B. Seliger, K. H. M. zum Buschenfelde, and T. Boon. Two tyrosinase nonapeptides recognized on HLA-A2 melanomas by autologous cytolytic T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, 24(3):759–764, 1994.
- [640] T. Wolfel, M. Hauer, J. Schneider, M. Serrano, C. Wolfel, E. Klehmann-Hieb, E. D. Plaen, T. Hankeln, K. H. M. zum Buschenfelde, and D. Beach. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science*, 269(5228):1281–1284, 1995.
- [641] J. M. Wong, K. Mafune, H. Yow, E. N. Rivers, T. S. Ravikumar, J. G. D. Steele, and L. B. Chen. Ubiquitin-ribosomal protein S27a gene overexpressed in human colorectal carcinoma is an early growth response gene. *Cancer Res.*, 53(8):1916–1920, 1993.
- [642] E. Y. Woo, H. Yeh, C. S. Chu, K. Schlienger, R. G. Carroll, J. L. Riley, L. R. Kaiser, and C. H. June. Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J. Immunol.*, 168(9):4272–4276, 2002.

- [643] T. Worzfeld, A. W. Puschel, S. Offermanns, and R. Kuner. Plexin-B family members demonstrate non-redundant expression patterns in the developing mouse nervous system: an anatomical basis for morphogenetic effects of Sema4D during development. *Eur. J Neurosci.*, 19(10):2622–2632, 2004.
- [644] T. C. Wu. The role of vascular cell adhesion molecule-1 in tumor immune evasion. *Cancer Res.*, 67(13):6003–6006, 2007.
- [645] H. Wunderlich, S. Schumann, V. Jantitzky, P. Moravek, M. Podhola, H. Kosmehl, and J. Schubert. Increase of renal cell carcinoma incidence in central Europe. *Eur. Urol.*, 33(6):538–541, 1998.
- [646] V. H. Wysocki, G. Tsapralis, L. L. Smith, and L. A. Breci. Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation. *J Mass Spectrom.*, 35(12):1399–1406, 2000.
- [647] P. X. Xing, J. Prenzoska, and I. F. McKenzie. Epitope mapping of anti-breast and anti-ovarian mucin monoclonal antibodies. *Mol. Immunol.*, 29(5):641–650, 1992.
- [648] J. Xu, F. Moatamed, J. S. Caldwell, J. R. Walker, Z. Kraiem, K. Taki, G. A. Brent, and J. M. Hershman. Enhanced expression of nicotinamide N-methyltransferase in human papillary thyroid carcinoma cells. *J Clin. Endocrinol. Metab.*, 88(10):4990–4996, 2003.
- [649] L. Xue, G. C. Fletcher, and A. M. Tolkovsky. Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: an alternative mechanism of death execution. *Mol. Cell Neurosci.*, 14(3):180–198, 1999.
- [650] L. Xue, V. Borutaite, and A. M. Tolkovsky. Inhibition of mitochondrial permeability transition and release of cytochrome c by anti-apoptotic nucleoside analogues. *Biochem. Pharmacol.*, 64(3):441–449, 2002.
- [651] A. Yagoda, B. Abi-Rached, and D. Petrylak. Chemotherapy for advanced renal-cell carcinoma: 1983-1993. *Semin. Oncol.*, 22(1):42–60, 1995.
- [652] J. S. Yakisich and G. M. Kapler. The effect of phosphoinositide 3-kinase inhibitors on programmed nuclear degradation in *Tetrahymena* and fate of surviving nuclei. *Cell Death. Differ.*, 11(10):1146–1149, 2004.
- [653] T. Yalcin, C. Khouw, I. G. Csizmadia, M. R. Peterson, and A. G. Harrison. Why Are B Ions Stable Species in Peptide Spectra? *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 6(12):1165–1174, 1995.
- [654] H. S. Yang, C. P. Matthews, T. Clair, Q. Wang, A. R. Baker, C. C. Li, T. H. Tan, and N. H. Colburn. Tumorigenesis suppressor Pdc4 down-regulates mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 expression to suppress colon carcinoma cell invasion. *Mol. Cell Biol.*, 26(4):1297–1306, 2006.
- [655] J. C. Yang, L. Haworth, R. M. Sherry, P. Hwu, D. J. Schwartzentruber, S. L. Topalian, S. M. Steinberg, H. X. Chen, and S. A. Rosenberg. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N. Engl. J. Med.*, 349(5):427–434, 2003.
- [656] M. Yao, H. Tabuchi, Y. Nagashima, M. Baba, N. Nakaigawa, H. Ishiguro, K. Hamada, Y. Inayama, T. Kishida, K. Hattori, H. Yamada-Okabe, and Y. Kubota. Gene expression analysis of renal carcinoma: adipose differentiation-related protein as a potential diagnostic and prognostic biomarker for clear-cell renal carcinoma. *J Pathol.*, 205(3):377–387, 2005.
- [657] M. Yao, Y. Huang, K. Shioi, K. Hattori, T. Murakami, N. Nakaigawa, T. Kishida, Y. Nagashima, and Y. Kubota. Expression of adipose differentiation-related protein: a predictor of cancer-specific survival in clear cell renal carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 13(1):152–160, 2007.
- [658] J. W. Yewdell and J. R. Bennink. Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses. *Annu. Rev. Immunol.*, 17:51–88, 1999.
- [659] J. W. Yewdell, L. C. Anton, and J. R. Bennink. Defective ribosomal products (DRiPs): a major source of antigenic peptides for MHC class I molecules? *J. Immunol.*, 157(5):1823–1826, 1996.
- [660] J. W. Yewdell, U. Schubert, and J. R. Bennink. At the crossroads of cell biology and immunology: DRiPs and other sources of peptide ligands for MHC class I molecules. *J. Cell Sci.*, 114(Pt 5):845–851, 2001.
- [661] T. Yorimitsu and D. J. Klionsky. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death. Differ.*, 12 Suppl 2:1542–1552, 2005.
- [662] K. Yoshimoto, H. Hanaoka, S. Sato, T. Kato, S. Tabata, T. Noda, and Y. Ohsumi. Processing of ATG8s, ubiquitin-like proteins, and their deconjugation by ATG4s are essential for plant autophagy. *Plant Cell*, 16(11):2967–2983, 2004.

- [663] K. Yoshimura, M. Shibata, M. Koike, K. Gotoh, M. Fukaya, M. Watanabe, and Y. Uchiyama. Effects of RNA interference of Atg4B on the limited proteolysis of LC3 in PC12 cells and expression of Atg4B in various rat tissues. *Autophagy*, 2(3):200–208, 2006.
- [664] T. Yoshio, T. Morita, Y. Kimura, M. Tsujii, N. Hayashi, and K. Sobue. Caldesmon suppresses cancer cell invasion by regulating podosome/invadopodium formation. *FEBS Lett.*, 581(20):3777–3782, 2007.
- [665] P. Yotnda, H. Firat, F. Garcia-Pons, Z. Garcia, G. Gourru, J. P. Vernant, F. A. Lemonnier, V. Leblond, and P. Langlade-Demoyen. Cytotoxic T cell response against the chimeric p210 BCR-ABL protein in patients with chronic myelogenous leukemia. *J Clin. Invest.*, 101(10):2290–2296, 1998.
- [666] A. N. Young, M. B. Amin, C. S. Moreno, S. D. Lim, C. Cohen, J. A. Petros, F. F. Marshall, and A. S. Neish. Expression profiling of renal epithelial neoplasms: a method for tumor classification and discovery of diagnostic molecular markers. *Am. J Pathol.*, 158(5):1639–1651, 2001.
- [667] A. R. Younger, S. Amria, W. A. Jeffrey, A. E. Mahdy, O. G. Goldstein, J. S. Norris, and A. Haque. HLA class II antigen presentation by prostate cancer cells. *Prostate Cancer Prostatic. Dis.*, 2007.
- [668] S. Yousefi, R. Perozzo, I. Schmid, A. Ziemiecki, T. Schaffner, L. Scapozza, T. Brunner, and H. U. Simon. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat. Cell Biol.*, 8(10):1124–1132, 2006.
- [669] D. Yu, M. C. Cook, D. M. Shin, D. G. Silva, J. Marshall, K. M. Toellner, W. L. Havran, P. Caroni, M. P. Cooke, H. C. Morse, I. C. MacLennan, C. C. Goodnow, and C. G. Vinuesa. Axon growth and guidance genes identify T-dependent germinal centre B cells. *Immunol. Cell Biol.*, 86(1):3–14, 2008.
- [670] H. Yu and T. Rohan. Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J Natl. Cancer Inst.*, 92(18):1472–1489, 2000.
- [671] L. Yu, A. Alva, H. Su, P. Dutt, E. Freundt, S. Welsh, E. H. Baehrecke, and M. J. Lenardo. Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science*, 304(5676):1500–1502, 2004.
- [672] A. H. Zea, P. C. Rodriguez, M. B. Atkins, C. Hernandez, S. Signoretti, J. Zabaleta, D. McDermott, D. Quiceno, A. Youmans, A. O'Neill, J. Mier, and A. C. Ochoa. Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res.*, 65(8):3044–3048, 2005.
- [673] Y. Zhang, V. Stroobant, V. Russo, T. Boon, and B. P. van der. A MAGE-A4 peptide presented by HLA-B37 is recognized on human tumors by cytolytic T lymphocytes. *Tissue Antigens*, 60(5):365–371, 2002.
- [674] U. Zimmermann, S. Balabanov, J. Giebel, S. Teller, H. Junker, D. Schmoll, C. Protzel, C. Scharf, B. Kleist, and R. Walther. Increased expression and altered location of annexin IV in renal clear cell carcinoma: a possible role in tumour dissemination. *Cancer Lett.*, 209(1):111–118, 2004.
- [675] E. Zorn and T. Hercend. A natural cytotoxic T cell response in a spontaneously regressing human melanoma targets a neoantigen resulting from a somatic point mutation. *Eur. J Immunol.*, 29(2):592–601, 1999.

## 8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt **Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee** und **Prof. Dr. Stefan Stevanović**, die mich seit meiner Hiwi- und Praktikantenzeit wissenschaftlich gefördert und betreut haben.

Die vielseitigen Experimente wären nicht möglich gewesen ohne die gute Zusammenarbeit, die Unterstützung und motivierenden Worte von folgenden Kooperationspartnern:

**Prof. Dr. Arnulf Stenzl** und **Jörg Hennenlotter** (Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen) einen herzlichen Dank für die reibungslose Versorgung mit Tumormaterial, **Herrn Dr. Bonin** (Microarray Facility, Universität Tübingen) gilt Dank für die Zusammenarbeit zur Auswertung der RNA-Mikroarrays, **Prof. Dr. Christian Münz** und **Dr. Dorothee Schmid** (The Rockefeller University, New York, USA), **Dr. Jörn Dengjel** (University of Southern Denmark, Odense, Dänemark) sowie **Dr. Tassula Proikas-Cezanne** (Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen) vielen Dank für einige Reagenzien und die Tipps und Diskussionen über Autophagie, **Dr. Günther Roth** (Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen) vielen Dank für die große Hilfsbereitschaft bei der Einführung und den Messungen an den Mikroskopen und **Alexander Ganser** (Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen) für die Unterstützung bei den ersten mikroskopischen Aufnahmen, **Dr. York-Dieter Stierhof** (ZMBP, Universität Tübingen) Danke für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen, **Dr. Markus Templin** und **Dr. Thomas Joos** (NMI, Reutlingen) gilt großer Dank für einige anregende Diskussionen rund um alle Mikroarray-Projekte, und vor allem auch **Thomas Knorpp** (NMI, Reutlingen) für all die Zeit, die Geduld, die gründliche Einführung in die Welt der Mikroarrays und die vielen Diskussionen unserer Arbeit.

Im Labor möchte ich ganz besonders danken:

Dem MS-Team **Andi, Claudia, Florian, Jörn, Martin, Nina, Oli, Toni, Verena** - ohne das Team hätte ich nur halb so viele Peptide und halb so viel Abwechslung gehabt. Allen Medizin-Doktoranden, **Maik, Tobias, Ute, Christian, Björn, Tobias, Gitsi, Anna, Juli** ein Dankeschön für die vielen Tumor-Aufarbeitungen. **Oli** und **Mathias** für die Probenaufarbeitung und Auswertung der RNA-Mikroarrays. **Siggi** und **Birsen** für die Zellkultur und allen weiteren Kollegen der Abteilung für das ein oder andere Reagenz, Ratschläge und den abwechslungsreichen Laboralltag.

Dann gab es da so einige gute Seelen im Hintergrund, die mit stets zuverlässiger, freundlicher Art dafür sorgen, dass vieles so selbstverständlich erscheint, was ohne sie so gar nicht funktionieren würde. Deshalb ihnen ganz herzlichen Dank:

**Hannes Planatscher**, dessen Engagement für unsere Datenbank einfach unersetzbar war, ist und bleibt, **Mathias Wenzel** für die stete Hilfsbereitschaft bei allen Computerfragen, **Claudia Falkenburger**, **Franziska Löwenstein**, **Beate Pömmerl** und **Patricia Hrstić** für literweise Medium, unzählige Mengen Antikörper, saubere Gefäße und Pitpettenspitzen, die Hilfe bei DNA-Fragen und Reparaturen aller Art und allgemeine Unterstützung im Labor. **Lynne Yakes** und **Gerhard Hörr**, die guten stillen Organisations- und Zahlengeister der Abteilung.

Außerhalb des Labors geht mein Dank an meine Freunde und Familie, deren Vertrauen und Rückhalt mir so unendlich viel bedeutet.

## 9 Publikationsliste

Lang KS, Moris A, Gouttefangeas C, Walter S, Teichgraber V, **Miller M**, Wernet D, Hamprecht K, Rammensee HG, Stevanovic S. High frequency of human cytomegalovirus (HCMV)-specific CD8+ T cells detected in a healthy CMV-seropositive donor. *Cell Mol. Life Sci.*, 59(6):1076-80, 2002.

Tenzer S, Stoltze L, Schonfisch B, Dengjel J, **Muller M**, Stevanovic S, Rammensee HG, Schild H. Quantitative analysis of prion-protein degradation by constitutive and immuno-20S proteasomes indicates differences correlated with disease susceptibility. *J. Immunol.*, 172(2):1083-91, 2004.

Kruger T, Schoor O, Lemmel C, Kraemer B, Reichle C, Dengjel J, Weinschenk T, **Muller M**, Hennenlotter J, Stenzl A, Rammensee HG, Stevanovic S. Lessons to be learned from primary renal cell carcinomas: novel tumor antigens and HLA ligands for immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.*, 54(9):826-36, 2005. Epub 2004 Dec 31.

Dengjel J, Schoor O, Fischer R, Reich M, Kraus M, **Muller M**, Kreymborg K, Altenberend F, Brandenburg J, Kalbacher H, Brock R, Driessen C, Rammensee HG, Stevanovic S. Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102(22):7922-7, 2005. Epub 2005 May 13.

Kramer BF, Schoor O, Kruger T, Reichle C, **Muller M**, Weinschenk T, Hennenlotter J, Stenzl A, Rammensee HG, Stevanovic S. MAGED4-expression in renal cell carcinoma and identification of an HLA-A\*25-restricted MHC class I ligand from solid tumor tissue. *Cancer Biol. Ther.*, 4(9):943-8, 2005. Epub 2005 Sep 8.

Baechle D, Flad T, Cansier A, Steffen H, Schitteck B, Tolson J, Herrmann T, Dihazi H, Beck A, Mueller GA, **Mueller M**, Stevanovic S, Garbe C, Mueller CA, Kalbacher H. Cathepsin D is present in human eccrine sweat and involved in the postsecretory processing of the antimicrobial peptide DCD-1L. *J. Biol. Chem.*, 281(9):5406-15, 2006. Epub 2005 Dec 14.

Dengjel J, Nastke MD, Gouttefangeas C, Gitsioudis G, Schoor O, Altenberend F, **Muller M**, Kramer B, Missiou A, Sauter M, Hennenlotter J, Wernet D, Stenzl A, Rammensee HG, Klingel K, Stevanovic S. Unexpected abundance of HLA class II presented peptides in primary renal cell carcinomas. *Clin. Cancer Res.*, 12(14):4163-70, 2006.

Ruckrich T, Brandenburg J, Cansier A, **Muller M**, Stevanovic S, Schilling K, Wiederanders B, Beck A, Melms A, Reich M, Driessen C, Kalbacher H. Specificity of human cathepsin S determined by processing of peptide substrates and MHC class II-associated invariant chain. *Biol Chem.*, 387(10-11):1503-11, 2006.

Weinzierl AO, Lemmel C, Schoor O, **Muller M**, Kruger T, Wernet D, Hennenlotter J, Stenzl A, Klingel K, Rammensee HG, Stevanovic S. Distorted relation between mRNA copy number and corresponding major histocompatibility complex ligand density on the cell surface. *Mol. Cell. Proteomics.*, 6(1):102-13

2007. Epub 2006 Oct 29.

Asemissen AM, Keilholz U, Tenzer S, **Müller M**, Walter S, Stevanovic S, Schild H, Letsch A, Thiel E, Rammensee HG, Scheibenbogen C. Identification of a highly immunogenic HLA-A\*01-binding T cell epitope of WT1. *Clin. Cancer Res.*, 12(24):7476-82, 2006.

Hillen N, Mester G, Lemmel C, Weinzierl AO, **Müller M**, Wernet D, Hennenlotter J, Stenzl A, Rammensee HG, Stevanovic S. Drastic differences in ligand presentation and T cell epitope recognition among HLA molecules of the HLA-B44 supertype. submitted.

Kloor D, Hermes M, Kirschler J, **Müller M**, Hagen N, Kalbacher H, Stevanovic S, Osswald H. Identification of the cAMP binding site at the S-adenosylhomocysteine-hydrolase: A new target for PKA independent cAMP action. submitted.

## 10 Lebenslauf

Name:	Margret Müller
Geburtsdatum, -ort	29. April 1976, Berlin
1982 - 1986	Besuch der Birger-Forell-Grundschule, Berlin-Wilmersdorf
1986 - 1995	Besuch des Canisius Kollegs (Gymnasium), Berlin-Tiergarten
1992 - 1993	Besuch der McDonogh High School in Baltimore, MD, USA
10/ 1995 - 07/ 1996	Besuch des Leibniz Kollegs, Tübingen
10/ 1996 - 03/ 1999	Grundstudium im Studiengang Medizin und Abschluss der Ärztlichen Vorprüfung an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
04/ 1999 - 09/ 2000	Grundstudium und Erlangen des Vordiploms im Studiengang Diplom Biologie an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
10/ 2000 - 09/ 2003	Hauptstudium im Studiengang Diplom Biologie an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
09/ 2001 - 07/ 2002	Auslandsstudium an der University of Oregon, Eugene, OR, USA
07/ 2003 - 09/ 2003	Diplomhauptprüfungen in den Fächern Biochemie, Mikrobiologie, Zellbiologie/ Immunologie
10/ 2003 - 06/ 2004	Diplomarbeit am Interfakultären Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen. Thema: Strategien zur Bestimmung von HLA-Peptidmotiven und zur Etablierung von T-Zellepitopvorhersagen
07/ 2004 - 12/ 2007	Promotionsarbeit am Interfakultären Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen. Thema: HLA-Ligandom- und Expressions-Analyse von Tumor- und Autophagie-assoziierten Antigenen in soliden Tumoren und Zelllinien