

Aus dem Interfakultären Institut für Zellbiologie
der Universität Tübingen
Abteilung Immunologie
Abteilungsleiter Professor Dr. Hans-Georg Rammensee

**Isolierung und Analyse von HLA-Klasse-I-Liganden aus
soliden Tumoren und Tumorzelllinien**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Margarete Susanne Pick
aus Tübingen 2003

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen
1. Berichterstatter: Professor Dr. H.-G. Rammensee
2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Pawelec

Meiner Mutter und meinen Brüdern

Ich versichere, daß ich die der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel „Isolierung und Analyse von HLA-Klasse-I-Liganden aus soliden Tumoren und Tumorzelllinien“ im Interfakultären Institut für Zellbiologie in der Abteilung Immunologie unter Leitung von Prof. Dr. H.-G. Rammensee selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel durchgeführt habe.

Diese Dissertation wurde bei keiner anderen akademischen oder staatlichen Prüfung verwendet.

Von mir wurde noch kein anderer Versuch auf Zulassung zum Promotionsverfahren unternommen.

Tübingen, den 30.04.2001

Margarete Pick

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Das Immunsystem | 1 |
| 1.1.1 Zellen des Immunsystems | 1 |
| 1.1.1.1 Lymphozyten | 2 |
| 1.1.1.1.1 B-Lymphozyten und ihre Aktivierung | 2 |
| 1.1.1.1.2 T-Lymphozyten und ihre Aktivierung | 3 |
| 1.1.1.2 APC (antigen presenting cells) | 4 |
| 1.1.2 Die Funktion der MHC-Moleküle (major histocompatibility complex) | 5 |
| 1.1.2.1 MHC-Klasse-I-Moleküle | 6 |
| 1.1.2.2 Bindungseigenschaften eines MHC-Klasse-I-Liganden | 8 |
| 1.1.2.3 Epitopvorhersage | 10 |
| 1.1.3 Antigenprozessierung für MHC-Klasse-I-Moleküle | 11 |
| 1.1.3.1 Das Proteasom | 11 |
| 1.1.3.2 Der TAP (transporter associated with antigen processing) | 12 |
| 1.1.3.3 Peptidprozessierung im ER (Endoplasmatisches Retikulum) | 13 |
| 1.1.3.4 Selektion der Peptide | 14 |
| 1.1.4 Tumorimmunologie | 14 |
| 1.1.4.1 Tumorzellen entziehen sich der Immunüberwachung | 15 |
| 1.1.4.2 Tumorantigene | 16 |
| 1.1.4.3 Spezifische Tumorimmuntherapie | 19 |
| 1.1.4.4 Probleme einer antigenspezifischen Immuntherapie | 20 |
| 1.2 Zielsetzung der Arbeit | 20 |
| 2 Material und Methoden | 22 |
| 2.1 Tumore von Patienten | 22 |
| 2.2 Zellbiologische Methoden | 22 |
| 2.2.1 Zelllinien | 22 |
| 2.2.2 Kultivierung von Zelllinien | 23 |
| 2.2.3 Ernten von Zellen | 23 |
| 2.2.4 Bestimmung der Lebendzellzahl | 23 |
| 2.2.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen | 24 |
| 2.3 Immunologische und biochemische Methoden | 24 |
| 2.3.1 Antikörperreinigung aus Hybridomüberstand | 24 |
| 2.3.2 Entsorgung der Azidlösungen | 25 |
| 2.3.3 Durchflußzytometrie | 25 |
| 2.3.4 FACS-Assay | 26 |
| 2.3.5 MHC-Stabilisierungsassay | 26 |
| 2.3.6 Säureextraktion von MHC-I-Liganden | 27 |
| 2.3.6.1 Herstellung einer Affinitätssäule | 27 |
| 2.3.6.2 Immunpräzipitation von MHC-Molekülen | 28 |
| 2.3.6.3 Säureextraktion | 28 |
| 2.3.6.4 Fraktionierung mittels Reversed-Phase HPLC | 29 |
| 2.3.6.5 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen | 29 |
| 2.4 Analytische Verfahren | 31 |
| 2.4.1 MALDI (Matrix-unterstützte Laserdesorptions-Ionisierung) | 31 |
| 2.4.2 Edman-Sequenzierung | 31 |
| 2.4.3 HPLC-(Electrospray-)mass spectrometry (Q-ToF) | 32 |
| 2.5 Herstellung einer Eichpeptidmischung | 32 |
| 2.5.1 Epitopvorhersage für Proteinantigene eines Tumors | 32 |
| 2.5.2 Peptidsynthese | 33 |
| 2.5.3 Reinigung und Analyse der synthetisch hergestellten Peptide | 33 |
| 2.6 Proteasomschnittvorhersage | 34 |

| | |
|---|-----------|
| 3 Ergebnisse | 36 |
| 3.1 Melanom | 36 |
| 3.1.1 HLA-A*0201 restringierte Eichpeptidmischung | 36 |
| 3.1.1.1 Epitopvorhersage für Melanome | 36 |
| 3.1.1.2 Aufreinigung der synthetischen Peptide | 39 |
| 3.1.1.3 Peptidbindungsassay | 42 |
| 3.1.1.4 Proteasom-Schnittvorhersage | 44 |
| 3.2 Kolonkarzinome | 45 |
| 3.2.1 Eichmischung | 45 |
| 3.2.2 Prozentuale Verteilung der HLA-Allele | 47 |
| 3.2.3 MHC-Präzipitationen | 48 |
| 3.2.3.1 Peptidextraktion eines Dickdarmtumors | 50 |
| 3.2.3.2 Methodenvergleich | 52 |
| | |
| 4 Diskussion | 62 |
| 4.1 HLA-A*0201 restringierten Eichpeptidmischung | 62 |
| 4.1.1 Epitopvorhersage | 62 |
| 4.1.2 Zusammenstellen der Eichpeptidmischung | 63 |
| 4.1.3 Proteasom-Schnittvorhersage | 63 |
| 4.1.4 Bindungsassay | 64 |
| 4.2 Peptidextraktion | 65 |
| 4.2.1 HLA-Verteilung | 65 |
| 4.2.2 Immunpräzipitation von soliden Tumoren | 65 |
| 4.2.3 Methodenvergleich | 66 |
| | |
| 5 Zusammenfassung | 68 |
| | |
| 6 Literaturangaben | 70 |
| | |
| 7 Verzeichnis der Abkürzungen | 79 |
| | |
| 8 Danksagung | 81 |
| | |
| 9 Lebenslauf | 82 |

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Obwohl Vertebraten ununterbrochen Pathogenen (Viren, Bakterien, Pilze, Parasiten) ausgesetzt sind, kommt es selten zu gravierenderen Infektionen. Diese Widerstandsfähigkeit basiert auf einem zweisäuligen Abwehrsystem: der angeborenen (natürlichen) und der adaptiven (erworbenen) Immunität.

Das angeborene Immunsystem besteht aus den anatomischen und chemischen Barrieren wie der Haut mit Säureschutzmantel, Schleimhaut und Magensäure, aus den Phagozyten, dem Komplementsystem, den Proteinen der akuten Phase und der Entzündungsreaktion mit ihren Botenstoffen (gesteigerte Durchblutung, erhöhte Kapillarpermeabilität, Wärmeentwicklung). Diese Komponenten sind ständig anwesend, können daher schnell nach einer Infektion aktiviert werden und reagieren mit dem Antigen gruppenspezifisch, haben aber kein immunologisches Gedächtnis.

Im Gegensatz dazu ist die adaptive Immunität hochspezifisch. Die Pathogene werden antikörpervermittelt oder zellvermittelt bekämpft. Da die erworbene Immunität eine Gedächtnisfunktion besitzt, kommt es bei erneutem Kontakt mit einem Pathogen schneller zu einer effektiven Abwehrreaktion. Dies wird zum Beispiel bei der Schutzimpfung ausgenutzt.

1.1.1 Zellen des Immunsystems

Alle Zellen des Immunsystems entstammen pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks (KM). Aus ihnen entwickeln sich zwei spezialisierte Arten von Vorläuferzellen: die lymphatischen, aus denen die Lymphozyten heranreifen, und die myeloiden Stammzellen, aus denen die APC (*antigen presenting cells*) ihren Ursprung nehmen.

1.1.1.1 Lymphozyten

Die erworbene Immunantwort beruht auf den Lymphozyten, die für die lebenslange Immunität verantwortlich sind.

Es gibt zwei Hauptgruppen von Lymphozyten: die B-Zellen und die T-Lymphozyten.

1.1.1.1.1 B-Lymphozyten und ihre Aktivierung

Ihren Name erhielten die **B**-Zellen, da sie in der Bursa Fabricii (bei den Vögeln) bzw. im Knochenmark (*Bone marrow*) heranreifen.

Ihr Charakteristikum ist die Fähigkeit, Antikörper (AK, Immunglobuline, Ig) zu produzieren. Eine B-Zelle produziert AK, die für ein Antigen spezifisch sind.

B-Lymphozyten exprimieren an ihrer Oberfläche Immunglobuline als Rezeptoren. Durch Bindung eines passenden extrazellulären Antigens an die Rezeptoren können sie aktiviert werden. Die Aktivierung kann sowohl T-Zell-abhängig als auch T-Zell-unabhängig erfolgen. Als Schutz vor einem Angriff gegen körpereigene Zellen oder Strukturen werden B-Lymphozyten, die körpereigene Strukturen oder Proteine binden, im KM zerstört. Dieser Vorgang wird **negative Selektion** genannt.

Die Aktivierung führt zu einer klonalen Expansion des B-Lymphozyten und zur Differenzierung in **immunglobulinsezernierende Plasmazellen**.

Durch eine Reihe von Mechanismen wie Rearrangement oder somatische Mutation wird ein enormes *Antikörperrepertoire* mit ca. 10^{12} Spezifitäten erreicht. Die Wirkungsweise der AK im Immunsystem ist sehr vielfältig. Sie können ein Pathogen neutralisieren, wodurch es keinen Kontakt zu körpereigenen Zellen mehr herstellen kann, opsonisieren und dadurch die Phagozytoseaktivität der Granulozyten effizient steigern, das Komplementsystem aktivieren und über ihr Fc-Ende immunstimulierend oder zytotoxisch wirken (Kayser et al., 1998). Wichtig ist, daß sie an der extrazellulären Pathogenbekämpfung beteiligt sind.

1.1.1.1.2 T-Lymphozyten und ihre Aktivierung

Die Reifung der T-Zellen findet im Thymus statt, dem sie auch ihren Namen verdanken.

Sie exprimieren einen antigenspezifischen T-Zellrezeptor (TCR, *T-cell receptor*). Diese Rezeptoren weisen eine große Diversität auf, wodurch verschiedene T-Zellen viele unterschiedliche Antigene erkennen können. Der TCR liegt eng mit CD3 assoziiert vor, da dieses Molekül das Signal in die Zelle weiterleitet.

Die Antigene, die die T-Zellen erkennen, sind Peptide. Diese müssen auf MHC-Molekülen (*major histocompatibility complex*, s.u.) präsentiert werden. Neben der Antigenerkennung ist noch ein zweites, costimulatorisches Signal dringend erforderlich, damit der reife T-Lymphozyt aktiviert werden kann. Dieses costimulatorische Signal erhält die T-Zelle, indem zum Beispiel das B7-Molekül der professionellen APC (*antigen presenting cells*, s.u.) mit dem komplementären CD28-Molekül der T-Zelle interagiert.

Fehlt das costimulatorische Signal, wird die reife T-Zelle inaktiviert, so daß diese auch auf eine spätere Aktivierung nicht mehr reagieren kann. Diese in der Peripherie ausgelöste Toleranz nennt man *Anergie*.

Nach der Aktivierung proliferiert die T-Zelle, und es entstehen Effektorzellen. Dabei werden T-Zellen in zwei Gruppen eingeteilt: Die eine Gruppe bilden die **CD4+ T-Helfer-Zellen** (T_H -Zellen), die nochmals in zwei Subpopulationen unterteilbar sind, nämlich die T_{H1} - und die T_{H2} -Zellen, die über Sekretion von Botenstoffen (Zytokinen) die Aktivität von T-Killerzellen (s.u.) und Makrophagen (durch T_{H1} -Zellen) oder B-Zellen (durch T_{H2} -Zellen) beeinflussen können. Ihr TCR interagiert mit einem Epitop, das auf den MHC-Klasse-II-Molekülen (s.u.) der APC präsentiert wird.

Die andere große Klasse der T-Lymphozyten stellen die **CD8+ T-Killerzellen**, auch bekannt als CTL (*cytotoxic T-lymphocytes*) dar. Sie kontrollieren die auf MHC-Klasse-I-Molekülen (s.u.) präsentierten Peptide. Diese Klasse der MHC-Moleküle kommt auf allen kernhaltigen Zellen vor. Dadurch wird auch ihre Aufgabe der Überwachung von Körperzellen deutlich. Sobald aktivierte CD8+ T-Zellen eine infizierte Zelle (durch intrazelluläre Viren und Bakterien) oder eine entartete Tumorzelle erkennen, töten sie diese (Röttschke et al., 1990; Berke, 1994). Den CTL stehen dafür verschiedene

Mechanismen zur Verfügung, die alle den „Programmierten Zelltod“ (*Apoptose*) auslösen (Berke, 1994): Die CTL setzen Perforin und eine Protease wie z.B. Granzym B frei, welches den nicht-rezeptorvermittelten Weg darstellt; durch Perforin werden Poren/Löcher in die Zellmembran der infizierten Zelle gebaut. Dadurch gelangt Granzym in die Zelle und induziert dort Apoptose. Ein weiteres Beispiel für solche Enzyme ist Fragmentin (Kuby, 1997).

Eine andere Möglichkeit stellen die Apoptose-Rezeptoren dar: Wechselwirkungen des Zytokins TNF- β (Tumornekrosefaktor- β) mit dem TNF-Rezeptor oder CD95/CD95L-Interaktionen (Fas/Fas-L, APO/APO1-L) lösen die Kaskade des Programmierten Zelltodes aus.

Während der Reifung im Thymus müssen sich die T-Zellen einer **positiven** und **negativen Selektion** unterziehen: Nur die T-Zellen, die ein MHC-Molekül erkennen, überleben (positive Selektion) und in einem zweiten Schritt werden alle T-Lymphozyten zerstört, die eine zu große Affinität zu den eigenen MHC-Molekülen oder zu einem körpereigenen Peptid-MHC-Komplex aufweisen (negative Selektion) (Obst et al., 2000; Obst et al., 1998; Robey and Fowlkes, 1994; Rammensee et al., 1993). Dies führt zu einer T-Zell-Toleranz gegenüber dem eigenen Körper.

1.1.1.2 APC (antigen presenting cells)

Zu den APC gehören Dendritische Zellen (DC) mit den Langerhans-Zellen der Haut, Makrophagen und B-Lymphozyten. Diesen ist gemein, daß sie alle auf der Oberfläche neben den MHC-Klasse-I-Molekülen, die ubiquitär exprimiert werden, auch costimulatorische Signale (wie B7) und MHC-Klasse-II-Moleküle exprimieren können.

DC sind die wichtigsten und effizientesten APC, da sie nach Aktivierung eine sehr große Anzahl sowohl an MHC-Molekülen als auch an costimulatorischen Signalen exprimieren können. Sie nehmen in der Peripherie Antigene auf, wandern nach Aktivierung durch „*danger signals*“ in lymphatisches Gewebe ein und präsentieren auf MHC-II-Molekülen den T_{H1}-Zellen die Antigene. Dadurch werden diese aktiviert, proliferieren und sezernieren Zytokine. Die Zytokine in Verbindung mit der

Antigenpräsentation auf MHC-I-Molekülen der DC sind für die wirkungsvolle Aktivierung der CTL wichtig (Toes et al., 1999).

Im Gegensatz zu den anderen APC nehmen die B-Lymphozyten mit ihren Immunglobulinrezeptoren spezifisch das Antigen auf, bevor sie es wie die anderen APC auf den MHC-Klasse-II-Molekülen präsentieren. Wird das Proteinantigen nicht spezifisch von B-Zellen erkannt, so ist seine Bindung an den Rezeptoren und die Internalisierung ineffektiv und die Expression der Antigenfragmente gering (Janeway and Travers, 1997). Der Peptid/MHC-II-Komplex der B-Zellen interagiert mit den T_{H2}-Zellen, die wiederum nach ihrer Aktivierung mit ihren Zytokinen auf die B-Lymphozyten wirken und deren Differenzierung induzieren.

1.1.2 Die Funktion der MHC-Moleküle (major histocompatibility complex)

T- und B-Lymphozyten erkennen ihre Antigene mit zwei unterschiedlichen Gruppen von hochvariablen Rezeptormolekülen: den Immunglobulinen, die auf B-Zellen als Rezeptoren dienen, und den antigenspezifischen Rezeptoren der T-Zellen. Der B-Zell-Rezeptor und die Antikörper interagieren mit dem dreidimensionalen nativen Pathogen, das bei Antikörpern kein Protein sein muß.

Für die Antigenerkennung von T-Zellen muß das Proteinantigen erst durch intrazelluläre Proteolyse in Peptide zerkleinert und von spezialisierten Glykoproteinen an die Zelloberfläche gebracht und dort gezeigt werden. Diese Trägermoleküle sind im MHC auf dem Chromosom 6 des Menschen kodiert. Auf den MHC-Molekülen werden sowohl Peptide des eigenen Körpers als auch Fremdpeptide präsentiert. Die T-Zellen sind durch ihre positive und negative Selektion in der Lage, Selbst- von Fremdpeptiden im Kontext der körpereigenen MHC-Moleküle zu unterscheiden (Obst et al., 2000; Munz et al., 1999; Zinkernagel and Doherty, 1997; Rammensee et al., 1993).

Indem kontinuierlich auf der Zelloberfläche eigene Peptide präsentiert werden, hat das Immunsystem eine gute Kontrolle über die produzierten Proteine jeder Zelle des Körpers.

Die MHC-Moleküle werden aufgrund der unterschiedlichen Struktur der Moleküle, der intrazellulären Herkunft und der Länge der Peptide, die sie präsentieren, und der

verschiedenen Subpopulationen von T-Lymphozyten, die sie aktivieren, in zwei Gruppen eingeteilt: MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II.

MHC-I-Moleküle werden auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert, dabei wird die Dichte auf etwa 100.000 Moleküle pro Zelle geschätzt – Kalkulationen liegen zwischen 100.000 und 750.000 präsentierten Peptid-MHC-I-Komplexen (Stevanović and Schild, 1999; Rammensee et al., 1993; Hunt et al., 1992; Tsomides et al., 1991). Dagegen sind die MHC-Klasse-II-Moleküle nur auf den spezialisierten APC vorhanden. Sie präsentieren vor allem extrazelluläre Proteine, die sie durch Endo- oder Pinozytose aufgenommen haben oder membranständige Proteine.

1.1.2.1 MHC-Klasse-I-Moleküle

Alle MHC-Moleküle bestehen aus zwei unterschiedlichen Polypeptidketten, sind also Heterodimere. Die MHC-Klasse-I-Moleküle setzen sich aus der α - oder schweren Kette (45 kDa, ca. 350 Aminosäuren (AS)), die aus drei extrazellulären Domänen (α_1 , α_2 , α_3), einer Transmembranregion und einem zytoplasmatischen Bereich aufgebaut ist, und aus einer leichten, nichtkovalent gebundenen Untereinheit, dem β_2 -Mikroglobulin (12 kDa, ca. 100 AS), das völlig extrazellulär gelegen ist, zusammen (Bjorkman et al., 1987), siehe Abbildung 1.1. Die α -Ketten der klassischen HLA (*human leucocyte antigen*) Klasse I-Moleküle sind in drei Loci auf Chromosom 6 im Bereich des MHC kodiert: HLA-A, HLA-B und HLA-C. Die Genabschnitte zeichnen sich durch einen außergewöhnlich großen Polymorphismus aus (Rammensee et al., 1993). Die α_3 -Domäne gehört zu den konserviertesten des MHC-I-Moleküls und enthält eine Sequenz, die von dem CD8 Membranmolekül der CTL erkannt wird (Kuby, 1997). Das funktionell monomorphe β_2 -Mikroglobulin ist nicht im MHC kodiert, sondern auf Chromosom 15 (York and Rock, 1996).

Das MHC-I-Molekül besitzt vier Domänen, von denen drei von der α -Kette gebildet werden. Die α_3 -Domäne und das β_2 -Mikroglobulin weisen in ihrer Aminosäuresequenz und in ihrer gefalteten Struktur große Ähnlichkeiten mit der konstanten Domäne der Immunglobuline auf (Janeway and Travers, 1997; Kuby, 1997).

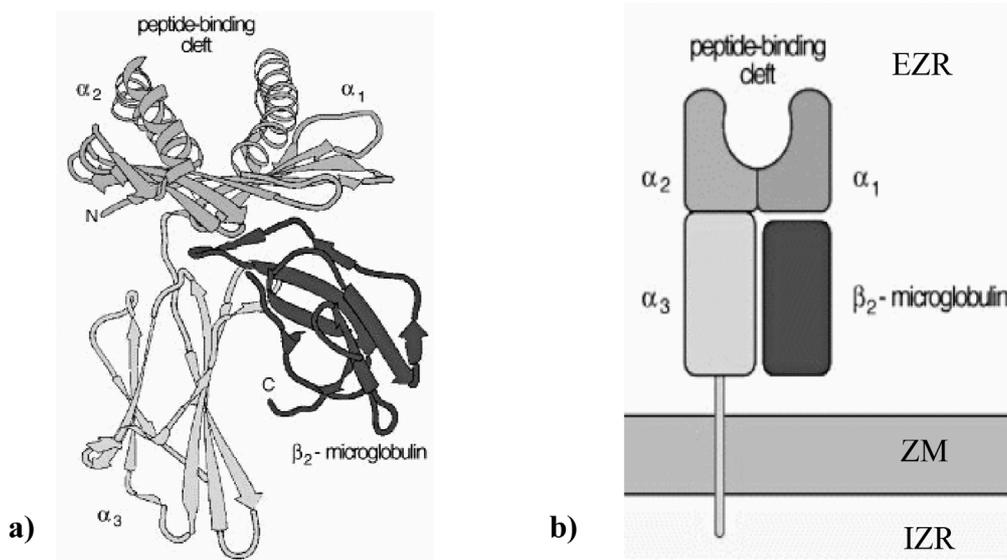


Abbildung 1.1.: Die Struktur eines MHC-Klasse-I-Moleküls, bestimmt durch Röntgenstrukturanalyse. a) Banddiagramm eines HLA-A2-Moleküls, b) zeigt schematisch, daß das MHC-I-Molekül ein Heterodimer einer α -Kette (45 kDa) ist, die sich durch die Zellmembran (ZM) erstreckt und die nichtkovalent mit dem β_2 -Mikroglobulin (12 kDa) assoziiert. EZR: Extrazellulärraum, IZR: Intrazellulärraum (Janeway and Travers, 1997)

Das wichtigste Merkmal der MHC-Klasse-I-Moleküle bildet aber die Struktur der α_1 - und α_2 -Domäne, die zusammen eine Grube bilden, in der das zu präsentierende Peptid gebunden wird. Der Boden dieser Furche wird von einer antiparallelen β -Faltblattstruktur geformt, der von zwei α -Helices der α_1 - und α_2 -Domäne begrenzt wird (Bjorkman et al., 1987), dargestellt in Abbildung 1.2. Die *Peptidbindungsfurche* befindet sich ganz oben auf dem Molekül und kann Peptide mit einer Länge von acht bis zehn Aminosäuren (AS) durch nichtkovalente Wechselwirkungen binden. Das präsentierte Peptid, das mit dem TCR interagiert, wird *Epitop* genannt.

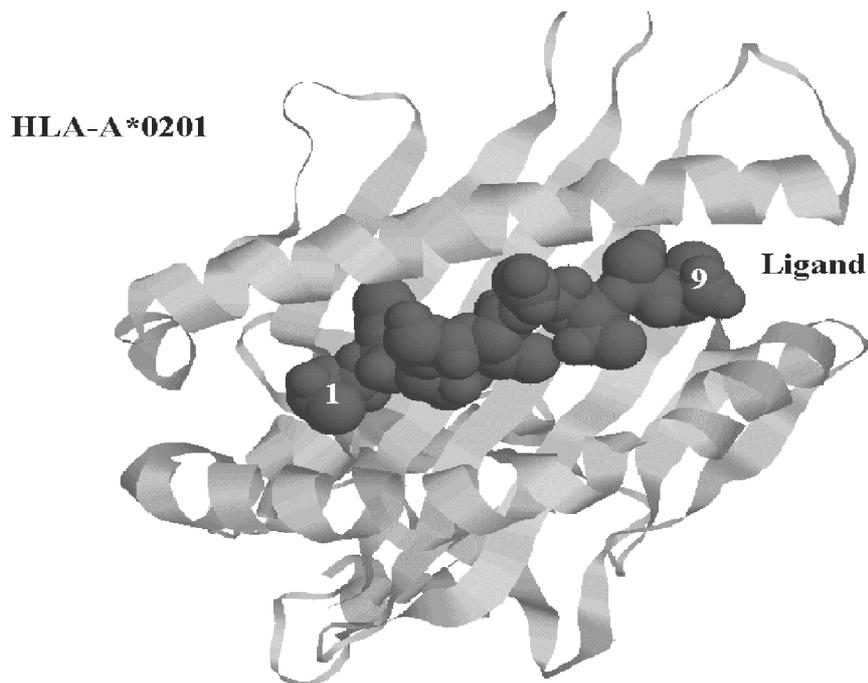


Abbildung 1.2.: Das Banddiagramm zeigt einen Blick von oben auf das MHC-I-Molekül mit gebundenem Peptid. AS 1 und 9 des Liganden sind gekennzeichnet.

1.1.2.2 Bindungseigenschaften eines MHC-Klasse-I-Liganden

N- und C-Terminus des gestreckt liegenden MHC-I-Liganden sind an den geschlossenen Enden der Peptidbindungsgrube durch Wasserstoffbrücken befestigt. Zusätzlich ist das ganze Peptid an allelspezifischen Bindungen durch hydrophobe, elektrostatische Interaktionen oder ebenfalls Wasserstoffbrücken von Aminosäureseitenketten des Liganden mit komplementären Taschen vor allem am Boden der Peptidbindungsfurche beteiligt (Rammensee et al., 1993). Die Anordnung und Spezifität der Taschen wird von dem jeweiligen MHC-I-Allel bestimmt und stellt so strukturelle Voraussetzungen, die für ein Peptid erforderlich sind, das gebunden wird. Daher weisen Peptide, die von demselben Molekül gebunden werden, Gemeinsamkeiten auf, die zu einem *Peptidmotiv* zusammengefaßt werden können.

Es gibt in der Regel zwei besonders enge Wechselwirkungen zwischen Ligand und MHC-I-Molekül. Dabei taucht die Aminosäureseitenkette des Peptids sehr weit in die komplementäre Tasche hinein: Diesen Platz nennt man *Ankerpositionen* des Peptids. An dieser Position ist nur eine bestimmte oder wenige strukturell verwandte AS erlaubt.

Die Ankerpositionen der meisten MHC-I-Moleküle befinden sich an der 2. Position und am Carboxylende (meist Position 9). Durch die Entwicklung eines Elutionsverfahrens für MHC-Klasse-I gebundene Liganden und anschließender Sequenzierung konnten schon einige dieser allelspezifischen Peptidmotive (Ankerpositionen, Hilfsanker, bevorzugte und verbotene AS, Tabelle 1.1. und 1.2.) genauer charakterisiert werden (Falk et al., 1991; Stevanović and Jung, 1993). Eine stets aktuelle Liste der bekannten Peptidmotive findet sich in der Internet-Datenbank SYFPEITHI unter www.syfpeithi.de (Rammensee et al., 1999).

Tabelle 1.1.: HLA-A*0201 Motiv (Rammensee et al., 1999; Falk et al., 1991; Rammensee et al., 1993); Die **Anker** an Position 2 und 9 sind fett gedruckt und der **Hilfsanker** an Position 6 unterstrichen.

| Position | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | <u>6</u> | 7 | 8 | 9 |
|----------------------------|---------------------------------|----------------------|---------------------------------|------------------|--------------------------------------|-------------|-------------|--------|----------------------|
| Ankeraminosäuren | | L M | | | | <u>V</u> | | | V L |
| Stark bevorzugte AS | | | | E K | | | | K | |
| Bevorzugte AS | I L F K M Y V | | A Y F P M S R | G P D T | I K Y N G F V H | I L T | A Y H | E S | |

Tabelle 1.2: Auswahl beschriebener Epitope

| HLA-A*0201 restringierte Epitope | Ursprung/Protein | Referenz |
|----------------------------------|---------------------------|--------------------------------|
| M L L A V <u>L</u> Y C L | Tyrosinase, Signalsequenz | (Wölfel et al., 1994) |
| W L S L L <u>V</u> P F V | HBV, surface antigen | (Nayersina et al., 1993) |
| Y M N G T <u>M</u> S Q V | Tyrosinase | (Wölfel et al., 1994) |
| I L T V I <u>L</u> G V L | MelanA | (Castelli et al., 1995) |
| F L W G P <u>R</u> A L V | MAGE-3 | (van der Bruggen et al., 1994) |
| L L G R N <u>S</u> F E V | p53 | (Theobald et al., 1997) |
| K I F G S <u>L</u> A F L | Her-2/neu | (Fisk et al., 1995) |
| L L L L T <u>V</u> L T V | MUC1 | (Brossart et al., 1999) |

Das Allel HLA-A*0201 präsentiert Peptide, die am Anker P2 überwiegend die hydrophoben AS Leucin oder Methionin und an P9 Valin oder Leucin enthalten. An der Hilfsankerposition P6 enthalten die Peptide häufiger Valin oder andere aliphatische AS (Leucin, Methionin oder Isoleucin). Auch an anderen Stellen können Vorlieben (oder Abneigungen) für bestimmte Aminosäuren des Peptids erkannt werden, allerdings liegen hier die Häufigkeiten einer bestimmter AS sehr viel niedriger als bei den Ankeraminosäuren. Die Peptidspezifität der MHC-Klasse-I-Moleküle wird hauptsächlich durch die Lage und die Spezifität der Taschen determiniert. Sekundär kommen noch die schwächeren Wechselwirkungen der Nicht-Anker-Aminosäuren hinzu (Rammensee, 1997).

Durch den Polymorphismus der unterschiedlichen HLA-Allele erkennt das Immunsystem eines jeden Menschen eine andere Sammlung von Peptid-Stichproben, d.h. T-Zellen von verschiedenen Individuen erkennen unterschiedliche Peptidsequenzen von Pathogenen.

1.1.2.3 Epitopvorhersage

Aufgrund der Kenntnis von Peptidmotiven und tumorspezifischen oder -assoziierten Proteinen wird versucht, potentielle CTL-Epitope für bestimmte HLA-Allele vorherzusagen.

Unter der Rubrik *EPITOPE PREDICTION* der *Database SYFPEITHI* (www.syfpeithi.de) kann ein bestimmtes HLA-Allel, die gesuchte Länge des Peptids und die Primärsequenz von einem Protein eingegeben und das Programm gestartet werden. In diesem Programm ist die Kenntnis des Peptidmotivs (Rammensee, 1995; Stevanović and Rammensee, 1994; Stevanović and Jung, 1993; Falk et al., 1991; Pamer et al., 1991; Rötzschke et al., 1991) in eine computergerechte Matrix umgesetzt worden. Diese Matrix läuft über die Primärsequenz eines Proteins und verteilt für AS, die an geeigneten (oder unerwünschten) Positionen eines Peptids liegen würden, Punkte, die den Einfluß auf das Bindevverhalten reflektieren. Die höchsten Werte werden den Ankeraminosäuren zugeteilt. So wird das gesamte Protein virtuell in Nonamere (oder eine andere Peptidlänge) zerlegt, die jeweils bewertet werden.

Unter den bestbewerteten 2 Prozent der vorhergesagten MHC-I-Liganden werden potentielle T-Zellepitope erwartet.

Dies wird für alle bekannten tumorspezifischen und -assoziierten Proteine eines bestimmten Karzinoms durchgeführt. Dadurch kann man bei einer Tumorprobe in der Analyse spezifisch nach den interessanten CTL-Epitopen suchen.

1.1.3 Antigenprozessierung für MHC-Klasse-I-Moleküle

Mit dem Begriff Antigenprozessierung wird der Weg vom Protein zum MHC-Liganden beschrieben.

1.1.3.1 Das Proteasom

Innerhalb der Zelle gibt es verschiedene Möglichkeiten, Proteine abzubauen: den lysosomal-autophagosomalen oder den proteasomalen Weg. Für die MHC-Klasse-I-Liganden, die als Nebenprodukte des normalen Stoffwechsels entstehen (Rock and Goldberg, 1999), ist das Proteasom vorrangig (Cerundolo et al., 1997; Rock et al., 1994). Studien, in denen die Proteasomen blockiert wurden, zeigten, daß die Peptidpräsentation auf MHC-I-Molekülen verhindert wurde, wohingegen in das Zytoplasma injizierte oder vorhandene Peptide präsentiert werden konnten (Harding et al., 1995; Rock et al., 1994).

Das humane Proteasom besteht aus 14 verschiedenen Untereinheiten. Aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeiten sind sie in eine α - und β -Gruppe eingeteilt. Das Multimer ist faßartig mit vier übereinanderliegenden Ringen à sieben Untereinheiten ($\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$) aufgebaut (Groll et al., 1997). Die katalytisch aktiven Stellen des Proteasoms liegen im Inneren des Fasses und werden von drei β -Untereinheiten gebildet (Fenteany et al., 1995; Löwe et al., 1995). Dabei haben die verschiedenen katalytischen Zentren unterschiedliche Schnittspezifitäten.

Die zum Abbau vorgesehenen zytosolischen Proteine werden mit Poly-Ubiquitin-Schwänzchen versehen, die als Einfädel-Signal in das Proteasom dienen (Thrower et al., 2000; Young et al., 1998; Deveraux et al., 1994). Mit dem Proteasom assoziierte

Proteine entfalten das Protein ATP-abhängig und entfernen wieder die Ubiquitin-Markierung, die recycelt werden kann (Lam, 1997). Die Proteine werden in eine Länge von je 3 bis 25 AS mit einem Durchschnitt von 7 bis 9 AS fragmentiert (Nussbaum et al., 1998).

Wie die Peptide genau vom Proteasom zum TAP (transporter associated with antigen processing) gelangen, ist noch ungewiß. Es werden verschiedene Möglichkeiten wie direkte Wechselwirkungen zwischen Proteasom und TAP oder ein Transport durch Hitzeschockproteine vom Proteasom zum TAP diskutiert (Srivastava et al., 1998; Arnold et al., 1995; Srivastava et al., 1994). Eine freie Diffusion der Peptide ist sehr unwahrscheinlich, da Peptide sehr schnell im Zytosol degradiert würden (Hill et al., 1995; Momburg et al., 1994).

1.1.3.2 Der TAP (transporter associated with antigen processing)

Die im Zytosol durch das Proteasom entstandenen Peptide werden ATP-abhängig durch den in der Membran des ER (Endoplasmatisches Retikulum) ansässigen Peptid-Transporter - kodiert als TAP1- und TAP2-Gene - in das ER geschleust (York and Rock, 1996). Die TAP-Proteine sind als Heterodimer assoziiert und bilden mit den transmembranösen Teilen eine Pore. Der genaue Mechanismus des Peptidtransports ist noch nicht bekannt.

Zellen, die mit dem Herpes simplex-Gen für ICP47 transfiziert sind, können nur wenige MHC-Klasse-I-Moleküle mit Peptiden beladen, da das ICP47-Protein den TAP blockiert. Unbeladene MHC-I-Moleküle sind instabil (Townsend et al., 1989), wodurch nur eine verringerte Anzahl von ihnen auf der Oberfläche exprimiert werden kann (Gatfield et al., 1998; Hill et al., 1995). Der TAP transportiert ein relativ breites Spektrum an Peptiden mit Präferenzen für bestimmte AS am Carboxyterminus (basische und hydrophobe) und an den ersten drei N-terminalen Positionen der Peptide (Uebel et al., 1997; Neefjes et al., 1993b; Heemels et al., 1993). Seine höchste Affinität hat der TAP zu Peptiden mit einer Länge von 8 bis 12 AS, was auch die optimale Länge für MHC-I-Liganden darstellt (Kuby, 1997; Howard, 1995; Momburg et al., 1994).

Der Zusammenbau eines neu biosynthetisierten MHC-I-Moleküls findet im ER mit Hilfe verschiedener Chaperone wie Calnexin und Calreticulin statt (Jackson et al., 1994). Dieser Komplex mit dem nur partiell gefalteten MHC-I-Molekül bindet (z.T.) über Tapasin direkt an den TAP (Pamer and Cresswell, 1998; Sadasivan et al., 1996).

Im ER selektionieren die MHC-I-Moleküle die passenden Peptide. Die Assoziation des Peptids an das unfertige MHC-I-Molekül bewirkt eine Konformationsänderung, wodurch die Bindung an Tapasin gelöst wird und sich der ganze MHC-Klasse-I/Ligand-Komplex fertig faltet. Das Zusammenlagern (*Assemblierung*) als Heterotrimer dauert in der Regel nur wenige Minuten (Neefjes et al., 1993a). Dieser Komplex wird nun über den Golgi-Apparat in einem exozytotischen Vesikel an die Zelloberfläche transportiert (Pamer and Cresswell, 1998).

1.1.3.3 Peptidprozessierung im ER (Endoplasmatisches Retikulum)

Bisher ist wenig über spezifische Prozessierungsschritte im ER bekannt. Es wird angenommen, daß viele Peptide als längere Vorläuferpeptide (im Zytoplasma oder) im ER (Rammensee et al., 1993) von Aminopeptidasen oder Endopeptidasen am N-Terminus (Beninga et al., 1998; Geier et al., 1999) in Abhängigkeit vom jeweiligen MHC-I-Molekül auf die passende Länge *getrimmt* werden (Paz et al., 1999; Stoltze et al., 2000). Verschiedene Arbeiten mit Proteasomeninhibitoren legen nahe, daß die C-Termini von MHC-Klasse-I-Liganden direkt vom Proteasom erzeugt werden und keiner weiteren Prozessierung durch Peptidasen unterliegen (Stoltze et al., 1998; Howard, 1995).

1.1.3.4 Selektion der Peptide

Allelspezifische Peptidmotive sind nicht nur einfach Bindungsmotive. Ein präsentiertes Peptid muß vorher schon einige Selektionsschritte durchlaufen haben, bevor es ein natürlicher MHC-I-Ligand werden kann (Rammensee et al., 1993).

Dazu gibt es allerdings noch viele offene Fragen:

Welche Proteine werden mit Ubiquitin-Ketten versehen und dadurch für das Proteasom markiert? Das Proteasom selbst schneidet im Zytoplasma mit nur teilweise verstandenen Präferenzen nach bestimmten AS. Da der Weg der Peptide vom Proteasom zum TAP-Komplex noch nicht bekannt ist, könnte hier auch eine Selektionierung stattfinden: Welche Peptide werden durch Peptidasen abgebaut? Welche werden eventuell durch Chaperone vor der Degradation geschützt und zum TAP transportiert? Die Aufnahme der Peptide in das ER über den TAP ist selektiv (Uebel et al., 1997). Die Peptidprozessierung im ER könnte eine Rolle spielen.

Den letzten Selektionsschritt bestimmen die Bindungsspezifitäten der MHC-Klasse-I-Moleküle.

Die Kenntnis der Schnittspezifitäten des Proteasoms (Kuttler et al., 2000) – online auch unter www.paproc.de - in Verbindung mit Untersuchungen zur TAP-Spezifität (Uebel et al., 1997; Uebel and Tampe, 1999) und den Vorhersageprogrammen zu MHC-I-Liganden würde neue Möglichkeiten zur Vorhersage von CTL-Epitopen aus Primärsequenzen von Proteinen eröffnen.

1.1.4 Tumorimmunologie

Krebs ist die zweithäufigste Todesursache in den industrialisierten Ländern. Die Tendenz ist steigend – sicherlich auch durch die wachsende durchschnittliche Lebenserwartung, da die Inzidenz mit steigendem Alter zunimmt. Ausgangspunkt ist eine einzelne transformierte Zelle, die proliferiert und ihr mutiertes Genmaterial an alle Tochterzellen vererbt. Dabei kommt es bei den Nachkommen dieser Zelle zu weiteren Mutationen. Diesen Prozeß nennt man Tumorprogression (Alberts et al., 1994).

Zur Heilung von Krebs ist es daher notwendig, daß sämtliche bösartigen Zellen zerstört oder entfernt werden. Eine elegante Methode dafür wäre die Induktion einer Immunantwort, die zwischen den Tumorzellen und Normalgewebe unterscheiden kann (Lindauer et al., 1998).

Einer der Hauptschwerpunkte der Tumorimmunologie ist es daher, viele Tumorantigene mit ihren CTL-Epitopen zu kennen und die Mechanismen zu verstehen, mit denen

Tumorzellen der immunologischen Zerstörung entfliehen, um daraus eine spezifische Therapie ableiten zu können.

1.1.4.1 Tumorzellen entziehen sich der Immunüberwachung

Eigentlich müßte das Immunsystem entartete Tumorzellen erkennen und zerstören. Da dies nicht oder nicht in ausreichendem Maße der Fall ist, gibt es verschiedene theoretische Möglichkeiten, wie der Tumor der Immunüberwachung entfliehen kann:

- MHC-Expression auf Tumorzellen ist vermindert (Stevanović and Schild, 1999; Früh et al., 1997), so daß keine oder zu wenig Tumorantigene präsentiert werden, die für die CTL-Erkennung notwendig sind. *In vitro* Studien haben gezeigt, daß bei erhöhter MHC-Expression eine gesteigerte Lyse erzielt wird. *In vivo* konnte demonstriert werden, daß eine geringere MHC-Expression eine schlechtere CTL-Antwort mit Tumorwachstum zur Folge hatte. Bei viral-induzierten Tumoren wäre auch vorstellbar, daß gewisse Genprodukte die Präsentation auf der Oberfläche verhindern, indem sie zum Beispiel den TAP blockieren, wie es schon für Herpes-Viren (ICP47) nachgewiesen wurde, oder daß der TAP durch Deletion oder Mutation verlorengeht. Andererseits muß auch eine Tumorzelle noch einen Restbestand an MHC-I-Molekülen aufweisen, um nicht von Natürlichen Killerzellen angegriffen zu werden.
- Es findet keine Aktivierung der CTL trotz Expression von Tumorantigenen statt. Dies kann verschiedene Ursachen haben: Die wenigsten Tumorzellen tragen MHC-Klasse-II-Moleküle auf ihrer Oberfläche und können dadurch nicht direkt tumorspezifische CD4⁺ T-Helfer-Zellen aktivieren, die einen starken Einfluß auf CTL ausüben (Toes et al., 1999). Das Fehlen von costimulatorischen Signalen auf den Tumorzellen kann zur klonalen Anergie der CD8⁺ oder CD4⁺ T-Zellen führen. Maligne Zellen können eine Art Resistenz gegen Fas-induzierte Lyse entwickeln (Bergmann-Leitner and Abrams, 2000).
- Eine andere Möglichkeit besteht darin, daß der Tumor selbst Produkte herstellt, die eine effiziente Antitumor-Reaktion unterdrücken und ihn dadurch schützen. Als

Beispiel wären hier Zytokine wie Interleukin-10 oder *transforming growth factor-β* (TGF-β) zu nennen.

- Toleranz gegen Tumorantigene könnte auch durch fetale/neonatale Exposition von solchen Epitopen (Übertragung der Viren, die Tumore induzieren) oder durch eine Präsentation der Antigene in einer nicht-immunogenen Art entstehen.
- Durch Mutationen bzw. Deletionen könnte der Tumor wichtige Adhäsionsmoleküle nicht mehr in ausreichendem Maße exprimieren.
- Das schnelle Wachstum der Tumorzellen kann eine Resistenz erzeugen, bevor das Immunsystem effektiv antworten kann.
- Die Antigenprozessierung kann durch Mutation o.ä. des Antigens gestört werden, wodurch die immunogenen Peptide nicht mehr exprimiert werden können (Theobald et al., 1998).
- Antikörper gegen Oberflächenantigene der Tumorzelle können Endozytose und den Abbau des Antigens auslösen. Immunselektion von Varianten, denen ein immunogenes Antigen fehlt, ist zudem vorstellbar.
- Antigenmaskierung beschreibt das Phänomen, daß Tumoren oft verstärkt Glykokalix-Moleküle exprimieren und ihre Oberflächenantigene darunter verstecken (Abbas et al., 1997).

1.1.4.2 Tumorantigene

Tumoren haben - wie schon im Kapitel Tumorummunologie erwähnt - im Vergleich zur Normalzelle des Körpers ein verändertes genetisches Material. Daher sind auch die Genprodukte verändert. Jene können über den normalen Antigenprozessierungsweg auf MHC-Moleküle gelangen und so dem Immunsystem gezeigt werden. Sobald aktivierte Immunzellen die veränderten Zellen erkennen, töten sie diese.

Die Tumorantigene können unterschieden werden in *tumorspezifische*, die nur auf Tumorzellen gefunden werden können, und in *tumorassoziierte* Antigene, die gleichzeitig MHC-Liganden normaler Zellen sind. Aufgrund der Selbsttoleranz generieren sie in der Regel keine Immunantwort.

Nach ihrem Ursprung werden sie in verschiedene Klassen eingeteilt:

- Produkte von mutierten normalen zellulären Genen, nicht verwandt mit Onkogenen. Ein Beispiel dafür wäre CDK4 (*cyclin-dependent kinase 4*) (Wölfel et al., 1995).
- Onkogenprodukte und Produkte von mutierten Tumorsuppressorgenen, diese zwei Klassen von Genen sind für die Kebsentstehung entscheidend:
Protoonkogene, die durch Mutation stärker aktiv werden (Onkogene), regen die Zelle dazu an, sich unter Verlust der normalen Kontrollmechanismen zu vermehren. Diese Mutationen sind dominant, die der Tumorsuppressorgene rezessiv (Alberts et al., 1994).

| Protoonkogen | Art des Antigens | Ursache der Aktivierung |
|------------------------------|-----------------------------|---|
| ras | Signalübermittlung | In ~25 % der Tumoren, in <i>hot spot region</i> : Punktmutation |
| bcl-2 | Apoptosehemmer | Translokation |
| myc/n-myc | reguliert Zellkernaktivität | Translokation |
| sis | Wachstumsfaktor | Überexpression |
| Her-2/neu | Wachstumsfaktorrezeptor | Amplifikation |
| abl | Signalübermittlung | Translokation |
| Mutiertes Tumorsuppressorgen | | |
| p53 | Zellzyklusregulator | ungefähr 50 % aller Tumoren (Theobald et al., 1997; Vierboom et al., 1997), Punktmutation, Überexpression |

(Bergmann-Leitner et al., 1998; Abrams et al., 1997; Bertholet et al., 1997; Roa et al., 1997; Stevens, 1997; Valassiadou et al., 1997; Disis and Cheever, 1996; Theobald et al., 1995; Rodrigues et al., 1990; Bos, 1989)

- Embryonaler Ursprung: Die Genfamilie MAGE, BAGE, GAGE gehören zu einer Gruppe von tumorassoziierten Antigenen, die in vielen Tumoren wie Melanomen, Lungen-, Hirn- und Blasen-Ca exprimiert werden. Diese Gene sind im gesunden Gewebe ruhig gestellt, werden aber auf normalen fetalen Zellen exprimiert. Eine Ausnahme stellt der Testis dar: die Gene sind zwar aktiv, allerdings werden dort keine MHC-Moleküle exprimiert. Daher sind diese Antigene, auch *cancer testis antigens* genannt, dem Immunsystem unbekannt und können tumorelektiv genutzt

werden (Boon et al., 1994; Boel et al., 1995; Duffour et al., 1999; van der Bruggen et al., 1994).

Eine weiteres cancer testis Antigen stellt das NY-ESO-1 dar (Chen et al., 1997). Es wurde in Melanomen nachgewiesen und ist ein sehr immunogenes Tumorantigen. Es induziert sowohl eine humorale als auch eine CD8+ Immunantwort (Jäger et al., 1998).

Ebenfalls embryonalen Ursprungs sind CEA (carcinoembryonales Antigen), das bei ungefähr 90 % der Patienten mit fortgeschrittenen und 50 % mit frühen kolorektalen Karzinomen, bei 50 % mit Mamma-Ca und in 70 % der nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome gefunden wird (Kawashima et al., 1999), und AFP (α -Feto-Protein). AFP wird im Serum von Patienten mit Leber-Ca oder mit Keimzelltumoren gefunden. Diese Proteine, die bei sehr wenigen Menschen unter physiologischen Bedingungen nachweisbar sind, eignen sich zudem sehr zum Monitoring von Tumoren (Kuby, 1997).

- Abnorme Modifikation nach der Translation: Mucine sind hochglykosylierte Oberflächenproteine normaler Schleimhaut. CTL-Aktivität wurde häufiger bei Mamma-, Ovar-, Pankreas-Ca und einer Reihe von anderen Tumoren gegen tumorspezifisch verändertes Mucin nachgewiesen. Mucin ist dabei weniger glykosyliert. Die dadurch induzierte CTL-Antwort ist nur z.T. HLA-restringiert. Die erkannten Strukturen der HLA-restringierten CTL-Aktivität liegen in Tandem-Repeat-Domänen des Proteinrückgrats oder in der Signalsequenz (Townsend and Allison, 1993; Brossart et al., 1999).
- Gewebespezifische Antigene (Differenzierungsantigene): werden von normalen Zellen und von Tumorzellen exprimiert, die von diesem Gewebe abstammen und von ihrem Differenzierungsgrad noch nicht zu weit entartet sind. Hier wäre zum Beispiel die Tyrosinase zu nennen, die in den Melanozyten ein wichtiges Enzym zur Synthese von Melanin darstellt und von vielen Melanomen präsentiert wird (Topalian et al., 1994). Weitere Beispiele wären Melan-A/MART-1, TRP-1 (*tyrosinase-related protein*)/gp75, TRP-2 (Sun et al., 2000), gp100 (Kawakami et al., 1995).
- Das Fusionsprotein bcr-abl mit Tyrosinaseaktivität entsteht als Folge der Chromosomentranslokation t(9;22). Das entstehende Chromosom wird

Philadelphia-Chromosom genannt und bei der chronisch myeloischen Leukämie gefunden.

- Onkovirale Proteine: Eine CTL-Antwort gegen Zellen, die mit dem humanen Papilloma Virus 16 (HPV16), das in den meisten Zervix-Karzinomen vorkommt, infiziert sind, konnte festgestellt werden. Bekannt sind z.B. Peptide, die aus dem Onkoprotein E7 des HPV16 stammen und auf HLA-A2 den CTL präsentiert werden (Boon et al., 1997; Tindle, 1996; Rensing et al., 1995).

Viele andere Viren wie HBV, HCV, EBV, HPV18, 6, 11 sind dafür bekannt, daß sie Tumore auslösen können.

Es gibt auch Antigene, die in Tumoren durch Mutation überexprimiert werden, wie HER-2/neu (Onkogen), das in 30 - 40 % der Mamma- und Ovarkarzinome , sowie gehäuft in Kolon-, nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen und Nierenzell-Ca zu finden ist (Brossart et al., 1998) oder MUC-2, das bei Kolon-, Brust-, Ovar- und Pankreas-Ca stark überexprimiert wird (Böhm et al., 1998).

1.1.4.3 Spezifische Tumorimmuntherapie

Die bisherige Therapieform für Krebspatienten ließe sich vielleicht am trefflichsten mit dem Sprichwort: „mit Kanonen auf Spatzen schießen“ beschreiben. Die Nebenwirkungen für den Krebspatienten sind sehr belastend und der Erfolg keinesfalls gesichert. Daher sucht man schon seit langem nach einer schonenderen, tumorspezifischen Therapie, mit der man selektiv die Tumorzellen anspricht. Eine Möglichkeit ist, die tumorspezifischen CTL zu aktivieren und zur Expansion anzuregen. Dafür ist die genaue Kenntnis von tumorassoziierten, besser noch von tumorspezifischen Epitopen Grundvoraussetzung. Zum genauen Therapieverlauf bei definierten Tumorantigenen gibt es verschiedene Konzepte, wobei man immer mit vielen verschiedenen Epitopen arbeiten möchte, damit möglichst alle Tumorzellen bei der Therapie erfaßt werden.

Ex vivo/in vitro werden autologe APC mit tumorassoziierten und –spezifischen Peptiden beladen. Diesen Vorgang bezeichnet man als *pulsen* (Kawashima et al., 1999; Toes et al., 1998). Die Zellen werden dem Patienten wieder appliziert. Durch die costimulatorischen Signale und die immunogenen Epitope sollen die Lymphozyten

aktiviert werden. Man hofft, daß man dadurch die Anergie des Immunsystems überwinden oder noch nicht anergisch gewordene Lymphozyten aktivieren kann.

Die T-Zellen könnten auch selbst *in vitro* mit beladenen APC und Zytokinen stimuliert werden (Abrams et al., 1997), um sie später dem Krebspatienten in aktivierter Form wiederzugeben.

In vivo könnte man direkt die Peptide (*Peptidvakzinierung*), die von den eigenen APC aufgenommen und präsentiert werden, in verschiedenen Kombinationen geben: entweder allein, mit Zytokinen, Peptide mit dendritischen Zellen, als rekombinante Proteine, mit viralen Vektoren oder transfizierte APC (Van den Eynde and Boon, 1997; Restifo, 1996; Melief et al., 1996; Robbins and Kawakami, 1996).

1.1.4.4 Probleme einer antigenspezifischen Immuntherapie

Grundvoraussetzung ist, daß der Tumor die Anzahl seiner MHC-Moleküle nicht zu sehr reduziert hat.

Die Therapie muß patientenindividuell abgestimmt werden, da die Epitopexpression sowohl von der HLA-Typisierung des Patienten als auch von dem Tumor mit seinen spezifischen Antigenen abhängig ist (van der Bruggen et al., 1991). Zudem sind zur Zeit leider auch bei vielen häufigen Tumoren wie Kolon-, Mamma- oder Lungen-Ca noch keine bzw. erst sehr wenig Tumorantigene bekannt.

Diskutiert werden derzeit verschiedene Protokolle zur wirksamen Applikation der Peptidvakzinierung.

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Das Projekt, in das die vorliegende Arbeit eingebunden ist, beschäftigt sich schon seit Jahren mit der Identifizierung von tumorspezifischen MHC-Klasse-I-Liganden für möglichst viele HLA-Allele. Diese Epitope sollen in Anschlußprojekten in der spezifischen Immuntherapie eingesetzt werden.

Der klassische Weg für die CTL-Epitop-Identifizierung geht primär über das Etablieren von CTL-Klonen gegen Tumorzelllinien und später wird versucht, das erkannte Epitop zu identifizieren (Cox et al., 1994).

Hier wird eine Methode benutzt, die T-Zell-unabhängig arbeitet. Sie verbindet verschiedene Verfahren (Stevanović, 1995; Schirle et al., 2000):

- Epitopvorhersage durch Peptidmotive
- Peptidextraktion
- HPLC (*high performance liquid chromatography*) – MS (massenspektrometrische) - Analyse

Zuerst werden anhand der Peptidmotive potentielle MHC-I-Liganden für verschiedene Allele vorhergesagt. Das wird für alle bisher bekannten tumorassoziierten und – spezifischen Proteine eines bestimmten Tumors durchgeführt. Daran angeschlossen ist die Synthese und die HPLC-Aufreinigung dieser Peptide. Die Epitope werden auf ihr HLA-Bindungsverhalten auf TAP-defizienten Zellen getestet und eine Eichmischung für die HPLC-MS-Analyse hergestellt.

Für die Tumorpräparation werden je Allel ungefähr 15 mg eines aufgereinigten, monoklonalen, MHC-spezifischen Antikörpers gebraucht.

Wenn das Tumorgewebe HLA-typisiert ist, wird der Tumor homogenisiert. Nach der Immunpräzipitation der MHC-Moleküle werden die Peptide mittels Säurebehandlung eluiert. Sobald die MHC-I-Liganden extrahiert sind, werden sie und die synthetischen potentiellen Epitope in ihrem HPLC-MS-Verhalten verglichen und analysiert (Hunt et al., 1992).

Im Rahmen dieses Projektes sollte ich alle Schritte dieser Methodik - außer der HPLC-MS-Analyse - selbst kennenlernen. Meine Aufgabenstellung beinhaltete eine HLA-A*0201-restringierte Epitopvorhersage mit anschließender Anfertigung einer Eichpeptidmischung für Melanome, Akquirierung von gastrointestinalen Tumoren, Zellkultur und Extraktion von MHC-Klasse-I-Liganden von Tumorzelllinien und soliden gastrointestinalen Tumoren.

2. Material und Methoden

2.1 Tumore von Patienten

Die Tumoren wurden während der Operation entgegengenommen, nicht mit Formalin in Berührung gebracht und den Pathologen gezeigt. Mit ihrem Einverständnis wurde ein möglichst großes Stück des Tumors oberflächlich abgetragen, gewogen und direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren. Ein gleich großes Stück gesunder Mukosa wurde als Kontrolle ebenfalls eingefroren. Eine Genehmigung durch die Ethikkommission lag vor. Zudem wurden 10 ml EDTA-Blut dem Patienten entnommen, das für die HLA-Typisierung verwendet wurde.

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Zelllinien

Diese Hybridomzelllinien produzieren monoklonale AK (mAK) gegen:

| | |
|---------|---|
| A11.1M | α HLA-A11, A24 (IgG ₃) (Grumet et al., 1982) |
| B1.23.2 | α HLA-B, -C (Ferrier et al., 1985) |
| BB7.2 | α HLA-A2 (IgG _{2b}) (Parham and Brodsky, 1981) |
| GAP A3 | α HLA-A3 (IgG _{2a}) (Berger et al., 1982) |
| W6/32 | α HLA-A, -B, -C (IgG _{2a}) (Barnstable et al., 1978) |
| HCT116 | Kolonkarzinom, exprimiert HLA-A1, A2, adhären wachsend (Brattain et al., 1981) |
| JY | humanes B-Zell-Lymphom, exprimiert HLA-A2, B7, Cw7, DR4 (Turner, 1975) |
| SW1116 | Kolonkarzinom, exprimiert HLA-A2, adhären wachsend (Leibovitz et al., 1976) |
| T1 | humanes B- und T-Zellhybridom, exprimiert HLA-A2, B5, DR7 (Salter et al., 1985) |
| T2 | exprimiert HLA-A2 und ist TAP-defizient (Salter et al., 1985) |

Die Tumorzelllinien wurden für Peptidextraktionen und für Peptidbindungsassays verwendet.

2.2.2 Kultivierung von Zelllinien

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in Inkubatoren (Forma Scientific) bei 37°C, 7,5 % CO₂ in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre. Es wurde RPMI 1640-Medium verwendet, das mit L-Glutamin (2 µM), β-Mercaptoethanol (50 µM), Penicillin (50 U/ml), Streptomycin (50 µg/ml), NaHCO₃ (2 g/l), HEPES (2,4 g/l) und 10 % fötalem Kälberserum (Fetal Calf Serum, FCS, PAA Laboratories) supplementiert wurde. Die Zelldichte wurde zwischen 10⁴ bis 10⁶ Zellen/ml gehalten.

Um Zellen in größerem Umfang kultivieren zu können, wurden sterile 2 l-Glasflaschen benutzt. Sie wurden im 37°C Raum auf Rollergestellen (1,5 U/min) gehalten.

Adhärent wachsende Zellen wurden mit sterilem PBS (*Phosphate Buffered Saline*) gewaschen, alle Flüssigkeit dekantiert und mit Trypsin (TRYPSIN-EDTA (1x) IN, GIBCO BRL) von den Wänden der Kulturflaschen abgelöst.

2.2.3 Ernten von Zellen

Durch die Verwertung der Nährstoffe und der damit verbundenen Azidifizierung verfärbte sich der Indikator im Medium. Die Zellen wurden bei 1200 U/min und 4°C 10 min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Zellen in 5 ml eiskaltem PBS pH 7,2 aufgenommen. Die Zellpellets wurden bei –80°C gelagert.

2.2.4 Bestimmung der Lebendzellzahl

50 µl Zellsuspension wurden mit 50 µl Trypanblau (0,05 % in PBS) gemischt. Die ungefärbten Zellen wurden in 16 Quadranten einer Zählkammer (Neubauer, Tiefe 0,1 mm) ausgezählt. Die Lebendzellzahl/ml ergab sich wie folgt:

$$(\text{durchschnittlich gezählte Zellen im Quadranten}) \times 10^4 \times 2 \text{ Zellen/ml}$$

Der dimensionslose Faktor 2 entspricht der Verdünnung mit Trypanblau.

2.2.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden $1-5 \times 10^6$ Zellen in 1 ml sterilfiltriertem, eisgekühltem Einfriermedium (10 % DMSO, 90 % hitzeinaktiviertes FCS) aufgenommen, in Cryotubes (Schraubverschluß, Greiner) überführt und sofort bei -80°C eingefroren. Nach einem Tag wurden sie in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen wurden die Zellen zügig im 37°C Wasserbad erwärmt und anschließend mit 10 ml Medium gewaschen, um das zytotoxische DMSO zu entfernen.

2.3 Immunologische und biochemische Methoden

2.3.1 Antikörperreinigung aus Hybridomüberstand

2 l Hybridomzellsuspension wurden mit 20 ml 2 % NaN_3 versetzt und 2 Tage bei 4°C ruhiggestellt. Die Zellen setzten sich als Sediment ab. Der Hybridomüberstand wurde sterilfiltriert (Porengröße $0,2 \mu\text{m}$) und auf pH 8,0 eingestellt.

Zur Reinigung und Konzentrierung der AK wurde eine Affinitätschromatographie mit Protein A (Protein A Sepharose® CL-4B, Pharmacia Biotech) durchgeführt. Protein A bindet spezifisch die Fc-Enden vieler Immunglobulintypen, v.a. IgG.

0,6 g Protein A wurden 30 min mit destilliertem Wasser gequollen. Die Protein A Sepharose wurde in eine Säule gepackt (Gelbettvolumen 3 bis 5 ml) und mit PBS 15 min gewaschen. Der Hybridomüberstand wurde bei 4°C mit einer Flußrate von 0,5 ml/min zwei Tage zyklisch über die Säule gepumpt. Die AK wurden mit 4 ml Citratpuffer (pH 3,0) in 9 ml vorgelegten Puffer (pH 8,3; 0,5 M NaCl; 0,1 M NaHCO_3 in H_2O_d) eluiert.

Die AK-Konzentration wurde über die Absorption bei 280 nm wie folgt bestimmt:

$$\text{OD}_{280\text{nm}} \times 0,7 = \text{mg AK / ml}$$

Zumeist lagen die Ausbeuten zwischen 5 und 25 mg AK/l Hybridomüberstand.

2.3.2 Entsorgung der Azidlösungen

Zu allen Hybridomsuspensionen wurden nach der Antikörperaufreinigung auf 2 Liter 100 ml 1 M Natriumthiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) und 500 mg Jod zugesetzt.

2.3.3 Durchflußzytometrie

Das Durchflußzytometer dient der semiquantitativen Analyse von Oberflächenmolekülen der Zellen. Wenn das Gerät gleichzeitig die Zellen nach ihren Fluoreszenzeigenschaften auftrennt, nennt man es FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorter).

Monoklonale AK gegen verschiedene Oberflächenmoleküle, die unterschiedliche Zellen exprimieren, werden selbst mit Farbstoffen markiert oder ein zweiter AK, der gegen den ersten AK gerichtet ist, wird fluoreszenzmarkiert. Jede Zelle wird einzeln durch eine Kapillare gedrückt und passiert einen Laser. Nachgeschaltete Photodetektoren messen das entstehende Licht, wodurch man Informationen über die Zelle erhält:

Emittiertes Licht: Anzahl der an Oberflächenmoleküle gebundenen AK

Gestreutes Licht: forward scatter (Vorwärtsstreuung): Zellgröße

side scatter: Granularität

Indem man mehrere verschiedene Erstantikörper mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen benutzt, kann man die Zellpopulation sehr genau charakterisieren.

2.3.4 FACS-Assay

Mit dieser Methode wurden regelmäßig alle Tumorzelllinien, die für die Immunpräzipitation eingesetzt wurden, auf die Expression der MHC-Allele kontrolliert.

1-5 x 10⁵ Zellen (jede Probe) wurden zunächst mit FCS-freiem Medium gewaschen. Anschließend wurden sie mit 100 µl MHC-spezifischen AK (5 µg/ml) 30 min auf Eis inkubiert. Nach dreimaligen Waschen mit 200 µl eisgekühltem PBS, 2 % FCS, 0,02 % NaN₃ erfolgte die Inkubation mit 100 µl 1:100 verdünnten Zweitantikörper 30 min auf Eis. Als Zweitantikörper wurde ein Fluoresceinisothiocyanat (FITC) – markiertes Ziege-anti-Maus-IgG-Immunglobulin eingesetzt. Erneut wurden die Zellen dreimal gewaschen und in 250 µl PBS, 2 % FCS, 0,02 % NaN₃ in FACS-Röhrchen (Falkon, 2053) überführt und gemessen.

2.3.5 MHC-Stabilisierungsassay

Die neu vorhergesagten und hergestellten Peptide werden auf ihr Bindevverhalten für ein bestimmtes MHC-Allel getestet. Es ist allerdings bekannt, daß bei bestimmten Allelen wie z.B. dem HLA-A2 gerade die in der Literatur beschriebenen tumorassoziierten Peptide keine besonders affine Bindung zeigen.

Hierfür wurden T2 Zellen verwendet (Elvin et al., 1993). Aufgrund einer Deletion in der MHC-Region exprimieren sie keinen TAP. Dadurch können sie keine vollständigen ternären Komplexe aus MHC- α -Kette, β_2 -Mikroglobulin und endogenem Peptid bilden. Dimere Komplexe aus MHC- α -Kette, und β_2 -Mikroglobulin werden an die Zelloberfläche transportiert. Diese sind jedoch nicht stabil. Das β_2 -Mikroglobulin dissoziiert ab und die schwere α -Kette wird wieder internalisiert und abgebaut. Daher exprimieren diese Zellen an ihrer Oberfläche eine stark reduzierte Zahl von MHC-Klasse-I-Molekülen.

Das Prinzip des Stabilisierungsassays beruht darauf, daß ein Peptid von extern in das Medium gegeben wird. Bindet dieses an den dimeren Komplex, überführt es ihn in die

stabile ternäre Form. Je stärker ein Peptid bindet, desto stärker ist die Stabilisierung. Die komplett gefalteten MHC-I/Peptid-Komplexe akkumulieren an der Zelloberfläche und können durch spezifische AK in der FACS-Analyse gemessen werden.

Zuerst wurde von jedem Peptid, das getestet werden sollte, eine 10 mM Stammlösung in DMSO hergestellt. Von dieser Stammlösung ausgehend, wurden drei verschiedene Konzentrationen hergestellt:

1 mM, 0,3 mM, 0,1 mM.

Davon wurden jeweils 10 µl in zwei Löcher einer 96-well-Kulturplatte (Greiner) pipettiert und mit 100 µl Zellsuspension ($1-5 \times 10^5$ Zellen/100 µl) vermischt. Die Negativkontrollen erhielten kein Peptid. Der Ansatz wurde über Nacht bei normalen Zellkulturbedingungen (s.o.) inkubiert und durch FACS-Färbung analysiert. Das Maß der Peptidbindung an das MHC-Molekül wurde durch das Verhältnis der Durchschnittsfluoreszenz mit Peptid zu der Durchschnittsfluoreszenz ohne Peptid ermittelt.

2.3.6 Säureextraktion von MHC-I-Liganden

2.3.6.1 Herstellung einer Affinitätssäule

40 mg CNBr-aktivierte Sepharose® 4B (Fa. Pharmacia Biotech) wurden pro mg AK mit 40 ml 1 mM HCl eine halbe Stunde im Drehrad aktiviert und bei 300 U/min 2 min ohne Bremse abzentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurden 40 ml AK-Lösung (ungefähr 15 mg AK in Kopplungspuffer: 0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,2) der aktivierten Sepharose zur Kopplung dazugegeben und 2-3 h (bei Raumtemperatur) geschüttelt. Nach Zentrifugation (300 U/min, 2 min, ohne Bremse) wurden jede Stunde 100 µl vom Überstand entnommen, um die Kopplungseffizienz zu bestimmen, die sich aus dem Verhältnis der OD bei 280nm am Beginn und am Ende ergab. Sie sollte über 80 % liegen.

Zum Blockieren unbesetzter reaktiver Gruppen der Sepharose wurden die Beads nach Abzentrifugation in 40 ml 0,1 M Glycin (in PBS, pH 8) 1 h aufgenommen. Nach

dreimaligem Waschen mit PBS wurde die Sepharose in eine Chromatographiesäule gepackt.

2.3.6.2 Immunpräzipitation von MHC-Molekülen

Die Tumorzellen wurden im fünffachen Volumen Aufschlußpuffer (0,01 M CHAPS (ROCHE), 2 Tbl/100 ml des Proteinase-Inhibitoren-Cocktails complete™ (ROCHE) in PBS) aufgenommen. Solide Tumoren wurden zunächst im Mixer zerkleinert. Nach einer Stunde Rühren bei 4°C wurde die Suspension im Glashomogenisator mit 20 Kolbenstößen der Größe large (Spaltbreite 50-70 µm) und 20 der Größe small (Spaltbreite 10-30 µm) homogenisiert. Nach weiteren ein bis zwei Stunden Rühren sollten die Membranproteine solubilisiert sein. In einem ersten Zentrifugationsschritt wurden bei 4.000 U/min (20 min, 4°C, mit Bremse) die groben Zellbruchstücke abgetrennt. Das oben schwimmende Fett und das Pellet am Boden wurden verworfen. Die Suspension wurde in einer Ultrazentrifuge (40.000 U/min, 1 h, 4°C) zentrifugiert. Der klare Überstand wurde sterilfiltriert und über Nacht bei 4°C zyklisch mit einer Flußrate von 0,5 ml/min über die α-MHC-AK-Säule gepumpt, die zuvor 15 min mit PBS gewaschen wurde.

2.3.6.3 Säureextraktion

Die Immunpräzipitationssäulen wurden 1 h mit PBS gewaschen. Nachdem die Säulen trockengelassen waren, wurden 300 µl 0,1 % und 10 µl 10 % TFA auf das Gelbett gegeben. Nach 10 min (anfänglich wurde die Probe während der Zeit geschüttelt) wurde die Probe in ein Centricon10-Röhrchen getropft. Zwei weitere Male wurde die Sepharose mit 300 µl 0,1 % TFA resuspendiert. Die Eluate wurden in dem Centricon10-Röhrchen (10 kDa-Filter) vereinigt und bei 4.000 U/min bei 4°C zentrifugiert, um die größeren Proteine abzutrennen. Das Ultrafiltrat wurde in der *Speedvac* auf ein Volumen von 500 µl eingengt.

Da im Laufe der Methodenoptimierung das Extraktionsvolumen auf jeweils 100 µl 0,1 % und 10 µl 10% TFA reduziert wurde, entfiel der Einengungsschritt in der *Speedvac*.

2.3.6.4 Fraktionierung mittels Reversed-Phase HPLC

Die so gewonnenen Peptide wurde über ein Microbore-HPLC-System (*High Performance Liquid Chromatography*, SMART-System, Pharmacia) mit einer μ RP SC 2.1/10-Säule (Säulendimension 100 x 2,1 mm), die eine Mischung von Silanolgekoppeltem C₂/C₁₈-Material enthielt, aufgetrennt und entsalzt. Die Trennung im Peak-Fraktionierungsmodus erfolgte bei einer Flußrate von 150 μ l/min bei folgendem Gradientenverlauf:

Eluent A: 0,1 % TFA in H₂O

Eluent B: 0,081 % TFA in 80 % Acetonitril in H₂O

| | | | | | | | | |
|----------------|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Zeit in min | 0 | 5 | 25 | 45 | 55 | 60 | 65 | 70 |
| Solvent A in % | 90 | 90 | 80 | 60 | 40 | 25 | 25 | 90 |
| Solvent B in % | 10 | 10 | 20 | 40 | 60 | 75 | 75 | 10 |

2.3.6.5 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen (Sodium Dodecyl Sulfate)

Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma) ist ein Triphenylmethanfarbstoff, mit dem Proteinbanden in Gelen nachgewiesen werden können.

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht, die durch SDS denaturiert wurden. Diese Methode wurde benutzt, um die Überstände auf dem 10 kDa Filter, auf dem sich die schweren Ketten der MHC-I-Moleküle befinden müßten, zu analysieren.

Material für ein 12 % SDS-PAGE (Trenngel):

H₂O_d 3,3 ml

1,5 M Tris-HCl, pH 8,6 2,5 ml

10 % SDS 0,1 ml

A30 %/Bis 0,8 % 4,0 ml

A: Acrylamid, Bis: N,N'-Methylenbisacrylamid

10 % APS 50 µl, induziert Radikalentstehung
TEMED 10 µl, stabilisiert die Radikale
APS: Ammoniumpersulfat

Material für das 4 % Sammelgel:

H₂O_d 6,1 ml
1,0 M Tris pH 6,8 2,5 ml
10 % SDS 0,1 ml
A 30 %/Bis 0,8 % 1,3 ml

10 % APS 50 µl
TEMED 10 µl

10 x Laufpuffer:

0,25 M Tris
1,9 M Glycin
1 % SDS

Marker: Prestained Protein Marker, Broad Range, New England BioLabs

Nachdem das 12 %-ige Polyacrylamid-Trenngel auspolymerisiert war, wurde es mit 4 %-igen Sammelgel, das die Probenaschen enthielt, überschichtet. Die Proben wurden mit 5 x SDS bei 95°C hitzedenaturiert. Die Gelkammer wurde mit Laufpuffer gefüllt und sowohl der Marker als auch die Proben in die Taschen pipettiert. In der ersten halben Stunde wurde eine Spannung von 80 V, danach von 120 V angelegt.

Das Gel wurde mindestens eine Stunde in der Färbelösung (0,1 % w/v Coomassie Brilliant Blue R-250, Sigma, in Entfärbelösung, s.u.) geschwenkt, was zur Fixierung der denaturierten Proteine führte und die Anlagerung des hydrophoben Farbstoffes an die Proteinmoleküle zur Folge hatte. Die Färbelösung wurde durch Entfärbelösung (50 % Methanol, Merck, 40 % H₂O_d, 10 % Essigsäure, Merck) ausgetauscht und das Gel mehrere Stunden (über Nacht) darin geschwenkt. Dadurch wurde der Gelhintergrund

entfärbt. Die Haltbarmachung des Gels erfolgte durch Vakuumtrocknung (Gel Dryer Model 583, Biorad).

2.4 Analytische Verfahren

2.4.1 MALDI (Matrix-unterstützte Laserdesorptions-Ionisierung)

Die auf Matrixmoleküle einkristallisierte Probe wird von einem UV-Laser im Vakuum beschossen. Die Laserenergie wird von der UV-absorbierenden Matrix auf die Analyten übertragen, die dadurch ionisiert werden.

Die Analysen wurden an einem MALDI-Tof (time of flight)-Gerät (G2025A, Hewlett-Packard) durchgeführt. Die entstehenden Ionen werden durch ein elektrisches Feld (Beschleunigungsspannung 28 kV) im Vakuum beschleunigt und treffen nach einer definierten Flugstrecke (1 m) auf den Tof-Detektor. Aufgrund der unterschiedlichen Flugzeiten können die Massen berechnet werden (Verhältnis Molekülmasse zu Ladung (m/z) ist proportional zum Quadrat der Flugzeit).

Als Matrix wurde HABA (2'-(4-Hydroxyphenyl)-Azobenzosäure) verwendet. Auf den Probenträger, der 10 Positionen enthält, wurden 0,5 µl HABA auf eine Position aufgetragen und im Vakuum getrocknet. Auf diese Matrix wurden 0,5 µl der Peptidprobe pipettiert und im Vakuum einkristallisiert. Bei niedrigeren Laserenergien wurde mit der Analyse begonnen, da die Matrixmoleküle selbst Signale erzeugen. Falls nötig wurde die Energie langsam erhöht. Dabei lagen die Laserenergien meist bei 1-3 µJ. Die Position des Lasers auf den Probenträger konnte variiert werden.

2.4.2 Edman-Sequenzierung

Durch automatisierten Edman-Abbau wurden Peptide N-terminal sequenziert. Es wurde ein „*pulsed-liquid*“ Protein Sequencer („Procise“ 494A, Applied Biosystems) verwendet. Die Peptidproben wurden in einer Kartusche vorgelegt, von denen jeweils die N-terminale AS durch Edman-Abbau abgespalten wurde. In einem nachgeschalteten

HPLC-Gerät wurden die AS durch ihre spezifischen Retentionszeiten identifiziert. Über die Höhe der Absorption bei 269 nm konnte die Konzentration bestimmt werden. Dieses Verfahren wurde zur Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten Eichpeptide und zur Poolsequenzierung angewendet.

2.4.3 HPLC-(Electrospray-)mass spectrometry (Q-Tof)

Zur Auftrennung und Analyse komplexer Peptidgemische, wie sie z.B. im Rahmen einer Säureextraktion von MHC-Liganden entstehen, wurde eine HPLC-MS-Kombination benutzt. Um das komplexe Gemisch aufzutrennen, ist dem Massenspektrometer eine HPLC-Anlage vorgeschaltet. Diese ist am Ende direkt mit der massenspektrometrischen Elektrospray-Ionisation verbunden. In kleinen Fraktionen werden hier die verschiedenen Massen mit ihren Aminosäuresequenzen identifiziert. Zur Erhöhung der Sensitivität wurde das Gerät zuvor mit einer probenspezifischen Eichmischung der vorhergesagten Liganden geeicht. Dadurch konnten Peptide in Mengen unter 10 fmol nachgewiesen werden.

Diese Analyse wurde bei den extrahierten MHC-Klasse-I-Liganden von soliden Kolonkarzinomen und –zelllinien angewandt. Dies wurde freundlicherweise von Markus Schirle durchgeführt.

2.5 Herstellung einer Eichpeptidmischung

2.5.1 Epitopvorhersage für Proteinantigene eines Tumors

Für bekannte tumorspezifische und -assoziierte Proteine eines Tumors werden potentielle MHC-Klasse-I-Liganden mittels Epitopvorhersage (siehe Kapitel 1.1.2.2.1) vorhergesagt. Hierfür wurde das online zu findende Programm www.syfpeithi.de (Rubrik: Epitope Prediction) verwendet.

2.5.2 Peptidsynthese

Die vorhergesagten Peptide für die Eichmischung wurden im klassischen Merrifield-Festphasensyntheseverfahren in einem Peptidsynthesizer (Modell 432A, Applied Biosystems) hergestellt. Es wurden Fmoc (9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-geschützte AS verwendet.

Die hier beschriebenen Peptide wurden freundlicherweise von Patricia Hrstić synthetisiert und aufbereitet.

2.5.3 Reinigung und Analyse der synthetisch hergestellten Peptide

Da synthesebedingt Verunreinigungen den Peptiden beigemischt waren, mußten alle Peptide der Eichmischung aufgereinigt werden. Dazu diente eine RP-HPLC (Varian Star, Zinsser Analytics). Bei einer Flußrate von 250 µl/min wurde mit folgendem Gradienten eluiert:

Eluent A: 0,1 % TFA in H₂O

Eluent B: 0,08 % TFA in Acetonitril

| Zeit in min | 0 | 5 | 25 | 27 | 30 | 32 | 48 |
|----------------|----|----|----|-----|-----|----|----|
| Solvent A in % | 90 | 90 | 50 | 0 | 0 | 90 | 90 |
| Solvent B in % | 10 | 10 | 50 | 100 | 100 | 10 | 10 |

Alle peptidverdächtigen Fraktionen wurden in kleinen Fraktionen aufgefangen und im MALDI-Tof analysiert. Die Fraktionen mit reinem Peptid wurden vereinigt. Zur Konzentrationsbestimmung wurden die Peptide mittels N-terminalen Edman-Abbau sequenziert.

2.6 Proteasomschnittvorhersage

Proteasomen spielen eine wichtige Rolle in der Generierung von MHC-Klasse-I-Liganden und daher in der Regulierung der spezifischen Immunantwort. Es wird davon ausgegangen, daß sie den C-Terminus der MHC-I-Liganden herstellen.

Humane 20S Proteasome bestehen aus je zwei Kopien von 14 verschiedenen Untereinheiten, die aufgrund von Sequenzähnlichkeiten in eine α - und β -Gruppe eingeteilt werden. Diese sind in Form von vier übereinander gestapelten Ringen mit je 7 Untereinheiten in der Reihenfolge $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ angeordnet (Groll et al., 1997). Dadurch entsteht ein faßartiger Komplex. Im Inneren sind je drei der sieben β -Untereinheiten katalytisch aktiv. Die drei katalytisch aktiven Untereinheiten besitzen jeweils verschiedene proteolytische Schnittspezifitäten. Vertebraten besitzen zudem noch drei weitere katalytisch aktive β -Untereinheiten, die durch Interferon- γ induziert werden und beim *de novo*-Zusammenbau von Proteasomen aus den α -Ketten und β -Ketten alternativ zu den drei anderen (konstitutiven) katalytisch aktiven Untereinheiten eingebaut werden können („Immunproteasomen“).

Derzeit etablieren sich Programme, die vorhersagen können, wo das abzubauen Proteom vom Proteasom geschnitten wird und somit welche Peptide als MHC-I-Liganden überhaupt generiert werden. Anhand der Proteolyse von Modellproteinen mit aufgereinigten Proteasomen ist es gelungen, derartige Informationen zur proteasomalen Schnittspezifität zu erhalten (Nussbaum et al., 1998; Emmerich et al., 2000). Die Schnittspezifitäten werden v.a. von den Aminosäure-Paaren, zwischen denen geschnitten wird, beeinflußt. Dabei wird die N-terminale AS mit P1 und die C-terminale AS mit P1' bezeichnet. Auch weiter entfernte AS variieren das Schnittverhalten. Es wurde festgestellt, daß die AS, die jenseits der Positionen P6 und P6' liegen, keinen statistisch signifikanten Einfluß mehr ausüben (Kuttler et al., 2000).

Das hier verwendete Programm spiegelt die Schnittspezifitäten des humanen konstitutiven 20S Proteasom („Erythrozyten-Proteasom“) wider. Zwei Versionen (hier A und B genannt) dieses Programms wurden verwendet, die sich in der Wahl der Modellproteine unterscheiden: Bei beiden diente Enolase und das Ovalbumin-Peptid 37-77 als Modellprotein. Programm A wurde zusätzlich mit den Daten des Ovalbumin-Peptids Y249-269 und Programm B mit den Daten des Ovalbumin-Peptids 239-282

„trainiert“. In beiden Versionen wurde der Einfluß der AS in P6-P1‘ und P4‘ berücksichtigt. In der Vorhersage bei den schon bekannten Proteinen wurden vom Programm A 99,2 % und vom Programm B 98,9 % der Schnitte korrekt reproduziert (Kuttler et al., 2000). Online sind diese Programme unter www.paproc.de frei zugänglich.

3 Ergebnisse

3.1 Melanom

3.1.1 HLA-A*0201 restringierte Eichpeptidmischung

3.1.1.1 Epitopvorhersage für Melanome

Die bevorzugte Länge von Liganden des HLA-A*0201-Moleküls ist das Nonamer. Daher ist die Matrix des Epitopvorhersage-Programms in Tab. 3.1. für Peptide mit neun AS dargestellt. Die Ankerpositionen P2 und P9 (fett gedruckt) und der Hilfsanker P6 (unterstrichen) erhalten bei der passenden AS die meisten Punkte. Besonders ungünstige AS können auch negative Bewertungen erhalten.

Tabelle 3.1.: Matrix für die Epitopvorhersage von HLA-A*0201-Liganden mit einer Länge von neun AS. P1 bis P9 entspricht der Aminosäure-Position im Peptid.

| AS | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | <u>P6</u> | P7 | P8 | P9 |
|----|----|-----------|----|----|----|-----------|----|----|-----------|
| A | 2 | 4 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 4 |
| C | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| D | -1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| E | -3 | 0 | -1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| F | 1 | 0 | 1 | -1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| G | 1 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| H | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| I | 2 | 8 | 2 | 0 | 0 | <u>4</u> | 0 | 0 | 8 |
| K | 1 | 0 | -1 | 0 | 1 | 0 | -1 | 2 | 0 |
| L | 2 | 10 | 2 | 0 | 1 | <u>4</u> | 1 | 0 | 10 |
| M | 0 | 8 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| N | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| P | -3 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Q | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| R | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| S | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| T | 0 | 4 | -1 | 0 | 0 | <u>2</u> | 0 | 2 | 4 |
| V | 1 | 4 | 0 | 0 | 0 | <u>4</u> | 2 | 0 | 10 |
| W | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| X | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Y | 2 | 0 | 1 | -1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |

Potentielle HLA-A*0201-Liganden wurden für folgende bekannten Melanom-assoziierten und –spezifischen Antigene als Nonamere und Decamere vorhergesagt:

Tyrosinase, MelanA/MART-1, gp100 (*glycoprotein*), MAGE-1 und MAGE-3, gp75/TRP1 (*tyrosinase-related protein*), TRP2 und MIA (*melanoma inhibitory activity*). In Tabelle 3.2. bis 3.4. ist ein Auszug von drei Listen der vorhergesagten Liganden, unter denen potentielle Kandidaten erwartet werden, dargestellt. Die Peptide mit den höchsten Punktwerten (*score*) erfüllen am besten das HLA-A*0201-Peptidmotiv.

Tabelle 3.2.: Die bestbewerteten Peptide für HLA-A*0201-Bindungsvorhersagen von TYROSINASE (TYRO_HUMAN); Position: bezeichnet die AS im Protein, mit der die Peptidsequenz startet; die **Ankeraminosäuren** an P2 und P9 sind fett gedruckt, der **Hilfsanker** an P6 ist unterstrichen

| Position | Aminosäurefolge 1 - 9 | score | Literatur |
|----------|-----------------------------------|-------|--|
| 490 | A L L A G L <u>V</u> S L | 34 | |
| 491 | L L A G L <u>V</u> S L L | 31 | |
| 487 | V L T A L L <u>A</u> G L | 28 | |
| 490 | A L L A G L <u>V</u> S L L | 28 | |
| 1 | M L L A V L <u>Y</u> C L | 27 | (Wölfel et al., 1994) |
| 482 | A M V G A <u>V</u> L T A L | 27 | |
| 478 | L L G A A <u>M</u> V G A V | 27 | |
| 387 | L L H H A <u>F</u> V D S I | 26 | |
| 117 | L L V R R <u>N</u> I F D L | 26 | |
| 2 | L L A V L <u>Y</u> C L L | 25 | |
| 486 | A V L T A L L <u>A</u> G L | 25 | |
| 207 | F L P W H R L <u>F</u> L L | 25 | |
| 489 | T A L L A <u>G</u> L V S L | 24 | |
| 214 | F L L R W <u>E</u> Q E I | 23 | |
| 369 | Y M N G T <u>M</u> S Q V | 23 | (Brichard et al., 1993; Robbins et al., 1994; Skipper et al., 1996; Wölfel et al., 1994) |

Tabelle 3.3.: Ein unvollständiger Ausschnitt (ab score von 25) für HLA-A*0201-Bindungsvorhersagen von gp100 (PM17_HUMAN)

| Position | Aminosäurefolge 1 - 9 | score | Literatur |
|----------|----------------------------|-------|-------------------------|
| 606 | L M A V V <u>L</u> A S L | 30 | |
| 605 | V L M A V <u>V</u> L A S L | 30 | |
| 162 | V L G G P <u>V</u> S G L | 29 | |
| 18 | L L A V G <u>A</u> T K V | 28 | |
| 456 | P L L D G <u>T</u> A T L | 28 | |
| 570 | S L A D T <u>N</u> S L A V | 27 | (Tsai et al., 1997) |
| 598 | L I V G I <u>L</u> L V L | 27 | |
| 602 | I L L V L <u>M</u> A V V | 27 | |
| 9 | L L H L A <u>V</u> I G A L | 27 | |
| 13 | A V I G A <u>L</u> L A V | 26 | |
| 597 | P L I V G I <u>L</u> L V | 26 | |
| 601 | G I L L V <u>L</u> M A V | 26 | |
| 457 | L L D G T <u>A</u> T L R L | 25 | (Kawakami et al., 1995) |
| 585 | I M P G Q <u>E</u> A G L | 25 | |
| 178 | M L G T H <u>T</u> M E V | 24 | (Tsai et al., 1997) |
| 476 | V L Y R Y <u>G</u> S F S V | 24 | (Kawakami et al., 1995) |
| 619 | R L M K Q <u>D</u> F S V | 23 | (Kawakami et al., 1998) |
| 280 | Y L E P G P <u>V</u> T A | 23 | (Cox et al., 1994) |
| 209 | I T D Q V P F S V | 18 | (Kawakami et al., 1995) |
| 154 | K T W G Q Y W Q V | 18 | (Kawakami et al., 1995) |
| 639 | R L P R I F C S C | 12 | (Kawakami et al., 1998) |

Tabelle 3.4.: Ein Ausschnitt für HLA-A*0201-Bindungsvorhersagen von MIA (MIA_HUMAN)

| Position | Aminosäurefolge 1 - 9 | score | Literatur |
|----------|----------------------------|-------|-----------|
| 4 | S L V C L <u>G</u> V I I L | 26 | |
| 113 | T L K P G <u>K</u> V D V | 25 | |
| 54 | Y M A P D <u>C</u> R F L | 24 | |
| 63 | T I H R G <u>Q</u> V V Y V | 24 | |
| 13 | L L S A F <u>S</u> G P G V | 24 | |
| 4 | S L V C L <u>G</u> V I I | 23 | |
| 5 | L V C L G <u>V</u> I I L | 22 | |
| 106 | S I V R E D <u>Q</u> T L | 22 | |
| 7 | C L G V I <u>I</u> L L S A | 21 | |
| 61 | F L T I H R <u>G</u> Q V | 20 | |

Zudem wurden zwei bekannte HLA-A*0201-restringierte Tumorantigene aus Telomerase (ILAKFLHWL) und Survivin (ELTLGEFLKL) hinzugefügt.

3.1.1.2 Aufreinigung der synthetischen Peptide

Die bestbewerteten 2 % aller theoretisch möglichen Peptide des jeweiligen Proteins wurden synthetisch hergestellt. Da synthesebedingte Verunreinigungen bei jedem Peptid vorhanden waren, wurden alle Peptide aufgereinigt. Dafür wurde das Peptid gelöst und über eine HPLC-Säule durch einen stetig ansteigenden Acetonitrilgradienten nach ihrer Lipophilie aufgetrennt. Alle Absorptionsmaxima wurden in kleinen Fraktionen aufgefangen. Abbildung 3.1. zeigt das HPLC-Chromatogramm eines synthetisch hergestellten Peptids. Neben dem erwarteten Produktpeak sind weitere Signale sichtbar, die die Verunreinigungen darstellen.

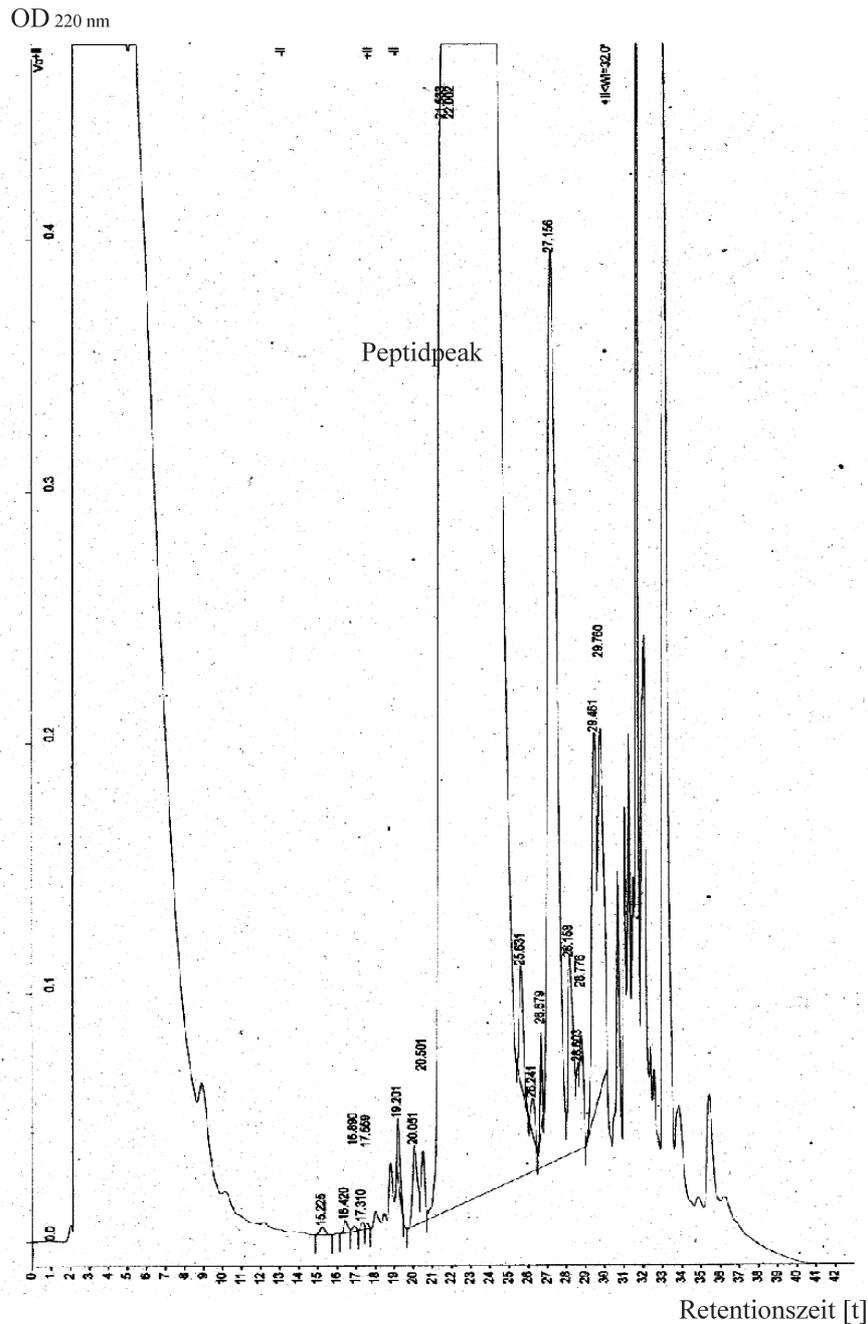


Abbildung 3.1.: Chromatogramm eines HPLC-Laufes zur Aufreinigung des synthetisierten Peptids YMAPDCRFL aus dem Protein MIA. Neben den Peptidpeak sind deutlich die Verunreinigungen erkennbar.

Die Masse jeder Peptid-Fraktion des HPLC-Laufs wurde durch MALDI-Massenspektrometrie analysiert. Im Rahmen der Meßgenauigkeit ist in Abbildung 3.2. die korrekte Masse von 1115,5 Da des Peptids YMAPDCRFL zu erkennen.

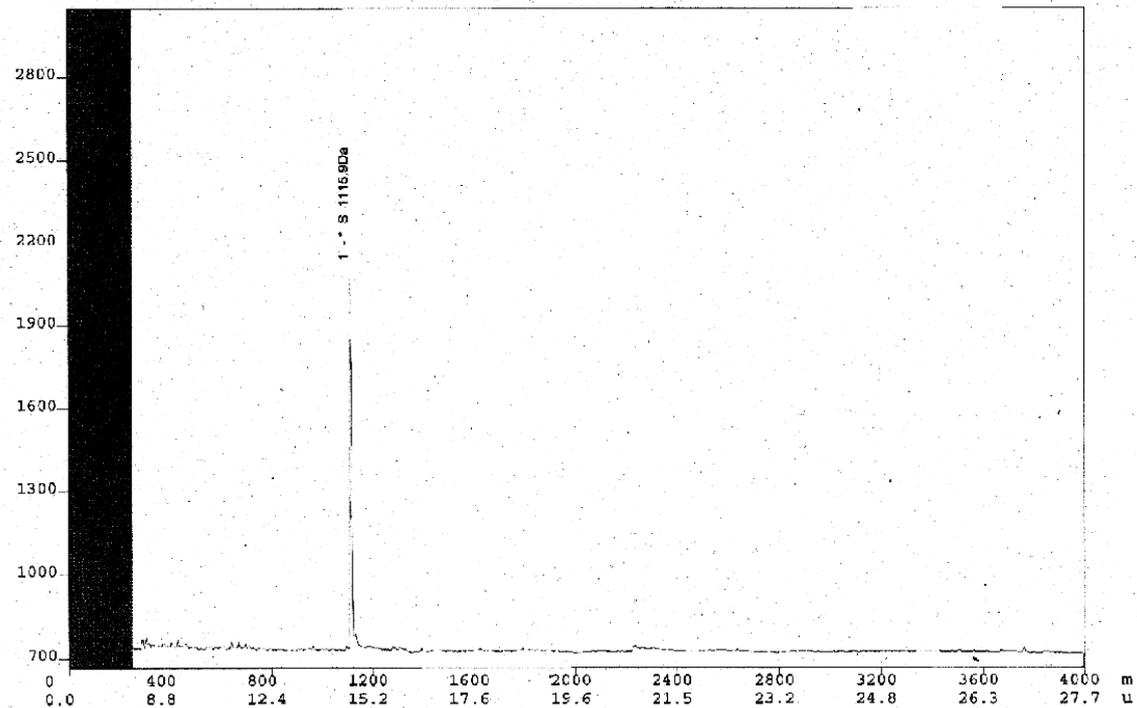


Abbildung 3.2.: MALDI-Spektrum des aufgereinigten Peptids YMAPDCRFL aus dem Protein MIA. Die korrekte Masse beträgt 1115,5 kDa.

Die reinen Fraktionen eines jeden Peptids wurden vereinigt. Die Konzentration der vereinigten Fraktionen wurde durch N-terminalen Edman-Abbau im Protein-Sequencer bestimmt. Dazu wurden 3µl des gelösten und aufgereinigten Peptids aufgetragen. Die Konzentration des Peptids wurde folgendermaßen berechnet:

$$(\text{die im 2. Zyklus detektierte Menge der AS}) \times 2 / 3$$

Im zweiten Zyklus geht man von einer Ausbeute von ca. 50 % aus. Daher wird mit 2 multipliziert. Da 3 µl aufgetragen wurden, muß noch durch 3 dividiert werden.

Peptide, die eine Konzentration unter 25 pmol/µl zeigten, wurden zunächst nicht in die Eichmischung integriert.

Tabelle 3.5. zeigt die Sequenzdaten der drei ersten AS des Peptids YMAPDCRFL. Die Konzentration dieses Peptids beträgt ca. 110 pmol/µl.

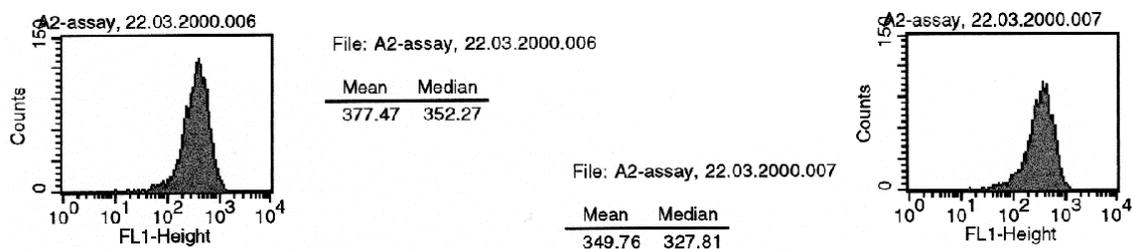
Tabelle 3.5.: Sequenz-Daten des synthetisierten und aufgereinigten Peptids YMAPDCRFL aus dem Protein MIA; es konnte eine Konzentration von ~ 110 pmol/ μ l detektiert werden.

| Zyklus | A | M | Y |
|--------|---------------|---------------|---------------|
| 1 | 0,66 | 22,11 | 171,34 |
| 2 | 1,19 | 164,39 | 4,67 |
| 3 | 149,54 | 10,83 | 1,01 |

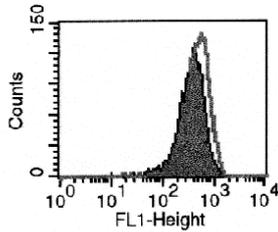
3.1.1.3 Peptidbindungsassay

Jedes Peptid der Eichmischung wurde auf sein HLA-A*0201-Bindungsverhalten hin untersucht. Dafür wurden im Stabilisierungsassay TAP-defiziente T2-Zellen mit Peptid inkubiert und anschließend durch FACS-Analyse die MHC-Dichte auf der Zelloberfläche bestimmt. Die Peptide wurden in zwei verschiedenen Konzentrationen (10 μ M und 100 μ M) in Doppelbestimmungen getestet. Die Referenz stellte die HLA-A2-Grundexpression ohne Peptid mit Erstantikörper und fluoreszierendem Zweitantikörper dar. Als Ergebnis wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI, *Mean Fluorescence Intensity*) verwendet. Abbildung 3.3. zeigt einen solchen Assay. Die Referenz ohne Peptid mit beiden AK wird als dunkel hinterlegte Kurve dargestellt, die als Hintergrundkurve bei den Proben mit Peptid bestehen bleibt.

a)



b)



File: A2-assay, 22.03.2000.035

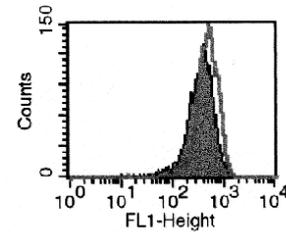
| Mean | Median |
|--------|--------|
| 497.52 | 469.76 |

ϕ 488,5

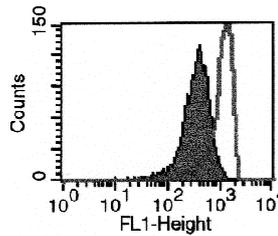
10 µM

File: A2-assay, 22.03.2000.036

| Mean | Median |
|--------|--------|
| 479.49 | 453.16 |



c)



File: A2-assay, 22.03.2000.039

| Mean | Median |
|---------|---------|
| 1055.17 | 1074.61 |

ϕ 1071,7

100 µM

File: A2-assay, 22.03.2000.040

| Mean | Median |
|---------|---------|
| 1088.17 | 1113.97 |

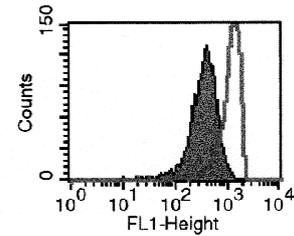


Abbildung 3.3.: FACS-Assay, Erkennung von Peptid-beladenen HLA-A*0201 exprimierenden T2 Zellen mit W6/32 als Erstantikörper; Doppelbestimmungen.

- a) Zellen ohne Peptid, mit Erstantikörper W6/32 und Fluoreszenz-markiertem Zweit-AK, Autofluoreszenz (die ausgefüllte Kurve wird als Vergleich beibehalten),
 b) Zellen mit dem Peptid YMAPDCRFL (10 µM) aus dem Protein MIA und beiden AK; die leere Kurve zeigt die aktuelle Fluoreszenzverteilung an.
 c) Zellen mit dem Peptid YMAPDCRFL (100 µM) und beiden AK

Wenn ein Peptid bindet, kommt es zu einer Fluoreszenzverschiebung nach rechts (höhere Fluoreszenzintensität). Das Maß für die Peptidbindung wird durch das Verhältnis der MFI mit Peptid zu der MFI ohne Peptid ermittelt.

Maß der Peptidbindung:

$$\frac{\text{Durchschnitt (MFI mit Peptid und AK)}}{\text{höchster Wert (MFI ohne Peptid, mit AK)}}$$

Somit binden diejenigen Peptide, die einen Faktor größer 1,0 zeigen. Werte von 1,0 oder kleiner sprechen für keine Bindung.

Das in Abbildung 3.3. dargestellte Peptid (YMAPDCRFL) bindet gut an den HLA-A*0201 Molekülen. Die Fluoreszenz nimmt deutlich zu.

Das Maß der Peptidbindung bei einer Konzentration von 100 µM:

$$\frac{(1055,17 + 1088,17) : 2}{377,47}$$

Der errechnete Faktor ergibt bei einer Konzentration von 100 μ M 2,8.

Die in der letzten Spalte der Tabelle 3.6. angegebenen Werte geben den Faktor der Peptidbindung bei 10 μ M und 100 μ M an.

3.1.1.4 Proteasom-Schnittvorhersage

Sascha Nussbaum führte freundlicherweise für alle hier beschriebenen Tumorantigene die Proteasom-Schnittvorhersage durch. Nun sollte untersucht werden, wieviele der C-Termini von den durch die Epitopvorhersage gefundenen CTL-Epitope vom Proteasom erzeugt werden.

Von Programm A und Programm B wurden übereinstimmend ein Drittel vorhergesagt und bei weiteren 14 % wurde der C-terminale Schnitt nur von einer Version vorhergesagt. Von den 27 bekannten Liganden wurden 12 (44,4 %) von beiden Versionen und ein Ligand (3,7 %) nur von Programm A erfaßt. In der vollständigen Liste der Eichpeptide, dargestellt in Tabelle 3.6., sind die genauen Ergebnisse der beiden Versionen durch + (C-terminaler Schnitt) und durch – (kein Schnitt) für beide Programmversionen angegeben.

Tabelle 3.6.: Vollständige Eichmischung der vorhergesagten Melanom-assoziierten HLA-A*0201-Liganden, PTM: posttraslationale Modifikation, *: beschriebene Liganden

| Sequenz | *Be- kannt | Quelle | Position | score | Proteasom- vorhersage A/B | (M+H) ⁺ in Da | Peptidbindung Peptid-Konzentration | |
|-------------|---------------|-----------------|----------|-------|---------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|-------------|
| | | | | | | | 10 μ M | 100 μ M |
| MLLAVLYCL | * | Tyrosinase | 1-9 | 27 | -/- | 1038.6 | 1,2 | 1,0 |
| YMNGTMSQV | * | Tyrosinase | 369-377 | 23 | +/+ | 1030.4 | 1,2/1,3/0,8 | 1,8/1,5/1,0 |
| ALLAGLVSL | | Tyrosinase | 490-498 | 34 | +/- | 856.5 | 1,1 | 1,3 |
| YMDGTMSQV | * | Tyrosinase, PTM | 369-377* | 22 | +/+ | 1031.4 | 1,1/1,2 | 1,9/1,7 |
| ILTVILGVL | * | MelanA | 32-40 | 25 | -/- | 940.6 | 1,5/1,0 | 1,4/0,8 |
| AAGIGILTV | * | MelanA | 27-35 | 25 | +/+ | 814.5 | 1,0/1,1 | 1,0/1,2 |
| ALMDKSLHV | | MelanA | 56-64 | 26 | -/+ | 1013.5 | | |
| EAAGIGILTV | * | MelanA | 26-34 | 22 | +/+ | 943.5 | 1,3 | 2,2 |
| MLGTHTMEV | * | gp100 | 178-186 | 24 | -/- | 1018.5 | 1,1/1,2/1,0 | 1,5/1,5/1,2 |
| RLMKQDFSV | * | gp100 | 619-627 | 23 | -/- | 1123.6 | 1,0 | 2,0 |
| RLPRIFCSC | * | gp100 | 639-647 | 12 | -/- | 1094.6 | 0,9 | 2,0 |
| YLEPGPVTA | * | gp100 | 280-288 | 23 | +/+ | 946.5 | 1,2/1,0 | 2,6/1,5 |
| LLDGTATLRL | * | gp100 | 457-466 | 25 | -/- | 1072.6 | 1,0/1,2 | 1,3/1,2 |
| ITDQVPFSV | * | gp100 | 209-217 | 18 | +/+ | 1005.5 | 0,9/1,0/1,0 | 1,1/1,0/0,9 |
| KTWGQYWQV | * | gp100 | 154-162 | 18 | +/+ | 1195.6 | 1,0 | 1,3 |
| SLADTNSLAV | * | gp100 | 570-579 | 27 | -/- | 980.5 | 0,9 | 2,5 |
| VLYRYGSEFSV | * | gp100 | 476-485 | 24 | -/- | 1190.6 | 1,1 | 1,5 |
| VLGGPVSGL | | gp100 | 162-170 | 29 | +/+ | 798.5 | 1,5 | 1,5 |
| LLAVGATKV | | gp100 | 18-26 | 28 | -/- | 871.6 | 0,8/1,2 | 1,7/1,7 |
| IMPGQEAGL | | gp100 | 585-593 | 25 | -/- | 915.5 | 1,0/0,9 | 0,9/0,9 |
| SLAVVSTQL | | gp100 | 576-584 | 24 | -/- | 917.5 | 1,3/0,9/1,2 | 2,8/1,3/2,2 |

| | | | | | | | | |
|--------------|---|------------|---------|----|-------------|--------|-------------|-------------|
| FLIIVLVM I | | MAGE-1 | 194-202 | 27 | +/- | 1060.7 | 0,9/0,9 | 0,6/0,6 |
| KVLEYVIK V | * | MAGE-1 | 278-286 | 26 | +/+ | 1090.7 | 1,0/0,9/1,0 | 1,1/1,2/1,1 |
| LVLGTL EEV | | MAGE-1 | 38-46 | 26 | -/- | 972.6 | 0,9/0,9 | 0,5/0,5 |
| ALREEEEG V | | MAGE-1 | 301-309 | 25 | Proteinende | 1031.5 | 1,3/1,5/1,3 | 2,6/2,4/2,6 |
| VITKKVAD L | | MAGE-1 | 101-109 | 25 | -/- | 986.6 | 1,1/1,1 | 1,1/1,1 |
| QIMPKTGFL | | MAGE-1 | 187-195 | 24 | +/+ | 1034.6 | 1,1/1,1/1,1 | 1,6/1,7/1,6 |
| ILES LFRAV | | MAGE-1 | 93-101 | 23 | +/+ | 1047.6 | 1,0/1,1 | 1,0/1,2 |
| ALEAQQEAL | | MAGE-1 | 15-23 | 22 | -/- | 972.5 | 1,0/1,1 | 1,1/1,1 |
| CLGLSYDGL | | MAGE-1 | 174-182 | 21 | -/- | 940.4 | 0,8/1,0 | 1,1/1,6 |
| SLQLVFGID V | | MAGE-1 | 150-159 | 22 | +/+ | 1090.6 | 1,4 | 1,4 |
| ALAETS YVKV | | MAGE-1 | 270-279 | 30 | -/+ | 1080.6 | 0,9/0,9 | 0,7/0,7 |
| FLWGPRAL V | * | MAGE-3 | 271-279 | 27 | -/- | 1058.6 | 1,1/1,0 | 2,4/2,6 |
| ALSRKVAEL | | MAGE-3 | 108-116 | 31 | -/- | 986.6 | 1,3/1,4 | 2,5/2,5 |
| GLLIIVLAI | | MAGE-3 | 200-208 | 27 | -/- | 924.6 | 1,0/1,3 | 1,0/1,2 |
| KIWEELSVL | | MAGE-3 | 220-228 | 26 | +/+ | 1116.6 | 1,1/1,4 | 2,0/2,8 |
| SILGDPKKL | | MAGE-3 | 237-245 | 25 | -/- | 970.6 | 1,0/1,3/1,0 | 1,4/1,2/0,9 |
| KVAELVHFL | * | MAGE-3 | 112-120 | 25 | +/+ | 1055.6 | 1,9/1,5 | 2,9/2,6 |
| LLHTFTDAV | * | gp75, TRP1 | 402-410 | 26 | -/- | 1016.5 | 1,1/1,2/0,9 | 1,7/2,2/2,0 |
| MLQEPSFSL | * | gp75 | 238-246 | 25 | +/+ | 1051.5 | 1,0/1,3 | 1,5/2,4 |
| VLIVRRNLL | | gp75 | 126-134 | 24 | -/- | 1095.7 | 1,0 | 1,0 |
| LIFGTASYL | | gp75 | 492-500 | 23 | -/- | 984.5 | 1,0/1,1 | 1,1/1,2 |
| NMVPFWPPV | | gp75 | 439-447 | 22 | -/- | 1086.5 | 2,2 | 2,4 |
| SLGCIFPPL | * | gp75 | 8-16 | 22 | -/- | 996.5 | 2,2/1,3/1,1 | 2,4/2,4/1,6 |
| FLTWHRYHL | | gp75 | 220-228 | 21 | -/- | 1272.7 | 1,0 | 1,3 |
| SVYDFVWL | * | TRP2, TYR2 | 180-188 | 21 | +/- | 1175.6 | 1,0 | 1,7 |
| ALVGLFVLL | | TRP2 | 482-490 | 27 | +/- | 944.6 | 1,0 | 1,0 |
| VMGTLVALV | | TRP2 | 476-484 | 26 | -/- | 902.5 | 1,3 | 2,3 |
| TLDSQVM SL | * | TRP2 | 360-368 | 26 | -/- | 993.5 | 1,2/1,8/1,5 | 2,4/3,0/2,7 |
| VIRQNIHSL | | TRP2 | 125-133 | 26 | +/+ | 1079.6 | 1,0 | 1,0 |
| SLDDYNHLV | * | TRP2 | 288-296 | 25 | -/- | 1075.5 | 1,1 | 2,2 |
| Y AIDL PVS V | * | TRP2 | 455-463 | 24 | +/+ | 976.5 | 2,0 | 2,5 |
| TLKPGKVDV | | MIA | 113-121 | 25 | +/- | 956.6 | 1,0 | 1,0 |
| YMAPDCRFL | | MIA | 54-62 | 24 | -/+ | 1115.5 | 1,3/1,3/1,0 | 2,8/2,9/1,2 |
| FLTIHRGQV | | MIA | 61-69 | 20 | -/- | 1052.6 | 1,1/1,0 | 1,7/1,0 |
| ILAKFLHWL | * | Telomerase | 540-548 | 30 | -/- | 1140.7 | 1,3 | 2,6/2,8 |
| ELTLG EFLKL | * | Survivin | 94-103 | 19 | +/+ | 1162.7 | 1,1/1,0 | 1,4/1,9 |

Die Epitope wurden beschrieben von: (Brichard et al., 1993; Castelli et al., 1995; Coulie et al., 1994; Cox et al., 1994; Kast et al., 1991; Kawakami et al., 1994a; Kawakami et al., 1994b; Kawakami et al., 1995; Kawakami et al., 1998; Kawashima et al., 1998; Noppen et al., 2000; Parkhurst et al., 1998; Pascolo et al., 2001; Rivoltini et al., 1995; Robbins et al., 1994; Skipper et al., 1996; Tsai et al., 1997; van der Bruggen et al., 1994; Wölfel et al., 1994)

3.2 Kolonkarzinome

3.2.1 Eichmischung

Für die MHC-Präzipitationen von Kolonkarzinomen bestand bereits die Eichmischung, die in Tabelle 3.7. dargestellt ist.

Tabelle 3.7.: Vorhergesagte Kolonkarzinom-assoziierte HLA-A*0201-Liganden

| Sequenz | Quelle | Score | Masse (neutral) |
|-------------|------------------------|-------|-----------------|
| SLLPAIVEL | PP2A (402-410) | 34 | 953.6 |
| ILMEHIHKL | RL19 (137-145) | 32 | 1132.6 |
| YLLPAIVHI | p68 (168-176) | 30 | 1037.6 |
| IMIGVLVGV | CEA (691-699) | 31 | 900.6 |
| YLSGANLNL | CEA (605-613) | 25 | 963.5 |
| YLWVWVNNQSL | CEA (176-185) | 25 | 1321.6 |
| QLSNGNRTL | CEA (192-200) | 24 | 1002.5 |
| GVLVGVALI | CEA (694-702) | 23 | 839.5 |
| LLSVTRNDV | CEA (380-388) | 23 | 1015.6 |
| IYPNASLL | CEA (100-108) | 23 | 1002.5 |
| VLYGPDTPI | CEA (589-597) | 23 | 973.5 |
| RLLLTASLL | CEA (17-25) | 22 | 998.7 |
| GLAPPQHEI | p53 (187-195) modified | 27 | 960.5 |
| KLLPENNVL | p53 (24-32) | 26 | 1038.6 |
| SMNRRPILTI | p53 (245-254) modified | 26 | 1199.6 |
| GLAPPQHILRV | p53 (187-197) | 26 | 1199.7 |
| VMNRRPILTI | p53 (245-254) modified | 25 | 1211.7 |
| GLAPPQHIL | p53 (187-195) | 25 | 944.5 |
| GMNWRPILTI | p53 (245-254) modified | 25 | 1199.6 |
| LLGRNSFEV | p53 (264-272) | 24 | 1033.5 |
| QLAKTCPVQL | p53 (136-145) | 24 | 1099.6 |
| ALNKMFCQL | p53 (129-137) | 23 | 1066.5 |
| KMFCQLAKT | p53 (132-140) | 22 | 1068.5 |
| PLDGEYFTL | p53 (322-330) | 21 | 1053.5 |
| RMPEAAPPV | p53 (65-73) | 21 | 966.5 |
| TLEDSSGNL | p53 (256-264) | 20 | 934.4 |
| STPPPGTRV | P53 (149-157) | 19 | 911.5 |
| VVPYEPPEV | p53 (217-225) | 17 | 1027.5 |
| LLDILDTAGL | ras (52-61) modified | 25 | 1042.5 |
| KLVVVGAGV | ras (5-13) modified | 24 | 840.5 |
| KLVVVGAAAGV | ras (5-14) modified | 24 | 911.6 |
| CLLDILDAGL | ras (51-61) modified | 24 | 1145.6 |
| CLLDILDTA | ras (51-59) | 23 | 975.5 |
| KLVVVGACV | ras (5-13) modified | 23 | 886.5 |
| KLVVVGAGGV | ras (5-14) | 22 | 897.6 |
| KLVVVGASGV | ras (5-14) modified | 22 | 927.6 |
| KLVVVGADGV | ras (5-14) modified | 22 | 955.6 |
| KLVVVGACGV | ras (5-14) modified | 22 | 943.6 |
| MTEYKLVVV | ras (1-9) | 19 | 1080.6 |
| LLKLLKSV | mdm2 (33-41) | 30 | 1025.7 |
| DLLGDLFGV | mdm2 (80-88) | 28 | 947.5 |
| SLSEEGQEL | mdm2 (260-268) | 26 | 990.5 |
| MIYRNLVVV | mdm2 (102-110) | 25 | 1105.6 |
| TMKEVLFYL | mdm2 (49-579) | 23 | 1142.6 |
| LALCVIREI | mdm2 (197-205) | 22 | 1028.6 |
| KIFGSLAFL | her-2/neu (369-377) | 28 | 995.6 |
| ILHNGAYSL | her-2/neu (435-443) | 27 | 987.5 |
| GAAKGLQSL | her-2/neu (1093-1101) | 25 | 844.5 |
| IISAVVGIL | her-2/neu (654-662) | 24 | 884.6 |
| RLQGISPKI | ssx2 (103-111) | 23 | 1010.6 |

3.2.2 Prozentuale Verteilung der HLA-Allele

Bei dem relativ großen Patientenkollektiv wurde die prozentuale Verteilung der HLA-Typisierung für HLA-A (n=92) und –B (n=91) ausgewertet. In Tabelle 3.8. ist von den häufigsten Allelen angegeben, bei wieviel Patienten ein bestimmtes Allel vorhanden war. Zudem ist die Allelhäufigkeit in diesem Patientenkollektiv angegeben.

Tabelle 3.8.: Prozentuale Verteilung der HLA-Allele des Patientenkollektivs

| HLA-A | Patienten [%] | Allel [%] | HLA-B | Patienten [%] | Allel [%] |
|-------|---------------|-----------|---------------|---------------|-----------|
| A2 | 52,2 | 31,5 | B7 | 25,3 | 14,3 |
| A1 | 23,9 | 13,0 | B44 | 18,7 | 9,9 |
| A3 | 21,7 | 12,0 | B8 | 17,6 | 9,3 |
| A24 | 16,3 | 9,2 | B35 | 16,5 | 8,2 |
| A26 | 10,9 | 5,4 | B18, B1501 | 11,0 | 6,0 |
| A11 | 9,8 | 4,9 | B38, B57 | 11,0 | 5,5 |
| A32 | 8,7 | 4,3 | B40 | 8,8 | 4,9 |
| A29 | 6,5 | 3,3 | B51 | 8,8 | 4,4 |
| A25 | 5,4 | 2,7 | B27 | 7,7 | 3,8 |

3.2.3 MHC-Präzipitationen

Zur Identifizierung von tumorassoziierten MHC-Klasse-I-Liganden wurden MHC-Präzipitationen bei soliden Tumoren und Tumorzelllinien durchgeführt. Tabelle 3.9. und 3.10. geben an, bei welchen Tumoren und Zelllinien Peptide extrahiert wurden.

Tabelle 3.9.: Solide Tumore

*: Diese AK wurden vor der Bindung an die Sepharose dialysiert, um das Azid zu entfernen, das die Bindung des AK an die Bindungsstellen der Sepharose erschwert.

| Tumorort | HLA-Typisierung | Tumor-gewicht | Verwendete Antikörper, Kopplungseffizienz | Interne ID | |
|----------------------------|------------------------------------|----------------------|--|-------------------------------|-------|
| Caecum/ Colon ascendens | A2, A68, B27, B57 | 32 g | BB7.2 (11 mg) W6/32 (11 mg) | 80 % CCA54 97 % | |
| Caecum/Colon | A2, A24 B55, B63 Bw4, Bw6 | 7 g | BB7.2 W6/32 | CCA55 | |
| Mamma | A11, A68, B18, B35, Cw2, Cw4 | 11 g | A11.1M (17 mg) B1.23.2 (15 mg) W6/32 (15 mg) | 84 % 96 % 96 % | - |
| Colon | A2, A3, B44, B62 | 4 g | BB7.2 (8 mg) GAPA3 (15 mg) *B1.23.2 (15 mg) W6/32 (15 mg) | 91 % 100 % 91 % 96 % | CCA58 |
| Colon sigmoideum | A2, A68, B7, B38, Bw4, Bw6 | 5 g | *BB7.2 (14 mg) *W6/32 (16 mg) | 98 % 98 % | CCA57 |

Tabelle 3.10.: Tumorzelllinien. Bei einer der JY-Extraktionen wurde die Peptidausbeute mit (H) und ohne (NH) Glashomogenisator verglichen.

| Zelllinie | HLA-Typisierung | Zellpellet | Verwendete Antikörper, Kopplungseffizienz | |
|---------------------|-------------------|------------|---|-------|
| SW1116 | A2 | 30 ml | BB7.2 (10,2 mg) | 95 % |
| | | | W6/32 (11,7 mg) | 98 % |
| T1 | A2 | 20 ml | *BB7.2 (15 mg) | 82 % |
| | B5 | | da die Kopplungseffizienz von verschiedenen W6/32-Linien nicht den Anforderungen entsprach, wurde auf den AK verzichtet | |
| JY | A2 | 20 ml (H), | <u>H</u> :BB7.2 (5 mg) | 100 % |
| | B7 | | B1.23.2 (5 mg) | 100 % |
| | | 20 ml (NH) | <u>NH</u> : BB7.2 (5,4 mg) | 95 % |
| | | | B1.23.2 (5 mg) | 93 % |
| JY | A2 | > 100 ml | BB7.2 (31 mg) | 96 % |
| | B7 | | B1.23.2 (31 mg) | 89 % |
| Mauszelllinie: NXS2 | H2-K ^k | 25 ml | H100-27-R55 (15 mg) (spezifisch gegen H2-K ^k , HLA-Allel von Mäusen) | 99 % |

Nachdem die MHC-Moleküle und ihre Liganden mittels TFA von der Präzipitationssäule extrahiert und ultrafiltriert worden sind, wurden die Peptide anschließend durch die HPLC (SMART) - Säule aufgetrennt. Die HPLC-Fraktionen wurden mit Hilfe verschiedener Verfahren analysiert. Einzelne Fraktionen wurden im MALDI untersucht. Proben, die interessante Massen zwischen 800 und 3000 Da enthielten, wurden einzeln im Sequenzer oder im Q-Tof analysiert. Ansonsten wurden z.T. die HPLC-Fraktionen zwischen 20 und 55 Minuten des SMART-Laufs wieder

vereinigt, da in ihnen die MHC-Liganden erwartet werden. Das Gemisch wurde mit den Verfahren der Poolsequenzierung oder im Q-ToF untersucht.

3.2.3.1 Peptidextraktion eines Dickdarmtumors

Exemplarisch wird die Extraktion des 32 Gramm schweren Dickdarmtumors (CCA54) besprochen. Die Typisierung ergab HLA-A2, -A68, -B27 und -B57. Die Immunpräzipitation wurde mit zwei Säulen, eine mit 11 mg des HLA-A*0201-spezifischen AK BB7.2 und eine mit 11 mg W6/32, der HLA-A, -B und -C erkennt, durchgeführt. Die Kopplungseffizienz an die Sepharose betrug bei BB7.2 80 %, bei W6/32 97 %. Gemäß der Anleitung wurde das Lysat über Nacht zyklisch über die HLA-A2-spezifische Säule geleitet, am nächsten Tag über die W6/32-Säule. Nach der TFA-Elution wurden die Proben ultrafiltriert. Dabei wurde zur Kontrolle ein SDS-Gel mit dem Material, das auf dem 10 kDa Filter der Centricon-Röhrchen zurückbleibt, angefertigt. Abb. 3.4. zeigt dieses Gel. Hier sollen die α -Ketten der MHC-I-Moleküle (45 kDa) nachgewiesen werden. Da das Gewicht des β_2 -Mikroglobulin bei 12 kDa liegt, könnte es den Filter passieren und ist daher nicht zwingend im Gel nachweisbar.

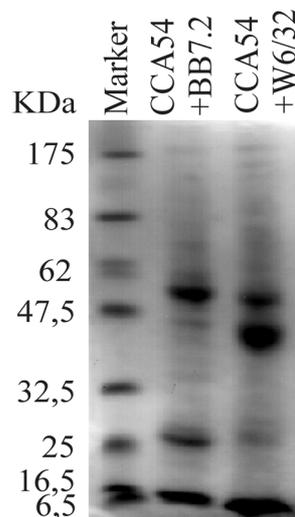


Abbildung 3.4.: SDS-Gel zum Nachweis der α -Ketten der MHC-I-Moleküle (45 kDa) von Proben des Kolonkarzinoms (CCA54); die Proteine stammen von dem Material, das nicht durch den 10 kDa-Filter des Centricon-Röhrchens zentrifugiert wurde.

Die aufgetragenen Proteinmengen sind nicht normiert. In beiden Extrakten ist die Masse um 45 kDa nachweisbar.

Nach der Filtration über den 10 kDa-Filter wurde das BB7.2-Eluat mittels HPLC auf dem SMART-System aufgetrennt. Abbildung 3.5. zeigt ein SMART-Chromatogramm.

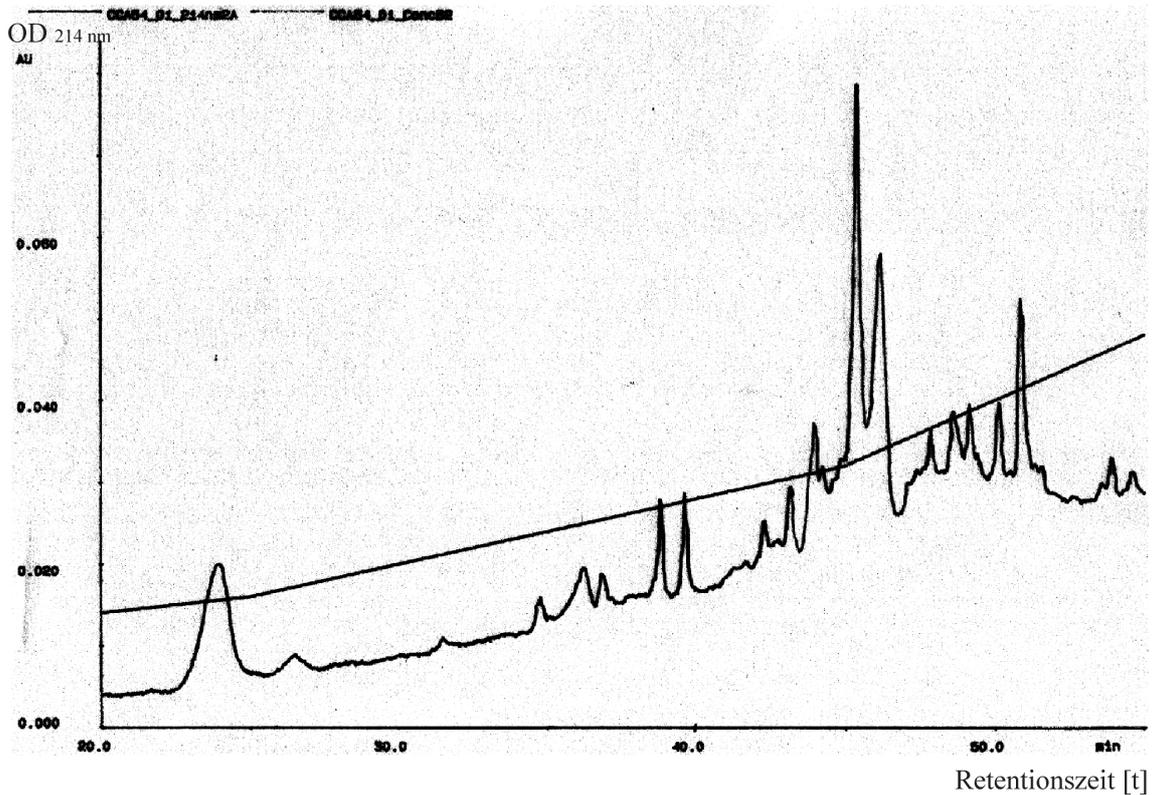


Abbildung 3.5.: HPLC-Chromatogramm der von CCA54 extrahierten Peptide, Eluat der BB7.2-Säule; Ausschnitt: 20-55 min; 0,00 - 0,08 AU.

In der Zeit zwischen 20 und 55 Minuten werden MHC-I-Liganden erwartet. Daher ist nur dieser Ausschnitt dargestellt. Die OD wird bei 214 nm gemessen, da bei dieser Wellenlänge die Peptidbindung sehr stark absorbiert.

Die einzelnen Absorptionsmaxima wurden in verschiedenen Fraktionen aufgefangen und im MALDI analysiert, demonstriert in Abbildung 3.6.

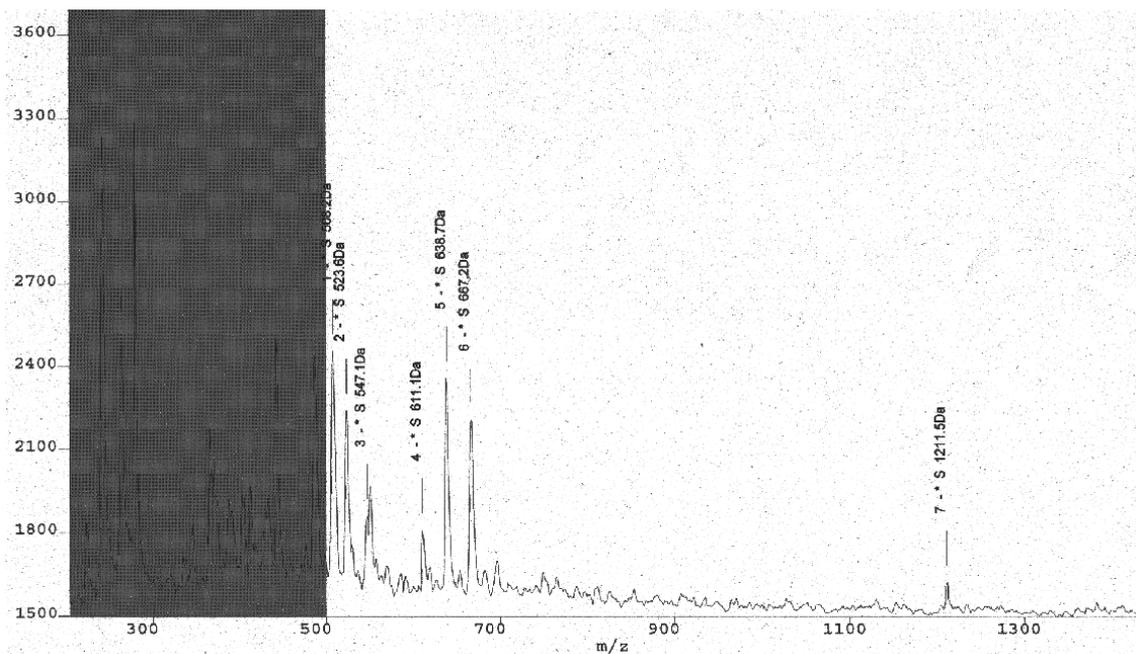


Abbildung 3.6.: MALDI einer SMART-Fraktion des CCA54-Eluats.

Bis 700 Da sind Matrixbestandteile sichtbar. Schwächere Signale mit der Masse von MHC-Klasse-I-Liganden wurden detektiert, wie in Abb. 3.6. bei 1211,5 Da zu sehen ist. Weiterführende Analysen mittels Q-ToF und Sequenzer führten zu keinem Ergebnis, da die vorhandene Menge an Peptiden zu gering und dadurch die Analyseverfahren nicht sensitiv genug waren.

3.2.3.2 Methodenvergleich

40 ml JY-Zellpellet wurde aufgearbeitet. Dabei wurden 20 ml wie im Protokoll beschrieben im Dounce-Homogenisator homogenisiert, bei den anderen 20 ml wurde dieser Schritt übersprungen. Diese Zellen sollten nur durch das Detergens aufgelassen werden. Für beide Lysate wurden zwei Immunpräzipitationssäulen verwendet, an die jeweils entweder BB7.2 oder B1.23.2 gekoppelt hatten.

Die Kontrollproben, die in Abb. 3.7. auf dem SDS-Gel dargestellt sind, zeigen die nach der TFA-Elution von der Immunpräzipitationssäule nicht durch den 10 kDa Filter des Centricon-Röhrchens zentrifugierten Proteine und Peptide.

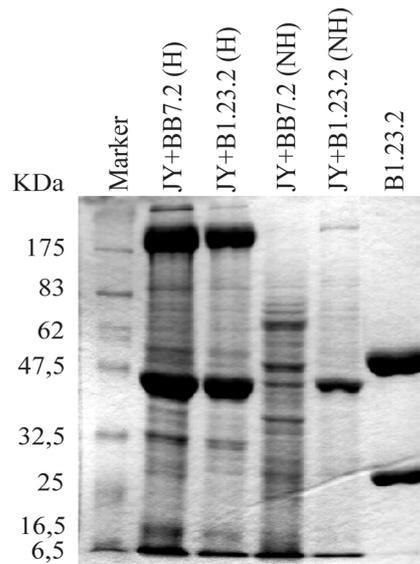


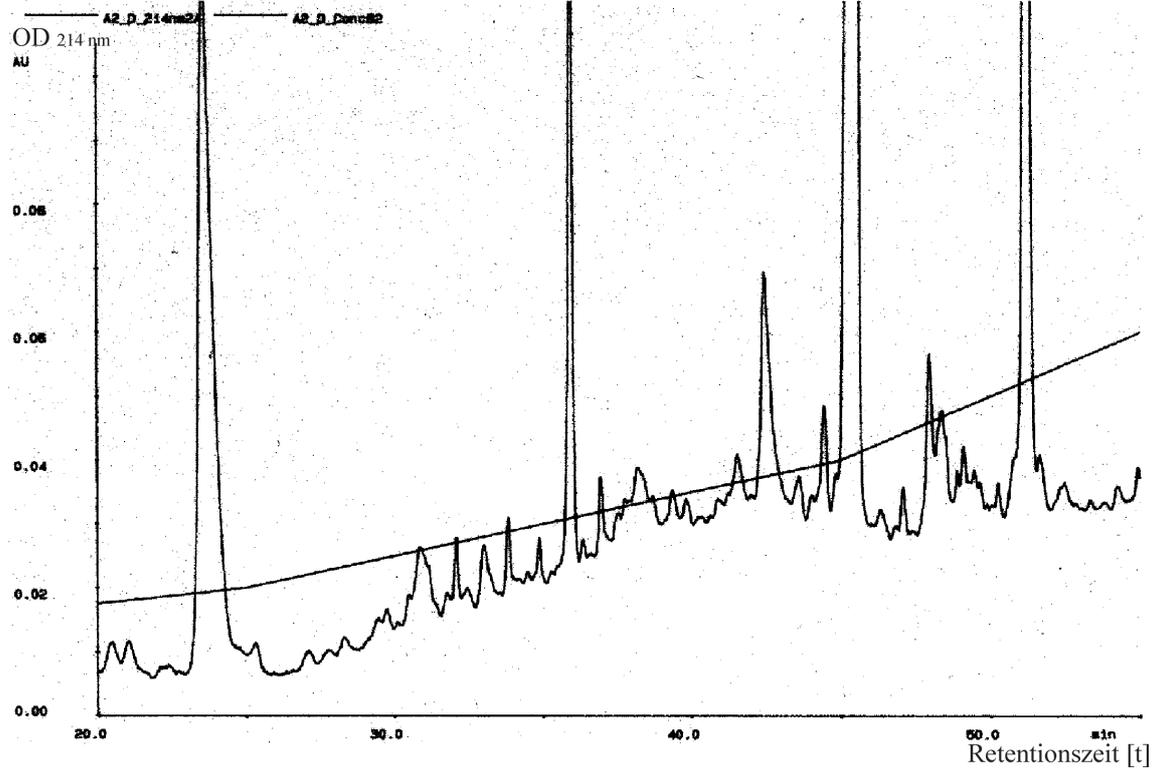
Abbildung 3.7.: SDS-Gel zum Nachweis der α -Ketten der MHC-I-Moleküle (45 kDa) von Proben unterschiedlicher JY-Lysate, die von dem 10 kDa-Filter des Centricon-Röhrchens genommen wurden. Die homogenisierten Proben sind mit (H) beschriftet. Bahn 6: denaturierter AK: B1.23.2: schwere Kette: 50 kDa, leichte Kette: 25 kDa

Die Banden sind um 45 kDa, die der schweren Kette des MHC-Klasse-I-Moleküls entsprechen, bei den homogenisierten Proben deutlich stärker nachweisbar als bei den nicht-homogenisierten. Obwohl die aufgetragenen Proteinmengen nicht normiert wurden, sprechen die Banden für eine Steigerung der Effektivität des Zellaufschlusses durch den Glashomogenisator.

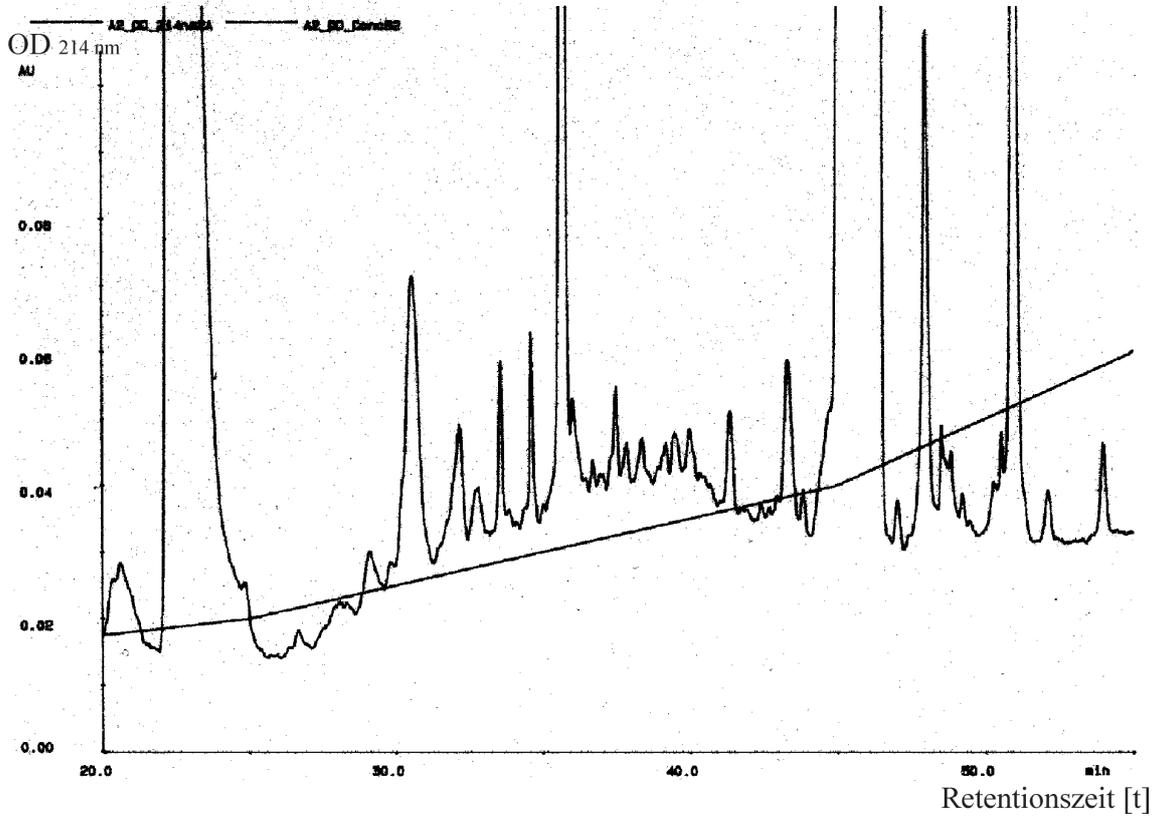
Die durch das Centricon-Röhrchen filtrierte Peptide wurden im SMART aufgetrennt. Abbildung 3.8. zeigt die vier SMART-Chromatogramme. Die HLA-A*0201-spezifischen lassen die typischen Absorptionsmaxima, die als Zeichen für extrahierte Peptide gelten, erkennen. Im Vergleich dieser beiden Proben sind ohne Homogenisator höhere Signale detektierbar.

Bei den HLA-B7-spezifischen HPLC-Chromatogrammen sind weder bei den homogenisierten noch bei den nicht-homogenisierten Eluatene viele distinkte Peaks erkennbar. Insgesamt liegt die Absorption bei der homogenisierten Probe etwas höher als bei der nicht-homogenisierten.

a)



b)



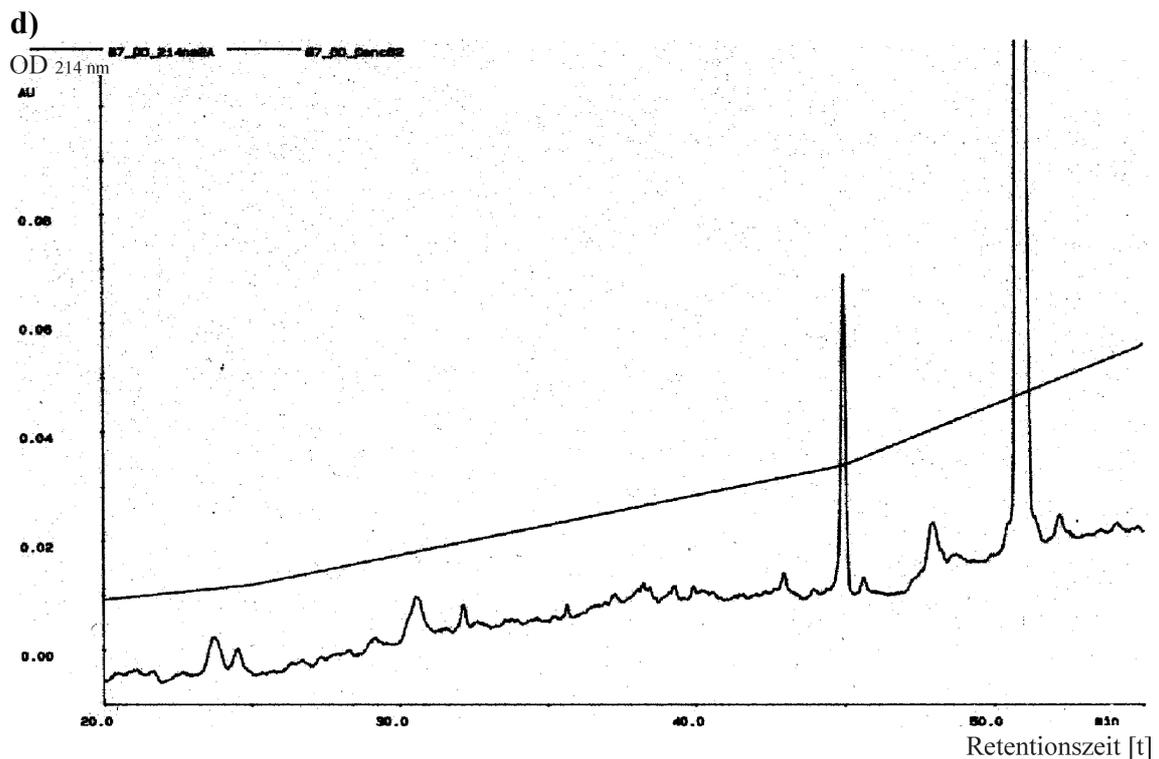
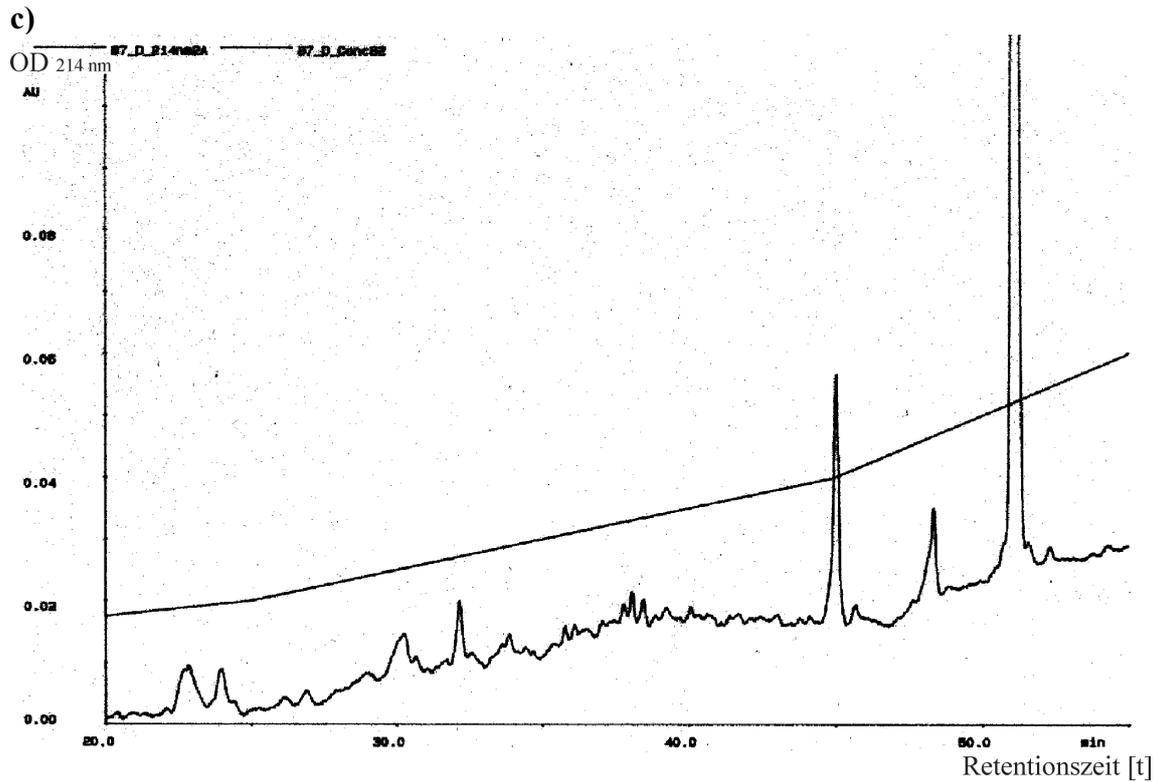
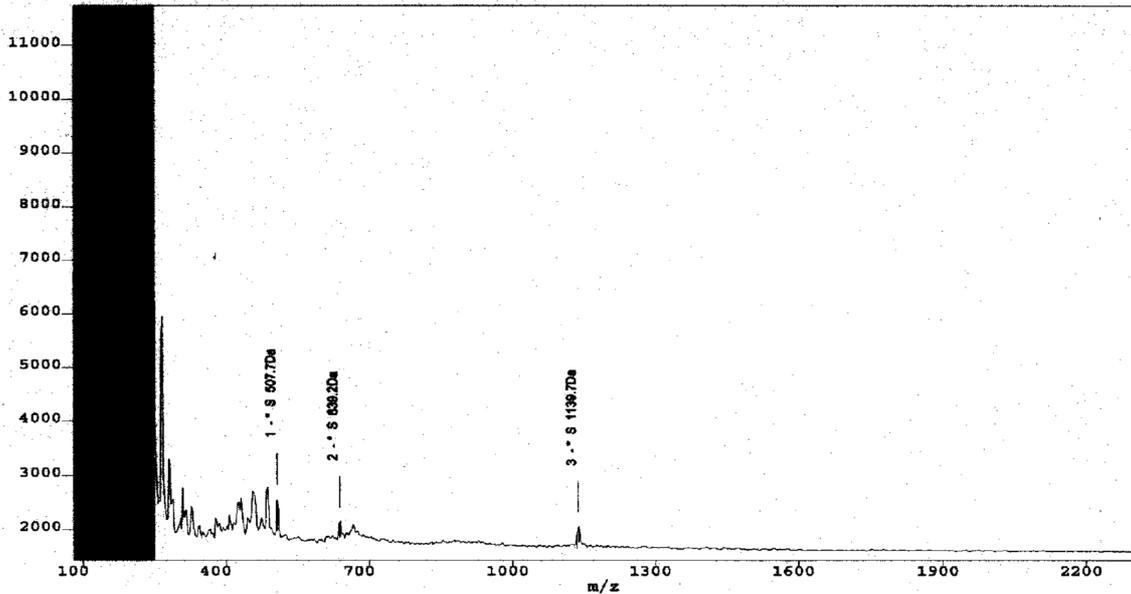


Abbildung 3.8.: Dargestellt sind die SMART-Chromatogramme verschiedener JY-Eluate einschließlich Acetonitrilgradient: a) von der BB7.2-Säule mit Homogenisieren, b) BB7.2-Säule ohne Homogenisieren, c) von der B1.23.2-Säule mit Homogenisieren, d) B1.23.2-Säule ohne Homogenisieren

In zwei SMART-Fractionen (Fraktion 14 und 15, von zwei Absorptionsmaxima um die 38-ste min) der homogenisierten B1.23.2-Eluate (Abbildung 3.8.c) wurden in der MALDI-Analyse Massen detektiert, Abbildung 3.9. Die detektierten Massen von 1139,7 Da und 1040,7 Da liegen im Bereich, in dem MHC-I-Liganden erwartet werden. Sie entsprechen allerdings keinen der vorhergesagten CTL-Epitope der Eichmischung für Kolonkarzinome (Tab.3.7.). Die Massen bis 700 Da gehören zu Matrixmolekülen.

a)



b)

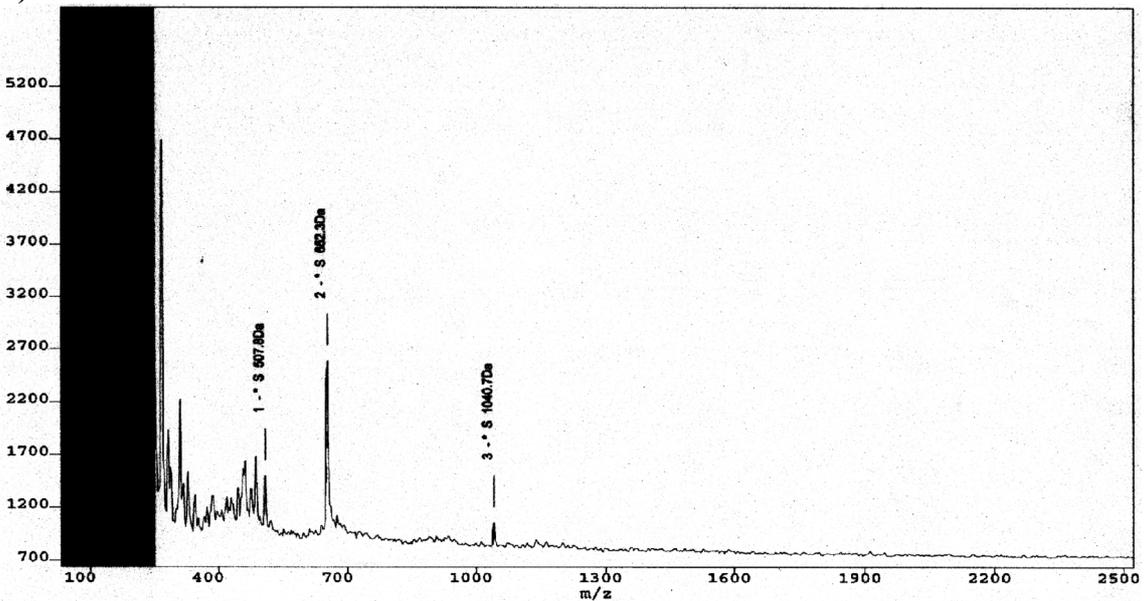


Abbildung 3.9.: MALDI-Analyse von zwei Fraktionen des SMART-Laufs der homogenisierten B1.23.2-Probe: a) Fraktion 14, b) Fraktion 15

Fraktion 14 wurde sequenziert, Tabelle 3.11. Dabei konnte nur bruchstückhaft die Peptidsequenz erkannt werden: Die Ankerposition 2 wurde wie erwartet von Prolin besetzt (siehe HLA-B7-Motiv, Tabelle 3.12.). An Position 4 konnte man Glutaminsäure und sowohl an Position 5 als auch an P6 Isoleucin erkennen. Von Valin wurden deutliche Signale an Position 7 detektiert. An Platz 8 war von Arginin ein Signalanstieg feststellbar. Sowohl Phenylalanin als auch Leucin waren an der Ankerposition 9 vertreten. Dabei ergab sich folgende unvollständige Sequenz:

?P?EIIVR(F/L)

Eine Datenbanksuche konnte bei der Identifizierung nicht weiterhelfen.

Tabelle 3.11.: Sequenzierung der 14. Fraktion des SMART-Laufs; JY-Extraktion mit Homogenisieren; Immunpräzipitation mit B1.23.2

| Zyklus | E | F | I | L | P | R | V |
|--------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 1 | 4,38 | 2,93 | 4,78 | 5,89 | 2,70 | 1,95 | 3,87 |
| 2 | 5,85 | 1,45 | 3,92 | 5,64 | 4,37 | 1,30 | 2,53 |
| 3 | 3,89 | 0,93 | 2,47 | 3,33 | 2,35 | 1,88 | 1,60 |
| 4 | 4,14 | 0,54 | 2,91 | 3,34 | 1,67 | 1,58 | 1,57 |
| 5 | 3,46 | 0,74 | 4,43 | 2,99 | 1,89 | 1,60 | 1,61 |
| 6 | 2,68 | 0,52 | 4,07 | 2,39 | 1,28 | 0,86 | 1,59 |
| 7 | 2,07 | 0,44 | 2,04 | 1,82 | 1,35 | 1,49 | 2,18 |
| 8 | 1,87 | 0,56 | 2,04 | 2,04 | 1,32 | 2,05 | 1,75 |
| 9 | 1,43 | 0,93 | 1,31 | 1,60 | 1,14 | 1,53 | 1,08 |

Tabelle 3.12.: HLA-B7-Motiv; Position 2 und 9 sind die **Anker** (fett), P3 der Hilfsanker (unterstrichen)

| Position | 1 | 2 | <u>3</u> | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|----------------------------|------------------|----------|----------------------|-------------|---|-----------------------|-------------|------------------|----------------------------|
| Anker | | P | <u>R</u> <u>S</u> | | | | | | L |
| Stark bevorzugte AS | A | | | G | P | | L V | | A F I M T V |
| Bevorzugte AS | E I K R | | A D G M | A K P | | F G R T V | A P T | A F P V | |

Alle JY-Lysate wurden nach der HPLC-Auftrennung N-terminal sequenziert. Die Poolsequenzierung des homogenisierten Eluats von der BB7.2-Affinitätssäule bestätigte das HLA-A*0201 Bindungsmotiv, siehe Tabelle 3.13. Sowohl der Anker in Position 2 war klar von der hydrophoben AS Leucin besetzt, als auch Position 9 von Leucin und Valin. Beim Hilfsanker in Position 6 war ein deutliches Signal von Valin und Isoleucin erkennbar. Die stark bevorzugten AS Glutaminsäure und Glycin fanden sich in Position 4 und zusätzlich Glutaminsäure und Lysin an Position 8. Zudem enthielten zahlreiche weitere Positionen bevorzugte AS wie in Position 1 vermehrt Alanin und Isoleucin, in Position 3 Alanin, Phenylalanin und Tyrosin.

Tabelle 3.13.: Poolsequenzierung von HLA-A2-restringierten (BB7.2-Säule) JY-Eluaten mit Homogenisieren. **Anker** und **Hilfsanker** sind fett und unterstrichen, **bevorzugte AS** fett gedruckt.

| Z | A | E | F | G | I | K | L | M | P | S | V | Y |
|----|------------|------------|-----------|------------|------------|-----------|-------------------|------------------|-----------|------------|------------------|-----------|
| 1 | 301 | 40 | 97 | 149 | 122 | 112 | 106 | 43 | 29 | 265 | 102 | 100 |
| 2 | 85 | 29 | 21 | 150 | 99 | 0 | <u>459</u> | <u>71</u> | 35 | 107 | 69 | 23 |
| 3 | 106 | 25 | 41 | 111 | 100 | 0 | 134 | 56 | 36 | 63 | 51 | 50 |
| 4 | 56 | 117 | 14 | 126 | 33 | 47 | 45 | 14 | 71 | 45 | 34 | 17 |
| 5 | 64 | 72 | 21 | 103 | 50 | 70 | 58 | 14 | 40 | 29 | 52 | 27 |
| 6 | 41 | 47 | 15 | 63 | 94 | 38 | 80 | 12 | 32 | 23 | <u>92</u> | 15 |
| 7 | 55 | 54 | 21 | 52 | 83 | 31 | 70 | 16 | 51 | 20 | 106 | 34 |
| 8 | 52 | 76 | 17 | 46 | 45 | 45 | 47 | 14 | 29 | 26 | 53 | 30 |
| 9 | 34 | 42 | 9 | 32 | 34 | 28 | <u>52</u> | 11 | 17 | 18 | <u>65</u> | 18 |
| 10 | 28 | 27 | 8 | 28 | 24 | 21 | 42 | 8 | 13 | 13 | 53 | 11 |

Die nicht-homogenisierten HLA-A2-Proben waren in Hinblick auf die detektierte Menge und Positionen der AS sehr ähnlich. Aufgrund eines technischen Defekts war das Ergebnis der Poolsequenzierung nicht im Detail verwertbar.

Auch die von der B1.23.2-Säule stammenden Proben ließen das HLA-B7-Motiv, das in Tabelle 3.12. demonstriert wird, erkennen. Die Ergebnisse der Poolsequenzierungen der zwei aussagekräftigsten AS sind in Tabelle 3.14. demonstriert.

Tabelle 3.14.: a) Poolsequenzierung HLA-B7 (B1.23.2-Säule) mit Homogenisieren

| Zyklus | Prolin | Arginin |
|--------|-------------------|------------------|
| 1 | 30 | 52 |
| 2 | <u>130</u> | 24 |
| 3 | 40 | <u>31</u> |
| 4 | 26 | 20 |
| 5 | 24 | 20 |
| 6 | 17 | 31 |
| 7 | 15 | 20 |
| 8 | 10 | 19 |
| 9 | 7 | 14 |
| 10 | 6 | 14 |

b) Poolsequenzierung HLA-B7 (B1.23.2-Säule) ohne Homogenisieren

| Zyklus | Prolin | Arginin |
|--------|------------------|------------------|
| 1 | 8 | 18 |
| 2 | <u>98</u> | 10 |
| 3 | 41 | <u>18</u> |
| 4 | 30 | 14 |
| 5 | 22 | 14 |
| 6 | 16 | 20 |
| 7 | 15 | 15 |
| 8 | 10 | 14 |
| 9 | 7 | 11 |
| 10 | 6 | 11 |

Der Anker an Position 2 wurde wie erwartet von Prolin besetzt, während Leucin an Position 9 nicht klar erkennbar war. Allerdings befand sich in dieser Position ein deutliches Signal für Valin. Die Position des Hilfsanker (P3) wurde von Arginin und Serin belegt. Zusätzlich wurden die stark bevorzugten AS Leucin und Valin an Position 7 und Alanin an Position 1 detektiert. Zudem fanden sich wieder viele positionell bevorzugte AS.

Im Vergleich der homogenisierten und nicht-homogenisierten B1.23.2-Eluate wurden etwas höhere Ausbeuten von AS durch das Homogenisieren gewonnen.

Zusammenfassend wurde die Effektivität des Glashomogenisators sowohl vom SDS-Gel, als auch von den B7-spezifischen Proben der SMART-Chromatogramme, als auch von den Sequenzdaten in diesem Experiment gezeigt. Lediglich die A2-spezifischen Proben ergaben in den SMART-Läufen höhere Absorptionen.

4. Diskussion

4.1 HLA-A*0201-restringierte Eichpeptidmischung

4.1.1 Epitopvorhersage

Epitopvorhersage wird seit Jahren eingesetzt, um gut bindende MHC-Liganden zu finden. Es ist aber bekannt, daß viele MHC-I-Liganden nicht die optimalen Ankeramino­säuren aufweisen (Ruppert et al., 1993). Das hier verwendete Vorhersageprogramm SYFPEITHI geht darauf ein. In diesem Programm werden nicht nur die Ankeramino­säuren mit hohen Punktzahlen bewertet, sondern auch sogenannte Neben- und Hilfsanker. Zum Beispiel hat das HLA-A*0201-Motiv in Position 2 eine seiner Ankerpositionen. Hier sind die Wechselwirkungen zwischen Ligand und Peptidbindungsgrube besonders spezifisch. Diese Position ist sehr häufig von einer bestimmten oder einer Gruppe strukturell verwandter AS besetzt, in diesem Fall von Leucin (L) oder Methionin (M). In dieser Vorhersage erhält L 10 und M 8 Punkte an Position 2. Die bekannten HLA-A*0201-Tumorepitope AAGIGILTV und das Decamer EAAGIGILTV aus dem Protein MelanA hingegen enthalten an zweiter Position Alanin (A). SYFPEITHI vergibt für A an Position 2 den Punktwert 4, so daß diese Peptide von diesem Programm vorhergesagt werden. So können Peptide durch Ausgleich eines fehlenden Ankers durch mehrere Hilfsanker und bevorzugte AS gut abschneiden. Dadurch werden über 80 % der natürlichen MHC-Liganden vorausgesagt.

Tumorepitope sind dafür bekannt, daß sie oft nicht hochaffin sind. Für die Epitopvorhersage bedeutet das, daß nicht unbedingt die am höchsten bewerteten Peptide die interessanten T-Zellepitope sind. Dennoch sollten bei Vorhersagen mit SYFPEITHI die relevanten T-Zellepitope unter den bestbewerteten 2 % aller theoretisch möglichen Peptide liegen.

Welche der tumorassoziierten Antigene sollen in die Eichmischung für einen bestimmten Tumor integriert werden? In der hergestellten Eichpeptidmischung für Melanome sind potentielle MHC-I-Liganden von Tyrosinase, MelanA/MART-1, gp100, MAGE-1 und MAGE-3, gp75/TRP1, TRP2 und MIA vertreten. Es gibt aber viele weitere Melanom-assoziierte Tumorantigene wie das *cancer testis* Antigen NY-ESO-1

(Chen et al., 1997) oder CDK4 (Wölfel et al., 1995), die auch Berechtigung hätten, dieser Mischung hinzugefügt zu werden.

4.1.2 Zusammenstellen der Eichpeptidmischung

Nach der Epitopvorhersage für Melanome und der Synthese der besten 2 % der potentiellen HLA-A*0201-Liganden bereitete die HPLC-Aufreinigung einiger sehr hydrophober Peptide einige Schwierigkeiten. Solche Peptide ließen sich nur schlecht lösen, wodurch die Menge auf der HPLC-Säule gering war. Zudem wurden sie erst mit hohem Acetonitrilgehalt im lipophilen Gradienten von der Säule zusammen mit vielen Verunreinigungen eluiert. Dies machte es schwer, reine Fraktionen mit ausreichendem Peptidgehalt zu gewinnen.

4.1.3 Proteasom-Schnittvorhersage

Da man heute davon ausgeht, daß die C-Termini der MHC-I-Liganden von den Proteasomen erzeugt werden, wurde die Vorhersage für die Tumorantigene der Melanom-assoziierten Eichmischung bezüglich dieses Gesichtspunktes betrachtet. Es wurde ein Drittel von beiden Programmversionen und insgesamt 47 % der vorhergesagten Liganden von diesem Programm erfaßt. Von den 23 beschriebenen Liganden wurde bei 10 von beiden Programmversionen und bei einem weiteren Liganden von Programm A ein C-terminaler Schnitt vorhergesagt.

Die Zuverlässigkeit der Vorhersage ist noch nicht sehr hoch. Bisher werden Schnitte nur aufgrund der einzelnen AS vorhergesagt und nicht aufgrund von bestimmten Eigenschaften wie Größe, Ladung, Polarität oder Lipophilie. Vielleicht wird die Bedeutung dieser Eigenschaften noch in diesem Programm unterschätzt.

Es kann zudem noch nicht endgültig ausgeschlossen werden, daß vielleicht andere *trimmende* Proteasen an der Generierung von MHC-Klasse-I-Liganden beteiligt sind, die von diesem Programm nicht erfaßt werden (Elliott et al., 1995; Stoltze et al., 2000).

Besonders starken Einfluß, ob ein Schnitt stattfindet oder nicht, haben die den Schnitt direkt flankierenden AS. Von den 400 Möglichkeiten (20 x 20 AS) der Aminosäure-Paare (P1,P1') sind dem Programm z.B. durch das Modellprotein Enolase nur 54 %

(214 AS-Paare) bekannt. Daher sollte es möglich sein, das Programm weiter zu optimieren, indem die Zahl der „Trainingsproteine“ erhöht wird.

Neuere Studien haben gezeigt, daß die drei verschiedenen katalytisch aktiven Stellen von eukaryontischen Proteasomen z.T. überlappende Spezifitäten aufweisen (Dick et al., 1998; Nussbaum et al., 1998). Dieser Parameter ist noch nicht im Programm verarbeitet.

Die genauere Kenntnis, ob ein Peptid überhaupt während der Antigenprozessierung generiert wird, könnte die Menge der durch das Peptidmotiv vorhergesagten Liganden sinnvoll einschränken. Sobald dieses Programm eine hohe Verlässlichkeit erreicht, wird die Kombination der Vorhersageprogramme des Peptidmotivs und der Proteasom-Schnittspezifitäten - eventuell auch unter Einbeziehung der TAP-Spezifität - neue Möglichkeiten zur Identifizierung von CTL-Epitopen eröffnen.

4.1.4 Bindungsassay

Im MHC-Stabilisierungsassay mit FACS-Analyse wurde das HLA-A*0201-Bindungsverhalten der vorhergesagten Liganden bei zwei verschiedenen Konzentrationen (10 μ M und 100 μ M) getestet. Als Referenz für die HLA-A2-Grundexpression wurden TAP-defiziente T2-Zellen ohne Peptid mit Erstantikörper und fluoreszierendem Zweitantikörper gemessen. Zum Vergleich der Ergebnisse wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) verwendet. Als Maß für die Peptidbindung wurde das Verhältnis des MFI mit Peptid zum MFI ohne Peptid ermittelt. Liegt der errechnete Faktor über 1,0, binden die Peptide.

Werte über 1,5 wurden nur bei ca. 46 % der vorhergesagten MHC-Liganden und Werte über 2,0 nur bei rund 30 % bestimmt. Somit sind die meisten der vorhergesagten und zum Teil bekannten A2-restringierten Peptide keine hochaffinen Binder. Da aus der Literatur bekannt ist, daß die Mehrheit der tumorassoziierten und tumorspezifischen CTL-Epitope nicht hochaffin bindet, ist hohe Affinität kein Einschlußkriterium in der Suche nach tumorspezifischen CTL-Epitopen.

Es sollte noch erwähnt werden, daß der T2-Assay nicht sehr sensitiv ist und nur relativ hochaffine Peptide erkennt. Tumorantigene wie KVLEYVIKV aus dem Protein

MAGE-1 bewirken keine meßbare Stabilisierung. Inzwischen wird statt des T2-Assays ein Kompetitionsassay mit wesentlich höherer Sensitivität verwendet.

4.2 Peptidextraktion

4.2.1 HLA-Verteilung

Bisher sind fast ausschließlich HLA-A*0201-restringierte Tumorepitope bekannt. Bei der mitteleuropäischen Kaukasiern weisen ungefähr 50 % dieses Allel auf (van der Bruggen et al., 1994; Longmate et al., 2001).

Die drei häufigsten Allele von HLA-A waren in unserem Patientenkollektiv HLA-A2 mit 52,2 %, -A1 mit 23,9 % und -A3 mit 21,7 %. Bei den Allelen von HLA-B waren -B7 mit 25,3 %, -B44 mit 18,7 % und -B8 mit 17,6 % am häufigsten vertreten. Würde man für die jeweils drei häufigsten Allele von HLA-A und -B CTL-Epitope identifizieren, so stünden für 91,5 % dieser mitteleuropäischen Patienten Peptide zur spezifischen Tumorstabilisierung zur Verfügung.

Da man davon ausgehen kann, daß diese HLA-Verteilung repräsentativ für die mitteleuropäische Bevölkerung steht, wäre die Kenntnis von tumorassoziierten und – spezifischen MHC-I-Liganden für diese sechs Allele ein enormer Fortschritt in der Entwicklung immuntherapeutischer Ansätze.

4.2.2 Immunpräzipitation von soliden Tumoren

Bei den Peptidextraktionen von 5 soliden Tumoren konnten keine MHC-Liganden extrahiert werden. Dafür könnte es verschiedene Gründe geben:

Da heute glücklicherweise die meisten Tumore in einem sehr frühen Stadium erkannt werden, sind solide Tumorproben häufig nur wenige Gramm schwer. Zudem sind gerade die gastrointestinalen Tumoren dafür bekannt, daß sie nicht homogen aus Tumorgewebe bestehen, sondern bindegeweblich durchsetzt sind. Auch sind die Tumorproben von ihrem Entartungsgrad und dadurch von ihrem Malignitätsgrad her sehr unterschiedlich.

Sobald die Tumoren entnommen sind, tragen die MHC-Moleküle möglicherweise bis zum Einfrieren und Lagern bei -80°C Schaden davon.

Zudem sind wir auf eine normale MHC-Expressionsrate angewiesen. Es ist aber allgemein bekannt, daß viele Krebsarten die Anzahl ihrer MHC-Moleküle reduzieren. Vor der Aufbereitung wird keine Quantifizierung, weder der Expressionsrate der MHC-Klasse-I-Moleküle noch der Effektivität des Zellaufschlusses, durchgeführt. Dazu kommt, daß es durch die Aufbereitung zu Verlusten kommt, die auf ca. 75 % der Peptidmenge geschätzt werden (Schirle et al., 2000).

All diese Faktoren führen dazu, daß die gesuchten Peptide in der Analyse leicht unter der Nachweisgrenze von ca. 10 fmol liegen.

Weitere Probleme könnten darin bestehen, daß die Qualität der verwendeten Antikörper schwankte und es unter anderem dadurch zu unterschiedlichen Kopplungseffizienzen der AK an die MHC-Präzipitationssäulen kam.

Dies mag dazu beigetragen haben, daß in dieser Periode keine neuen MHC-Klasse-I-Liganden gefunden wurden. Im Rahmen dieses Projektes wurden allerdings schon einige identifiziert. Ein Beispiel dafür wäre der HLA-A*0201-Ligand KVLEYVIKV aus dem MAGE-1 Protein (Pascolo et al., 2001).

4.2.3 Methodenvergleich

Im Methodenvergleich der Peptidextraktionen aus JY-Zellen mit und ohne Homogenisieren legt das SDS-Gel die Vermutung nahe, daß eine höhere MHC-Ausbeute durch das Homogenisieren erzielt wurde. Da aber die aufgetragenen Proteinmengen nicht normiert waren, läßt sich keine endgültige Aussage über die Quantifizierung der Ausbeute aus dem Gel treffen.

Die HLA-A*0201-spezifischen JY-Extrakte ließen in beiden HPLC-Läufen die typischen Peptidpeaks erkennen. Allgemein war die Absorption der Peptide besonders im Bereich zwischen 20 und 50 Minuten, in dem die MHC-Liganden eluiert werden, relativ niedrig. Hier erzielte die nicht-homogenisierte Probe höhere Absorptionen als die homogenisierte Fraktion.

In den SMART-Chromatogrammen der HLA-B7-spezifischen Proben war die Absorption relativ niedrig. In der homogenisierten Probe waren sowohl eine höhere Grundabsorption als auch vermehrt Peptidpeaks nachweisbar.

Die Poolsequenzierung der homogenisierten BB7.2-Fraktion bestätigte das HLA-A*0201-Bindungsmotiv: Die Ankerposition 2 war von Leucin, der Hilfsanker in Position 6 von Isoleucin, Leucin und Valin und der Anker in 9 von Valin und Leucin besetzt. Viele weitere Positionen enthielten von A2-Liganden bevorzugte AS.

Auch die von der B1.23.2-Säule stammenden Proben ließen das HLA-B7-Motiv erkennen. Der Anker an Position 2 wurde wie erwartet von Prolin besetzt. Der zweite Anker wurde nicht von seiner vorhergesagten AS belegt, dafür aber von der stark bevorzugten AS Valin. Die Lokalität des Hilfsankers wurde von Arginin passend belegt. Zusätzlich fanden sich wieder viele positionell bevorzugte AS.

Die Aminosäuremengen mit und ohne Homogenisieren waren durchaus vergleichbar. Höhere Aminosäurekonzentrationen wurden allerdings in allen B7-spezifischen Positionen bei der homogenisierten Probe detektiert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß in diesem Experiment die Ausbeute mit Homogenisieren bekräftigt durch das SDS-Gel, die B7-spezifischen HPLC-Läufe und die Sequenzdaten etwas höher lagen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde an der Methode zur Identifizierung tumorassoziiertes CTL-Epitope gearbeitet. Es wurden potentielle, HLA-A2-restringierte Liganden für Melanome aus den Tumorantigenen Tyrosinase, MelanA/MART-1, gp100, MAGE-1, MAGE-3, gp75/TRP1, TRP2 und MIA vorhergesagt. 57 der vorhergesagten Peptide, die das HLA-A2-Motiv am besten erfüllten, wurden synthetisiert, über Reversed-Phase HPLC aufgereinigt und durch N-terminalen Edman-Abbau quantifiziert. Danach wurden sie zu einer Eichmischung vereinigt.

Die synthetisierten Peptide wurden in einem Stabilisierungsassay auf ihre HLA-A2-Bindungsaktivität hin untersucht. Nur 30 % der potentiellen Liganden banden hochaffin und ungefähr die Hälfte mäßig affin. Da bekannt ist, daß die meisten tumorassoziierten und tumorspezifischen CTL-Epitope keine hochaffinen Binder sind, werden die vorhergesagten Peptide zwar auf ihre MHC-I-Affinität getestet, aber alle vorhergesagten Peptide - auch die niedrig affinen – für weitere Studien verwendet.

Die durchgeführte Proteasom-Schnittvorhersage zeigte wie erwartet, daß sie momentan noch nicht die Zuverlässigkeit erreicht, um in der Auswahl der durch das Peptidmotiv vorhergesagten Liganden mitbestimmend zu sein.

Bei fünf soliden Tumoren und fünf Tumorzelllinien wurden MHC-I-Liganden säureextrahiert. Von den zehn Proben waren acht gastrointestinaler Herkunft, die alle HLA-A2-Moleküle exprimierten. Dieses HLA-Allel wurde als häufigstes von 52,2 % der Patienten exprimiert.

Die schon zur Verfügung stehende HLA-A2-restringierte Eichmischung gastrointestinaler Tumore enthielt potentielle Liganden von den tumorassoziierten Antigenen CEA, Her-2/neu, p53, MDM2, H-ras, K-ras, N-ras, SSX2 und den Kontrollproteinen PP2A, RL19 und p68. Bei den zehn durchgeführten Peptidextraktionen wurden regelmäßig die typischen Peptidpeaks in den SMART-Chromatogrammen bei einer insgesamt relativ niedrigen Grundabsorption gesehen. In der anschließenden MALDI-Massenspektrometrie der interessanten SMART-Fractionen wurden Massen, die im Bereich der MHC-I-Liganden lagen, nachgewiesen.

In weiterführenden Analysen wie ESI-Massenspektrometrie oder Sequenzanalyse konnten jedoch keine MHC-Klasse-I-Liganden identifiziert werden. Sehr wahrscheinlich lagen die Peptidkonzentrationen unter der Nachweisgrenze.

Der Methodenvergleich mit der JY-Tumorzelllinie sollte die Effektivität des Glashomogenisators untersuchen. Nur das nicht-homogenisierte HLA-A2-restringierte SMART-Chromatogramm zeigte eine höhere Grundabsorption und mehr Peptidpeaks als die vergleichbare homogenisierte Probe. Sowohl das SDS-Gel der A2- und der B7-spezifischen Proben, als auch der HPLC-Lauf der B7-spezifischen Proben, als auch die Sequenzdaten der A2- und der B7-restringierten Fraktionen sprachen für eine größere Peptidausbeute durch das Homogenisieren.

6 Literaturverzeichnis

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., and Pober, J. S. Cellular and Molecular Immunology (1997).
- Abrams, S.I., Khleif, S.N., Bergmann-Leitner, E.S., Kantor, J.A., Chung, Y., Hamilton, J.M., and Schlom, J. (1997). Generation of stable CD4+ and CD8+ T cell lines from patients immunized with ras oncogene-derived peptides reflecting codon 12 mutations. *Cell Immunol* 182, 137-151.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J.D. (1994). Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing, Inc., New York & London.
- Arnold, D., Faath, S., Rammensee, H., and Schild, H. (1995). Cross-priming of minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T cells upon immunization with the heat shock protein gp96. *J Exp Med* 182, 885-889.
- Barnstable, C.J., Bodmer, W.F., Brown, G., Galfre, G., Milstein, C., Williams, A.F., and Ziegler, A. (1978). Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens—new tools for genetic analysis. *Cell* 14, 9-20.
- Beninga, J., Rock, K.L., and Goldberg, A.L. (1998). Interferon-gamma can stimulate post-proteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase. *J Biol Chem* 273, 18734-18742.
- Berger, A.E., Davis, J.E., and Cresswell, P. (1982). Monoclonal antibody to HLA-A3. *Hybridoma* 1, 87-90.
- Bergmann-Leitner, E.S. and Abrams, S.I. (2000). Differential role of Fas/Fas ligand interactions in cytolysis of primary and metastatic colon carcinoma cell lines by human antigen-specific CD8+ CTL. *J Immunol* 164, 4941-4954.
- Bergmann-Leitner, E.S., Kantor, J.A., Shupert, W.L., Schlom, J., and Abrams, S.I. (1998). Identification of a human CD8+ T lymphocyte neo-epitope created by a ras codon 12 mutation which is restricted by the HLA-A2 allele. *Cell Immunol* 187, 103-116.
- Berke, G. (1994). The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspects. *Annu Rev Immunol* 12, 735-773.
- Bertholet, S., Iggo, R., and Corradin, G. (1997). Cytotoxic T lymphocyte responses to wild-type and mutant mouse p53 peptides. *Eur J Immunol* 27, 798-801.
- Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L., and Wiley, D.C. (1987). Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329, 506-512.
- Boel, P., Wildmann, C., Sensi, M.L., Brasseur, R., Renauld, J.C., Coulie, P., Boon, T., and van der Bruggen, P. (1995). BAGE: a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes. *Immunity* 2, 167-175.
- Böhm, C.M., Hanski, M.L., Stevanović, S., Rammensee, H.G., Stein, H., Taylor-Papadimitriou, J., Riecken, E.O., and Hanski, C. (1998). Identification of HLA-A2-restricted epitopes of the tumor-associated antigen MUC2 recognized by human cytotoxic T cells. *Int J Cancer* 75, 688-693.
- Boon, T., Cerottini, J.C., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P., and Van Pel, A. (1994). Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 12, 337-365.

- Boon,T., Coulie,P.G., and Van den Eynde,B. (1997). Tumor antigens recognized by T cells. *Immunol Today* 18, 267-268.
- Bos,J.L. (1989). ras oncogenes in human cancer: a review [published erratum appears in *Cancer Res* 1990 Feb 15;50(4):1352]. *Cancer Res* 49, 4682-4689.
- Brattain,M.G., Fine,W.D., Khaled,F.M., Thompson,J., and Brattain,D.E. (1981). Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Res* 41, 1751-1756.
- Brichard,V., Van Pel,A., Wölfel,T., Wölfel,C., De Plaen,E., Lethe,B., Coulie,P., and Boon,T. (1993). The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* 178, 489-495.
- Brossart,P., Heinrich,K.S., Stuhler,G., Behnke,L., Reichardt,V.L., Stevanović,S., Muhm,A., Rammensee,H.G., Kanz,L., and Brugger,W. (1999). Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies. *Blood* 93, 4309-4317.
- Brossart,P., Stuhler,G., Flad,T., Stevanović,S., Rammensee,H.G., Kanz,L., and Brugger,W. (1998). 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, 732-736.
- Castelli,C., Storkus,W.J., Maeurer,M.J., Martin,D.M., Huang,E.C., Pramanik,B.N., Nagabhusan,T.L., Parmiani,G., and Lotze,M.T. (1995). Mass spectrometric identification of a naturally processed melanoma peptide recognized by CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 181, 363-368.
- Cerundolo,V., Benham,A., Braud,V., Mukherjee,S., Gould,K., Macino,B., Neeffjes,J., and Townsend,A. (1997). The proteasome-specific inhibitor lactacystin blocks presentation of cytotoxic T lymphocyte epitopes in human and murine cells. *Eur J Immunol* 27, 336-341.
- Chen,Y.T., Scanlan,M.J., Sahin,U., Tureci,O., Gure,A.O., Tsang,S., Williamson,B., Stockert,E., Pfreundschuh,M., and Old,L.J. (1997). A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1914-1918.
- Coulie,P.G., Brichard,V., Van Pel,A., Wölfel,T., Schneider,J., Traversari,C., Mattei,S., De Plaen,E., Lurquin,C., and Szikora,J.P. (1994). A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* 180, 35-42.
- Cox,A.L., Skipper,J., Chen,Y., Henderson,R.A., Darrow,T.L., Shabanowitz,J., Engelhard,V.H., Hunt,D.F., and Slingluff,C.L.J. (1994). Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science* 264, 716-719.
- Deveraux,Q., Ustrell,V., Pickart,C., and Rechsteiner,M. (1994). A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J Biol Chem* 269, 7059-7061.
- Dick,T.P., Nussbaum,A.K., Deeg,M., Heinemeyer,W., Groll,M., Schirle,M., Keilholz,W., Stevanović,S., Wolf,D.H., Huber,R., Rammensee,H.G., and Schild,H. (1998). Contribution of proteasomal beta-subunits to the cleavage of peptide substrates analyzed with yeast mutants. *J Biol Chem* 273, 25637-25646.
- Disis,M.L. and Cheever,M.A. (1996). Oncogenic proteins as tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 8, 637-642.
- Duffour,M.T., Chaux,P., Lurquin,C., Cornelis,G., Boon,T., and van der Bruggen,P. (1999). A MAGE-A4 peptide presented by HLA-A2 is recognized by cytolytic T lymphocytes. *Eur J Immunol* 29, 3329-3337.
- Elliott,T., Willis,A., Cerundolo,V., and Townsend,A. (1995). Processing of major histocompatibility class I-restricted antigens in the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* 181, 1481-1491.

- Elvin,J.; Potter,C.; Elliott,T.; Cerundolo,V.; Townsend,A. (1993). A method to quantify binding of unlabeled peptides to class I MHC molecules and detect their allele specificity. *J Immunol Methods* *158*, 161-71.
- Emmerich,N.P., Nussbaum,A.K., Stevanović,S., Priemer,M., Toes,R.E., Rammensee,H.G., and Schild,H. (2000). The human 26 S and 20 S proteasomes generate overlapping but different sets of peptide fragments from a model protein substrate. *J Biol Chem* *275*, 21140-21148.
- Falk,K., Rötzschke,O., Stevanović,S., Jung,G., and Rammensee,H.G. (1991). Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* *351*, 290-296.
- Fenteany,G., Standaert,R.F., Lane,W.S., Choi,S., Corey,E.J., and Schreiber,S.L. (1995). Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* *268*, 726-731.
- Fisk,B., Savary,C., Hudson,J.M., O'Brian,C.A., Murray,J.L., Wharton,J.T., and Ioannides,C.G. (1995). Changes in an HER-2 peptide upregulating HLA-A2 expression affect both conformational epitopes and CTL recognition: implications for optimization of antigen presentation and tumor-specific CTL induction. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* *18*, 197-209.
- Früh,K., Ahn,K., and Peterson,P.A. (1997). Inhibition of MHC class I antigen presentation by viral proteins. *J Mol Med* *75*, 18-27.
- Gatfield,J., Lammert,E., Nickolaus,P., Munz,C., Rothenfusser,S., Fisch,P., Stevanović,S., Schild,H., Rammensee,H.G., and Arnold,D. (1998). Cell lines transfected with the TAP inhibitor ICP47 allow testing peptide binding to a variety of HLA class I molecules. *Int Immunol* *10*, 1665-1672.
- Geier,E., Pfeifer,G., Wilm,M., Lucchiarri-Hartz,M., Baumeister,W., Eichmann,K., and Niedermann,G. (1999). A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome. *Science* *283*, 978-981.
- Groll,M., Ditzel,L., Löwe,J., Stock,D., Bochtler,M., Bartunik,H.D., and Huber,R. (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution [see comments]. *Nature* *386*, 463-471.
- Grumet,F.C., Fendly,B.M., Fish,L., Fong,S., and Engleman,E.G. (1982). Monoclonal antibody (B27M2) subdividing HLA-B27. *Hum Immunol* *5*, 61-72.
- Harding,C.V., France,J., Song,R., Farah,J.M., Chatterjee,S., Iqbal,M., and Siman,R. (1995). Novel dipeptide aldehydes are proteasome inhibitors and block the MHC-I antigen-processing pathway. *J Immunol* *155*, 1767-1775.
- Heemels,M.T., Schumacher,T.N., Wonigeit,K., and Ploegh,H.L. (1993). Peptide translocation by variants of the transporter associated with antigen processing. *Science* *262*, 2059-2063.
- Hill,A., Jugovic,P., York,I., Russ,G., Bennink,J., Yewdell,J., Ploegh,H., and Johnson,D. (1995). Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature* *375*, 411-415.
- Howard,J.C. (1995). Supply and transport of peptides presented by class I MHC molecules. *Curr Opin Immunol* *7*, 69-76.
- Hunt,D.F., Henderson,R.A., Shabanowitz,J., Sakaguchi,K., Michel,H., Sevilir,N., Cox,A.L., Appella,E., and Engelhard,V.H. (1992). Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry [see comments]. *Science* *255*, 1261-1263.
- Jackson,M.R., Cohen-Doyle,M.F., Peterson,P.A., and Williams,D.B. (1994). Regulation of MHC class I transport by the molecular chaperone, calnexin (p88, IP90). *Science* *263*, 384-387.

Jäger,E., Chen,Y.T., Drijfhout,J.W., Karbach,J., Ringhoffer,M., Jäger,D., Arand,M., Wada,H., Noguchi,Y., Stockert,E., Old,L.J., and Knuth,A. (1998). Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *J Exp Med* 187, 265-270.

Janeway, C. A. jr. and Travers, P. Immunologie (1997). Spektrum Akademischer Verlag.

Kast,W.M., Roux,L., Curren,J., Blom,H.J., Voordouw,A.C., Meloen,R.H., Kolakofsky,D., and Melief,C.J. (1991). Protection against lethal Sendai virus infection by in vivo priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with a free synthetic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 2283-2287.

Kawakami,Y., Eliyahu,S., Delgado,C.H., Robbins,P.F., Rivoltini,L., Topalian,S.L., Miki,T., and Rosenberg,S.A. (1994a). Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3515-3519.

Kawakami,Y., Eliyahu,S., Jennings,C., Sakaguchi,K., Kang,X., Southwood,S., Robbins,P.F., Sette,A., Appella,E., and Rosenberg,S.A. (1995). Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-infiltrating T lymphocytes associated with in vivo tumor regression. *J Immunol* 154, 3961-3968.

Kawakami,Y., Eliyahu,S., Sakaguchi,K., Robbins,P.F., Rivoltini,L., Yannelli,J.R., Appella,E., and Rosenberg,S.A. (1994b). Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 180, 347-352.

Kawakami,Y., Robbins,P.F., Wang,X., Tupesis,J.P., Parkhurst,M.R., Kang,X., Sakaguchi,K., Appella,E., and Rosenberg,S.A. (1998). Identification of new melanoma epitopes on melanosomal proteins recognized by tumor infiltrating T lymphocytes restricted by HLA-A1, -A2, and -A3 alleles. *J Immunol* 161, 6985-6992.

Kawashima,I., Hudson,S.J., Tsai,V., Southwood,S., Takesako,K., Appella,E., Sette,A., and Celis,E. (1998). The multi-epitope approach for immunotherapy for cancer: identification of several CTL epitopes from various tumor-associated antigens expressed on solid epithelial tumors. *Hum Immunol* 59, 1-14.

Kawashima,I., Tsai,V., Southwood,S., Takesako,K., Sette,A., and Celis,E. (1999). Identification of HLA-A3-restricted cytotoxic T lymphocyte epitopes from carcinoembryonic antigen and HER-2/neu by primary in vitro immunization with peptide-pulsed dendritic cells. *Cancer Res* 59, 431-435.

Kayser, F. H., Bienz, K. A., Eckert, J., and Zinkernagel, R. M. Medizinische Mikrobiologie (1998). Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.

Kuby, Janis. Immunology (1997). W.H. Freeman and Company, New York.

Kuttler,C., Nussbaum,A.K., Dick,T.P., Rammensee,H.G., Schild,H., and Hadelers,K.P. (2000). An algorithm for the prediction of proteasomal cleavages. *J Mol Biol* 298, 417-429.

Lam, Y. A., Xu, W., DeMartino, G. N., and Cohen, R. E. (1997). Editing of ubiquitin conjugates by an isopeptidase in the 26S proteasome. *Nature* 385, 737-740.

Leibovitz,A., Stinson,J.C., McCombs,W.B., McCoy,C.E., Mazur,K.C., and Mabry,N.D. (1976). Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res* 36, 4562-4569.

Lindauer,M., Stanislawski,T., Haussler,A., Antunes,E., Cellary,A., Huber,C., and Theobald,M. (1998). The molecular basis of cancer immunotherapy by cytotoxic T lymphocytes. *J Mol Med* 76, 32-47.

- Longmate,J., York,J., La Rosa,C., Krishnan,R., Zhang,M., Senitzer,D., and Diamond,D.J. (2001). Population coverage by HLA class-I restricted cytotoxic T-lymphocyte epitopes. *Immunogenetics* 52, 165-173.
- Löwe,J., Stock,D., Jap,B., Zwickl,P., Baumeister,W., and Huber,R. (1995). Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* 268, 533-539.
- Melief,C.J., Offringa,R., Toes,R.E., and Kast,W.M. (1996). Peptide-based cancer vaccines. *Curr Opin Immunol* 8, 651-657.
- Momburg,F., Roelse,J., Hammerling,G.J., and Neefjes,J.J. (1994). Peptide size selection by the major histocompatibility complex-encoded peptide transporter. *J Exp Med* 179, 1613-1623.
- Munz,C., Obst,R., Osen,W., Stevanović,S., and Rammensee,H.G. (1999). Alloreactivity as a source of high avidity peptide-specific human CTL. *J Immunol* 162, 25-34.
- Nayersina,R., Fowler,P., Guilhot,S., Missale,G., Cerny,A., Schlicht,H.J., Vitiello,A., Chesnut,R., Person,J.L., and Redeker,A.G. (1993). HLA A2 restricted cytotoxic T lymphocyte responses to multiple hepatitis B surface antigen epitopes during hepatitis B virus infection. *J Immunol* 150, 4659-4671.
- Neefjes,J.J., Hammerling,G.J., and Momburg,F. (1993a). Folding and assembly of major histocompatibility complex class I heterodimers in the endoplasmic reticulum of intact cells precedes the binding of peptide. *J Exp Med* 178, 1971-1980.
- Neefjes,J.J., Momburg,F., and Hammerling,G.J. (1993b). Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC- encoded transporter [published erratum appears in *Science* 1994 Apr 1;264(5155):16]. *Science* 261, 769-771.
- Noppen,C., Levy,F., Burri,L., Zajac,P., Rimmel,E., Schaefer,C., Luscher,U., Heberer,M., and Spagnoli,G.C. (2000). Naturally processed and concealed HLA-A2.1-restricted epitopes from tumor-associated antigen tyrosinase-related protein-2. *Int J Cancer* 87, 241-246.
- Nussbaum,A.K., Dick,T.P., Keilholz,W., Schirle,M., Stevanović,S., Dietz,K., Heinemeyer,W., Groll,M., Wolf,D.H., Huber,R., Rammensee,H.G., and Schild,H. (1998). Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12504-12509.
- Obst,R., Munz,C., Stevanović,S., and Rammensee,H.G. (1998). Allo- and self-restricted cytotoxic T lymphocytes against a peptide library: evidence for a functionally diverse allorestricted T cell repertoire. *Eur J Immunol* 28, 2432-2443.
- Obst,R., Netuschil,N., Klopfer,K., Stevanović,S., and Rammensee,H.G. (2000). The role of peptides in T cell alloreactivity is determined by self- major histocompatibility complex molecules. *J Exp Med* 191, 805-812.
- Pamer,E. and Cresswell,P. (1998). Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol* 16, 323-358.
- Pamer,E.G., Harty,J.T., and Bevan,M.J. (1991). Precise prediction of a dominant class I MHC-restricted epitope of *Listeria monocytogenes*. *Nature* 353, 852-855.
- Parham,P. and Brodsky,F.M. (1981). Partial purification and some properties of BB7.2. A cytotoxic monoclonal antibody with specificity for HLA-A2 and a variant of HLA- A28. *Hum Immunol* 3, 277-299.
- Parkhurst,M.R., Fitzgerald,E.B., Southwood,S., Sette,A., Rosenberg,S.A., and Kawakami,Y. (1998). Identification of a shared HLA-A*0201-restricted T-cell epitope from the melanoma antigen tyrosinase-related protein 2 (TRP2). *Cancer Res* 58, 4895-4901.

- Pascolo,S., Schirle,M., Gückel,B., Dumrese,T., Stumm,S., Kayser,S., Moris,A., Wallwiener,D., Rammensee,H.G., and Stevanović,S. (2001). A MAGE-A1 HLA-A*0201 epitope identified by mass spectrometry. *Cancer Res* in press.
- Paz,P., Brouwenstijn,N., Perry,R., and Shastri,N. (1999). Discrete proteolytic intermediates in the MHC class I antigen processing pathway and MHC I-dependent peptide trimming in the ER. *Immunity* *11*, 241-251.
- Rammensee,H.G., Bachmann,J., and Stevanović,S. 1997. *MHC-Ligands and Peptide Motifs*. Austin, Texas: Landes Bioscience Publishers.
- Rammensee,H., Bachmann,J., Emmerich,N.P., Bachor,O.A., and Stevanović,S. (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* *50*, 213-219.
- Rammensee,H.G. (1995). Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Curr Opin Immunol* *7*, 85-96.
- Rammensee,H.G., Falk,K., and Rötzschke,O. (1993). Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu Rev Immunol* *11*, 213-244.
- Ressing,M.E., Sette,A., Brandt,R.M., Ruppert,J., Wentworth,P.A., Hartman,M., Oseroff,C., Grey,H.M., Melief,C.J., and Kast,W.M. (1995). 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*, 5934-5943.
- Restifo,N.P. (1996). The new vaccines: building viruses that elicit antitumor immunity. *Curr Opin Immunol* *8*, 658-663.
- Rivoltini,L., Kawakami,Y., Sakaguchi,K., Southwood,S., Sette,A., Robbins,P.F., Marincola,F.M., Salgaller,M.L., Yannelli,J.R., and Appella,E. (1995). Induction of tumor-reactive CTL from peripheral blood and tumor- infiltrating lymphocytes of melanoma patients by in vitro stimulation with an immunodominant peptide of the human melanoma antigen MART-1. *J Immunol* *154*, 2257-2265.
- Roa,J.C., Villaseca,M.A., Roa,I., Araya,J.C., Okayasu,I., Flores,P., and Flores,M. (1997). [Immunohistochemical expression of p53 oncoprotein in large bowel adenomas and carcinomas]. *Rev Med Chil* *125*, 523-529.
- Robbins,P.F. and Kawakami,Y. (1996). Human tumor antigens recognized by T cells. *Curr Opin Immunol* *8*, 628-636.
- Robbins,P.F., el-Gamil,M., Kawakami,Y., Stevens,E., Yannelli,J.R., and Rosenberg,S.A. (1994). Recognition of tyrosinase by tumor-infiltrating lymphocytes from a patient responding to immunotherapy. *Cancer Res* *54*, 3124-3126.
- Robey,E. and Fowlkes,B.J. (1994). Selective events in T cell development. *Annu Rev Immunol* *12*, 675-705.
- Rock,K.L. and Goldberg,A.L. (1999). Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol* *17*, 739-779.
- Rock,K.L., Gramm,C., Rothstein,L., Clark,K., Stein,R., Dick,L., Hwang,D., and Goldberg,A.L. (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* *78*, 761-771.
- Rodrigues,N.R., Rowan,A., Smith,M.E., Kerr,I.B., Bodmer,W.F., Gannon,J.V., and Lane,D.P. (1990). p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* *87*, 7555-7559.

- Rötzschke,O., Falk,K., Deres,K., Schild,H., Norda,M., Metzger,J., Jung,G., and Rammensee,H.G. (1990). Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells. *Nature* 348, 252-254.
- Rötzschke,O., Falk,K., Stevanović,S., Jung,G., Walden,P., and Rammensee,H.G. (1991). Exact prediction of a natural T cell epitope. *Eur J Immunol* 21, 2891-2894.
- Ruppert,J., Sidney,J., Celis,E., Kubo,R.T., Grey,H.M., and Sette,A. (1993). Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to HLA- A2.1 molecules. *Cell* 74, 929-937.
- Sadasivan,B., Lehner,P.J., Ortman,B., Spies,T., and Cresswell,P. (1996). Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity* 5, 103-114.
- Salter,R.D., Howell,D.N., and Cresswell,P. (1985). Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids. *Immunogenetics* 21, 235-246.
- Schirle,M., Keilholz,W., Weber,B., Gouttefangeas,C., Dumrese,T., Becker,H.D., Stevanović,S., and Rammensee,H.G. (2000). Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T cell-independent approach. *Eur J Immunol* 30, 2216-2225.
- Schmitz,M., Diestelkoetter,P., Weigle,B., Schmachtenberg,F., Stevanović,S., Ockert,D., Rammensee,H.G., and Rieber,E.P. (2000). Generation of survivin-specific CD8+ T effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides. *Cancer Res* 60, 4845-4849.
- Skipper,J.C., Hendrickson,R.C., Gulden,P.H., Brichard,V., Van Pel,A., Chen,Y., Shabanowitz,J., Wölfel,T., Slingluff,C.L.J., Boon,T., Hunt,D.F., and Engelhard,V.H. (1996). An HLA-A2-restricted tyrosinase antigen on melanoma cells results from posttranslational modification and suggests a novel pathway for processing of membrane proteins. *J Exp Med* 183, 527-534.
- Srivastava,P.K., Menoret,A., Basu,S., Binder,R.J., and McQuade,K.L. (1998). Heat shock proteins come of age: primitive functions acquire new roles in an adaptive world. *Immunity* 8, 657-665.
- Srivastava,P.K., Udono,H., Blachere,N.E., and Li,Z. (1994). Heat shock proteins transfer peptides during antigen processing and CTL priming. *Immunogenetics* 39, 93-98.
- Stevanović,S., Pomer, S., and Rammensee, H. G. 1995. Oberflächenantigene im Nierenzellkarzinom von MHC I-gebundenen Selbstpeptiden. *Aktuelle Urologie, Sonderdruck, Georg Thieme Verlag*, 26. Jahrgang.
- Stevanović,S., and Jung,G. (1993). Multiple sequence analysis: pool sequencing of synthetic and natural peptide libraries. *Anal Biochem* 212, 212-220.
- Stevanović,S., and Rammensee,H.G. (1994). Identification of T-cell epitopes using allele-specific ligand motifs. *Behring Inst Mitt* 7-13.
- Stevanović,S., and Schild,H. (1999). Quantitative aspects of T cell activation--peptide generation and editing by MHC class I molecules. *Semin Immunol* 11, 375-384.
- Stevens, A. and Löwe J. 1997. *Pathology*. Ullstein Mosby.
- Stoltze,L., Dick,T.P., Deeg,M., Pommerl,B., Rammensee,H.G., and Schild,H. (1998). Generation of the vesicular stomatitis virus nucleoprotein cytotoxic T lymphocyte epitope requires proteasome-dependent and -independent proteolytic activities. *Eur J Immunol* 28, 4029-4036.
- Stoltze,L., Schirle,M., Schwarz,G., Schroter,C., Thompson,M.W., Hersh,L.B., Kalbacher,H., Stevanović,S., Rammensee,H.G., and Schild,H. (2000). Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nat Immunol* 1, 413-418.

- Sun,Y., Song,M., Stevanović,S., Jankowiak,C., Paschen,A., Rammensee,H.G., and Schadendorf,D. (2000). Identification of a new HLA-A*0201-restricted T-cell epitope from the tyrosinase-related protein 2 (TRP2) melanoma antigen. *Int J Cancer* 87, 399-404.
- Theobald,M., Biggs,J., Dittmer,D., Levine,A.J., and Sherman,L.A. (1995). Targeting p53 as a general tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11993-11997.
- Theobald,M., Biggs,J., Hernandez,J., Lustgarten,J., Labadie,C., and Sherman,L.A. (1997). Tolerance to p53 by A2.1-restricted cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 185, 833-841.
- Theobald,M., Ruppert,T., Kuckelkorn,U., Hernandez,J., Haussler,A., Ferreira,E.A., Liewer,U., Biggs,J., Levine,A.J., Huber,C., Koszinowski,U.H., Kloetzel,P.M., and Sherman,L.A. (1998). The sequence alteration associated with a mutational hotspot in p53 protects cells from lysis by cytotoxic T lymphocytes specific for a flanking peptide epitope. *J Exp Med* 188, 1017-1028.
- Thrower,J.S., Hoffman,L., Rechsteiner,M., and Pickart,C.M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* 19, 94-102.
- Tindle,R.W. (1996). Human papillomavirus vaccines for cervical cancer. *Curr Opin Immunol* 8, 643-650.
- Toes,R.E., Ossendorp,F., Offringa,R., and Melief,C.J. (1999). CD4 T cells and their role in antitumor immune responses. *J Exp Med* 189, 753-756.
- Toes,R.E., van,d., V, Schoenberger,S.P., Drijfhout,J.W., van Bloois,L., Storm,G., Kast,W.M., Offringa,R., and Melief,C.J. (1998). Enhancement of tumor outgrowth through CTL tolerization after peptide vaccination is avoided by peptide presentation on dendritic cells. *J Immunol* 160, 4449-4456.
- Topalian,S.L., Rivoltini,L., Mancini,M., Markus,N.R., Robbins,P.F., Kawakami,Y., and Rosenberg,S.A. (1994). Human CD4+ T cells specifically recognize a shared melanoma-associated antigen encoded by the tyrosinase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9461-9465.
- Townsend,A., Ohlen,C., Bastin,J., Ljunggren,H.G., Foster,L., and Karre,K. (1989). Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. *Nature* 340, 443-448.
- Townsend,S.E. and Allison,J.P. (1993). Tumor rejection after direct costimulation of CD8+ T cells by B7- transfected melanoma cells. *Science* 259, 368-370.
- Tsai,V., Southwood,S., Sidney,J., Sakaguchi,K., Kawakami,Y., Appella,E., Sette,A., and Celis,E. (1997). Identification of subdominant CTL epitopes of the GP100 melanoma-associated tumor antigen by primary in vitro immunization with peptide-pulsed dendritic cells. *J Immunol* 158, 1796-1802.
- Tsomides,T.J., Walker,B.D., and Eisen,H.N. (1991). An optimal viral peptide recognized by CD8+ T cells binds very tightly to the restricting class I major histocompatibility complex protein on intact cells but not to the purified class I protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 11276-11280.
- Turner,M.D. (1975). Carcinoembryonic antigen. *JAMA* 231, 756-758.
- Uebel,S. and Tampe,R. (1999). Specificity of the proteasome and the TAP transporter. *Curr Opin Immunol* 11, 203-208.
- Uebel,S., Kraas,W., Kienle,S., Wiesmuller,K.H., Jung,G., and Tampe,R. (1997). Recognition principle of the TAP transporter disclosed by combinatorial peptide libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 8976-8981.
- Valassiadou,K.E., Stefanaki,K., Tzardi,M., Datseris,G., Georgoulas,V., Melissas,J., Tsiftsis,D.D., Delides,G., and Kanavaros,P. (1997). Immunohistochemical expression of p53, bcl-2, mdm2 and waf1/p21 proteins in colorectal adenocarcinomas. *Anticancer Res* 17, 2571-2576.

- Van den Eynde,B.J. and Boon,T. (1997). Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Int J Clin Lab Res* 27, 81-86.
- van der Bruggen,P., Bastin,J., Gajewski,T., Coulie,P.G., Boel,P., De Smet,C., Traversari,C., Townsend,A., and Boon,T. (1994). A peptide encoded by human gene MAGE-3 and presented by HLA-A2 induces cytolytic T lymphocytes that recognize tumor cells expressing MAGE-3. *Eur J Immunol* 24, 3038-3043.
- van der Bruggen,P., Traversari,C., Chomez,P., Lurquin,C., De Plaen,E., Van den Eynde,B., Knuth,A., and Boon,T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254, 1643-1647.
- Vierboom,M.P., Nijman,H.W., Offringa,R., van,d., V, van Hall,T., van den Broek,L., Fleuren,G.J., Kenemans,P., Kast,W.M., and Melief,C.J. (1997). Tumor eradication by wild-type p53-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 186, 695-704.
- Vonderheide,R.H., Hahn,W.C., Schultze,J.L., and Nadler,L.M. (1999). The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 10, 673-679.
- Wölfel,T., Hauer,M., Schneider,J., Serrano,M., Wölfel,C., Klehmann-Hieb,E., De Plaen,E., Hankeln,T., Meyer,z.B.K., and Beach,D. (1995). A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 269, 1281-1284.
- Wölfel,T., Van Pel,A., Brichard,V., Schneider,J., Seliger,B., Meyer,z.B.K., and Boon,T. (1994). Two tyrosinase nonapeptides recognized on HLA-A2 melanomas by autologous cytolytic T lymphocytes. *Eur J Immunol* 24, 759-764.
- York,I.A. and Rock,K.L. (1996). Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 14, 369-396.
- Young,P., Deveraux,Q., Beal,R.E., Pickart,C.M., and Rechsteiner,M. (1998). Characterization of two polyubiquitin binding sites in the 26 S protease subunit 5a. *J Biol Chem* 273, 5461-5467.
- Zinkernagel,R.M. and Doherty,P.C. (1997). The discovery of MHC restriction. *Immunol Today* 18, 14-17.

7 Abkürzungen

Aminosäuren

| EBC | Abkürzung | Aminosäure | Eigenschaft |
|-----|-----------|----------------|---|
| A | Ala | Alanin | sehr klein, hydrophob |
| C | Cys | Cystein | sehr klein, polar, hydrophob |
| D | Asp | Asparaginsäure | klein, polar, saure AS |
| E | Glu | Glutaminsäure | polar, saure AS |
| F | Phe | Phenylalanin | hydrophob, aromatisch |
| G | Gly | Glycin | sehr klein |
| H | His | Histidin | polar, hydrophob, aromatisch, basische AS |
| I | Ile | Isoleucin | hydrophob |
| K | Lys | Lysin | polar, hydrophob, basische AS |
| L | Leu | Leucin | hydrophob |
| M | Met | Methionin | hydrophob |
| N | Asn | Asparagin | klein |
| P | Pro | Prolin | klein |
| Q | Gln | Glutamin | polar |
| R | Arg | Arginin | polar, basische AS |
| S | Ser | Serin | sehr klein, polar |
| T | Thr | Threonin | klein, polar, hydrophob |
| V | Val | Valin | klein, hydrophob |
| W | Trp | Tryptophan | polar, hydrophob, aromatisch |
| Y | Tyr | Tyrosin | polar, hydrophob, aromatisch |

EBC: Einbuchstaben-Code

| | |
|-------|---|
| Ag | Antigen |
| AK | Antikörper |
| AS | Aminosäure |
| APC | <i>antigen presenting cells</i> |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| Ca | <i>cancer</i> |
| CD | <i>cluster of differentiation</i> |
| CTL | <i>cytotoxic T-lymphocytes</i> |
| DC | Dendritische Zellen |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| FACS | <i>fluorescence-activated cell sorter</i> |
| gp | Glykoprotein |
| HLA | <i>human leucocyte antigen</i> |
| HPLC | <i>high performance liquid chromatography</i> |
| Ig | Immunglobulin |
| KM | Knochenmark |
| mAK | monoklonaler Antikörper |
| MFI | mittlere Fluoreszenzintensität |
| MHC | <i>major histocompatibility complex</i> |
| MALDI | Matrix-unterstützte Laserdesorptionsionisierung |
| OD | optische Dichte |
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| TAP | <i>transporter associated with antigen processing</i> |
| TCR | T-cell receptor |
| TFA | Trifluoressigsäure |

8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee danke ich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die sowohl fachliche als auch persönliche Betreuung,

Herrn PD Dr. Stefan Stevanović für das stete Interesse an meiner Arbeit, die herausragende Betreuung und dafür, daß er sich immer Zeit zur Beantwortung meiner Fragen nahm,

Frau Dr. Jutta Bachmann für die Organisation des fachlich und menschlich sehr bereichernden Graduiertenkollegs „Zellbiologie in der Medizin“,

Hüseyin D., Patricia H., Markus S., Toni W., David G. und Sascha N. für das gute Zusammenarbeiten und schöne Musizieren

und all den anderen freundlichen Mitarbeitern, mit denen die Arbeit im Labor viel Spaß gemacht hat.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden für die liebevolle Unterstützung.

9 Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

| | |
|-------------|--|
| Name | Margarete Susanne Pick |
| Geburtstag | 17. Oktober 1975 |
| Geburtsort | Tübingen |
| Eltern | Dr. rer. nat. Bernward Pick, Physiker, 1979 verstorben Elisabeth, geb. Berg, Dipl.-Bildungsreferentin, Sozialarbeiterin |
| Geschwister | Andreas Constantin Pick, geb. 1972, Dipl.-Ing. Simon Gregor Pick, geb. 1974, Dipl.-Physiker |

AUSBILDUNG

| | |
|-----------------|---|
| 1986–1995 | Ludwig Uhland-Gymnasium, Tübingen Sprachen: Latein, Englisch, Französisch |
| 1995 | Abitur, Leistungskurse: Mathematik und Musik (Violine) |
| April 1996 | Beginn des Medizinstudiums in Tübingen |
| März 1998 | Physikum |
| März 1999 | Erstes Staatsexamen |
| April 2002 | Zweites Staatsexamen |
| Mai 2003 | Drittes Staatsexamen |
| September 1999 | Dissertation bei Prof. Dr. H.-G. Rammensee „Isolierung und Analyse von HLA-Klasse-I-Liganden von soliden Tumoren und Tumorzelllinien“ |
| 10.1999–09.2000 | Stipendiatin des Graduiertenkollegs „Zellbiologie in der Medizin“ |
| 09.2000–08.2001 | Auslandsstudium an der Università degli Studi di Bari, Italien, Facoltà di Medicina e Chirurgia, SOCRATES / ERASMUS-Stipendium |

PRAKTIKA

| | |
|-------------------|--|
| 28.08.–24.09.1995 | Krankenpflegepraktikum im Evelyn Hospital, Cambridge, England |
| 15.01.–14.02.1996 | Krankenpflegepraktikum Gynäkologie, Universitätsklinikum Tübingen |
| 20.07.–19.08.1998 | Famulatur Innere Medizin im St. Josefskrankenhaus, Freiburg |
| 26.07.–25.08.1999 | Famulatur Kinderkardiologie, Universitätsklinikum Tübingen |
| 01.11.–15.12.2000 | Famulatur Pädiatrie, Policlinico di Bari, Italien |
| 01.03.–01.04.2001 | Famulatur Neurologie, Universitätsklinikum Tübingen |
| 25.06.–15.07.2001 | Famulatur Dermatologie, Policlinico di Bari, Italien |
| 16.07.–05.08.2001 | Famulatur Neurologie, Policlinico di Bari, Italien |
| 29.04.–23.06.2002 | Praktisches Jahr: Innere Medizin, St. Luke's Hospital, Malta |
| 24.06.–18.08.2002 | Praktisches Jahr: Innere Medizin, Universitätsklinikum Tübingen |
| 19.08.–08.12.2002 | Praktisches Jahr: Chirurgie, Ospedale San Paolo di Milano, Italien |
| 09.12.02–30.03.03 | Praktisches Jahr: Neurologie, Universitätsklinikum Tübingen |