

**Aus dem Interfakultären Institut für Zellbiologie der Universität
Tübingen
Abteilung: Immunologie
Abteilungsleiter: Professor Dr. H.-G. Rammensee**

**HLA-Klasse-I-Antigenpräsentation und Genexpression
solider Tumoren im Vergleich**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Florian Michael Anton Obermayr

**aus
Neuenbürg**

2005

Dekan: Professor Dr. C.D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. H.-G. Rammensee

2. Berichterstatter: Frau Professor Dr. C. Müller

Meiner Mutter und meinem Bruder gewidmet.

Die Ethikkommission der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen hat diesem Projekt zugestimmt. Nummer des Ethikantrages: 727/2000.

Teile dieser Doktorarbeit wurden veröffentlicht in:

Weinschenk, T., Gouttefangeas, C., Schirle, M., Obermayr, F., Walter, S., Schoor, O., Kurek, R., Loeser, W., Bichler, K.H., Wernet, D., Stevanovic, S., Rammensee, H.G., 2002. **Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccins**. *Cancer Res.*, 62: 5818-5827.

Inhalt

1. Einleitung	8
1.1 Das Immunsystem	8
1.1.1 Allgemein	8
1.1.2 Das humorale Immunsystem	8
1.1.3 Zellen des Immunsystems	9
1.2 MHC	11
1.2.1 Die MHC-Gene	12
1.2.2 MHC-Polymorphismus	13
1.2.3 Struktur	14
1.3 Antigenprozessierung	17
1.3.1 MHC-Klasse-I-Prozessierungsweg	18
1.3.2 MHC-Klasse-II-Prozessierungsweg	19
1.4 T-Zellantwort	20
1.5 Tumorantigene	22
1.5.1 Identifizierung von Tumorantigenen	22
1.5.2 Einteilung von Tumorantigenen	23
1.5.3 Expression und Funktion bestimmter TAA	24
1.6 T-Zellepitopvorhersage	31
1.7 Die Karzinome	32
1.7.1 Das Nierenzellkarzinom	32
1.7.2 Das kolorektale Karzinom	33
1.8 Zielsetzung der Doktorarbeit	37
2. Material und Methoden	38
2.1 Zellbiologische Methoden	38

2.1.1	Zelllinien	38
2.1.2	Sammeln von Tumorgewebe	38
2.1.3	Zellkultur	38
2.1.4	Zellernte	39
2.1.5	Einfrieren, Lagern und Auftauen der Zellen	39
2.1.6	Ermittlung der Lebendzellzahl	39
2.2	Immunologische und biochemische Methoden	39
2.2.1	Antikörperaufreinigung aus Hybridomüberstand	39
2.2.2	Subklonierung der Zelllinie BB7.2	40
2.2.3	Durchflußzytometrie	40
2.2.4	SDS-PAGE	41
2.2.5	Western Blot	43
2.2.6	Extraktion von MHC-Liganden durch Immunpräzipitation mit CNBr-aktivierter Sepharose	44
2.2.7	Extraktion von MHC-Liganden durch Immunpräzipitation mit Protein A-Sepharose	46
2.3	Analytische Methoden	47
2.3.1	Massenspektrometrische Methoden	47
2.3.2	Edman-Sequenzanalyse	52
2.4	Molekularbiologische Methoden	53
2.4.1	HLA-Typisierung	53
2.4.2	DNA-Mikroarray Gen-Expressionsanalyse	53
2.4.3	Gen-Expressionsanalyse mit quantitativer PCR (qPCR)	55
2.4.4	Laser Capture-Mikroskopie	56
3.	Ergebnisse	58
3.1	Untersuchungen zu den Antikörpern	58
3.1.1	Untersuchung des HLA-ABC-spezifischen Antikörpers W6/32 und des HLA-A*0201-spezifischen Antikörpers BB7.2 im FACS-Assay	58
3.1.2	Subklonierung von BB7.2-Hybridomzellen	58

3.2	Vergleich der CNBr-Methode mit der Protein A-Methode bei der MHC-Klasse-I-Immunpräzipitation	60
3.2.1	MHC-Immunpräzipitation von LCL 721 Zellen mit der CNBr-Methode	60
3.2.2	MHC-Immunpräzipitation von LCL 721 Zellen mit der Protein A-Methode	60
3.3	Die Tumoren	65
3.3.1	Gesammelte Tumoren	65
3.3.2	Das Nierenzellkarzinom NZK13 – MHC-Klasse-I-Liganden und Gen-expression	68
3.3.2.1	MHC-Immunpräzipitation von NZK13 mit dem Antikörper W6/32	68
3.3.2.2	MHC-Immunpräzipitation von NZK13 mit dem Antikörper BB7.2	70
3.3.2.3	Gen-Chip Analyse von NZK13	72
3.3.2.4	Vergleich der Gen-Chip Analyse mit den identifizierten Liganden von NZK13	73
3.3.2.5	Untersuchung der Expression von Met-Protoonkogen und Cytokeratin 18 in Tumor- und Normalgewebe von NZK13 mit quantitativer PCR	73
3.3.2.6	Quantitative PCR mit microdissektiertem Tumor- und Normalgewebe	77
3.3.2.7	Expression von Met-Protoonkogen, Nikotinamid-N-Methyl-transferase und Cytokeratin 18 in verschiedenen Körpergeweben	79
3.3.3	Identifizierung von HLA-Liganden der Kolonkarzinome CCA69, CCA75 und des Nierenzellkarzinoms NZK08	80
3.3.4	Kolon- und Nierenzellkarzinome, deren MHC-Klasse-I-Präzipitate keiner weiteren Analytik zugeführt wurden	81
3.3.5	Überprüfung der Effizienz der MHC-Immunpräzipitation durch Western-Blot-Analyse	83
4.	Diskussion	84
4.1	Diskussion der Methoden	84
4.1.1	Subklonierung von BB7.2 Hybridomzellen	84
4.1.2	Vergleich der CNBr-Methode und der Protein A-Methode bei der MHC-Immunpräzipitation	84

4.1.3	MHC-Klasse-I-Western-Blot zur Verlaufskontrolle der MHC- Immunpräzipitation _____	85
4.1.4	Ausbeute an HLA-Klasse-I-Liganden _____	86
4.1.5	Verschiedene Techniken zur Analyse der HLA-Klasse-I-Liganden ____	87
4.1.6	Kombination von DNA-Chip-Technologie und massenspektrometrischer HLA-Klasse-I-Liganden-Identifikation _____	89
4.2	Diskussion der identifizierten HLA-Klasse-I-Liganden _____	89
4.2.1	HLA-Klasse-I-Liganden des Nierenzellkarzinoms NZK13 _____	90
4.2.2	HLA-Klasse-I-Liganden des Nierenzellkarzinoms NZK08 _____	95
4.2.3	HLA-Klasse-I-Liganden der Kolonkarzinoms CCA69 und CCA75 ____	95
4.3	Eignung der identifizierten HLA-Klasse-I-Liganden für die Tumorvakzinierung _____	96
4.4	Ausblick _____	98
5.	Zusammenfassung _____	100
6.	Abkürzungsverzeichnis _____	101

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem

1.1.1 Allgemein

Das Immunsystem stellt eine komplexe Allianz verschiedener Organe des menschlichen Körpers dar, die das Ziel hat körperfremde Stoffe und Pathogene am Eindringen in den Körper zu hindern und bereits eingedrungene Stoffe zu eliminieren. Eine besondere Rolle spielen hierbei die zentralen und peripheren lymphatischen Organe. Bei den zentralen lymphatischen Organen handelt es sich um das Knochenmark, das lymphatische und myeloische Vorläuferzellen produziert, und den Thymus, welcher für die Reifung von T-Lymphozyten verantwortlich ist. Die peripheren lymphatischen Organe wie Milz, Lymphknoten und schleimhautassoziiertes lymphatisches System sind Orte, wo Lymphozyten auf Antigene treffen, stimuliert werden und eine Immunantwort einleiten können. Die Immunantwort an sich lässt sich nach dem Kriterium der Spezifität einteilen. Das sogenannte angeborene, nicht-adaptive und phylogenetisch sehr alte Immunsystem stellt mit Haut, Schleimhäuten, Säureschutz der Haut, phagozytierenden Zellen, Temperatur und Entzündungsreaktion unspezifische, sowie musterspezifische (Toll-like-receptors) Mechanismen für die Immunabwehr zur Verfügung. Es ist wirksam gegen eine breite Palette von Pathogenen ohne einen effektiven Schutz gegen Reinfektion, ein Infektionsgedächtnis, zu bieten. Das erworbene Immunsystem dagegen basiert auf einem spezifischen Erkennen der antigenen Strukturen eines Pathogens durch hochvariable Rezeptoren von Lymphozyten und deren monoklonaler Vermehrung. Das erworbene, oder auch adaptive Immunsystem lässt sich weiter in humorale und zelluläre Funktion aufteilen.

1.1.2 Das humorale Immunsystem

Das humorale Immunsystem ist gegen extrazelluläres Pathogen gerichtet und besteht vor allem aus Antikörpern und dem Komplementsystem. Antikörper sind antigenspezifische Proteine, von B-Lymphozyten produziert, und bestehen aus 1 - 5 Grundeinheiten, die wiederum aus jeweils zwei schweren Ketten (50 kDa) und zwei leichten Ketten (25 kDa) aufgebaut sind. Die beiden schweren Ketten sind durch

Disulfidbrücken miteinander verbunden und bilden eine Y-förmige Struktur, wobei sie am offenen N-terminalen Ende zusammen mit der leichten Kette das hoch variable antigenbindende Fragment (F_{ab}) bilden. Der C-terminale Teil (F_c) des Y wird nur aus den beiden schweren Ketten gebildet und ist relativ konstant. Dieser Teil ist für die Bindung und Aktivierung von Komplement, Erkennung durch Makrophagen und Bindung an Protein A und G wichtig. Man kann fünf, in ihrer Sequenz verschiedene, schwere Ketten unterscheiden ($\alpha, \gamma, \delta, \epsilon, \mu$), welche die fünf Isotypen ausmachen. Auch zwei leichte Ketten können unterschieden werden (κ, λ), deren spezielle Funktionen allerdings nicht bekannt sind.

Für die Vielfalt der Antikörper sind diverse Mechanismen verantwortlich. Vererbte Variabilität, zufällige und ungenaue Rekombination der Gensegmente V, D, J und die Assoziation verschiedener variabler schwerer und leichter Ketten zu einem F_{ab} bedingen diese Vielfalt.

Antikörper können spezifisch an Antigene binden und haben neutralisierende Wirkung, d.h. sie fangen Pathogene und Toxine ab, noch bevor diese Zellen infizieren oder anderen Schaden anrichten können. Des Weiteren markieren (opsonisieren) sie Pathogene und infizierte Zellen für Makrophagen und aktivieren, an Pathogen gebunden, Komplement.

1.1.3 Zellen des Immunsystems

B-Lymphozyten

Die Zellen des Immunsystems entstehen überwiegend aus pluripotenten Zellen des Knochenmarks. Die B-Lymphozyten (B: bone marrow oder bursa) verbleiben während ihrer gesamten Entwicklung bis zur reifen Zelle im Knochenmark und wandern dann in die peripheren lymphatischen Organe aus. Dort können sie von Antigenen zur Antikörperproduktion stimuliert werden. Diese Stimulation kann T-Zell-abhängig und -unabhängig stattfinden. Der T-Zell-abhängige Mechanismus basiert auf einer spezifischen Aufnahme von Proteinantigen in B-Lymphozyten über membranständige Antikörpermoleküle (IgM und IgD), dessen Prozessierung und Präsentation über MHC-Klasse-II-Moleküle auf der B-Zelloberfläche. Dieses MHC-Klasse-II-präsentierte Antigen wird von T-Helferzellen erkannt, durch welche die B-Zelle zur Antikörperproduktion angeregt wird. Polysaccharide und Lipide – Strukturen, die in

hoher Frequenz auf Pathogenoberflächen vorkommen – sind im Gegensatz dazu in der Lage, B-Zellen unabhängig von T-Zell-Hilfe zur Antikörperproduktion zu stimulieren. Als Mechanismus wird eine, durch die hochrepetitive Antigenanordnung verursachte, Quervernetzung der membranständigen Antikörper angenommen. Somit nehmen die B-Lymphozyten eine zentrale Rolle im humoralen Immunsystem ein.

T-Lymphozyten

Im Gegensatz zu den B-Zellen wandern die Vorläufer der T-Lymphozyten in den Thymus ein, wo diese proliferieren und wo es, ähnlich wie bei den Antikörpern, zu einer Rekombination der T-Zell-Rezeptoren (TCR) kommt. So entstehen auch hier eine Vielzahl in ihrer Spezifität verschiedene Rezeptoren. Dann geschehen dort für das Funktionieren des Immunsystems zwei entscheidende Dinge. a) Zum einen findet eine positive Selektion derjenigen T-Zellen statt, welche die im Thymusepithel exprimierten MHC-Moleküle erkennen. D.h., T-Zellen, die nicht in der Lage sind, die vorhandenen MHC-Moleküle mit ausreichender Affinität zu binden, gehen apoptotisch zugrunde.

b) Zum anderen sind die T-Zellen im Thymus einer negativen Selektion ausgesetzt. Dabei werden T-Lymphozyten eliminiert, welche Komplexe von MHC-Klasse-I mit Selbst-Peptid erkennen, die dort vorwiegend von dendritischen Zellen präsentiert werden. Durch diese Prozesse im Thymus erlangt das Immunsystem die Fähigkeit zwischen Selbst und Fremd zu unterscheiden, tolerant gegenüber gesunden körpereigenen und intolerant gegenüber, durch Pathogen oder Transformation, veränderten körpereigenen Zellen zu werden.

Die T-Zellen werden noch nach ihrer Restriktion für MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II unterschieden, deren Beschreibung in späteren Kapiteln folgt.

Antigenpräsentierende Zellen (APC)

Die APC im engeren Sinn sind MHC-Klasse-II exprimierende Zellen, wie Makrophagen, B-Zellen und dendritische Zellen. Sie besitzen die Fähigkeit, Antigen aktiv aufzunehmen, zu prozessieren und über MHC-Klasse-II zu präsentieren. In der Körperperipherie nehmen die APC Antigen auf, wandern dann in die Lymphknoten ab und können dort MHC-Klasse-II- und MHC-Klasse-I-restringierte T-Zellen in

Abhängigkeit von Kostimulatoren aktivieren. Die dendritischen Zellen sind die effektivsten APC, da sie die Kostimulatoren (z.B. B7) konstitutiv exprimieren.

Im weiteren Sinn sind auch alle MHC-Klasse-I exprimierenden Zellen antigenpräsentierende Zellen, da sie den zytotoxischen T-Zellen (CTL, CD8-positiv) Pathogenpeptide präsentieren und dadurch deren zytotoxische Aktivität anregen können.

1.2 MHC

Anfang des letzten Jahrhunderts beobachtete man bei Mäusen, denen Tumoren von anderen Mäusen implantiert wurden, daß diese nur dann abgestoßen wurden, wenn der Tumor von einer Maus eines anderen Stammes als von dem der Empfängermaus stammte (Little et al., 1916). Man machte dafür genetische Unterschiede zwischen den Mausstämmen und nicht Eigenschaften des Tumors verantwortlich. Peter Gorer entdeckte um 1936 dann antigenetische Unterschiede zwischen Mauserythrozyten, für die er ein Protein verantwortlich machte, das er Antigen-2 nannte (Gorer, 1936). Einige Zeit später waren sich Gorer und George Snell, der zwischenzeitlich die von ihm benannten H-Gene in Mäusen für Tumorabstoßungsreaktionen verantwortlich machte (Snell, 1948), einig, daß es sich bei Antigen-2 und H-Genen um den gleichen Genekomplex handeln musste und nannten ihn H2. Snell prägte kurze Zeit später auch den Begriff Major Histocompatibility Complex (MHC).

Die Entdeckung der MHC-Moleküle beim Menschen beruht auf der Beobachtung, daß das Serum von Bluttransfusionsempfängern in der Lage war, Leukozyten des Blutspenders zu agglutinieren. Die Antigene, welche diese Reaktion verursachten nannte man Human Leukocyte Antigen (HLA). Es dauerte daraufhin allerdings noch lange bis man erkannte, daß die HLA-Proteine denen des MHC entsprechen.

Da die Transplantation von fremdem Gewebe oder Bluttransfusionen keine physiologischen Vorgänge darstellen, blieb die eigentliche Funktion noch im Dunkeln.

Dotherty und Zinkernagel entdeckten dann, daß mit dem Lymphocytotropischen Choriomeningitis Virus (LCMV) infizierte Zellen nur dann von CTL lysiert wurden, wenn diese die gleichen MHC-Klasse-I-Moleküle besaßen wie die infizierten Zellen. Das war die Entdeckung der MHC-Restriktion (Zinkernagel and Doherty, 1974) und gab einen wichtigen Hinweis auf den Einfluß des MHC im Immunsystem.

Heute weiß man, daß MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche Peptide präsentieren, die Fragmente von Proteinen sind, welche im Zytoplasma und in Endosomen vorkommen. Es kann sich dabei um Proteine zelleigener oder zellfremder/pathogener Natur handeln. Somit übermitteln die MHC-Moleküle den Infektionsstatus einer Zelle an das Immunsystem.

Dabei werden MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle unterschieden, die trotz erheblicher Unterschiede im Aufbau aus Untereinheiten und in ihrer Nukleotidsequenz sehr ähnliche Strukturen aufweisen. Diese Struktur geht mit ihrer Fähigkeit einher Peptide zu präsentieren.

1.2.1 Die MHC-Gene

Die MHC-Gene liegen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 (6p21.3) und erstrecken sich über 3800 kb. Am telomeren Ende dieser Region liegen die HLA-Klasse-I-, am centromeren Ende die HLA-Klasse-II-Loci. Dazwischen liegt eine Region, die als "unrelated chromatin" (UC) oder auch HLA-Klasse-III bezeichnet wird. Als unrelated werden diese Gene deshalb bezeichnet, da sie nicht mit der Expression bzw. der Funktion des eigentlichen HLA (Klasse-I und -II) verknüpft sind.

Die HLA-Klasse-I-Loci werden zum einen von den klassischen HLA-Klasse-I (Ia)- und den nichtklassischen HLA-Klasse-I- (Ib) Genen repräsentiert. Die Ia-Gene (HLA-A, -B, -C) kodieren für ein 45 kDa Glykoprotein, das im Endoplasmatischen Retikulum (ER) mit Peptid und β_2 -Mikroglobulin (β_2m) nichtkovalente Bindung eingeht und über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche geschleust wird. Ia-Proteine werden, bis auf wenige Ausnahmen, ubiquitär in allen kernhaltigen Zellen des Körpers exprimiert und stellen den Hauptmechanismus zur Antigenpräsentation gegenüber CTL dar. Die Ib-Gene liegen zwischen den Ia Genen, aber auch am Rand der HLA-Klasse-I-Region. Bisher sind die Loci von HLA-E, -X, -F, -G, -H, und -J charakterisiert. Über ihre Funktion ist allerdings noch wenig bekannt. Sie scheinen nicht ubiquitär, sondern differenzierungs- und gewebsabhängig exprimiert zu werden. Ihre Funktion in der Embryonalentwicklung (HLA-F und -G) (Kovats et al., 1990) wird diskutiert. HLA-H, heute als HFE bezeichnet, wird mit gastrointestinaler Eisenresorption und Hämochromatosis (Philpott, 2002) in Zusammenhang gebracht. Des Weiteren ist bekannt, daß HLA-E und HLA-G Liganden von Rezeptoren auf Natürlichen

Killerzellen sind und durch Bindung an diese deren zytotoxische Reaktion unterdrücken.

Die HLA-Klasse-II-Region beherbergt auf einem 1000 kb Abschnitt die Loci der HLA-D Gene. Sie lassen sich ähnlich wie die HLA-Klasse-I-Gene in 3 Isotypen einteilen: DR, DQ, DP. Jede dieser Subregionen beinhalten ein A und B Gen, welche dann nach Transkription und Translation im ER Heterodimere bilden. Die HLA-D Proteine werden überwiegend in Zellen des Immunsystems exprimiert (Makrophagen, dendritischen Zellen, B-Lymphozyten) und besitzen eine Schlüsselfunktion bei der Aktivierung von Immunzellen.

Weitere HLA-D-Gene in der HLA-Klasse-II-Region sind HLA-DO, -DN, und -DM. Davon spielt HLA-DM eine wichtige Rolle bei der Beladung von HLA-Klasse-II-Moleküle. Des Weiteren findet man in dieser Region die Gene für LMP2, LMP7, TAP1 und TAP2. Durch ihre Funktion – die LMP Proteine sind Untereinheiten des Immunproteasoms und die TAP transportieren Peptide in das ER – spielen sie eine wichtige Rolle bei der Antigenprozessierung und damit auch bei der Antigenpräsentation.

Die Klasse-III-Region erstreckt sich über 1100 kb und beheimatet Gene für Komplementfaktoren, Tumornekrosefaktor (TNF), Steroid 21-Hydroxylase (CYP21), heat shock protein 70 (HSP70) und Genprodukte unbekannter Funktion.

1.2.2 MHC-Polymorphismus

Einige der MHC-Loci weisen einen extrem starken Polymorphismus auf Nukleotidebene und, was im Vergleich zu anderen polymorphen Genen besonders ist, auch auf Proteinebene auf. Verglichen mit den synonymen (stillen) Nukleotidsubstitutionen überwiegen – und hier speziell in der Peptidbindungsfurche – beim MHC die nichtsynonymen Substitutionen, was stark für einen selektionsbedingten Polymorphismus spricht (Hughes and Nei, 1988).

Die Selektionshypothese von Hughes und Nei findet auch Untermauerung durch die Beobachtungen von Hill et al., 1991. Dabei zeigten Hill et al. auf, daß das gegen Malaria tropicana Resistenz verleihende HLA-Allel HLA-B*5301 in Malaria tropicana endemischen Regionen (West Afrika) in 30-40% der Bevölkerung vorkommt. Im

Gegensatz dazu kommt dieses Allel in der kaukasischen europäischen Bevölkerungsgruppe mit 1% nur sehr niederfrequent vor.

So entkommt hier das Pathogen (*Plasmodium falciparum*) dem humanen Immunsystem und tötet den Menschen, sofern er nicht das HLA-B*5301 Allel besitzt. Weitere Allele vermögen wahrscheinlich Resistenzen gegen andere Pathogene zu erzeugen. So ist der MHC-Polymorphismus und die Polygenie essentiell für das Überleben eines Individuums, sofern daran die Resistenz gegen verschiedene Pathogene gekoppelt ist.

Andererseits kann ein hochprävalentes HLA-Allel Selektionsdruck ausüben und ein immunologisch resistentes Pathogen selektieren. So ist bei einer HLA-A*11 Prävalenz von über 50% in China und Papua-Neuguinea dort eine Epstein-Barr-Virusmutante existent, deren prozessierte Peptide nur sehr instabil auf HLA-A*11 gebunden werden (de Campos-Lima et al., 1993).

Derzeit sind in der Datenbank des Anthony Nolan Trust (www.anthonynolan.com) 1620 Allele erfasst. Darunter sind 266 HLA-A-, 511 HLA-B-, und 128 HLA-C-Allele. Bei HLA-Klasse-II ist herausragend das HLA-DRB mit 403 Allelen zu nennen. Zieht man auch noch die Kombinationsmöglichkeiten zwischen leichten und schweren HLA-Klasse-II-Ketten und die Tatsache der Polygenie (drei verschiedene Loci für HLA-Klasse-I und Klasse-II) in Betracht, so ist die Chance für nicht miteinander verwandte Individuen, den gleichen HLA-Typ (d.h. die gleichen Allele für alle Loci) zu besitzen verschwindend gering. Diese Tatsache ist nicht nur bei der Organtransplantation wichtig sondern verleiht einer Bevölkerungspopulation als ganzes Schutz gegen deren Ausrottung, da es mit einer hohen Wahrscheinlichkeit immer eine Subpopulation geben wird, die aufgrund ihres HLA-Types das Pathogen immunologisch effektiv bekämpfen kann.

1.2.3 Struktur

Das zellmembranständige Klasse-I-Molekül setzt sich aus zwei Untereinheiten, der schweren α - und der leichten β_2m -Kette, zusammen. Weiter kann die schwere Kette in die Domänen α_1 , α_2 und α_3 unterteilt werden. An die α_3 Domäne knüpft sich noch der Membrananker und der zytoplasmatische Anteil des Heterodimers an. Die Domänen α_1 und α_2 formen gemeinsam die Peptidbindungsfurche. Mit ihren Aminosäuren 1 α_1 - 48 α_1 und 94 α_2 - 135 α_2 bilden sie eine β -Faltblattstruktur als Boden der Furche, und mit

den restlichen Aminosäuren der α_1 - und α_2 -Domänen zwei α -helikale Strukturen als deren Randbegrenzung (Abbildung 1.1). Bezeichnenderweise ist in dieser Region der Polymorphismus, im Vergleich zu den anderen MHC-Domänen, am stärksten ausgeprägt.

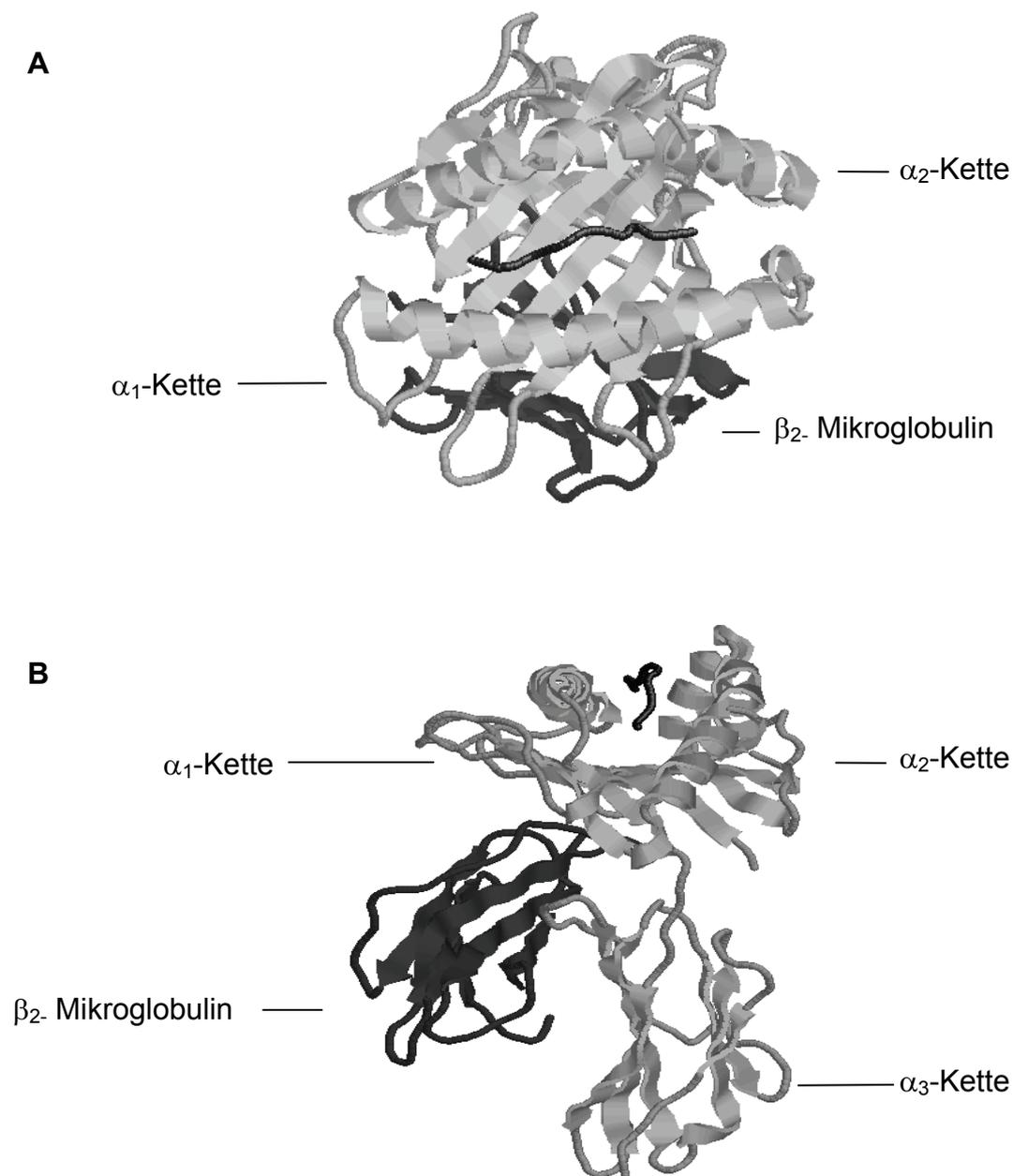


Abbildung 1.1: Struktur des HLA-Klasse-I-Moleküls. A: Aufsicht auf die peptidbindende Furche mit Peptid, B: Seitansicht. Grau: α -Kette, schwarz: β_2 -Mikroglobulin. In der Bindungsfurche, schwarz dargestellt, das Peptid (Madden et al., 1993).

In aller Regel befindet sich das in der Furche gebundene 8-10mer-Peptid ausgestreckt zwischen den beiden α -Helices und ist N- und C-terminal über Wasserstoffbrückenbindungen mit konservierten Aminosäureseitenketten (Tyr7, Tyr59, Tyr71, Trp167 und Tyr159 für den N-Terminus; Tyr84, Thr143, Lys146 und Trp147 für den C-Terminus) verankert. Allerdings scheint es auch Peptide zu geben, welche länger als die oben genannten 8-10 Aminosäuren sind. Erst kürzlich wurde ein auf einem Ratten-MHC gebundenes 13mer Peptid röntgen-kristallographisch dargestellt (Speir et al., 2001). Dieses Peptid ist an seinem N- und C-terminalen Ende in der Furche fixiert, bildet aber in der Furchenmitte eine kleine Schleife, um die Überlänge zu kompensieren. Neben den konservierten Aminosäuren der Bindungsfurche bilden deren hochpolymorphen Areale Bindungstaschen aus, die aufgrund ihrer Aminosäurekomposition und Größe bevorzugt ein bestimmtes Set von Peptidaminosäuren nichtkovalent binden können (Saper et al., 1991). Bindet nur eine kleine Gruppe von Peptidaminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften an einer Bindungstasche, bezeichnet man diese als Ankeraminosäuren. Diese Ankeraminosäuren sind mit der korrekten Länge und der C- oder N-terminalen Fixierung des Peptids Grundvoraussetzungen für dessen stabile Bindung an das MHC-Klasse-I-Molekül und damit für eine effektive Präsentation von Proteinantigenen in Peptidform. Zusätzlich zu den Ankeraminosäuren wurden für verschiedene HLA-Allele noch für die Bindungseigenschaften weniger wichtige, aber bevorzugt vorkommende Peptidaminosäuren identifiziert. Die Summe dieser Peptideigenschaften, die für die effektive Bindung eines Peptides an ein MHC-Allel notwendig sind, bezeichnet man als Peptid-Motiv (Falk et al., 1991).

Die Bestimmung der Ankeraminosäuren kann über den N-terminalen Edman-Abbau von Pools eluierter HLA-Liganden eines bestimmten Allels erfolgen, wobei an den Ankerpositionen des Peptids die jeweiligen Ankeraminosäuren vermehrt detektiert werden (Stevanovic and Jung, 1993). Die Spezifizierung der restlichen Peptidaminosäuren muß über die Sequenzanalyse einzelner HLA-Liganden erfolgen. In Tabelle 1.1 ist exemplarisch das Motiv für das Allel HLA-A*0201 dargestellt.

Tabelle 1.1: Peptidmotiv für HLA-A*0201; die Ankeramino­säuren sind jeweils fett hervorgehoben (aus der Internetdatenbank SYFPEITHI: www.syfpeithi.de)

HLA-A*0201	Position								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ankeramino­säuren		L				V			V
		M							L
Stark bevorzugt				E				K	
				K					
Schwach bevorzugt	I		A	G	I	I	A	E	
	L		Y	P	K	L	Y	S	
	F		F	D	Y	T	H		
	K		P	T	N				
	M		M		G				
	Y		S		F				
	V		R		V				
					H				

Obwohl die MHC-II-Moleküle, bezogen auf die Untereinheiten und die Aminosäuresequenz, einen zu den MHC-I-Molekülen sehr verschiedenen Grundaufbau aufweisen, gleichen sie diesen röntgen-kristallographisch dargestellt doch sehr. Die Peptidbindungsfurche wird bei ihnen durch ihre α - und β - Kette gebildet und ist an beiden Enden nicht so eng geschlossen wie das bei MHC-Klasse-I der Fall ist. Dadurch können die MHC-Klasse-II-Moleküle auch längere Peptide – bis zu 20 Aminosäuren – binden, da die Peptide über die Bindungsfurche hinausragen können. Die N- und C-terminalen Enden sind hierbei nicht fixiert. Ansonsten scheint für die MHC-II-Peptide, was das Motiv und die Bindungseigenschaften betrifft ähnliches zu gelten, wie für die MHC-Klasse- I-Peptide.

1.3 Antigenprozessierung

Endogene und endozytotisch aufgenommene exogene Proteine sind im Zellinneren ständig einer Degradation durch dort vorkommende Proteasen ausgesetzt. Die dabei entstehenden Peptide werden durch die MHC-Moleküle gebunden und mit ihnen an der

Zelloberfläche dem Immunsystem präsentiert. Diesen Weg, der mit dem Abbau der Proteine beginnt und mit deren Präsentation endet, bezeichnet man als Antigenprozessierung. Hierbei wird intrazelluläres und endozytotisch aufgenommenes Protein prinzipiell verschieden verarbeitet, wobei beide Prinzipien nicht völlig isoliert voneinander ablaufen. Für intrazelluläres Protein ist vor allem der MHC-Klasse-I-Prozessierungsweg und für extrazelluläres Protein der MHC-Klasse-II-Prozessierungsweg von Bedeutung.

1.3.1 MHC-Klasse-I-Prozessierungsweg

Zytosolisches zelleigenes und virales Protein wird im Zytosol durch das Proteasom und andere proteolytisch aktive Enzyme (Stoltze et al., 1998; van Endert, 1999) zu kurzen Peptiden abgebaut. Das Proteasom ist ein tonnenförmiger multikatalytischer Komplex, dessen Kernkomponente das 20S Proteasom ist. Dieses ist aus 14 α - und 14 β -Untereinheiten aufgebaut, von denen sich jeweils 2x7 α - und 2x7 β -Untereinheiten in Ringform arrangieren und sich, eine Röhre bildend, übereinander lagern. Es entsteht also eine Röhre bestehend aus vier Ringen ($\alpha_7, \beta_7, \beta_7, \alpha_7$), die aus je 7 Untereinheiten aufgebaut sind. Von diesen Ringen tragen lediglich die in der Mitte des Proteasoms vorkommenden β -Ringe proteolytische Aktivität. Die Untereinheit β_5 weist hier chymotrypsinartige Aktivität auf (hydrophobe Reste in Position 1), wohingegen β_2 nach basischen (trypsinartige Aktivität) und β_1 nach sauren Aminosäuren schneidet.

Interferon- γ (INF- γ) moduliert die enzymatische Aktivität des Proteasom in der Weise, daß es die Expression von Enzymuntereinheiten induziert, welche die β_1 -, β_2 - und β_5 -Enzymaktivitäten des konstitutiven 20S Protasoms ersetzen. Hierbei handelt es sich um MECL1 (β_{1i}), LMP2 (low-molecular weight protein) (β_{2i}) und LMP7 (β_{5i}). Nach Einbau dieser Enzymaktivitäten spricht man von einem Immunproteasom (Tanaka and Kasahara, 1998). Des weiteren induziert INF- γ die Bildung des PA-28-Aktivierungskomplexes, was zusammen mit den veränderten Enzymaktivitäten eine effektivere und, vom Proteasomschnittmuster, veränderte Peptidgenerierung zur Folge hat (Dick et al., 1996; Groettrup et al., 1996).

Die Längenverteilung der durch das Proteasom generierten Peptide entspricht einer Gaussverteilung mit Präferenz für Peptide mit einer Länge von 8-10 Aminosäuren (Ehring et al., 1996; Kisselev et al., 1998; Wenzel et al., 1994). Somit fallen vor allem

Peptide an, welche, die Länge betreffend, optimal in die Peptidbindungsfurche von MHC-Klasse-I-Molekülen passen.

Die im Zytosol entstandenen Peptide werden anschließend in das Endoplasmatische Retikulum (ER) transloziert. Das dafür verantwortliche Protein, der TAP (Transporter Associated with Antigen Processing), ist ein Heterodimer aus den Untereinheiten TAP1 und TAP2. Es transportiert bevorzugt Peptide einer Länge von 8 bis 16 Aminosäuren in das ER. Auch selektiert der TAP Peptide in begrenztem Maße nach ihrer Aminosäuresequenz (Momburg and Hämmerling, 1998; Shepherd et al., 1993; Trowsdale et al., 1990): Bevorzugte Aminosäuren am N-Terminus in Position 1 sind K, N, R, in Position 2 R und in Position 3 W, Y. C-Terminus werden die Aminosäuren F, L, R, T und V bevorzugt, was zusammen mit den N-terminalen Aminosäurepräferenzen wohl als Peptidvorauswahl für die Präsentation auf MHC- Klasse-I gewertet werden kann.

Daß Peptide, die durch TAP in das ER transportiert wurden, nicht unbedingt unverändert auf MHC-I-Moleküle geladen werden, zeigt sich am Beispiel des HLA-B*5101, dessen Motiv in Position 2 ein Prolin besitzt, aber Peptide mit P in Position 2 selektiv, wie auch D und E in Position 2, nicht von TAP transportiert werden. Es wird spekuliert, daß die Peptide im ER zum Teil noch N-terminal getrimmt werden und so ein Prolin-Anker in Position 2 entstehen kann (Serwold et al., 2002; Stoltze et al., 2000; Uebel et al., 1997).

Das im ER komplexierte MHC-Klasse-I-Molekül ist ohne gebundenes Peptid sehr instabil und wird durch verschiedenen Chaperone wie Calnexin, Calretikulin und Tapasin stabilisiert. Nach der Bindung des Peptids in der Bindungsfurche wird das MHC-I-Molekül von den Chaperonen freigegeben und geht den normalen Weg membranständiger Proteine über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche.

1.3.2 MHC-Klasse-II-Prozessierungsweg

Die Prozessierung der Proteine für den MHC-Klasse-II-Weg findet in Endosomen statt, in die zuvor durch rezeptorvermittelte oder unspezifische Endozytose Proteinantigen aufgenommen wurde. Im Zellinneren sinkt der pH in den Endosomen soweit ab, daß saure Proteasen (Cathepsin B, D, S, L) aktiv werden und aus den aufgenommenen Proteinen Peptide generieren (Nakagawa et al., 1998; Nakagawa et al., 1999).

Die Zusammensetzung des MHC-Klasse-II-Moleküls findet derweil im ER statt, wobei sich hier jeweils drei α - und β -Ketten mit der trimeren invarianten Kette (Ii) zu einem nonameren Komplex zusammenfügen. Über einen speziellen vesikulären Transportweg gelangen die Nonamere nun in die Endosomen (MHC class II compartment (MIIC)), wo ihre invariante Kette proteolytisch soweit gespalten wird, daß nur noch ein, die Peptidbindungsfurche besetzendes Peptid (CLIP) übrigbleibt. Dieses CLIP wird durch das chaperonartige HLA-DM entfernt und die Bindungsfurche wird frei für die, aus exogenem Protein entstanden Peptide (Denzin and Cresswell, 1995). Die Regulation dieses Schrittes scheint dem HLA-DO Molekül zuzukommen, welches das HLA-DM-abhängige Beladen von HLA-Klasse-II Molekülen inhibiert (Kropshofer et al., 1998). Die beladenen MHC-Klasse-II-Moleküle gelangen dann durch Membranfusion des MIIC mit der Plasmamembran an die Zelloberfläche. Nicht beladene MHC-Klasse-II Moleküle besitzen eine sehr geringe Halbwertszeit auf der Zelloberfläche bzw. werden schnell wieder endozytiert.

Der MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Antigenprozessierungsweg laufen nicht völlig unabhängig voneinander ab. So gibt es Hinweise darauf, daß Peptide, die aus extrazellulärem Protein stammen, auch in den MHC-I-Antigenprozessierungsweg gelangen können. Dieses Phänomen nennt man "cross-presentation".

1.4 T-Zellantwort

Alle kernhaltigen Zellen, mit Ausnahme der männlichen Keimzellen, des Körpers exprimieren im Durchschnitt 10^5 - 10^6 MHC-Klasse-I-Moleküle auf ihrer Oberfläche. Spezifische $CD8^+$ -Zellen sind in der Lage diese Peptid-MHC-Komplexe mit ihren T-Zell-Rezeptoren (TCR) zu erkennen und abhängig von ihrem Aktivierungszustand, entsprechend zu reagieren. Handelt es sich um naive, d.h. noch nicht aktivierte, T-Zellen, so werden diese aktiviert, sofern die antigenpräsentierende Zelle Costimulatoren wie z.B. B7.1 bzw. B7.2 coexprimiert. Diese Kostimulatoren binden an CD28 der T-Zelle. Trägt die antigenpräsentierende Zelle keine Costimulatoren auf ihrer Oberfläche, so wird die T-Zelle anergisch bzw. stirbt den apoptotischen Zelltod. Dies ist zusätzlich zu der negativen Selektion der T-Zellen im Thymus ein weiterer Mechanismus um selbstreaktive CTL zu eliminieren. Im Falle des Erkennens von präsentiertem Antigen auf einer Zelle durch einen aktivierten CTL sezerniert dieser die Proteine Perforin und

Granzym. Perforin dringt in die Membran der präsentierenden Zelle ein und polymerisiert dort zu Poren aus, welche zum einen dem Granzym den Eintritt ins Zytosol erleichtern, zum anderen die Eigenschaft der Zellmembran als Diffusionsbarriere beeinträchtigen. Bei den Granzymen handelt es sich um Serin-Proteasen, die im Zellinneren eine Signalkaskade anstoßen, die letzten Endes in der Apoptose der Zelle endet (Shiver et al., 1992). Ebenfalls zur Apoptose führt die Interaktion von Fas und Fas-Ligand zwischen T- und Zielzelle (Fisher et al., 1995; Suda et al., 1993).

Optimalerweise erkennen CTL nach Selektion im Thymus nur MHC-Klasse-I gebundenes Peptid, welches von Fremdprotein und nicht von Selbstprotein stammt. Wird ein Selbstpeptid allerdings nur in sehr geringer Kopienzahl präsentiert, scheint die T-Zell-Selektion nicht mehr optimal zu funktionieren. So ist es möglich, durch Immunisierung eine CTL-Antwort gegen ein Selbstprotein hervorzurufen (Kawakami and Rosenberg, 1996). Weitere potentielle Ziele für CTL sind durch Mutation veränderte oder auch neu exprimierte Proteine, die lediglich in frühen Entwicklungsstadien des Menschen exprimiert werden. Im Falle von Tumorzellen spricht man bei diesen Proteinen von tumorassoziierten Antigenen (TAA), von denen manche direkt oder auch indirekt mit der Tumorigenese in Zusammenhang stehen.

Bei den durch MHC-Klasse-II aktivierten T-Zellen handelt es sich um $CD4^+$ -Zellen, die sich je nach Zytokinsekretion in zwei T-Helferzellpopulationen (Th_1 - und Th_2 -Zellen) unterteilen lassen. Th_1 -Zellen sezernieren vor allem, wenn aktiviert $IFN-\gamma$, Th_2 als wichtigstes Interleukin 4 (IL-4). Die beiden Zelltypen sind nicht nur im Zytokinsekretionsmuster verschieden, sondern unterscheiden sich auch in ihrer Funktion. Die Th_1 -Zellen dienen eher der „inflammatorischen“, zytotoxischen Immunabwehr, indem sie Makrophagen und $CD8^+$ -Zellen aktivieren bzw. stimulieren. Die Th_2 -Zellen stimulieren B-Zellen zur Antikörperproduktion und sind so für die humorale Immunabwehr unersetzlich.

1.5 Tumorantigene

1.5.1 Identifizierung von Tumorantigenen

Tumorzellen exprimieren im Vergleich zu normalen Zellen ein anderes Repertoire an Proteinen. Die Proteine, die sich vom Repertoire normaler Zellen unterscheiden, werden tumor-assoziierte Antigene (TAA) genannt und stellen aufgrund ihrer mehr oder weniger klaren Restriktion auf den Tumor einen selektiven Angriffspunkt für eine Immuntherapie dar. Obwohl ihre Existenz schon seit 1968 bekannt ist (Masuda, 1968), wurde erst Anfang der 90er Jahre des vorigen Jahrhunderts das erste T-Zellepitop eines Tumorantigens identifiziert.

Zur Identifizierung der TAA werden verschiedene Techniken eingesetzt.

a) Die Gruppe um Thierry Boon beispielsweise stellte cDNA-Expressionsbibliotheken aus Tumorzellen her, welche von CTL erkannt wurden. COS-Zellen wurden dann mit Teilen der Tumor cDNA und dem passenden HLA-Gen kotransfiziert. Die cDNA der Zelle, die dann durch die CTL erkannt und lysiert wurde, wurde weiter eingengt, bis am Ende nur noch ein Gen übrig blieb, welches für das Tumorantigen kodierte. Selbst der Sequenzabschnitt auf dem Gen, der für das eigentliche CTL-Epitop kodierte, konnte durch Transfektion von Fragmenten des entsprechenden Gens herausgefunden werden. So wurde als erstes Epitop eines tumorassoziierten Antigens das HLA-A*0101 restringierte Peptid EADPTGHSY aus dem Tumorantigen MAGE-1 identifiziert (Traversari et al., 1992).

b) Werden antigenpräsentierende Zellen mit Proteinantigen inkubiert, so nehmen sie die Proteine auf und präsentieren die durch Antigenprozessierung entstandenen Peptide über MHC-Klasse-II-Moleküle. Mit Hilfe von spezifischen CD4⁺-T-Zellen können dann die T-Zell-aktivierenden Proteine identifiziert werden (Topalian et al., 1994).

c) Der „Reverse Immunologie“-Ansatz macht sich die Möglichkeit zu nutze, mit synthetischen, vorhergesagten, potentiellen T-Zellepitopen CTL zu erzeugen, sei es durch Immunisierung transgener Mäuse oder durch Stimulation von Vorläufer T-Zellen aus Blut von gesunden Spendern. Die generierten CTL werden anschließend auf Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen überprüft (Brossart et al., 1998; Parkhurst et al., 1998). Dieser Ansatz kann auch mit Peptiden durchgeführt werden, die direkt von Tumorzellen eluiert und anschließend chromatographisch aufgetrennt werden. Hier

werden die einzelnen Peptidfraktionen auf APC geladen, die Stimulation von Antitumor-CTL durch die APC gemessen und die Peptide der entsprechenden Fraktion massenspektrometrisch sequenziert (Cox et al., 1994).

Um T-Zellepitope zu identifizieren, ist es notwendig zu testen ob bereits vorhandene T-Zellen das potentielle Epitop erkennen oder nicht. Die dafür eingesetzten Peptide können die ganze Proteinsequenz überlappend abdecken, synthetische Duplikate von Tumorzellen eluierter Peptide oder nach Motiv-Kriterien vorhergesagt sein (Wallny et al., 1992).

1.5.2 Einteilung von Tumorantigenen

Die auf Tumoren exprimierten TAA lassen sich entsprechend ihrer Charakteristika in verschiedene Gruppen einteilen:

Cancer-Testis Antigene

Cancer-Testis Antigene sind Proteine, die selektiv in Tumoren und den Zellen der männlichen Keimbahn exprimiert werden. Die Expression dieser Proteine in männlichen Keimzellen kann unter dem Gesichtspunkt der zellulären Immunabwehr vernachlässigt werden, da diese Zellen keine MHC-Klasse-I-Moleküle exprimieren. Beispiele für diese Gruppe sind Mitglieder der MAGE-, BAGE-, GAGE-, und RAGE-Genfamilie. Über die Funktion dieser Proteine ist nur wenig bekannt.

Differenzierungsantigene

Differenzierungsantigene sind nur in bestimmten Gewebetypen wie auch in den aus ihnen entstandenen Tumorgeweben exprimiert. Im Falle einer Immuntherapie besteht hier daher die Gefahr einer Autoimmunreaktion. Bei der melanozyten- und melanomspezifischen Tyrosinase zum Beispiel werden auch gesunde Melanozyten abgetötet (Topalian et al., 1994), was zu dem Krankheitsbild Vitiligo führen kann.

Überexprimierte oder selektiv in Tumoren exprimierte Antigene

Proteine, die in Tumoren, verglichen mit Normalgeweben, stark überexprimiert oder sogar selektiv exprimiert sind, können als Angriffspunkt für eine Tumorimmunotherapie genutzt werden. Bekannte Beispiele sind hierbei HER2/neu

(Fisk et al., 1995) und das Tumorsupressorprotein p53 (Greenblatt et al., 1994; Soussi et al., 1994).

Mutierte Proteine

Mutieren zelleigene Proteine, so besteht die Möglichkeit, daß es in MHC-I-Peptiden zu Aminosäuresubstitutionen kommt. Dadurch kann ein neues T-Zellepitop entstehen bzw. das Peptid mit einer höheren Affinität an das MHC-I-Molekül oder den TCR binden. Eine höhere Affinität zum MHC mag zur Folge haben, daß das Peptid nun in viel höheren Kopienzahlen auf der Zelloberfläche präsentiert wird. Eine höhere Affinität zum TCR mag eine stärkere Aktivierung der CTL zur Folge haben. Eine bestimmte Punktmutation im CDK4-Gen führt z.B. zur Veränderung einer Ankeraminosäure und dazu, daß das Peptid im Vergleich zum Wildtyp-Peptid noch in einer hundertfach geringeren Konzentration erkannt wird (Wölfel et al., 1995). Das Apoptose-Gen Caspase-8 besitzt ein mutiertes Stop-Codon und produziert ein um 88 Aminosäuren längeres Protein. Aus dem elongierten Anteil wird ein Peptid prozessiert, welches als T-Zellepitop erkannt wird (Mandrizzato et al., 1997).

Onkoproteine viraler Herkunft

Wird virales Genom in Zellen integriert und diese dadurch zu Tumorzellen transformiert, sind auch die Produkte dieser Gene geeignete Angriffspunkte für Immunotherapie. Ein Beispiel ist das Onkoprotein E7 des humanen Papilloma Virus Typ 16 (HPV16), das in den meisten uterinen Zervixtumoren zu finden ist (Ressing et al., 1995).

1.5.3 Expression und Funktion bestimmter TAA

Da in dieser Arbeit insbesondere nach Peptiden der folgenden TAA gesucht wurde, sollen diese hier kurz beschrieben werden.

p53

Physiologischerweise ist das p53-Tumorsuppressorprotein in der Lage, den Zellzyklus in der späten G1-Phase zu unterbrechen und somit ein weiteres Proliferieren von Zellen zu verhindern. In vielen Tumorzellen treten Mutationen des p53-Gens auf, was häufig

zur Inaktivierung seiner Funktion und zu einer längeren Halbwertszeit des Genproduktes führt. Somit ist das mutierte p53 nicht mehr in der Lage, die Zellproliferation zu stoppen, akkumuliert aufgrund der längeren Halbwertszeit im Zytoplasma und ist somit in vielen Tumorzellen überexprimiert.

MUC-1

MUC-1 ist ein Glykoprotein vom Mucin-Typ, welches normalerweise in apikalen Membrananteilen von duktalem epitheliale Zellen vorkommt. Der Hauptteil des Proteins besteht aus Tandem-Repeat-Sequenzen mit einer Länge von 20 Aminosäuren. Diese sich wiederholenden Sequenzen sind reich an Serin und Threonin, die als O-Glykosylierungsstelle dienen können. Das Protein ist stark glykosyliert, wobei die Oligosaccharide einen hohen Anteil an Sialinsäure tragen und dadurch dem Molekül und der Zelloberfläche eine negative Ladung verleihen. Neben seiner Eigenschaft, mit dem Zytoskelett zu interagieren, verleiht ihm die negative Ladung antiadhäsive Eigenschaften, was beim Offenhalten von Lumina und der Adhäsion von Mikroorganismen an Epithelien zum Tragen kommt. Außer in Epithelzellen ist die Expression von MUC-1 auch für Adenokarzinome von Mamma, Ovar, Lunge, Pankreas und des Gastrointestinaltraktes beschrieben (Finn et al., 1995; Gendler et al., 1990).

HER2/neu

Das HER2/neu-Protoonkogen (c-erbB2) ist ein 185 kDa transmembranes Glykoprotein mit Tyrosinkinaseaktivität und einer starken Homologie zum Epidermal Growth Factor Receptor (EGF-R). HER2/neu dimerisiert mit dem EGF-R, um damit dessen Affinität zum Epidermal Growth Factor (EGF), im Vergleich zum EGF-R- oder HER2/neu-Homodimer, um ein Vielfaches zu erhöhen. Genamplifikation und Genüberexpression von HER2/neu wurden für viele Malignome wie Mamma- und Ovarialtumoren (Slamon et al., 1989), Kolonkarzinome (Brossart et al., 1998), Prostata-Adenokarzinome (Kallakury et al., 1998), Zervikalkarzinom (Ndubisi et al., 1997), Magenkarzinom (Ishikawa et al., 1997), kleinzelliges Bronchialkarzinom (Yoshino et al., 1994) und Nierenzellkarzinom (Seliger et al., 2000) beschrieben.

Carcinoembrionales Antigen (CEA)

Der bekannte Tumormarker CEA ist ein 180 kDa membranständiges Glykoprotein, das vor allem in Adenokarzinomen des Verdauungssystems und im fötalen Kolon stark exprimiert wird. Seine Struktur beinhaltet 7 Immunglobulinähnliche Domänen und ist damit zur Superfamilie der Immunglobuline zu zählen. Über die Funktion von CEA ist nur wenig bekannt. Beschrieben ist die Funktion als Zelladhäsions- bzw. Antiadhäsionsmolekül (Benchimol et al., 1989).

MAGE-1, MAGE-3

Die Cancer/Testis-Tumorantigene MAGE-1 und MAGE-3 sind normale Gewebsantigene, deren Expression auf männliche Keimzellen beschränkt ist und dort scheinbar eine wichtige Rolle in der frühen Spermatogenese spielt. Demethylierung induziert die MAGE-Expression. Es wird angenommen, daß es während der Tumorigenese zu genetischen Instabilitäten kommt, welche einen Verlust an DNA-Methylierung nach sich ziehen, was in einer präferentiellen Expression von MAGE-Tumorantigenen resultiert (De Smet et al., 1999). Die (Über-) Expression ist in Tumoren verschiedener histologischer Herkunft beschrieben wie z.B. Nierenzellkarzinom (Yamanaka et al., 1998), Ovarialtumoren (Yamada et al., 1995), maxillären Karzinomzellen (Eura et al., 1995), Blasentumoren (Patard et al., 1995), Magenkarzinomen (Inoue et al., 1995), Mammakarzinomen (Russo et al., 1995), Myelomazellen (Pellat-Deceunynck et al., 2000).

SSX-2

Das SSX-2 (Synovial Sarcoma, X Breakpoint 2; HOM-MEL-40) Protein zählt zu den Cancer/Testis Tumorantigenen und wird außer in den männlichen Keimzellen nur noch in Malignomen und schwach in der Schilddrüse exprimiert. Funktionell ist es in die beim Synovialsarkom beschriebene Chromosomentranslokation t(X;18) involviert (Clark et al., 1994; Crew et al., 1995), was zur Entstehung eines zelltransformierenden Fusionsprotein führt. Seine Expression ist für Melanome, Kolonkarzinome, Leberkarzinome und Mammakarzinome beschrieben (Tureci et al., 1996).

NY-ESO-1

Auch NY-ESO-1 zählt zu den Cancer/Testis-Tumorantigenen. Sein Expressionsmuster gleicht dem der anderen Cancer/Testis-Antigene mit der Ausnahme, daß es auch in uterinem Myometrium detektiert wurde. Über seine Funktion ist noch nicht viel bekannt. Die NY-ESO-1-Expression in Tumorgewebe ist für Melanom, Mamma-, Blasen-, Prostata-, Leber- und Lungentumoren beschrieben (Chen et al., 1997).

PRAME

Die physiologische Funktion des PRAME Tumorantigens und dessen Rolle in der Transformation von Zellen ist weitgehend unbekannt. Es scheint, daß es von dem mit Chronischer Myeloischer Leukämie (CML) assoziierten Fusionsprotein BCR/ABL induziert werden kann. In seinem Expressionsmuster ähnelt PRAME den Tumorantigenen der MAGE-Familie stark. Es wird wie sie nur in Tumorgeweben und in den Testes exprimiert. Ob sich die dortige Expression auf Spermatogonien und Spermatozyten beschränkt, ist bisher noch unklar. Die Expression ist, wie für die MAGE-Familie, für viele Tumoren unterschiedlicher histologischer Herkunft beschrieben, mit dem Unterschied, daß PRAME in einem höheren Anteil der Proben zu detektieren ist (Ikeda et al., 1997).

Telomerase

Die Telomerase ist ein Ribonucleoprotein-Komplex, der aus 3 Hauptbestandteilen aufgebaut ist. a) Die humane „telomerase reverse transcriptase“ (hTERT) besitzt Reverse-Transkriptase-Aktivität (Nakamura et al., 1997) und benutzt einen weiteren Bestandteil der Telomerase, b) die humane Telomerase-RNA (hTR), als Matrize. Die dritte Komponente, c) das „telomerase-associated protein“ (TP1) ist noch wenig charakterisiert und seine genaue Funktion noch unbekannt. Die Aufgabe des Telomerase-Komplexes besteht in stark proliferierenden Zellen darin, die Chromosomentelomere zu verlängern, die während jeder DNA-Replikation verkürzt werden. Die Telomerase verhindert dadurch, daß eine grenzwertige Telomerlänge erreicht wird, bei der eine Apoptose-Signalkaskade ausgelöst wird (Nakamura and Cech, 1998). Dies scheint für Zellen, die physiologischerweise eine hohe Teilungsrate haben, wie z.B. die Basalzellen der Haut, Stammzellen im Knochenmark oder eben

auch Tumorzellen, eine Grundvoraussetzung für deren Überleben bzw. Immortalisierung zu sein. Die Expression der Telomerase ist in Tumoren für einen hohen Prozentsatz verschiedenster histologischer Herkunft beschrieben (Dhaene et al., 2000).

Thymosin β 10

Thymosin β 10 ist der Gruppe der Thymosine zugehörig. Diese wurden zuerst im Kalbsthymus entdeckt und lassen sich in die Klassen α , β und γ einteilen. Mit ihrer Eigenschaft Actin-G zu binden und zurückzuhalten scheinen die Thymosine der β -Gruppe eine Rolle in Zellwachstum, -differenzierung und Embryonalentwicklung zu spielen (Hall et al., 1990; Lin and Morrison-Bogorad, 1990; Lugo et al., 1991). In nicht-neoplastischen Geweben ist Thymosin β 10 nicht anzutreffen, dagegen in einer Vielzahl von Tumoren (Hall, 1991; Santelli et al., 1999; Weterman et al., 1993).

Renal Tumor Antigen-1 (RAGE-1)

Auch RAGE-1 zählt zu den Cancer/Testis-Tumorantigenen. Über seine Funktion ist noch wenig bekannt und seine Expression ist in Nierenzellkarzinomen beschrieben (Neumann et al., 1998).

LAGE-1

LAGE-1, ein Cancer-Testis Tumorantigen, besitzt starke Sequenzhomologie zu NY-ESO-1. Seine Funktion ist unbekannt. Das Expressionsmuster in Normalgeweben gleicht dem von NY-ESO-1. In Tumorgewebe ist seine Expression für Melanome, Sarkome, B-Zell-Lymphome, Kopf- und Hals-Tumoren und Tumoren der Blase, Prostata, Mamma und Lunge beschrieben (Lethe et al., 1998).

SART-1

Das Gen SART-1 kodiert für ein nukleäres Protein mit einer Länge von 800 Aminosäuren (SART800), welches ubiquitär vorkommt, und für ein weiteres cytosolisches, 256 Aminosäuren langes Protein (SART256), das nicht in Normalgewebe, außer den Testes, aber in verschiedenen Tumorgeweben zu detektieren ist. Seine Expression ist für Kopf- und Hals-Tumoren, Ösophaguskarzinome, für

Tumoren der Lunge (Shichijo et al., 1998), für Mammakarzinome (Kawamoto et al., 1999), Hirntumoren (Imaizumi et al., 1999), Kolonkarzinome (Sasatomi et al., 2000), Hepatozelluläre Karzinome (Yutani et al., 2001) und für Nierenzellkarzinome (Shintaku et al., 2000) beschrieben.

p56-lck

Das Protoonkogen p56lck-Tyrosinkinase ist ein Mitglied der scr-Tyrosinkinase Familie, besitzt transformierendes Potential und scheint an der antigen-induzierten Signaltransduktion in Lymphozyten beteiligt zu sein. Seine Expression ist auf lymphoides und Tumorgewebe beschränkt und für Mammakarzinome (Koster et al., 1991), B-Zellymphome (Von Knethen et al., 1997) und Kolonkarzinome (Veillette et al., 1987) beschrieben.

Survivin

Das Antiapoptoseprotein Survivin (BIR5) ist einer Protein-Familie zugehörig, die BIR- (baculovirus iap repeat) Domänen in sich tragen. Diese Proteine sind in der Lage Proteine der Caspase-Familie und damit die Apoptose zu inhibieren (Deveraux and Reed, 1999). Die Expression von Survivin ist nicht streng auf Tumorgewebe beschränkt, sondern auch in Zellen von Kolonkrypten detektierbar (Gianani et al., 2001). In Tumorgewebe ist die Survivinexpression für das hepatozelluläre Karzinom (Ito et al., 2000), Mammakarzinom (Tanaka et al., 2000), Melanom (Grossman et al., 1999), kleinzellige Lungenkarzinom (Monzo et al., 1999), Neuroblastom (Adida et al., 1998), Magenkarzinom (Lu et al., 1998), Kolonkarzinom (Kawasaki et al., 1998) und für Uterustumoren (Saitoh et al., 1999) beschrieben.

WT1

Das Wilms-Tumorsuppressor-Gen (WT1) kodiert für ein nukleäres, DNA- und p53-bindendes Protein mit der Fähigkeit, die Transkription verschiedener Gene entweder zu aktivieren oder zu unterdrücken (Rauscher et al., 1990). Seine Expression wurde in embryonalem Nierengewebe, hämatopoetischen Vorläuferzellen, Wilmstumoren Nierenzellkarzinomen, und Leukämiezellen beobachtet. (Campbell et al., 1998; Coppes et al., 1993; Smith et al., 1998).

Bereits bekannte HLA-A*0201-Liganden bzw. Epitope der oben beschriebenen TAA sind in folgender Tabelle (Tabelle 1.2) aufgelistet:

Tabelle 1.2: Bereits bekannte HLA-A*0201 Liganden bzw. CTL-Epitope

Proteine Liganden	Position	Sequenz	Referenz
MUC1	141-148	APDTRPAP	Apostolopoulos et al. 1997
MUC1	130-138	STAPPAHGV	Apostolopoulos et al. 1997
p53	322-330	PLDGEYFTL	Schirle et al. 2000
CEA	694-702	GVLVGVALI	Schirle et al. 2000
T-Zellepitope			
HER-2/neu	348-356	KIFGSLAFL	Fisk et al. 1995
	950-958	ELVSEFSRM	Fisk et al. 1995
	830-838	VLVKSPNHV	Fisk et al. 1997
	633-641	IISAVVGIL	Peiper et al. 1997
	752-761	VMAGVGSPYV	Lustgarten et al. 1997
	789-797	CLTSTVQLV	Fisk et al. 1997
	689-697	RLLQETELV	Kono et al. 1998
	665-673	VVLGVVFGI	Rongcon et al. 1999
	435-443	ILHNGAYSL	Rongcon et al. 1999
		952-961	YMIMVKCWMI
	5-13	ALCRWGLLL	Rongcon et al. 1999 Kwashima et al. 1998
p53	187-197	GLAPPQHLIRV	Theobald et al. 1997
	261-269	LLGRNSFEV	Theobald et al. 1997
	149-157	STPPPGRV	Yu et al. 1997
NY-ESO-1	157-167	SLLMWITQCFL	Jäger et al. 1998
	157-167	SLLMWITQC	Jäger et al. 1998
	155-163	QLSLLMWIT	Jäger et al. 1998
hTERT	540-548	ILAKFLHWL	Vonderheide et al. 1999
MUC1	950-958	STAPPVHNV	Brossart et al. 1999
	12-20	LLLLTVLTV	Brossart et al. 1999
CEA	571-579	YLSGANLNL	Gsang et al. 1995
	691-699	IMIGVLGVV	Kawashima et al. 1998
WT1	126-134	RMFPNAPYL	Oka et al. 2000
MAGE-3	112-120	KVAELVHFL	Kwashima et al. 1998

1.6 T-Zellepitopvorhersage

Ist das Peptidmotiv für ein bestimmtes HLA-Allel-Produkt bekannt, ist es möglich, mit dieser Kenntnis die Sequenz jedes beliebigen Proteins daraufhin zu untersuchen, ob es Teilsequenzen in sich beherbergt, die mit dem Peptidmotiv übereinstimmen und damit potentiell in der HLA-Bindungsfurche gebunden werden. Wie schon oben erwähnt, gibt es mehrere Voraussetzungen für eine effektive Bindung auf dem MHC. a) Die Länge der Peptide sollte in der Regel 10 Aminosäuren nicht überschreiten und maximal 11 Aminosäuren betragen; b) die Anker- und Hilfsankeraminosäuren sollten so weit wie möglich mit denen des bekannten Motivs übereinstimmen.

Grundsätzlich wird angenommen, daß jede Aminosäure, auch die Nicht-Ankeraminosäuren, einen Beitrag zur Bindung an das MHC-Molekül leistet. Über eine Matrix wird, entsprechend der Größe des Beitrages, jeder Aminosäure ein bestimmter Wert zugeordnet und aus diesen Werten die Bindungswahrscheinlichkeit der einzelnen Peptide berechnet.

Derzeit sind via Internet mehrere Computerprogramme zur T-Zellepitopvorhersage frei verfügbar, von denen vor allem zwei hervorzuheben sind. Zum einen handelt es sich um das „HLA-BIND“-Programm des National Institute of Health (http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/), welches nach Experimenten von K.C. Parker auf der Basis von Bindungseigenschaften synthetischer Peptide (Parker et al., 1994) entwickelt wurde. Ein zweites frei verfügbares Programm ist die SYFPEITHI-Datenbank (www.syfpeithi.de) zur Epitopvorhersage der Gruppe von H.G. Rammensee. Hier basiert die Beurteilung der Bindungseigenschaften der Peptide ausschließlich auf Informationen natürlicher MHC-Liganden (Rammensee et al., 1999). Dieses Programm ist in der Lage, MHC-Klasse-I-Liganden mit solcher Präzision vorherzusagen, daß experimentell identifizierte MHC-Klasse-I-Liganden mit großer Wahrscheinlichkeit den Peptiden entsprechen, die bei der Ligandenvorhersage als die 2% am besten bindende Peptide vorhergesagt wurden.

1.7 Die Karzinome

1.7.1 Das Nierenzellkarzinom

Allgemein

Das Nierenzellkarzinom stellt 3% der Malignome des Menschen und ist mit ca. 90% der häufigste maligne Nierentumor. Die durchschnittliche Inzidenz beträgt für Männer 8,9:100.000 und für Frauen 5:100.000/Jahr, wobei der Häufigkeitsgipfel bei 55-60 Jahren liegt. Als Risikofaktoren gelten unter anderem die chronische Niereninsuffizienz, erworbene zystische Nephropathie (5-10faches Risiko), die von Hippel-Lindau Erkrankung (45%), Familienanamnese (10%) und die tuberöse Sklerose (10%) (Mikuz et al., 1995). Die TNM-Klassifikation ist in Tabelle 1.3 dargestellt.

Tabelle 1.3: TNM-Klassifikation für das Nierenzellkarzinom

T1	< oder = 7 cm, begrenzt auf Niere
T2	> 7 cm, begrenzt auf Niere
T3a	Invasion der Nebenniere oder des perirenal Gewebes innerhalb der Gerota Faszie
T3b	Invasion der Nierenvene oder V. cava unterhalb des Zwerchfells
T3c	Invasion der V. cava oberhalb des Zwerchfells
T4	Invasion jenseits der Gerota Faszie
N1	Solitäre Lymphknotenmetastase
N2	> eine Lymphknotenmetastase
M1	Fernmetastase

Einteilung und genetische Besonderheiten

Die Tumoren der Niere lassen sich nach ihrem Wachstumsmuster in kompakte, tubuläre, papilläre, tubulopapilläre und zystische Tumoren einteilen. Histologisch ist eine weitere Einteilung der Karzinome in klarzellige, chromophile, chromophobe und spindelzellige Tumoren möglich. Dabei fällt beim Vergleich der verschiedenen Subtypen mit deren Zytogenetik auf, daß z.B. klarzellige und chromophile Tumoren eine terminale Deletion am kurzen Arm des Chromosoms 3p13 aufweisen. Rein

papilläre NZK zeigen dagegen überdurchschnittlich häufig eine Trisomie 17 und eine Trisomie oder Tetrasomie 7. Allen NZK ist, mit Ausnahme der Sammelrohrkarzinome (Ductus-Bellini-Karzinome), die Zytokeratinexpression der proximalen Tubuluszellen gemeinsam, was diesen Abschnitt des Nephrons als den Ausgangspunkt der meisten NZK identifiziert hat.

Therapie

Therapie der Wahl und derzeit einzige effektive Therapie stellt die operative Resektion des Tumors dar, wobei in der Regel, bei gesunder Gegenniere, eine radikale Nephrektomie durchgeführt wird. Lediglich bei kranker Gegenniere kann bei kleiner Tumorgöße und peripherer Tumorage eine organerhaltende Tumorsektion mit Sicherheitsabstand durchgeführt werden. Die weiteren Therapiemöglichkeiten sind durch die hohe Resistenz der Nierenzellkarzinome gegenüber Radio-, Chemo- oder Kombinationstherapie sehr begrenzt. So wird derzeit neben oder zusätzlich zur Nephrektomie kein weiteres Therapieschema empfohlen. Lediglich der palliative Einsatz der Strahlentherapie bei z.B. Knochenmetastasen erscheint sinnvoll.

Mit dem Einsatz von Zytokinen (Interferone und Interleukin-2) scheint eine Remissionsrate bei NZK-Patienten von 15% - 20% erreichbar zu sein (Dutcher, 2002).

1.7.2 Das kolorektale Karzinom

Allgemein

Das kolorektale Karzinom stellt weltweit, nach Karzinomen der Lunge und des Magens bei den Männern und Mamma- und Zervixkarzinomen bei Frauen, die dritthäufigste Krebserkrankung dar. 98% der kolorektalen Karzinome sind Adenokarzinome, von denen 90% auf exogene Faktoren (Benzpyrene, fett- und eiweißreiche Ernährung, Alkohol, etc.) und 10% auf hereditäre Faktoren (HNPCC, familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), Lynch-Syndrom, Gardner-Syndrom, Peutz-Jeghers-Syndrom) zurückgeführt werden können. Das lebenslange Risiko, an einem kolorektalen Karzinom zu sterben wird für Männer mit 3,6% und für Frauen mit 3% angegeben (Zielinski und Jakesz, 1999).

Das genetische Konzept des sporadischen kolorektalen Karzinoms

Für die Entstehung von kolorektalen Karzinomen gilt die Adenom-Karzinom-Sequenz (Abbildung 1.2) (Hill et al., 1978) und damit die sogenannte Multistep-Akkumulation von mutierten Genen als gesichert (Vogelstein et al., 1988).

Dabei handelt es sich um eine Hypothese, welche sich auf die Entdeckung verschiedener Genmutationen bzw. Gendelektionen in kolorektalen Adenomen und Karzinomen stützt. Durch die frühe Mutation bzw. den Verlust des APC-Gens (Chromosom 5q21.22) entsteht ein hyperproliferatives Epithel. DNS-Methylierungsstörungen führen zum frühen, k-ras Mutation (Chromosom 12p12.1) zum intermediären und der Verlust des DCC-Gens (18q21.1) zum späten Adenom. Der Verlust des p53-Gens (Chromosom 17p13) bedingt dann den Übergang vom Adenom zum Karzinom. Der Verlust dieser Gene wird auch als Loss of Heterozygosity (LOH bezeichnet).

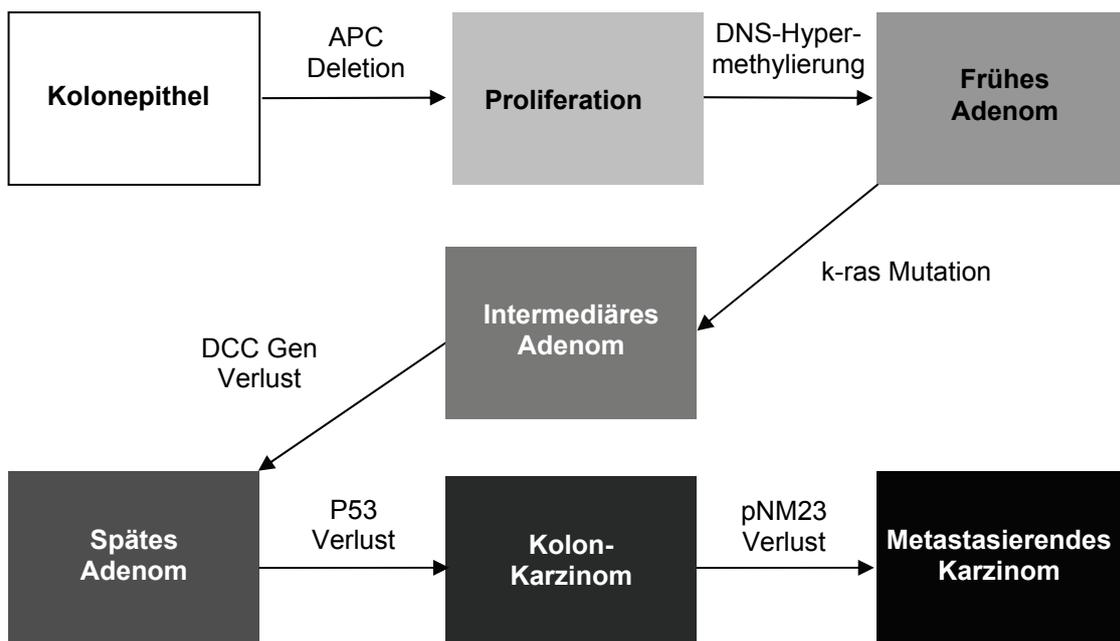


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Adenom-Karzinom-Sequenz kolorektaler Karzinome.

Neben der LOH ist mit der Mikrosatelliteninstabilität (MIN) ein weiterer molekularer Phänotyp der Tumorigenese bekannt. MIN sind Veränderungen in kurzen repetitiven DNS-Sequenzen, die über das ganze Genom verteilt sind. Diese Mikroinstabilitäten sind

auf Mutationen in Mismatch-Reperaturgenen zurückzuführen. Interessanterweise findet man in MIN-Tumoren in der Regel keine LOH von Tumorsuppressorgenen. MIN-Alterationen verursachen dann ihrerseits unter anderem die Expression von tumorigenen Faktoren wie z.B. den Tumorwachstumsfaktor TGF β II. Dadurch kommt es zu einem Wachstumsvorteil und einer erhöhten Mutationsrate der Zelle (Markowitz et al., 1995). Es wird angenommen, daß ungefähr 15% der kolorektalen Karzinome durch diesen Mechanismus entstehen.

Therapie des kolorektalen Karzinoms

Die Methode der Wahl zur Therapie des kolorektalen Karzinoms stellt die chirurgische Resektion des Tumors mit ausreichendem Sicherheitsabstand und Entfernung der proximalen Lymphknoten dar. Trotz initial kurativer Intention kommt es allerdings bei einem nicht unerheblichen Anteil der Patienten, in Abhängigkeit vom Tumorstadium, zu Lokalrezidiven oder Fernmetastasen und damit zu einer hohen Mortalität (Tabelle 1.4).

Tabelle 1.3: TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms

Tis	Carcinoma in situ
T1	Infiltration der Submukosa
T2	Infiltration der Muscularis propria
T3	Infiltration der Subserosa und mehr
T4	Infiltration von Nachbarorganen
N1	1-3 (von 12) perikolische/perirektale Lymphknoten befallen
N2	>3 (von 12) perikolische/perirektale Lymphknoten befallen
M1	Fernmetastasierung

Chemotherapeutisch wird für das Kolonkarzinom adjuvant eine Kombination von 5-Fluorouracil (5-FU) mit Folinsäure (FA) nach dem Mayo-Clinic-Protokoll (Poon et al., 1991) oder dem Roswell-Park/GITSG-Protokoll (Petrelli et al., 1989) empfohlen. Die Indikationen für diese Therapie stellen die Tumorstadien T3 N0 M0 mit Risikofaktor (CEA > 5 ng/ml präop. im Serum, aneuploider DNS-Satz, Siegelring- oder wenig

differenzierter Tumor, 17p- oder 18q- Deletionen), T4 N0 M0 und T1-4 N1-2 M0 dar. Es konnte für Dukes-B2 und -C Patienten gezeigt werden, daß die 5-FU/FA Kombination die Krankheitsfreiheit nach 3 Jahren von 64% auf 77% und das Gesamt-

Tabelle 1.4: Unten: Darstellung der 5-Jahres Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Tumorstadium.

Dukes	T	N	M	5-Jahres-Überleben
A	Tis, T1, T2	N0	M0	90%
B	T3, T4	N0	M0	60 – 80%
C	T1, T2, T3, T4	N1, N2	M0	30 – 60%
D	T1, T2, T3, T4	N1, N2	M1	5%

überleben nach 3 Jahren von 78% auf 83% steigert (O'Connell et al., 1998). Für die alleinige palliative Chemotherapie stehen mit Irinotecan und Oxaliplatin zwei neuere Chemotherapeutika zu Verfügung, die in Kombination mit 5-FU allerdings meist nur in der Lage sind, die Überlebenszeit um einige Monate zu verlängern.

Immuntherapeutisch ist seit wenigen Jahren für das Dukes-C-Stadium der monoklonale Antikörper 17-1A (Edrecolomab) zugelassen. Sein Einsatz senkte in Studien die Gesamtmortalität nach 7 Jahren um 32% und die Rezidivrate um 23% (Riethmüller et al., 1998). Ein weiterer immunologischer, experimenteller Ansatz stellt die Applikation von autologen Tumorzellen mit BCG dar, was in Studien zu einer Rezidivrate von 44% innerhalb von 5,3 Jahren geführt hat (Vermorken et al., 1999). Allerdings ist bei beiden immunologischen Ansätzen gemeinsam, daß bei den Studien zu ihrer Effektivität ein chemotherapeutischer Kontrollarm fehlte.

Beim Rektumkarzinom wird im Gegensatz zum Kolonkarzinom eine neoadjuvante, kombinierte Radiochemotherapie für nicht radikal resektable Tumoren empfohlen, um durch Verkleinerung des Tumors eine radikal-operative Therapie zu ermöglichen. Des Weiteren gilt diese Empfehlung für unvollständig rezidierte Tumoren. So konnte gezeigt werden, daß durch die adjuvante Radiochemotherapie (50 Gy mit 5-FU) die Lokalrezidivrate von 25% auf 13,5% gesenkt werden konnte (Krook et al., 1991).

1.8 Zielsetzung der Doktorarbeit

Das Ziel dieser Doktorarbeit war es, aus humanen Nieren- und kolorektalen Karzinomen MHC-Klasse-I-Liganden zu identifizieren und diese mit Gen-Expressionsdaten der jeweiligen Tumoren und Normalgeweben des zugehörigen Organs und des menschlichen Körpers im Allgemeinen zu vergleichen. Das geschah mit der Absicht potentielle CTL-Epitope verschiedener tumor-assoziiertes Antigene zu finden, welche für den jeweiligen und für zukünftige Tumorpatienten als Tumorstoff eingesetzt werden können.

Daneben galt es, die Technik der MHC-Immünpräzipitation hinsichtlich der Ausbeute an MHC-Klasse-I-gebundenen Peptiden zu optimieren und eine Methode zu etablieren, welche im Verlauf der Immünpräzipitation Auskunft über deren Effektivität gibt.

2. Material und Methoden

2.1 Zellbiologische Methoden

2.1.1 Zelllinien

Tabelle 2.1: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	MHC-Typisierung	Referenz
LCL 721	Humane EBV-transformierte B-Zelllinie	HLA-A*0101 HLA-A*0201 HLA-B*5101 HLA-B*0801 HLA-Cw*0701 HLA-Cw*0102	(Steinle et al, 1994)
B1.23.2	Maushybridom, IgG, anti- α -HLA-B, -C	Nicht relevant	(O'Neil et al., 1984)
BB7.2	Maushybridom, IgG _{2b} , anti- α -HLA-A2	Nicht relevant	(Parham and Brodsky et al., 1981)
W6/32	Maushybridom, IgG _{2a} , anti- α -HLA-A, -B, -C	Nicht relevant	(Barnstable et al., 1978)

2.1.2 Sammeln von Tumorgewebe

Es wurden ausschließlich Adenokarzinome des Magen, des Kolon, des Rektum und Karzinome der Niere verwendet. Direkt nach chirurgischer Resektion wurden Proben von Tumor- und Normalgewebe unter Aufsicht des Pathologen entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Das restliche Gewebe wurde der pathologischen Routinediagnostik zugeführt.

2.1.3 Zellkultur

Die verwendeten Zelllinien wurden in RPMI 1640-Medium, das mit NaHCO_3 (2 g/l), HEPES (2,4 g/l), L-Glutamin (2 $\mu\text{mol/l}$), 2-Mercaptoethanol (50 $\mu\text{mol/l}$), Penicillin (50 U/ml), Streptavidin (50 $\mu\text{g/ml}$) und 10% hitzeinaktiviertem (56°C , 1 h) fötalem Kälberserum versetzt wurde, kultiviert und bei 37°C und 7,5% CO_2 inkubiert.

Um größere Mengen von Zellen zu züchten wurden 2 l Rollerflaschen (Schott, Mainz) verwendet, die bei 37°C und 1,5 Umdrehungen pro Minute (rpm) inkubiert wurden.

2.1.4 Zellernte

Um das für die MHC-Präzipitation notwendige Zellpellet zu erhalten, wurde die Zellsuspension in 500 ml-Zentrifugenbechern gesammelt und bei 1800 rpm (Sorvall RC 5C Plus, Rotor GS-3), 4°C für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit eiskaltem PBS pH 7,2 gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde sofort bei -80°C eingefroren.

2.1.5 Einfrieren, Lagern und Auftauen der Zellen

Um Zellen, die für die Wiederverwendung in Zellkultur gedacht waren, dauerhaft zu lagern, wurden sie in 1 ml Portionen zu 10^6 Zellen /ml in FCS mit 10% DMSO bei -80°C eingefroren und gelagert. Zur Reaktivierung der Zellen wurden diese schnell in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und danach sofort mit Kulturmedium gewaschen, bevor sie in die Kulturflaschen überführt wurden.

2.1.6 Ermittlung der Lebendzellzahl

Um die Lebendzellkonzentration in einer Zellsuspension zu bestimmen, wurden 20 µl der Suspension mit dem gleichen Volumen 0,05% w/v Trypanblau (Gibco) verdünnt. In einer Neubauer Zählkammer wurden dann die nicht gefärbten Zellen in zweimal 16 Kleinquadraten ausgezählt und mit dem Faktor 10^4 multipliziert um, die Zellzahl pro ml zu errechnen.

2.2 Immunologische und biochemische Methoden

2.2.1 Antikörperaufreinigung aus Hybridomüberstand

Die Zellsuspension der Hybridomzellen wurde nach Kultivierung in Rollerflaschen mit 0,02% Natriumazid versetzt und mit Natronlauge auf pH 8 titriert. Die Suspension wurde mindestens 2 Tage ruhig bei 4°C gelagert, um die Sedimentation der Zellen und größeren partikulären Bestandteile zu erlauben. Daraufhin wurde der Überstand zur Entfernung von kleineren Partikeln durch einen 0,2 µm Membranfilter filtriert.

Zur Aufreinigung wurden 0,6 mg Protein A-Sepharose (Protein A-Sepharose CL-4B, Pharmacia) verwendet. Diese wurde unter 15minütigem Schwenken in 5 ml zweifach destilliertem Wasser gequollen. Nach einstündigem Ruhen wurde der Überstand abgenommen, die Sepharose in 5 ml PBS pH 7,2 resuspendiert und auf eine Säule gepackt. Die Protein A-Sepharose Säule wurde nun mit 250 ml PBS pH 7,2 äquilibriert. Zwischen 2 l und 4 l filtrierter Hybridomüberstand wurde pro Aufreinigung auf eine Säule gegeben. Nach Applikation des Hybridomüberstandes wurde die Säule mit 250 ml PBS gewaschen und danach mit 4 ml eines sauren Elutionspuffers (50 mM Zitronensäure, 0,02% Natrium-Azid, pH 3) eluiert. Die ersten 0,5 ml des Eluates wurden verworfen und der Rest in 9 ml Kopplungspuffer (0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3) aufgefangen.

Die Konzentration der Antikörperlösung wurde photometrisch durch die UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt, wobei 1,0 OD_{280nm} 0,7 mg Protein/ml entsprechen.

2.2.2 Subklonierung der Zelllinie BB7.2

Die Zellsuspension der BB7.2-Zellen wurde mit Kulturmedium auf eine Konzentration von 1,5 Zellen pro ml verdünnt. 200 µl dieser Suspension wurden dann in jedes Loch von drei 96-Loch Platten gegeben. Theoretisch bedeutet das 1 Zelle / 3 Löcher. Nach der Aussaat der Zellen wurden alle Löcher mit dem Mikroskop auf ihren Zellgehalt hin überprüft und die ohne oder mit mehr als einer Zelle Inhalt von dem weiteren Prozedere ausgeschlossen. Nach 10 Tagen wurde der Überstand der einzelnen Zellen mittels FACS Analyse auf Antikörpergehalt überprüft.

2.2.3 Durchflußzytometrie

Zellfärbung

Die Anfärbung von Zellen mit Erstantikörper und Flouresceinisothiocyanat (FITC) markiertem Zweitantikörper erfolgte in 96-Loch Platten. 10⁵ Lebendzellen wurden pro Loch in 100 µl ausgesät und abzentrifugiert (1500 rpm, 4°C, 3 min, Heraeus Instruments, Megafuge 1.0R). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet durch sanftes Schütteln resuspendiert. Ein Waschschrift mit 200 µl FACS-Puffer (PBS, 2% FCS, 0,02% NaN₃) pro Loch, Zentrifugation, Überstand Verwerfen und Schütteln

folgte. Die Zellen wurden dann mit je 100 µl des ersten, in FACS-Puffer verdünnten, gereinigten Antikörpers für eine Stunde auf Eis inkubiert und nach anschließender Zentrifugation zweimal gewaschen (s.o.). 100 µl des 1:100 in FACS-Puffer verdünnten und FITC-markierten Zweitantikörpers (Anti-Mouse IgG, Fab) wurden pro Loch zugegeben und die Zellen 1 h auf Eis inkubiert. Drei Waschschriffe schlossen sich an (s.o.). Die Zellen wurden dann in 250 µl FACS-Puffer mit Propidiumjodid (PI) aufgenommen und in PE-Röhrchen überführt.

FACS-Analyse

Das FACS- (Fluorescence Activated Cell Sorter) Gerät (FACSCalibur, Becton-Dickinson) erlaubt es, Zellen nach morphologischen Gesichtspunkten, wie Größe und Granulation, und aufgrund unterschiedlicher Fluoreszenzmarkierung zu unterscheiden, zu zählen und voneinander zu trennen. Die Zellen gelangen einzeln durch eine Nadel in den Strahlengang eines oder mehrerer Laser. Nun kann folgendes geschehen. a) Durch die Ablenkung des Lasers wird die Zelle registriert. Das Ausmaß der Streuung seitwärts zum Strahlengang (side scatter, SSC) gilt dann als Maß für die Granulation der Zelle und die Streuung in Einstrahlrichtung (forward scatter, FSC) gilt als Maß für die Größe der Zelle. b) Fluoreszenzmoleküle auf der Zelloberfläche oder im Zellinneren können durch das Laserlicht angeregt werden und Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Die Intensität und Wellenlänge dieses Lichtes kann gemessen werden.

Im Experiment wurden FITC- und PI-markierte Zellen verwendet. Mittels Dot-Blot-Darstellungsverfahren wurden die Granularität (SSC) und Größe (FSC) jeder Zelle in einem Koordinatensystem festgehalten. Nun war es auf der Basis der SSC- und FSC-Werte möglich, die Zellpopulation auszuwählen, welche lebenden Zellen entspricht. Diese Population wurde weiter auf ihre PI-Färbung hin überprüft. Die Zellen mit einer starken Färbung wurden als tot erachtet und von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Bei den positiv selektierten Zellen wurde dann die FITC-Färbung gemessen und in einem Histogramm dargestellt.

2.2.4 SDS-PAGE

Bei der Natriumdodecylsulfat- (SDS-) Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) werden Proteine durch Zugabe von β -Mercaptoethanol und SDS in ihre Untereinheiten

aufgetrennt und aufgefaltet und erhalten eine ihrer Molekülgröße proportionale negative Ladung. Diese geladenen Proteine werden auf ein Gel aufgetragen und einer Spannung ausgesetzt. In Abhängigkeit ihrer Größe wandern die verschiedenen Proteine nun unterschiedlich schnell in Richtung Anode. Eine Auftrennung von Proteinen eines Gemisches erfolgt. Ein Sammelgel wurde dem Trenngel vorgeschaltet, um die Proteine zu konzentrieren. Für die Herstellung des Trenngel wurden folgende Substanzen miteinander gemischt:

- 4 ml zweifach destilliertes Wasser (dH₂O)
- 2,5 ml Trenngelpuffer (1,5 M Tris-Puffer, pH 8,6)
- 100 µl 10% SDS
- 3,3 ml 30% Acrylamid / 0.8% N, N'-Methylenbisacrylamid
- 50 µl 10% Ammoniumpersulfat (APS)
- 10 µl N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin (TEMED)

Sofort nach der Zugabe des APS und TEMED wurde das Gemisch leicht geschwenkt und zwischen zwei, mit Plastik-Spacern getrennte und abgedichtete, Glasplatten gegossen. Das Gel wurde vorsichtig mit ca. 1 ml dH₂O überschichtet. Die Polymerisierung wurde abgewartet, das Sammelgelgemisch wurde hergestellt

- 4 ml zweifach destilliertes Wasser (dH₂O)
- 2,5 ml Trenngelpuffer (1,5 M Tris-Puffer, pH 8,6)
- 100 µl 10% SDS
- 3,3 ml 30% Acrylamid/ 0.8% N, N'-Methylenbisacrylamid
- 50 µl 10% Ammoniumpersulfat (APS)
- 10 µl N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin (TEMED)

und nach Entfernung des Wassers über dem Trenngel auf dieses aufgetragen. Sofort wurde ein Kamm in das noch flüssige Sammelgel eingebracht und die Polymerisierung abgewartet.

Das Gel wurde in die Elektrophoreseapparatur eingespannt und am oberen und unteren Ende mit SDS-Laufpuffer (0,025 M Tris, 0,19 M Glycin, 0.1% SDS in dH₂O) umspült.

Die Proben wurden 1:1 im Ladebuffer (125 mM Tris pH 6,8, 3,5 % SDS, 20% Glycerol, 10% β -Mercaptoethanol, 0,2% Bromphenolblau) aufgenommen und für 3 min bei 95°C inkubiert, um anschließend auf das Sammelgel aufgetragen zu werden. Ein Strom durch das Gel von 30 mA (Sammelgel) bis 50 mA (Trenngel) wurde durch eine Spannung von 100 V-200 V erreicht und für ca. 1,25 h appliziert. Als Marker für das Molekulargewicht wurde ein Low Molecular Weight Marker (Pharmacia) mit Proteinen für die Massen 94, 67, 43, 30, 20 und 14 kDa benutzt. Es folgte entweder eine Färbung mit Coomassie-Blau oder eine Western-Blot-Analyse des Gels.

2.2.5 Western Blot

Um ein bestimmtes Protein in einer Proteinbande der SDS-PAGE zu identifizieren können die Proteine mittels elektrischer Spannung von einem SDS-Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und dort fixiert werden. Dort kann das Protein dann von einem spezifischen Antikörper erkannt und gebunden werden, welcher wiederum mit einem Merrettich-Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper markiert und durch eine Reaktion der Peroxidase mit Substrat dargestellt werden kann.

8 Whatman Filterpapiere und die Nitrocellulosemembran werden mit Blotpuffer (50 mM Natriumboratpuffer pH 9, 20% Methanol) getränkt. Im Sandwich-Verfahren werden nun von der Anode der Blotapparatur ausgehend 4 Whatman Filterpapiere, Nitrocellulosemembran, Gel und 4 Whatman Filterpapiere geschichtet, die Kathodenplatte aufgesetzt und mit ca. 2 kg beschwert. Bei 60 mA wurde 1 h geblottet. Um das Blotergebnis zu überprüfen, wurde die Membran mit Ponceau S-Lösung (0,2% Ponceau S in 3% Trichloressigsäure) eine Minute lang gefärbt und anschließend mit dH₂O gespült. Die Proteinbanden wurden sichtbar. Um die noch freien Bindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran zu blockieren, wurde die Membran 30 min in Blockpuffer (0,1% w/v Nonidet P-40, 3% BSA w/v, 5 mM EDTA in Tris-gepufferter Saline [TBS]) inkubiert. Anschließend wurde die Membran zusammen mit 5 ml Erstantikörper (LY 5.1, Anti-Human HLA-ABC, Anogen, Yes Biotech Laboratories Ltd.) in einer Verdünnung von 1:1000 in eine Plastiktasche eingeschweißt und 1 h inkubiert. Drei Waschschriffe zu jeweils 5 min mit Waschpuffer (0,1% w/w Nonidet P-40 in TBS) folgten. Die gewaschene Membran wurde nun mit dem Zweitantikörper (Goat anti mouse IgG, HRP-konjugiert) in einer Verdünnung von 1:5000 für eine

Stunde inkubiert. Ein 5minütiges Waschen mit TBS, drei 10minütige Waschschritte mit Waschpuffer und wiederum ein 5minütiges Waschen mit TBS folgten. Nach 3minütiger Inkubation der Membran mit dem HRP-Substrat (Renaissance Westernblot Chemoluminescence Reagent Plus, NEN Life Science Products) wurde die Chemolumineszenz mit einer digitalen Imaging Station (LAS-1000, Fujifilm) detektiert und fotografiert.

2.2.6 Extraktion von MHC-Liganden durch Immunpräzipitation mit CNBr-aktivierter Sepharose

Herstellung der Antikörpersäule

200 mg CNBr-Sepharose (CL-4B, Pharmacia) wurden in 40 ml 1 mM HCl 30 min auf einem Rotator bei Raumtemperatur (RT) gequollen und aktiviert. Danach wurde die Sepharose bei 300 rpm, RT, 2 min ohne Bremse abzentrifugiert und der Überstand verworfen. 5 mg Antikörper wurden in 20 ml Kopplungspuffer aufgenommen, 150 μ l davon einer OD_{280nm}-Messung zugeführt und der Rest mit der Sepharose für 1 h auf dem Rotator inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose erneut abzentrifugiert (s.o.) und wiederum die OD_{280nm} des Überstandes gemessen. Aus dem OD_{280nm}-Quotienten vor und nach Inkubation konnte die Kopplungseffizienz des Antikörpers an die Sepharose ermittelt werden, welche i.d.R. zwischen 90% und 99% lag. Der Überstand wurde verworfen. Die restlichen freien aktivierten Stellen der CNBr-Sepharose wurden durch eine 30minütige Inkubation mit 40 ml 0,1 M Glycinlösung pH 8 blockiert. Die Sepharose wurde dann noch zweimal mit PBS gewaschen und in eine Säule gepackt, die bei einer Flußrate von 0,5 ml/min mit 50 ml Lysispuffer äquilibriert wurde.

Herstellung des Zellysats

Das zu lysierende Zellpellet wurde im noch gefrorenen Zustand mit dem gleichen Volumen Lysispuffer (0,6% CHAPS: 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propansulfonate, 3 Tabletten Proteaseinhibitoren "complete" von Roche pro 200 ml) versetzt und bei 4° C gerührt. Nach Auftauen wurde ein weiteres Volumen Lysispuffer zugesetzt und für 1 h gerührt. Die Suspension wurde zum weiteren Zellaufschluß in einen Dounce Homogenisator überführt. Zehn Stöße mit einem "L"-Kolben (50-70 μ m Spalt) und 20 Stöße mit einem "S"-Kolben (10-30 μ m Spalt) wurden ausgeführt, 1-2

weitere Volumen Lysispuffer zugesetzt und 30 weitere Minuten gerührt. Das entstandene Lysat wurde 20 min bei 4000 rpm, 4° C (Heraeus Instruments, Megafuge 1.0R) zentrifugiert und der Überstand anschließend 1 h bei 40000 rpm, 4° C (Beckman L-80 Ultrazentrifuge, Rotor Ti45) zentrifugiert. Der Überstand wurde sterilfiltriert (0,2 µm) und der Affinitätschromatographie zugeführt.

Herstellung des Tumorlysats

Das tiefgefrorene Tumorpräparat wird mit dem gleichen Volumen 2x Lysispuffer versetzt, in einem Mixer (Laboratory blender, Warring Commercial) ca. 2 min zerkleinert und danach in ein Becherglas überführt. Ein Volumen 1x Lysispuffer wird zugesetzt und 30 min gerührt. Das weitere Prozedere gleicht dem der Zellyse von Zellpellet.

Affinitätschromatographie und Säureextraktion

Das Lysat wurde über Nacht zyklisch mit einer Flußrate von 0,5 ml/min auf die Antikörpersäule aufgetragen. Das gesamte Lysatvolumen passiert die Säule so mindestens viermal. Anschließend wurde die Säule mit 30 ml Lysispuffer, dann mit 30 ml PBS gewaschen und danach trockengepumpt. Die Flußrate blieb bei allen Schritten konstant. Die trockene Sepharose wurde mit ca. 250 µl 0,1% TFA und 10 µl 10% TFA versetzt und unter kräftigem Schütteln 10 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde die TFA-Lösung von der Säule auf eine 10 kDa Zentrikon-Ultrafiltrationsmembran (centricon concentrators 10, Amicon) pipettiert. Dieser Schritt wurde noch zweimal wiederholt und das Zentrikon anschließend bei 4000 rpm, 4° C so lange zentrifugiert, bis die gesamte Flüssigkeit filtriert war. Das Volumen des Filtrats wurde mittels SpeedVac (Vacuum Concentrator; Bachofer, Reutlingen) auf 500 µl reduziert.

Reversed phase-HPLC

Die im Zentrikonfiltrat enthaltenen Peptide wurden durch ein Micorbore-HPLC-System (SMART-System, Pharmacia) aufgetrennt. Es kam dabei eine reversed-phase-Säule (µRP SC C2/C18 2,1/10-Säule, Säulendimensionen 100 x 2,1 mm, Pharmacia) und ein Fraktionensammler im Peak-Fraktionierungsmodus zum Einsatz. Über eine 500 µl

Probenschleife wurde das Zentrikonfiltrat aufgetragen und bei einer Flußrate von 150 µl/min und folgendem Gradienten eluiert:

Tabelle 2.2: Gradient der reversed phase-HPLC zur Auftrennung des Zentrikonfiltrates. Lösungsmittel A: 0,1 % TFA (v/v) in H₂O, Lösungsmittel B: 0,08% TFA (v/v) 80 % Acetonitril/H₂O.

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

2.2.7 Extraktion von MHC-Liganden durch Immunpräzipitation mit Protein A-Sepharose

Herstellung der Protein A-Säule

Die Herstellung der Protein A-Säule gleicht der der Antikörperaufreinigungssäule. Es wurden 0,4 mg Protein A-Sepharose eingesetzt. Nach Packen der Säule wurde diese bei einer Flußrate von 2 ml/min mit 50 ml Lysispuffer äquilibriert.

Affinitätschromatographie und Säureextraktion

Im Gegensatz zur Extraktion mit CNBr-aktivierter Sepharose wurde bei dieser Methode der Antikörper (5 mg) nicht kovalent an die Säule gebunden, sondern 1 h mit dem Lysat unter leichtem Rühren inkubiert. Dies erlaubte die Bildung von Antikörper-MHC-Peptid-Komplexen in der Lösung, die später durch die Protein A-Säule extrahiert wurden.

Das Lysat-Antikörper-Gemisch wurde mit einer Flußrate von 2 ml/min auf die Säule zyklisch (mind. viermal) aufgetragen. Der Durchfluß wurde gesammelt und die Säule mit 100 ml PBS gewaschen, die Säule mit 3 ml Citratpuffer eluiert, die ersten 0,5 ml wurden verworfen und der Rest in einem 5 ml-Röhrchen gesammelt. Die Säule wurde mit 50 ml PBS gewaschen und es wurde noch zwei weitere Male Lysat-Antikörpergemisch aufgetragen und eluiert. Den Eluaten wurden jeweils 25 µl 25%

TFA zugesetzt und 5% für die Edman-Sequenzanalyse entnommen. Die Eluate wurden mit einem 10 kDa Zentrikon ultrafiltriert. 5% des Filtrates wurden der Edman-Sequenzanalyse zugeführt. Das restliche Filtrat wurde noch konzentriert.

Konzentrierung des Zentrikonfiltrats

Das Zentrikonfiltrat wurde auf eine, mit 0,1% TFA-Lösung äquilibrierten, RP-C18-Sequenzersäule (G1017A, Hewlett Packard) an einer Hewlett Packard Sequenzer Probenvorbereitungsstation aufgetragen. Waschen der Säule mit 1 ml 0,1% TFA folgte. Die Säule wurde anschließend mit 100 µl 50% Acetonitril, 0,1% TFA eluiert und das Eluat mit 400 µl 0,1% TFA in H₂O v/v verdünnt. Dieser Schritt dient der Konzentration und der Entsalzung der Probe. 5% des Konzentrats wurden der Edman-Sequenzanalyse zugeführt. Die Peptide wurden anschließend mittels HPLC aufgetrennt oder direkt mittels LC-MS analysiert.

2.3 Analytische Methoden

2.3.1 Massenspektrometrische Methoden

MALDI-TOF Massenspektrometrie

Bei der MALDI- (Matrix-assisted Laser Desorption Ionization) Massenspektrometrie werden die zu analysierenden Moleküle in einer UV-absorbierenden Matrix kokristallisiert. Diese Matrix wird durch einen N₂-Laser mit einer Wellenlänge von 337 nm beschossen und absorbiert dessen Energie. Durch Übertragung der Energie von der Matrix auf die Probenmoleküle werden diese besonders schonend und ohne signifikante Fragmentierung ionisiert. Diese Ionen werden nun durch ein elektrostatisches Feld in Abhängigkeit ihrer Masse in Richtung eines Detektors beschleunigt, wo das eintreffende Ion registriert wird. Die Zeit, welche die Ionen benötigen, um ein feldfreies Hochvakuum ($p = 3 \times 10^{-8}$ mbar) bis zum Detektor zurückzulegen, wird gemessen (Time-Of-Flight, TOF) und ist von der Beschleunigung des Ions und damit von dessen Molekülmasse abhängig. Mit dieser Zeit kann der TOF-Analysator die Ionenmasse/Ladung (m/z) bestimmen, welche dem Quadrat der Flugzeit proportional ist (Karas et al., 1990).

Das hier verwendete Gerät (MALDI-TOF, HP G2025A, Hewlett Packard) besitzt eine lineare Flugbahn ohne Reflektor und "Delayed extraction". Die Auflösung des Gerätes liegt im Bereich von $R=500$ FWHM (Full width at half maximum) und die Sensitivität bei etwa 100 bis 500 femtomol. Der Analysebereich liegt zwischen 0 und 200 000 Da. Bei der verwendeten Matrix handelt es sich um 2,5 Dihydroxyacetophenon (DHAP; 15 mg DHAP, 5 mg Ammoniumcitrat in 200 μl H_2O und 800 μl Isopropanol).

Die Probenvorbereitung erfolgte im "dried droplet"-Verfahren. 0,5 μl der Matrix wurden auf den Probenträger aufgetragen, unter Vakuum getrocknet und anschließend wurden 0,5 μl der Probe aufgetragen und ebenfalls getrocknet. Die Probe wurde in das Massenspektrometer geladen und analysiert. Verschiedene Regionen des Targets wurden mit dem Laser beschossen, wobei mit niedriger Energie begonnen und diese langsam gesteigert wurde.

ESI-Q-TOF-Massenspektrometrie

Die Elektrospray-Ionisierung (ESI) erfolgt dadurch, daß die Analytlösung durch eine Kapillare fließt, an der ein starkes elektrisches Feld (1000-2000 V) angelegt ist. Dies führt zur Dispersion der Lösung in viele kleine geladene Tröpfchen, die dem Druck- und Konzentrationsgradienten folgend durch einen senkrecht zur Flugrichtung stehenden Stickstoffstrom in den Massenanalysator wandern. Durch Lösungsmittelverlust (Desolvation) der Tröpfchen und durch deren weitere Aufteilung (Coulomb-Explosionen) werden die Tröpfchen kleiner, ihre Ladungsdichte steigt. Am Ende dieses Desolvationsprozesses bleibt das, im Tröpfchen enthaltene, lösungsmittelfreie Ion übrig. Zur Erleichterung des Versprühens der Analytlösung wird koaxial an der Kapillare ein sog. Nebulizer Gas entlanggeführt. Charakteristischerweise treten in ESI-Spektren Ionen unterschiedlicher Ladung ein und der gleichen Molekülart auf. Somit können auch höhermolekulare Verbindungen gemessen werden, sofern sie mehrfach geladen sind. Dies zeigt sich dann im Spektrum durch eine Reihe von Signalen, die durch $m/z = (M + n\text{H}^+)/n$ ($n = 1$ bis maximale Ladungszahl) definiert sind. Hier wurde für die Elektrospray-Ionisierung (ESI) die Nanospray-Methode (Wilm and Mann, 1996) verwandt, bei der in eine beschichtete Glaskapillare 0,5-3,0 μl Probe gefüllt wurde. Der Vorteil dieser Methode liegt in den geringen Flußraten von 5-1000 nl/min. Durch den geringen Probenverbrauch ergibt sich eine stark erhöhte Sensitivität.

Bei dem verwendeten Q-TOF-Massenspektrometer (Micromass, Manchester) handelt es sich um ein „Hybrid Quadrupol ToF-Massenspektrometer“ (Abbildung 2.1), welches aus zwei funktionellen Untereinheiten aufgebaut ist. a) Der Quadrupol-Analysator MS1, in den die mit ESI entstandenen Ionen durch eine unabhängig evakuierte Ionenoptik gelangen, dient der Auswahl der Ionen für eine folgende Fragmentierung. Die Fragmentierung findet in einer Hexapol-Kollisionszelle statt, in der die Ionen gegen Moleküle eines inerten Gases (Argon) stoßen und fragmentieren (Tandem-MS-Experiment).

Soll keine Fragmentierung stattfinden, bleibt die Kollisionszelle argonfrei in einem Hochvakuum-Zustand und die Ionen werden unfragmentiert weitergeleitet. Aus der Kollisionszelle heraus werden die Ionen über eine Hexapol-Transferlinse auf einen „Pusher“ gelenkt, der die Ionen mit einer Frequenz von 20 kHz orthogonal auf einen Reflektor ablenkt. Diesem nachgeschaltet befindet sich der Detektor. Dieser Abschnitt des ESI-Q-ToF-Massenspektrometers wird als b) MS2 bezeichnet und stellt die analytische Einheit des Gerätes dar. Hier wird die Flugzeit der Ionen von „Pusher“ bis zum Detektor und damit deren m/z -Wert ermittelt.

Die Auflösung des Gerätes liegt bei etwa $R=5000$ FWHM (Full width at half maximum) und der analytische Bereich zwischen 2 und 4000 Da, wobei aufgrund möglicher Mehrfachladungen auch höhermolekulare Verbindungen detektiert werden können.

Die Steuerung des ESI-Q-Massenspektrometers, die Datenaufnahme und die Datenprozessierung erfolgte mittels der PC-Software MassLynx NT. Sämtliche Q-ToF-MS-Experimente wurden von Markus Schirle, Toni Weinschenk und Claudia Lemmel durchgeführt.

LC-MS-Kopplung

Bei der LC-MS-Analyse wird der ESI-Quelle ein Kapillarsäulen-HPLC-System vorgeschaltet, welches es erlaubt, analog zur konventionellen reversed phase-HPLC Peptidgemische aufzutrennen und diese direkt in das ESI-Q-ToF einzuspritzen. In diesem Falle geschieht dies allerdings mit sehr geringen Flußraten (300 nl/min) und sehr kleinen Probenvolumen (100 – 200 μ l). Dementsprechend klein sind auch die Elutionsvolumen, in denen die einzelnen Peptidfraktionen gelöst sind. Das bringt gegenüber der konventionellen HPLC den Vorteil, daß die Peptide um ein vielfaches

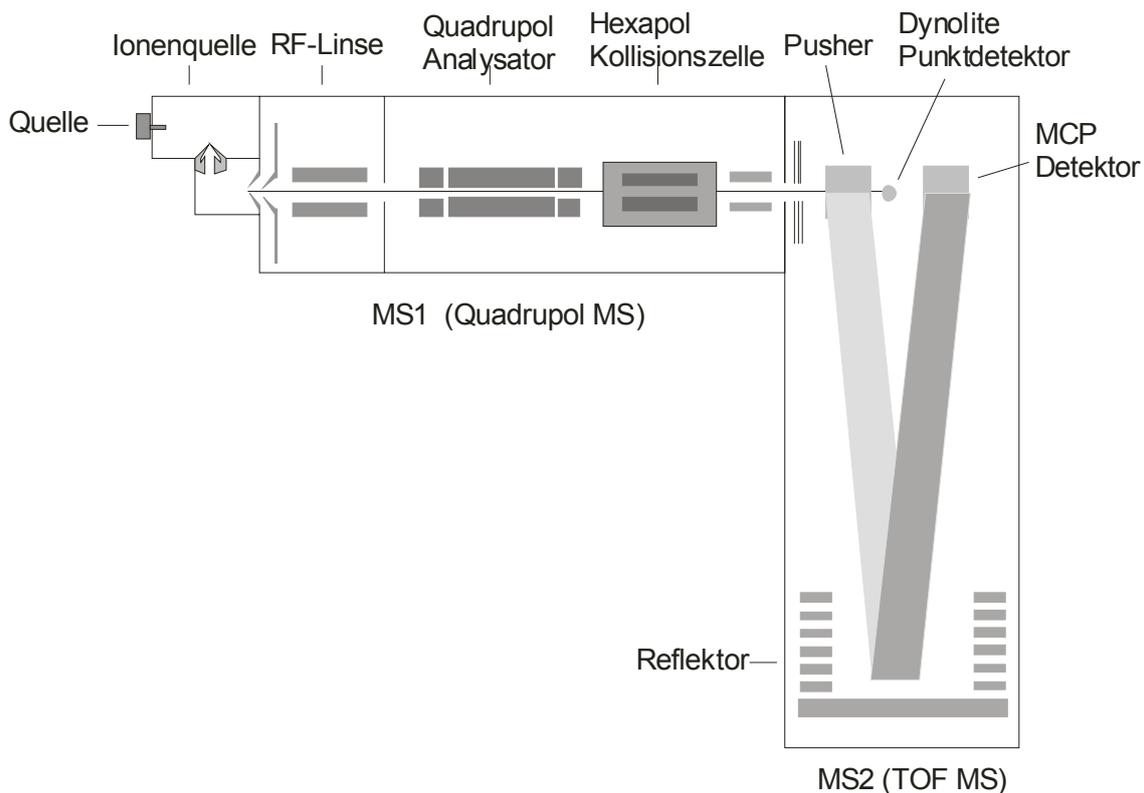


Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau des ESI-Q-TOF Massenspektrometers. (Modifizierte Abbildung aus dem Q-Tof Handbuch der Firma Micromass).

konzentrierter vorliegen als bei der einfachen ESI-Q-Tof Analyse.

Das verwendete HPLC-Pumpensystem (140D Solvent Delivery System, Injector 785A, Applied Biosystems) wurde mit einer Flußrate von 27 $\mu\text{l}/\text{min}$ betrieben. Um einen Fluß von 300 nl/min zu erreichen, wurde der Probenschleife und der Kapillarsäule (Hypersil C18 BDS, 5 μm , Abmessungen: Länge 210 mm, Innendurchmesser 75 μm ; LC Packings) ein T-Stück vorgeschaltet, welches einen Teil des Lösungsmittels auf eine zweite Säule (Grom-Sil 120 ODS-4 HE, 5 μm , Abmessungen: 150 mm x 0,3 mm + 20 mm Vorsäule; Grom, Herrenberg).

Da ein Probenvolumen von 100-300 μl nicht vollständig auf die Kapillarsäule geladen werden konnte, wurde dieses zuerst auf eine C18-gefüllte Kartusche gepumpt (Pumpe: PHD2000 Infusion, Harvard Apparatus). Dies geschah mit einer Flußgeschwindigkeit von 2 $\mu\text{l}/\text{min}$. Die auf der Kartusche gebundenen Peptide wurden dann mittels eines Lösungsmittelgradienten auf das Kapillarsystem eluiert. Nach 30minütiger

Äquilibrierung mit 15% Lösungsmittel B wurde die Elution mit folgendem Gradienten begonnen:

Tabelle 2.2: Gradient für die LC-MS-Kopplung. Lösungsmittel A: 4 mM Ammoniumacetat in H₂O; pH 3 mit Ameisensäure; Lösungsmittel B: 2 mM Ammoniumacetat in 70% Acetonitril; 30% H₂O; pH 3,0 mit Ameisensäure.

Zeit (min)	Konzentration B (%)
0	15
70	60
75	80
78	80
80	15

Predict-Calibrate-Detect-Methode

Bei der Predict-Calibrate-Detect-Methode (PCD) wird vor der Analyse der eigentlichen Probe ein LC-MS Eichlauf mit einer Mischung synthetischer Peptide durchgeführt. Diese Peptide sind bekannte oder vorhergesagte T-Zellepitope von TAA. Dabei wird deren Masse und Retentionszeit während der Analyse festgehalten und später mit den Massen und Retentionszeiten der Peptide in der Tumorprobe verglichen. Stimmen Masse und Retentionszeit eines Tumor-Peptides dann mit Masse und Retentionszeit eines synthetischen Peptids überein, so wird dieses sequenziert und identifiziert. Somit wird in der Tumorprobe nach den Äquivalenten der synthetischen Peptide gesucht. Die in dieser Arbeit verwendeten synthetischen Peptide sind in Tabelle 2.3 dargestellt.

Tabelle 2.3: Aminosäuresequenzen vorhergesagter und bekannter HLA-A*0201 Epitope und Liganden tumorassoziierter Antigene und deren Position in der Proteinsequenz. Fett gedruckt sind die schon bekannten Epitope.

P68	YLLPAIVHI	168-176	SART-1	GLLETTVQKV	649-658
RL19	ILMEHIHKL	137-145		LLNQKLGKI	179-187
2AAA	SLLPAIVEL	403-411		DLAEKRAKL	215-223
CEA	YLSGANLNL	571-579		LLETTVQKV	650-658
	GVLVGVALI	694-702		VLEEDEAEL	489-497
CT7	TLDEKVDEL	907-915	SCP1	VIADAVKL	687-696
	FLAMLKNTV	1087-1095		NLKAELLSV	755-763
	VIWDVLSGI	1018-1026		LLEESRDKV	288-296
	RLILILISI	998-1006		QLKILTMEL	404-412

	SLPEWEDSL	535-543		VLGEKETLL	439-447
HER2	IISAVVGIL	654-662		RMLKQIENL	557-565
	KIFGSLAFL	369-377		QLRNELEYV	571-579
LAGE-1	ILSRDAAPL	112-120		QLNVYEIKV	635-643
	RLLELHITM	86-94		NLLEEVEKA	677-685
P56-Lck	ITFPGLHEL	196-204		ELSNLKAEL	752-760
	KIADFGLARL	378-387	SSX2	RLQGISPKI	103-111
	LLIRNGSEV	35-43		KASEKIFYV	41-49
	QLQHQRVLRL	293-302		QIPEKIQKA	16-24
	GIKLTINKL	332-341		MTFGRLQGI	99-107
	AINYGTFTI	410-418	SSX4	SLQRIFPKI	103-111
	KLLDMAAQI	339-347		STLEKINKT	146-154
	QIAEGMAFI	346-354		MTFGSLQRI	99-107
	RLVRLYAVV	298-306		VMTKLGFKV	57-65
MAGE-1	KVLEYVIKV	278-286		KIVYVYMKL	45-53
MAGE-3	FLWGPRLV	271-279		KLRKAFDDI	20-28
	ALSRKVAEL	108-116	Survivin	ELTLGEFLKL	94-103
MUC1	LLLLTVLTV	12-20		TLPPAWQPFL	5-14
	STAPPVHNV	950-958	Telomerase	ILAKFLHWL	540-548
NY-ESO-1	SISSCLQQL	148-156		LMSVYVVEL	548-556
	TVSGNILTI	127-135	Thymosin β10	EIASFDKAKL	8-17
	FATPMEAEL	96-104		IASFDKAKL	9-17
	LLMWITQCFL	158-167		NLPTKETI	26-34
	MLMAQEALAFI	alt.ORF	ts85	DLIATQRDL	244-252
	RLLEFYLAM	86-94		FLDMSLDDI	25-33
	SLAQDAPPL	108-116		LIVTQRDLV	273-281
	LMWITQCFL	159-167		LIATQRDLIV	266-275
p53	LLGRNSFEV	264-272		IYKELEGT	34-42
	GLAPPQHLIRV	187-197		DLVDTQSDL	237-245
	PLDGEYFTL	322-330	WT1	KVNFLMDSL	22-30
PRAME	YLHARLREL	462-470		RMFPNAPYL	126-134
	SLLQHLIGL	425-433		SLGEQQYSV	187-195
	RLRELLCEL	466-474		DLNALLPAV	7-15
RAGE-1	KLKLSGVVRL	73-82		ALLPAVPSL	10-18
	GTNGRVPVL	97-105		NLGATLKGV	242-250
	RLSSYSSPTL	81-90			

2.3.2 Edman-Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse nach Edman ist ein Verfahren zur Bestimmung von Peptid- und Proteinsequenzen. In einem automatisierten Verfahren werden die drei Schritte Kopplung, Spaltung und Konvertierung zyklisch ausgeführt. Bei der Kupplung bindet Phenylisothiocyanat an die N-terminale Aminosäure unter Bildung des Phenylthiocarbamoyl- (PTC) Addukts. Im folgenden Schritt, der Spaltung, wird durch wasserfreie Trifluoressigsäure selektiv das N-terminale Thiazolinon-Derivat abgespalten. Folgend wird die Anilino-Thiazolinon-Aminosäure mittels eines organischen Lösungsmittels extrahiert und im dritten Schritt in das stabilere Phenylthiohydantoin- (PTH) Derivat konvertiert. Die chromatographische Retentionszeit der PTH-Derivate kann dann mit den Retentionszeiten von

Referenzamino­säuren verglichen und dadurch die abgespaltene Aminosäure identifiziert werden.

Der verwendete automatische Proteinsequenzer („Procise“ 494A Proteinsequencer, ABI) enthält eine spezielle C18-Säule (Spheri-5 PTH 5 µm, 220 x 2,1 mm, Perkin Elmer) zur Identifizierung und Quantifizierung der PTH-Aminosäuren. Die Edman-Sequenzierungen wurden von Melanie Kraft und PD Dr. Stefan Stevanovic durchgeführt.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 HLA-Typisierung

Zur HLA-Typisierung der Patienten wurde 10 ml EDTA-Blut verwendet, aus dessen Zellen die DNA isoliert und diese mit sequenzspezifischen Primern der verschiedenen HLA-A- und -B- Allele amplifiziert wurde. Das Auftreten einer bestimmten Bande bei elektrophoretischer Auftrennung des PCR-Produkts im Vergleich zu einer Kontrollbande zeigt dann, ob der Patient für ein bestimmtes HLA-Allel positiv oder negativ war. Die HLA-Typisierungen wurden im HLA-Labor der Blutbank der Universität Tübingen unter Leitung von Frau PD Dr. med. Dorothee Wernet durchgeführt.

2.4.2 DNA-Mikroarray Gen-Expressionsanalyse

Das Kernstück dieser Technik stellt ein zirka 2 mal 2 cm großer Chip dar, auf den, in räumlich definierten Zellen, tausende von Oligonucleotiden aufgetragen sind. Es handelt sich dabei um möglichst einzigartige Sequenzen von verschiedenen zu analysierenden Genen. Der experimentelle Ablauf folgt der in Abbildung 2.2 dargestellten Sequenz. Die zu analysierende mRNA wird aus Zellen extrahiert und revers in cDNA transkribiert. Danach folgt ein Transkriptionsschritt, bei dem die entstehende RNA gleichzeitig mit Biotin markiert wird. Nun wird die markierte RNA auf den Chip aufgetragen, wo es den komplementären RNA-Strängen möglich ist, mit den entsprechenden Oligonucleotiden auf dem Chip zu hybridisieren. Es folgen Anfärbung der Probe-RNA mit Streptavidin-Phycoerythrin und Waschschr­itte, um die nicht hybridisierte, aber angefärbte RNA vom Chip zu entfernen.

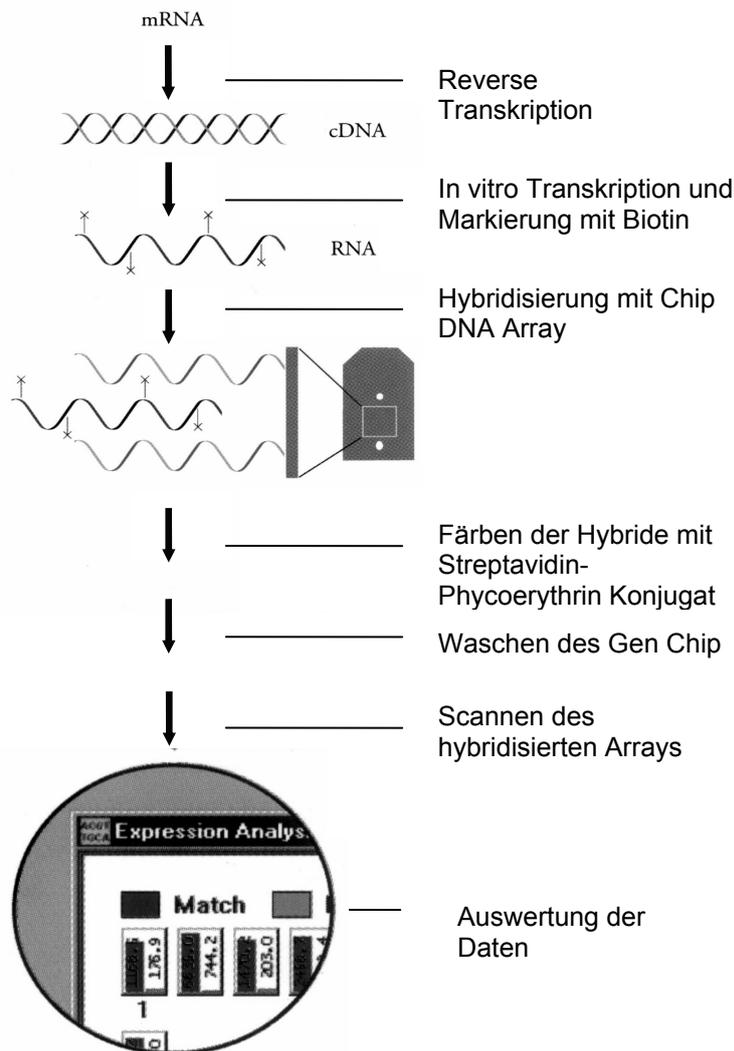


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Expressionsanalyse mit einem DNA Mikroarray Assay (GeneChip). (Modifizierte Abbildung aus GeneChip Expression Analysis, Affymetrix, Inc.)

Der Chip wird nun in einen Scanner (Hewlett-Packard GeneArray™ Scanner) eingelegt, der die Farbintensität in den definierten Zellen erfaßt. Jeder Zelle ist ein bestimmtes Gen zugeordnet und die gemessene Farbintensität in der jeder Zelle korreliert dabei direkt mit der mRNA-Menge in der zu analysierenden Probe. Die Auswertung und Zuordnung dieser Daten erfolgt mit der GeneChip Operating System Software.

Die auf den Chip aufgetragenen Oligonukleotide sind immer in Paaren angeordnet. D.h. ein Paar besteht immer aus zwei benachbarten Zellen. In einer Zelle ist dabei immer die genaue, zu analysierende, Gen-Teilsequenz (perfekt passende Sequenz = perfect match

Oligo), in der anderen eine Sequenz, die bis auf ein Nukleotid dem perfect match Oligo gleich ist (nicht passende Sequenz = mismatch Oligo), aufgetragen. Dies erlaubt, durch die Messung der mismatch Oligo-Felder ein Hintergrund-Niveau festzulegen, welches unspezifische Bindung von RNA darstellt.

Weiterhin sind auf dem Chip mehrere Oligo-Paare von verschiedenen Referenzgenen enthalten. Die Zugabe eines Standard-RNA-Gemisches zur Analysenprobe erlaubt es dann, verschiedene Chips quantitativ miteinander zu vergleichen. Die Gen-Chip-Experimente in dieser Arbeit wurden von Toni Weinschenk durchgeführt.

2.4.3 Gen-Expressionsanalyse mit quantitativer PCR (qPCR)

Entsprechend der konventionellen PCR wird hier ein, durch Primer definierter, DNA-Abschnitt eines Gens in mehreren Amplifikationszyklen exponentiell vermehrt. Im Gegensatz dazu wird hier aber nach jedem Vermehrungszyklus die Menge der DNA in der Probe gemessen. Dazu stehen verschiedene Methoden zur Verfügung von denen die zwei am häufigsten benutzten hier beschrieben sind. a) Die Sybr-Green Methode macht es sich zu Nutze, daß sich der interkalierende Farbstoff Sybr-Green in die Doppelstrang-DNA einlagert und dort nach Anregung eine vielfach höhere Fluoreszenzintensität als das nicht interkalierte Sybr-Green in Lösung emittiert. Das nach einer bestimmten Anzahl von Zyklen meßbare Fluoreszenzsignal ist dann proportional zur gebildeten DNA und läßt Rückschlüsse auf den DNA- bzw. RNA-Gehalt der Ausgangsprobe zu. b) Eine weitere sehr sensitive und spezifische Methode ist das Benutzen von sogenannten Sonden. Eine Sonde ist ein sequenzspezifisches Oligonukleotid, welches mit einem Fluoreszenzfarbstoff und einem „Quenching-Molekül“ markiert ist. Sind diese beiden Moleküle an das Oligonukleotid gebunden, erhält man kein Fluoreszenzsignal, da dieses durch das „Quenching-Molekül“ unterdrückt wird. Die komplementäre Sequenz zur Probe liegt dabei zwischen den Primern. Da die Taq-Polymerase 5'Nukleaseaktivität besitzt, spaltet sie beim Erreichen des 5'Endes der Probe das dort gebundene Quenching-Molekül ab und der Farbstoff emittiert Fluoreszenz definierter Wellenlänge. Die Intensität des Fluoreszenz-Signals ist dabei wieder proportional zur Menge der gebildeten DNA-Stränge. Für die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente wurde die Sybr-Green Methode verwendet. Die Experimente wurden von Toni Weinschenk und Oliver Schoor durchgeführt.

2.4.4 Laser Capture-Mikroskopie

Gefrierschnitte

Von Normal- und Tumorgewebe wurden jeweils Gefrierschnitte mit einer Dicke von 5-7 μm angefertigt. Das bei -80°C gefrorene Präparat wurde mit einem Gewebekleber (Tissue-Tek, Miles Inc.) auf einem Metallträger fixiert und in einem Leica CM 3000 Mikrotom eingespannt. Die Schnitte wurden bei -28°C mit einem Leica 16 cm/c Messer hergestellt und auf Objektträger (Superfrost Objektträger, R.Langensbrinck, Emmendingen) aufgezogen.

Färbeprotokoll

Sofort nach dem Aufziehen der Kryoschnitte auf den Objektträger wurden diese in 70%igem Alkohol für maximal 1 Stunde gelagert. Die Hämatoxylin/Eosin Färbung erfolgte dann nach folgendem Protokoll:

1. Mayers Hämatoxylin	90 s
2. Waschen in bidestilliertem Wasser	<5 s
3. 70% Ethanol	60 s
4. 95% Ethanol	60 s
5. 1% Eosin Y (in 70% Ethanol, + 500 μl Eisessig)	30 s
6. 95% Ethanol	2 min
7. 95% Ethanol	2 min
8. 100% Ethanol	2 min
9. 100% Ethanol p.a.	2 min
11. Xylol	5 min
12. Xylol	5 min
13. Objektträger Lufttrocknen	

Ausschneiden der Zellen

Die Zellen wurden mit einem Laser Capture-Mikroskop der Firma Acturus (Pix Cell II) vom Kryoschnitt ausgeschnitten (Abbildung 2.3). Dabei wird ein so genanntes „Cap“ auf den Schnitt aufgesetzt, welcher an seiner unteren Fläche mit einer thermoplastischen Folie überzogen ist. Nach Anvisieren der Zelle mit einem Licht-Pointer wird die Zelle durch einen Laser-Impuls an der Folie fixiert. Hat man die Zellen der Wahl fixiert, hebt

man das „Cap“ an, und an dessen Unterseite haften dann die Zellen. Danach wird das „Cap“ auf ein Eppendorf Gefäß aufgesteckt, welches Trizol enthält. Durch kräftiges Schütteln lösen sich die Zellen im Trizol auf.

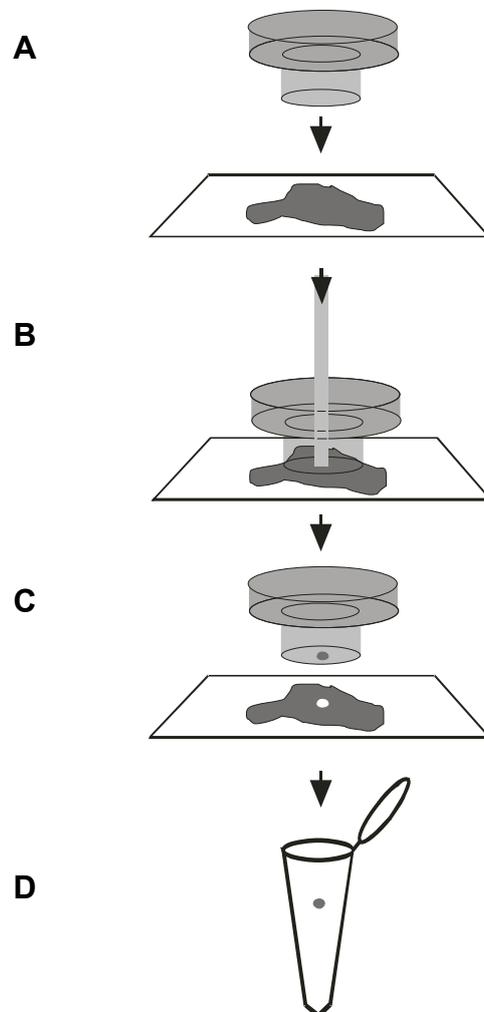


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung Laser Capture-Mikroskopie. A: Aufsetzen des „Cap“ auf den gefärbten Kryoschnitt. B: Anheften einer anvisierten Zelle durch den Laser an den thermoplastischen Film an der Unterfläche des „Cap“. C: Abheben des „Cap“ vom Objektträger und Überführung der ausgeschnittenen Zellen in ein mit 400 μ l Trizol gefülltes Gefäß (D).

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zu den Antikörpern

3.1.1 Untersuchung des HLA-ABC-spezifischen Antikörpers W6/32 und des HLA-A*0201-spezifischen Antikörpers BB7.2 im FACS-Assay

Diese FACS-Analyse der Antikörper wurde durchgeführt, um den aufgereinigten Überstand der jeweiligen Hybridomzellen auf Antikörpergehalt und Antikörperspezifität zu überprüfen. Hierzu wurden LCL 721-Zellen (HLA-A*0101, A*0201, B*5101, B*0801) benutzt, die mit den aufgereinigten Antikörpern der Hybridomüberstände in unterschiedlichen Verdünnungen angefärbt wurden. Die zur Immunpräzipitation benutzten Antikörper ergaben im FACS-Assay bei einer Antikörperkonzentration von 5 µg/ml eine mittlere Fluoreszenzintensität von 1000 bis 1500 (Abbildung 3.1).

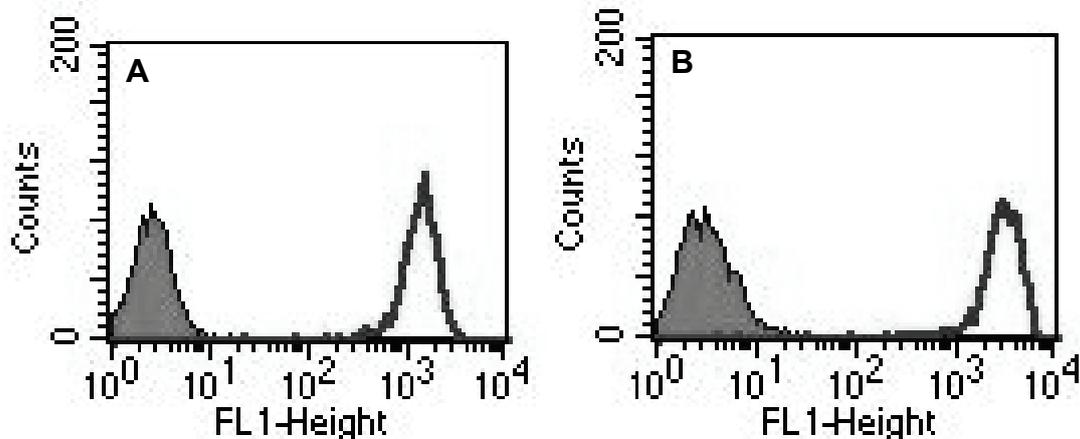


Abbildung 3.1: Test der monoklonalen Antikörper BB7.2 (A) und W6/32 (B) auf LCL 721-Zellen; Antikörperkonzentration 0,5 µl/100 µl auf 10^5 Zellen.

3.1.2 Subklonierung von BB7.2-Hybridomzellen

Aufgrund geringer Ausbeute bei der Antikörperproduktion mit der Hybridomzelllinie BB7.2 wurde versucht, durch Subklonierung Klone zu selektieren, welche eine höhere Antikörperproduktivität aufwiesen. Eine BB7.2-Zellsuspension wurde verdünnt und so in 96-Loch-Platten verteilt, daß jedes Loch nur eine Zelle enthielt. Nach mehreren Teilungsschritten der einzelnen Subklone wurde deren Überstand mittels FACS-

Analyse auf Antikörpergehalt überprüft. Dabei fiel auf, daß ca. 25% der getesteten Klone anscheinend ihre Fähigkeit verloren hatten Antikörper zu produzieren und deren Überstand nicht in der Lage war, LCL 721-Zellen in der FACS-Analyse anzufärben (Abbildung 3.2).

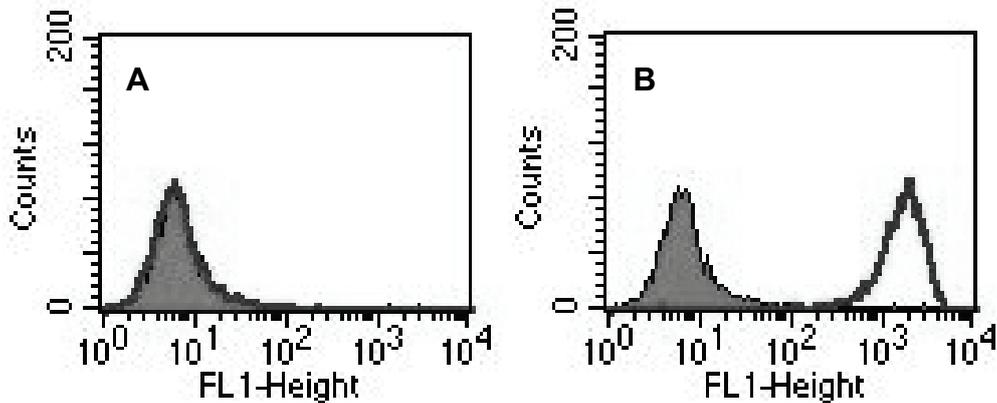


Abbildung 3.2: Beispiele vom Testen subklonierter Hybridomüberstände des Antikörpers BB7.2: A: Klon produziert keine Antikörper; B: Klon produziert BB7.2 Antikörper.

Von den im FACS positiv getesteten Klonen wurden fünf so expandiert, daß eine Menge von ca. 1 l Hybridomüberstand je Klon aufgereinigt werden konnte. Weder die photometrische noch die FACS-Analyse dieser Überstände ergaben eine höhere Antikörperproduktion oder eine höhere Spezifität der subklonierten Antikörper im Vergleich mit dem der nicht subklonierten (Abbildung 3.3).

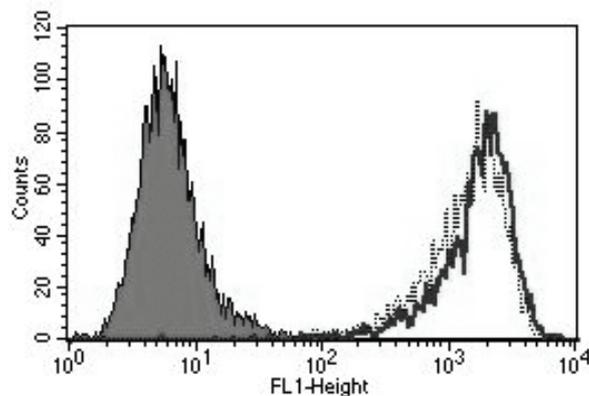


Abbildung 3.3: Vergleich des aufgereinigten Hybridomüberstandes des BB7.2 Subklons 9.2 (durchgehende Linie) mit dem nicht subklonierter Hybridomzellen (gestrichelte Linie) bei einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$.

3.2 Vergleich der CNBr-Methode mit der Protein A-Methode bei der MHC-Klasse-I-Immunpräzipitation

3.2.1 MHC-Immunpräzipitation von LCL 721-Zellen mit der CNBr-Methode

Bei dieser Methode wurden ca. 5 mg Antikörper kovalent an 200 mg aktivierte CNBr-Sepharose gebunden und dann auf eine Säule geladen. Es wurden jeweils eine Säule für den HLA-ABC-spezifischen monoklonalen Antikörper W6/32 und den HLA-A*0201-spezifischen Antikörper BB7.2 hergestellt. Die Kopplungseffizienz wurde photometrisch bestimmt und betrug in beiden Fällen mehr als 95%. Zur Analyse wurden 25 ml Zellpellet der Zelllinie LCL 721 verwendet, welche die HLA-Allele A*0101, A*0201, B*5101, B*0801 exprimiert. Lysiert, ultrazentrifugiert und filtriert wurde das Zellysat dann zuerst durch die BB7.2-Säule präzipitiert, um die HLA-A*0201-Molekülkomplexe zu isolieren. Danach kam die W6/32-Säule zum Einsatz, um die restlichen HLA-Klasse-I-Molekülkomplexe zu extrahieren. Das Eluat der einzelnen Säulen wurde nach Ultrafiltration mittels reversed phase-HPLC und Edman-Sequenzierung auf ihren Gehalt an MHC-Liganden untersucht und mit den Daten der Protein-A-Methode verglichen (siehe unten). Da MHC-Klasse-I-Liganden der LCL 721-Zellen früher schon ausgiebig analysiert wurden, ist hier darauf verzichtet worden, einzelne MHC-Liganden zu identifizieren.

3.2.2 MHC-Immunpräzipitation von LCL 721-Zellen mit der Protein A-Methode

Im Gegensatz zur CNBr-Methode werden die Antikörper hier nicht kovalent an die Sepharose gebunden, sondern das Zellysat mit 5 mg des jeweiligen Antikörpers gemischt und durch eine Säule mit 400 mg Protein-A Sepharose aufgereinigt. Verwendet wurden hier wieder 25 ml Zellpellet der LCL 721-Zellen und die Antikörper BB7.2 und W6/32. Zuerst wurde das BB7.2-Zellysat-Gemisch mit der Protein-A Säule aufgereinigt, wobei das gleiche Gemisch dreimal auf die Säule aufgetragen und dazwischen jeweils eluiert wurde, um sicher zu gehen, alle Antikörper-MHC-Komplexe extrahiert zu haben. Das Lysat wurde dann mit W6/32 versetzt und entsprechend den vorherigen Schritten behandelt. Vor Ultrafiltration wurden nun 5% des jeweiligen Eluats mittels Edman-Sequenzierung auf Antikörper- und MHC Klasse I- Gehalt hin überprüft. Deutlich zu erkennen sind dabei die Aminosäuren des N-terminalen Endes

der κ -Antikörperkette (SIVMT für W6/32), des β_2 -Mikroglobulin (IQRTP) und der schweren MHC-Klasse-I-Kette (GSHSM) (Tabelle 3.2). Nach Ultrafiltration wurden die ersten Eluate der beiden Antikörper wie die Proben der CNBr-Methode behandelt und mit diesen verglichen (Abbildung 3.4 und Tabelle 3.1).

Hierbei wurde bei der Edman-Sequenzierung ein fast vierfach höherer Wert für die Ankeraminsäuren P₂ und A₂ des HLA-B*5101 bei der Protein A-Methode mit W6/32 im Vergleich mit der CNBr-Methode beobachtet. Im HPLC-Chromatogramm verlaufen die Kurven für die Protein A-aufgereinigten Peptide insgesamt höher und zeigen mehr und höhere Peaks im Zeitraum zwischen 30 min und 50 min, wo in der Regel die MHC-Klasse-I-Peptide eluiert werden. Auch das weist auf einen höheren Peptidgehalt hin.

Tabelle 3.1: Poolsequenzierungsdaten von MHC-immunpräzipitierten Peptiden, die (A) mit der CNBr-Methode und (B) mit der Protein A-Methode gewonnen wurden. Angegeben sind die Mengen der PTH-Aminosäuren in pmol. Die Präzipitation wurde mit dem monoklonalen Antikörper W6/32 durchgeführt. Die grau unterlegten Werte für die Aminosäuren A, G und P in Position 2 stellen die Ankeraminosäuren für das HLA-Allel B*5101 dar. Die Aminosäuren H und W wurden nicht dargestellt, da sich bei ihnen keine Veränderung ergab.

A: MHC-Immunpräzipitation mit Protein-A Methode

	A	D	E	F	G	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	Y
1	57.7	287.6	36.1	51.4	79.4	98.8	13.2	140.2	93.8	63.0	18.4	6.6	9.5	64.8	77.0	114.6	133.3
2	380.6	69.1	15.6	14.8	138.5	45.3	5.0	67.7	17.3	12.2	368.1	6.8	8.5	42.4	24.1	47.2	16.6
3	96.0	41.3	27.1	89.0	60.0	48.8	9.9	78.2	29.7	25.1	264.3	8.0	15.6	20.0	22.5	49.6	212.9
4	68.5	60.9	99.3	24.9	82.7	72.5	47.0	94.8	22.4	45.8	134.6	24.0	24.1	41.2	36.2	60.5	58.1

B: MHC-Immunpräzipitation mit CnBr Methode

	A	D	E	F	G	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	Y
1	69.7	38.9	21.3	31.8	80.7	53.2	16.9	54.7	31.5	25.9	18.4	7.5	15.0	74.5	49.5	61.0	56.6
2	116.8	34.8	12.7	6.9	74.8	22.9	3.5	76.3	12.0	7.5	97.2	7.3	9.8	35.9	17.2	22.5	9.9
3	37.3	23.5	13.8	29.3	41.0	21.4	2.9	40.7	12.9	10.3	72.3	8.1	10.8	21.6	13.2	19.7	62.1
4	25.2	34.5	41.5	9.7	46.5	22.4	10.0	31.1	7.0	16.6	43.7	13.3	13.6	19.9	14.8	20.1	18.9

Tabelle 3.2: Edman-Sequenzdaten des 1. Eluats der MHC-Immunitätspräzipitation von 25ml LCL-Zellen mit dem Antikörper W6/32. Grau unterlegt sind die Aminosäuren, welche die N-terminale Sequenz der κ -Kette des W6/32 (SIVMT) darstellen, unterstrichen die des β_2 -Mikroglobulin (IQRTP) und fett gedruckt die der schweren Kette des MHC-Moleküls (α) (GSHSM). Die Aminosäure W wurde weggelassen, da die Detektion gleich blieb.

	A	D	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	Y
1	153.9	344.3	59.7	627.4	33.9	<u>1311.4</u>	0.0	184.2	162.1	62.8	83.0	39.4	61.6	715.3	86.1	128.0	179.1
2	311.7	159.1	96.3	204.1	36.7	1499.1	0.0	179.7	38.7	47.7	341.3	<u>656.0</u>	92.9	346.5	122.0	179.6	101.2
3	231.0	177.3	176.4	169.0	250.2	485.4	94.2	239.1	54.0	69.4	397.4	271.9	<u>587.0</u>	219.3	174.0	1025.1	214.5
4	233.7	176.0	170.5	213.6	200.1	322.8	178.1	306.4	809.2	92.4	363.5	191.1	424.6	309.4	509.9	552.2	166.0
5	270.6	184.3	199.6	239.4	154.0	285.4	221.4	353.7	509.3	111.2	<u>615.3</u>	180.5	386.0	236.9	634.4	456.4	188.3

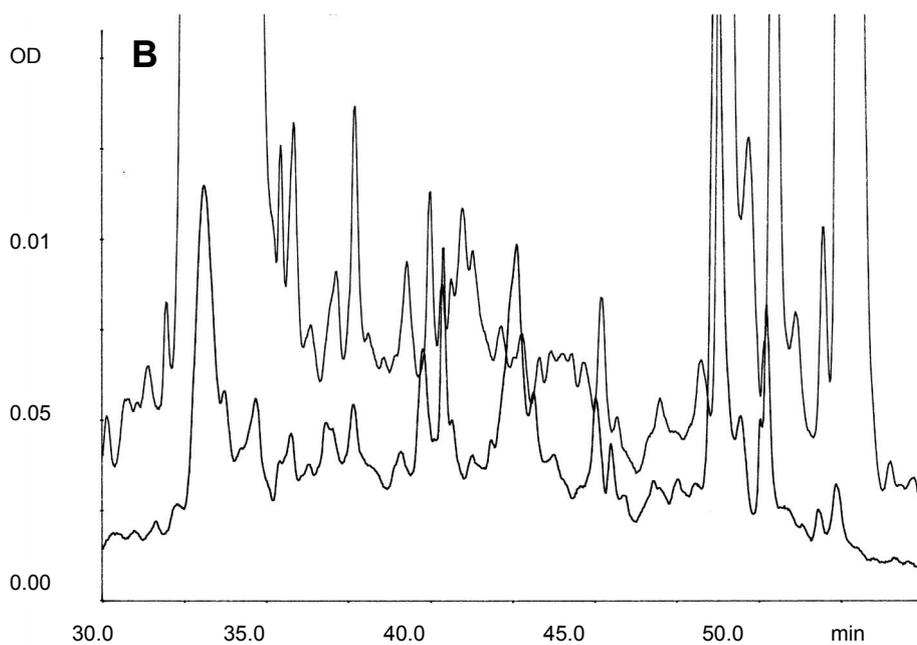
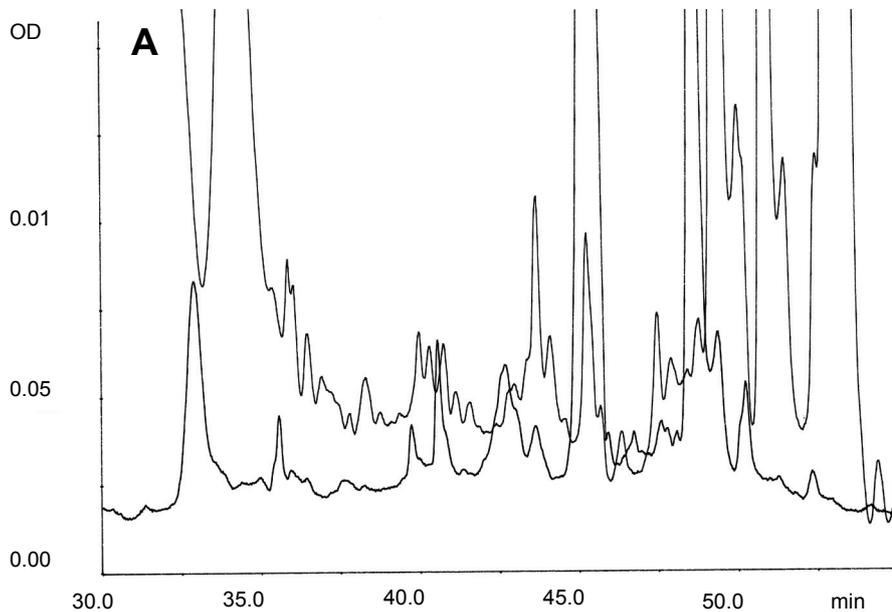


Abbildung 3.4: HPLC-Chromatogramme von Peptidpools der MHC-Immunpräzipitation der Zelllinie LCL 721 mit den Antikörpern BB7.2 (A) und W6/32 (B). Dargestellt ist jeweils der Zeitraum, in dem die Peptide typischerweise von der Chromatographiesäule eluiert werden. Im Vergleich sind hier jeweils die Immunpräzipitation nach der CNBr-Methode (untere Kurve in den Chromatogrammen) und die Protein A-Methode (obere Kurve in den Chromatogrammen) dargestellt.

Die Lysat-AK Gemische wurden bei der Protein-A Methode wurden für die beiden Antikörper jeweils dreimal über die Säule aufgereinigt und dazwischen eluiert. Die Menge an β_2m , α -Kette des MHC und κ -Kette der Antikörper wurden dabei in den drei Eluaten durch Edman-Sequenzierung bestimmt (Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3: Darstellung der Menge des β_2m , der α -Kette des MHC und der κ -Kette der Antikörper in drei aufeinander folgenden Aufreinigungsschritten eines LCL-Lysates. Volumen der Eluate war jeweils 2 ml.

Eluat	BB7.2			W6/32		
	β_2m	α - MHC	κ - AK	β_2m	α - MHC	κ - AK
1	9,3 nmol	5 nmol	13 nmol	18 nmol	13 nmol	29 nmol
2	5,2 nmol	1,8 nmol	6,5 nmol	1,5 nmol	0,78 nmol	2,6 nmol
3	0,65 nmol	0,26 nmol	0,78 nmol	-	-	-

Dabei zeigt sich, daß im zweiten Eluat von BB7.2 noch ca. 35% der schweren Kette des MHC und in dem dritten Eluat noch ca. 5% der Menge im ersten Eluat zu detektieren waren. Für den Antikörper W6/32 ergibt sich ein anderes Bild. Hier sind im zweiten Eluat nur noch 6% der Menge von schwerer MHC Kette im ersten Eluat zu finden. Die Menge von β_2m und κ -Kette der Antikörper in den Eluaten zwei und drei sind ungefähr im gleichen Maßstab verringert, wie das für die α -Kette des MHC-Klasse-I der Fall ist.

3.3 Die Tumoren

3.3.1 Gesammelte Tumoren

Die während der Doktorarbeit gesammelten Tumoren sind in Tabelle 3.4 und 3.5 aufgeführt. Insgesamt wurden 12 der Tumoren zur HLA-Klasse-I-Identifikation MHC-Immunpräzipitiert. Davon wurde in 6 der Proben (NZK08, NZK09, NZK10, NZK13, NZK26, CCA75) massenspektrometrisch nach HLA-Klasse-I-Liganden gesucht, wobei die Suche lediglich im Falle der Tumoren NZK13, NZK08, CCA69 und CCA75 erfolgreich war. Vier der Proben (CCA64, CCA79, MaCa29, NZK09) wurden wegen zu geringem Peptid- und MHC-Gehalt nach Edman-Abbau und HPLC von der weiteren

Analyse ausgeschlossen. Die Analyse der Tumoren CCA65, CCA77, NZK 10, NZK11, NZK26 stehen noch aus.

Tabelle 3.4: Liste der während der Doktorarbeit gesammelten Nierenzellkarzinome (NZK), pTNM-Klassifikation, histologisches Grading, HLA-Typisierung. Bearbeitete Tumoren sind fett gedruckt. Für die mit – markierten Felder liegen keine Daten vor.

Tumor	T	N	M	Grading	HLA-Typisierung			
NZK01	T3b	Nx	M0	G2	A*02	A*68	B*18	B*44
NZK02	T3a	N2	M1	G2	A*01	A*32x	-	-
NZK03	T3b	N1	M1	G2/3	-	-	-	-
NZK04	T3b	N1	M1	G2	A*03	A*11	B*07	B*44
NZK05	T1	Nx	M0	G2	A*01	A*02	B*07	B*08
NZK06	T3b	N0	M0	G1	A*02	A*Xx	B*18	B*56
NZK07	T1	Nx	M1	G2	A*03	A*29	B*07	B*08
NZK08	T3b	N0	M1	G2	A*02	A*33	B*14	B*38
NZK09	T1	N0	M0	G2	A*02	A*32	-	-
NZK10	T3b	Nx	M0	G2	A*02	A*03	-	-
NZK11	T2	Nx	M0	G2	A*02	-	-	-
NZK12	T1	Nx	M0	G1	A*02	-	-	-
NZK13	T2	Nx	M0	G3	A*02	A*24	B*07	B*40
NZK14	T1	Nx	M0	G2	A*03	-	-	-
NZK15	T2	Nx	M0	G2	-	-	-	-
NZK16	T3b	N1	M0	G3	A*03	A*11	-	-
NZK17	T4	N2	M1	G2/3	A*02	A*11	-	-
NZK18	T1	Nx	M0	G2	A*02	-	-	-
NZK19	T4	N2	M1	-	A*03	-	-	-
NZK20	T3a	Nx	M0	G2	-	-	-	-
NZK21	T1	Nx	M0	G2	A*01	A*03	B*08	B*51
NZK22	T1	Nx	M1	G2	A*23	A*68	B*15	B*49
NZK23	T2	Nx	M0	G2	A*01	A*02	B*35	B*57
NZK24	T1	Nx	M0	G1/2	A*02	A*03	B*07	B*x
NZK25	T3b	Nx	M0	G2	A*01	A*	B*07	B*08
NZK26	T3b	N2	M1	G2	A*02	A*31	B*18	B*
NZK27	T1	Nx	M0	G1/2	-	-	-	-
NZK28	T4	N2	M1	G3	A*01	A*29	B*08	B*58
NZK29	T1	Nx	M0	G2	A*24	A*29	B*44	B*63
NZK30	T2	Nx	M0	G2	-	-	-	-
NZK31	T3b	N0	M1	G2	-	-	-	-
NZK32	Metastase Hypopharynxkarzinom				-	-	-	-
NZK33	T1	N0	M1	G1/2	-	-	-	-

Tabelle 3.5: Liste der während der Doktorarbeit gesammelten Kolonkarzinome und Magenkarzinome mit TNM-Klassifizierung, histologischem Grading, Lokalisation und HLA-Typisierung. Für die mit – markierten Felder liegen keine Daten vor. Bearbeitete Tumoren sind fett gedruckt.

Tumor	T	N	M	Grading	Lokalisation	HLA-Typisierung			
CCA64	T3	N2	M0	G3	Rektum	A*31	A*68	B*18	B*15
CCA65	T4	N0	M0	G2	Sigma	A*02	A*26	B*14	B*14
CCA66	Rezidiv-Sigmakarzinom, Niere					A*02	A*26	B*45	B*07
CCA67	T2	N0	M0	G2	Rektum	A*02	A*32	B*35	B*51
CCA68	T3	N0	M0	G2	Coecum	A*24	A*68	B*14	B*35
CCA69	T2	N0	M0	G2	Kolon asc.	A*03	A*24	B*39	B*13
CCA70	T3	N0	M0	G3	Kolon desc.	-	-	-	-
CCA71	T3	N0	M0	G2	Rektum	A*02	A*24	B*44	B*35
CCA72	T2	N0	M0	G2/3	Rektum	A*02	A*30	B*53	B*38
CCA73	T2	N1	Mx	G3	Magen	A*01	A*03	B*57	B*07
CCA74	T3	N2	M0	G2	Sigma	A*02	A*11	B*44	B*07
CCA75	T3	N0	M0	G2	Sigma	A*02	A*24	B*44	B*15
CCA76	T2	N0	Mx	G2	Rektum	-	-	-	-
CCA77	T3	N0	Mx	G2	Kolon asc.	A*02	A*69	B*35	B*07
CCA79	T3	N0	Mx	G3	Kolon asc.	A*02	A*03	B*27	B*40
MaCa29	T3	N2	Mx	G3	Magen	A*30	A*68	B*15	B*41
MaCa30	T3	N1	Mx	G3	Magen	A*02	A*03	B*44	B*51
MaCa31	T1	N0	M0	G1	Magen	A*11	A*	B*07	B*35

3.3.2 Das Nierenzellkarzinom NZK13 – MHC-Klasse-I-Liganden und Gen-Expression

3.3.2.1 MHC-Immunpräzipitation von NZK13 mit dem Antikörper W6/32

Das Nierenzellkarzinom NZK13 wurde mit der CNBr-Methode und den Antikörpern BB7.2 und nachfolgend W6/32 aufgearbeitet. Das Eluat der W6/32-Antikörpersäule wurde nach Filtration mittels HPLC aufgetrennt (Abbildung 3.5).

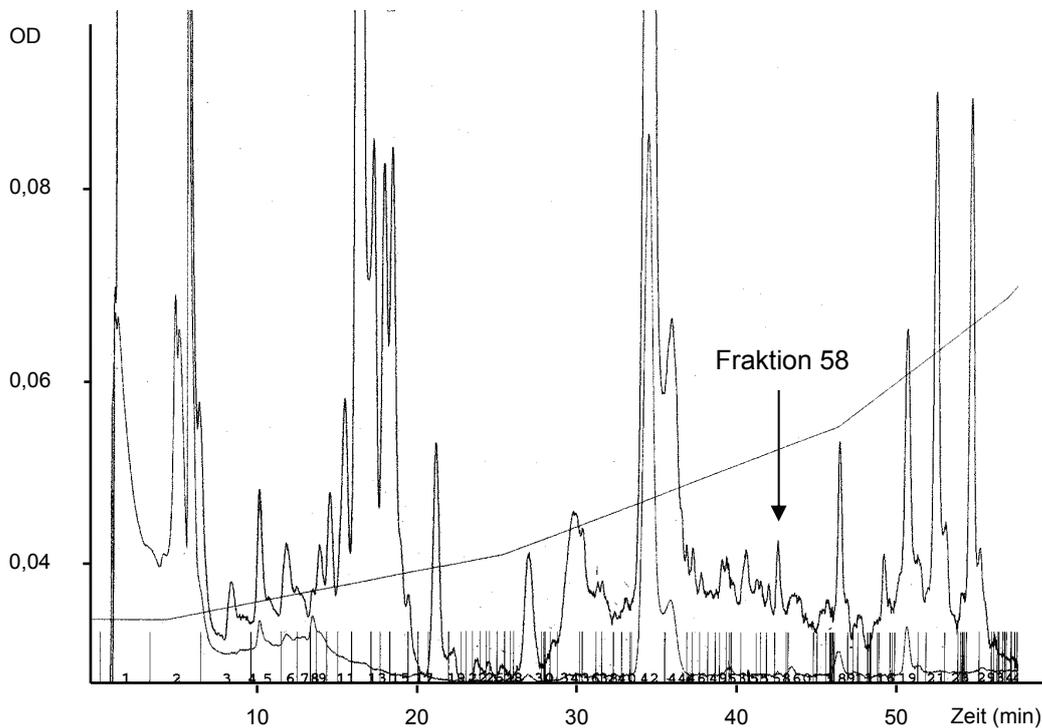


Abbildung 3.5: HPLC-Chromatogramm des Peptidpools des mit W6/32 immunpräzipitierten Nierenzellkarzinoms NZK13. Der Pfeil markiert die Fraktion 58, welche mittels ESI-Q-TOF MSMS analysiert wurde. Siehe auch Abbildung 3.6.

Die Fraktionen 50, 51, 54, 58 des HPLC-Laufes wurden durch Tandem-MS weiter analysiert, wobei in Fraktion 50 das Peptid KESTLHLVL (Ubiquitin), in Fraktion 58 das Peptid TYGEIFEKF (Ubiquinone), in Fraktion 51 das Peptid YYMIGEQQF (Nicotinamid N-Methyltransferase) und in Fraktion 54 das Peptid YAYDGKDYIAL (MHC-Klasse-I) identifiziert wurde. In Abbildung 3.6 ist in A exemplarisch das Massenspektrum der Fraktion 58 dargestellt mit dem doppelt geladenen Peak ($M+2H^+ = 567,37$ Da) dessen Fragmentspektrum in B dem des Peptides TYGEIFEKF entspricht.

Die Peptide konnten aufgrund ihrer Ankeraminosäuren den HLA-Allelen HLA-A*24 (TYGEIFEKF, YYMIGEQKF), HLA-B*40 (KESTLHLVL) und HLA-Cw*0304 (YAYDGKDYIAL) zugeordnet werden (Tabelle 3.4). Die restlichen Fraktionen von Fraktion 19 bis 80 wurden gepoolt, eingengt und eingefrohren. Die LC-MSMS-Analyse steht noch aus.

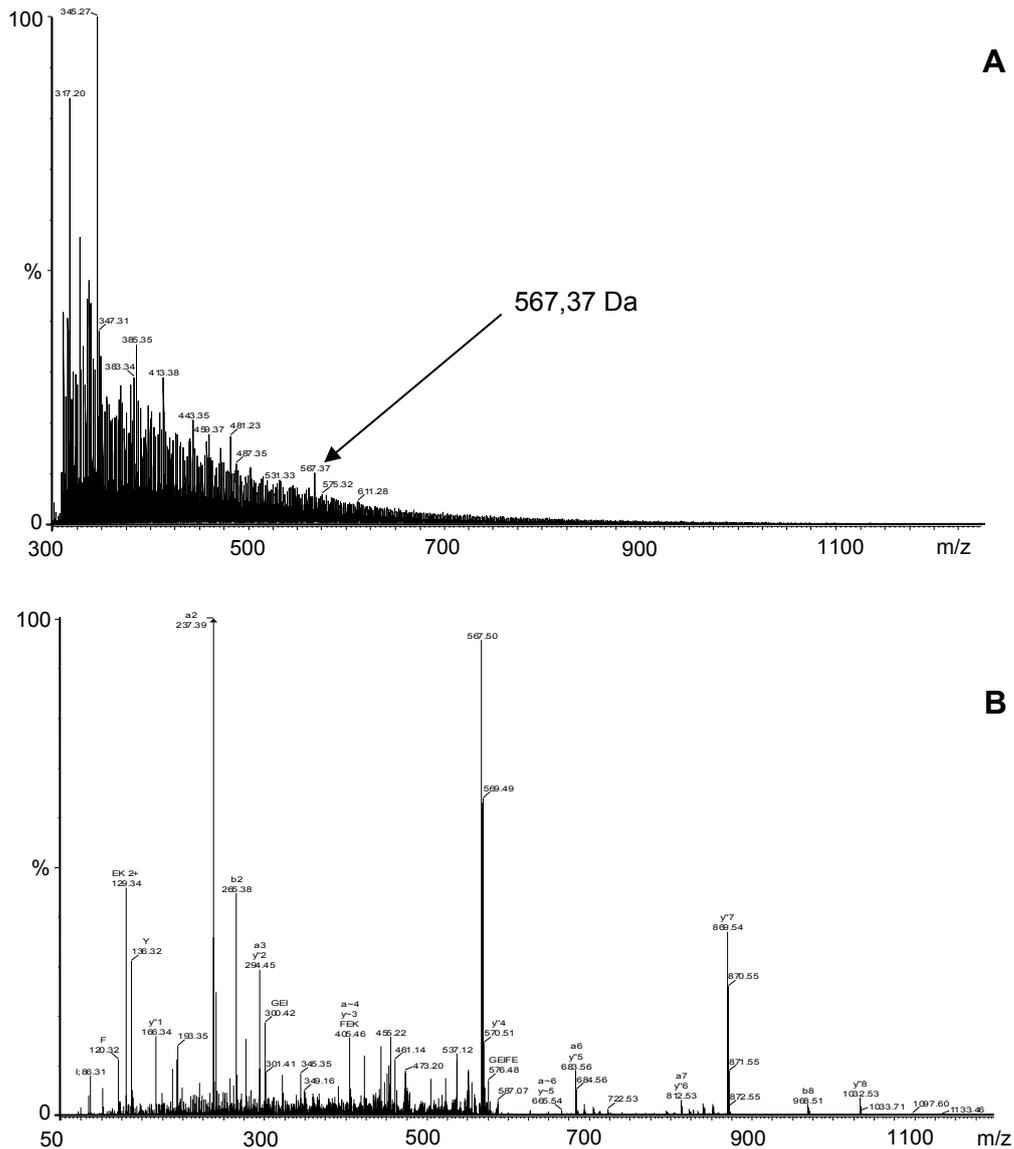


Abbildung: 3.6: Massenspektrum der Fraktion 58 des Smart-HPLC-Laufes, der durch Immunpräzipitation des Nierenzellkarzinoms NZK13 mit dem Antikörper W6/32 gewonnenen Peptide (A) mit Fragmentspektrum des zweifach geladenen Peak des Peptids TYGEIFEKF mit einer Masse von $M+2H^+ = 567,37$ Da (B). Das Experiment wurde von Markus Schirle durchgeführt.

3.3.2.2 MHC-Immünpräzipitation von NZK13 mit dem Antikörper BB7.2

Das Eluat der BB7.2-Antikörpersäule wurde nach HPLC-Aufreinigung direkt eingengt und durch LC-MS analysiert. Hier wurde der Ansatz so gewählt, daß vor der Analyse der eigentlichen Probe ein Eichlauf mit synthetischen HLA-A*0201-Peptiden stattgefunden hat. Bei den Peptiden handelt es sich um bekannte oder durch die SYFPEITHI-Datenbank vorhergesagte potentielle Liganden tumorassoziierter Proteine (Tabelle 2.3). In der Probe von NZK13 wurde nun nach den Peptiden gesucht, die in Masse und Retentionszeit denen der Eichmischung entsprachen. Allerdings wurden, mit Ausnahme des Kontrollpeptids YLLPAIVHI, keines der vorhergesagten Peptide identifiziert. Hingegen wurden 18 HLA-A*0201-Liganden durch gezieltes Fragmentieren von Massenpeaks zwischen 800 und 1300 Da gefunden (Tabelle 3.5). In Abbildung 3.8A ist das Übersichtschromatogramm des BB7.2-Eluats als „Total Ion Current“ (TIC) dargestellt. Hier sind alle gemessenen Ionen über die Zeit aufgetragen zu sehen, was allen Massensignalen zu einem bestimmten Zeitpunkt entspricht. Durch die Darstellung einer einzelnen bestimmten Masse über die Zeit ergibt sich Abbildung 3.8B, wo exemplarisch die Masse des Peptides LLDVPTAAV ($M + H^+ = 898,5$ Da) ausgewählt ist. Durch Fragmentieren dieses Peptides ergibt sich dann dessen Fragmentspektrum in Abbildung 3.8C.

Besondere Beachtung verdiente bei der Analyse der HLA-Liganden das Peptid ALAAVTEV. In Proteindatenbanken ist diese Aminosäuresequenz keinem Protein zuzuordnen, wohl aber dessen Nukleotidsequenz einem Gen in Gendatenbanken.

Hier entspricht es einem, im Leserahmen, um zwei Nukleotide verschobenen Nukleotidabschnitt des Gens DDX-3 (Abbildung 3.7).

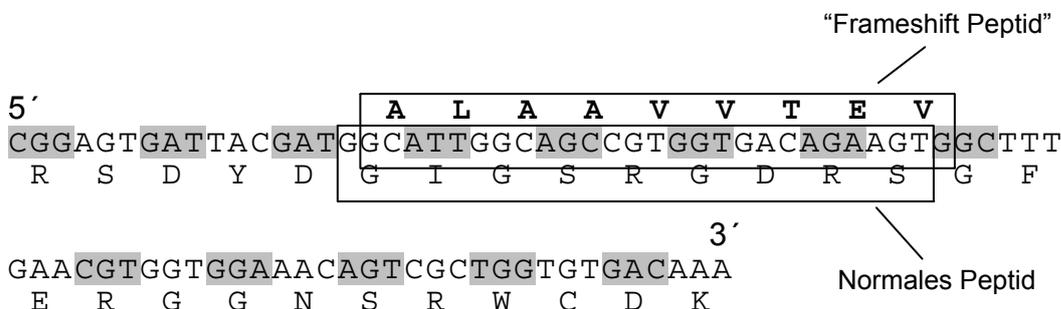


Abbildung 3.7: Nukleotidsequenz des kodierenden Stranges des DDX-3 Gens von Position 300 bis 381. Von Position 317 bis 343 das Frameshift-Peptid ALAAVTEV.

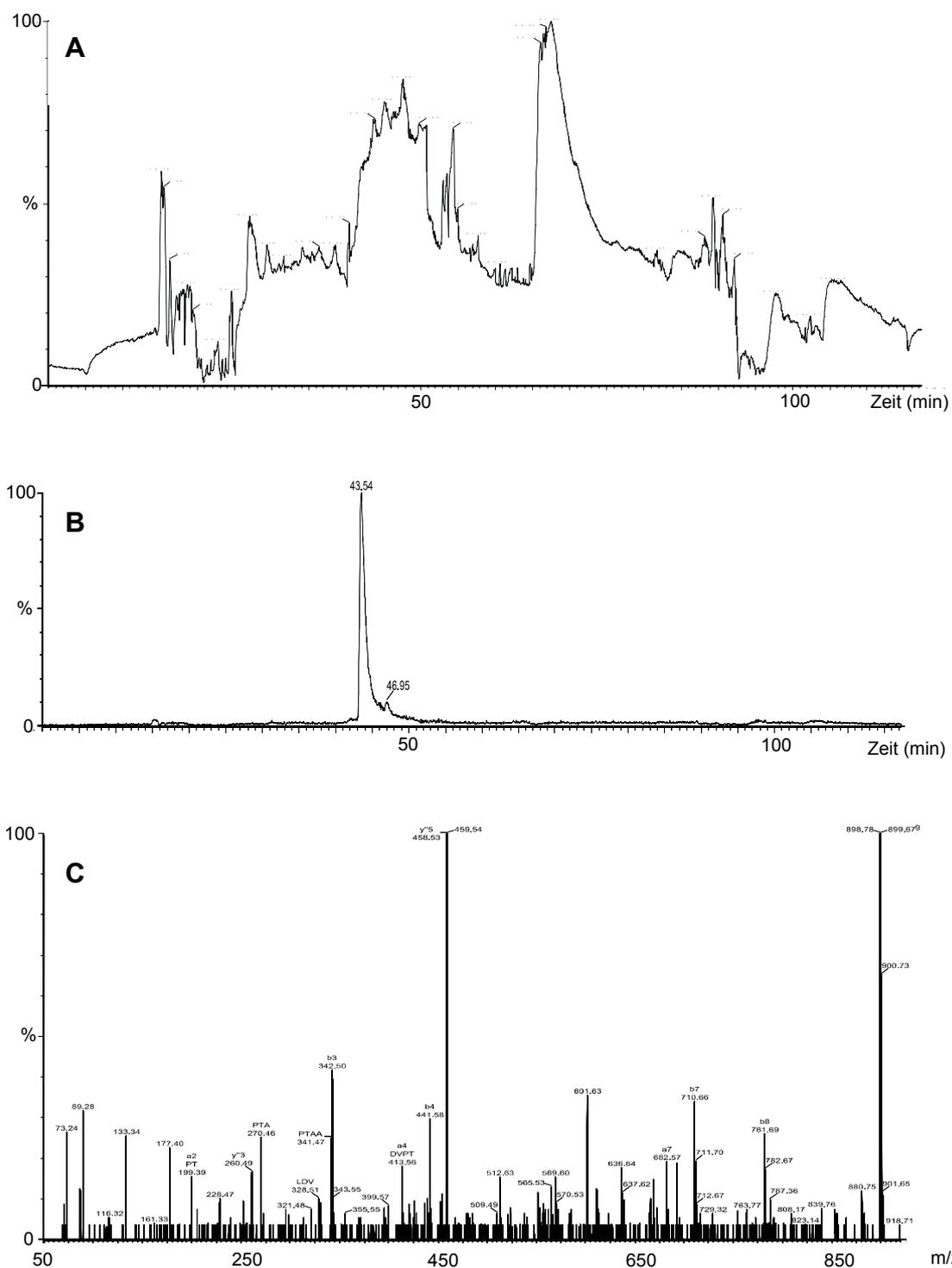


Abbildung 3.8: A: LC-MS Übersichtschromatogram (TIC) der BB7.2-Fraktion der NZK13 Immunpräzipitation. B: LC-MS Massenchromatogramm der ausgewählten Masse ($M + H^+$) 898,5 Da bei einem Massefenster von 0,6 Da. C: Tandem-MS-Fragmentspektrum der $m/z = 898,5$ (LLDVPTAAV).

Tabelle 3.5: Identifizierte HLA-Klasse-I-Liganden des Nierenzellkarzinoms NZK13. Grau unterlegt sind die Liganden, welche durch Analyse der Einzelfraktionen 50, 51, 54 und 58 identifiziert wurden. Fett gedruckt sind die Liganden, deren Gene laut Expressionsanalyse von NZK13 überexprimiert sind.

Proteinbezeichnung	Acc.Nr.	Position	Peptid	HLA – Motiv
Aldolase A	X12447	215 – 223	ALSDHHIYL	A* 0201
Cytokeratin 18	M26326	365 – 373	ALLNIKVKL	A* 0201
HLA-E	M21533	1 – 9	MVDGTLLLL	A* 0201
INF-γ induc. Protein IFI-30	J03909	27 – 35	LLDVPTAAV	A* 0201
Phospholipid transfer protein	L26232	2 – 10	ALFGALFLA	A* 0201
Nicotinamide N-Methyltransferase	U08021	203 – 211	YYMIGEQKF	A*24
MHC-I	U44064	140 – 150	YAYDGKDYIAL	Cw*0304
Ubiquitin	X04803	63 – 71	KESTLHLVL	B*40
Ubiquinone	AF070652	107 – 115	TYGEIFEKF	A*24
DDX3-“frameshift”	AF061337		ALAAVVTEV	A* 0201
Met protooncogene tyrosine kinase	J02958	654 – 662	YVDPVITSI	A* 0201
DKFZP727M231	AL132825	209 – 217	TLIEDILGV	A* 0201
EST	AA483794	72 – 80	VLATLVLLL	A* 0201
DDX5	AF015812	148 – 156	YLLPAIVHI	A* 0201
Protein phosphatase 2	J02902	403 – 411	SLLPAIVEL	A* 0201
FLJ10042	AK000904	325 – 333	TLDDLIAAV	A* 0201
Damage-specific DNA binding protein 1	U18299	316 – 324	YLDNGVVFV	A* 0201
GUCY1A3 (guanylat cyclase 1)	U58855	581 – 589	SVFAGVVGW	A* 0201
SSP29 (acidic protein rich in leucins)	BC000476	48 – 57	SLINVGLISV	A* 0201
APOL1 (apolipoprotein L, 1)	AF323540	176 – 184	ALADGVQKV	A* 0201
APOL1 (apolipoprotein L, 1)	AF323540	273 – 282	FLGENISNFL	A* 0201
Karyopherin alpha 2	BC005978	377 – 385	GLVPFLVSV	A* 0201

3.3.2.3 Gen-Chip-Analyse von NZK13

Bei der Gen-Chip-Analyse des Nierenzellkarzinoms NZK13 wurden ungefähr 7000 Gene im Tumorgewebe und in entsprechendem Normalgewebe der gleichen Niere auf ihre Expression hin untersucht. Davon waren ca. 500 im Tumor überexprimiert bzw. nur dort exprimiert (Tabelle 3.6 und Tabelle 3.7). Bei den bekannt tumorassoziierten bzw. tumorspezifischen Genen sind z.B. die humane Nikotinamid N-Methyltransferase, das Gen für melanoma growth stimulatory activity, das humane Mesothelin Antigen, Galectin-4, cbl-b, das c-fms Protoonkogen und Annexin II zu nennen. In Tabelle 3.8

sind Gene aufgelistet, welche in NZK13 überexprimiert bzw. selektiv exprimiert sind und als INF- γ -induzierbar gelten.

3.3.2.4 Vergleich der Gen-Chip-Analyse mit den identifizierten Liganden von NZK13

Vergleicht man die Gen-Chip-Daten und die identifizierten HLA-Liganden des Nierenzellkarzinoms NZK13, so sind die Expression der Gene für die humane Nicotinamide N-Methyltransferase (HLA-Ligand: YYMIGEQKF) und des Phospholipid Transfer Proteins (HLA-Ligand: ALFGALFLA) exklusiv im Tumorgewebe zu finden (Tabelle 3.7).

Weitere Gene von gefundenen HLA-Liganden sind im Tumorgewebe ebenfalls überexprimiert. MHC-Klasse-I (HLA-Ligand: YAYDGKDYIAL) ist um den Faktor 3,8, Cytokeratin 18 (HLA-Ligand: ALLNIKVKL) um den Faktor 2,9, HLA-E (HLA-Ligand: MVDGTL LLL) um den Faktor 2,3, Interferon- γ inducible Protein (HLA-Ligand: LLDVPTAAV) um den Faktor 3,5 und Aldolase A (HLA-Ligand: ALSDHHIYL) um den Faktor 2 im Tumor überexprimiert (Tabelle 3.7).

3.3.2.5 Untersuchung der Expression von Met-Protoonkogen und Cytokeratin 18 in Tumor- und Normalgewebe von NZK13 mit quantitativer PCR

Zur Überprüfung der Expression des Protoonkogens Met und Cytokeratin 18 in NZK 13 wurde ein Vergleich des relativen mRNA-Gehalts der beiden Gene in Tumor- und Normalgewebes mittels qPCR durchgeführt (Abbildung 3.9). Hierzu wurden aus der resezierten Niere makroskopisch erkennbare Tumor- und Normalgewebsanteile getrennt gesammelt, aufbewahrt und aufgearbeitet.

Tabelle 3.6: Gen-Chip-Daten: Auswahl von Genen, die im Tumorgewebe von NZK13 überexprimiert sind. Fett gedruckt sind die Gene, von denen MHC-Liganden von NZK13 identifiziert wurden. Der Faktor gibt an, wie vielfach die jeweiligen Gene im Tumor überexprimiert sind. Experiment durchgeführt von Toni Weinschenk.

Gen	Acc. Nr.	Faktor
Human skeletal muscle LIM-protein SLIM1	U60115	19.91
Human alpha-1 collagen type I gene	M55998	14.44
H.sapiens SOD-2 gene for manganese superoxide dismutase	X65965	10.94
Human complement component C1r	J04080	10.33
Human alpha-1-antitrypsin	K01396	10.02
Human NK4	M59807	7.61
Homo sapiens lysyl hydroxylase isoform 2 (PLOD2)	U84573	6.50
External Membrane Protein, 130 Kda (Gb)	Z22971	6.22
Human complement C1r	M14058	6.11
H.sapiens gene for alpha1-antichymotrypsin, exon 1	X68733	6.08
Human pre-B cell enhancing factor (PBEF)	U02020	6.05
Human HLA-B null allele mRNA	D49824	6.01
H.sapiens vimentin gene	Z19554	5.86
Human MHC class I (HLA-A*8001)	M94880	5.28
Human complement factor B mRNA, complete cds	L15702	5.00
Human, plasminogen activator inhibitor-1 gene, exons 2 to 9	J03764	4.79
Beta 2-microglobulin 11bp deleted between nt 98-99	S82297	4.63
Human mRNA for KIAA0062 gene	D31887	4.55
Major Histocompatibility Complex, Class I, C	X58536	4.47
Human zinc-finger protein (bcl-6)	U00115	4.46
Human mRNA for heme oxygenase	X06985	4.44
Human mRNA for unknown product	D28124	4.23
Human mRNA for lactate dehydrogenase-A (EC 1.1.1.27)	X02152	4.12
Human hepatic dihydrodiol dehydrogenase gene	U05861	4.04
Thymosin beta-10	S54005	3.97
HLA class-I (HLA-A26) heavy chain	D32129	3.84
Human mRNA for matrix Gla protein	X53331	3.81
Major Histocompatibility Complex, Class I	X12432	3.78
Human transaldolase mRNA containing transposable element	L19437	3.71
Human MHC cell surface glycoprotein (HLA-DQA)	M34996	3.68
Major Histocompatibility Complex, Class I, E	M21533	3.65
Human TRPM-2 protein gene	M63379	3.64
Human mRNA for KIAA0205 gene	D86960	3.63
Human plasma protease (C1)	M13690	3.63
Human mRNA for 80K-L protein	D10522	3.57
Human lipocortin II	D00017	3.51
Alpha B-crystallin=Rosenthal fiber component	S45630	3.50
Human LIM domain protein CLP-36	U90878	3.47
Human mRNA for calgizzarin	D38583	3.44
H.sapiens mRNA for polyadenylate binding protein II	Z48501	3.42
⋮	⋮	⋮
Cytokeratin 18	X12876	2.91
HLA-E	X56841	2.32
Aldolase A	X12447	1.97

Tabelle 3.7: Auswahl von exklusiv in Tumorgewebe von NZK13 exprimierten Genen. Fett: Gene von denen durch Tandem-MS MHC-Klasse-I-Liganden identifiziert wurden. Experiment durchgeführt von Toni Weinschenk.

Gen	Acc. Nr.
Fibronectin X02761	X02761
Human serum amyloid A	J03474
Human omega light chain protein 14.1	M34516
Serum amyloid A (SAA) protein partial	X51441
Human apolipoprotein B-100 (apoB)	M19828
Human Ig rearranged gamma chain	M63438
Fibronectin (FN precursor)	X0276
HPR from Human haptoglobin	M69197
Human ceruloplasmin	M13699
Human nicotinamide N-methyltransferase	U08021
Human Rad mRNA	L24564
Human cystic fibrosis antigen	M26311
Human (hybridoma H210) anti-hepatitis A	M87789
Human chemokine exodus	U64197
Human IAP homolog C (MIHC)	U37546
Human Fc-epsilon-receptor gamma-chain	M33195
HPR gene (haptoglobin-related protein)	K03431
Human guanylate binding protein isoform II (GBP-2)	M55543
Human chondroitin sulfate proteoglycan versican V0 splice-variant	U16306
Human RAR-responsive (TIG1)	U27185
Human complement component 2 (C2)	L09708
Ig alpha 2=immunoglobulin A heavy chain allotype 2	S71043
Human gene for melanoma growth stimulatory activity	X54489
Human omega light chain protein 14.1	M34516
Human neuronal pentraxin II	U29195
Human mRNA for reticulocalbin	D42073
skin-antimicrobial-peptide 1	Z71389
Human clone 23587	U90914
MHC-encoded LAMP7-E1 (proteasome subunit LMP7)	Z14982
Human mesothelin antigen	U40434
Human butyrophilin (BTF4)	U90546
SAA4=serum amyloid A	S48983
Human nicotinamide N-methyltransferase	U51010
Human complement component C3	K02765
Human mRNA for KIAA0206	D86961
Homo sapiens cytidine deaminase	L27943
Phospholipid transfer protein	L26232
Human leukocyte adhesion protein	M15395
not in GB record, H. sapiens CD18 exon 2	X64072
Human type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor	U01062
Human lysosomal-associated multitransmembrane protein s	U51240
Galectin-4	AB006781
Human von Willebrand factor	M10321
Human lysyl oxidase	L16895
Human interleukin 8	M28130
Human phosphoglycerate mutase	J05073

Tabelle 3.8: Interferon- γ induzierbare Gene, die in NZK13 überexprimiert oder selektiv exprimiert sind.

Gen	Accession No.	Faktor
MHC Klasse I	X12432	3,78
HLA-E	X56841	2,32
β_2 Mikroglobulin	J00105	2,52
LMP2	X66401	Selektiv exprimiert
LMP7	Z14982	Selektiv exprimiert
IP-30	J03909	Selektiv exprimiert

Es ist zu erkennen, daß das Protoonkogen Met im Tumorgewebe relativ zum Normalgewebe um ungefähr den Faktor 3 und Cytokeratin 18 um mehr als den Faktor 4 überexprimiert ist.

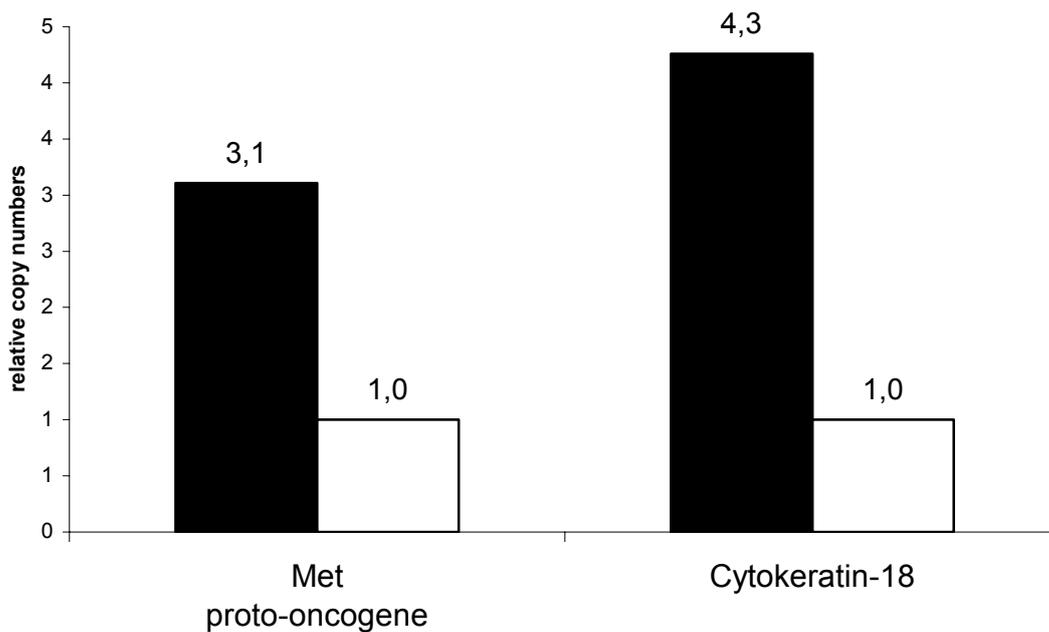


Abbildung 3.9: qPCR-Analyse der Expression von Met Protoonkogen und Cytokeratin 18 in Tumorgewebe (schwarze Balken) und Normalgewebe (weiße Balken). Das Experiment wurde von Toni Weinschenk durchgeführt.

3.3.2.6 Quantitative PCR mit microdissektiertem Tumor- und Normalgewebe

Um möglichst genaue Vergleiche zwischen Tumor- und Normalgewebsexpression einzelner Gene anstellen zu können, wurde reines Tumor- und Normalgewebe mit einem Laser Capture-Mikroskop ausgeschnitten. Im Falle des Tumors wurden nur

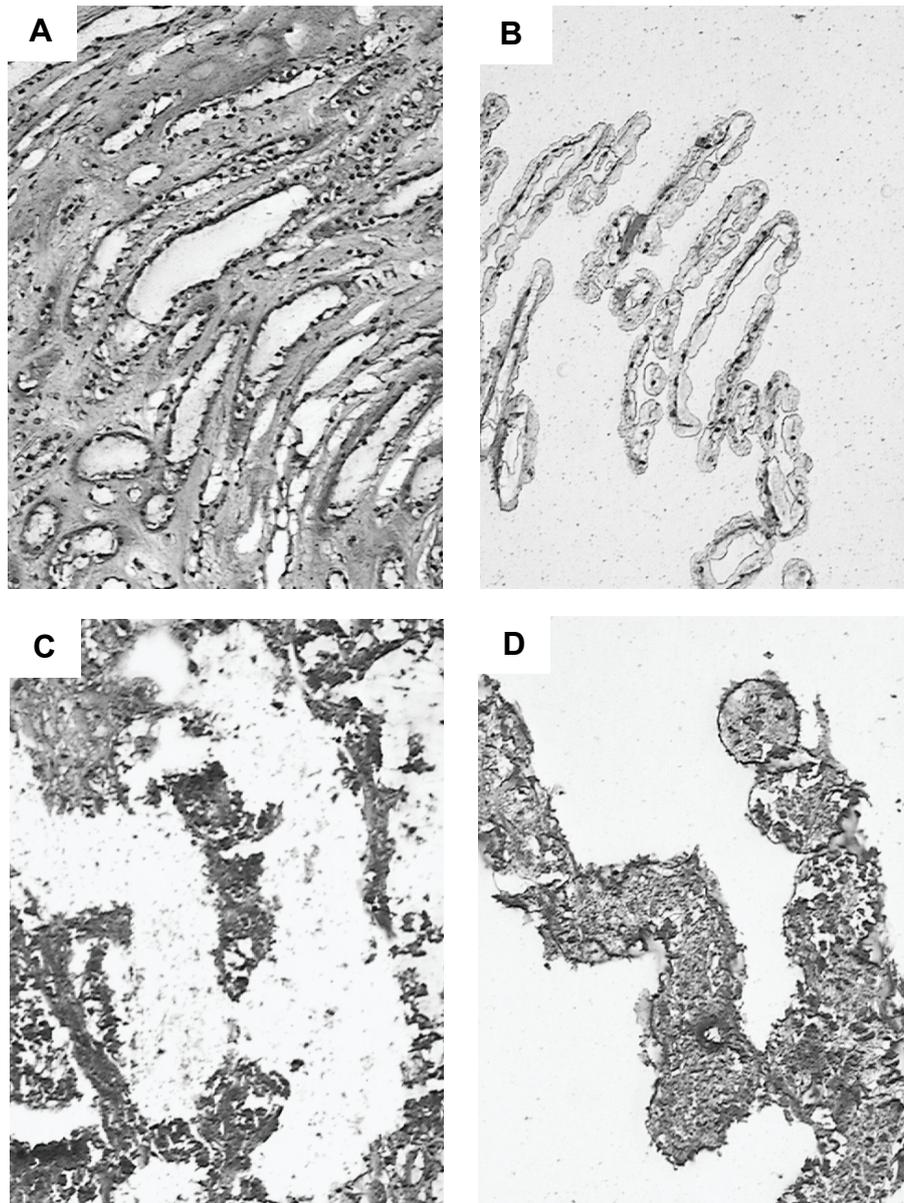


Abbildung 3.10: Laser Capture-Mikroskopie von NZK13. A: Tubuluszellen, B: Ausgeschnittene Tubuluszellen, C: Tumorgewebe, D: Ausgeschnittenes Tumorgewebe.

Zellareale ausgewählt, die aufgrund ihrer hohen Zellkerndichte (hohe Kern-Plasmarelation) eindeutig als Tumorgewebe identifiziert werden konnten (Abbildung 3.10, C und D). Beim normalen Gewebe wurden aus Schnitten der Nierenrinde einzelne Tubuluszellen herausgeschossen (Abbildung 3.10, A und B), welche die Ursprungszellen der Nierenkarzinome darstellen. Eine Unterscheidung zwischen einzelnen Tubulusabschnitten konnte nicht vorgenommen werden. Bindegewebs-, Gefäß- und Glomerolumszellen wurden gemieden.

Die Ergebnisse der qPCR-Analyse dieser Proben sind in Abbildung 3.11 dargestellt.

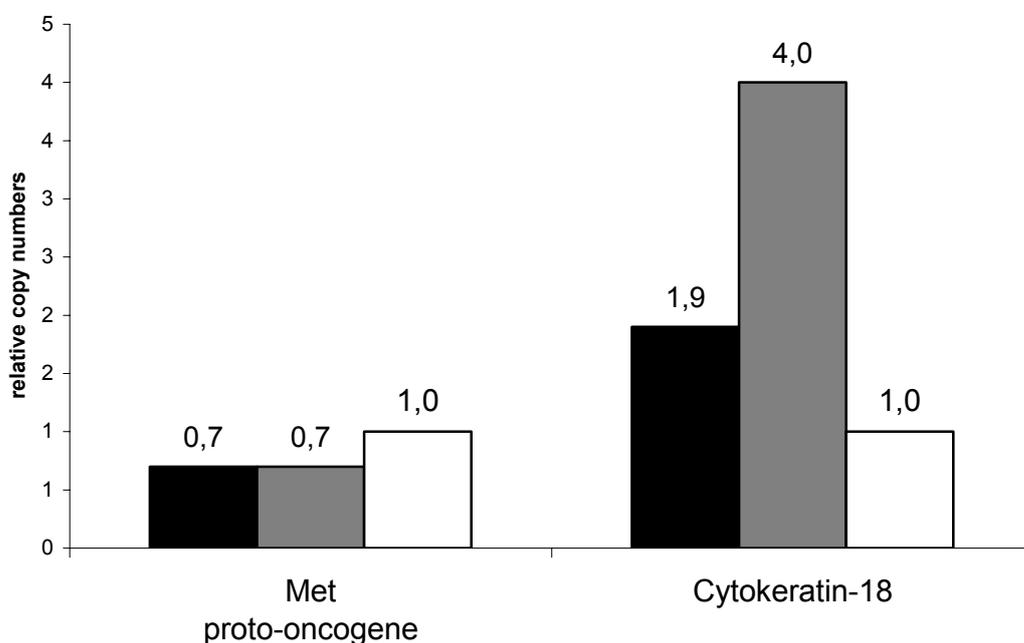


Abbildung 3.11: Analyse der Expression von Met-Protoonkogen und Cytokeratin 18 in Normalgewebe (weiße Balken) und Tumorgewebe (Experiment 1: grauer Balken; Experiment 2: schwarzer Balken) von NZK13. Hier wurden die Tumor- und Normalgewebeproben mit dem Laser Capture-Mikroskop ausgeschnitten

Hier zeigt sich für Cytokeratin 18 ein ähnliches Bild wie bei der qPCR von nicht ausgeschnittenem Gewebe. Cytokeratin 18 ist in zwei voneinander unabhängigen Experimenten in Tumorgewebe gegenüber Normalgewebe deutlich überexprimiert. Jeweils um den Faktor 1,9 und 4. Für die Met-Protoonkogen-Expression erscheinen die Ergebnisse gegensätzlich zu dem vorherigen Experiment mit nicht ausgeschnittenem

Gewebe. In den zwei Experimenten entspricht die relative mRNA-Menge im Tumor nur 70% der Menge im Normalgewebe.

3.3.2.7 Expression von Met-Protoonkogen, Nikotinamid N-Methyl-transferase und Cytokeratin 18 in verschiedenen Körpergeweben

Zur Überprüfung der Expression der Gene Met-Protoonkogen, Nikotinamid N-Methyltransferase und Cytokeratin 18 im menschlichen Körper wurden 22 gekaufte mRNA-Proben aus verschiedenen Körpergeweben auf den Gehalt an mRNA der oben genannten Gene mit qPCR untersucht (Abbildung 3.12).

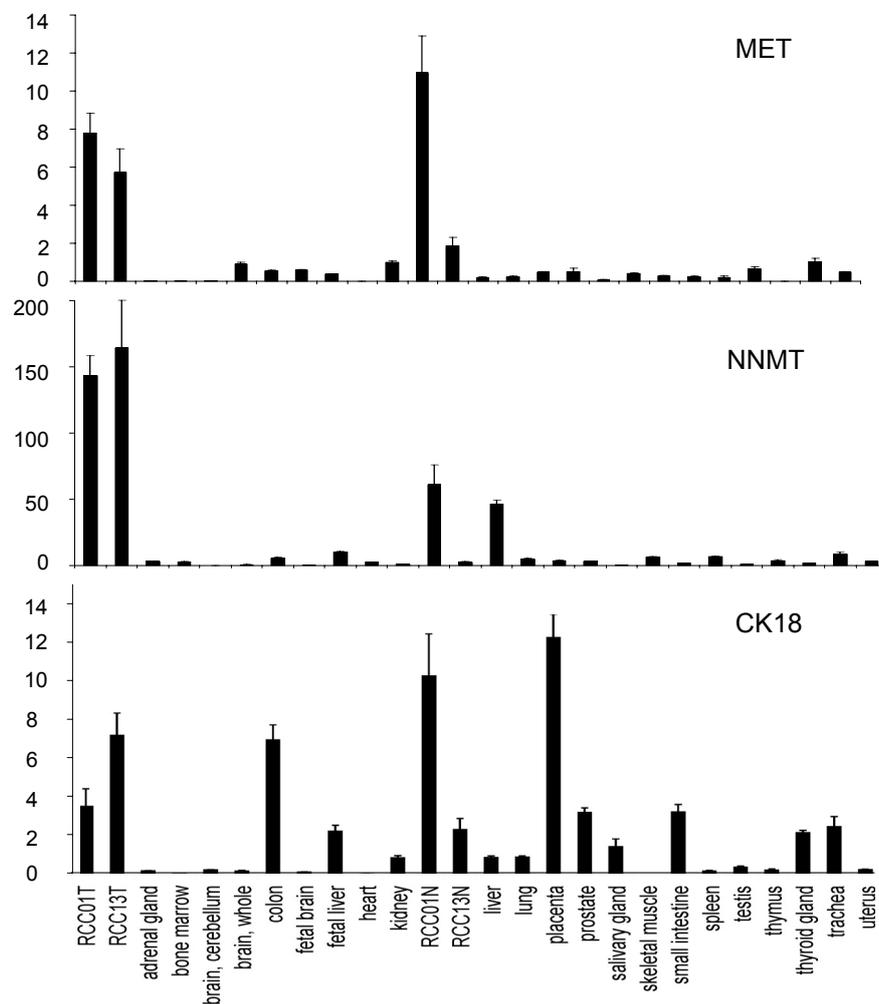


Abbildung 3.12: Expressionsvergleich von Met-Protoonkogen (MET), Nikotinamid N-Methyltransferase (NNMT) und Cytokeratin 18 (CK18) in verschiedenen Körpergeweben durch qPCR von gekauften RNA-Proben der einzelnen Gewebe. Das Experiment wurde von Oliver Schoor durchgeführt.

Met-Protonkogen zeigt hier lediglich in den Tumorgeweben von NZK01 und NZK13 und im Normalgewebe von NZK01 eine hohe Expression, wohingegen die Expression in den anderen Geweben sehr gering oder gar nicht zu detektieren ist. Expression für Nikotinamid N-Methyltransferase wurde in normalem Lebergewebe und den Tumorgeweben von NZK01 und NZK13 detektiert. Die Expression in den anderen Geweben ist nur gering oder nicht vorhanden. Cytokeratin 18 dagegen erscheint in einigen der Gewebe in unterschiedlichem Ausmaße exprimiert zu sein. So ist für normales Kolon-, fetales Leber-, Prostata-, Dünndarm- und Plazentagewebe eine vergleichsweise hohe Expression zu beobachten.

3.3.3 Identifizierung von HLA-Liganden der Kolonkarzinome CCA69, CCA75 und des Nierenzellkarzinoms NZK08

Die Kolonkarzinome CCA69 und CCA75 wurden mit der Protein A-Methode immunpräzipitiert. Bei CCA69 wurde nur der Antikörper W6/32 verwendet. Für CCA75 kam erst der HLA-B spezifische Antikörper B1.23.2 und danach der Antikörper W6/32 zum Einsatz um die HLA-A-Allele zu extrahieren. Die jeweiligen W6/32-Fractionen wurden entsalzt und mittels LC-MS nach vorausgegangenem Eichlauf (siehe oben) analysiert. In beiden Immunpräzipitaten konnte, außer dem Kontrollpeptid YLLPAIVHI in der CCA75-Probe, keines der Eichpeptide identifiziert werden. Statt dessen wurden in CCA69 zwei und in CCA75 acht nicht vorhergesagte HLA-Liganden identifiziert (Tabelle 3.9), unter ihnen wieder Cytokeratin 18 für CCA75.

Das Nierenzellkarzinom NZK08 wurde ebenfalls mit der Protein A-Methode aufgearbeitet. Die benutzten Antikörper waren W6/32 und BB7.2. Die BB7.2-Fraktion wurde wie die bei CCA69 und CCA75 analysiert. Es wurden keine den Eichpeptiden entsprechenden Liganden identifiziert. Die gefunden Peptide sind in Tabelle 3.9 zusammengefaßt. Hier ist vor allem das Peptid des in vielen Nierenzellkarzinomen, u.a. auch in NZK13, überexprimierten Vimentin hervorzuheben.

Tabelle 3.9: Identifizierte HLA-Klasse-I-Liganden der Kolonkarzinome CCA69, CCA75 und des Nierenkarzinom NZK08.

CCA69

Proteinbezeichnung	Acc. Nr.	Position	Peptid	HLA-Motiv
Testis enhanced gene transcript	X75861	45-53	AYVHVMVTHF	A*24
GNBP beta SU-like protien	M24194	35-43	SRDKTIIMW	B*39

CCA 75

Proteinbezeichnung	Acc. Nr.	Position	Peptid	HLA-Motiv
Gastrointestinal glutathione peroxidase	Q9NRP9	31-39	VLIENVASL	A*0201
Cytokeratin 18	AF179904	365-373	ALLNIKVKL	A*0201
KIAA0116	D29958	221-229	SLASLLVSL	A*0201
Novel protein similar to Trp-1 assoc. Tap1	AL132825	209-217	TLIEDILGV	A*0201
EST (fer-1-like 4)	AA483794	72 – 80	VLATLVLLL	A*0201
DDX5	AF015812	148 – 156	YLLPAIVHI	A*0201
PEA protein	AAD56775	61-69	SYIEHIFEI	A*24
EST	BE0238		YPLLALYLL	B*15

NZK 08

Proteinbezeichnung	Acc. Nr.	Position	Peptid	HLA-Motiv
Microsomal glutathion S-Transferase	J03746	147-155	RLLKSKLYL	A*0201
Clathrin heavy chain	D21260	1226-1234	RLASTLVHL	A*0201
Mig-2	Z24725	389-397	ALSDLEITL	A*0201
Vimentin	X56134	226-234	SLQEEIAFL	A*0201
Phospholipid transfer protein	L26232	2-10	ALFGALFLA	A*0201
EST	AA483794	72-80	VLATLVLLL	A*0201

3.3.4 Kolon- und Nierenzellkarzinome, deren MHC-Klasse-I-Präzipitate keiner weiteren Analytik zugeführt wurden

Ob MHC-Klasse-I-Präzipitate einer weiteren massenspektrometrischen Ligandenanalyse zugeführt wurden wurde von deren Gesamt-MHC-Klasse-I-Gehalt (>500 pmol) oder von dem deutlichen Vorhandensein der Ankeraminosäuren bei der Edman-Degradation abhängig gemacht. Ein anderer Teil der Tumoren wurde aus Zeitgründen noch nicht weiter verarbeitet und ist noch zu analysieren (Tabelle 3.10).

Tabelle 3.10: Tumoren, die von der massenspektrometrischen Analytik ausgeschlossen wurden oder noch zu analysieren sind.

Tumor	
CCA64	Zu wenig MHC/Peptid
CCA65	Noch zu analysieren
CCA77	Noch zu analysieren
CCA79	Zu wenig MHC/Peptid
MaCa29	Zu wenig MHC/Peptid
NZK09	Zu wenig MHC/Peptid
NZK10	Noch zu analysieren
NZK11	Noch zu analysieren
NZK26	Noch zu analysieren

3.3.5. Überprüfung der Effizienz der MHC-Immunpräzipitation durch Western-Blot-Analyse

Um zu überprüfen, ob eine MHC-Immunpräzipitation erfolgreich war, wurde eine MHC-Western-Blot-Analyse etabliert. Teile des Lysats verschiedener Tumoren wurden vor und nach der Immunpräzipitation gesammelt und danach durch den Western-Blot miteinander verglichen (Abbildung 3.13).

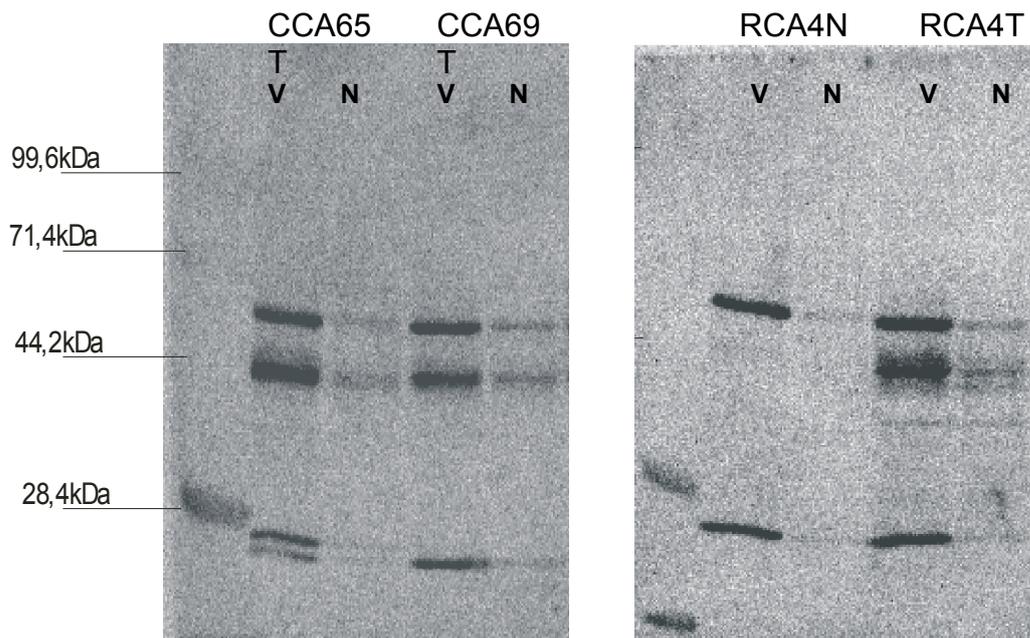


Abbildung 3.13: Western-Blot des Zellysats der Kolonkarzinome CCA65T, CCA69T und des Rektumkarzinoms RCA4T und dessen korrespondierenden Normalgewebe RCA4N vor (V) und nach (N) Immunpräzipitation mit der Protein A-Methode und dem Antikörper W6/32. Benutzt wurde der monoklonale Antikörper LY5.1, der für HLA-ABC spezifisch ist. Zu sehen sind von oben nach unten die Banden der schweren AK-Kette, (~50 kDa) die α -Kette des MHC-Klasse-I-Molekül (~44 kDa) und der leichten AK-Kette (~25 kDa).

Der Western-Blot zeigt eine deutliche Abnahme des Signals sowohl für die Antikörperketten als auch für die schwere MHC-Klasse-I-Kette im Lysat der Tumoren CCA65T, CCA69T und RCA4T nach der MHC-Immunpräzipitation. Dagegen ist für RCA4N schon vor Immunpräzipitation keine Bande für die MHC-Klasse-I-Kette zu finden.

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1. Subklonierung von BB7.2 Hybridomzellen

Die Subklonierung der BB7.2-Hybridomzellen wurde für notwendig erachtet, da die Antikörper-Aufreinigung der Zellkulturüberstände dieser Zellen in sehr geringen Mengen an Antikörper resultierte. Bei der Überprüfung der Klone durch die FACS-Analyse wurde dann auch festgestellt, daß ca. 25% der Klone keine Antikörper produzierten. Allerdings zeigte sich nach Aufreinigung des Überstandes der produzierenden Klone, verglichen mit den nicht subklonierten Zellen, keine Verbesserung der Antikörperausbeute – weder in der photometrischen Messung, noch in der FACS-Analyse. Die Erklärung für die geringen produzierten Mengen an BB7.2-Antikörper bleibt offen. Möglicherweise ist die Bindung des BB7.2-Antikörper an die Protein A-Sepharose nicht stark genug, um eine befriedigende Menge zu extrahieren.

4.1.2. Vergleich der CNBr-Methode und Protein A-Methode bei der MHC-Immunpräzipitation

Mit dem Ziel der Optimierung der MHC-Immunpräzipitation wurden zwei verschiedene Säulen zur Affinitätschromatographie verwendet und miteinander verglichen. Die konventionelle Methode bedient sich dabei einer CNBr-Säule, an die kovalent Antikörper gebunden sind. Bei der neuen Methode wurde eine Protein A-Säule verwendet.

Im Vergleich zeigt sich eine deutlich höhere Peptidmenge in den Eluaten der Protein A-Säule – sowohl in den HPLC-Elutionsprofilen als auch in der Edman-Degradation der filtrierten Eluate – (Tabelle 3.2 und Abbildung 3.4). Dies läßt sich am ehesten durch die Art der Bindung der Antikörper an den zwei verschiedenen Säulen erklären. Protein A bindet spezifisch das F_c-Fragment der Antikörper und läßt somit die Antigen-bindenden Fragmente (F_{ab}) frei. Des weiteren kann der Antikörper bei dieser Methode dem Lysat direkt zugegeben werden, was ihm erlaubt, ohne jegliche sterische Einschränkungen mit den MHC-Peptid-Komplexen in Lösung zu reagieren. Im Gegensatz dazu bindet die CNBr-Sepharose unspezifisch Aminogruppen. Damit binden die Antikörper nicht nur

mit ihren F_c-Fragmenten an die Sepharose, sondern – im ungünstigsten Fall – auch so, daß es aus sterischen Gründen für sie unmöglich ist noch MHC zu binden.

Neben der höheren Peptidausbeute bei der Protein A-Methode ergeben sich weitere Vorteile. So ist diese mit einem geringeren Aufwand verbunden, da lediglich eine Protein A-Säule hergestellt werden muß und auf die aufwendigere Herstellung einer CNBr-Antikörpersäule verzichtet werden kann. Außerdem ist es möglich, die Protein A-Säule wieder zu verwenden und somit das gleiche Lysat mehrmals oder verschiedene Lysate über die gleiche Säule aufzureinigen. Dies ist bei der CNBr-Säule nicht möglich, da hier der Elutionschritt mit einer Zerstörung der Antikörpersäule einhergeht. Ein weiterer Vorteil ist die Tatsache, daß MHC-Peptid-Komplexe wie auch Antikörper vollständig von der Protein A-Säule eluiert werden, was die Analyse von Effizienz und Erfolg der Immunpräzipitation durch Edman-Degradation des Eluates ermöglicht. Dies geschieht durch die Quantifizierung der κ -Kette des Antikörper sowie der α -Kette und des β_2 -Mikroglobulins des HLA-Moleküls (Tabelle 3.3).

Die Immunpräzipitation des gleichen Lysats wurde in der Regel dreimal wiederholt, mit dem Ziel, alle MHC-Peptid-Komplexe zu extrahieren. Hierbei zeigte sich – nach Quantifizierung der α -MHC-Kette – daß es sinnvoll ist, ein BB7.2-Lysat-Gemisch zweimal aufzureinigen um möglichst viel MHC-Moleküle in einem noch relativ kleinen Volumen zu erhalten. Für ein W6/32-Lysat-Gemisch scheint ein Aufreinigungsschritt auszureichen (Tabelle 3.3).

4.1.3. MHC-Klasse-I-Western-Blot zur Verlaufskontrolle der MHC- Immunpräzipitation

Um im Verlauf der MHC-Immunpräzipitation beurteilen zu können, ob MHC-Moleküle und Antikörper effizient aus dem Lysat entfernt wurden, wurde neben der Edman-Degradation (siehe oben) noch eine Western-Blot-Analyse des MHC-Gehaltes im Lysat vor und nach MHC-Aufreinigung etabliert. So kann über die Intensität der Banden für die schwere MHC-Klasse-I-Kette vor der Präzipitation, zumindest qualitativ, auf das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein von MHC-Klasse-I-Molekülen im Lysat geschlossen werden. So ist z.B. im Lysat des Normalgewebes RCA4N (Abbildung 3.13) schon vor der Präzipitation keine MHC-Klasse-I-Bande zu erkennen und damit sind hier auch keine Peptide im weiteren Verlauf zu erwarten. Für die anderen dargestellten

Proben ist vor der Präzipitation in allen Fällen die MHC-Klasse-I-Bande zu erkennen, flankiert von den beiden Banden des Antikörpers bei ca. 50 kDa (schwere Antikörperkette) und bei ca. 25 kDa (leichte Antikörperkette). Nach Präzipitation zeigt sich eine starke Abnahme der Intensität aller Banden, was für eine gelungene Extraktion der MHC- und Antikörpermoleküle spricht. Im Vergleich zur Edman-Analyse weist der Western-Blot mit diesem Versuchsaufbau bisher allerdings noch einen wichtigen Nachteil auf. So ist es nicht möglich, die MHC-Moleküle zu quantifizieren. Um dies zu erreichen, wäre es notwendig, die Intensität der Banden zu messen und sie mit definierten Standards auf dem gleichen Blot zu vergleichen. Andererseits ist durch die Edman-Analyse keine direkte Aussage über die MHC-Klasse-I-Menge im Lysat vor Präzipitation und damit zur MHC-Klasse-I-Menge im Tumor- oder Normalgewebe möglich.

4.1.4. Ausbeute an HLA-Klasse-I-Liganden

Wie oben dargestellt, wurden in dieser Arbeit HLA-Klasse-I-Liganden für die Tumoren NZK08, NZK13, CCA69 und CCA75 identifiziert. In vier der Proben war die Menge von Gesamt-MHC beim Edman-Abbau unter 500 pmol. Da nach unserer Erfahrung die Suche nach MHC-Klasse-I-Liganden erfolglos bleibt, wenn der Gehalt an Gesamt-MHC-Klasse-I einer Probe 500pmol unterschreitet, wurden diese Proben keiner weiteren Analyse zugeführt. Die Nachweisgrenze für die einzelnen MHC-Klasse-I-Peptide im Massenspektrometer (10 fmol) scheint dann nicht erreicht zu werden (Stefan Stevanovic). Fünf der Tumoren wurden aus Zeitgründen noch nicht weiter massenspektrometrisch analysiert – werden viele Peptide gefunden kann eine vollständige MHC-Klasse-I-Liganden-Analyse mitunter bis zu 3 Monaten dauern. Ein anderer Teil wurde noch nicht aufgearbeitet, da bei diesen Tumoren, mit einem Tumorgewicht von unter 5 g, in der Regel keine HLA-Klasse-I-Liganden gefunden werden (Stefan Stevanovic). Neben dem Tumorgewicht scheinen noch zwei weitere Faktoren eine Rolle zu spielen, welche die Peptidaubeute negativ beeinflussen. Zum einen gehen bei den verschiedenen Arbeitsschritten Peptide verloren. Dieser Verlust konnte mit der Einführung der Protein A-Methode schon verringert werden. Zum anderen kommt es in einigen Tumoren zur Down-Regulation der MHC-Klasse-I-Moleküle, was ebenfalls zu einer geringeren Peptidausbeute führt und außerdem eine

schlechte Ausgangssituation für eine Impfung mit Tumorstoff darstellt. In Tabelle 4.1 sind verschiedene Untersuchungen zum Ausmaß der HLA-Klasse-I-Defizienz in Tumoren des Kolorektums zusammengefaßt.

Tabelle 4.1: Verschiedene immunhistologische Studien zum Ausmaß der HLA-Klasse-I-Defizienz in kolorektalen Karzinomen. Angegeben ist jeweils der prozentuale Anteil von Tumoren, welche eine normale, negative oder einen teilweisen Verlust in der HLA-Klasse-I-Expression aufweisen.

Referenzen	Normal	Teilweiser Verlust	Negativ
(Momburg et al., 1986)	65%	27%	8%
(Stein et al., 1988)	69%	21%	10%
(Lopez-Nevot et al., 1989)	-	-	14%
(McDougall et al., 1990)	4%	68%	28%
(Natali et al., 1989)	-	70-80%	-
(Rees et al., 1988)	-	-	30%

Hier zeigt sich eine uneinheitliche Erkenntnislage mit einer Schwankungsbreite für vollständig HLA-Klasse-I-negative Tumoren von 8-30%. Allerdings ist allen Studien gemeinsam, daß eine umgekehrt proportionale Korrelation des Differenzierungsgrades des Tumors mit der HLA-Klasse-I-Expression hergestellt werden konnte. Bei Nierenzellkarzinomen ist die Datenlage noch uneinheitlicher. Hier schwanken die Angaben von 70-80% (Natali et al., 1989) bis nahezu 0% bei den Primärtumoren (Gastl et al., 1996).

4.1.5. Verschiedene Techniken zur Analyse der HLA-Klasse-I-Liganden

Prinzipiell wurden zur Analyse der HLA-Klasse-I-Liganden zwei verschiedene massenspektrometrische Ansätze verwendet. Die „predict-calibrate-detect“- (PCD) Methode und die Nanospray-MS/MS-Analyse von HPLC-Einzelfractionen.

So werden bei der PCD-Methode vorhergesagte Epitope synthetisiert und in einem LC-MS-Eichlauf auf Retentionszeit und Masse analysiert. In einem zweiten Schritt wird die eigentliche Probe gemessen und, wenn die richtige Masse zur richtigen Retentionszeit detektiert wird, diese fragmentiert und deren Aminosäuresequenz identifiziert. Der

Vorteil dieser Methode steckt darin, daß sie sehr sensitiv ist, da die Probe direkt durch die vorgeschaltete HPLC aufkonzentriert wird und die Peptide in einem extrem kleinen Volumen in das Massenspektrometer eingespritzt werden. Ein Nachteil stellt allerdings die Beschränkung auf die Suche nach einer begrenzten Anzahl von Eichpeptiden dar. Dies beschränkt die Suche zum einen auf Epitope bestimmter weniger Tumorantigene, zum anderen auf Liganden einer limitierten Anzahl von HLA-Allelen. Doch gerade die Identifizierung von Epitopen vieler verschiedener Tumorantigene von vielen verschiedenen HLA-Allelen wird als Voraussetzung für eine effektive Tumorstimmung gefordert (Stevanovic 2002; Rammensee et al., 2002). In dieser Arbeit wurden mit diesem Ansatz keine tumorassoziierten HLA-Liganden identifiziert. Dafür mag es mehrere mögliche Gründe geben: a) Die Antigenpräsentations-Maschinerie im Tumor ist herunterreguliert. b) Die vorhergesagten Peptide werden im Tumor nicht präsentiert. c) Der Tumor exprimiert das Antigen nicht – oder nur schwach –, von dem das Peptid abstammt. Ergänzend zu diesem Ansatz muß allerdings noch erwähnt werden, daß eine strenge Konzentration auf die Eichpeptide nicht notwendig ist. So ist es möglich, und das ist hier auch geschehen, unabhängig von den Eichpeptiden Massen zwischen 800 und 1300 Da zu fragmentieren. Dies resultierte in dieser Arbeit in der Identifizierung der meisten HLA-Klasse-I-Liganden.

Bei der Messung von HPLC-Einzelfractionen werden keine Eichpeptide verwendet, sondern sämtliche Massen von 800 bis 1300 Da in einer HPLC-Fraktion fragmentiert und damit sequenziert. Der Vorteil hier ist nun, daß, bei ausreichend hoher Menge an Peptid – trotz geringerer Sensitivität – mehr HLA-Liganden identifiziert werden können, da weder eine Limitierung von seiten der Anzahl der Antigene noch von seiten der HLA-Allele vorliegt. So erhält man ein weites Spektrum an Peptiden der verschiedensten Antigene und HLA-Allele, von denen allerdings die wenigsten von Antigenen abstammen, die eine bekannte Tumorstimmung aufweisen. Doch konnte mit der Identifizierung von NNMT₂₀₃₋₂₁₁ in dieser Arbeit gezeigt werden, daß es mit diesem Ansatz möglich ist, auch tumorassoziierte Peptide in Tumoren zu finden.

4.1.6. Kombination von DNA-Chip-Technologie und massenspektrometrischer HLA-Klasse-I-Liganden-Identifikation

Betrachtet man die identifizierten HLA-Klasse-I-Liganden (Tabelle 3.5 und 3.9) so erkennt man, daß die meisten von Proteinen stammen, für die auf den ersten Blick keine Tumorassoziation besteht.

Durch die dazu parallele Expressions-Analyse von Tumor- und Normalgewebe von NZK13 kann allerdings schon eine Aussage getroffen werden bezüglich der Tumorassoziation der verschiedenen Antigene innerhalb der Niere. Die Expression dieser Antigene im restlichen Körpergewebe wird dabei natürlich noch nicht berücksichtigt.

In einem nächsten Schritt sollte deshalb die Expression der nun – aufgrund ihrer Tumorassoziation in der Niere – ausgewählten Antigene in den anderen Körpergeweben überprüft werden. Dies ist hier z.B. für c-Met, NNMT, und CK 18 durch die Überprüfung von RNA verschiedener Körpergewebe mittels quantitativer PCR geschehen. Auch stehen im www Datenbanken zur Verfügung, mit denen die Gewebsverteilung der verschiedenen Antigene überprüft werden kann. Hier wurden unter anderem die Datenbanken GeneCards (<http://bioinformatics.weizmann.ac.il/cards>) und SOURCE (<http://genome-www5.stanford.edu/cgi-bin/SMD/source/sourceSearch>) verwendet.

Zusätzlich können durch die SEREX-Datenbank (<http://www.licr.org/SEREX.html>) noch Informationen über die Immunogenität der einzelnen Antigene eingeholt werden.

Mit der Kombination dieser Techniken ist es möglich, unter den identifizierten HLA-Klasse-I-Liganden Kandidaten für eine Tumorstimmung auszuwählen.

So sind bei der folgenden Diskussion der identifizierten Peptide die obengenannten Informationsquellen berücksichtigt.

4.2. Diskussion der identifizierten HLA-Klasse-I-Liganden

Zuerst sollen im Folgenden diejenigen Antigene kurz beschrieben werden, welche im Tumorgewebe von NZK13 überexprimiert sind und von denen HLA-Klasse-I-Liganden identifiziert wurden.

4.2.1. HLA-Klasse-I-Liganden des Nierenzellkarzinoms NZK13

Aldolase A

Die Aldolase A ist ein Enzym des Glukosestoffwechsels und ist dort bei der Glykolyse für die Spaltung von Fructose-1,6-bisphosphat in Glycerinaldehyd-3-phosphat und Dihydroxyacetonphosphat verantwortlich. In tierischen Geweben kennt man drei Isoformen des Enzyms, die sich in ihrer Affinität zu ihrem Substrat unterscheiden, die Aldolase A, B und C. Die Aldolase A ist dabei als eher muskeltypische Form, die Aldolase B als Enzym in Leber und Niere und die Aldolase C als Enzym des Gehirns beschrieben. Im Gegensatz zu diesem physiologischen Expressionsmuster hat sich gezeigt, daß sich die Expression in Malignomen der Niere und anderer Lokalisationen bezüglich der Dominanz der verschiedenen Isoformen zur Aldolase A und C hin verschiebt. Aldolase B wird herunterreguliert, Aldolase A oft bis zu zehnfach überexprimiert. So entsteht selbst im Serum der Patienten eine meßbare Erhöhung des Aldolase A/Aldolase B-Quotienten (Zhu et al., 1991). Dieses Phänomen erklärt man sich durch die Induktion der am anaeroben Stoffwechsel beteiligten Enzyme durch Hypoxie (Akakura et al., 2001).

Neben Aldolase A ist auch die Lactatdehydrogenase im Tumorgewebe überexprimiert, was ebenfalls auf eine anaerobe Stoffwechsellage hinweist (Tabelle 3.6).

Eine weitere Besonderheit der Aldolase A ist, daß in Seren von Tumorpatienten mit dem SEREX-Verfahren Antikörper gegen dieses Enzym gefunden wurden (Gure et al., 1998; <http://www.licr.org/SEREX.html>).

Nicotinamid N-Methyltransferase (NNMT)

Die NNMT katalysiert die N-Methylierung von Nicotinamind und anderen Pyridinen, und scheint mit dem Metabolismus verschiedener Medikamente und dem Morbus Parkinson in Zusammenhang zu stehen (Aksoy et al., 1994; Parsons et al., 2002). Normalerweise ist sie vorwiegend in der Leber exprimiert, was sich auch in der qPCR-Analyse von mRNA verschiedener Körpergeweben (Abbildung 3.12) gezeigt hat. In der Gen-Chip-Analyse von NZK13 zeigt sich zudem, daß das Gen für NNMT, im Vergleich zum Normalgewebe, selektiv im Tumor exprimiert wird. Diese Beobachtung

wurde auch schon früher für andere Tumoren gemacht (Markert et al., 2001). Welche Rolle die NNMT in der Tumorigenese einnimmt, ist noch unklar.

Cytokeratin 18

Bei Cytokeratin (CK) 18 handelt es sich um ein Typ I-CK (kleiner und sauer) welches in der Regel mit dem Typ II-CK 8 (größer und basisch) assoziiert ist und damit einen Hauptbestandteil der Intermediärfilamente in Epithelien, wie denen des Gastrointestinaltraktes, der Leber, der Brustdrüse darstellt. Während der Tumorigenese von Adenokarzinomen geht die CK 18-Expression im Gegensatz zu der anderer CK nicht verloren. Im Gegenteil, sie wird sogar noch hoch reguliert und dient dadurch als histologischer Marker verschiedener Karzinome und deren Metastasen (Moll et al., 1982). Dies wird einer Stimulation der CK 18-Expression über den K-Ras-Signal-Transduktionsweg zugeschrieben (Oshima et al., 1996). CK 18 scheint außerdem noch eine Rolle in der Invasion und Metastasierung von Tumorgewebe zu spielen (Schaafsma et al., 1990).

Auch in NZK13 ist CK 18 drei- bis vierfach überexprimiert (Tabelle 3.6, Abbildung 3.9 und 3.11). Allerdings zeigte sich bei der Expressionsanalyse verschiedener Körpergewebe, daß die Expression von CK 18, wie oben beschrieben, auch in verschiedenen nicht transformierten Geweben stark ausgeprägt ist (Abbildung 3.12).

MHC-Klasse-I

Über Funktion, Aufbau und Expressionsmuster der MHC-Klasse-I-Moleküle wurde bereits in der Einleitung ausführlich berichtet. Interessanterweise zeigt sich in NZK13, den Gen-Chip-Daten zufolge, eine Überexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen. Diese scheint durch Interferon- γ induziert zu sein. Es konnte zwar kein direkter Beweis für diese Hypothese erbracht werden, allerdings spricht auch die Überexpression von anderen INF- γ induzierbaren Genen, wie LMP7, LMP2 und β 2m für diese Überlegung. (Tabelle 3.7 und Tabelle 3.8). Durch die gute MHC-Klasse-I-Expression ergibt sich nicht nur eine günstige Ausgangslage für die Identifizierung von HLA-Klasse-I-Liganden, sondern auch für eine Tumorzellvakzinierung, da reichlich Peptide auf der Tumorzelloberfläche präsentiert werden.

Interferon- γ inducible Protein IP-30

Das IP-30 ist, neben den oben genannten, ein weiteres INF- γ induzierbares Protein. Seine Überexpression konnte in der Gen-Chip-Analyse nachgewiesen werden. Dies unterstützt zusätzlich die Annahme, daß die Karzinomzellen unter dem Einfluß von INF- γ standen. Über die Funktion von IP-30 ist bisher noch wenig bekannt. Beschrieben ist aber die Fähigkeit von Peptidfragmenten des IP-30, auf HLA-A*0201 Molekülen TAP unabhängig gebunden zu werden und somit ihre Präsentation, selbst in TAP-defizienten Zellen, zu ermöglichen (Wei and Cresswell, 1992). Eines der von Wei und Cresswell gefundenen Peptide (LLDVPTAAV) wurde auch bei NZK13 identifiziert.

HLA-E

Das HLA-E ist ein HLA-Klasse-Ib-Molekül, welches vornehmlich Leader-Sequenzen anderer HLA-Klasse-I-Moleküle präsentiert. Bekannt ist, daß HLA-E, an seinen Rezeptor (CD94/NKG2A) auf Natürliche Killerzellen gebunden, diese Zellen inaktiviert und so die HLA-E exprimierende Zelle vor ihrer Zerstörung schützt (Moretta et al., 2002). In NZK13 ist HLA-E um den Faktor 2,3 überexprimiert (Tabelle 3.6). HLA-E ist auch INF- γ induzierbar (Gustafson and Ginder, 1996).

Phospholipid-Transfer-Protein (PLTP)

Das PLTP ist ein Protein, welches in Zusammenhang mit dem Abbau von HDL und Atherogenese steht. Die Gen-Chip-Analyse von NZK13 ergab eine tumorspezifische Expression gegenüber dem Normalgewebe. Eine erhöhte PLTP-Aktivität ist bisher nur für das primäre Leberkarzinom beschrieben (Koumanov and Infante, 1986). Allerdings ist auch eine weite Verbreitung in normalen Körpergeweben beschrieben (SOURCE).

Met Tyrosinkinase Rezeptor (c-Met)

C-Met ist ein hochaffiner Rezeptor für den hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF). Für diese Liganden-Rezeptor-Kombination sind verschiedene biologische Funktionen wie Angiogenese, Zellmotilität, Zellwachstum, Invasion und Zelldifferenzierung beschrieben. Mutationen in der Tyrosinkinase-region von c-Met können, wie auch die Koexpression von c-Met und HGF/SF transformierend wirken (Danilkovitch-Miagkova and Zbar, 2002). Ob dies auch für NZK13 zutrifft ist unklar.

Beschrieben ist die Expression von c-Met für verschiedene, hauptsächlich mesenchymale und epidermale, Körpergewebe und die Überexpression in diversen Tumoren (Natali et al., 1996; Umeki et al., 1999). Die durch qPCR erhaltenen Daten verschiedener normaler Körpergewebe zeigten hier eine, im Vergleich zum Tumorgewebe, sehr geringe bis gar keine Expression. Eine Ausnahme stellt dabei das Normalgewebe von NZK01 dar, in dem c-Met sehr hoch exprimiert erscheint. Ob dies der Wahrheit entspricht oder ob es sich um einen Meßfehler handelt, ist bisher noch unklar.

Die Daten zur Überexpression von c-Met im Tumorgewebe von NZK13 gegenüber Normalgewebe sind widersprüchlich. So ist zwar eine Überexpression in der qPCR-Analyse von nicht mikrodiseziertem Gewebe zu detektieren, nicht aber bei ausgeschnittenem Tumorgewebe. Ob durch die Mikrodisektion hier ein genaueres Bild der Genexpression geschaffen und die qPCR mit nicht-disseziertem Gewebe in ihrer Aussage verbessert wurde oder ob sie, aufgrund des geringen RNA-Gehaltes, ungenauer ist und ein falsches Ergebnis liefert, ist unklar. Durch die Reproduktion des Expressionsergebnisses für CK 18 mit der gleichen mikrodisezierten Probe läßt sich für die Richtigkeit des Versuches argumentieren und damit gegen eine Überexpression. Die Tatsache allerdings, daß das c-Met-Peptid überhaupt identifiziert werden konnte spricht eher für eine ausgeprägte Expression von c-Met.

Weiter ist auch ein Zusammenhang zwischen der Entstehung von hereditären und sporadischen papillären und chromophilen Nierenzellkarzinomen mit der c-Met-Expression bekannt (Inoue et al., 1998). Allerdings ist für NZK13 weder ein papilläres noch ein chromophiles histologisches Muster beschrieben.

DDX3 (Frameshift, reading frame +2)

Das Peptid ALAAVVTEV ist in Proteindatenbanken keinem Protein zuzuordnen. Wohl aber die Nukleotidsequenz, welche für dieses Peptid codiert. Dabei handelt es sich um das Gen für das DEAD/H box polypeptide 3, auf dessen kodierenden Strang die Nukleotide 317 bis 343 für ALAAVVTEV kodieren. Im normalen Leserahmen kodieren die Nukleotide 316 bis 342 dagegen für das Peptid GIGSRGDRS (Abbildung 3.7). Der Grund für die Produktion dieses Peptids ist unbekannt. Hauptsächlich sind zwei Möglichkeiten in Erwägung zu ziehen. Erstens, es handelt sich um ein Produkt

eines mutierten DDX-3 Gens, bei welcher upstream des Nukleotids 317 eine Deletion stattgefunden hat und damit einen Frameshift verursacht. Oder es wurden upstream zwei Nukleotide inseriert, welche ebenfalls zu einem Frameshift von +2 führen würden. Die zweite Möglichkeit besteht darin, daß es sich um ein alternatives Translatat des DDX-3 Gens handelt. Hinweisend auf diese Möglichkeit ist auch ein Startkodon (ATG) direkt vor dem Peptid-kodierenden Abschnitt bei der Position 314-316. Zum Ausschluß bzw. Beweis der ersten Möglichkeit ist die Sequenzierung des Gens upstream von Position 317 vonnöten, um eine Mutation in diesem Abschnitt nachzuweisen. Der Beweis der zweiten Möglichkeit hingegen ist weitaus schwieriger zu erbringen.

Unabhängig von beiden Möglichkeiten ist ein alternatives Produkt eines Gens immer ein optimaler Kandidat für die Tumorstimmung, sofern gezeigt werden kann, daß dieser auch wirklich tumorassoziiert oder gar tumorspezifisch ist. Das ist hier nicht geschehen. Es ist bisher noch unbekannt, ob ALAAVVTEV auch in anderen Geweben präsentiert wird und deshalb kann hier über eine Tumorstimmung nur spekuliert werden.

Für die Liganden folgender Proteine konnte in der Literatur weder ein Zusammenhang mit der Tumorigenese noch eine Überexpression in Tumoren gefunden werden (Tabelle 4.2):

Tabelle 4.2: HLA-Klasse-I-Liganden von NZK13, für deren Ursprungproteine nach Literaturrecherche keine Tumorstimmung erkennbar ist.

Protein	Peptid
DKFZP727M231	TLIEDILGV
EST AA483794	VLATLVLLL
Protein Phosphatase 2	SLLPAIVEL
Hypothetical Protein FLJ10042	TLDDLIAAV
Damage-specific DNA-binding protein	YLDNGVVFV
Guanylat Cyclase 1 (GUCY1A3)	SVFAGVVG
SSP29 (acidic protein rich in leucins)	SLINVGLISV
Apolipoprotein L 1 (APOL1)	ALADGVQKV
Apolipoprotein L 1 (APOL1)	FLGENISNFL
Karyopherin alpha 2	GLVPFLVSV
Ubiquitin	KESTLHLVL
Ubiquitin	TYGEIGKEK

4.2.2. HLA-Klasse-I-Liganden des Nierenzellkarzinoms NZK08

Phospholipid-Transfer-Protein

Für NZK08 wurde, interessanterweise, der gleiche Ligand (ALFGALFLA) identifiziert wie für NZK13 (siehe oben), der dort selektiv im Tumorgewebe exprimiert ist. Leider liegen für NZK08 keine Gen-Chip- oder qPCR-Daten vor.

Vimentin

Vimentin ist ein Klasse 3-Intermediärfilament, welches in nicht-epithelialen, mesenchymalen Zellen, wie z.B. in Fibroblasten, exprimiert wird. In Karzinomen, und hier vor allem in Nierenzellkarzinomen, allerdings, ist die Expression von Vimentin ein Indikator für die maligne Transformation der Epithelzellen. So werden hier der epitheliale Marker CK 18 und der mesenchymale Marker Vimentin coexprimiert. Für NZK08 liegen keine Expressionsdaten vor, doch wurde für NZK13 eine Überexpression für Vimentin gefunden.

4.2.3. HLA-Klasse-I-Liganden der Kolonkarzinome CCA 69 und CCA75

Diabetes/phosphoprotein enriched in astrocytes-15 kDa (PED/PEA-15)

PED/PEA-15 ist ein anti-apoptisches Protein, welches die FasL- und TNF α -induzierte Apoptose über Inhibition der Caspase 8-Aktivität verhindern kann. Eine PEA-15-Überexpression ist bisher nur für das metastasierende murine Plattenepithelkarzinom beschrieben (Dong et al., 2001). Seine Expression für Normalgewebe wird zwar für periphere Gewebe als niedrig beschrieben, doch scheint für Gliazellen recht hoch zu sein (SOURCE).

Cytokeratin 18

Hier wurde der gleiche Ligand identifiziert, wie das schon für NZK13 der Fall war.

Gastrointestinale Glutathionperoxidase (GI-Px)

Die GI-Px ist ein Enzym, das beim Schutz vor aufgenommenen organischen Hydroperoxiden im Verdauungstrakt eine Rolle zu spielen scheint. Die Expression von GI-Px scheint auf den Verdauungstrakt mit anhängenden Organen wie Speicheldrüsen,

Leber, Pankreas und Gallenblase beschränkt zu sein (Komatsu et al., 2001). Eine Überexpression ist für kolorektale Karzinome beschrieben (Florian et al., 2001).

Für die Liganden folgender Proteine konnte in der Literatur weder ein Zusammenhang mit der Tumorigenese noch eine Überexpression in Tumoren gefunden werden (Tabelle 4.3):

Tabelle 4.3: HLA-Klasse-I-Liganden von CCA69, CCA75 und NZK08, für deren Ursprungproteine nach Literaturrecherche keine Tumorassoziation erkennbar ist.

Tumor	Protein	Peptid
CCA69	Testis enhanced gene transcript GNBP beta SU-like protien	AYVHMTVTHF SRDKTIIMW
CCA75	KIAA0116 DKFZP727M231 EST EST	SLASLLVSL TLIEDILGV VLATLVLLL YPLLALYLL
NZK08	Clathrin heavy chain EST	RLASTLVHL VLATLVLLL

4.3. Eignung der identifizierten HLA-Klasse-I-Liganden für die Tumorstimmung

Die oben beschriebenen Proteine weisen aufgrund ihres Expressionsmusters oder ihrer Funktion alle eine gewisse Tumorassoziation auf. Ob die HLA-Klasse-I-Liganden dieser Proteine auch für eine Tumorstimmung geeignet sind, ist vor allem von ihrer Expression in anderen, gesunden Körpergeweben abhängig. So ist das, aus der schweren MHC-Klasse-I-Kette entstandene Peptid aufgrund seines ubiquitären Vorkommens sicherlich kein geeigneter Kandidat. Für CK 18, Vimentin und HLA-E gilt, trotz ihrer Überexpression in NZK13 und vielen anderen Tumoren, aufgrund der relativ hohen Expression in verschiedenen gesunden Körpergeweben (Abbildung 3.12) das gleiche. Eine weniger eindeutige Aussage läßt sich über die HLA-Klasse-I-Liganden von Aldolase A, IP-30, PLTP, PEA-15 und GI-Px treffen. Für sie ist entweder eine Überexpression in Tumorgewebe beschrieben oder noch nicht untersucht. Auch die

Datenlage, die Stärke ihrer Expression in Normalgewebe betreffend, ist noch nicht eindeutig. So kämen Peptide dieser Proteine für eine Tumorstimmung in Frage, sobald nachgewiesen ist, daß ihre Expression in gesunden Körpergeweben weit geringer ist als im Tumor.

Allerdings ist bis heute noch unklar, um welchen Faktor die Expression eines Antigens im Tumor die Expression im Normalgewebe übertreffen muß bzw. wie hoch es im Normalgewebe exprimiert werden darf, damit es nicht zur Autoimmunreaktion kommt.

Auch für das DDX3-Frameshift-Peptid ist es noch unklar, ob es auch durch gesunde Zellen präsentiert wird. Somit sind auch hier noch weitere Untersuchungen notwendig, die zeigen, daß das DDX3-Frameshift-Peptid tumorspezifisch ist.

c-Met und NNMT bringen für eine Tumorstimmung bessere Voraussetzungen mit. So konnte gezeigt werden, daß die beiden Proteine, außer in Tumorgewebe, nur sehr schwach oder gar nicht exprimiert werden (Abbildung 3.11). Nur die Leber zeigt eine mäßige, aber im Vergleich zum Tumor immer noch geringe, Expression der NNMT. So stellen Peptide dieser beiden Proteine Kandidaten für eine Tumorstimmung dar.

Das Kriterium für die Auswahl der einzelnen Peptide war hier ihre potentielle Fähigkeit, eine Autoimmunreaktion hervorzurufen. Diese ist um so geringer, so wird angenommen, desto geringer die Expression der jeweiligen Antigene in gesundem Gewebe ist. Mit einer Autoimmunreaktion muß zwar auch bei Tumorstimmung mit c-Met und NNMT gerechnet werden. Doch ist generell eine Autoimmunreaktion nach Peptidtumorstimmung erst selten beschrieben (Yee et al., 2000). Des Weiteren wird angenommen, daß die Aktivierung von CTL durch Peptide nur in einer zeitlich limitierten Immunantwort gegen das jeweilige Antigen resultiert und ohne Restimulation die Immunantwort nicht aufrechterhalten werden kann (Speiser et al., 1997). So scheint die Gefahr einer Autoimmunreaktion nach Peptidtumorstimmung eher gering bzw. kein irreversibler Prozeß zu sein.

Über die Fähigkeit der einzelnen Peptide, tatsächlich CTL so zu aktivieren, daß sie den Tumor effektiv bekämpfen können, läßt sich momentan noch keine Aussage treffen. Ihre Immunogenität muß letztendlich durch Tumorstimmungsstudien im Menschen oder mit dem Ansatz der reversen Immunologie über den Nachweis peptidspezifischer T-Zellen bewiesen werden.

4.4. Ausblick

Die Immuntherapie bei Tumorpatienten mit Peptidvakzinen war in der Vergangenheit nur in einer begrenzten Anzahl von Fällen erfolgreich. Dabei wurden in der Regel nur wenige verschiedene Peptide weniger Tumorantigene verwendet. Eine höhere Effektivität von Tumorkvakzinen verspricht man sich durch die Verwendung einer größeren Anzahl von Peptiden verschiedener Tumorantigene und HLA-Allele (Stevanovic 2002; Rammensee et al., 2002). Dadurch glaubt man eine Selektion von Tumorzellen zu verhindern, die ein bestimmtes Antigen nicht tragen. Dazu wird es notwendig sein, noch mehr HLA-Klasse-I-Liganden bzw. T-Zellepitope von verschiedenen tumorassoziierten Antigenen zu identifizieren. Hierfür steht mit der Protein A-MHC-Immunpräzipitationsmethode jetzt eine optimierte und sensitivere Methode zur Verfügung.

Durch die Kombination von DNA-Chip-Technologie und massenspektrometrischer Identifizierung von HLA-Klasse-I-Liganden in Serie oder parallel wird in Zukunft eine leistungsfähige Methode zur Verfügung stehen, welche die effektivere Identifizierung von HLA-Klasse-I-Peptiden tumorassoziiierter Antigene und damit die Entwicklung patientenspezifischer, effektiverer Tumorkvakzine ermöglicht.

Das Konzept zum patientenspezifischen Tumorkvakzin ist in Abbildung 4.1 dargestellt. Dabei stellt, neben Expressionsanalyse und HLA-Ligandenidentifizierung, das Testen von Patientenblut, vor und nach Vakzinierung, auf peptidspezifische CTL, ein Monitoring der Immunantwort gegen das Peptid, die dritte Säule des Konzeptes dar. Dies kann beispielsweise durch die Färbung von Lymphozyten mit HLA-Tetrameren oder durch Peptidstimulation der Lymphozyten mit anschließender Messung deren INF- γ -mRNA-Gehaltes geschehen. Zusätzlich kann dies noch mit dem Blut gesunder Spender vorgenommen werden, um auch hier nach Vorläuferzellen peptidspezifischer CTL zu fahnden. Sicherlich kann für die Mäßigkeit der bisherigen Erfolge in der Tumor-Immuntherapie nicht nur die ungenügende Patientenspezifität und die zu geringe Anzahl an benutzten Peptiden verantwortlich gemacht werden. Resistenz-Mechanismen von Tumoren gegenüber dem zellulären Immunsystem sind zur Genüge beschrieben. Doch ist sicher auch zu sehen, daß in den Fällen, in denen diese Resistenzen nicht vorliegen, das vorgestellte Konzept zu einer effektiveren Tumorthherapie führen kann.

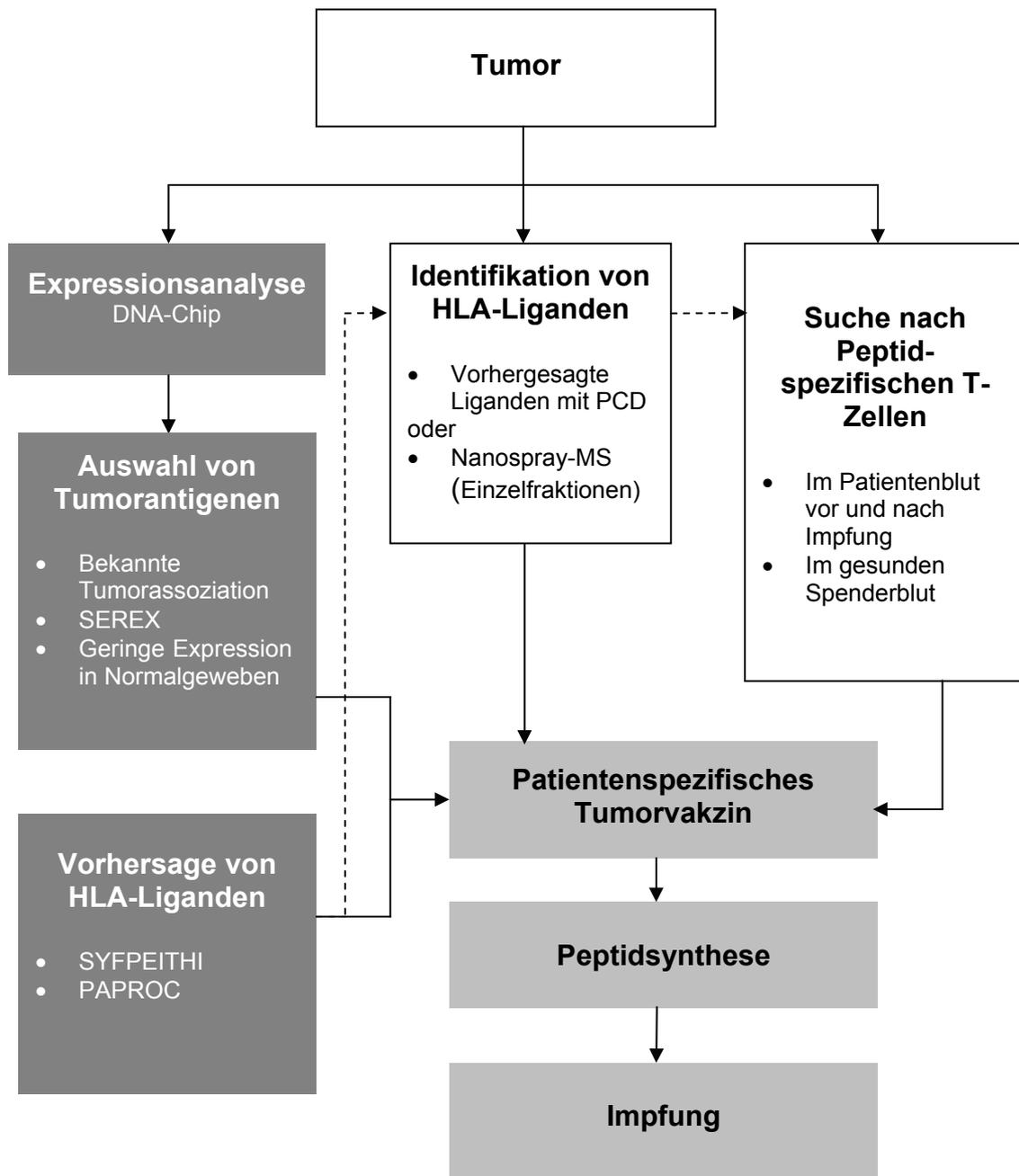


Abbildung 4.1: Schema des neuen patientenspezifischen Tumorvakzinkonzepts.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden aus zwei Nierenzellkarzinomen und zwei Kolonkarzinomen nach MHC-Klasse-I-Immunpräzipitation insgesamt 38 HLA-Klasse-I-gebundene Peptide massenspektrometrisch identifiziert.

Zusätzlich wurde mit Hilfe von DNA-Chip-Technologie, quantitativer PCR und Laser Capture-Mikroskopie eine Expressionsanalyse eines Nierenzellkarzinoms durchgeführt und deren Ergebnisse mit den identifizierten HLA-Klasse-I-Liganden des selben Karzinoms verglichen.

So wurde die Expression im Tumorgewebe gegenüber dem Normalgewebe der gleichen Niere für ca. 7000 Gene überprüft. Verglichen mit den 22 gefundenen HLA-Klasse-I-Liganden des Nierenzellkarzinoms zeigte sich, daß sieben der den Peptiden zugehörigen Antigene im Tumor überexprimiert waren. Darunter waren u.a. die Nicotinamide-N-Methyltransferase (NNMT) (YYMIGEQKF) und das Protoonkogen c-Met (YVDPVITSI). Für sie konnte mittels quantitativer PCR von RNA verschiedener Körpergewebe nachgewiesen werden, daß ihre Expression – mit Ausnahme der Leber für NNMT – auf die Tumoren beschränkt ist bzw. sie dort stark überexprimiert sind. Somit wird angenommen, daß diese beiden Peptide mögliche Kandidaten für eine Tumorstimmulierung sind. Des Weiteren wurde im untersuchten Nierenzellkarzinom ein Peptid eines vermeintlichen Frameshift-Proteins gefunden, für das die Nukleotidsequenz₃₁₇₋₃₄₃ des DEAD/H box 3-Gens kodiert. Ob es sich dabei um ein tumorspezifisches Phänomen handelt, ist bis jetzt noch unklar. Für die restlichen Antigene der gefundenen Peptide konnte keine Überexpression in Tumoren nachgewiesen werden oder es war eine weite Verbreitung in normalen Körpergeweben offensichtlich oder unklar.

Durch Einführung einer neuen MHC-Klasse-I-Immunpräzipitationsmethode mit Protein A-Sepharose wurde die Peptidausbeute bis auf das vierfache gesteigert.

Es ist anzunehmen, daß der hier dargestellte Ansatz der Kombination von DNA-Expressionsanalyse und HLA-Klasse-I-Ligandenidentifikation und die daraus resultierende Möglichkeit des patientenspezifischen Vakzins die Tumorstimmulierung entscheidend verbessern kann.

6. Abkürzungsverzeichnis

(q)PCR	(quantitative) PCR
AK	Antikörper
APC	Antigen Präsentierende Zellen
APC	Adenomatöse Polyposis Coli
APS	Ammoniumpersulfat
β_2m	β_2 -Mikroglobulin
CCA	Colon Carcinoma
CD	Cluster of Differentiation
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]propansulfonat
CK	Cytokeratin
c-Met	Met Tyrosinkinase Rezeptor
CnBr	Cyanbromid
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt
DCC	Deleted in Colon Cancer
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ESI	Elektrospray Ionisierung
EST	Expressed Sequence Tag
Fab	Antigenbindendes Fragment des Immunglobulins
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
Fc	Konstantes Fragment des Immunglobulins
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward Scatter
Gi-Px	Gastrointestinale Glutathion Peroxidase
HLA	Human Leukocyte Antigen
HNPCC	Hereditäres Nicht Polypöses Colon Carcinom
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	Horse Raddish Peroxidase
HSP	Heat shock Protein
Ig	Immunglobulin
Ii	Invariant Chain
INF	Interferon
IP-30	Interferon gamma induzierbares Protein 30
LCM	Laser Capture Microscopy
LCMV	Lymphocytotropisches Choriomeningitis Virus
LMP	Low Molecular Weight Protein
LOH	Loss of Herterozygosity
MALDI	Matrix-assisted Laser Desorption Ionization
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIIC	MHC class II Compartment
MIN	Mikrosatelliteninstabilität
MS	Massenspektrometrie
NNMT	Nicotinamid N-Methyltransferase
NZK	Nierenzellkarzinom
OD	Optische Dichte
P	Position
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PED/PEA-15	Diabetes/phosphoprotein enriched in astrocytes-15kDa
PI	Propidium Iodid
PLTP	Phospholipid Transfer Protein
RCA	Rektum Carcinom

RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSC	Side Scatter
TAA	Tumorassoziiertes Antigen
TAP	Transporter Associated with Antigen Processing
TCR	T-Zellrezeptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TGF	Tumor Growth Factor
Th	T-Helfer Zelle
TIC	Total Ion Current
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TOF	Time of Flight
UC	Unrelated Chromatin

Einbuchstabencode der Aminosäuren

A	Alanin	M	Methionin
C	Cystein	N	Asparagin
D	Asparaginsäure	P	Prolin
E	Glutaminsäure	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
H	Histidin	T	Threonin
I	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Tyrosin

Literaturliste

Adida, C., Berrebi, D., Peuchmaur, M., Reyes-Mugica, M., and Altieri, D.C., 1998. Anti-apoptosis gene, survivin, and prognosis of neuroblastoma. *Lancet*, 351(9106): 882-883.

Akakura, N., Kobayashi, M., Horiuchi, I., Suzuki, A., Wang, J., Chen, J., Niizeki, H., Kawamura, K., Hosokawa, M., and Asaka, M., 2001. Constitutive expression of hypoxia-inducible factor-1alpha renders pancreatic cancer cells resistant to apoptosis induced by hypoxia and nutrient deprivation. *Cancer Res.*, 61(17): 6548-6554.

Aksoy, S., Szumlanski, C.L., and Weinshilboum, R.M., 1994. Human liver nicotinamide N-methyltransferase. cDNA cloning, expression, and biochemical characterization. *J. Biol. Chem.*, 269(20): 14835-14840.

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.

Benchimol, S., Fuks, A., Jothy, S., Beauchemin, N., Shirota, K., and Stanners, C.P., 1989. Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell*, 57(2): 327-334.

Brossart, P., Stuhler, G., Flad, T., Stevanovic, 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(4): 732-736.

Campbell, C.E., Kuriyan, N.P., Rackley, R.R., Caulfield, M.J., Tubbs, R., Finke, J., and Williams, B.R., 1998. Constitutive expression of the Wilms tumor suppressor gene (WT1) in renal cell carcinoma. *Int. J. Cancer*, 78(2): 182-188.

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(5): 1914-1918.

Clark, J., Rocques, P.J., Crew, A.J., Gill, S., Shipley, J., Chan, A.M., Gusterson, B.A., and Cooper, C.S., 1994. Identification of novel genes, SYT and SSX, involved in the t(X;18)(p11.2;q11.2) translocation found in human synovial sarcoma. *Nat. Genet.*, 7(4): 502-508.

Coppes, M.J., Liefers, G.J., Paul, P., Yeger, H., and Williams, B.R., 1993. Homozygous somatic Wt1 point mutations in sporadic unilateral Wilms tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90(4): 1416-1419.

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., 1994. Identification of a peptide

recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science*, 264(5159): 716-719.

Crew, A.J., Clark, J., Fisher, C., Gill, S., Grimer, R., Chand, A., Shipley, J., Gusterson, B.A., and Cooper, C.S., 1995. Fusion of SYT to two genes, SSX1 and SSX2, encoding proteins with homology to the Kruppel-associated box in human synovial sarcoma. *EMBO J.*, 14(10): 2333-2340.

Danilkovitch-Miagkova, A. and Zbar, B., 2002. Dysregulation of Met receptor tyrosine kinase activity in invasive tumors. *J. Clin. Invest.*, 109(7): 863-867.

de Campos-Lima, P.O., Gavioli, R., Zhang, Q.J., Wallace, L.E., Dolcetti, R., Rowe, M., Rickinson, A.B., and Masucci, M.G., 1993. HLA-A11 epitope loss isolates of Epstein-Barr virus from a highly A11+ population. *Science*, 260(5104): 98-100.

De Smet, C., Lurquin, C., Lethe, B., Martelange, V., and Boon, T., 1999. DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter. *Mol. Cell Biol.*, 19(11): 7327-7335.

Denzin, L.K. and Cresswell, P., 1995. HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading. *Cell*, 82(1): 155-165.

Deveraux, Q.L. and Reed, J.C., 1999. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev.*, 13(3): 239-252.

Dhaene, K., Van Marck, E., and Parwaresch, R., 2000. Telomeres, telomerase and cancer: an up-date. *Virchows Arch.*, 437(1): 1-16.

Dick, T.P., Ruppert, T., Groettrup, M., Kloetzel, P.M., Kuehn, L., Koszinowski, U.H., Stevanovic, S., Schild, H., and Rammensee, H.G., 1996. Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands. *Cell*, 86(2): 253-262.

Dong, G., Loukinova, E., Chen, Z., Gangi, L., Chanturita, T.I., Liu, E.T., and Van Waes, C., 2001. Molecular profiling of transformed and metastatic murine squamous carcinoma cells by differential display and cDNA microarray reveals altered expression of multiple genes related to growth, apoptosis, angiogenesis, and the NF-kappaB signal pathway. *Cancer Res.*, 61(12): 4797-4808.

Dutcher, J., 2002. Current status of interleukin-2 therapy for metastatic renal cell carcinoma and metastatic melanoma. *Oncology*, 16: 4-10

Ehring, B., Meyer, T.H., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., and Tampe, R., 1996. Effects of major-histocompatibility-complex-encoded subunits on the peptidase and proteolytic activities of human 20S proteasomes. Cleavage of proteins and antigenic peptides. *Eur J Biochem*, 235(1-2): 404-415.

Eura, M., Chikamatsu, K., Ogi, K., Nakano, K., Masuyama, K., and Ishikawa, T., 1995. Expression of genes MAGE-1, -2, and -3 by human maxillary carcinoma cells. *Anticancer Res.*, 15(1): 55-59.

- Falk, K., Rotzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G., and Rammensee, H.G., 1991. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*, 351(6324): 290-296.
- Finn, O.J., Jerome, K.R., Henderson, R.A., Pecher, G., Domenech, N., Magarian-Blander, J., and Barratt-Boyes, S.M., 1995. MUC-1 epithelial tumor mucin-based immunity and cancer vaccines. *Immunol. Rev.*, 145:61-89.: 61-89.
- Fisher, G.H., Rosenberg, F.J., Straus, S.E., Dale, J.K., Middleton, L.A., Lin, A.Y., Strober, W., Lenardo, M.J., and Puck, J.M., 1995. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell*, 81(6): 935-946.
- Fisk, B., Blevins, T.L., Wharton, J.T., and Ioannides, C.G., 1995. Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines. *J. Exp. Med.*, 181(6): 2109-2117.
- Florian, S., Wingler, K., Schmehl, K., Jacobasch, G., Kreuzer, O.J., Meyerhof, W., and Brigelius-Flohe, R., 2001. Cellular and subcellular localization of gastrointestinal glutathione peroxidase in normal and malignant human intestinal tissue. *Free Radic. Res.*, 35(6): 655-663.
- Gastl, G., Ebert, T., Finstad, C.L., Sheinfeld, J., Gomahr, A., Aulitzky, W., and Bander, N.H., 1996. Major histocompatibility complex class I and class II expression in renal cell carcinoma and modulation by interferon gamma. *J. Urol.*, 155(1): 361-367.
- Gendler, S.J., Lancaster, C.A., Taylor-Papadimitriou, J., Duhig, T., Peat, N., Burchell, J., Pemberton, L., Lalani, E.N., and Wilson, D., 1990. Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin. *J. Biol. Chem.*, 265(25): 15286-15293.
- Gianani, R., Jarboe, E., Orlicky, D., Frost, M., Bobak, J., Lehner, R., and Shroyer, K.R., 2001. Expression of survivin in normal, hyperplastic, and neoplastic colonic mucosa. *Hum. Pathol.*, 32(1): 119-125.
- Gorer, P.A., 1936. The detection of antigenetic differences in mouse erythrocytes by the employment of immune sera. *Br. J. Exp. Pathol.*, 17, 42-50.
- Greenblatt, M.S., Bennett, W.P., Hollstein, M., and Harris, C.C., 1994. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.*, 54(18): 4855-4878.
- Groettrup, M., Soza, A., Kuckelkorn, U., and Kloetzel, P.M., 1996. Peptide antigen production by the proteasome: complexity provides efficiency. *Immunol Today*, 17(9): 429-435.
- Grossman, D., McNiff, J.M., Li, F., and Altieri, D.C., 1999. Expression and targeting of the apoptosis inhibitor, survivin, in human melanoma. *J. Invest Dermatol.*, 113(6): 1076-1081.

Gure, A.O., Altorki, N.K., Stockert, E., Scanlan, M.J., Old, L.J., and Chen, Y.T., 1998. Human lung cancer antigens recognized by autologous antibodies: definition of a novel cDNA derived from the tumor suppressor gene locus on chromosome 3p21.3. *Cancer Res.*, 58(5): 1034-1041.

Gustafson, K.S. and Ginder, G.D., 1996. Interferon-gamma induction of the human leukocyte antigen-E gene is mediated through binding of a complex containing STAT1alpha to a distinct interferon-gamma-responsive element. *J. Biol. Chem.*, 271(33): 20035-20046.

Hall, A.K., 1991. Differential expression of thymosin genes in human tumors and in the developing human kidney. *Int. J. Cancer*, 48(5): 672-677.

Hall, A.K., Hempstead, J., and Morgan, J.I., 1990. Thymosin beta 10 levels in developing human brain and its regulation by retinoic acid in the HTB-10 neuroblastoma. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 8(2): 129-135.

Hill, A.V., Allsopp, C.E., Kwiatkowski, D., Anstey, N.M., Twumasi, P., Rowe, P.A., Bennet, S., Brewster, D., McMichael, A.J., Greenwood, B.M., 1991. Common west african HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature*, 352(6336): 595-600.

Hill, M.J., Morson, B.C., Bussey, H.J., 1978. Aetiology of adenoma – carcinoma sequence in large bowel. *Lancet*, 1(8058): 245-247.

Hughes, A.L. and Nei, M., 1988. Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. *Nature*, 335(6186): 167-170.

Ikeda, H., Lethe, B., Lehmann, F., van Baren, N., Baurain, J.F., De Smet, C., Chambost, H., Vitale, M., Moretta, A., Boon, T., and Coulie, P.G., 1997. Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity.*, 6(2): 199-208.

Imaizumi, T., Kuramoto, T., Matsunaga, K., Shichijo, S., Yutani, S., Shigemori, M., Oizumi, K., and Itoh, K., 1999. Expression of the tumor-rejection antigen SART1 in brain tumors. *Int. J. Cancer*, 83(6): 760-764.

Inoue, H., Li, J., Honda, M., Nakashima, H., Shibuta, K., Arinaga, S., Ueo, H., Mori, M., and Akiyoshi, T., 1995. MAGE-1 mRNA expression in gastric carcinoma. *Int. J. Cancer*, 64(1): 76-77.

Inoue, K., Karashima, T., Chikazawa, M., Iiyama, T., Yoshikawa, C., Furihata, M., Ohtsuki, Y., and Shuin, T., 1998. Overexpression of c-met proto-oncogene associated with chromophilic renal cell carcinoma with papillary growth. *Virchows Arch.*, 433(6): 511-515.

Ishikawa, T., Kobayashi, M., Mai, M., Suzuki, T., and Ooi, A., 1997. Amplification of the c-erbB-2 (HER-2/neu) gene in gastric cancer cells. Detection by fluorescence in situ hybridization. *Am. J. Pathol.*, 151(3): 761-768.

- Ito, T., Shiraki, K., Sugimoto, K., Yamanaka, T., Fujikawa, K., Ito, M., Takase, K., Moriyama, M., Kawano, H., Hayashida, M., Nakano, T., and Suzuki, A., 2000. Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 31(5): 1080-1085.
- Kallakury, B.V., Sheehan, C.E., Ambros, R.A., Fisher, H.A., Kaufman, R.P., Muraca, P.J., and Ross, J.S., 1998. Correlation of p34cdc2 cyclin-dependent kinase overexpression, CD44s downregulation, and HER-2/neu oncogene amplification with recurrence in prostatic adenocarcinomas. *J. Clin. Oncol.*, 16(4): 1302-1309.
- Kawakami, Y. and Rosenberg, S.A., 1996. T-cell recognition of self peptides as tumor rejection antigens. *Immunol. Res.*, 15(3): 179-190.
- Kawamoto, M., Shichijo, S., Imai, Y., Imaizumi, T., Koga, T., Yanaga, H., and Itoh, K., 1999. Expression of the SART-1 tumor rejection antigen in breast cancer. *Int. J. Cancer*, 80(1): 64-67.
- Kawasaki, H., Altieri, D.C., Lu, C.D., Toyoda, M., Tenjo, T., and Tanigawa, N., 1998. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res.*, 58(22): 5071-5074.
- Kisselev, A.F., Akopian, T.N., and Goldberg, A.L., 1998. Range of sizes of peptide products generated during degradation of different proteins by archaeal proteasomes. *J. Biol. Chem.*, 273(4): 1982-1989.
- Komatsu, H., Okayasu, I., Mitomi, H., Imai, H., Nakagawa, Y., and Obata, F., 2001. Immunohistochemical detection of human gastrointestinal glutathione peroxidase in normal tissues and cultured cells with novel mouse monoclonal antibodies. *J. Histochem. Cytochem.*, 49(6): 759-766.
- Koster, A., Landgraf, S., Leipold, A., Sachse, R., Gebhart, E., Tulusan, A.H., Ronay, G., Schmidt, C., and Dingermann, T., 1991. Expression of oncogenes in human breast cancer specimens. *Anticancer Res.*, 11(1): 193-201.
- Koumanov, K. and Infante, R., 1986. Phospholipid-transfer proteins in human liver and primary liver carcinoma. *Biochim. Biophys. Acta*, 876(3): 526-532.
- Kovats, S., Main, E.K., Librach, C., Stubblebine, M., Fisher, S.J., and DeMars, R., 1990. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science*, 248(4952): 220-223.
- Krook, J.E., Moertel, C.G., Gunderson, L.L., Wieand, H.S., Collins, R.T., Beart, R.W., Kubista, T.P., Poon, M.A., Meyers, W.C., Mailliard, J.A., 1991. Effective surgical adjuvant therapy for high-risk rectal carcinoma. *N. Engl. J. Med.*, 324(11):709-715.
- Kropshofer, H., Vogt, A.B., Thery, C., Armandola, E.A., Li, B.C., Moldenhauer, G., Amigorena, S., and Hammerling, G.J., 1998. A role for HLA-DO as a co-chaperone of HLA-DM in peptide loading of MHC class II molecules. *EMBO J.*, 17(11): 2971-2981.

- Lethe, B., Lucas, S., Michaux, L., De Smet, C., Godelaine, D., Serrano, A., De Plaen, E., and Boon, T., 1998. LAGE-1, a new gene with tumor specificity. *Int. J. Cancer*, 76(6): 903-908.
- Lin, S.C. and Morrison-Bogorad, M., 1990. Developmental expression of mRNAs encoding thymosins beta 4 and beta 10 in rat brain and other tissues. *J. Mol. Neurosci.*, 2(1): 35-44.
- Little, C.C., Tyzzer, E.E., 1916. Further experimental studies on the inheritance of susceptibility to a transplantable tumor, carcinoma (JWA) of the japanese waltzing mouse. *J. Med. Res.* 33: 393-453.
- Lopez-Nevot, M.A., Esteban, F., Ferron, A., Gutierrez, J., Oliva, M.R., Romero, C., Huelin, C., Ruiz-Cabello, F., and Garrido, F., 1989. HLA class I gene expression on human primary tumours and autologous metastases: demonstration of selective losses of HLA antigens on colorectal, gastric and laryngeal carcinomas. *Br. J. Cancer*, 59(2): 221-226.
- Lu, C.D., Altieri, D.C., and Tanigawa, N., 1998. Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas. *Cancer Res.*, 58(9): 1808-1812.
- Lugo, D.I., Chen, S.C., Hall, A.K., Ziai, R., Hempstead, J.L., and Morgan, J.I., 1991. Developmental regulation of beta-thymosins in the rat central nervous system. *J. Neurochem.*, 56(2): 457-461.
- Madden, D.R., Garboczi, D.N., Wiley, D.C., 1993. The antigenic identity of peptide-MHC complexes: comparison of the conformations of five viral peptides presented by HLA-A2. *Cell*, 75(4): 693-701.
- Mandruzzato, S., Brasseur, F., Andry, G., Boon, T., and van der, B.P., 1997. A CASP-8 mutation recognized by cytolytic T lymphocytes on a human head and neck carcinoma. *J. Exp. Med.*, 186(5): 785-793.
- Markert, J.M., Fuller, C.M., Gillespie, G.Y., Bubien, J.K., McLean, L.A., Hong, R.L., Lee, K., Gullans, S.R., Mapstone, T.B., and Benos, D.J., 2001. Differential gene expression profiling in human brain tumors. *Physiol Genomics*, 5(1): 21-33.
- Markowitz, S., Wang, J., Myeroff, L., Parsons, R., Sun, L., Lutterbaugh, J., Fan, R.S., Zborowska, E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., 1995. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer with microsatellite instability. *Science*, 268(5215): 1276-1277.
- Masuda, T., 1968. A search for a complement-fixing antibody in cancer patients against the tumor antigen of adenovirus type 12. *Gann*, 59(1): 79-82.
- McDougall, C.J., Ngoi, S.S., Goldman, I.S., Godwin, T., Felix, J., DeCosse, J.J., and Rigas, B., 1990. Reduced expression of HLA class I and II antigens in colon cancer. *Cancer Res.*, 50(24): 8023-8027.

Mikuz, G., Studler, G., Vilits, P., Tomschi, W., Maier, U., Sedlmayer, F., Albrecht, W., Kozak, W., Vierhapper, H., Tomschi, W., Hörtl, W., 1995. Nierenzellkarzinom, Nebennierentumoren. AUO-Manual (komplett) (www.uro.at/auo/auo5.htm).

Moll, R., Franke, W.W., Schiller, D.L., Geiger, B., and Krepler, R., 1982. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, 31(1): 11-24.

Momburg, F., Degener, T., Bacchus, E., Moldenhauer, G., Hammerling, G.J., and Moller, P., 1986. Loss of HLA-A,B,C and de novo expression of HLA-D in colorectal cancer. *Int. J. Cancer*, 37(2): 179-184.

Momburg, F. and Hammerling, G.J., 1998. Generation and TAP-mediated transport of peptides for major histocompatibility complex class I molecules. *Adv. Immunol.*, 68:191-256.: 191-256.

Monzo, M., Rosell, R., Felip, E., Astudillo, J., Sanchez, J.J., Maestre, J., Martin, C., Font, A., Barnadas, A., and Abad, A., 1999. A novel anti-apoptosis gene: Re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers. *J. Clin. Oncol.*, 17(7): 2100-2104.

Nakagawa, T., Roth, W., Wong, P., Nelson, A., Farr, A., Deussing, J., Villadangos, J.A., Ploegh, H., Peters, C., and Rudensky, A.Y., 1998. Cathepsin L: critical role in Ii degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science*, 280(5362): 450-453.

Nakagawa, T.Y., Brissette, W.H., Lira, P.D., Griffiths, R.J., Petrushova, N., Stock, J., McNeish, J.D., Eastman, S.E., Howard, E.D., Clarke, S.R., Rosloniec, E.F., Elliott, E.A., and Rudensky, A.Y., 1999. Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice. *Immunity.*, 10(2): 207-217.

Nakamura, T.M. and Cech, T.R., 1998. Reversing time: origin of telomerase. *Cell*, 92(5): 587-590.

Nakamura, T.M., Morin, G.B., Chapman, K.B., Weinrich, S.L., Andrews, W.H., Lingner, J., Harley, C.B., and Cech, T.R., 1997. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science*, 277(5328): 955-959.

Natali, P.G., Nicotra, M.R., Bigotti, A., Ventura, I., Marcenaro, L., Giacomini, P., and Russo, C., 1989. Selective changes in expression of HLA class I polymorphic determinants in human solid tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 86(17): 6719-6723.

Natali, P.G., Prat, M., Nicotra, M.R., Bigotti, A., Olivero, M., Comoglio, P.M., and Di Renzo, M.F., 1996. Overexpression of the met/HGF receptor in renal cell carcinomas. *Int. J. Cancer*, 69(3): 212-217.

Ndubisi, B., Sanz, S., Lu, L., Podczaski, E., Benrubi, G., and Masood, S., 1997. The prognostic value of HER-2/neu oncogene in cervical cancer. *Ann. Clin. Lab Sci.*, 27(6): 396-401.

- Neumann, E., Engelsberg, A., Decker, J., Storkel, S., Jaeger, E., Huber, C., Seliger, B., 1998. Heterogeneous expression of the tumor-associated antigens RAGE-1, PRAME, and glycoprotein 75 in human renal cell carcinoma: candidates for T-cell-based immunotherapies? *Cancer Res.*, 58(18): 4090-4095.
- O'Connell, M.J., Laurie, J.A., Kahn, M., Fitzgibbons, R.J., Erlichman, C., Shepherd, L., Moertel, C.G., Kocha, W.I., Pazdur, R., Wieand, H.S., Rubin, J., Vukov, A.M., Donohue, J.H., Krook, J.E., Figueredo, A., 1989. Prospectively randomized trial of postoperative adjuvant chemotherapy in patients with high-risk colon cancer. *J. Clin. Oncol.*, 16(1): 295-300.
- Oshima, R.G., Baribault, H., and Caulin, C., 1996. Oncogenic regulation and function of keratins 8 and 18. *Cancer Metastasis Rev.*, 15(4): 445-471.
- Parker, K.C., Bednarek, M.A., and Coligan, J.E., 1994. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J. Immunol.*, 152(1): 163-175.
- Parkham, P., Brodsky, F.M., 1981. Partial purification and some properties of BB7.2. A cytotoxic monoclonal antibody with specificity with specificity for HLA-A2 and a variant of HLA-A28. *Hum. Immunol.*, 3(4): 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(21): 4895-4901.
- Parsons, R.B., Smith, M.L., Williams, A.C., Waring, R.H., and Ramsden, D.B., 2002. Expression of nicotinamide N-methyltransferase (E.C. 2.1.1.1) in the Parkinsonian brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 61(2): 111-124.
- Patard, J.J., Brasseur, F., Gil-Diez, S., Radvanyi, F., Marchand, M., Francois, P., Abi-Aad, A., Van Cangh, P., Abbou, C.C., Chopin, D., 1995. Expression of MAGE genes in transitional-cell carcinomas of the urinary bladder. *Int. J. Cancer*, 64(1): 60-64.
- Pellat-Deceunynck, C., Mellerin, M.P., Labarriere, N., Jego, G., Moreau-Aubry, A., Housseau, J.L., Jotereau, F., and Bataille, R., 2000. The cancer germ-line genes MAGE-1, MAGE-3 and PRAME are commonly expressed by human myeloma cells. *Eur. J. Immunol.*, 30(3): 803-809.
- Petrelli, N., Douglass, H.O.Jr., Herrera, L., Russell, D., Stablein, D.M., Bruckner, H.W., Mayer, R.J., Schinella, R., Green, M.D., Muggia, F.M., 1989. The modulation of fluorouracil with leucovorin in metastatic colorectal carcinoma: a prospective randomized phase III trial. Gastrointestinal Tumor Study Group. *J. Clin. Oncol.*, 7(10): 1419-1426.
- Philpott, C.C., 2002. Molecular aspects of iron absorption: Insights into the role of HFE in hemochromatosis. *Hepatology*, 35(5): 993-1001.

- Poon, M.A., O'Connell, M.J., Wieand, H.S., Krook, J.E., Gerstner, J.B. Tschetter, L.K., Lewitt, R., Kardinal, C.G., Mailliard, J.A., 1992. Biochemical modulation of fluorouracil with leucovorin: confirmatory evidence of improved therapeutic efficacy in advanced colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.*, 10(5): 865.
- Rammensee, H.G., Bachmann, J., Emmerich, N., Stevanovic, S.: SYFPEITHI: An Internet Database for MHC Ligands and Peptide Motifs (access via: <http://www.uni-tuebingen.de/uni/kxi/>).
- Rammensee, H.G., Weinschenk, T., Goutefangeas, C., Stevanovic, S. 2002. Towards patient-specific tumor antigen selection for vaccination. *Immunol. Rev.*, 188:164-176.
- Rauscher, F.J., Morris, J.F., Tournay, O.E., Cook, D.M., and Curran, T., 1990. Binding of the Wilms' tumor locus zinc finger protein to the EGR-1 consensus sequence. *Science*, 250(4985): 1259-1262.
- Rees, R.C., Buckle, A.M., Gelsthorpe, K., James, V., Potter, C.W., Rogers, K., and Jacob, G., 1988. Loss of polymorphic A and B locus HLA antigens in colon carcinoma. *Br. J. Cancer*, 57(4): 374-377.
- 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(11): 5934-5943.
- Riethmüller, G., Holz, E., Schlimok, G., Schmiegel, W., Raab, R., Hoffken, K., Gruber, R., Funke, I., Pichlmaier, H., Hirche, H., Buggisch, P., Witte, J., Pichelmayer, R., 1998. Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial. *J. Clin. Oncol.*, 16(5): 1788-1794.
- Russo, V., Traversari, C., Verrecchia, A., Mottolese, M., Natali, P.G., and Bordignon, C., 1995. Expression of the MAGE gene family in primary and metastatic human breast cancer: implications for tumor antigen-specific immunotherapy. *Int. J. Cancer*, 64(3): 216-221.
- Saitoh, Y., Yaginuma, Y., and Ishikawa, M., 1999. Analysis of Bcl-2, Bax and Survivin genes in uterine cancer. *Int. J. Oncol.*, 15(1): 137-141.
- Santelli, G., Califano, D., Chiappetta, G., Vento, M.T., Bartoli, P.C., Zullo, F., Trapasso, F., Viglietto, G., and Fusco, A., 1999. Thymosin beta-10 gene overexpression is a general event in human carcinogenesis. *Am. J. Pathol.*, 155(3): 799-804.
- Saper, M.A., Bjorkman, P.J., and Wiley, D.C., 1991. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *J Mol Biol*, 219(2): 277-319.
- Sasatomi, T., Yamana, H., Shichijo, S., Tanaka, S., Okamura, T., Ogata, Y., Itoh, K., and Shirouzu, K., 2000. Expression of the SART1 tumor-rejection antigens in colorectal cancers. *Dis. Colon Rectum*, 43(12): 1754-1758.

- Schaafsma, H.E., Ramaekers, F.C., van Muijen, G.N., Lane, E.B., Leigh, I.M., Robben, H., Huijsmans, A., Ooms, E.C., and Ruiter, D.J., 1990. Distribution of cytokeratin polypeptides in human transitional cell carcinomas, with special emphasis on changing expression patterns during tumor progression. *Am. J. Pathol.*, 136(2): 329-343.
- Seliger, B., Rongcun, Y., Atkins, D., Hammers, S., Huber, C., Storkel, S., and Kiessling, R., 2000. HER-2/neu is expressed in human renal cell carcinoma at heterogeneous levels independently of tumor grading and staging and can be recognized by HLA-A2.1-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Int. J. Cancer*, 87(3): 349-359.
- Shepherd, J.C., Schumacher, T.N., Ashton-Rickardt, P.G., Imaeda, S., Ploegh, H.L., Janeway, C.A., and Tonegawa, S., 1993. TAP1-dependent peptide translocation in vitro is ATP dependent and peptide selective. *Cell*, 74(3): 577-584.
- Serwold, T., Gonzales, F., Kim, J., Jacob, R., Shastri, N., 2002. ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmatic reticulum. *Nature*, 419(6906): 443-445.
- Shichijo, S., Nakao, M., Imai, Y., Takasu, H., Kawamoto, M., Niiya, F., Yang, D., Toh, Y., Yamana, H., and Itoh, K., 1998. A gene encoding antigenic peptides of human squamous cell carcinoma recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 187(3): 277-288.
- Shintaku, I., Kawagoe, N., Yutani, S., Hoshi, S., Orikasa, S., Yoshizumi, O., and Itoh, K., 2000. Expression of the SART1 tumor rejection antigen in renal cell carcinoma. *Urol. Res.*, 28(3): 178-184.
- Shiver, J.W., Su, L., and Henkart, P.A., 1992. Cytotoxicity with target DNA breakdown by rat basophilic leukemia cells expressing both cytolysin and granzyme A. *Cell*, 71(2): 315-322.
- Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A., 1989. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, 244(4905): 707-712.
- Smith, S.I., Weil, D., Johnson, G.R., Boyd, A.W., Li, C.L., 1998. Expression of the Wilms' tumor suppressor gene, WT1, is upregulated by leukemia inhibitor factor and induces monocytic differentiation in M1 leukemic cells. *Blood*, 91: 764-773.
- Snell, G.D., 1948. Methods for the study of histocompatibility genes. *J. Genet.*, 49: 87-108.
- Soussi, T., Legros, Y., Lubin, R., Ory, K., and Schlichtholz, B., 1994. Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review. *Int. J. Cancer*, 57(1): 1-9.
- Speir, J.A., Stevens, J., Joly, E., Butcher, G.W., and Wilson, I.A., 2001. Two different, highly exposed, bulged structures for an unusually long peptide bound to rat MHC class I RT1-Aa. *Immunity*, 14(1): 81-92.

- Stein, B., Momburg, F., Schwarz, V., Schlag, P., Moldenhauer, G., and Moller, P., 1988. Reduction or loss of HLA-A,B,C antigens in colorectal carcinoma appears not to influence survival. *Br. J. Cancer*, 57(4): 364-368.
- Steinle, A., Schendel, D.J., 1994. HLA class I alleles of LCL 721 and 174x CEM.T2 (T2). *Tissue Antigens*, 44(4): 268-270.
- Stevanovic, S. and Jung, G., 1993. Multiple sequence analysis: pool sequencing of synthetic and natural peptide libraries. *Anal Biochem*, 212(1): 212-220.
- Stevanovic, S., 2002. Identification of tumour-associated T-cell epitopes for vaccine development. *Nat. Rev. Cancer*, 2(7):514-520.
- 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(12): 4029-4036.
- Stoltze, L., Schirle, M., Schwarz, G., Schroter, C., Thompson, M.W., Hersh, L.B., Kalbacher, H., Stevanovic, S., Rammensee, H.G., and Schild, H., 2000. Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nat. Immunol.*, 1(5): 413-418.
- Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P., and Nagata, S., 1993. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*, 75(6): 1169-1178.
- Tanaka, K., Iwamoto, S., Gon, G., Nohara, T., Iwamoto, M., and Tanigawa, N., 2000. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin. Cancer Res.*, 6(1): 127-134.
- Tanaka, K. and Kasahara, M., 1998. The MHC class I ligand-generating system: roles of immunoproteasomes and the interferon-gamma-inducible proteasome activator PA28. *Immunol Rev*, 163: 161-176.
- 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(20): 9461-9465.
- Traversari, C., van der, B.P., Luescher, I.F., Lurquin, C., Chomez, P., Van Pel, A., De Plaen, E., Amar-Costesec, A., and Boon, T., 1992. A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E. *J. Exp. Med.*, 176(5): 1453-1457.
- Trowsdale, J., Hanson, I., Mockridge, I., Beck, S., Townsend, A., and Kelly, A., 1990. Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the 'ABC' superfamily of transporters. *Nature*, 348(6303): 741-744.
- Tureci, O., Sahin, U., Schobert, I., Koslowski, M., Scmitt, H., Schild, H.J., Stenner, F., Seitz, G., Rammensee, H.G., and Pfreundschuh, M., 1996. The SSX-2 gene, which is

involved in the t(X;18) translocation of synovial sarcomas, codes for the human tumor antigen HOM-MEL-40. *Cancer Res.*, 56(20): 4766-4772.

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(17): 8976-8981.

Umeki, K., Shiota, G., and Kawasaki, H., 1999. Clinical significance of c-met oncogene alterations in human colorectal cancer. *Oncology*, 56(4): 314-321.

van Endert, P.M., 1999. Genes regulating MHC class I processing of antigen. *Curr Opin Immunol*, 11(1): 82-88.

Veillette, A., Foss, F.M., Sausville, E.A., Bolen, J.B., and Rosen, N., 1987. Expression of the lck tyrosine kinase gene in human colon carcinoma and other non-lymphoid human tumor cell lines. *Oncogene Res.*, 1(4): 357-374.

Vermorken, J.B., Claessen, A.M., van Tinteren, H., Gall, H.E., Einga, R., Meijer, S., Scheper, R.J., Meijer, C.J., Bloemena, E., Ransom, J.H., Hanna, M.G.Jr., Pinedo, H.M., 1999. Active specific immunotherapy for stage II and stage III human colon cancer: a randomised trial. *Lancet*, 353(9150):345-350.

Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A.M., Bos, J.L., 1988. *N. Engl. J. Med.*, 319(9): 525-532.

Von Knethen, A., Abts, H., Kube, D., Diehl, V., and Tesch, H., 1997. Expression of p56lck in B-cell neoplasias. *Leuk. Lymphoma*, 26(5-6): 551-562.

Wallny, H.J., Deres, K., Faath, S., Jung, G., Van Pel, A., Boon, T., and Rammensee, H.G., 1992. Identification and quantification of a naturally presented peptide as recognized by cytotoxic T lymphocytes specific for an immunogenic tumor variant. *Int. Immunol.*, 4(10): 1085-1090.

Wei, M.L. and Cresswell, P., 1992. HLA-A2 molecules in an antigen-processing mutant cell contain signal sequence-derived peptides. *Nature*, 356(6368): 443-446.

Wenzel, T., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., and Baumeister, W., 1994. Existence of a molecular ruler in proteasomes suggested by analysis of degradation products. *FEBS Lett.*, 349(2): 205-209.

Weterman, M.A., van Muijen, G.N., Ruiter, D.J., and Bloemers, H.P., 1993. Thymosin beta-10 expression in melanoma cell lines and melanocytic lesions: a new progression marker for human cutaneous melanoma. *Int. J. Cancer*, 53(2): 278-284.

Wolfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M., Wolfel, C., Klehmann-Hieb, E., De Plaen, E., Hankeln, T., Meyer zum Buschenfelde, K.H., and Beach, D., 1995. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science*, 269(5228): 1281-1284.

- Yamada, A., Kataoka, A., Shichijo, S., Kamura, T., Imai, Y., Nishida, T., and Itoh, K., 1995. Expression of MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3/-6 and MAGE-4a/-4b genes in ovarian tumors. *Int. J. Cancer*, 64(6): 388-393.
- Yamanaka, K., Miyake, H., Hara, I., Gohji, K., Arakawa, S., and Kamidono, S., 1998. Expression of MAGE genes in renal cell carcinoma. *Int. J. Mol. Med.*, 2(1): 57-60.
- Yoshino, I., Goedegebuure, P.S., Peoples, G.E., Parikh, A.S., DiMaio, J.M., Lyerly, H.K., Gazdar, A.F., and Eberlein, T.J., 1994. HER2/neu-derived peptides are shared antigens among human non-small cell lung cancer and ovarian cancer. *Cancer Res.*, 54(13): 3387-3390.
- Yutani, S., Shichijo, S., Inoue, Y., Kawagoe, N., Okuda, K., Kurohiji, T., Tanaka, M., Sata, M., and Itoh, K., 2001. Expression of the SART1 tumor-rejection antigen in hepatocellular carcinomas. *Oncol. Rep.*, 8(2): 369-372.
- Zielinski, C., Jakesz, R., 1999.: *Onkologie heute - Colorectales Carcinom*, Springer Wien, New York
- Zhu, Y.Y., Takashi, M., Miyake, K., and Kato, K., 1991. An immunochemical and immunohistochemical study of aldolase isozymes in renal cell carcinoma. *J. Urol.*, 146(2): 469-472.
- Zinkernagel, R.M. and Doherty, P.C., 1974. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature*, 248(450): 701-702.

Danksagung

Vielen Dank an Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für das Projekt, für die Unterstützung und die Geduld während dieser Doktorarbeit.

Besonders muß ich PD Dr. Stefan Stevanovic danken für die hervorragende Betreuung, für die allzeit geduldige Hilfe bei jedem noch so kleinem Problem, für ein immer offenes Ohr und seinen ansteckenden Optimismus.

Vielen Dank an Melanie Kraft und Patricia Hristic für die Einführung in viele der Arbeitstechniken und allzeitiger Hilfestellung bei technischen Problemen.

Besonderer Dank geht auch an Toni Weinschenk, Markus Schirle, Claudia Lemmel und Oliver Schoor für die sehr gute Zusammenarbeit, für das Durchführen unzähliger MS-Analysen sowie für die Durchführung der von DNA-Microarray- und qPCR-Experimente.

Vielen Dank an Dr. Thomas Kratt und Jörg Hennenlotter für ihre gute Kooperation was die Versorgung des Projektes mit Kolon- bzw. Nierenzellkarzinomen betrifft.

Vielen Dank an PD Dr. Dorothee Wernet für die vielen HLA-Typisierungen.

Vielen Dank auch an alle anderen Mitarbeiter des Labors die immer hilfsbereit und für jede Diskussion offen waren, vielen Dank für das gute Arbeitsklima.

Der größte Dank geht an meine Mutter und meinen Bruder für den immer währenden familiären Rückhalt.

