

**Identifizierung krankheitsassoziierter MHC-Liganden durch
massenspektrometrische Verfahren**

Dissertation

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

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

2001

vorgelegt von

Markus Schirle

Tag der mündlichen Prüfung:

19.4.2001

Dekan:

Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. H.-G. Rammensee

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. G. Jung

3. Berichterstatterin:

Dr. M. F. van den Broek

scientific progress goes „boink“!

Inhaltsverzeichnis:

1. EINLEITUNG	3
1.1 Das Immunsystem	3
1.2 MHC-Moleküle	4
1.3 Antigenprozessierung	8
1.4 MHC-Moleküle und T-Zellantwort	10
1.5 Tumorerkrankungen und das Immunsystem	11
1.5.1 Identifizierung und Klassifizierung von Tumorantigenen	11
1.5.2 Identifizierung von T-Zellepitopen zum Einsatz bei der antigenspezifischen Immuntherapie bei Tumoren	14
1.6 Viruserkrankungen - ein Beispiel: Bornakrankheit	16
1.7 Autoimmunkrankheiten - ein Beispiel: Insulin-abhängiger Diabetes mellitus	17
1.8 Sequenzanalyse von Peptiden und Proteinen	18
1.9 Zielsetzung	21
2. MATERIAL UND METHODEN	22
2.1 Peptidsynthese	22
2.2 Analytische Methoden	24
2.2.1 Massenspektrometrische Verfahren	24
2.2.1.1 Elektrospray-Ionisierung (ESI) Massenspektrometrie	24
2.2.1.2 Matrix-unterstützte Laserdesorptions Ionisierung (MALDI)	30
2.2.2 Edman-Abbau	31
2.3 Biochemische Methoden	34
2.3.1 N-terminale Acetylierung von Peptiden	34
2.3.2 Trypsinverdau von Protein nach Polyacrylamidgelelektrophorese	34
2.4 Epitopvorhersage	35
2.5 Suchalgorithmen und Sequenzdatenbanken im WWW	37
3. ERGEBNISSE	39
3.1 Der „Predict, Calibrate, Detect“-Ansatz zur Identifizierung tumor-assoziiertes MHC Klasse I-Liganden	39
3.1.1 Prinzip	39
3.1.2 Epitopvorhersage	41
3.1.3 Kalibrierung und Bestimmung der Sensitivität des HPLC-ESI-MS-Systems	43
3.1.4 Identifizierung des tumorassoziierten natürlichen HLA-A2-Liganden p53 ₃₂₂₋₃₃₀	45
3.1.5 Identifizierung des tumorassoziierten natürlichen HLA-A2-Liganden CEA ₆₉₄₋₇₀₂	47
3.1.6 Analyse von HLA-A2-Liganden von soliden Tumorproben	50
3.1.7 Identifizierung des tumorassoziierten natürlichen HLA-A2-Liganden MAGE-A1 ₂₇₈₋₂₈₆	52
3.2 Identifizierung virusspezifischer MHC Klasse I-Liganden durch HPLC-MS und -MS/MS-Analyse	56
3.3 Identifizierung von MHC Klasse II-präsentierten Peptiden aus dem IDDM-assoziierten Protein Glutaminsäuredecarboxylase 65	59

3.4 Identifizierung von MHC Klasse I und II-Liganden von Tumorzellen durch off-line Nanoelektrospray-MS/MS-Analyse	64
3.4.1 MHC Klasse I-Liganden der Melanomzelllinie M18	64
3.4.2 MHC Klasse II-Liganden der Melanomzelllinie M18	66
3.4.3 MHC Klasse I-Liganden von soliden Nierenzellkarzinomproben	68
3.5 Bestimmung und Bestätigung von MHC-Peptidmotiven anhand von Einzelliganden	70
3.5.1 Identifizierung von HLA-B*1510-Liganden	70
3.5.2 Identifizierung von HLA-DQ(α 1*0201/ β 1*0202)-Liganden	71
3.6 Massenspektrometrische Identifizierung neuer Proteasen im MHC Klasse I - Antigenprozessierungsweg	73
4 DISKUSSION	77
4.1 Der „Predict, Calibrate, Detect“-Ansatz zur Identifizierung tumor-assoziiertes MHC Klasse I-Liganden	77
4.2 Identifizierung virusspezifischer MHC Klasse I-Liganden durch HPLC MS und MS/MS-Analyse	82
4.3 Identifizierung von MHC Klasse II-präsentierten Peptide aus dem IDDM-assoziierten Protein Glutaminsäuredecarboxylase 65	83
4.4 Identifizierung von MHC Klasse I und II-Liganden von Tumorzellen durch off-line Nanoelektrospray MS/MS Analyse	86
4.5 Bestimmung und Bestätigung von MHC Peptidmotiven anhand von Einzelliganden	87
4.6 Massenspektrometrische Identifizierung neuer Proteasen im MHC Klasse I - Antigenprozessierungsweg	89
4.7 Zusammenfassung	91
5. PUBLIKATIONSLISTE	92
6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	93
7. LITERATUR	94
8. DANKSAGUNG	105
9. VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER	106
10. TABELLARISCHER LEBENSLAUF	107

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem der Vertebraten ist ein komplexer Verbund von Molekülen und Zellen mit der Fähigkeit, zwischen „selbst“ und „fremd“ zu unterscheiden. Seine Aufgabe ist einerseits der Schutz des Organismus vor Mikroorganismen wie Bakterien, Viren und Parasiten. Das Immunsystem ist andererseits aber auch in der Lage, Tumorzellen zu bekämpfen, die aufgrund genetischer Veränderungen ihre ursprünglichen Eigenschaften verloren haben und als „fremd“ erkannt werden.

Die vielfältigen Schutzmechanismen des Immunsystems lassen sich der natürlichen oder der adaptiven Immunantwort zuordnen.

Zu ersterer gehören physiologische Barrieren (z. B. die Haut), das Komplementsystem, Phagozyten, Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) und lösliche Mediatoren. Diese Mechanismen sind seit der Geburt vorhanden und zeichnen sich durch das Fehlen von Gedächtnis und Spezifität aus.

Das adaptive Immunsystem hingegen wird durch Lymphozyten vermittelt, die zum einen die natürliche Immunantwort verstärken und fokussieren. Zum anderen sind sie dafür verantwortlich, daß eine wiederholte Infektion eine verstärkte Immunantwort auslöst. Dieses Phänomen wird als immunologisches Gedächtnis bezeichnet. Die adaptive Immunantwort läßt sich weiter unterteilen in eine humorale und eine zelluläre Komponente:

Das humorale Immunsystem ist gegen extrazelluläre Antigene gerichtet und wird durch lösliche Antikörpermoleküle vermittelt, die von B Lymphozyten produziert werden.

Zu den wichtigsten Effektorzellen des zellulären Immunsystems gehören zytotoxische T Lymphozyten (*cytotoxic T lymphocytes*, CTL), die in der Lage sind, virusinfizierte Zellen sowie Tumorzellen zu erkennen und zu bekämpfen. Die Grundlage der adaptiven Erkennung ist in diesem Fall eine veränderte Proteinausstattung dieser Zellen im Vergleich zu normalen Zellen desselben Gewebes.

1.2 MHC-Moleküle

Sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort sind in ihrer Funktion von membranständigen Glykoproteinen abhängig, deren Aufgabe es ist, Peptide aus extrazellulären bzw. zytosolischen Proteinen zu binden und für die Erkennung durch T-Lymphozyten zu präsentieren. Diese Proteine werden beim Menschen als *Human Leucocyte Antigens* (HLA) bezeichnet. Sie werden von den Genen des *Major Histocompatibility Complex* (MHC) kodiert, der auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 lokalisiert ist.

Klassische MHC-Moleküle lassen sich nach Struktur und Funktion in zwei Klassen einteilen:

Während MHC Klasse I-Moleküle auf nahezu allen zellkernhaltigen Vertebratenzellen zu finden sind, werden MHC Klasse II-Moleküle in der Regel nur von spezialisierten, antigen-präsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*, APC), wie z. B. von B Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen, exprimiert.

MHC Klasse I-Moleküle (Abb.1.1) bestehen aus einer 45-kD- α -Kette, auch schwere Kette genannt, die nichtkovalent mit einem extrazellulären 12-kD-Polypeptid, dem β_2 -Mikroglobulin, assoziiert ist.

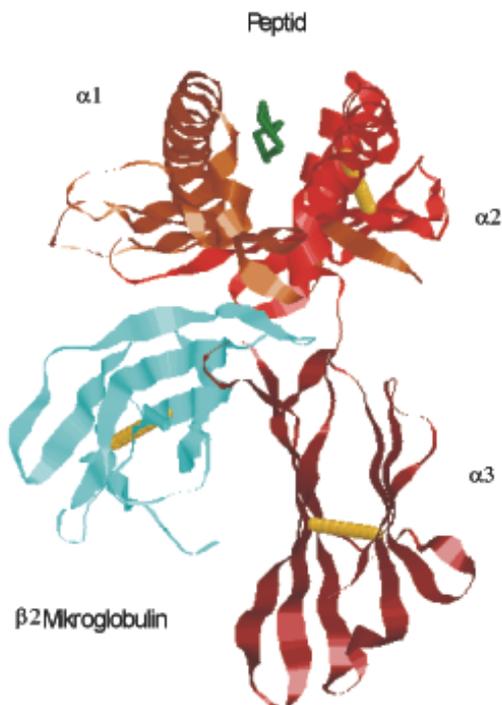


Abb. 1.1: Kristallstruktur des HLA-A2-Moleküls im Komplex mit einem Peptidliganden, Darstellung als Ribbon-Diagramm, das gebundene Peptid ist zur besseren Unterscheidung in der Backbone-Darstellung abgebildet [nach (1)]

Die α -Kette besitzt drei extrazelluläre Immunoglobulindomänen (α_{1-3}), eine Transmembranregion und eine kurze zytosolische Domäne.

MHC Klasse II-Moleküle (Abb. 1.2) bestehen dagegen aus zwei nichtkovalent assoziierten schweren Ketten, α (34 kD) und β (29 kD), die jeweils zwei extrazelluläre Immunoglobulindomänen (α_1 und α_2 bzw. β_1 und β_2), eine Transmembranregion und eine kurze zytosolische Domäne besitzen.

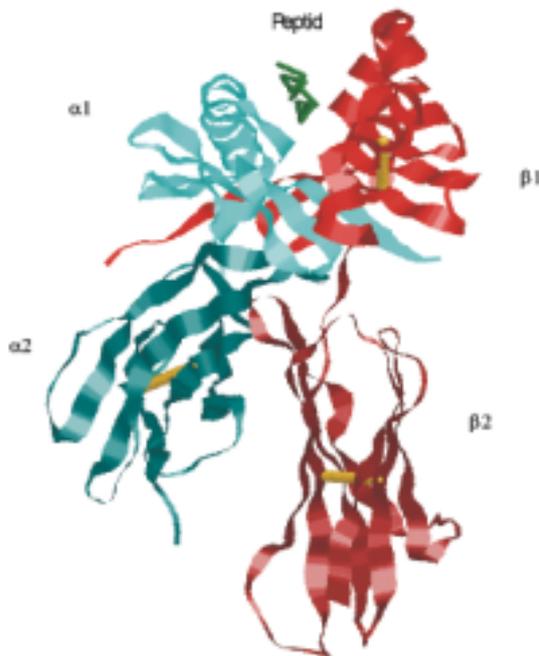


Abb.1.2: Kristallstruktur des HLA-DR1-Moleküls im Komplex mit dem Peptidliganden PKYVKQNTLKLAT aus dem Influenza A Virus Hämagglutinin (306-313) [nach (2)], Darstellung wie in Abb 1.1

Für die schweren Ketten von MHC Klasse I-Molekülen sowie die α - und β -Ketten der MHC Klasse II-Moleküle befinden sich beim Menschen auf Chromosom 6 je drei Loci: HLA-A, -B und -C für Klasse I, HLA-DP, -DQ und -DR für Klasse II.

Diese Gene zeichnen sich durch einen außergewöhnlich starken Polymorphismus auf: So waren im Oktober 2000 z. B. 195 HLA-A-Allele, 399 HLA-B-Allele, 20 HLA-DQA1 Allele sowie 320 HLA-DRB Allele bekannt (IMGT/HLA Database release 1.8.0, <http://www.anthonynolan.org.uk/HIG/>). Dagegen ist das auf Chromosom 15 liegende Gen für β_2 -Mikroglobulin nicht polymorph.

Die Bindung eines Peptids durch ein MHC-Molekül erfolgt über die zwei N-terminalen Domänen der schweren Ketten. Im Falle des MHC Klasse I-Moleküls sind dies die α_1 - und die α_2 -Domänen, im Falle des MHC Klasse II-Moleküls die α_1 - und die β_1 -Domänen. Diese bilden eine längliche Peptidbindungsgrube, deren Boden von einer β -Faltblattstruktur gebildet wird, die seitlich von zwei α -helikalen Bereichen begrenzt ist (Abb. 1.3). Die Peptidbindungsgrube erlaubt die Bindung von Peptiden über nichtkovalente Wechselwirkungen und ist der Bereich, in dem

sich die verschiedenen Allelprodukte am stärksten unterscheiden. Die größten Anteil haben bei MHC Klasse I-Molekülen Bereiche der α_1 -Helix, für MHC-Klasse II-Moleküle unter anderem der β_1 -Helix. Diese treten in Wechselwirkung mit den sogenannten „Ankerminosäuren“ des gebundenen Peptides, die nach allen Kristallstrukturen von der MHC-Moleküloberfläche weg zur β -Faltblattstruktur der Bindungsgrube hin orientiert sind.

Im Falle der MHC Klasse I-Moleküle sind außerdem die C- und N-Termini des Liganden an den geschlossenen Grubenenden fixiert. Daher ergibt sich für MHC Klasse I-Liganden eine charakteristische Länge von meist 9 Aminosäuren. Dagegen sind die Peptidbindungsgruben von MHC Klasse II-Molekülen an den Enden offen, weshalb die Liganden eine variabelere Länge von 9-25 Aminosäuren aufweisen.

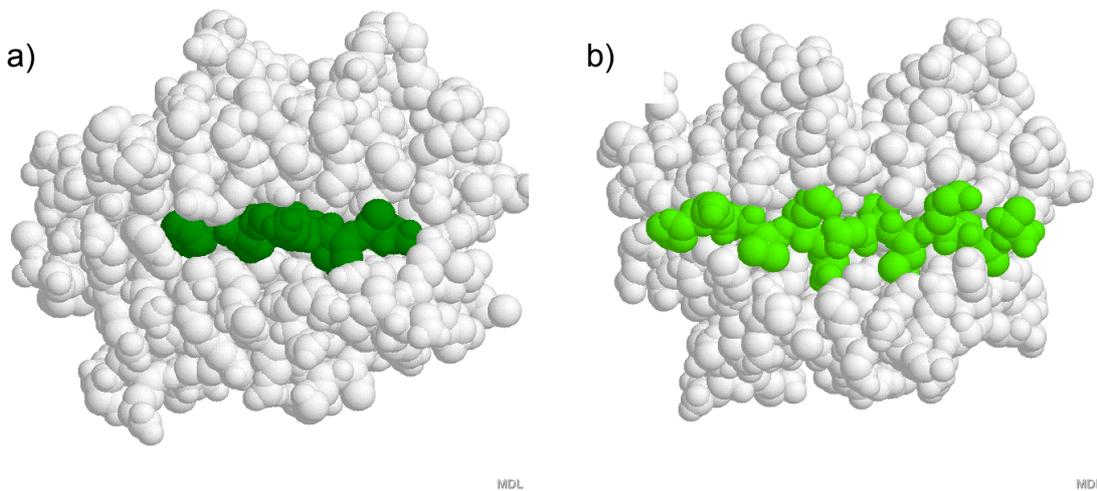


Abb.1.3: Peptidbindungsgruben von MHC-Molekülen aus der Sicht eines T-Zellrezeptors
a) Peptidbindungsgrube eines H2-K^b-Moleküls mit gebundenem viralen Nonapeptid; b) Peptidbindungsgrube eines HLA-DR1-Moleküls mit einem Influenza-Tridecapeptid (siehe Abb. 1.2)

Die Tatsache, daß die Peptidbindungsgruben der einzelnen HLA-Allelprodukte jeweils charakteristische chemische Verhältnisse aufweisen, führt dazu, daß Peptide, die an ein bestimmtes Allelprodukt binden, strukturelle Gemeinsamkeiten besitzen. Es ergibt sich für jedes Allel ein „Peptidmotiv“ (3), das Länge und Besetzung der bindungsentscheidenden Positionen eines idealen Liganden beschreibt. Die Identifizierung von Peptidmotiven wurde durch die Entwicklung eines Elutionsverfahrens für MHC-gebundene Peptide und der Pool-Sequenzierung des erhaltenen Gemischs möglich (4;5).

Inzwischen konnte für viele MHC-Allele das entsprechende Peptidmotiv identifiziert werden, als Beispiel ist hier das Motiv für HLA-A*6601 dargestellt.

Position	<u>1</u>	2	3	4	5	6	7	8	9
Anker- und Hilfsanker-aminosäuren	<u>E</u> <u>D</u>	T V							R K
Sonstige bevorzugte Aminosäuren		A P L I V	F Y K I	D E G K L P Q R S	G P Q V	G I M T V	Y L R	E K Q R	

Abb.1.4: Peptidmotiv für HLA-A*6601; Anker-aminosäuren sind fett gedruckt, Hilfsanker sind unterstrichen (6)

Der starke Polymorphismus der MHC-Moleküle führt dazu, daß die meisten Individuen heterozygot sind und damit wegen der kodominanten Expression der Gene der schweren Ketten z. B. sechs verschiedene MHC-I-Moleküle besitzen. Auf Populationsebene betrachtet, erhöht sich dadurch die Wahrscheinlichkeit, daß Peptide aus einem beliebigen Pathogen von einem ausreichenden Teil der Bevölkerung durch MHC-Moleküle präsentiert werden können und damit eine überlebenssichernde Immunantwort auslösen. Entsprechend werden lokale Allelfrequenzen durch das Auftreten bestimmter Pathogene beeinflusst. Beispielsweise ist das HLA-B*5301, das besonders effizient ein Epitop aus einem Protein der leberresistenten Form des Malariaerregers *Plasmodium falciparum* präsentiert, in 20-40 % der westafrikanischen Population vorhanden, jedoch nur in 1 % der kaukasischen Population (7).

1.3 Antigenprozessierung

Die Beladung der MHC-Moleküle mit Peptiden erfolgt für Klasse I und II auf unterschiedlichen Wegen, die sich aus der unterschiedlichen Herkunft der Peptide ergeben.

MHC-I-präsentierte Peptide sind in erster Linie zytosolischen Ursprungs und entstehen durch intrazelluläre Proteolyse von Proteinen. Auf gesunden Zellen sind dies folglich Selbstpeptide, die den regulären zytosolischen Proteinbestand widerspiegeln. Im Falle einer virusinfizierten Zelle oder einer Tumorzelle werden dagegen auch Peptide aus virus- bzw. tumorspezifischen Proteinen präsentiert. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß neben dem normalen Proteinmetabolismus ein weiterer Mechanismus für einen Großteil der MHC Klasse I-präsentierten Peptide verantwortlich ist: Durch Fehler während der ribosomalen Translation der RNA, wie z. B. einem vorzeitigem Abbruch, entstehen sogenannte DriPs (*defective ribosomal products*), die sofort abgebaut werden und damit Nachschub für die Beladung von MHC Klasse I-Molekülen liefern (8;9).

Die wichtigste Rolle beim intrazellulären Proteinabbau kommt dem Proteasom zu, einem in Zytosol und Kernmatrix lokalisierten Multienzymkomplex. Die Entdeckung der durch das Zytokin Interferon- γ (IFN- γ) induzierbaren proteasomalen Untereinheiten LMP2 und LMP7 stellten einen ersten konkreten Hinweis auf eine Beteiligung des Proteasoms an der Klasse-I-Antigenprozessierung dar. Inzwischen konnte nachgewiesen werden, daß Inhibition des Proteasoms durch den spezifischen Inhibitor Lactacystin die MHC-Klasse I-vermittelte Antigenpräsentation blockiert (10). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß das Proteasom tatsächlich für die Generierung der C-Termini von MHC-Klasse I-Liganden verantwortlich ist (11). Daneben sind weitere Proteasen, wie möglicherweise die IFN- γ -induzierbare Leucinaminopeptidase, (12) an der Prozessierung N-terminal verlängerter Vorläuferpeptide beteiligt („Trimming“).

Das humane Proteasom besteht aus einer katalytisch aktiven Kernkomponente, dem 20S-Proteasom, das *in vivo* zumindest teilweise in Komplex mit dem 19S-Aktivator als sogenanntes 26S-Proteasom vorliegt. Das 20S-Proteasom ist einen faßartigen Komplex aus vier übereinanderliegenden Ringen aus je sieben α -Untereinheiten (äußere Ringe) und sieben β -Untereinheiten (innere Ringe). Nur je drei β -Untereinheiten ($\beta_1/\beta_2/\beta_5$) stellen enzymatisch aktive Zentren mit jeweils unterschiedlichen Schnittspezifitäten dar. Man unterscheidet für das konstitutive

Proteasom eine tryptische, eine chymotryptische und eine peptidylglutamyl-peptidyl-spezifische Aktivität. Unter Einfluß von IFN- γ , z. B. im Zusammenhang mit einer viralen Infektion, kommt es zu einem Austausch der konstitutiven aktiven β -Untereinheiten durch die schon erwähnten MHC-codierten Untereinheiten LMP2 und LMP7 (13) sowie die MECL1-Untereinheit (14;15). Vergleicht man die Schnittmuster des humanen konstitutiven Proteasoms und dieses sogenannten Immunoproteasoms, so ergeben sich vermehrt Schnitte nach hydrophoben Aminosäuren, jedoch weniger Schnitte nach sauren Aminosäuren (16). Damit entstehen vermehrt potentielle MHC Klasse I-Liganden, da alle bekannten Peptidmotive für humane MHC-Klasse I-Moleküle C-terminal entweder hydrophobe oder basische Aminosäuren fordern. Ebenfalls durch IFN- γ wird der 11S-Aktivator (PA28) induziert, der das 20S-Proteasom *in vitro* aktiviert (17), dessen genauer Funktionsmechanismus *in vivo* jedoch noch nicht eindeutig geklärt ist.

Die durch das Proteasom gebildeten Peptide gelangen über das heterodimere Transportprotein TAP (*Transporter associated with Antigen Processing*) ATP-abhängig in das endoplasmatische Retikulum (ER). Dort bindet das Peptid, nach möglicher Assoziation mit Chaperonen (z. B. gp96 (18), Protein-Disulfid-Isomerase (19)) und nach möglicher weiterer Prozessierung durch ER-ständige Proteaseaktivitäten (20) an ein geeignetes leeres MHC Klasse I-Molekül. Diese leeren MHC-Moleküle können in einem Beladungskomplex mit weiteren Molekülen wie Tapasin, das eine Verbindung zu TAP herstellt (21), sowie Calretikulin (22) und ER60 (23) vorliegen. Aus dem ER gelangt der trimere Komplex aus Peptid, schwerer Kette und β_2 -Mikroglobulin auf dem regulären Exozytoseweg für Membranproteine über den Golgi-Komplex und exozytotische Vesikel an die Zelloberfläche.

Peptide, die auf MHC Klasse II-Molekülen präsentiert werden, stammen dagegen aus Proteinen, die in das endosomale/lysosomale Kompartiment gelangen. Dies können zytosolische, extrazelluläre Proteine oder Membranproteine sein. Die Aufnahme eines exogenen Proteins kann entweder unspezifisch durch Pinozytose und Phagozytose oder spezifisch durch rezeptorvermittelte Endozytose geschehen (24). Anschließend erfolgt in den angesäuerten Vesikeln die Spaltung des Proteins in Peptide durch eine Reihe lysosomaler Proteasen, wie z. B. Cathepsin S und B. Leere MHC Klasse II-Moleküle werden nach ihrer Synthese im ER nach Komplexbildung mit der „Invariant Chain“ (Ii) ebenfalls in das späte endosoma-

le/lysosomale Kompartiment gelotst. Dabei bindet ein Teil von Ii in der Peptidbindungsgrube. Im lysosomalen Kompartiment kommt es zum Abbau von Ii bis auf das in der Bindungsgrube lokalisierte und damit geschützte Peptid (*class II-associated invariant chain peptide*, CLIP). Ein weiteres Molekül, HLA-DM, katalysiert im Fall von HLA-DR den Austausch von CLIP gegen hochaffine Peptide exogenen Ursprungs (25). Schließlich wird analog zur Klasse I-Antigenprozessierung der trimere Komplex aus den schweren Ketten und Peptid in Vesikeln zur Zelloberfläche transportiert.

Für die Stabilität von MHC-Molekülen an der Zelloberfläche ist das gebundene Peptid von entscheidender Bedeutung. Gelangt im MHC Klasse I-Weg der unbeladene dimere Komplex aus schwerer Kette und β_2 -Mikroglobulin im Zuge des konstitutiven Exozytoseweges an die Oberfläche, so erfolgt rasche Abdissoziation des β_2 -Mikroglobulin und schließlich Reinternalisierung der schweren Kette (26).

1.4 MHC-Moleküle und T-Zellantwort

Die unterschiedliche Herkunft der MHC Klasse I- und II-präsentierten Peptide spiegeln sich in der Erkennung durch unterschiedliche Effektorzellen wider.

Im MHC Klasse I-System sind dies $CD8^+$ CTL. Reife CTL zirkulieren bis zur Erkennung eines Peptid-MHC-Komplexes ständig im Körper und passieren dabei die lymphatische Gewebe wie z. B. die Lymphknoten, in denen eine hohe Dichte an APC herrscht. Der Erkennungsprozeß in Zusammenhang mit einem von der APC gelieferten kostimulierenden Signal führt zur Aktivierung der CTL und ihrer sekretorischen und rezeptorvermittelten zytotoxischen Mechanismen gegen krankhaft veränderte Zielzellen in der Peripherie (27). Daneben produzieren CTL Zytokine wie z. B. Interferon- γ , die u. a. Entzündungsreaktionen induzieren, die Antigenpräsentation stimulieren und virale Replikationsvorgänge inhibieren.

Die Erkennung MHC Klasse II-präsentierter Peptide auf APC erfolgt durch $CD4^+$ T-Zellen. Der Erkennungsprozeß führt zur Ausschüttung von Zytokinen, wobei sich nach Funktion und Zytokinmuster zwei Untergruppen einteilen lassen: Th1- oder inflammatorische T-Zellen, deren Leitzytokin IFN- γ ist, aktivieren Makrophagen, intravesikuläre Bakterien abzutöten. Th2- oder Helfer-T-Zellen, deren Leitzytokin Interleukin 4 ist, aktivieren dagegen die Antikörperproduktion durch B

Lymphozyten und sind damit für die humorale Immunantwort von entscheidender Bedeutung.

Alle T-Zellen durchlaufen während ihrer Reifungsphase im Thymus Selektionsprozesse, die für die Funktionalität der spezifischen Immunantwort eines Individuums entscheidend sind. Die positive Selektion bedeutet Selektion nur solcher T-Zellen, die Peptide im Kontext der selbst-MHC-Moleküle erkennen. Die negative Selektion dagegen führt zur Apoptose solcher T-Zellen, die Peptide erkennen, die auch auf gesunden Körperzellen präsentiert werden. Ergänzend kann es in der Peripherie zu einer Inaktivierung selbstreaktiver T-Zellen durch Anergie kommen. Letzteres stellt sicher, daß auch solche T-Zellen inaktiviert werden, die ein lokal, gewebsspezifisch exprimiertes Antigen erkennen. Die Bedeutung der Mechanismen der negativen Selektion wird an Autoimmunkrankheiten deutlich, wo es zu einer Immunreaktion gegen körpereigene Antigene kommt (siehe unten).

1.5 Tumorerkrankungen und das Immunsystem

1.5.1 Identifizierung und Klassifizierung von Tumorantigenen

Da sich Tumorzellen in ihrer Proteinausstattung von gesunden Zellen desselben Gewebes unterscheiden und Peptide aus zytosolischen Tumorantigenen auf MHC-I-Molekülen präsentieren, können sie unter Umständen durch autologe CTL erkannt und bekämpft werden.

Diese Tatsache, deren Mechanismus im Mausmodell schon seit Jahren bekannt ist (28;29), konnte mit der Entdeckung tumorassoziierter Antigene auch für das humane System direkt nachgewiesen werden (30).

Dabei kamen verschiedene Ansätze zur Identifizierung immunologisch relevanter Tumorantigene zum Einsatz:

Die Identifizierung der ersten Antigene erfolgte mit Hilfe klonaler tumorinfiltrierender Lymphozyten (TIL). Deren Isolierung gelingt nur für Melanome relativ häufig, so daß diesen eine klare Sonderstellung unter humanen Tumoren eingeräumt werden muß. Bei diesem genetischen Ansatz werden HLA-identische Melanomzelllinien, die von den TIL nicht erkannt werden, mit cDNA-Bibliotheken aus Melanomzellen, die erkannt werden, transfiziert und so das immunologisch relevante Antigen identifiziert (31). In anderen Fällen wurden MHC-gebundene Peptide elu-

iert, aufgetrennt und die Fraktionen zur Beladung von Zielzellen benutzt. Das relevante Peptid in einer CTL-reaktiven Fraktion wurde direkt durch Massenspektrometrie identifiziert (32). Die SEREX-Methode (*Serological screening of cDNA expression libraries*) (33) nutzt dagegen die Tatsache, daß im Serum vieler Patienten tumorspezifische Antikörper nachgewiesen werden können. Diese Antikörper erkennen tumorassoziierte Proteine, gegen die auch eine zelluläre Immunantwort angenommen wird. Das Serum dieser Patienten wird zum Screening von *in vitro* translatierten cDNA-Bibliotheken aus Tumorzellen (oder Testisgewebe, siehe unten) eingesetzt.

Die bekannten tumorassoziierten Antigene lassen sich anhand ihrer Expressionsmuster und -mechanismen in zahlreiche Klassen einteilen:

1.) tumorspezifische Proteine

Diese Proteine werden von Genen codiert, die in normalem adulten Gewebe nicht exprimiert werden. Eine Ausnahme stellen Zellen der männlichen Keimbahn dar, die keine MHC Klasse I-Moleküle tragen. Die codierten Proteine werden wegen dieses Expressionsmusters oft auch als Cancer-Testis-Antigene bezeichnet. Dazu gehören unter anderem Proteine, die von der *MAGE*-Genfamilie (34) codiert werden und durch die SEREX-Methode identifizierte Tumorantigene wie z. B. NY-ESO1 (35). Die Expression dieser Gene konnte für Tumoren unterschiedlichster histologischer Herkunft nachgewiesen werden. Die Ursache für die tumorspezifische Expression scheint im Falle der *MAGE*-Gene im Zusammenhang mit einer unspezifischen, genomweiten Demethylierung der DNA zu stehen, die zu einer Aktivierung des *MAGE*-Promoters führt (36;37).

2.) gewebsspezifische Differenzierungsantigene

Viele CTL, die gegen Melanomzellen gerichtet sind, erkennen auch Melanozyten, nicht jedoch andere Zellen. Die Ursache dafür liegt in der Erkennung melanozytenspezifischer Antigene, zu denen z. B. Tyrosinase (38;39) und gp100 (40) gehören, deren Gene in anderen Geweben nicht exprimiert werden.

3.) durch Genmutationen und -fusionen entstandene Antigene

In manchen Fällen führen mutationsbedingte Aminosäuresubstitutionen zu neuen tumorspezifischen MHC-Liganden, die allerdings häufig nur im autologen Tumor auftreten. Eine Ausnahme stellt eine Mutation in der Cyclin-abhängige Kinase 4 (CDK4) dar, die in mehreren Melanomen gefunden wurde (41). Im

Falle dieses Zellzyklusregulators verhindert die Aminosäuresubstitution die Bindung eines Inhibitors und ist damit direkt für die Transformation verantwortlich. Ein weiteres Beispiel ist β -Catenin, ein zytoplasmatisches Protein, das an Zelladhäsionsvorgängen beteiligt ist und das Genprodukt des Adenomatous Polyposis Coli-Tumorsuppressorgens bindet. Hier führt eine Punktmutation zu einem neuen immunogenen, HLA-A24 restringierten Epitop, das von TIL erkannt wird (42). Chromosomale Translokationen können zu tumorspezifischen Fusionsproteinen führen. So ist das bcr-abl-Fusionsprotein in chronischer myeloider Leukämie Ziel spezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen (43).

4.) überexprimierte Antigene

Genetische Modifikationen können auch zu Überexpression von Proteinen führen, die dadurch für eine tumorspezifische Immunantwort relevant werden. Beispiele für diesen Mechanismus sind zum Beispiel das Onkoprotein HER-2/neu, das in 30 % der Brust- und Ovarialkarzinome überexprimiert ist (44), oder das Tumorsuppressorprotein p53 (45;46).

5.) durch irreguläre Transkriptions-, Splicing- und Translationsereignisse entstandene Antigene

In manchen Fällen konnten tumorspezifische T-Zellepitope auf Expression z. B. von Intronsequenzen (47;48) zurückgeführt werden. Auch die Verwendung alternativer Leserahmen kann zu immunologisch relevanten Tumorantigenen führen. So ist für das RAGE-1 Gen ein HLA-B7-präsentiertes Epitop aus Leserahmen 2 und ein HLA-B8-präsentiertes Epitop aus Leserahmen 5 bekannt (49;50) In zwei Fällen konnte zudem Epitope identifiziert werden, die in Leserahmen ohne reguläres Startcodon AUG codiert werden (51;52).

6.) virale Antigene

Auch onkovirale Proteine stellen potentielle Tumorantigene dar, so z. B. das Onkoprotein E7 des Human Papilloma Virus 16 (53).

Daneben gibt es eine Reihe bislang hypothetischer Mechanismen. So gibt es Hinweise auf die Existenz phosphorylierter (54) und glykosylierter (55) MHC Klasse I-Liganden *in vivo*. Damit ist eine Erkennung von Tumorzellen aufgrund veränderter posttranslationaler Modifizierungsmuster denkbar.

1.5.2 Identifizierung von T-Zellepitopen zum Einsatz bei der antigenspezifischen Immuntherapie bei Tumoren

Ziel einer spezifischen Immuntherapie bei Tumorerkrankungen ist die Induktion einer dauerhaften T-Zell-Antwort gegen MHC Klasse I- und II-restringierte Tumorantigene (56). Dabei haben sich zwei grundsätzliche Strategien herauskristallisiert: Zum einen die Vakzinierung unter Verwendung ganzer Tumorzellen, eines Tumorsates oder Hybridzellen aus Tumorzellen und dendritischen Zellen, zum anderen antigenspezifische Vakzinierungen.

Der Vorteil von Vakzinen, die auf Tumorzellen - insbesondere auf autologen Tumorzellen - basieren, besteht darin, daß sie prinzipiell gegen alle relevanten Tumorantigene gerichtet sind. Dieser Ansatz setzt daher, zumindest im Hinblick auf die Vakzinentwicklung, die vorherige Identifizierung von Tumorantigenen nicht voraus. Andererseits lassen sich mögliche therapeutischen Effekte nur schwer auf klar definierte immunologische Vorgänge zurückführen. Zwar konnte in einzelnen Fällen während der klinischen Antwort auch eine spezifische T-Zellantwort gegen definierte Antigene nachgewiesen werden (57-59), jedoch ist unklar, inwiefern sich diese Ergebnisse auf Vakzinierungsstrategien bei großen Patientengruppen übertragen lassen.

Dagegen ist bei antigenspezifischen Strategien eine systematische Analyse der vakzininduzierten Immunität bei einer klinischen Antwort und eine Verbesserung der Strategie aufgrund empirischer Befunde möglich.

Dabei kommt der Identifizierung von T-Zellepitopen eine wichtige Rolle zu. Zum einen zur Entwicklung von Peptidvakzinen, deren Hauptbestandteil ein oder mehrere Epitope darstellen, wobei inzwischen oft sowohl CTL- als auch Helferzelepitope zum Einsatz kommen, um einen möglichst umfassenden Aktivierungseffekt zu erzielen (60). Zum anderen zum Nachweis peptidspezifischer CTL und Helferzellen mit MHC-Tetrameren (61). Diese Komplexe bestehen aus vier Peptid-MHC-Komplexen, wobei die schweren Ketten eine zusätzliche Biotinylierungssequenz besitzen. Durch Bindung an Streptavidin können diese gekoppelt und der Komplex über einen an das Streptavidin gebundenen Fluoreszenzfarbstoff detektiert werden.

Zur Identifizierung von T-Zellepitopen stehen generell drei Ansätze zur Verfügung, wobei am Ende jeweils der Nachweis der Erkennung durch T-Zellen steht:

Zunächst durch das Fine-Mapping von Epitopen mittels Expression verkürzter Gene oder Synthese überlappender Peptide, die ein Proteinsequenz abdecken. Zum anderen durch Extraktion und Auftrennung MHC-gebundener Peptide und anschließender Untersuchung der Fraktionen auf CTL-Reaktivität hin. Die Identifizierung des immunogenen Peptides erfolgt z. B. durch Massenspektrometrie. Am meisten Bedeutung kommt jedoch seit der Identifizierung und sukzessiven Optimierung von Peptidmotiven der theoretischen Vorhersage von MHC Klasse I- (und in zunehmendem Maße auch MHC Klasse II-) Liganden aus Proteinsequenzen (62;63) und anschließender Untersuchung der Erkennung der Peptide durch T-Zellen zu („Reverse Immunologie“ (64)). Diese Peptidmotive werden entweder aus Aminosäuresequenzen natürlicher Liganden abgeleitet (3) oder basieren auf Bindungsstudien mit synthetischen Peptiden bzw. Peptidbibliotheken (65;66). Vergleiche zeigten allerdings, daß für MHC Klasse I-Moleküle Unterschiede zwischen Peptidbindung und Peptidpräsentation bestehen. Besonders für die C-terminale Aminosäure wird in reinen Bindungstests eine größere Variabilität gefunden (67). Natürliche Liganden spiegeln daher als Produkte der zellulären Antigenprozessierungsmaschinerie in gewissem Maße auch die Spezifitäten der daran beteiligten Komponenten wider.

Seitdem die ersten CTL-Epitope aus melanomspezifischen Tumorantigenen identifiziert werden konnten (32;39;68;69) wurden für zahlreiche tumorassoziierte Proteine Versuche zur Bestimmung der entsprechenden T-Zellepitope unternommen. Dabei zeigte sich, daß durch *ex vivo*-Stimulation von Lymphozyten mit synthetischen Peptiden z. B. aus p53 (70) oder MUC2 (71) bzw. durch Peptidvakzination mit synthetischen Peptiden aus RAS (72) durchaus peptidspezifische T-Zellen generiert werden können. Diese T-Zellen sind allerdings oft nicht in der Lage, Tumorzellen zu erkennen, die das betreffende Tumorantigen endogen exprimieren. Mögliche Gründe hierfür sind u. a. ausbleibende Generierung des erwarteten Epitops bei der Antigenprozessierung, eine geringe Affinität der generierten T-Zellen, eine verminderte Expression von Komponenten der Antigenprozessierung oder -präsentation in den Tumorzellen, oder allgemein eine zu geringe Zahl an MHC-Peptid-Komplexen an der Tumorzelloberfläche, um eine spezifische Immunantwort auszulösen.

Inzwischen sind eine Reihe klinischer Phase I-Studien zur Vakzination von Tumorpatienten unter Verwendung von T-Zellepitopen durchgeführt worden (57;73-76), die zeigten, daß keine nennenswerten Nebenwirkungen zu erwarten sind und

peptidspezifische T-Zellantworten ausgelöst werden können. Allerdings wurde nur in einem Teil der Patienten eine signifikante Abnahme der Tumorlast beobachtet. Die Applikation erfolgte in den meisten Fällen in Form von peptidbeladenen dendritischen Zellen oder als reines Peptid in Adjuvans.

Zudem zeigte sich, daß ein möglichst breit wirksames Vakzin wünschenswert ist, das eine Reihe von CTL-Epitopen sowie T Helferzellepitope aus verschiedenen Tumorantigenen und mit verschiedener MHC-Restriktion umfaßt (77). Neben einer Einsatzmöglichkeit bei vielen Patienten und einer generell breiteren induzierten T-Zellantwort spricht für solche multiplen Vakzine auch die geringere Wahrscheinlichkeit, daß sich der Tumor dem Immunsystem durch Verlust des angegriffenen Tumorantigens entziehen kann (78).

Daher ist die Identifizierung neuer T-Zellepitope aus Tumorantigenen auch weiterhin von großer Bedeutung, auch wenn sich solche Ergebnisse nicht mehr unbedingt in den wichtigsten immunologischen Zeitschriften publizieren lassen...

1.6 Viruserkrankungen - ein Beispiel: Bornakrankheit

Borna Disease Virus (BDV) ist ein (-)RNA-Virus aus der Familie der *Bornaviridae* in der Ordnung der *Mononegavirales*. Es ist der Verursacher der Bornakrankheit, einer Enzephalomyelitis, die in einer Vielzahl von Warmblütern beobachtet wurde, unter anderem in Pferden, Schafen und Hunden (79). Im Menschen wurden BDV-Proteine und -Nukleinsäuren sowie virusspezifische Antikörper im Blut von Patienten mit psychischen Krankheiten (z. B. Depressionen) nachgewiesen. Auch mit Multipler Sklerose wurde BDV in Zusammenhang gebracht (80), jedoch fehlen bis heute eindeutige Beweise für einen kausalen Zusammenhang zwischen BDV-Infektion und diesen Krankheiten im Menschen.

Das am besten untersuchte Tiermodell für BDV-Infektion ist die Lewis-Ratte. Nach intrazerebraler Infektion entwickeln diese Tiere eine Enzephalomyelitis, wobei es zu einer Infiltration durch CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie Makrophagen kommt. BDV-spezifische CTL stellen die Effektorpopulation während der akuten Phase der Infektion dar und sind in signifikantem Maße an der Zerstörung infizierter Gehirnzellen beteiligt. Daneben ist diese T-Zellpopulation wohl auch maßgeblich für die während der chronischen Phase auftretende degenerative Enzephalopathie verantwortlich, die zu einer schweren Hirnkortexatrophie führt. Neben ihrer Rolle in der Immunpathologie sind BDV-spezifische CTL jedoch auch an der regulären

Beseitigung von BDV beteiligt. So induzieren BDV-spezifische CD4⁺ T-Zellen, wenn sie vor Infektion transferiert werden, CD8⁺ T-Zellen, die den Virus ohne signifikante Zellschädigung eliminieren (81). Ein Hauptziel der BDV-spezifischen CTL ist dabei das Nukleoprotein p40 (82). Die Charakterisierung des durch das MHC Klasse I-Molekül RT1.A^I der Lewis-Ratte präsentierte Epitop aus p40 erfolgte unter anderem im Rahmen dieser Arbeit.

1.7 Autoimmunkrankheiten - ein Beispiel: Insulin-abhängiger Diabetes mellitus

In normalen Individuen werden autoreaktive T-Zellen nach der Präsentation des erkannten Selbstpeptids durch APC entweder im Thymus eliminiert oder in der Peripherie inaktiviert. Bei einer Fehlfunktion dieser Mechanismen kann es zu Antikörper- und T-zellvermittelten Immunreaktionen gegen körpereigene Antigene kommen, die zur Ausbildung von Autoimmunkrankheiten führen.

Beim Insulin-abhängigen Diabetes mellitus (*insulin-dependent diabetes mellitus*, IDDM) kommt es durch T-zellvermittelte Effektormechanismen zu einer Zerstörung von Insulin-produzierenden β -Zellen in den Langerhans-Inseln des Pankreas, die in einem gestörten Glukosestoffwechsels resultiert.

Die Bedeutung autoreaktiver T-Zellen bei IDDM wird an der starken positiven wie auch negativen Assoziation mit bestimmten HLA Klasse II-Allelen deutlich. So zeigen unter anderem Individuen mit dem Haplotyp HLA-DRB1*0401, HLA-DQA1*0301/DQB1*0302 eine deutliche Prädisposition zur Ausbildung von IDDM (83), während dagegen einige HLA-DR2-Subtypen die Wahrscheinlichkeit der Erkrankung herabsetzen (84). Verschiedene Autoantigene der Inselzellen wurden mit der Pathogenese der Krankheit in Verbindung gebracht, unter anderem Insulin, Glutaminsäuredecarboxylase 65 (*glutamic acid decarboxylase 65*, GAD65), IA-2 und HSP60. So weisen über die Hälfte der Patienten Insulin-spezifische Antikörper auf (85) und auch für GAD65 konnten spezifische Antikörper und T-Zellen in Patienten nachgewiesen werden (86). Versuche zur Identifizierung der entsprechenden T-Zelldeterminanten wurden vor allem für Insulin und GAD65 und in geringerem Maße auch für die Tyrosinphosphatase IA-2 durchgeführt (87).

Die molekularen und zellulären Mechanismen, die letztendlich zum Ausbruch der Krankheit führen, sind trotz intensiver Untersuchungen an Patienten und am Tiermodell der *nonobese diabetic* (NOD)-Maus, nicht zuletzt wegen häufig wider-

sprüchlicher Ergebnisse noch weitgehend unklar. Jedoch scheint die Verfügbarkeit der Inselzellantigene für eine T-Zellerstaktivierung auf eine lokale Zerstörung der β -Zellen zurückzuführen zu sein. Im Menschen wurde dies unter anderem auf virale Infektionen im Kindesalter zurückgeführt, die eine Entzündung des Pankreas verursachen (88;89). Ein weiterer möglicher Mechanismus könnte Apoptose der β -Zellen im Rahmen der natürlichen Reorganisation des Pankreas sein (90). Bei einer unvollständigen Beseitigung apoptotischer Zellen durch Makrophagen (91) oder durch apoptotische Vorgänge in Anwesenheit einer starken Entzündung (92) könnte es zu einer Aktivierung dendritischer Zellen kommen, die wiederum als APC für Inselantigen-spezifische T-Zellen dienen können.

1.8 Sequenzanalyse von Peptiden und Proteinen

Die Geschichte der Sequenzanalyse von Peptiden und Proteinen in ihrer heutigen Form begann vor 50 Jahren mit der Beschreibung einer Methode zur sequentiellen Abspaltung von N-terminalen Aminosäuren durch Pehr Edman (93). 1967 stellte er dann den ersten automatisierten Proteinsequencer vor (94). In den folgenden Jahren kam es zu einer raschen Weiterentwicklung dieser Geräte, wobei die Art der Probenapplikation und Reagenzienzufuhr sowie Gestaltung des Reaktionskompartimentes Ansatzpunkte für höhere Ausbeuten und geringere Nebenreaktionen lieferten. Die eigentliche Chemie des Edmanabbaus dagegen blieb praktisch unverändert. Die Sensitivität der heute erhältlichen Geräte liegt bei etwa 100 fmol und die Analyse von >50 Zyklen ist routinemäßig problemlos möglich.

Die analoge C-terminale Sequenzanalyse erwies sich dagegen als sehr viel schwieriger, besonders wegen der nötigen drastischen Reaktionsbedingungen, die zu einer Reihe von unerwünschten Nebenreaktionen führen. Daher liegt bei dem einzigen für kurze Zeit Mitte bis Ende der neunziger Jahre kommerziell erhältlichen Gerät die Sensitivität für die meisten Proben bei etwa 1 nmol, wobei spätestens im dritten Zyklus die Reaktionsprodukte der Nebenreaktionen eine weitere Analyse meist unmöglich machen.

Die Massenspektrometrie spielte dagegen bis Ende der achtziger Jahre keine nennenswerte Rolle in der Protein- und Peptidanalytik. Die bis dahin zur Verfügung stehenden Methoden zur notwendigen Ionisierung der Analytmoleküle wie z. B. der Beschuß der Probe mit Elektronen (Elektronenstoß-Ionisierung, EI) oder Überführung in die Gasphase im Rahmen der Gaschromatographie (GC MS) wa-

ren so drastisch, daß sie für große labile Biomoleküle nur bedingt geeignet waren. Erst die Entwicklung der Elektrosprayionisierung (ESI) (95) und der MALDI-Technik (*matrix-assisted laser desorption/ionization*) (96) als schonende Ionisierungstechniken machten die Massenspektrometrie für Proteanalytiker interessant. In der Kombination der ESI- mit der Quadrupol-Technik stand nun auch eine Methode zur Verfügung, die direkt eine Sequenzanalyse eines Peptides in einer Mischung aus vielen Massen möglich machte. Durch Massenselektion mit einem Fenster von etwa 1 Da mit einem Quadrupol und kontrollierte Fragmentierung des gewählten Moleküls durch Kollision mit einem inerten Gas konnte 1992 zum ersten Mal ein natürlicher MHC Klasse I-Ligand massenspektrometrisch sequenziert werden (97). Bei der MALDI-Massenspektrometrie ist eine solche Sequenzanalyse unter Ausnutzung des „*post source decay*“-Effektes mit Abstrichen ebenfalls möglich (98) und auch für MHC Klasse I-Liganden erfolgreich durchgeführt worden (50). Allerdings ist im Augenblick die Massenselektion noch weniger präzise, so daß sich besonders bei sehr heterogenen Gemischen Schwierigkeiten ergeben. Daneben ist eine Sequenzanalyse auch durch vorgeschaltete chemische (99) oder enzymatische (100) Abbaureaktionen möglich.

Parallel mit der Entwicklung schonender Ionisierungsverfahren wurden weitere technische Neuerungen eingeführt, wie z. B. TOF (*time of flight*)-Analysatoren, Ionenfallen- (*ion trap*) und FT ICR- (*Fourier transform ion cyclotron resonance*) Massenspektrometer, die bezüglich Sensitivität und Auflösung große Fortschritte brachten.

Die Vorteile dieser massenspektrometrischen Verfahren der Sequenzanalyse gegenüber dem Edmanabbau liegen zum einen in einer höheren Sensitivität (<100 amol), zum anderen in der Möglichkeit der Analyse einzelner Massen in einem Peptidgemisch, wie es z. B. ein Extrakt von MHC-Liganden oder ein tryptischer Proteinverdau darstellt. Die MALDI-Massenspektrometrie erlaubt zudem eine schnelle, automatisierte Aufnahme von Übersichtspektren vieler Proben, was sie zu einem Hauptwerkzeug der Proteomforschung gemacht hat. Dieser - auch kommerziell relevante - Zweig der Bioanalytik widmet sich der Untersuchung des gesamten Proteinexpressionsmusters einer Zellpopulation unter definierten Bedingungen. Das übliche Vorgehen ist dabei die Auftrennung und Anfärbung der Proteine in einem 2D-Gel und die anschließende Identifizierung der angefärbten Proteine. Dazu werden die interessanten Gelbereiche ausgestanzt, mit Trypsin behandelt und die extrahierten Verdauungsprodukte massenspektrometrisch analysiert (101). Die Proteinidentifizierung erfolgt dabei oft nur anhand der Massen der tryp-

tischen Fragmente im Übersichtsspektrum, die für ein Protein einen charakteristischen „Fingerabdruck“ darstellen (*peptide mass fingerprint*) (102). Für die Sequenzanalyse bei nicht eindeutigen *fingerprints* und für die Analyse posttranslativaler Modifizierungen wird dann häufig ergänzend die ESI-Massenspektrometrie eingesetzt. So erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die Identifizierung neuer Proteasen im MHC Klasse-Antigenprozessierungsweg durch ESI-Massenspektrometrie. Der Hauptvorteil des Edmanabbaus dagegen ist die eindeutige Quantifizierbarkeit der analysierten Peptide, was für die Massenspektrometrie aufgrund sequenzabhängiger Ionisierungseffizienzen nur über eine individuelle Kalibrierung mit synthetischen Peptiden möglich ist. Vor allem bei der MALDI-Massenspektrometrie können zudem erhebliche Suppressionseffekte auftreten (103). Daher ist der Edmanabbau besonders für quantitative Analysen z. B. von proteasomalen Verdauungsprodukten geeignet (16).

1.9 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten massenspektrometrische Ansätze zur T-zell-unabhängigen Identifizierung krankheitsassoziierter MHC-Liganden entwickelt und getestet werden. Im Zentrum stand dabei die Entwicklung des „Predict, Calibrate, Detect“-Ansatzes zur Identifizierung natürlicher Liganden aus tumor- oder allgemein krankheitsassozierten Proteinen. Dieser Ansatz verbindet die Epitopvorhersage als Methode zur Identifizierung der Massen potentieller Liganden mit dem Koelutionsverfahren unter Verwendung eines HPLC-MS-Systems. Während die Koelution schon seit längerem zur Bestätigung von Peptidsequenzen eingesetzt wird, die zuvor durch tandemmassenspektrometrische Untersuchung CTL-reaktiver Fraktionen ermittelt wurden (104), wurden die Kombination aus Epitopvorhersage und HPLC-Massenspektrometrie erst kürzlich zum ersten Mal zur Identifizierung natürlicher Liganden aus *Trypanosoma cruzi* eingesetzt (105). Daneben sollten weitere Verfahren zur Analyse natürlicher MHC-Klasse I- und Klasse II-Liganden aus tumor- und virusspezifischen Proteinen sowie Autoantigenen entwickelt und getestet werden.

2. Material und Methoden

2.1 Peptidsynthese

Die Peptidsynthese erfolgte auf einem automatisierten 432A Peptidsynthesizer (Applied Biosystems) im klassischen Merrifield-Festphasensyntheseverfahren unter Verwendung von 9-Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)-geschützten Aminosäuren. Dieses Gerät erlaubt die Synthese von Peptiden bis zu einer Länge von 31 Aminosäuren, wobei folgende Fmoc-Aminosäuren (NMI) eingesetzt wurden.

Tab. 2.1: verwendete Fmoc-Aminosäuren und Seitenkettenschutzgruppen: Boc: Benzyloxycarbonylgruppe, Pmc: 8-Pentamethylchroman-6-sulfonylgruppe, t-Bu: *tert*-Butylgruppe, Trt: Tritylgruppe

Aminosäure	Code	Seitenkettenschutzgruppe	Molekulargewicht der Fmoc-Aminosäure [Da]
Alanin	A	--	311,34
Arginin	R	Pmc	663,81
Asparigin	N	Trt	534,57
Aspartat	D	t-Bu	411,45
Cystein	C	Trt	585,72
Glutamat	E	t-Bu	425,49
Glutamin	Q	Trt	610,77
Glycin	G	--	297,31
Histidin	H	Trt	619,72
Isoleucin	I	--	353,42
Leucin	L	--	353,42
Lysin	K	Boc	468,55
Methionin	M	--	371,46
Phenylalanin	F	--	387,44
Prolin	P	--	337,38
Serin	S	t-Bu	383,44
Threonin	T	t-Bu	397,47
Tryptophan	W	Boc	526,58
Tyrosin	Y	t-Bu	459,54
Valin	V	--	339,39

25 μ mol der C-terminalen Aminosäure liegen in der Reaktionskartusche (*peptide synthesis column*, PSC) an eine Polymermatrix gekoppelt vor. Im Falle des verwendeten Wangharzes besteht diese aus einem Styrol-Divinylbenzol-Copolymer,

an das die Aminosäure über einen p-Benzoyloxybenzyl-Linker kovalent gebunden ist.

Ein Karussell nimmt bis zu 30 Aminosäurekartuschen (*amino acid columns*, AAC) auf, die je 75 µmol der zu kuppelnden Aminosäuren in Fmoc-geschützter Form enthalten. Die Reihenfolge der AAC entspricht der Sequenz des zu synthetisierenden Peptids. Die Synthese umfaßt für den ersten Kopplungszyklus folgende Schritte:

- Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe vom N-Terminus der harzgekoppelten Aminosäure in der PSC unter Leitfähigkeitskontrolle durch Piperidin in Dimethylformamid (DMF)
- Aktivierung der nächsten Aminosäure durch ein 1:1-Gemisch von 2-(1-H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU) und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT) in Diisopropylethylamin (DIEA)
- Kupplung der aktivierten Aminosäure in der PSC unter Leitfähigkeitskontrolle

Für jede weitere Aminosäure wird analog verfahren.

Die Abspaltung des Peptides vom Wang-Harz und aller Seitenkettenschutzgruppen erfolgte manuell durch Behandlung mit Trifluoressigsäure (TFA)/Phenol/Thioanisol/Ethandithiol/H₂O (90/3.75/1.25/2.5/2.5 in Volumenanteilen) für 1 h bzw. 3 h im Falle argininhaltiger Peptide. Danach wurde das Peptid in Methyl-*tert.* Butylether (MTBE) präzipitiert, der Niederschlag ein weiteres Mal mit MTBE und zweimal mit Diethylether gewaschen und in H₂O gelöst. Nach Lyophilisieren lag die Ausbeute in der Regel bei 15-20 mg Peptid. Die Syntheseprodukte wurden mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie (siehe Abschnitt 2.2.1.2) auf Identität und durch Reversed-Phase-HPLC (System Gold, Beckman bzw. Varian star, Varian) auf Reinheit überprüft.

Peptide mit einer Reinheit von unter 80% wurden mittels präparativer RP-HPLC (System Gold, Beckman) aufgereinigt. Dazu wurde eine C18-Säule (Säulendimension 150 x 10 mm) bei einer Flußrate von 3 ml/min eingesetzt, wobei der Gradient unter Berücksichtigung der Elutionsbedingungen aus den analytischen HPLC-Läufen gewählt wurde. Die peptidhaltigen Fraktionen wurden aufgefangen

und durch MALDI-TOF Massenspektrometrie auf Identität und durch erneute analytische RP-HPLC nochmals auf Reinheit geprüft.

2.2 Analytische Methoden

2.2.1 Massenspektrometrische Verfahren

2.2.1.1 Elektrospray-Ionisierung (ESI) Massenspektrometrie

Bei der Elektrospray-Ionisierung wird eine Analytlösung bei Atmosphärendruck kontinuierlich in ein elektrisches Feld injiziert, wobei beim Nachweis positiv geladener Ionen die Kapillare die Anode und eine Gegenelektrode im Massenspektrometer die Kathode darstellt. Die an der Flüssigkeitsoberfläche akkumulierten positiven Ionen werden gegen die Oberflächenspannung der Flüssigkeit in Richtung Kathode gezogen, wodurch sich der charakteristische Taylorkonus bildet, an dessen Spitze ein Flüssigkeitsfilament entsteht. In einiger Entfernung von der Anode zerfällt dieser Flüssigkeitsstrom in einzelne Tröpfchen, die zunächst einen Durchmesser von wenigen Mikrometern besitzen und etwa 10^5 Ladungen enthalten. Im weiteren Verlauf kommt es durch kontinuierliches Verdampfen von Lösungsmittel zu einer Abnahme der Tröpfchengröße bei gleichzeitiger Zunahme der Ladungsdichte an der Tröpfchenoberfläche. In Folge der zunehmenden Coulombkräfte zwischen den gleichen Ladungen kommt es schließlich zum spontanen Zerfall der Tröpfchen. Der endgültige Übergang der Analytmoleküle in die Gasphase erfolgt nach der *single ion in droplet* Theorie von F. Röllgen in Weiterentwicklung der Arbeiten von Dole durch Bildung kleinster Tröpfchen, die noch ein einziges geladenes Molekül enthalten und anschließender Desolvatisierung der Analytmoleküle durch Kollision mit Stickstoffmolekülen am Übergang zum Massenspektrometer. Das Ionenemissionsmodell nach Iribane und Thomson erklärt den Vorgang dagegen durch die direkte Emission von Ionen aus hochgeladenen Tröpfchen.

Die Massenanalyse der in der Gasphase vorliegenden Ionen, die bei großen Biomolekülen durch mehrfache Protonenaufnahme mehrfach geladen sind, erfolgt in der Peptid- und Proteinanalytik in der Regel durch Triplequadrupol-, Ionenfallen-, Flugzeit (*time of flight*, TOF)- oder *Fourier transform Ion cyclotron resonance* (FT

ICR)-Massenspektrometer. Nur auf die hier verwendete TOF-Technik soll im weiteren eingegangen werden.

Bei der TOF-Technik erfolgt die Bestimmung der Masse m der z -fach geladenen Anionen nach Beschleunigung in einem elektrischen Feld der Spannung U durch die Bestimmung der Flugzeit t durch eine feldfreie Driftstrecke der Länge L in einem Hochvakuumflugrohr. Dabei ergibt sich für die kinetische Energie E_{kin} der Ionen:

$$E_{kin} = \frac{1}{2} m v^2 = \frac{1}{2} m (L/t)^2 = z e U \quad (v \text{ Geschwindigkeit, } e \text{ Elementarladung})$$

Für die Bestimmung von m/z ergibt sich damit:

$$m/z = 2 e U t^2 L^{-2}$$

Die Probenaufnahme erfolgte auf einem Micromass Q-TOF I Gerät mit coaxialer ESI-Quelle (Abb. 2.1)(106) unter Verwendung der Software MassLynx 3.0 und 3.1.

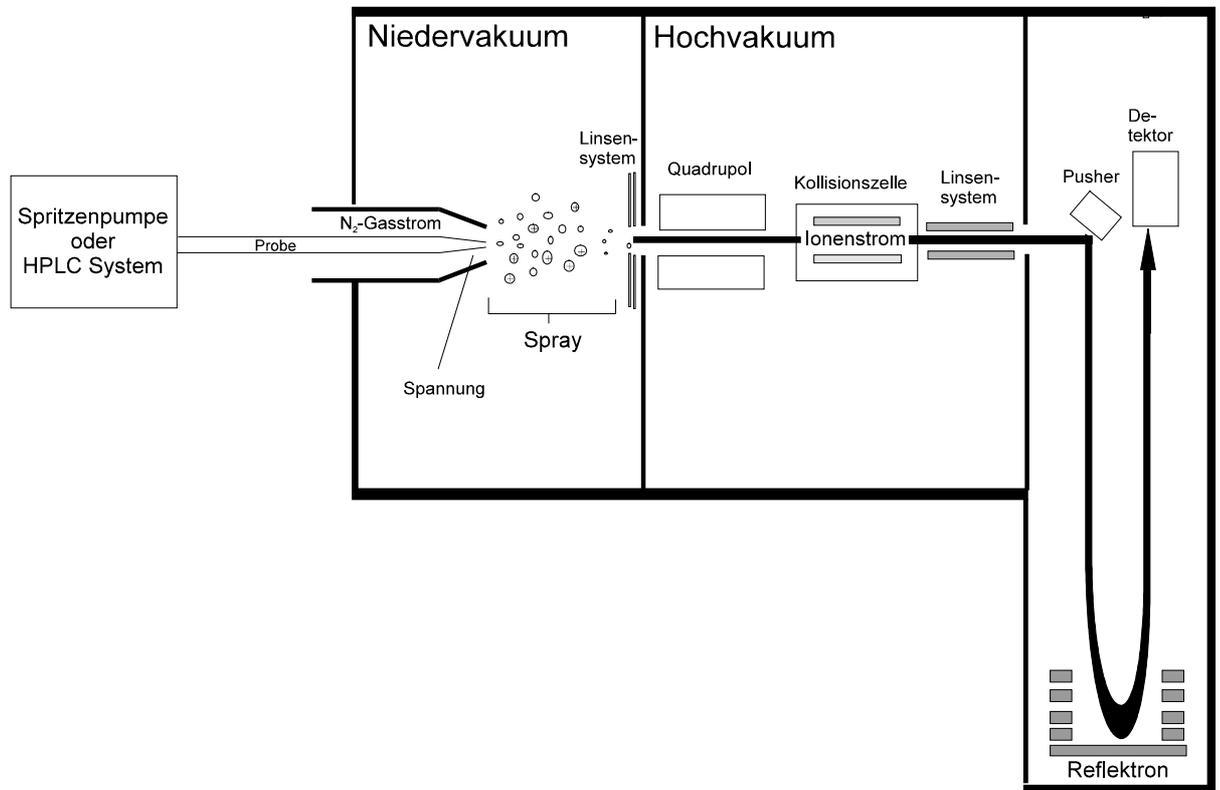


Abb. 2.1: schematischer Aufbau des Micromass Q-TOF-Massenspektrometers

In diesem Gerät erfolgt die Beschleunigung durch einen sog. Pusher orthogonal zur ursprünglichen Flugrichtung der generierten Ionen. Die Auflösung des Gerätes beträgt $R = m/\Delta m \geq 5000$, wobei Δm für die Halbwertsbreite (*full width at half maximum*, FWHM) eines Peaks steht.

Das Gerät besitzt zudem einen Quadrupol und eine Kollisionskammer und ist für tandemmassenspektrometrische Analysen (MS/MS) und damit für die Sequenzanalyse von Peptiden geeignet. Der erste massenspektrometrische Schritt ist dabei die Massenselektion durch den Quadrupol, eine Anordnung von vier parallelen stabförmigen Metallelektroden. Unter Einwirkung eines kombinierten Wechsel- und Gleichspannungsfeldes, wobei jeweils gegenüber liegende Stäbe gleiche Polarität der Gleichspannung und gleiche Phase der Wechselspannung besitzen, können nur Ionen eines definierten m/z -Verhältnisses auf einer oszillierenden Flugbahn den Quadrupol passieren. Ionen mit einem anderen m/z -Verhältnis fliegen auf instabilen Flugbahnen und kollidieren mit den Metallstäben. Die so selektionierten Ionen können nun durch Kollision mit Atomen eines inerten Kollisionsgases, hier Argon, fragmentiert werden (*collisionally induced decomposition*, CID). In der Regel ist für eine effektive Fragmentierung die Einwirkung einer zusätzlichen Beschleunigungsspannung (Kollisionsspannung) kurz vor der Stoßaktivierung notwendig. Die Massen der entstandenen Fragmentionen werden nun im zweiten massenspektrometrischen Schritt mit dem TOF-Analysator bestimmt. Die Produktionen entstehen dabei in erster Linie durch Bruch des Peptidbackbones. Abb. 2.2 zeigt die häufigsten Fragmentierungsprodukte und ihre Nomenklatur.

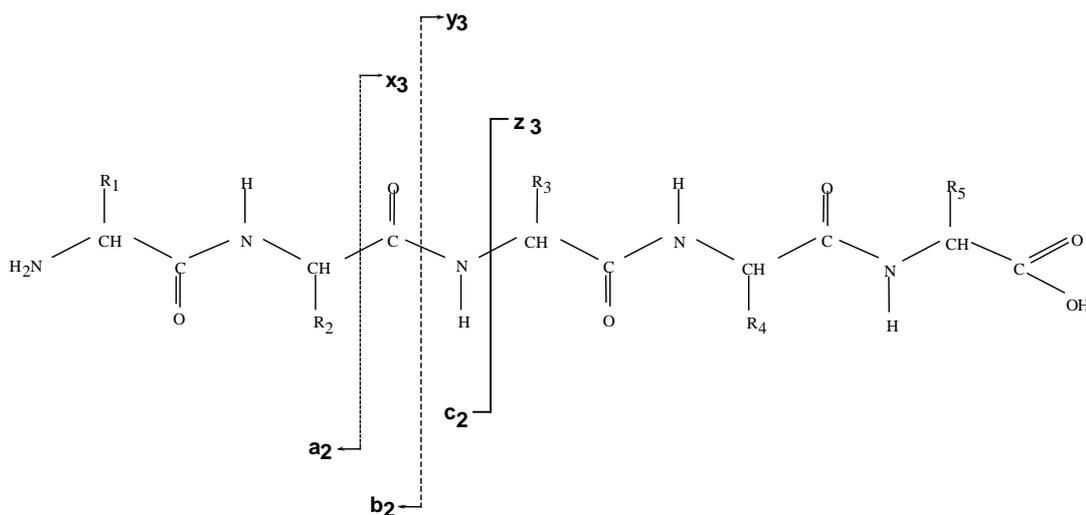


Abb. 2.2: Häufigste Produktionen bei der kollisionsinduzierten Fragmentierung von Peptiden und ihre Nomenklatur (nach Roepstorff und Fohlmann)

Von diesen Ionentypen entstehen erfahrungsgemäß b- und y-Ionen mit höchster Intensität, für deren Entstehung von folgendem Reaktionsmechanismus ausgegangen wird:

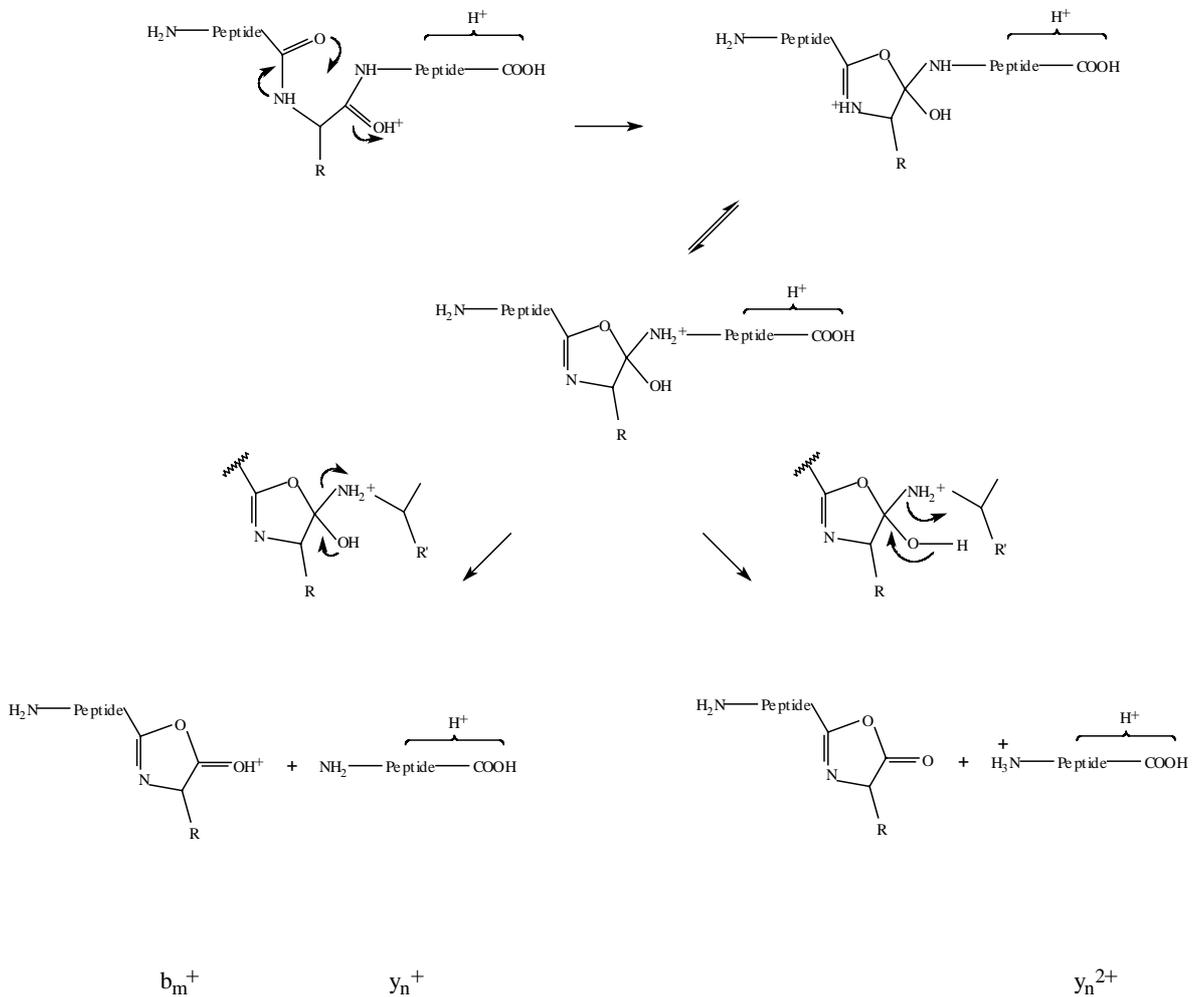


Abb. 2.3: Entstehung von b- und y-Ionen bei der kollisionsinduzierten Fragmentierung von Peptiden (nach (107))

Weiterhin spielen für die Intensitäten der entstehenden Ionen auch die Natur der beteiligten Aminosäuren eine direkte oder indirekte Rolle. So sind Ionen, die bei der Spaltung von X-P Bindungen und insbesondere von D-P Bindungen entstehen, in der Regel mit hohen Intensitäten zu sehen. Für X-H und X-XH Bindungen konnte eine erhöhte Spaltungshäufigkeit mit der Bildung eines ungewöhnlichen b-Ions in Verbindung gebracht werden (108). Daneben findet man häufig begleitende Serien im Abstand von $\Delta m = -18$ Da (Wasserabspaltung bei S und T), $\Delta m = -17$ Da (Ammoniakabspaltung bei R), $\Delta m = -64$ Da (Abspaltung von Methylsulfen-

säure bei oxidiertem M). Grundsätzlich führen die basische Aminosäuren R und K zu einer bevorzugten Lokalisierung des Protons an der funktionellen Gruppe. Damit steht dieses Proton nicht mehr an der Peptidbindung für die Fragmentierungsreaktion zur Verfügung, was zur Folge hat, daß K/R-haltige Peptide in einfach geladenem Zustand schwer zu fragmentieren sind. Im Fragmentspektrum der entsprechenden doppelt geladenen Ionen erscheinen die R/K-haltigen Fragmentionen mit hoher Intensität. Daher ergeben tryptische Fragmente, die C-terminal ein R oder ein K besitzen, meist dominante y-Serien.

Für die Identifizierung eines unbekanntes natürlichen Peptids und die Zuordnung zu seinem Quellprotein genügt in der Regel die Identifizierung eines kurzen Sequenzabschnitts von 4 oder 5 Aminosäuren („Sequence Tag“). Im Internet stehen zahlreiche Programme kostenlos zur Verfügung, mit denen mit dieser Sequenzinformation sowie der Information über die Gesamtmasse des Peptides Protein- und Nukleinsäuresequenzdatenbanken durchsucht werden können. Eine Auflistung solcher Programme findet sich in Abschnitt 2.4.

Das Micromass Q-TOF I kann wie jedes ESI MS-Gerät grundsätzlich in zwei Verfahren betrieben werden:

2.2.1.1.1 Nanoelektrospray-MS

1-3 µl der in 50 % Methanol/49 % H₂O/1% Ameisensäure gelösten Probe wurden in eine platinbedampfte Glaskapillare (Typ „Normal“ bzw. „Medium for the Micromass Q-TOF“, Protana) gefüllt, deren spitz zulaufende Auslassöffnung zuvor unter optischer Kontrolle in einem Mikroskop aufgebrochen worden war. Ein stabiles Elektrospray ergab sich in der Regel beim Anlegen einer Kapillarspannung von 900-1200, eines Rückdrucks von 2 psi und einer Temperatur der ESI-Quelle von 45°C. Die effektive Flußrate betrug etwa 20-50 nl/min. Für tandemmassenspektrometrische Experimente wurde die Kollisionskammer mit Argon gefüllt (20 - 25 psi), Quadrupol 1 auf die gewünschte Masse eingestellt und eine optimierte Kollisionsspannung (in der Regel zwischen 20 und 35 V) angelegt. Die Integrationszeit für den TOF-Analyszer betrug 1 s mit einer Interscanverzögerung von 0,1 s.

2.2.1.1.2 HPLC-MS-Kopplung

Zur Auftrennung und Analyse komplexer Peptidgemische wurde das ESI-Massenspektrometer mit einem Kapillarsäulen-HPLC-System (Applied Biosystems) gekoppelt, das für sehr kleine Flußraten bis etwa 2 µl/min und kleinste Probenmengen ausgelegt ist. Zur Auftrennung wurden C18-Säulen mit Innendurchmessern (ID) von 300, 150 sowie 75 µm verwendet (Säulenlänge jeweils 150 mm, alle Säulen von LC Packings, alle Kapillaren von Grom). Für eine weitere Reduzierung der Flußrate auf etwa 300 nl/min für die 75 µm ID-Säule wurde ein „Precolumn - Split“ unter Verwendung eines T-Stücks (ZT1C, Valco) und einer 300 µm x 150 mm oder 500 µm x 150 mm C18-Säule als Gegendrucksäule eingesetzt. Durch die Verwendung einer C18-Säule anstelle einer einfachen Kapillare wird über den gesamte Gradientenverlauf trotz sich ändernder Lösungsmittelbedingungen ein konstantes Splitverhältnis erreicht. Die für die Benutzung einer 75 µm ID C18-Säule gewünschte Flußrate an der ESI-Quelle erforderte eine primäre Flußrate der HPLC-Pumpen von 7-30 µl/min, je nach ID der Gegendrucksäule.

Da TFA-haltige HPLC-Lösungsmittel erfahrungsgemäß bei ESI-Techniken eine optimale Ionisierung behindern (109), wurden als Lösungsmittel A 4 mM Ammoniumacetat in H₂O und Lösungsmittel B 2 mM Ammoniumacetat in 70 % Acetonitril/30 % H₂O eingesetzt. Beide Lösungsmittel wurden mit Ameisensäure auf pH 3 eingestellt.

Das HPLC-System wurde über eine 75 µm ID Kapillare direkt mit der ESI-Quelle des Massenspektrometers verbunden. Eine goldbeschichtete Glaskapillare (75 mm ID Kapillare, 30 µm ID Auslassöffnung, PicoTip, New Objective) diente als Elektrospraykapillare.

Das Laden der Probe erfolgt im Originalaufbau der ESI-Quelle über einen Rotor mit manueller Injektion. Da dieser Rotor nur Probenvolumina von 100 nl oder 1 µl erlaubt, wurde für größere Volumina ein Festphasenextraktionsverfahren eingesetzt (Abb. 2.4). Das Laden der Probe (üblicherweise 10-100 µl) erfolgte hierbei über eine 300 µm*10 mm C-18 Vorsäule (Ziemer) mit einer Flußrate von 2 µl/min. Injektion der Probe erfolgte automatisch über das Rheodyne 8125 Einspritzventil des ABI 112 Oven/Injector des Kapillar-HPLC-Systems, indem die Vorsäule vor der analytischen Säule in den Fluß geschaltet wurde.

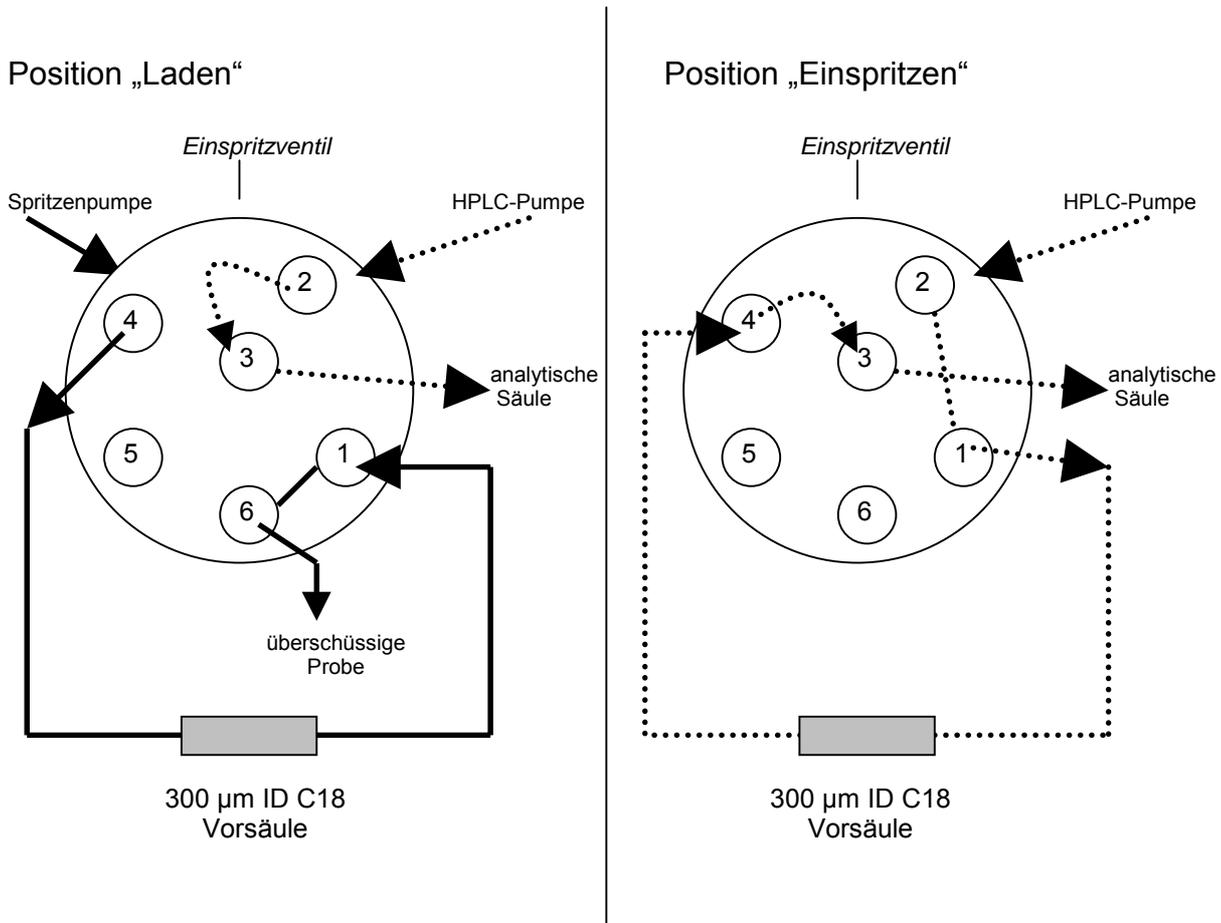


Abb. 2.4: Schematische Darstellung des Festphasenextraktionsverfahrens zum Laden größerer Probenvolumina

2.2.1.2 Matrix-unterstützte Laserdesorptions Ionisierung (MALDI)

Beim *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization* (MALDI)-Verfahren wird die Probe mit einer Matrix kleiner, UV-absorbierender Moleküle, z. B. 2,5-Dihydroxyacetophenon (DHAP), kristallisiert und die Kristalle mit einem UV-Laser, seltener auch einem IR-Laser beschossen. Die Laserenergie wird über die Matrix auf die Analytmoleküle übertragen, die dadurch ein- oder seltener zweimal ionisiert werden.

Die MALDI-Analysen fanden in erster Linie auf dem „HP G2025A“ (Hewlett-Packard) statt. Die Masse der entstehenden Ionen wird ebenfalls durch Bestimmung der Flugzeit bestimmt. Die Ionen werden dabei über ein elektrisches Feld beschleunigt (Beschleunigungsspannung 28 kV) und fliegen im Vakuum von unter 10^{-6} Torr durch ein Flugrohr gegebener Länge (hier 1 m) zum TOF-Detektor. Die Massenbestimmung erfolgt wie in 2.2.1.1 beschrieben.

Die Probenvorbereitung erfolgte nach dem „dried droplet“-Verfahren: Dazu wurden zunächst 0,5 µl DHAP-Matrix (20 mg DHAP und 5 mg Diammoniumhydro-

gencitrat in 1 ml 80 % Isopropanol) auf eine Probenposition („Mesa“) pipettiert und das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Anschließend wurden 0,5 µl der zu analysierenden Probe aufgetragen, das Lösungsmittel ebenfalls entfernt und die Probe analysiert.

Die Aufnahme der Spektren erfolgte in Einzelschüssen bei einer Laserenergie von 6 - 8 µJ bei Verwendung der DHAP-Matrix. Über die Software des Gerätes kann der Laserstrahl auf unterschiedliche Regionen der Mesa gerichtet und so die Oberfläche abgetastet werden. Die Spektren der einzelnen Laserschüsse lassen sich aufsummieren, wobei in der Regel die Aufnahme von etwa 50 Spektren für deutliche Signale ausreicht.

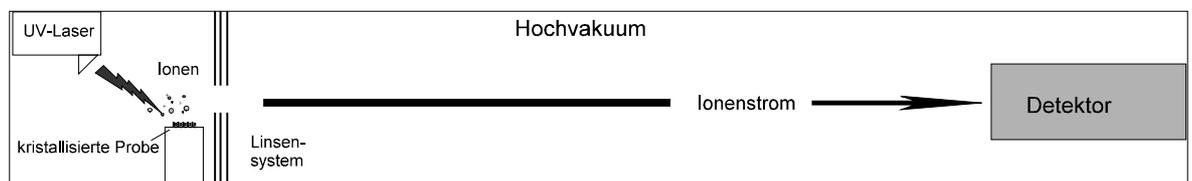


Abb. 2.5: Schematischer Aufbau des HP G2025A MALDI-TOF-Massenspektrometers mit linearem Flugrohr

2.2.2 Edman-Abbau

Die N-terminale Sequenzierung von Peptiden erfolgte durch automatisierten Edman-Abbau entweder auf einem HP G 481 oder einem Applied Biosystems Procise 494A Proteinsequencer.

Der Edmanabbau verläuft in beiden Geräten nach folgendem Prinzip:

Phenylisothiocyanat (PITC) addiert im alkalischen Milieu an den N-Terminus eines Peptides unter Bildung des entsprechenden Phenylthiocarbamyl-Peptides (PTC-Peptid). In Anwesenheit von TFA wird nun die derivatisierte Aminosäure unter Zyklisierung zur Anilinothiazolinon-Aminosäure (ATZ-aa) abgespalten. Unter wässrig-sauren Reaktionsbedingungen erfolgt die Umlagerung zur stabileren Phenylthiohydantoin-Aminosäure (PTH-aa). Das Gemisch der PTH-Derivate wird anschließend über eine C18-Säule aufgetrennt und die PTH-Derivate anhand ihrer Retentionszeiten identifiziert.

Bei den beiden eingesetzten Geräten handelt es sich um einen Pulsed-Liquid-Gasphasensequencer (Procise 494A) und um einen Sequencer mit biphasischen Säulenreaktor (G481) (Abb. 2.6). Die Unterschiede liegen vor allem in der Art der

Probenapplikation und im Reaktionskompartiment. Im Falle des Procise 494A wurde die Probe (maximal 15 µl) auf einen Glasfaserfilter appliziert, der zuvor zur Verbesserung der adsorptiven Eigenschaften mit Biobren, einem Polymer auf Polyaminbasis, behandelt worden war. Der Glasfaserfilter, auf dem die Reaktionen des Edmanabbaus ablaufen, wurde anschließend zwischen zwei Glasblöcke mit Chemikalienu- und ableitungen gespannt. Beim G481 besteht das Reaktionskompartiment aus zwei chromatographischen Säulen. Eine C18 RP-Säule bindet das Protein oder Peptid effizient unter hydrophilen Bedingungen. Eine starke Anionenaustauschersäule (*strong anion exchange*, SAX-Säule) dagegen bindet das Protein oder Peptid unter den hydrophoben Bedingungen der Extraktion der ATZ-aa und Reaktionsnebenprodukte. Die Applikation der Probe erfolgte in einer Ladestation direkt auf die RP-Säule, die zunächst mit 1 ml Methanol gewaschen und mit 1 ml 2 % TFA äquilibriert wurde. Die Lösungsmittel wurden unter Argondruck durch die Säule gepreßt. Der Äquilibrierungsschritt wurde gestoppt, wenn sich noch ein Restvolumen von wenigen µl über der Säule befand; die Probe wurde in das Restvolumen gegeben und auf die Säule geladen. Anschließend wurde die Säule zur Entfernung von störenden Salzen u. ä. noch einmal mit 500 µl 2 % TFA gewaschen. Die trockene beladene RP-Säule wurde dann mit der SAX-Säule zusammengesteckt und in die Probenhalterung des Gerätes eingespannt. Proben, die auf Membranen (PVDF, Teflon) geblottet wurden, wurden direkt in „leere“ Säulen geladen, die kein C18-Material enthalten. Diese wurden ebenfalls mit SAX-Säulen kombiniert.

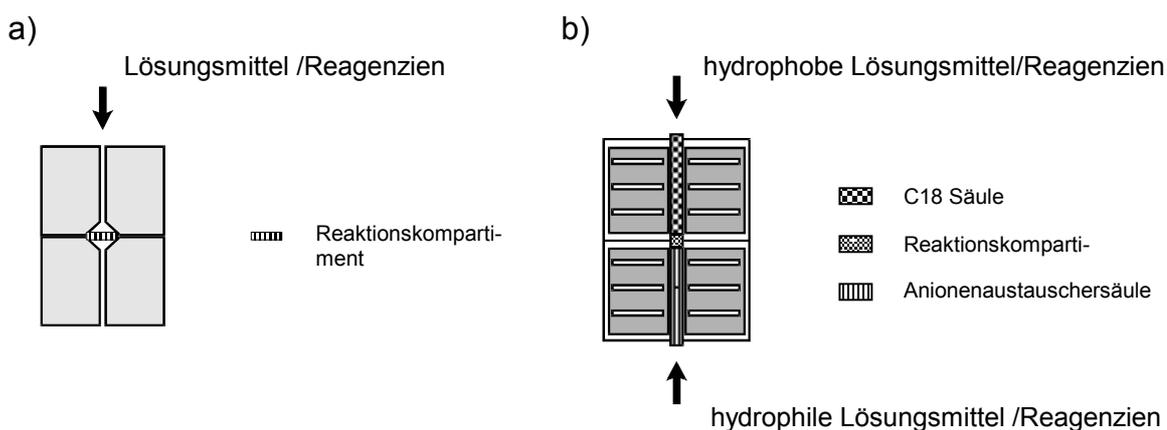


Abb. 2.6: Schematische Darstellung der Reaktionskompartimente bei einem Gasphasensequencer (a) und einem Sequencer mit biphasischen Säulenreaktor (b)

Bei der Quantifizierung der PTH-aa-Signale und der Interpretation der Rohdaten sind folgende Punkte zu beachten:

- Aminosäuren mit funktionellen Seitenketten zeigen deutlich reduzierte Signalintensitäten verglichen mit Aminosäuren mit inerten Seitenketten. Dies gilt im besonderen für Aminosäuren mit generell chemisch empfindlichen Seitenketten (C, H, W) oder unter Bedingungen des Edman-Abbaus instabiler Gruppen (R, S, T). Aber auch die weiteren Aminosäuren mit funktionellen Seitenketten sowie das sekundäre Amin Prolin zeigen verminderte Ausbeuten.
- Die *initial yield* ist die Signalintensität, die sich bei Auftrag einer definierten Stoffmenge für ein Peptid für eine Aminosäure mit einer Ausbeute von 100 % in Zyklus 1 ergibt. Sie liegt meist bei 50-75 %.
- Peptide mit sich wiederholenden Aminosäuren zeigen mit steigender Zykluszahl abnehmende Signalintensität (*repetitive yield*). Diese Restquote liegt bei etwa 90 %, verglichen mit dem vorausgehenden Zyklus.

Damit ergibt sich für eine Aminosäure mit einer inerten Seitengruppe (Ausbeute 100 %) im Zyklus 2 ein vom Gerät angegebener Stoffmengenwert, der etwa 50 % der tatsächlichen Ausgangsmenge entspricht.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 N-terminale Acetylierung von Peptiden

In der Literatur finden sich zahlreiche Beispiele, wie durch Derivatisierung von Peptiden die Interpretation von Fragmentspektren vereinfacht bzw. zusätzliche Informationen erhalten werden können. Eine sehr unkompliziertes und schnelles Verfahren ist die Acetylierung freier Aminogruppen, wobei der freie N-terminus von Peptiden sowie in geringerem Maße auch die ϵ -Aminofunktion von Lysinresten modifiziert werden. Das Fragmentspektrum eines N-terminal acetylierten Peptides zeigt für b-Ionen eine charakteristische Massenverschiebung um $\Delta m/z = +42$ Da im Vergleich zu b-Ionen der nichtmodifizierten Form, was eine eindeutige Zuordnung von y- und b-Ionen ermöglicht.

1 μ l einer 5 % (v/v) Lösung von Acetanhydrid in Methanol wurde zu 10 μ l der in 50 % (v/v) Methanol gelösten Probe gegeben. Nach einer Reaktionszeit von etwa 15 min wurde die Probe eingetrocknet, in 50 % Methanol/49 % H_2O /1% Ameisensäure aufgenommen und für massenspektrometrische Messungen eingesetzt.

2.3.2 Trypsinverdau von Protein nach Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Identifizierung von Proteinbanden in Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen wurde die entsprechende Bande möglichst knapp ausgeschnitten und das Gelstück in ein Eppendorfgefäß überführt. Zum Waschen und Entfärben wurden zunächst zweimal 1 ml H_2O zugegeben und 10 min geschüttelt. Dies wurde danach mit 1 ml 50 % Acetonitril/50 % H_2O und ein weiteres Mal mit 1 ml H_2O wiederholt. Anschließend wurde das Gelstück unter Vakuum getrocknet und in 50 μ l Trypsinlösung (1 μ g/50 μ l) aufgenommen. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 37°C wurden 50 μ l Puffer (0,1 M $NaHCO_3$, pH 8,1) zugegeben, nach weiteren 15 min bei 37°C weitere 100 μ l Puffer. Nach 12 h Inkubation bei 37°C wurde der Überstand abgenommen und die tryptischen Fragmente aus dem Gelstück extrahiert. Dazu wurden 50 μ l 50 % TFA/50 % H_2O zugegeben und 20 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurde der Überstand abgenommen und der Extraktionsschritt einmal wie oben mit 50 μ l TFA/ H_2O und zweimal mit 50 μ l 50 % TFA/50 % Acetonitril wiederholt. Die Überstände wurden vereinigt, im Va-

kuum eingeengt und für ESI MS-Messungen in 50 % Methanol/49 % H₂O/1% Ameisensäure aufgenommen.

2.4 Epitopvorhersage

Die Vorhersage potentieller MHC-Liganden aus Quellproteinen mit bekannter Aminosäuresequenz erfolgte durch Screening gegen das in eine Matrix umgewandelte Peptidmotiv. Dabei wird jeder Aminosäure für jede der zu besetzenden Sequenzpositionen des Peptides ein Koeffizient zwischen 1 und 10 zugeordnet, wobei ein hoher Zahlenwert das häufigen Auftreten dieser Aminosäure in natürlichen Liganden bedeutet. Abbildung 2.7 zeigt exemplarisch das Peptidmotiv für HLA-A*0201 und die entsprechende Motivmatrix für Nonapeptide. Die rechnergestützte Vorhersage beruht auf dem Microsoft Excel-basierten Programm „PAP 2.0“ (110) und ist inzwischen im Rahmen der Internetdatendank SYFPEITHI ((111), Adresse siehe Abschnitt 2.4) für viele MHC Klasse I-Allele und einige MHC-Klasse II-Allele kostenlos möglich. Für MHC Klasse I-Peptide erfolgte routinemäßig die Vorhersage von Nona-, Deca- und Undecameren. Für MHC Klasse II-Peptide erfolgt generell die Vorhersage von Pentadecameren, wobei jeweils eine zentrale, 9 Aminosäuren umfassende Kernsequenz zugrundegelegt wird.

a)

Position	1	2	3	4	5	<u>6</u>	7	8	9
Anker- und Hilfsanker-aminosäuren		L M				<u>V</u>			V L I
Bevorzugte Aminosäuren				E K				K	
Sonstige Aminosäuren	I L F K M Y V		A Y F P M S R	G P D T	I K Y N G F V H	I L T	A Y H	E S	

b)

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

Abb. 2.7: a) Peptidmotiv für HLA-A*0201 (modifiziert nach (111)); Ankerpositionen sind fettgedruckt, Hilfsankerpositionen sind unterstrichen. b) Motivmatrix für HLA-A*0201 für Liganden mit einer Länge von 9 Aminosäuren. P1-P9: Position der Aminosäure im Peptid.

2.5 Suchalgorithmen und Sequenzdatenbanken im WWW

Die Identifizierung von MHC-Liganden und tryptischen Fragmenten und ihrer jeweiligen Quellproteinen sowie Vorhersagen von Epitopen und proteasomaler Schnittstellen erfolgten mit Hilfe der folgenden Suchalgorithmen und Sequenzdatenbanken (alle kostenlos zugänglich im WWW):

Bestimmung des Quellproteines und Sequenzbestimmung eines natürlichen Peptides durch Tandemmassenspektrometrie (Information über Sequenzabschnitt und Masse vorhanden):

PEPSEA http://195.41.108.38/PA_PeptidePatternForm.html

(die alte Version dieses Programmes, PeptideSearch, war im November 2000 noch verfügbar unter http://peptsearch.protana.com/FR_PeptidePatternForm.html)

MS-TAG SIMPLE <http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml3.2/mstagfd.htm>

MASCOT <http://www.matrixscience.com>

Bestimmung des Quellproteines bzw. Quell-EST nach Sequenzbestimmung eines Peptides anhand von Sequenzinformationen:

BLAST (basic local alignment sequence tool) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

Suche nach Aminosäuresequenzen von Proteinen in Protein- und Nukleotiddatenbanken mit Möglichkeit der Volltextsuche:

SWISS-PROT/TrEMBL <http://www.expasy.ch/sprot/>

ENTREZ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/protein.html>

Suche nach Nukleotidsequenzen in Nukleotiddatenbanken mit Möglichkeit der Volltextsuche:

ENTREZ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/nucleotide.html>

Suche nach Aminosäure- und Nukleotidsequenzen inklusive Expressed Sequence Tags (ESTs) mit Möglichkeit der Volltextsuche:

SRS (sequence retrieval system) : <http://www.embl-heidelberg.de/srs5/>

<http://www.expasy.ch/srs5/>

Bestimmung der theoretischen Aminosäuresequenzen von Nukleotidsequenzen inklusive nichtkodierender Genabschnitte und Leseraster:

TRANSLATE <http://www.expasy.ch/tools/dna.html>

Datenbank aller bekannten MHC-Liganden und T-Zellepitope, Epitopvorhersage:

SYFPEITHI <http://www.syfpeithi.de>

Vorhersage proteasomaler Schnittstellen:

PapRoC <http://www.paproc.de>

3. Ergebnisse

3.1 Der „Predict, Calibrate, Detect“-Ansatz zur Identifizierung tumorassoziierter MHC Klasse I-Liganden

3.1.1 Prinzip

Auf einer humanen Zelle werden etwa 10000 verschiedene Peptid-MHC-Komplexe in 1-10000 Kopien präsentiert (112). Ein CTL-unabhängiger Ansatz zur gezielten direkten Identifizierung tumorassoziierter Liganden neben einer großen Anzahl an Selbstliganden ist daher nur sinnvoll, wenn geeignete Selektionskriterien zur Verfügung stehen. Der „Predict, Calibrate, Detect“-Ansatz, schematisch dargestellt in Abb. 3.1.1, nutzt zunächst die Epitopvorhersage aus bekannten tumorassozierten Proteinen, um die Suche auf eine überschaubare Anzahl von Peptiden zu fokussieren. Mit Kenntnis der Molmassen wird zudem die Verwendung von Massenchromatogrammen möglich, d. h. die Auftragung der Intensitätsverteilung von Ionen eines m/z -Wertes über den Zeitraum eines HPLC-Gradienten. Konventionelle Auftragungen der Intensität des Gesamtionenstroms (*total ion current*, TIC) bzw. des Ions mit höchster Signalintensität zu einem bestimmten Zeitpunkt (*base peak ion*, BPI) über den Zeitraum des Gradienten spiegeln ausschließlich Veränderungen der Signale mit hoher Intensität wider. Dies sind entweder Peptide mit hoher Kopienzahl oder oft sogar nichtpeptidische Kontaminationen. Mit dem Massenchromatogramm werden dagegen auch für Massen mit niedriger Intensität, wie es für tumorassoziierte Peptide erwartet werden muß, lokale Maxima sichtbar.

Um die Suche weiter zu fokussieren, wird das analytische HPLC-MS-System mit den vorhergesagten synthetischen Peptiden geeicht. Damit ergeben sich mit der Retentionszeit, sichtbar als lokales Maximum im entsprechenden Massenchromatogramm, und dem bevorzugten Ladungszustand zwei weitere Selektionskriterien, die bei der Einschätzung helfen, ob ein Signal möglicherweise tatsächlich auf ein gesuchtes Peptid zurückzuführen ist. Ergibt die HPLC-MS-Analyse einer Mischung natürlicher Liganden Ionen, die mit einem synthetischen Peptid gleichen m/z -Wertes koeluiieren, wird die Peptidsequenz in einem zweiten Experiment durch Fragmentierung der Masse zum Elutionszeitpunkt überprüft. Dies kann bei

unklaren Ergebnissen auch für das synthetische Peptid unter identischen Bedingungen wiederholt werden.

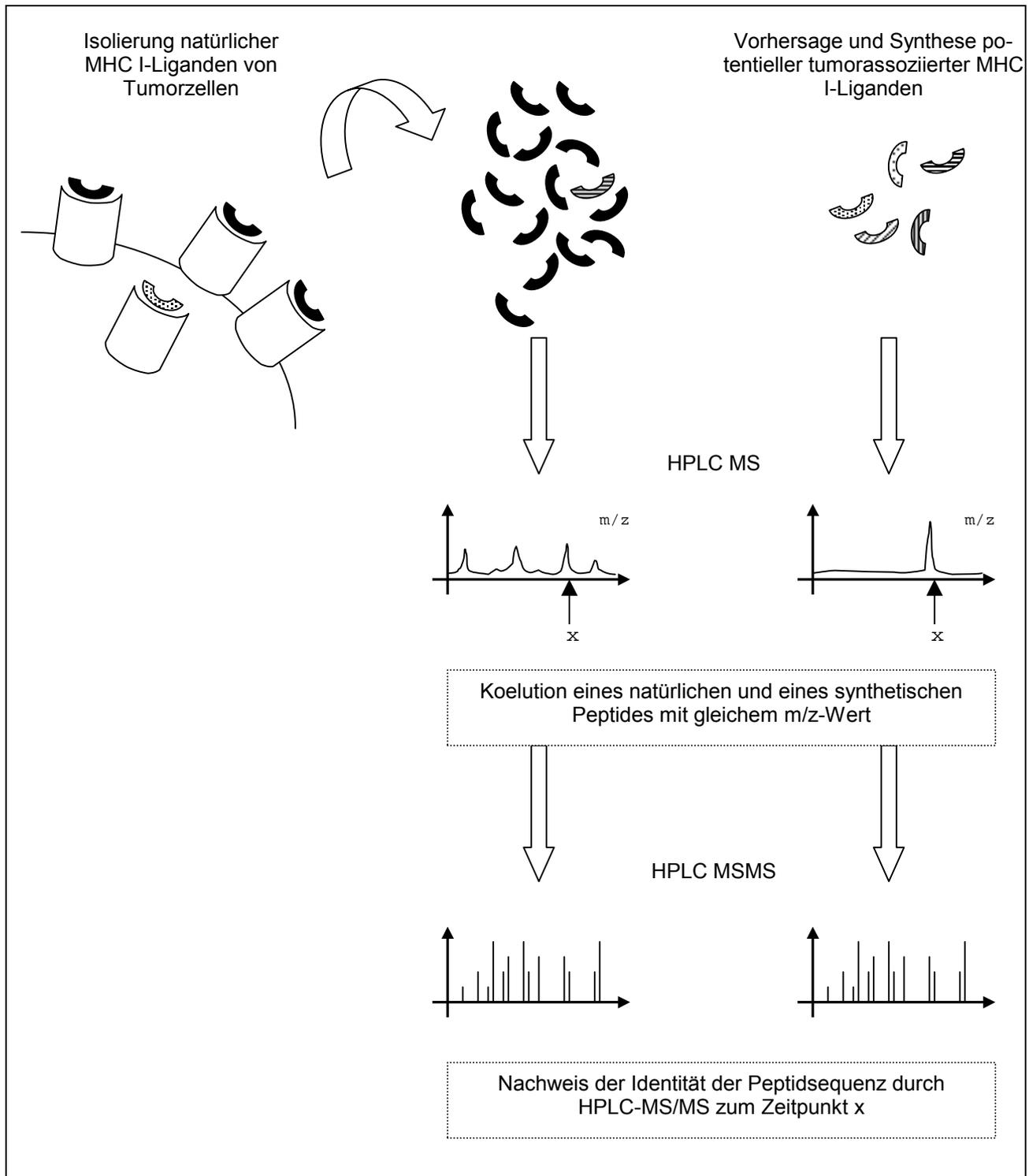


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des „Predict, Calibrate, Detect“-Ansatzes (Erläuterungen im Text; keine realen Daten)

3.1.2 Epitopvorhersage

Die Vorhersage potentieller HLA-A2-Liganden wurden zunächst für die Proteine p53, RAS, MDM2, SSX2, Her2/*neu* und Carcinoembryonic Antigen (CEA) durchgeführt, für die einer Assoziation mit Tumoren unter anderem des Gastrointestinaltraktes nachgewiesen worden ist (33;113-117).

Für p53 und RAS wurden neben den Wildtypsequenzen auch solche Sequenzeinträge der Proteindatenbank SwissProt berücksichtigt, die Aminosäuresubstitutionen aufgrund häufig auftretender Mutationen aufweisen. Es wurden zunächst 47 Peptide, die bei der Epitopvorhersage am besten bewertet worden waren, synthetisiert und in MHC-Stabilisierungsassays mit der TAP-defizienten Zelllinie .174xCEM T2 (T2) auf HLA-A2-Bindung untersucht (durchgeführt von Patricia Hrsti[≡], nicht gezeigt). Obwohl nur für einen kleinen Teil eine signifikante Bindung gezeigt werden konnte, wurde keines der Peptide von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen, da dieser Assay erfahrungsgemäß nicht sensitiv genug ist, um die Bindung aller natürlicher Liganden nachzuweisen. Neben Peptiden aus tumorassoziierten Proteinen wurden auch drei bekannte natürliche HLA-A2-Liganden aus den Proteinen p68, PP2A und RL19 ohne Tumorassoziation synthetisiert (97;118).

Eine äquimolare Mischung dieser 50 Peptide („HLA-A2 Mischung 1“, siehe Tabelle 3.1) wurde zu Untersuchungen zur Sensitivität des HPLC-MS-Systems sowie zur Kalibrierung des Systems für die ersten untersuchten Proben eingesetzt (siehe 3.1.3, 3.1.4 und 3.1.5). Spätere Untersuchungen erfolgten mit einer 78 Peptide umfassenden Mischung („HLA-A2 Mischung 2“, siehe Tabelle 3.2), die zusätzlich Peptide aus den ebenfalls tumorassoziierten Proteinen MAGE-A1 (34), MAGE-A3 (119) und MUC1 (120;121) sowie weitere Peptide aus Her2/*neu* und SSX2 enthielt.

Tab. 3.1: Liste der 50 synthetischen Peptide, die als Mischung 1 zur Kalibrierung des Nanokapillar-HPLC-ESI-MS-Systems eingesetzt wurden. (CCA Colonkarzinom)

Sequenz	Protein	Punkte	Peptidmasse (neutral)	Identifiziert in Peptidextrakten von
SLLPAIVEL	PP2A (402-410)	34	953.6	C1R-A2, CCA27/46/47/55, KS24.22
ILMEHIHKL	RL19 (137-145)	32	1132.6	C1R-A2
YLLPAIVHI	p68 (168-176)	30	1037.6	C1R-A2, SW1116, CCA8/10/11/27/30/46/55, KS24.22
IMIGVLVGV	CEA (691-699)	31	900.6	
YLSGANLNL	CEA (605-613)	25	963.5	
YLWVVNNQSL	CEA (176-185)	25	1321.6	
QLSNGNRTL	CEA (192-200)	24	1002.5	
GVLVGVALI	CEA (694-702)	23	839.5	SW1116, CCA11
LLSVTRNDV	CEA (380-388)	23	1015.6	
IYPNASLL	CEA (100-108)	23	1002.5	
VLYGPDTPI	CEA (589-597)	23	973.5	
RLLLTASLL	CEA (17-25)	22	998.7	
GLAPPQHEI	p53 (187-195) modifiziert	27	960.5	
KLLPENNVL	p53 (24-32)	26	1038.6	
SMNRRPILTI	p53 (245-254) modifiziert	26	1199.6	
GLAPPQHILRV	p53 (187-197)	26	1199.7	
VMNRRPILTI	p53 (245-254) modifiziert	25	1211.7	
GLAPPQHLI	p53 (187-195)	25	944.5	
GMNWRPILTI	p53 (245-254) modifiziert	25	1199.6	
LLGRNSFEV	p53 (264-272)	24	1033.5	
QLAKTCPVQL	p53 (136-145)	24	1099.6	
ALNKMFCQL	p53 (129-137)	23	1066.5	
KMFCQLAKT	p53 (132-140)	22	1068.5	
PLDGEYFTL	p53 (322-330)	21	1053.5	C1R-A2
RMPEAAPPV	p53 (65-73)	21	966.5	
TLEDSSGNL	p53 (256-264)	20	934.4	
STPPPGRV	p53 (149-157)	19	911.5	
VVPYEPPEV	p53 (217-225)	17	1027.5	
LLDILDAGL	RAS (52-61) modifiziert	25	1042.5	
KLVVVGAGV	RAS (5-13) modifiziert	24	840.5	
KLVVVGAAAGV	RAS (5-14) modifiziert	24	911.6	
CLLDILDAGL	RAS (51-61) modifiziert	24	1145.6	
CLLDILDTA	RAS (51-59)	23	975.5	
KLVVVGACV	RAS (5-13) modifiziert	23	886.5	
KLVVVGAGGV	RAS (5-14)	22	897.6	
KLVVVGASGV	RAS (5-14) modifiziert	22	927.6	
KLVVVGADGV	RAS (5-14) modifiziert	22	955.6	
KLVVVGACGV	RAS (5-14) modifiziert	22	943.6	
MTEYKLVVV	RAS (1-9)	19	1080.6	
LLLKLLKSV	mdm2 (33-41)	30	1025.7	
DLLGDLFGV	mdm2 (80-88)	28	947.5	
SLSEEGQEL	mdm2 (260-268)	26	990.5	
MIYRNLVVV	mdm2 (102-110)	25	1105.6	
TMKEVLFYL	mdm2 (49-579)	23	1142.6	
LALCVIREI	mdm2 (197-205)	22	1028.6	
KIFGSLAFL	Her-2/neu (369-377)	28	995.6	
ILHNGAYSL	Her-2/neu (435-443)	27	987.5	
GAAKGLQSL	Her-2/neu (1093-1101)	25	844.5	
IISAVVGIL	Her-2/neu (654-662)	24	884.6	
RLQGISPKI	SSX2 (103-111)	23	1010.6	

Tab. 3.2: Liste der 28 synthetischen Peptide, die zusammen mit den Peptiden der Mischung 1 als Mischung 2 zur Kalibrierung des Nanokapillar-HPLC-ESI-MS-Systems eingesetzt wurden

Sequenz	Protein	Punkte	Peptidmasse (neutral)	Identifiziert in Peptidextrakten von
RLLQETELV	Her-2/ <i>neu</i> (689-662)	24	1099.6	
ALCRWGLLL	Her-2/ <i>neu</i> (5-13)	23	1043.6	
VMAGVGSPPYV	Her-2/ <i>neu</i> (773-782)	24	978.5	
IISAVVGILL	Her-2/ <i>neu</i> (654-663)	20	996.7	
KASEKIFYV	SSX2 (41-49)	22	954.6	
RLRERKQLV	SSX2 (167-175)	22	1196.7	
QIPEKIQKA	SSX2 (16-24)	21	1053.6	
MTFGRLQGI	SSX2 (99-107)	20	1021.5	
KIQKAFDDI	SSX2 (112-120)	17	1076.6	
ALSRKVAEL	MAGE-A3 (108-116)	31	985.6	
FLWGPRALV	MAGE-A3 (271-279)	27	1057.6	
GLLIIVLAI	MAGE-A3 (200-208)	27	923.6	
KIWEELSVL	MAGE-A3 (221-228)	26	1115.6	
SILGDPKKL	MAGE-A3 (237-245)	25	969.6	
KVAELVHFL	MAGE-A3 (112-120)	25	1054.6	
ALAETSYVKV	MAGE-A1 (270-279)	30	1079.6	
FLIIVLMI	MAGE-A1 (194-202)	27	1059.7	
LVLGTLEEV	MAGE-A1 (38-46)	26	971.6	
KVLEYVIKV	MAGE-A1 (278-286)	26	1089.7	KS24.22
VITKKVADL	MAGE-A1 (101-109)	25	985.6	
ALREEEEGV	MAGE-A1 (301-309)	25	1030.5	
QIMPKTGFL	MAGE-A1 (187-195)	24	1033.6	
ILESIFRAV	MAGE-A1 (93-101)	23	1046.6	
ALEAQKEAL	MAGE-A1 (15-23)	22	971.5	
SLQLVFGIDV	MAGE-A1 (150-159)	22	1089.6	
CLGLSYDGL	MAGE-A1 (174-182)	21	939.4	
LLLLTVLTV	MUC1 (12-20)	31	983.7	
STAPPVHNV	MUC1 (950-958)	26	920.5	

3.1.3 Kalibrierung und Bestimmung der Sensitivität des HPLC-ESI-MS-Systems

Die Konzentration von CTL-Epitopen an der Oberfläche einer Zelle liegt nach Schätzungen bei 1-1000 Kopien pro Zelle (122;123). Während für Zelllinien die Zellzahl theoretisch beliebig erhöht werden kann, stehen für Untersuchungen solider gastrointestinaler Tumorproben (5-10 g Gewicht inklusive benachbartem gesunden Gewebe) in der Regel maximal 5×10^9 Zellen zur Verfügung. Berücksichtigt man zudem eine Ausbeute von schätzungsweise 25% nach Peptidextraktion und HPLC, so können für eine spezifische Detektion mit dem Massenspektrometer noch Stoffmengen im unteren fmol-Bereich erwartet werden.

Um die Sensitivität des analytischen Systems, bestehend aus dem Q-TOF ESI-Massenspektrometer und einer vorgeschalteten 75 μm ID Nanokapillar-RP-HPLC,

zu bestimmen, wurde zunächst die HLA-A2 Mischung 1 analysiert, wobei 680 fmol/Peptid und 68 fmol/Peptid eingesetzt wurden. Für eine 5×10^9 Zellen enthaltende Probe entspricht dies einer Konzentration von 340 und 34 Kopien/Zelle. Abb. 3.2A zeigt das BPI Chromatogramm für 680 fmol/Peptid. Die meisten Signale lassen sich eindeutig synthetischen Eichpeptiden zuordnen, wie für zwei Peptide exemplarisch gezeigt ist. Unterschiede in den Signalintensitäten spiegeln vor allem unterschiedliches Ionisierungsverhalten der Peptide wider. Abb. 3.2B-D zeigen für 68 fmol/Peptid das BPI Chromatogramm sowie die Massenchromatogramme zweier exemplarischer Peptide, p53₃₂₂₋₃₃₀ (m/z 1054.5) und CEA₆₉₄₋₇₀₂ (m/z 840.5). Die Signale im BPI Chromatogramm können nicht mehr Eichpeptiden zugeordnet werden können, sondern sind vielmehr auf Verunreinigungen wie z. B. aus den verwendeten Plastikgefäßen ausgewaschene Polyethylenglykole zurückzuführen. Die Massenchromatogramme zeigen dagegen eindeutige Signale zu vergleichbaren Retentionszeiten wie für die 680 fmol/Peptid-Mischung. Die unkorrigierten Peakintensitäten für m/z 1054.5 betragen 1.09×10^4 counts/scan (680 fmol) und 913 counts/scan (68 fmol). Für m/z 840.5 betragen sie 2.46×10^3 counts/scan (680 fmol) und 106 counts/scan (68 fmol).

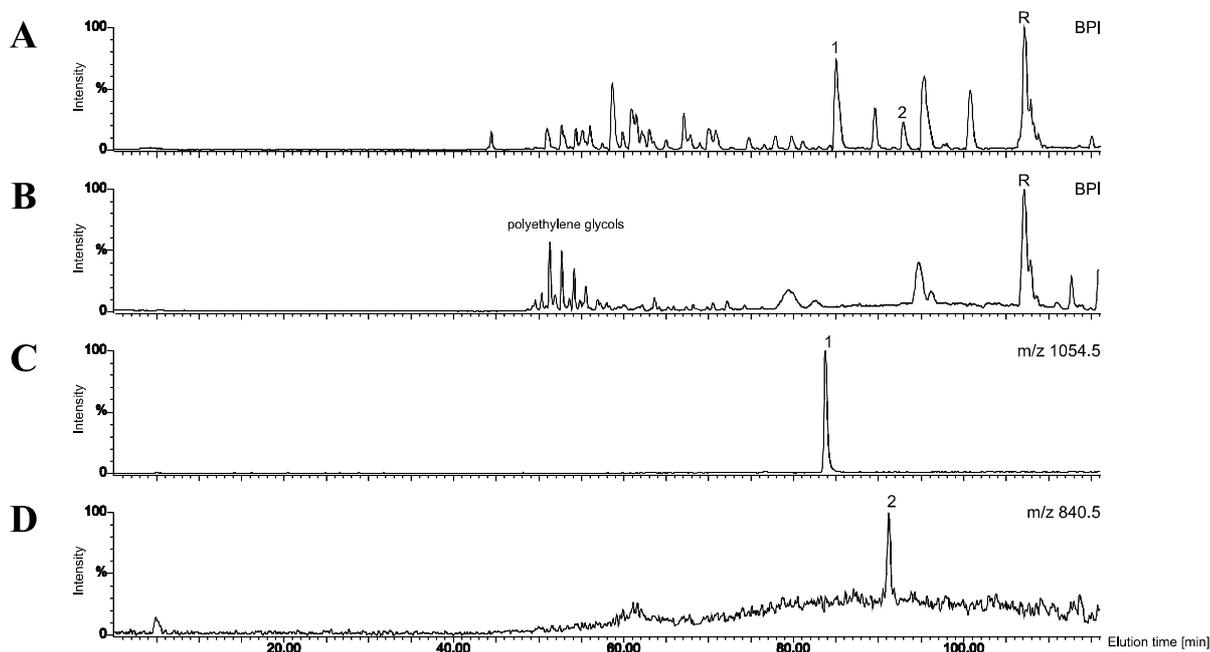


Abb. 3.2: Bestimmung der Sensitivität des Nanokapillar-HPLC-ESI-MS-Systems. A zeigt das BPI Chromatogramm für die 50 Peptide umfassende HLA-A2 Mischung 1 für 680 fmol/Peptid (R, HPLC Referenzpeak; für den mit 1 markierten Peak ist das Eichpeptid p53₃₂₂₋₃₃₀ mit m/z 1054.5 das Base peak ion; für 2 ist CEA₆₉₄₋₇₀₂ mit m/z 840.5 Base peak ion). B zeigt das BPI Chromatogramm für die HLA-A2 Mischung 1 für 68 fmol/Peptid. C und D zeigen die Massenchromatogramme für jeweils 68 fmol p53₃₂₂₋₃₃₀ (m/z 1054.5) und CEA₆₉₄₋₇₀₂ (m/z 840.5).

Diese Ergebnisse zeigen, daß auch in der Gegenwart großer Mengen an Selbstpeptiden und verunreinigender Substanzen für die meisten Peptide bei Stoffmengen von <10 fmol noch klar erkennbare Signale in den korrespondierenden Massenchromatogrammen erwartet werden können.

3.1.4 Identifizierung des tumorassoziierten natürlichen HLA-A2-Liganden p53₃₂₂₋₃₃₀

330

HLA-A2-assoziierte Peptide wurden von der p53-überexprimierenden humanen B-lymphoblastoiden Zelllinie C1R-A2 mit dem HLA-A2-spezifischen Antikörper BB7.2 extrahiert (durchgeführt von Tilman Dumrese) und Aliquots von etwa 3×10^9 Zellen mit dem Nanokapillar HPLC ESI MS-System analysiert.

Analyse der natürlichen HLA-A2-Liganden von C1R-A2-Zellen und Vergleich mit der synthetischen HLA-A2 Mischung 1 ergab Koelution von Peptiden mit den Massen der ausgewählten Selbstpeptide p68₁₆₈₋₁₇₆ (YLLPAIVHI), RL19₁₃₇₋₁₄₅ (ILMEHIHKL) und PP2A₄₀₂₋₄₁₀ (SLLPAIVEL), sowie des vorhergesagten tumorassoziierten Peptids p53₃₂₂₋₃₃₀ (PLDGEYFTL). Abb. 3.3A zeigt exemplarisch das Massenchromatogramm für m/z 1054.5, entsprechend den $[M+H]^+$ Ionen von p53₃₂₂₋₃₃₀, in der Mischung natürlicher HLA-A2-Liganden. Moleküle dieser Masse eluierten bei 53.6 min, das synthetische Peptid in der HLA-A2-Mischung 1 eluierte bei 54.1 min (nicht gezeigt). Für Mischungen natürlicher HLA-A2-Liganden wurde der Gradient optimiert (25-60% in 70min), um ein stabiles Elektrospray auch im hydrophilen Bereich des Gradienten und damit konstante Retentionszeiten zu gewährleisten. Dies erklärt die unterschiedlichen Retentionszeiten zwischen Abb. 3.2 und Abb. 3.3, 3.5 und 3.7.

Im Falle der Positivkontrolle p68₁₆₈₋₁₇₆ konnte die Peptidsequenz durch Nanoelektrospray-ESI-MS/MS-Analyse der $(M+2H)^{2+}$ Ionen in der nichtfraktionierten Probe verifiziert werden. In allen anderen Fällen war dies nur durch Nanokapillar-HPLC-ESI-MS/MS Analyse der $(M+H)^+$ oder $(M+2H)^{2+}$ Ionen möglich, was die höhere Sensitivität der „on-line“-Technik durch Aufkonzentration und Trennung gegenüber der konzentrationsabhängigen „off-line“-Technik verdeutlicht. Abb. 3.2.B zeigt das CID-Massenspektrum und damit die eindeutige Identifizierung des natürlichen HLA-A2-Liganden p53₃₂₂₋₃₃₀, aufgenommen zwischen 53.8 und 55.0 min.

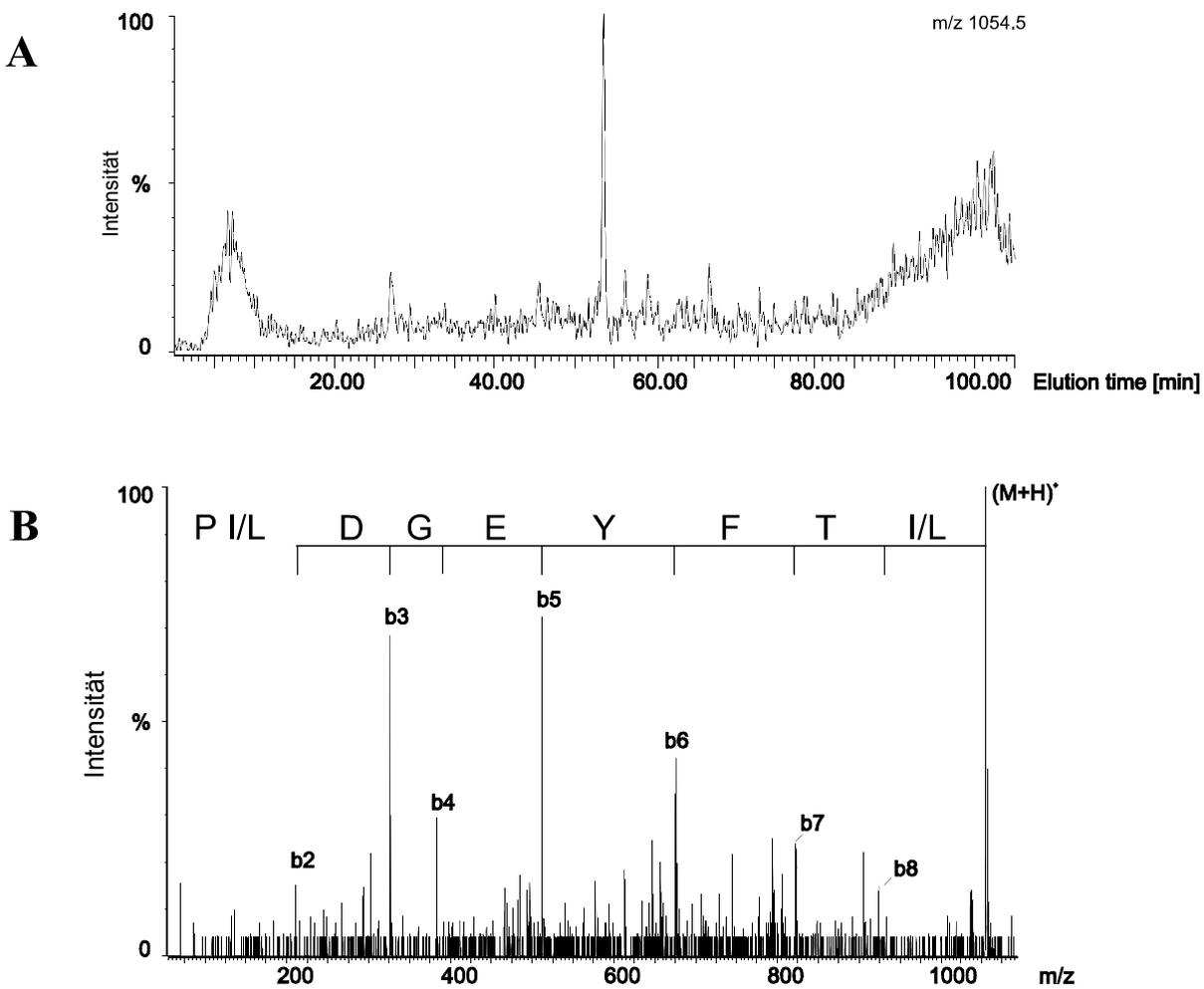


Abb. 3.3: Identifizierung des vorhergesagten tumorassoziierten HLA-A2-Liganden p53₃₂₂₋₃₃₀ in einer von C1R-A2-Zellen extrahierten Peptidmischung. A zeigt das Massenchromatogramm für (M+H)⁺ Ionen dieses Peptids (m/z 1054.5). Ein einzelner Peak bei 53.6 min ist zu erkennen, das synthetische Peptid eluierte bei 54.1 min (nicht gezeigt). B zeigt das CID Massenspektrum für m/z 1054.5 Ionen, aufgenommen zwischen 53.8 und 55.0 min. Nur Peaks der b-Serie sind gekennzeichnet.

Vergleiche der Signalintensitäten in den Massenchromatogrammen des synthetischen und des natürlichen Peptids ergaben für p68₁₆₈₋₁₇₆ unter Berücksichtigung der Ausbeute von etwa 25% nach Peptidextraktion und HPLC eine Konzentration von 1.2 pmol/3x10⁹ Zellen, was 240 Kopien/Zelle entspricht. Für p53₃₂₂₋₃₃₀ ergaben sich 40 fmol/3x10⁹ Zellen und damit 8 Kopien/Zelle.

Um nachzuweisen, daß p53₃₂₂₋₃₃₀ nicht nur als MHC-Ligand an der Zelloberfläche präsentiert wird, sondern auch als CTL-Epitop zu einer Aktivierung spezifischer CTL führt, wurden HHD-Mäuse eingesetzt (Experimente durchgeführt von Steve Pascolo). Diese exprimieren in geringem Maße ein Molekül, das aus der zytoplasmischen, der Transmembran- sowie der α₃-Domäne des H2-D^b-Moleküls, den α₁- und α₂-Domänen des HLA-A2-Moleküls sowie β₂-Mikroglobulin in einer Polypeptidkette besteht und die Ausbildung eines breiten Repertoires an CD8+

Zellen erlaubt (124). Zahlreiche Versuche, durch Injektion des synthetischen Peptids p53₃₂₂₋₃₃₀ PLDGEYFTL spezifische CTL zu generieren, schlugen fehl. Da diese Sequenz auch Bestandteil des murinen p53 ist und die negativen Ergebnisse möglicherweise auf Toleranzinduktion in den HHD-Mäusen zurückzuführen sind, wurden weitere Versuche mit modifizierten Peptiden durchgeführt: Während für ALDGEYFTL und AMDGEYFTL im T2-Stabilisierungsassay Bindung an HLA-A2 nachgewiesen werden konnte, ist dies für PMDGEYFTL nicht der Fall. Durch Immunisierung von AMDGEYFTL konnte schließlich eine CTL-Linie generiert werden, die murine Zielzellen nach Beladung mit dem modifizierten Peptid oder auch der Wildtypsequenz PLDGEYFTL erkennt (Abb. 3.4). Weitere Experimente zur genauen Charakterisierung der spezifischen Aktivität dieser CTL werden folgen.

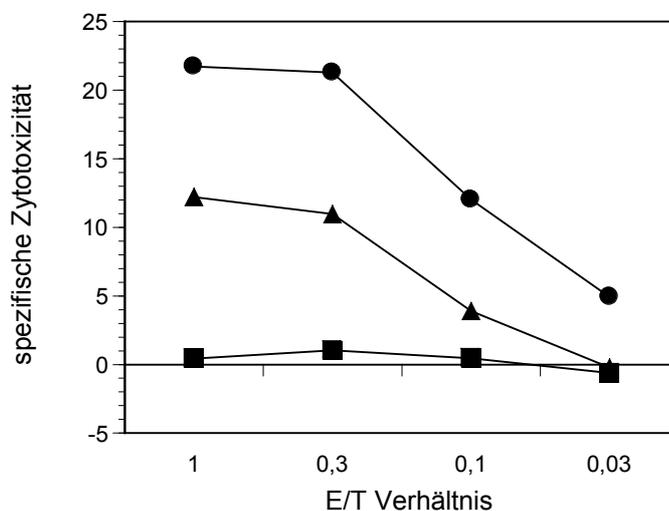


Abb. 3.4: Zytotoxizität der HLA-A2-restringierten CTL-Linie gegen unbeladene (gefüllte Quadrate), mit AMDGEYFTL beladene (gefüllte Kreise) und mit PLDGEYFTL beladene (gefüllte Dreiecke) Zielzellen (EL4S3-Rob/HHD)

3.1.5 Identifizierung des tumorassoziierten natürlichen HLA-A2-Liganden CEA₆₉₄₋

702

HLA-A2-assoziierte Peptide wurden von der HLA-A2⁺, CEA⁺⁺⁺ humanen Colonkarzinomzelllinie SW1116 mit dem HLA-A2-spezifischen Antikörper BB7.2 extrahiert (durchgeführt von Bernd Weber) und Aliquots von etwa 3×10^9 Zellen mit dem Nanokapillar HPLC-ESI-MS-System analysiert.

In zwei getrennten Experimenten konnte durch Vergleich mit der synthetischen HLA-A2 Mischung 1 neben der Positivkontrolle p68₁₆₈₋₁₇₆ auch für den vorhergesagten tumorassoziierten HLA-A2-Liganden CEA₆₉₄₋₇₀₂ ein koeluiendes Peptid gleicher Masse nachgewiesen werden. Abb. 3.5A zeigt exemplarisch das Massenchromatogramm für m/z 840.5, entsprechend den [M+H]⁺ Ionen von

CEA₆₉₄₋₇₀₂, in der Mischung natürlicher HLA-A2-Liganden. Moleküle dieser Masse eluierten bei 61.4 min, das synthetische Peptid in der HLA-A2-Mischung 1 eluierte bei 62.4 min (nicht gezeigt). Abb. 3.5B zeigt das CID Massenspektrum, aufgenommen zwischen 62.2 und 63.0 min, und damit die eindeutige Identifizierung des natürlichen HLA-A2-Liganden CEA₆₉₄₋₇₀₂. Das ungewöhnliche Fragmentspektrum mit vielen internen Fragmenten hoher Intensität wurde durch CID Analyse des synthetischen Peptides bestätigt (nicht gezeigt).

Die Quantifizierung, wie für p53₃₂₂₋₃₃₀ beschrieben, ergab für CEA₆₉₄₋₇₀₂ eine Konzentration von 120 fmol/3x10⁹ Zellen und damit 24 Kopien/Zelle.

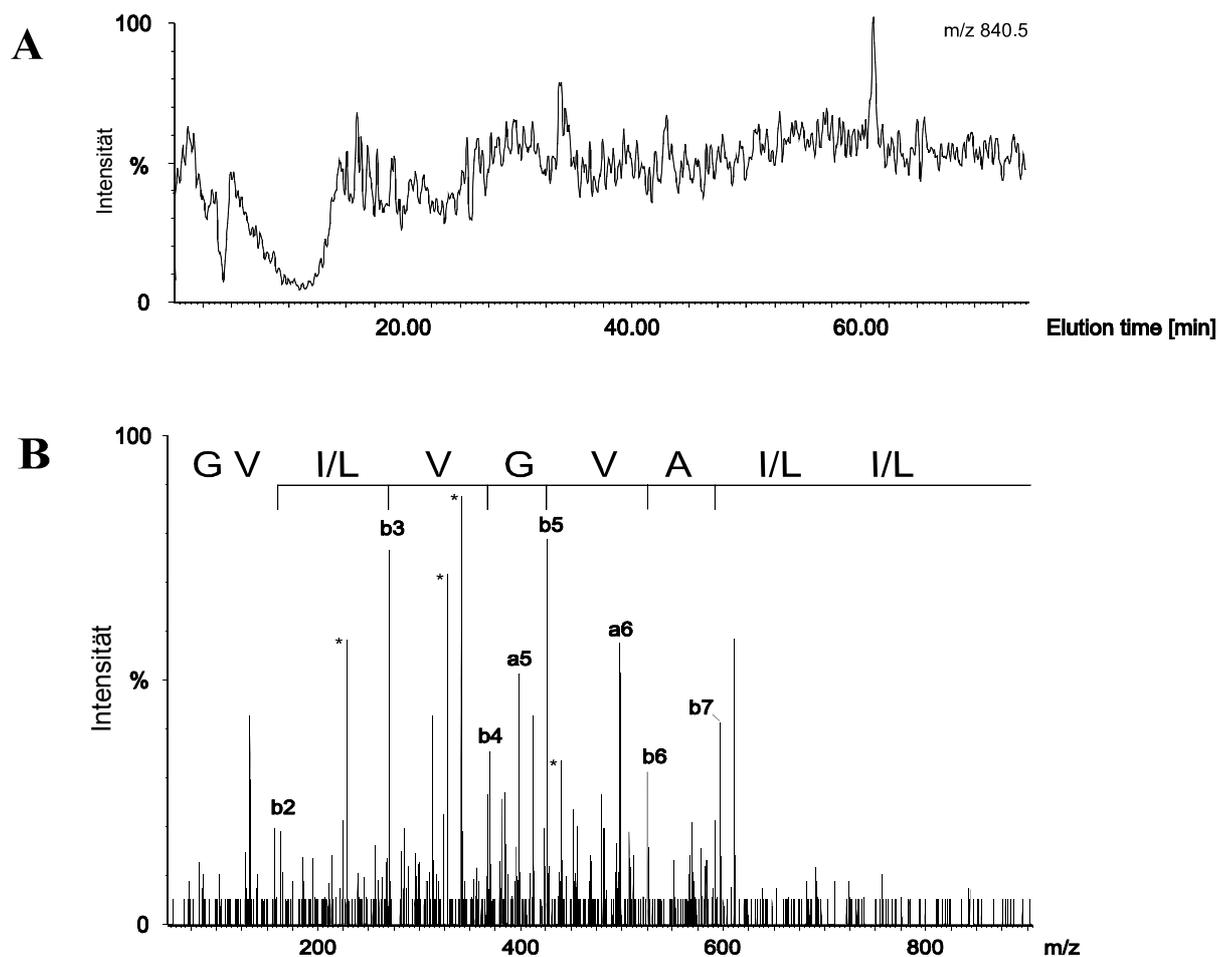


Abb. 3.5: Identifizierung des vorhergesagten tumorassoziierten HLA-A2-Liganden CEA₆₉₄₋₇₀₂ in einer von SW1116-Zellen extrahierten Peptidmischung. A zeigt das Massenchromatogramm für (M+H)⁺ Ionen dieses Peptides (m/z 840.5). Ein einzelner Peak bei 61.4 min ist zu erkennen, das synthetische Peptid eluierte bei 62.4 min (nicht gezeigt). B zeigt das CID Massenspektrum für m/z 840.5 Ionen, aufgenommen zwischen 62.2 und 63.0 min. Peaks der a- und b-Serie sowie interne Fragmente (*) sind gekennzeichnet.

Um nachzuweisen, daß CEA₆₉₄₋₇₀₂ nicht nur als MHC-Ligand an der Zelloberfläche präsentiert wird, sondern auch als CTL-Epitop zu einer Aktivierung spezifischer CTL führt, wurden wiederum Versuche in HHD-Mäusen durchgeführt (Experi-

mente durchgeführt von Steve Pascolo). Durch Immunisierung mit synthetischem CEA₆₉₄₋₇₀₂ konnten wiederholt CTL erhalten werden, die sowohl peptidbeladene murine Zielzellen (Abb. 3.6A) als auch SW1116-Zellen, von denen das Peptid extrahiert worden war, erkannten (Abb. 3.6B) und mit CEA₆₉₄₋₇₀₂-HLA-A2-Tetrameren gefärbt werden konnten (nicht gezeigt). Eine vollständige Charakterisierung der Aktivität dieser CTL gegen Tumorzellen steht allerdings aufgrund von Problemen in der permanenten Kultur dieser CTL-Linien noch aus.

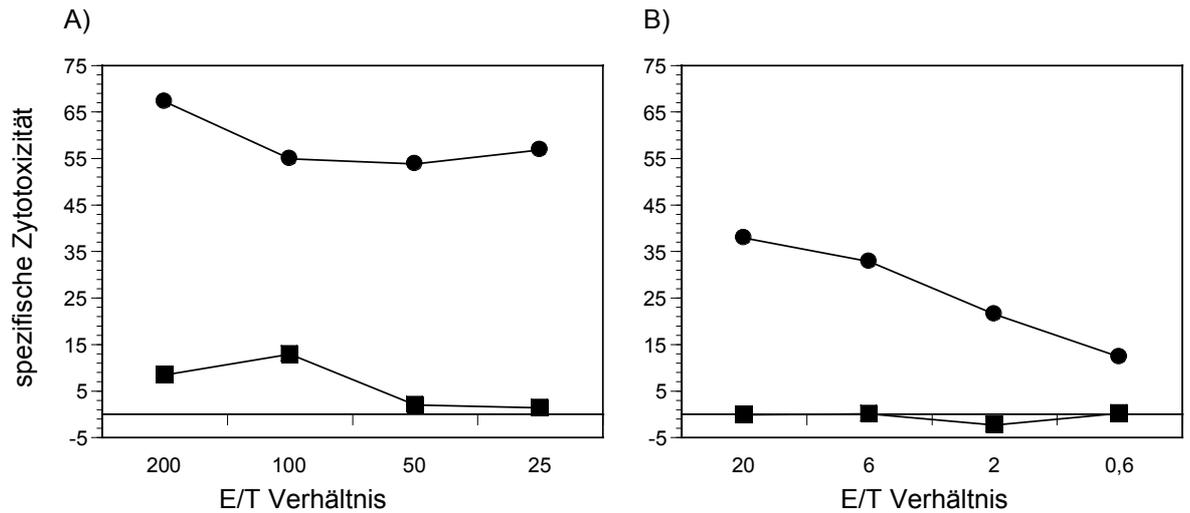


Abb. 3.6: Zytotoxizität der HLA-A2-restringierten CEA₆₉₄₋₇₀₂-spezifischen CTL-Linie

A) gegen unbeladene (gefüllte Quadrate) und beladene (gefüllte Kreise) Zielzellen (EL4S3-Rob/HHD) nach einer Woche *in vitro* Restimulation

B) gegen SW1116-Zellen von denen das Peptid extrahiert worden war (gefüllte Kreise) nach zwei Wochen *in vitro* Restimulation; HLA-A2-restringierte CTL-Linie aus HHD-Mäusen gegen HPV-16 E7 86-93 (gefüllte Quadrate)

3.1.6 Analyse von HLA-A2-Liganden von soliden Tumorproben

Der „Predict, Calibrate, Detect“-Ansatz wurde im Rahmen dieser Arbeit auch auf extrahierte HLA-A2-Liganden von insgesamt 16 Colonkarzinomproben (CCA), 4 Magenkarzinomproben (MCA), 4 Rektumkarzinomproben (RCA) sowie eine Pankreastumorprobe (PCA) angewandt. In Peptidmischungen von 8 CCA-Proben konnte mindestens eine Positivkontrolle nachgewiesen werden (siehe Tab.3.1). Für CCA11 (8.2 g, etwa 4×10^9 Zellen), ein mittelgradig entdifferenziertes Adenokarzinom des Coecums (Dukes Stadium C), konnte zusätzlich zu p68₁₆₈₋₁₇₆ auch CEA₆₉₄₋₇₀₂ mit 400 fmol/ 8×10^8 Zellen und damit 300 Kopien/Zelle nachgewiesen werden (Abb. 3.7). Für eine Probe gesunden Colongewebes konnte keine Präsentation von CEA₆₉₄₋₇₀₂ nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

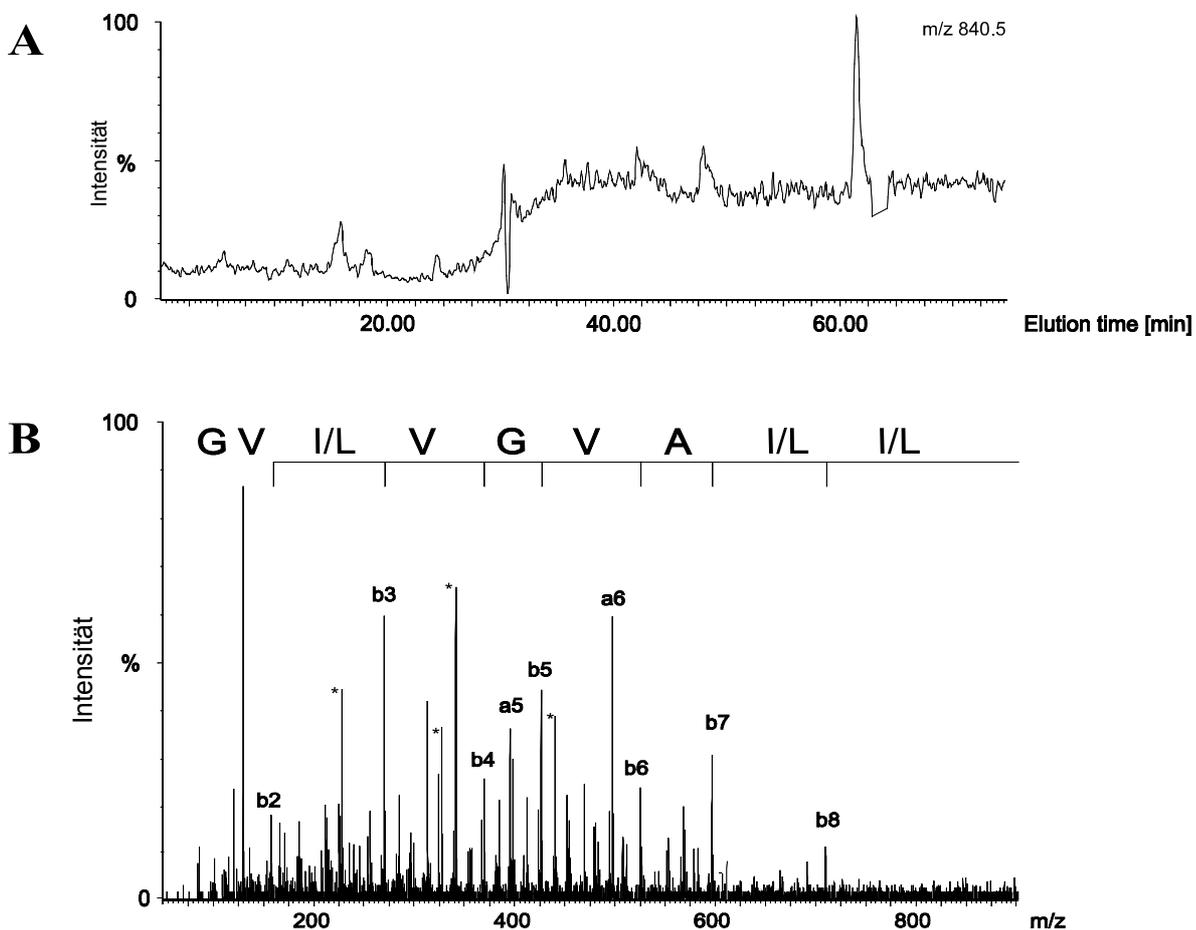


Abb. 3.7: Identifizierung des vorhergesagten tumorassoziierten HLA-A2-Liganden CEA₆₉₄₋₇₀₂ in einer Peptidmischung, die von der soliden Colonkarzinomprobe CCA11 extrahiert worden war. A zeigt das Massenchromatogramm für (M+H)⁺ Ionen dieses Peptides (m/z 840.5). Ein einzelner Peak bei min ist zu erkennen, das synthetische Peptid eluierte bei 66.6 min (nicht gezeigt). B zeigt das CID Massenspektrum für m/z 840.5 Ionen, aufgenommen zwischen 63.9 und 64.6 min. Peaks der a- und b-Serie sowie interne Fragmente (*) sind gekennzeichnet.

Nicht jeder Ligand, der mit einem synthetischen Eichpeptid gleicher Masse koeluiert, stellt sich bei den tandemmassenspektrometrischen Untersuchungen auch wirklich als das gesuchte Peptid heraus. Da jedoch bis jetzt nur für wenige MHC-Liganden Präsentation auf Tumorgewebe nachgewiesen werden konnte, ist zunächst prinzipiell jeder MHC-Ligand von einer soliden Tumorprobe von Interesse. Daher wurden in diesen Fällen auch solche Fragmentspektren, die ein vorhergesagtes Peptid nicht bestätigten, weiterverfolgt und folgende HLA-A2-Liganden aus Proteinen ohne bekannte Tumorassoziation identifiziert (Tab. 3.3). Die Identifizierung der Peptide erfolgte unter Verwendung des Suchalgorithmus PeptideSearch.

Tab. 3.3: natürliche HLA-A2-Liganden aus Proteinen ohne bekannte Tumorassoziation, für die ein Präsentation auf soliden Tumorgewebsproben nachgewiesen werden konnte. Ankeraminosäuren in Position 2 und am C-Terminus sind fett gedruckt.

Sequenz	Masse (neutral)	Protein (Position)	EMBL Datenbank- eintrag	identifiziert in Probe
P A M D V Q F P V	1002.5	Katanin P80 subunit (422-430)	AF052432	CCA30
D V T A I I F V V	975.6	Guanin Nukleotid-bind. Protein G(S) (240-248)	X04408	CCA30
T A A G R K T V Q L	1043.6	Hypothetisches Protein KIAA0196 (492-501)	D83780	CCA30
V L N V A L L N V	953.6	Hepatocyte growth factor-like protein (618-626)	M74180	CCA47
S L F D L N F Q A	1053.5	NAD(P)H:Menadion Oxidoreduktase (227-235)	J03934	CCA47

3.1.7 Identifizierung des tumorassoziierten natürlichen HLA-A2-Liganden MAGE-A1₂₇₈₋₂₈₆

HLA-A2-assoziierte Peptide wurden nach IFN- γ -Behandlung von der Her-2/neu-transfizierten humanen Ovarialkarzinomzelllinie KS24.22 (MAGE-A1⁺, MAGE-A3⁺, CEA⁺, MUC1⁺, HLA-A2⁺) mit dem HLA-A2-spezifischen Antikörper BB7.2 extrahiert (durchgeführt von Tilman Dumrese), und Aliquots von etwa 10¹⁰ Zellen mit dem Nanokapillar HPLC ESI MS-System analysiert.

Durch Vergleich mit der erweiterten synthetischen HLA-A2 Mischung 2 konnte unter anderem neben den Positivkontrollen p68₁₆₈₋₁₇₆ und PP2A₄₀₂₋₄₁₀ für den vorhergesagte tumorassoziierten HLA-A2-Liganden MAGE-A1₂₇₈₋₂₈₆ ein koeluiertes Peptid gleicher Masse nachgewiesen werden. Abb. 3.3A zeigt das Massenchromatogramm für m/z 545.9, entsprechend den [M+2H]²⁺ Ionen von MAGE-A1₂₇₈₋₂₈₆, in der synthetischen HLA-A2-Mischung 2. Ein einzelner Peak bei 42.8 min ist zu erkennen, das isobare Peptid MAGE-A1₁₅₀₋₁₅₉ eluierte ausschließlich in der [M+H]⁺-Form bei 83.2 min (nicht gezeigt). In der Mischung natürlicher HLA-A2-Liganden sind im Massenchromatogramm mehrere Peaks zu erkennen, die zumindest teilweise auf Moleküle mit m/2 545.9 zurückzuführen sind. An diesem Beispiel wird deutlich, daß die zusätzliche Kenntnis der Retentionszeit des synthetischen Peptides den Nachweis eines vorhergesagten Liganden stark vereinfacht. Hier zeigt das Spektrum bei 42.4 min, daß der Peak zu dieser Retentionszeit auf Ionen mit m/2 545.9 zurückzuführen ist. Abb. 3.8 zeigt das CID Massenspektrum, aufgenommen während des tandemmassenspektrometrischen Experimentes zwischen 42.8 und 43.4 min und damit die eindeutige Identifizierung des natürlichen HLA-A2-Liganden MAGE-A1₂₇₈₋₂₈₆. Auch für p68₁₆₈₋₁₇₆ und PP2A₄₀₂₋₄₁₀ konnte die Sequenz durch Nanokapillar-HPLC-ESI-MS/MS bestätigt werden (nicht gezeigt). Die Quantifizierung ergab für MAGE-A1₂₇₈₋₂₈₆ 300 fmol/10¹⁰ Zellen und damit 18 Kopien/Zelle, für das Selbstpeptid ergaben sich 2.5 pmol/10¹⁰ Zellen und damit 600 Kopien/Zelle.

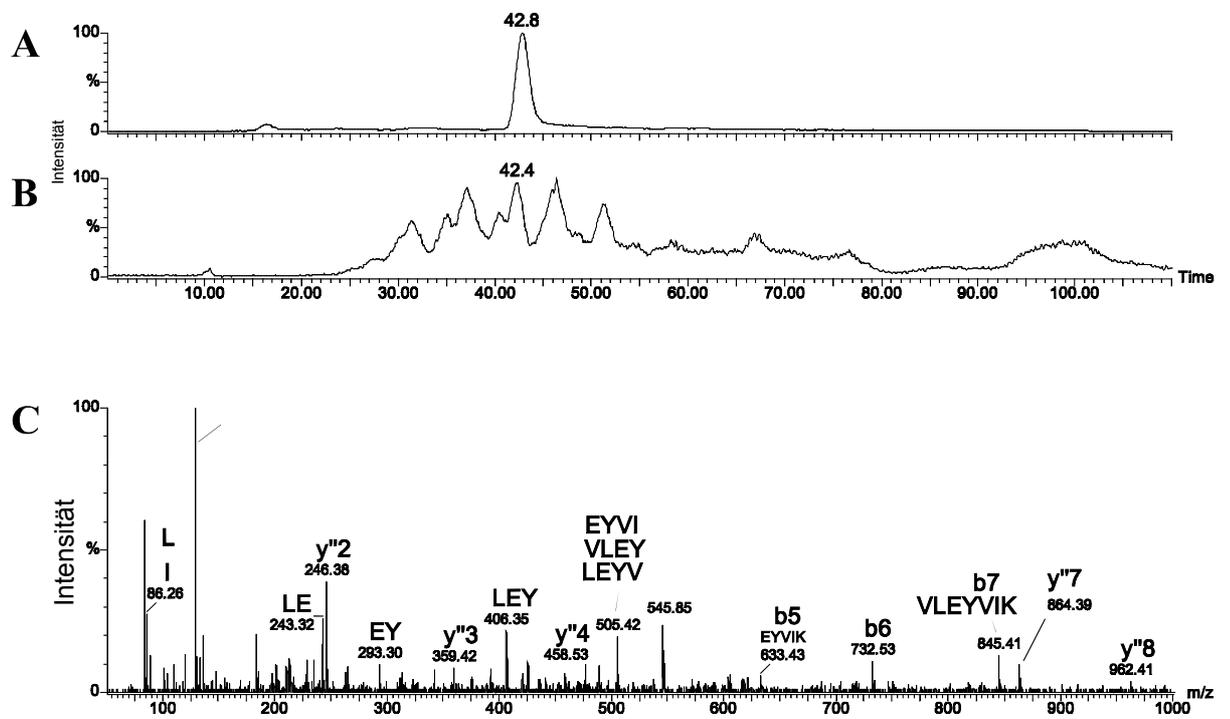


Abb. 3.8: Identifizierung des vorhergesagten tumorassoziierten HLA-A2-Liganden MAGE-A1₂₇₈₋₂₈₆ in einer Peptidmischung, die von der Ovarialkarzinomzelllinie KS24.22 extrahiert worden war. A zeigt das Massenchromatogramm für (M+2H)²⁺ Ionen dieses Peptides (m/z 545.9) in der synthetischen HLA-A2 Mischung 2. Das synthetische Peptid eluierte bei 42.8 min. B zeigt das Massenchromatogramm für m/z 545.9 in der Mischung natürlicher Liganden. Neben weiteren Peaks ist auch ein Peak bei 42.4 min zu erkennen. C zeigt das CID Massenspektrum für m/z 545.9 Ionen, aufgenommen zwischen 42.8 und 43.4 min. Ionen der b-, y"-Serie sowie interne Fragmente sind gekennzeichnet.

Um nachzuweisen, daß MAGE-A1₂₇₈₋₂₈₆ nicht nur als MHC-Ligand an der Zelloberfläche präsentiert wird, sondern auch als CTL-Epitop zu einer Aktivierung spezifischer CTL führt, wurden HHD-Mäuse eingesetzt (nachfolgende Experimente durchgeführt von Steve Pascolo). Eine subkutane Injektion von synthetischem MAGE-A1₂₇₈₋₂₈₆ und dem H2-A^b Helferpeptid aus dem HBV Core Protein (125), führte nach *in vitro* Stimulierung der Milzzellen nach 10 Tagen mit synthetischem MAGE-A1₂₇₈₋₂₈₆ und IL-2 zu CTL mit spezifischer Zytotoxizität gegen murine Zielzellen, die mit synthetischem MAGE-A1₂₇₈₋₂₈₆ beladen worden waren (Abb. 3.9).

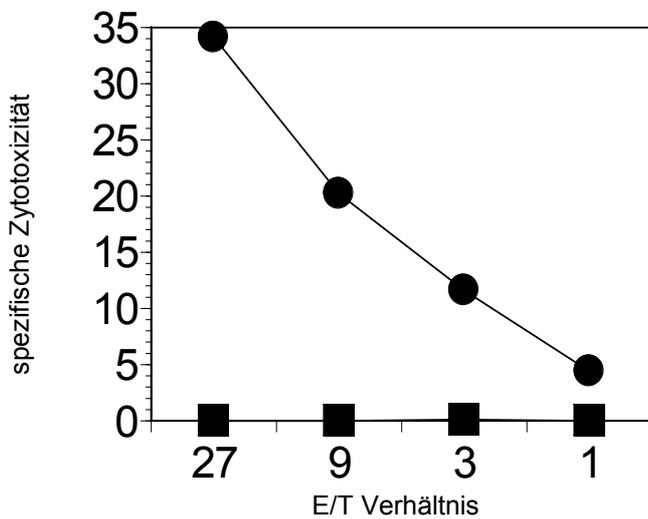


Abb. 3.9: Zytotoxizität der HLA-A2-restringierten, -spezifischen CTL-Linie gegen unbeladene (gefüllte Quadrate) und peptidbeladene (gefüllte Kreise) Zielzellen (EL4S3-Rob/HHD)

Nach *in vitro* Restimulierungen wurden CTL-Linien erhalten, die spezifisch durch HLA-A2-MAGE-A1₂₇₈₋₂₈₆-Tetramere gefärbt werden konnten (durchgeführt von Arnaud Moris, nicht gezeigt). Weiterhin wurde die Erkennung einer Reihe humaner Tumorzelllinien in Zytotoxizitätsassays getestet. Alle peptidbeladenen HLA-A2⁺ Tumorzellen wurden durch die murinen MAGE-A1₂₇₈₋₂₈₆-spezifischen CTL-Linien lysiert, aber nur die INF- γ -stimulierten KS24.22 Zellen, die sowohl HLA-A2 als auch MAGE-A1 exprimieren, wurden auch ohne Peptidbeladung erkannt. Tumorzellen die entweder nur HLA-A2 (GAKL, 721) oder nur MAGE-A1 (KLHE) exprimieren, wurden auch nach Stimulierung durch INF- γ nicht lysiert (Abb 3.10). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß HeLa-Zellen, die ein chimäres HLA-A2-Molekül ähnlich dem HHD exprimieren, nach transients Transfektion mit einem pIRES Plasmid kodierend für MAGE-A1 durch die murinen MAGE-A1₂₇₈₋₂₈₆-spezifischen CTL-Linien lysiert werden, nicht jedoch nach Transfektion mit einem für CEA kodierenden pIRES Plasmid (nicht gezeigt).

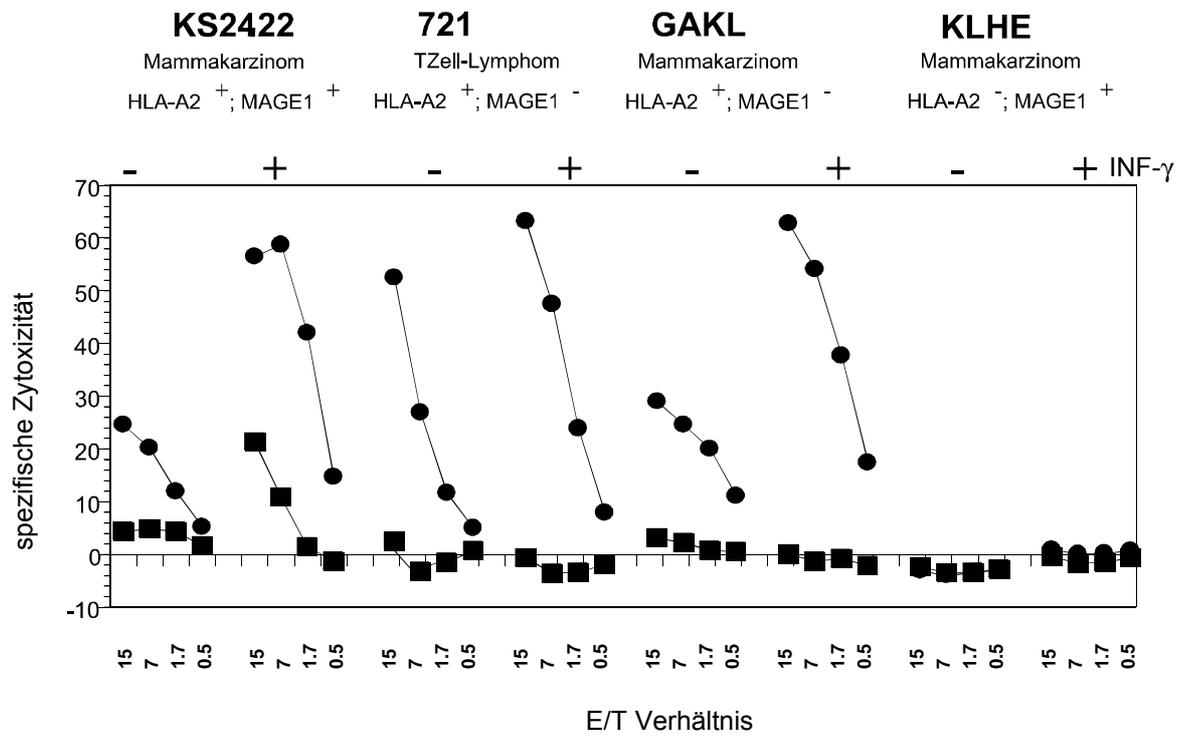


Abb. 3.10: Zytotoxizität der MAGE-A1₂₇₈₋₂₈₆-spezifischen CTL-Linie gegen peptidbeladene (gefüllte Kreise) oder unbeladene (gefüllte Quadrate) humane Tumorzellen mit oder ohne INF- γ -Behandlung

3.2 Identifizierung virusspezifischer MHC Klasse I-Liganden durch HPLC-MS und -MS/MS-Analyse

Die Identifizierung virusspezifischer MHC Klasse I-Liganden kann prinzipiell analog zu den in 3.1 beschriebenen Anwendungen für tumorassoziierte Liganden durch den „Predict, Calibrate, Detect“-Ansatz erfolgen. Im hier vorliegenden Fall waren jedoch durch O. Planz schon Vorarbeiten durchgeführt worden mit dem Ziel, durch einen „Reverse Immunology“-Ansatz Liganden des RT1.A^I-Moleküls der Ratte aus Proteinen des Borna Disease Virus (BDV) zu identifizieren.

Dazu wurden zunächst die 5 Proteine aus BDV, für die SwissProt Datenbankeinträge vorliegen (p40, p24, gp18, gp94, L-pol), durch Epitopvorhersage auf potentielle RT1.A^I-Liganden hin untersucht. Optimale RT1.A^I-Liganden sind Nonamere mit F oder Y in P3 sowie großen hydrophoben Resten in P9 (126). Insgesamt 16 Peptide wurden daraufhin synthetisiert und zur Beladung von Fibroblasten (LEW) aus RT1.A^I+ Lewisratten eingesetzt. Um zu testen, ob die vorhergesagten Peptide durch BDV-spezifische CD8⁺ T Zellen erkannt werden, wurden Lewisratten intracerebral mit BDV infiziert und nach 19 Tagen Lymphozyten aus dem Gehirn isoliert. In Zytotoxizitätstests gegen peptidbeladene LEW-Zellen erkannten diese T Zellen nur Zellen beladen mit p40₂₃₀₋₂₃₈ (ASYAQMTTY) (Arbeiten durchgeführt von Oliver Planz und Mitarbeitern an der BFA für Viruskrankheiten der Tiere, Institut für Immunologie, Tübingen).

Weiterhin wurden mit dem MHC Klasse I-spezifischen Antikörper OX18 natürliche RT1.A^I-Liganden von BDV-infizierten LEW-Zellen extrahiert und über durch RP-HPLC aufgetrennt (durchgeführt von Tilman Dumrese). Nichtinfizierte LEW-Zellen wurden mit Aliquots dieser Fraktionen inkubiert und als Zielzellen für BDV-spezifische T Zellen in Zytotoxizitätstests eingesetzt. Signifikante BDV-spezifische Lyse konnte für Fraktion 24 (42%) sowie in geringerem Maße für Fraktion 23 (25%) nachgewiesen werden. Zudem konnte gezeigt werden, daß das synthetische Peptid p40₂₃₀₋₂₃₈ unter identischen HPLC-Bedingungen mit der CTL-reaktiven Fraktion 24 koeluierte.

Um die Identität des Peptides zu bestätigen und eine Abschätzung der Kopienzahl/Zelle zu ermöglichen, wurde die Fraktion 24 der natürlichen RT1.A^I-Liganden von 2.5×10^{10} BDV-infizierten LEW-Zellen analog zu den in Abschnitt 3.1 beschriebenen Experimenten durch Nanokapillar HPLC MS und MS/MS analysiert, wobei identische HPLC-Bedingungen wie für die Analyse von HLA-A2-Liganden gewählt

wurden. Da die Infektionseffizienz von BDV bei nur 3 Viruskopien/Zelle liegt, wurde zudem Fraktion 24 von RT1.A^I-Liganden von 4.5×10^9 LEW-Zellen analysiert, die mit einem rekombinanten, p40 exprimierenden Vacciniavirus (100 Viruskopien/Zelle) infiziert worden waren.

Die Analyse der vermeintlich erfolgversprechenderen Fraktion 24 der Liganden von Vaccinia-infizierten Zellen ergab jedoch ein äußerst schwaches Signal bei 48.8 min im Massenchromatogramm für m/z 1035.5 entsprechend den $[M+H]^+$ Ionen des Peptides p40₂₃₀₋₂₃₈ (Abb 3.11A). Eine Verifizierung der Peptidsequenz durch HPLC-MS/MS war nicht möglich. Dieses negative Ergebnis wurde später im Western Blot bestätigt, die Expression von p40 in diesen Zellen war nicht nachweisbar.

Dagegen zeigt Abb. 3.11B für das Massenchromatogramm für m/z 1035.5 für Fraktion 24 der MHC-Liganden von BDV-infizierten LEW-Zellen einen deutlichen Peak bei 50.1 min. Allerdings war angesichts der vermeintlich niederen Expression selbst bei hoher Viruskopienzahl/Zelle bei Infektion mit rekombinanten Vacciniavirus für die BDV-infizierten Zellen eine höchstens vergleichbare Menge an Peptid erwartet worden und deshalb die gesamte Probe eingesetzt worden. Für das anschließende Nanokapillar HPLC MS/MS-Experiment wurde daher das leere Probengefäß mit 20 µl 50% Methanol/49% H₂O/1% Ameisensäure ausgewaschen, mit H₂O verdünnt und analysiert. Abb. 3.11C zeigt, daß die Aufnahme eines CID Massenspektrum und damit die eindeutige Identifizierung des BDV-spezifischen natürlichen RT1.A^I-Liganden p40₂₃₀₋₂₃₈ dennoch möglich war. Dieses Resultat verdeutlicht auch die möglichen Probenverluste durch Adsorption von Probe an die Wände der eingesetzten Probengefäße.

Die Quantifizierung, wie in 3.1.3 für p53₃₂₂₋₃₃₀ beschrieben, ergab für p40₂₃₀₋₂₃₈ eine Konzentration von 3.7 pmol/ 2.5×10^{10} Zellen und damit 350 Kopien/Zelle.

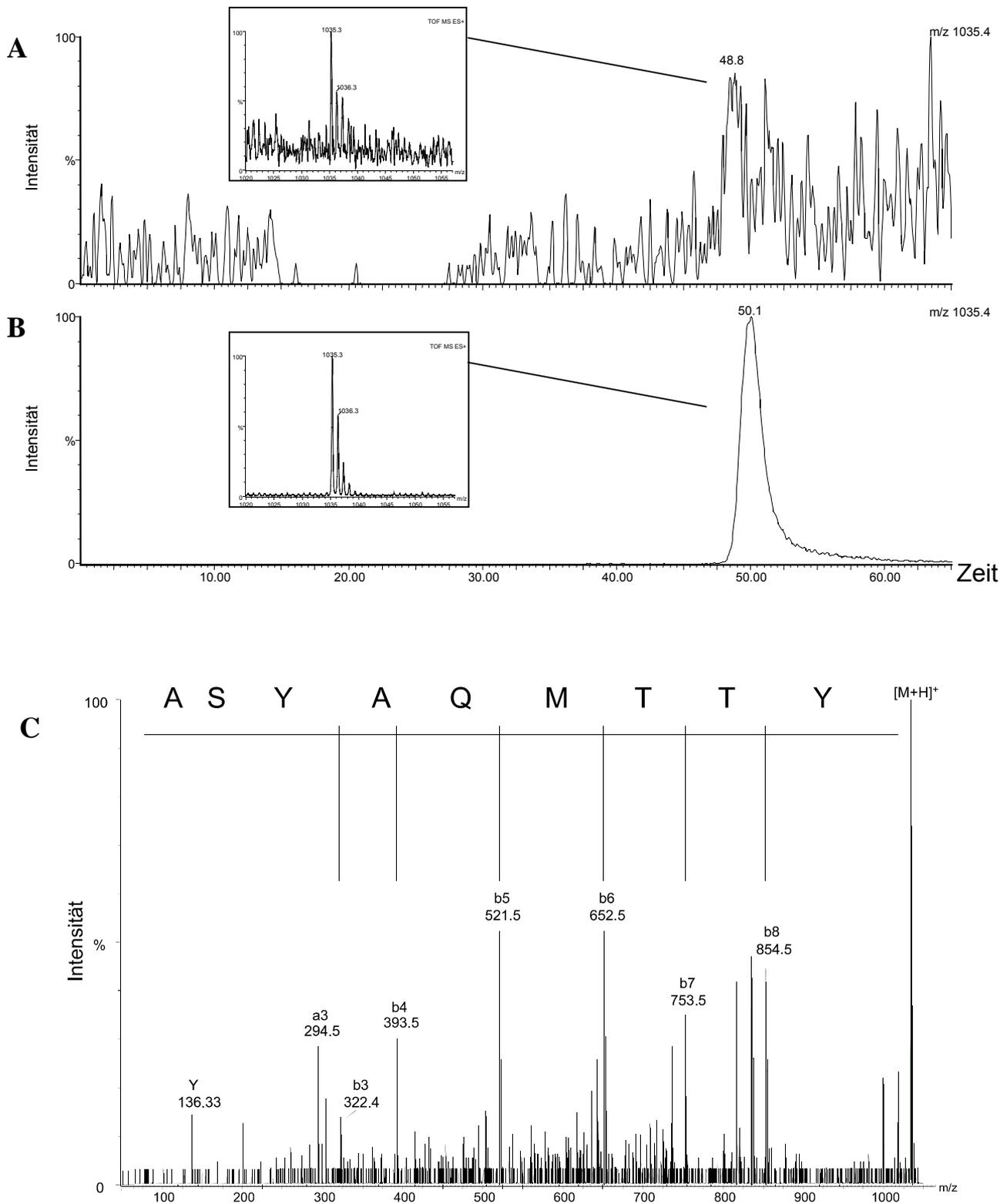


Abb. 3.11: Identifizierung des BDV-spezifischen RT1.A¹-Liganden p40₂₃₀₋₂₃₈ (ASYAQMTTY). A zeigt das Massenchromatogramm für (M+H)⁺ Ionen dieses Peptides (m/z 1035.5) in einer Peptidmischung, extrahiert von LEW-Zellen infiziert mit rekombinantem, p40 exprimierendem Vaccinia-virus. Ein sehr schwacher Peak (5 counts/scan) bei 48.8 min ist zu erkennen. B zeigt das Massenchromatogramm für m/z 1035.5 in einer Peptidmischung extrahiert von BDV-infizierten LEW-Zellen. Ein deutlicher Peak (916 counts/scan) bei 51.0 min ist zu erkennen. Für beide Massenchromatogramme ist in den eingefügten Spektrumausschnitten verdeutlicht, daß die jeweiligen Signale auf einfach geladene Ionen dieser Masse zurückzuführen sind. C zeigt das CID Massenspektrum für m/z 1035.5 Ionen (BDV-infizierte LEW-Zellen). Peaks der a- und b-Serie sowie Immoniumionen sind gekennzeichnet.

3.3 Identifizierung von MHC Klasse II-präsentierten Peptiden aus dem IDDM-assozierten Protein Glutaminsäuredecarboxylase 65

Da MHC Klasse II-Liganden häufig als Längenvarianten einer einzelnen Kernsequenz auftreten, erscheint hier ein Vorgehen nach dem „Predict, Calibrate, Detect“-Ansatz kaum sinnvoll, da sich bei N- und C-terminaler Verlängerung um bis zu 5 Aminosäuren für jede Kernsequenz 25 Eichpeptide ergeben würden. Zudem sind Vorhersagen von MHC Klasse II-Liganden noch nicht so verlässlich wie es für MHC-Klasse I der Fall ist.

Im Fall der Bestimmung von MHC Klasse II-Liganden aus der Glutaminsäuredecarboxylase 65 (GAD65), einem Autoantigen in der insulinabhängigen Form der Diabetes, wurde daher der Versuch unternommen, in Zusammenarbeit mit Petra Söhnlein (Orthopädische Universitätsklinik, Heidelberg) durch radioaktiven Markierung des Proteins das Aufspüren der natürlich prozessierten Liganden zu ermöglichen. Abb. 3.12 zeigt, daß durch Markierung von GAD65 mit ^{35}S -Methionin und ^3H -Leucin 95 % der gesamten Proteinsequenz abgedeckt werden können. Nur für zwei kurze Abschnitte im N-terminalen Bereich des Proteins liegen weder ein Methionin- noch ein Leucinrest im Abstand von weniger als 15 Aminosäuren.

1	<u>M</u> ASPGSGFWS	<u>F</u> GEDGSGDS	ENPGTARAWC	<u>Q</u> VAQKFTGGI	<u>G</u> NKLCALLYG
51	<u>D</u> AEKPAESGG	<u>S</u> QPPRAAARK	<u>A</u> ACACDQKPC	SCSKVDVNVA	<u>F</u> LHATD <u>L</u> LPA
101	<u>C</u> DGERPTLAF	<u>L</u> QDVMNILLQ	YVVKSFDRST	KVIDFHYPNE	<u>L</u> LQEYNWELA
151	<u>D</u> QPQNLEEIL	M HCQTTLKYA	IKTGHPRYFN	<u>Q</u> LSTGLDMVG	L AADWLTSTA
201	<u>N</u> TNMFTYEIA	PVFLLEYVT	L KKMREIIGW	PGSGDGIFS	PGGAISNMYA
251	M MIARFKMFP	EVKEKGMAAL	PRLIAFTSEH	SHFSLKKGAA	ALGIGTDSVI
301	<u>L</u> IKCDERGKM	IPSDLERRIL	EAKQKGFVPF	L VSATAGTTV	YGAFD <u>P</u> LLAV
351	<u>A</u> DICKKYKIW	MHVDAAWGGG	L LMSRKHKWK	L SGVERANSV	TWNPHK M MGV
401	<u>P</u> LQCSALLVR	EEGLMQNCNQ	M HASYLFQQD	KHYDLSYDTG	DKALQCGRHV
451	<u>D</u> VFKLWLMWR	AKGTTGFEAH	VDKCLELAEY	L YNIKKNREG	Y EMVFDGKPO
501	<u>H</u> TNVCFWYIP	PSLRTLEDNE	ERMSRLSKVA	PVIKAR M MEY	GTTMVSYQPL
551	<u>G</u> DKVNFFRMV	ISNPAATHQD	IDFLIEEIER	L GQDL	

Abb. 3.12: Markierung von GAD65 mit ^{35}S -Methionin und ^3H -Leucin. Regionen des Proteins, für die ein Methionin- oder Leucinrest im Abstand von weniger als 15 Aminosäuren liegt, sind unterstrichen; Methionin- und Leucinreste sind fett gedruckt.

Als Quelle für HLA-DR-Liganden dienten in diesem Fall MICA4-Zellen: Autoreaktive B-Zellen, die aus einem HLA-DR1⁺/DR7⁺ IDDM-Patienten isoliert wurden und deren B Zellrezeptor (BCR) ein Epitop in der zentralen Region von GAD65 erkennt (aa 245-450) (127) und somit für eine effiziente BCR-vermittelte Internalisierung von exogener GAD65 sorgt.

2.6×10^9 MICA4-Zellen wurden 16 h mit GAD65 (1 mg/ 10^9 Zellen) inkubiert, davon 10% mit radioaktiv markierter GAD65. Anschließend wurden die HLA-DR-Liganden der insgesamt eingesetzten Zellen mit dem HLA-DR-spezifischen Antikörper L243 isoliert (durchgeführt von Petra Söhnlein). Die extrahierten HLA-DR-Liganden wurden danach über RP-HPLC aufgetrennt und 2 µl Aliquots der 100-300 µl Fraktionen in einem β-Counter auf ³⁵S- und ³H-Radioaktivität hin untersucht. Wie aus Abb. 3.12 ersichtlich, ergaben sich für die ³⁵S-Radioaktivität zwei Peaks, während für ³H-Radioaktivität keine Peaks erkennbar waren (nicht gezeigt). Damit sollten die Sequenzen der mit diesem Ansatz nachweisbaren dominanten HLA-DR-Liganden aus GAD65 mindestens ein Methionin, jedoch kein Leucin enthalten.

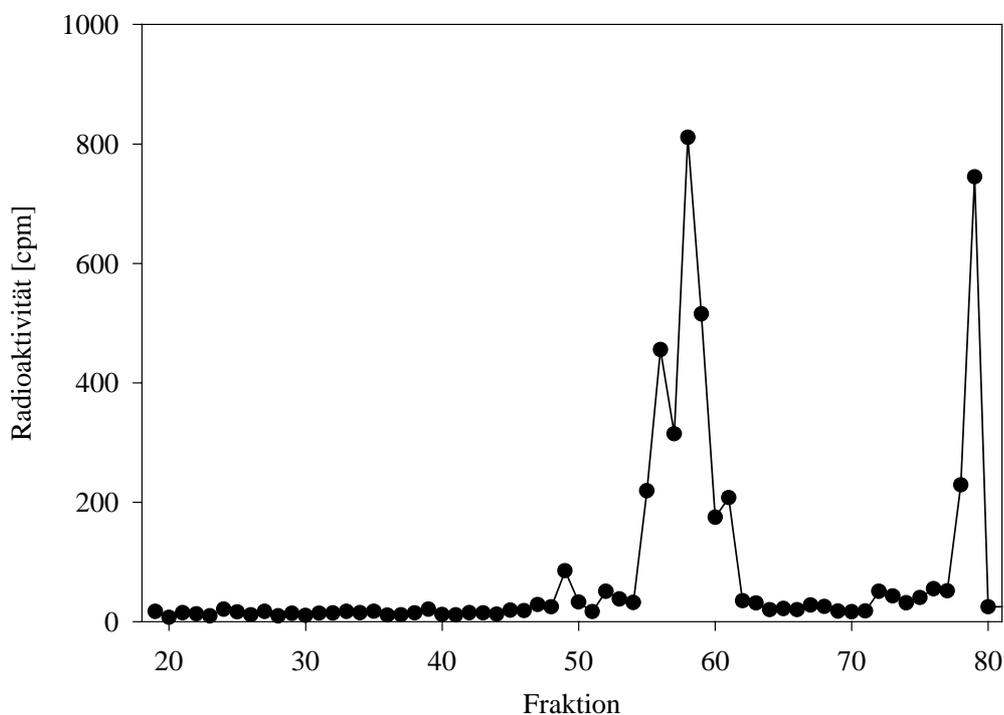


Abb. 3.12: ³⁵S-Radioaktivität in HLA-DR-Liganden der GAD65-spezifischen B-Zelllinie MICA4 nach Inkubation mit ³⁵S-Methionin-markierter GAD65

Radioaktive Fraktionen wurden anschließend durch Tandemmassenspektrometrie im Nanoelektrosprayverfahren untersucht. Die Identifizierung der Peptide erfolgte unter Verwendung des Suchalgorithmus PeptideSearch. Abb. 3.13 zeigt das Übersichtsspektrum für die repräsentative Fraktion 59. Neben hohen $[M+2H]^{2+}$ - und $[M+3H]^{3+}$ -Signalen, die durch MS/MS-Analyse als HLA-DR1-Liganden aus dem Transferrinrezeptor identifiziert werden konnten, ist auch ein Signal bei m/z 973.9 zu erkennen, das durch MS/MS-Analyse als das Fragment 554-570 VNFFRMVISNPAATHDQ aus GAD65 identifiziert werden konnte (Abb. 3.14).

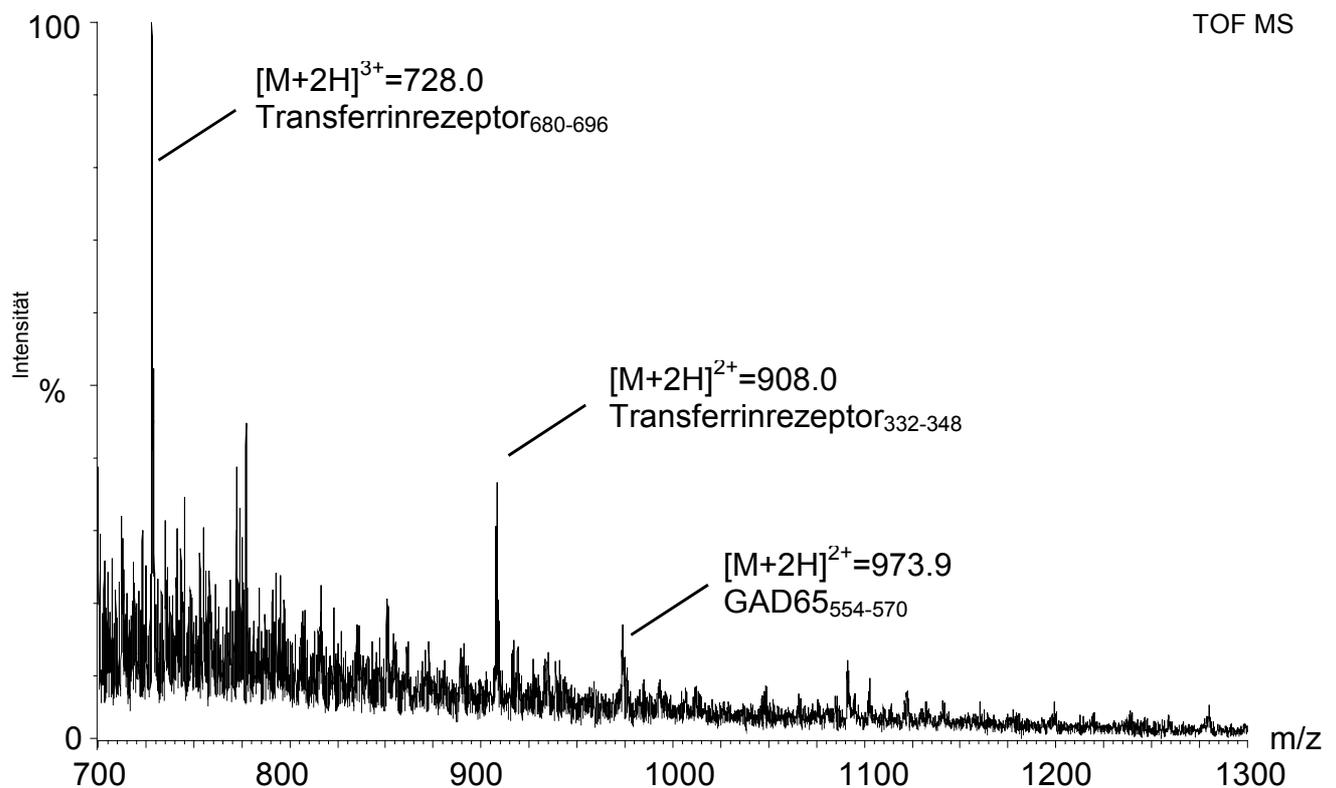


Abb. 3.13: Übersichtsspektrum der ^{35}S -Radioaktivität-enthaltenden RP-HPLC-Fraktion 59. Neben hohen Signalen für HLA-DR1-Liganden aus dem Transferrinrezeptor ist auch deutlich das Signal für $[M+2H]^{2+}$ -Ionen des GAD65 Fragmentes 554-570 zu erkennen.

Durch MS/MS-Analyse der HPLC-Fraktion 57 des ersten ^{35}S -Peaks konnte zusätzlich das GAD65-Fragment 552-570 identifiziert werden. Die beiden Peptide stellen zwei Längensvarianten derselben Kernsequenz dar und enthalten - wie gefordert - ein Methionin sowie kein Leucin. Daneben konnte noch eine Reihe weiterer HLA-DR1-Liganden aus anderen Proteinen identifiziert werden (zusammengefaßt in Tab. 3.4). Dagegen ergaben sich aus den Fraktionen 78/79 des zweiten

³⁵S-Peaks sowie aus Fraktion 72 zwar weitere HLA-DR1-Liganden aus der schweren Kette des murinen Antikörpers L243 sowie aus der Invariant chain, jedoch keine weiteren GAD65-Fragmente. Die gemessene Radioaktivität repräsentiert daher wohl unspezifisch gebundene Radioaktivität, die im Waschschrift des HPLC-Gradienten eluiert.

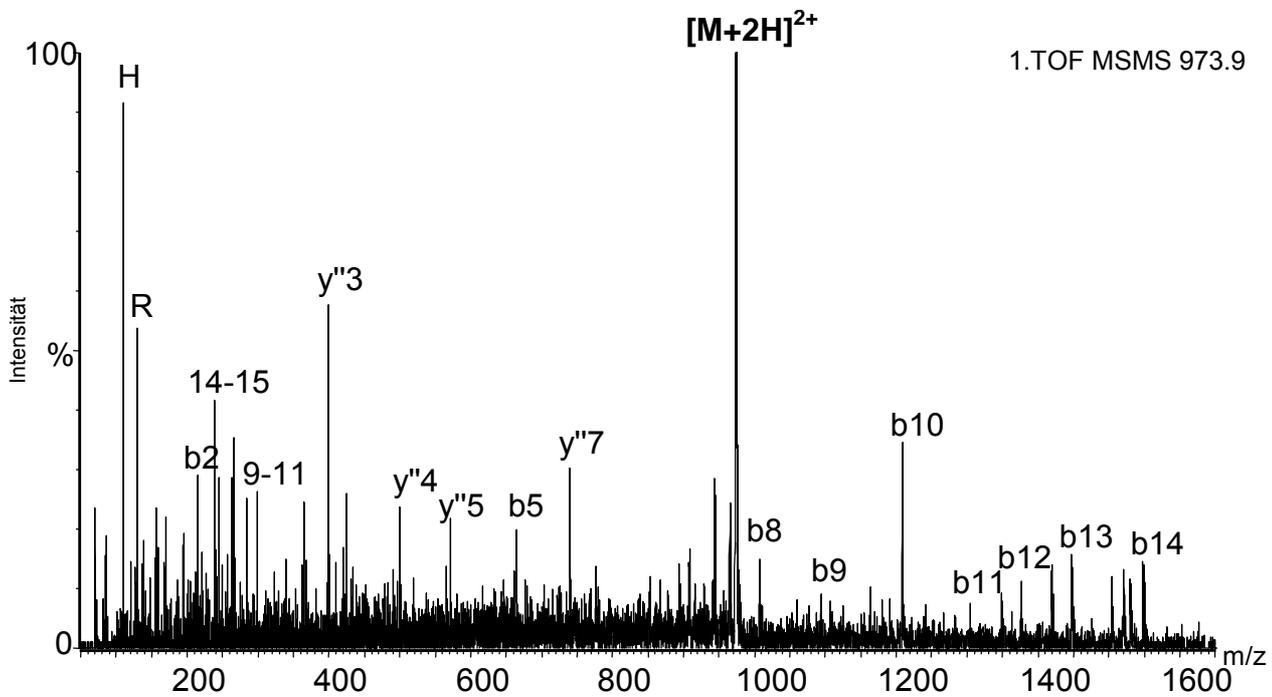


Abb. 3.14: CID Spektrum des HLA-DR1-Liganden VNFRRMVISNPAATHDQ aus GAD65 (Fragment 554-570), nachgewiesen in der radioaktivitätsen Fraktion 59.

Die identifizierten HLA-DR1-Liganden aus GAD65 stammen aus der C-terminalen Region des Proteins (Kernsequenz 554-568). Damit scheint die Erkennung der zentralen Region von GAD65 (aa 245-450) durch den BCR der MICA4-Zellen und die BCR-vermittelte Internalisierung keinen Einfluß auf die anschließende Antigenprozessierung und Beladung der MHC-Moleküle durch GAD65-Fragmente zu haben.

Tab. 3.3.1: Liste der HLA-DR1-Liganden, die in den radioaktivitätenthaltenden RP-HPLC-Fraktionen durch Nanoelektrospray MS/MS-Analyse identifiziert wurden. Die Anordnung orientiert sich an der fett gedruckten Position 1 des HLA-DR1-Motives (111)

Sequenz	Masse (neutral)	Protein (Position)	EMBL Datenbankeintrag
V N F F R M V I S N P A A T H DQ	1945.9	GAD65 (554-570)	M81882
D K V N F F R M V I S N P A A T H DQ	2189.1	GAD65 (552-570)	M81882
I P V Q T I S R A A A E K L F	1643.0	Transferrinrezeptor (332-346)	X01060
I P V Q T I S R A A A E K L F G	1700.0	Transferrinrezeptor (332-347)	X01060
I P V Q T I S R A A A E K L F G N	1814.0	Transferrinrezeptor (332-348)	X01060
I P V Q T I S R A A A E K L F G N M	1945.0	Transferrinrezeptor (332-349)	X01060
LPNI P V Q T I S R A A A E K L F G N ME	2398.3	Transferrinrezeptor (329-350)	X01060
R V E Y H F L S P Y V S P K E SPF	2181.1	Transferrinrezeptor (680-696)	X01060
L N P L I K L S G A Y L V D D	1630.0	IGF2R (146-160)	Y00285
L N P L I K L S G A Y L V D D S	1716.9	IGF2R (146-161)	Y00285
SP E R P F L A I L G G A K V A D K	1868.1	Phosphoglyzeratkinase (202-219)	V00572
T D K T L V L L M G K E G V H G G L	1867.0	Profilin I (105-122)	J03191
E D P A F Y M L K G K L Q Y E L Q	2072.0	Human EST	AC002303
LPKPK P V S K M R M A T P L L M Q A L PM	2674.5	Invariant chain (97-120)	X00497
A P N L L G G P S V F I F P P K IKDVL	2221.3	murine IgG schwere Kette	X70423

3.4 Identifizierung von MHC Klasse I und II-Liganden von Tumorzellen durch off-line Nanoelektrospray-MS/MS-Analyse

Neben den zuvor vorgestellten Ansätzen zur gezielten Suche nach krankheitsassoziierten MHC-Liganden ist auch eine Strategie möglich, durch Identifizierung möglichst vieler MHC-Liganden mit viel Glück auch krankheitsassoziierte Peptide zu finden. Wie schon angedeutet, liegt neben dem hohen Zeitaufwand das Hauptproblem eines solchen Vorgehens in der geringen Wahrscheinlichkeit, neben einer großen Mengen an Selbstliganden auch Peptide aus Proteinen mit bekannter Krankheitsassoziation zu identifizieren. Andererseits ist keine Beschränkung auf wenige ausgewählte Proteine notwendig und auch Liganden aus Proteinen mit noch unbekannter Funktion oder aus ESTs (*expressed sequence tags*) können identifiziert werden. Zudem ist die Kenntnis der MHC-Allele oder deren Peptidmotive keine Voraussetzung und schließlich ist auch zumindest für HPLC-MS/MS-Analysen eine relativ einfache Automatisierung der Datenaufnahme und - mit Einschränkung - der Dateninterpretation möglich (128). Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieser Ansatz durch off-line Nanoelektrospray MS/MS Analyse unter anderem für MHC-Liganden der Melanomzelllinie M18 sowie solide Nierenzellkarzinomproben verfolgt.

3.4.1 MHC Klasse I-Liganden der Melanomzelllinie M18

HLA-Klasse I-Liganden (HLA-A29, -B*4901, -Cw07) von 1.2×10^{11} M18 Zellen wurden durch Immunpräzipitation mit dem pan-HLA Klasse I-Antikörper W6/32 isoliert (durchgeführt von Mahdi Adibzadeh). Die Liganden wurden durch RP-HPLC aufgetrennt und die einzelnen Fraktionen durch Tandemmassenspektrometrie im Nanoelektrosprayverfahren analysiert. Die Identifizierung der Peptide erfolgte unter Verwendung der Suchalgorithmen PepSea, Mascot und MStag. Tab. 3.5 zeigt die Liste der identifizierten Liganden.

Tab. 3.5: Liste der HLA Klasse I-Liganden der Zelllinie M18, die in den RP-HPLC-Fractionen durch Nanoelektrospray MS/MS-Analyse identifiziert wurden. Putative Ankeraminosäuren der nicht eindeutig einem Allel zuzuordnenden Liganden in Position 2 und am C-Terminus sind fett gedruckt.

Sequenz	Masse (neutral)	Protein (Position)	EMBL Datenbankeintrag
A E A Y L G K K V	977.6	GRP78 (157-165)	M19645
V S L D V L D K R	1043.6	Epidermal growth factor (205-213)	X04571
Y E I T E Q R K I	1178.6	60S ribosomal protein L6 (239-247)	X69391
R E A E F T K S I	1079.6	Microsomale Signalpeptidase (184-192)	D14658
D M R Q E Y E Q L	1210.5	Cytokeratin 9 (324-332)	X75015
S E T D T S L I	864.4	TCP-1-zeta (200-207)	L27706
G E I S T I D K V	960.5	Prolyl 4-hydroxylase α (197-205)	M24486
A E D P A G L K V	898.5	RNA polymerase II termination factor (560-568)	AF073771
Y E E R V Q A V V	1091.6	Spectrin beta-chain (474-452)	M96803
A E Y G E I K N I	1035.5	Ribonucleoprotein RBM8 (94-102)	AF127761
T E I D E K E Y I	1138.5	PA28 γ (220-228)	U11292
F E D G Q K I V V	1033.4	cAMP-dep. protein kinase reg. subunit I (276-284)	M33336
A T N A S V F K Y	999.5	KIAA1304 Fragment 283-291 (auch KIAA0456)	AB037725
S E N P V P L T V	954.5	KIAA 1185 Fragment 135-143	AB033011
K Y F D E H Y E Y	1292.5	cyclin-dep. kinases regulatory subunit 2 (11-19)	X54942
K E M V A N W D S L	1191.6	KIAA1352 Fragment (811-820)	AB037773
R E A E S F T Q L	1079.5	hypothetisches 64.7 KD Protein (363-371)	HSM801103
S E F K A M D S I	1026.5	α -1 Catenin (898-906)	D14705
R E D Q I N R L I	1155.6	60S ribosomales Protein L7 (236-244)	X52967
A E L S E F T T V	995.5	Uridinphosphorylase (195-203)	X90858
A E A Q Q L I T I	985.5	Coatomer α subunit 1 (1048-1056)	U24105
G E T D P L L I	856.5	RNA polymerase II (85-92)	Z27113
G E I V T T I P T I	1042.6	ADP-ribosylierungsfaktor 1 (39-48)	M36340
A E T L P A L K I	954.6	PAPS Synthetase 1 (251-259)	Y10387
K E G D I V T L I	986.6	C-CBL interacting protein (289-297)	AF230904
S E V P M V L V	872.5	EST	AI903176
Y Y S G L I Y T Y	1141.5	Myosin heavy chain (109-117)	M69181
R W N P L P L S Y	1144.6	KIAA1034 fragment (150-158)	AB028957
G A M G I M L V Y	953.5	RAB-8B (80-88)	U66624
F E I L P G L S V	973.5	Complex I-MWFE (2-11)	X81900
A L N F S V F Y Y	1122.5	14-3-3 Protein β/α (172-180)	X57346
S F G L Y G L L Y	1031.5	CPRP1 (541-549)	AF036536

In Abb. 3.15 sind CID Spektren doppelt geladener Ionen des Liganden DMRQEYEQL aus Cytokeratin 9 zu sehen. In diesem Fall war im Übersichtsspektrum dieser Fraktion sowohl das unveränderte als auch das einfach oxidierte Peptid mit einer um 16 Da höheren Masse zu erkennen. Diese Massendifferenz ergibt sich auch für alle Fragmentionen, die den Methioninrest enthalten (z. B. b6). Weiterhin ist für b-Ionen neben der begleitenden a-Serie eine weitere Serie im

Abstand $\Delta m = - 64$ Da (b^*), ebenfalls mit begleitender a-Serie (a^*) zu erkennen. Diese Serie erlaubt die eindeutige Identifizierung von Peptiden mit oxidierten Methioninresten auch in Abwesenheit des nichtoxidierten Peptides. Dies ist von besonderer Bedeutung, da die Masse des oxidierten Methioninrestes identisch ist mit der eines Phenylalaninrestes ($m = 147$ Da).

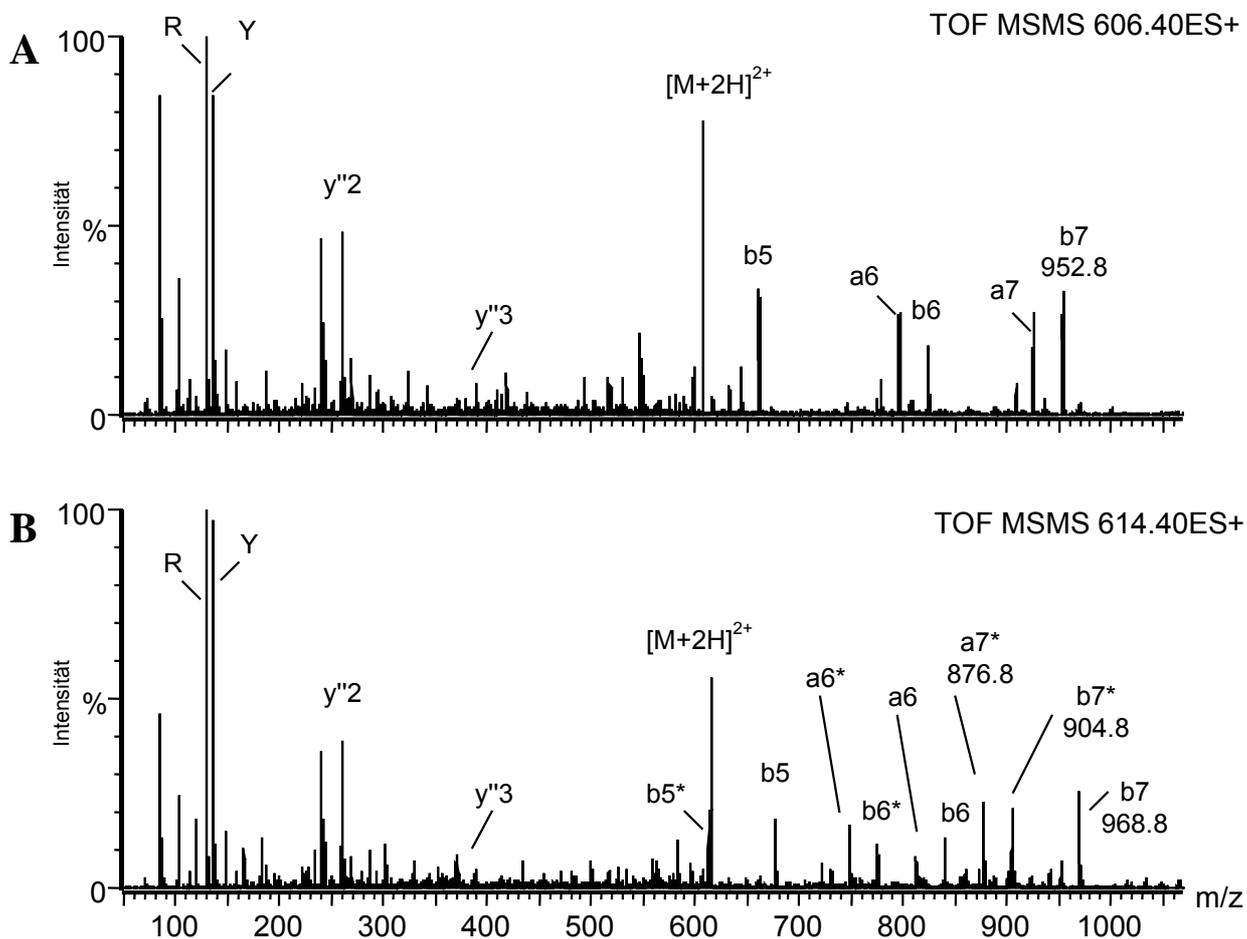


Abb. 3.15: CID Spektrum des Liganden DMRQEYEQL aus Cytokeratin 9 in nichtoxidierte (A) und in oxidierte Form (B). Neben dem Massenunterschied von 16 Da für alle Fragmente, die den oxidierten Methioninrest enthalten, sind in B zur b-Serie neben der a-Serie zwei zusätzliche begleitende Serien zu erkennen (b^* und a^*). Ionen dieser Serien liegen in der Masse um 64 Da unter der korrespondierenden Ionen der b- und a- Serie.

3.4.2 MHC Klasse II-Liganden der Melanomzelllinie M18

HLA-DR-Liganden von 1.2×10^{11} M18 Zellen wurden durch Immunpräzipitation mit dem HLA-DR-spezifischen Antikörper L243 isoliert (durchgeführt von Mahdi Adibzadeh). Die Liganden wurden durch RP-HPLC aufgetrennt und die einzelnen Fraktionen wie in 3.4.1 durch Tandemmassenspektrometrie im Nanoelektro-

sprayverfahren analysiert. Tabelle 3.6 zeigt die Liste der identifizierten HLA-DR-Liganden.

Tab. 3.6: Liste der HLA-DR-Liganden der Zelllinie M18, die in den RP-HPLC-Fractionen durch Nanoelektrospray MS/MS-Analyse identifiziert wurden. Wie für das HLA-DRB1*0405-Motiv gefordert (111), ist Position 1 (fett gedruckt) durch große, hydrophobe Aminosäuren besetzt, während sich in Position 9 (fett gedruckt) fast ausschließlich saure Aminosäuren befinden. Für Liganden, die eindeutig aus nichthumanen Proteinen stammen, ist die Herkunft angegeben.

Sequenz	Masse (neutral)	Protein (Position)	EMBL Datenbankeintrag
L R H T F S G V A S V E S S S G	1619.8	bovines Fetuin (311-326)	X16577
V Q Q G Y Q S L N D I P D R	1631.8	AC133 Antigen (357-370)	AF027208
V Q Q G Y Q S L N D I P D R V Q	1858.9	AC133 Antigen (357-372)	AF027208
S P S A A I Y N I D T S S E S P D	1752.8	Fettsäuresynthase (856-875)	U26644
G S P S A A I Y N I D T S S E S P D	1809.8	Fettsäuresynthase (855-875)	U26644
G S P S A A I Y N I D T S S E S P D H	1946.8	Fettsäuresynthase (855-876)	U26644
T P E G E F V S M G V I S D G N	1637.7	Malatdehydrogenase (260-275)	U20352
G A Y K A I P V A Q D L N	1358.7	Osteopontin (200-212)	J04765
G A Y K A I P V A Q D L N A P	1526.8	Osteopontin (200-214)	J04765
G A Y K A I P V A Q D L N A P S	1613.8	Osteopontin (200-215)	J04765
G I L N V S A V D K S T G K E	1516.8	HSC70 (484-498)	Y00371
T V F D N L P N P E D R K N	1657.8	bovines Serotransferrin (232-245)	U02564
H S T V F D N L P N P E D	1483.7	bovines Serotransferrin (230-242)	U02564
G K P P Q Y I A V H V V P D Q	1646.9	Macrophage migr. inh. factor (31-45)	Z23063
G F E V V A T N G D T H	1245.6	GRP78 (240-252)	M19645
G F E V V A T N G D T H L G	1415.7	GRP78 (240-254)	M19645
L R Y R F Q L Q A T T K E G P G	1864.0	N-CAM L1 987-1004)	X59847
I D N G F E V V A T N G D T H L G	1757.8	GRP78 (237-254)	M19645
E D L R S W T A A D T A A Q I T Q	1875.9	HLA-Cw07 (152-168)	X83394
D L R S W T A A D T A A Q I T Q	1746.9	HLA-Cw07 (153-168)	X83394
K D V I E L T D D S F D K	1523.7	ERP5 (73-85)	D49489
A P N T F K T L D S W R D E	1678.8	RAB7 (92-106)	X93499
A P N T F K T L D S W R D E F	1825.9	RAB7 (92-107)	X93499
E D L S S W T A A D T A A Q I T Q R	1962.9	HLA-B*4901 (152-169)	M24037
I E H E I K S L E D L Q D E Y D	1974.9	STAT1 (156-174)	M97935
D L R S W T A V D T A A Q I S E Q	1889.9	HLA-E α chain	M20022
E L K I D I I P N P Q E R T	1664.9	HSP90 beta (69-82)	M16660
G V P L Y R H I A D L A G N S E	1710.9	α Enolase (126-141)	M14328
G G Y V K L F P N S L D Q T D	1652.8	Calreticulin (107-121)	M84739
A D A P M F V M G V N H E K Y D	1822.8	GAPDH (125-140)	AJ005371
H D P Q F E P I V S L P E Q E	1763.8	RAN GTPase-activ. protein (23-37)	X83617
H D P Q F E P I V S L P E Q E I	1876.9	RAN GTPase-activ. protein (23-38)	X83617
H D P Q F E P I V S L P E Q E I K	2005.0	RAN GTPase-activ. protein (23-39)	X83617
N H D P Q F E P I V S L P E Q E I	1990.9	RAN GTPase-activ. protein (22-38)	X83617

Sequenz	Masse (neutral)	Protein (Position)	EMBL Daten- bankeintrag
L K P E F V D I I N A K Q	1513.9	Triosephosphatisomerase (236-248)	M10036
R D N Y V P E V S A L D Q E I	1746.8	40S ribosomales Protein S17 (80-94)	M13932
R R D N Y V P E V S A L D Q E I	1902.9	40S ribosomales Protein S17 (79-94)	M13932
K T T V E L L P V N G E F S	1532.8	amyloid A4 protein (351-364)	X06989
V A D K I Q L I N N M L D K	1613.9	Phosphoglyzeratkinase 1 (216-229)	V00572
V A D K I Q L I N N M L D K V N E	1956.0	Phosphoglyzeratkinase 1 (216-232)	V00572
D P I L Y R P V A V A L D T K	1669.9	Pyruvatkinase M2 (100-114)	X56494
D P I L Y R P V A V A L D T K G	1727.0	Pyruvatkinase M2 (100-115)	X56494
D P I L Y R P V A V A L D T K G P E	1953.1	Pyruvatkinase M2 (100-117)	X56494
S P F P E V W H T M D D N E E N L D	2173.9	Glutaminylcyclase (323-340)	X71125
S P F P E V W H T M D D N E E N L D E	2302.9	Glutaminylcyclase (323-341)	X71125
x Q Q I L S L L E S N K D L	1499.8	4F2 Cell surface antigen (285-297)	J02939
Y G K Y L T L E N V A D L	1497.8	Tripeptidylaminopeptidase 1 (76-88)	AF017456
F P E P H L S W L E N G E E L N	1909.9	CD80 (168-185)	M27533
E P I D Q K F V A I S D L T E P I D	2029.0	RAB GDP dissoc. inhibitor α (374-391)	X79354
L A A V L L Q A L D R P A S P P	1630.9	VGf (82-97)	Y12661
L Q Q L K A L L N H L D V G	1560.9	KIAA0062 (98-11)	D31887

3.4.3 MHC Klasse I-Liganden von soliden Nierenzellkarzinomproben

Solide Nierenzellkarzinomproben von 5 Patienten mit verschiedenen HLA-Haplotypen wurden vereinigt (etwa 1.5×10^{10} Zellen) und MHC Klasse I-Liganden durch Immunpräzipitation mit dem pan-HLA Klasse I-Antikörper W6/32 isoliert (durchgeführt von Thomas Flad). Die Liganden wurden durch RP-HPLC aufgetrennt und die einzelnen Fraktionen wie in 3.4.1 durch Tandemmassenspektrometrie im Nanoelektrosprayverfahren analysiert. Tab. 3.7 zeigt die Liste der mit Hilfe der Suchalgorithmen PepSea und Mascot identifizierten Liganden.

Tab. 3.7: Liste der HLA Klasse I-Liganden von 5 vereinigten Nierenzellkarzinomproben, die in den RP-HPLC-Fractionen durch Nanoelektrospray MS/MS-Analyse identifiziert wurden. Putative Ankeramino-säuren in Position 2 und am C-Terminus sind fett gedruckt. Wo möglich, wurde eine Zuordnung zu den in den Tumorproben exprimierten Allelen vorgenommen.

Sequenz	Masse (neutral)	Protein (Position)	EMBL Datenbankeintrag	Putatives HLA-Allel
E T R P A G D G T F	1049.5	verschiedene HLA Klasse I α -Ketten	z. B. K02883	?
I L D K K V E K V	1070.7	HSP 90 β (569-577)	M16660	A2
H P I S D H E A T L	1118.5	verschiedene HLA Klasse I α -Ketten	z. B. X00492	B35
Y Y E E Q H P E L	1206.5	NK cell protein 4 (107-115)	M59807	A24
A Y V H M V T H F	1103.5	Testis enhanced gene transcript (45-53)	X75861	A24
E Y P D R I M N T F	1284.6	β -Tubulin (159-167)	J00314	A24
L P D M V V S H L	1009.5	NDRG1 protein (187-195)	D87953	B35
F T V D Q I R A I	1061.6	Elongationsfaktor 2 (4-12)	M19997	?
R A F S S L G L L K	1090.6	Uromodulin (615-624)	M15881	A68
T Y W V V Y G V F	1132.6	Polyposis locus protein 1 (84-92)	M73547	A24

3.5 Bestimmung und Bestätigung von MHC-Peptidmotiven anhand von Einzelliganden

Die Sequenzanalyse von Einzelliganden durch Tandemmassenspektrometrie und andere Verfahren spielt eine wichtige Rolle bei der Bestimmung von Peptidmotiven. Sie dient in erster Linie der Bestätigung der durch N-terminale Poolsequenzierung ermittelten Anker- und Hilfsankeraminosäuren und kann mögliche Ausnahmen von diesen Regeln aufzeigen. Bei der Motivbestimmung von MHC Klasse II-Allelen kommt hinzu, daß in den Ankerpositionen häufig eine ganze Reihe von Aminosäuren erlaubt sind und vor allem P4, P6 und P9 häufig nicht genutzt werden. Daher ist hier eine Ergänzung der Poolsequenzierung durch die Analyse von Einzelliganden von großer Bedeutung

3.5.1 Identifizierung von HLA-B*1510-Liganden

In diesem Fall wurden HLA-B*1510 -Liganden von humanen LCL721.221 Zellen (keine endogene HLA-Expression), transfiziert mit dem *HLA-B*1510* Gen, durch Immunpräzipitation mit dem pan-HLA Klasse I-Antikörper W6/32 isoliert (durchgeführt von Florian Seeger). Die Liganden wurden durch RP-HPLC aufgetrennt und einzelne Fraktionen durch Tandemmassenspektrometrie im Nanoelektrosprayverfahren analysiert. Die Identifizierung der Peptide erfolgte durch Peptide-Search. Tab. 3.8 zeigt eine Liste der identifizierten Liganden.

Tab. 3.8: Liste der HLA Klasse I-Liganden der mit dem *HLA-B*1510* Gen transfizierten Zelllinie LCL721.221, die in den RP-HPLC-Fractionen durch Nanoelektrospray MS/MS-Analyse identifiziert wurden. Ankeraminosäuren in Position 2 und am C-Terminus sind fett gedruckt.

Sequenz	Masse (neutral)	Protein (Position)	EMBL Datenbankeintrag
G H D P R A Q T L	993.5	HLA-DP α chain (220-229)	X00457
D H C V A H K L	921.4	Cytochrom C Reduktase (66-73)	M36647
G H L E N N P A L	963.5	60S ribosomales Protein PQ (67-75)	M17885
I H D P G R G A P L	1031.6	60S ribosomales Protein L8 (49-58)	Z28407
T H T Q P G V Q L	979.5	Septin 2 Homolog (70-78)	D50918
Y Q E K G V R V L	1090.6	Actin-verwandtes Protein Arp2	AF006082

Zudem wurde eine N-terminale Poolsequenzierung sowie eine N-terminale Analyse einzelner RP-HPLC Fraktionen durchgeführt, die zur Identifizierung weiterer Einzelliganden führte (durchgeführt von Stefan Stevanović, nicht gezeigt).

3.5.2 Identifizierung von HLA-DQ($\alpha 1^*0201/\beta 1^*0202$)-Liganden

Die Bestimmung des Peptidmotivs dieses HLA Klasse II-Motivs erfolgte im Rahmen der Bestimmung der Motive aller HLA-DQ-Allele, für die eine Assoziation mit der oligoartikulären Form der juvenilen Arthritis beschrieben ist. Dazu wurden HLA Klasse II-Liganden der murinen Zelllinie D5, transfiziert mit den *HLA-DQ $\alpha 1^*0201$* und *DQ $\beta 1^*0202$* Genen (Peter Nickolaus), durch Immunpräzipitation mit dem HLA-DQ-spezifischen Antikörper Tü39 isoliert (durchgeführt von Tilman Dumrese). Die Liganden wurden durch RP-HPLC aufgetrennt und einzelne Fraktionen durch Tandemmassenspektrometrie im Nanoelektrosprayverfahren analysiert. Die Identifizierung der Peptide erfolgte durch PeptideSearch. Tab. 3.9 zeigt eine Liste der identifizierten Liganden.

Tab. 3.9: Liste der HLA Klasse II-Liganden der mit den *HLA-DQ $\alpha 1^*0201$* und *DQ $\beta 1^*0202$* Genen transfizierten murinen Zelllinie D5, die in RP-HPLC-Fraktionen durch Nanoelektrospray MS/MS-Analyse identifiziert wurden. Ankeraminosäuren des HLA-DQ($\alpha 1^*0201/\beta 1^*0202$)-Motivs nach Stefan Stevanović sind fett gedruckt. Für Liganden, die eindeutig aus nichtmurinen Proteinen stammen, ist die Herkunft angegeben.

Sequenz					Masse (neutral)	Protein (Position)	EMBL Daten- bankeintrag
P1	P4	P6	P9				
VKT	L T G K T I	T L E V E P S D T			1931.0	Ubiquitin (5-22)	M33013
	R P D A E Y W N S Q P E I L E				1845.9	H2 Klasse II β -Kette	M31825
L P S A D E I Y D C K V E H W G					1860.8	humanes HLA-DQ $\alpha 1^*0201$ (180-195)	L34087
I P S D D D I Y D C K V E H W G					1890.8	H2 Klasse II α -Kette	M21931
	T L H L V S T T K T E V I P P				1634.9	hum. Apolipoprotein B-100 (941- ⁹⁵⁵)	X04506
	D E P K S S E E A L I V P P				1509.8	E25B protein (18-31)	U76253
	K D E P K S S E E A L I V P P				1637.9	E25B protein (17-31)	U76253
	R P T G E V Y D I E I D T L E				1748.8	bovines Fetuin (72-86)	X16577
	R P T G E V Y D I E I D T L E T				1849.9	bovines Fetuin (72-87)	X16577
LD	K L T I T S Q N L Q L E S L				1815.0	Invariant chain (61-76)	X00496
LD	K L T I T S Q N L Q L E S L R				1971.1	Invariant chain (61-77)	X00496
QQQGRLD	K L T I T S Q N L Q L E S L R				2383.3	Invariant chain (58-77)	X00496

In Abb. 3.16 ist das CID Spektrum des Liganden QQQGRLDKLTITSQNLQLESLR aus der murinen Invariant Chain zu sehen. Obwohl in der γ -Serie ein nahezu

durchgehender Sequenzabschnitt von 13 Aminosäuren zu erkennen ist und damit eine eindeutige Identifizierung des Peptids ermöglicht, sind die Gesamtmasse sowie die Massen aller b-Ionen um 17 Da zu niedrig. So wird das b₂-Ion mit 240.2 Da statt den zu erwartenden 257.2 Da gemessen und das b₃-Ion mit 368.3 Da statt 385.3 Da. Die Erklärung dafür ist in einer N-terminalen Modifizierung des Peptids zu suchen: N-terminale Glutaminreste bilden unter den während der Peptidisolierung und –analyse durchgehend vorliegenden sauren Bedingungen einen zyklischen Pyroglutamatrest. Die damit einhergehende Abspaltung von Ammoniak erklärt den Massenverlust von 17 Da. Diese Reaktion verläuft teilweise nicht quantitativ, so daß häufig beide Peptidspezies nebeneinander im Massenspektrum zu sehen sind.

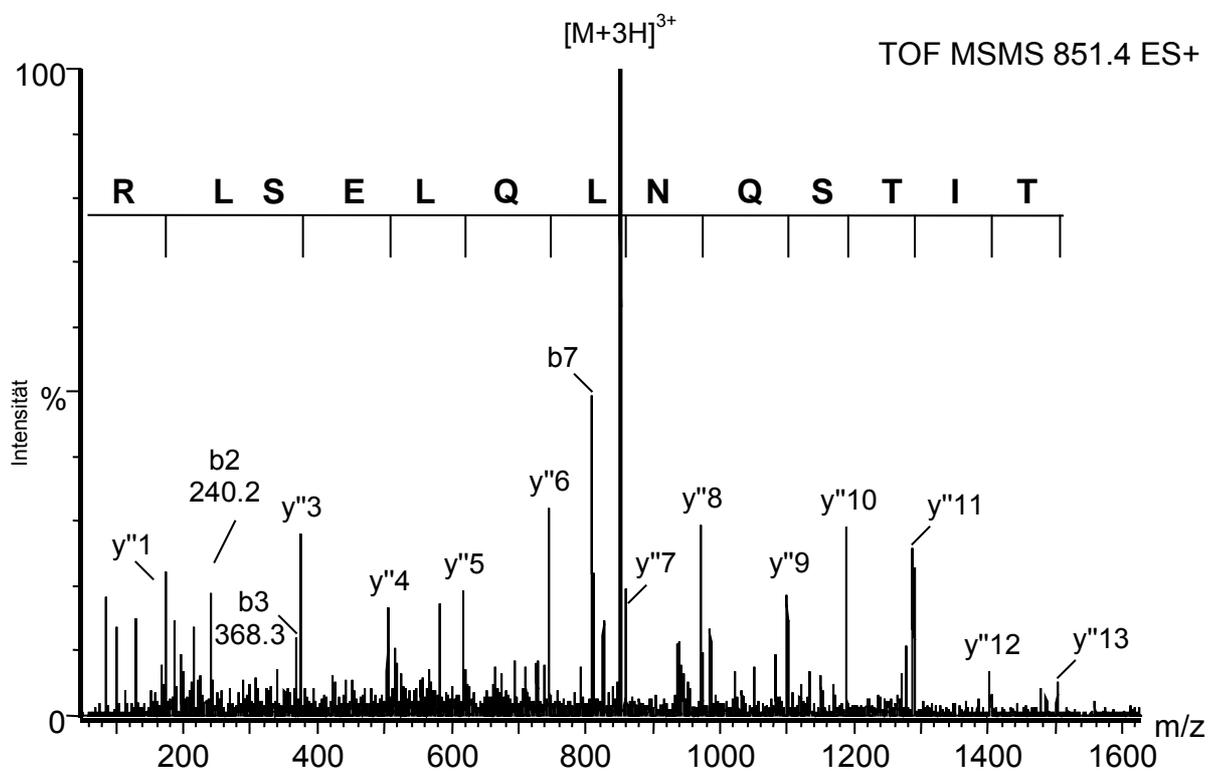


Abb. 3.16: CID Spektrum des Liganden QQQGRLDKLTITSQNLQLESLR aus der murinen Invariant Chain. Durch Pyroglutamatbildung am N-terminus werden die Massen der b-Ionen sowie die Gesamtmasse um 17 Da zu niedrig gemessen (theor. Masse des [M+3H]³⁺ Ions 857.1).

3.6 Massenspektrometrische Identifizierung neuer Proteasen im MHC Klasse I-Antigenprozessierungsweg

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch eine Reihe von Versuchen zur Identifizierung von Proteinen nach Verdau mit Trypsin durchgeführt. Als Beispiel soll hier die Identifizierung zweier Proteasen dienen, die als zytosolische N-terminale Trimmingproteasen in der MHC Klasse I-Antigenprozessierung in Frage kommen. Proteasen, die bezüglich Schnittspezifität und Inhibitorprofil die Selektionskriterien erfüllten, wurden aus dem Zytosol humaner Cox-Zellen durch Free Flow Elektrophorese, Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltrationschromatographie isoliert (durchgeführt von Lars Stoltze). Nach Gelfiltration konnten zwei Aktivitäten mit einer Größe der nativen Komplexe von 100 kDa (Fraktion 19-22) und 300 kDa (Fraktion 15 und 16) nachgewiesen werden. Diese Fraktionen wurden auf einem denaturierenden 8% Polyacrylamidgel aufgetrennt und das Gel mit Coomassie Blue gefärbt (Abb. 3.17).

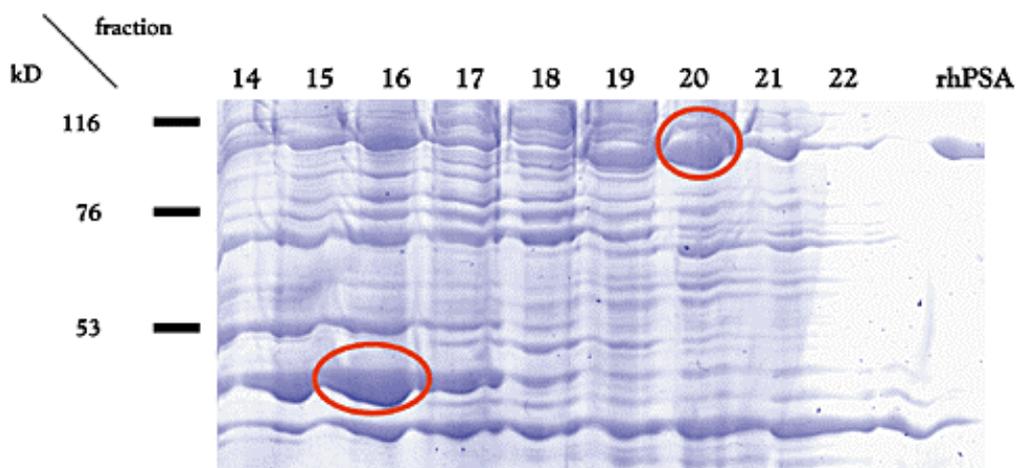


Abb. 3.17: SDS-PAGE der Gelfiltrationsfraktionen 14-22, die die gesuchten proteolytischen Aktivitäten enthielten. Die prominenteste Bande in Fraktion 16 bei 50 kDa (eingekreist) konnte als Bleomycinhydrolase und HSC70-interacting Protein identifiziert werden, die prominenteste Bande in Fraktion 20 bei 100 kDa (eingekreist) als puromycin-sensitive Aminopeptidase. Die letzte Spur zeigt rekombinante puromycin-sensitive Aminopeptidase (rhPSA).

In der 100 kDa Fraktion ist eine prominente Bande bei 95 kDa zu erkennen, für die 300 kDa Fraktion sind neben einer prominenten Bande bei 50 kDa weitere Banden unter anderem bei 100 kDa zu sehen. Die Proteinbanden wurden ausgeschnitten und im Gelstück durch Trypsinbehandlung verdaut (durchgeführt von Lars Stoltze). Tryptische Fragmente wurden anschließend aus dem Gelstück extrahiert und durch Nanoelektrospray MS/MS-Analyse untersucht. Dabei konnte das 100 kDa Protein anhand von 4 Fragmenten aus zwei getrennten Experimenten als puromycin-sensitive Aminopeptidase (MW 94 kDa) identifiziert werden (Abb. 3.18., Tab. 3.10).

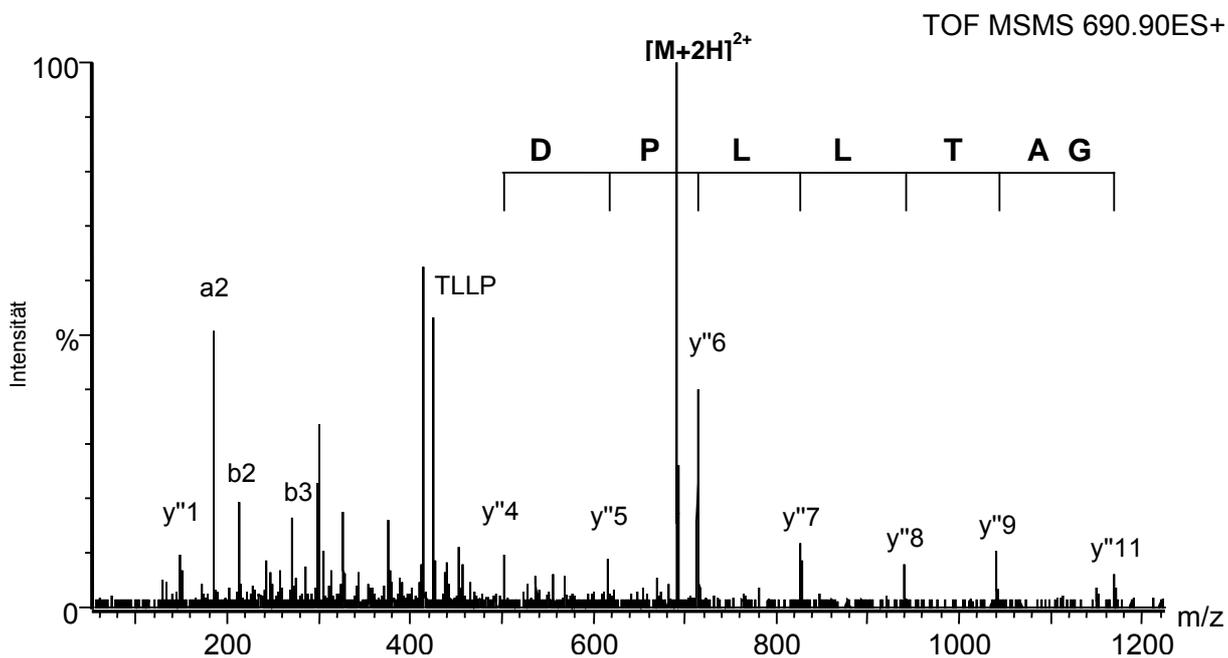


Abb. 3.18: CID-Spektrum des tryptischen Fragments VLGATLLPDLIQK aus puromycin-sensitiver Aminopeptidase; Ionen der a-, b- und y-Serie sowie interne Fragmente sind gekennzeichnet, der Sequenzabschnitt ist in der y-Serie von rechts nach links zu lesen.

Die Analyse der Proteinbanden aus den 300 kDa Gelfiltrationsfraktionen ergab für die 50 kDa-Bande Fragmente aus zwei verschiedenen Proteinen: Zum einen das HSC70-interacting Protein (MW 41, kDa 3 Fragmente, Tab. 3.10) ohne bekannte Proteaseaktivität sowie die Cysteinprotease Bleomycinhydrolase (MW 53 kDa, 1 Fragment, Abb. 3.19, Tab. 3.10). Die 100 kDa Bande wurde als HSP70-related Protein APG-2 (MW 95 kDa, 3 Fragmente, Tab. 3.10), ebenfalls ohne bekannte Proteaseaktivität, identifiziert.

Die Analyse weiterer Banden bei 25, 30, 35, 40 und 60 kDa ergab nur für die 40 kDa Bande wie erwartet β -Actin (MW 42 kDa, 1 Fragment, Tab. 3.10.), das häufig als unspezifische Kontamination in Proteinpräparationen vorliegt.

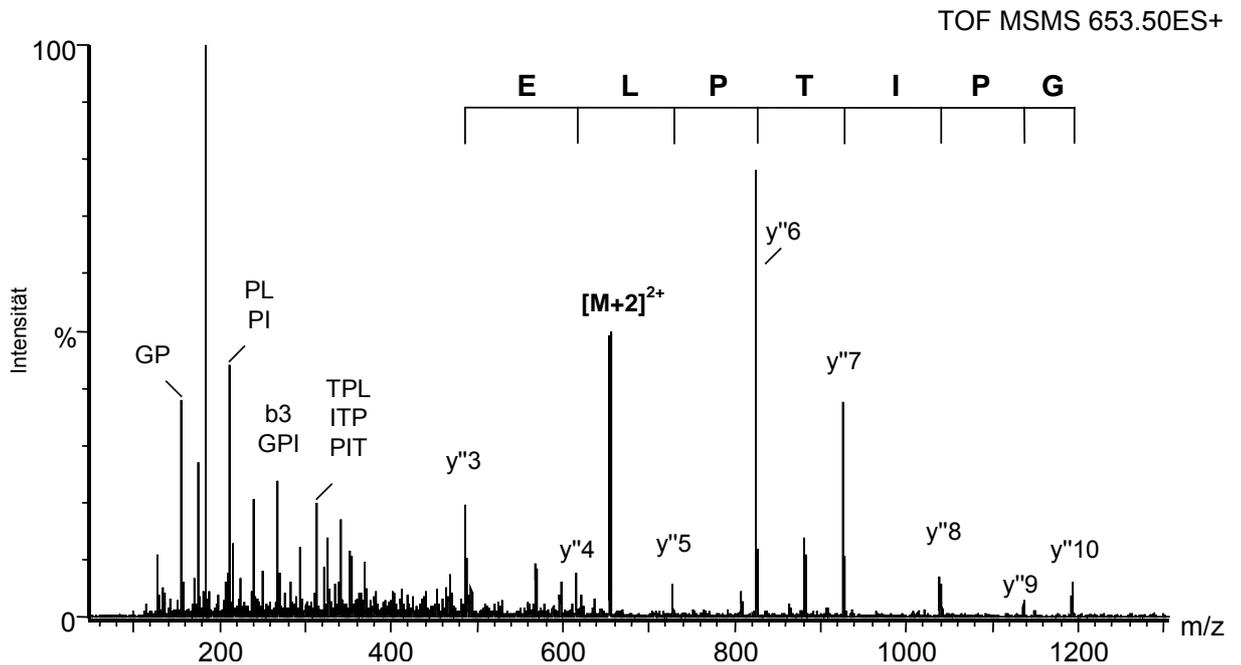


Abb. 3.19: CID-Spektrum des tryptische Fragmentes IGPITPLEFYR aus Bleomycinhydrolase; Ionen der b- und y-Serie sowie interne Fragmente sind gekennzeichnet, der Sequenzabschnitt ist in der y-Serie von links nach rechts zu lesen.

Tab. 3.10: Liste der identifizierten tryptischen Fragmente aus den Proteinbanden bei 40, 50, 94 und 100 kDa. Die Fragmente aus puromycin-sensitiver Aminopeptidase (PSA) sind das Gesamtergebnis aus zwei getrennten Experimenten.

Bande [kDa]	Sequenz	Masse (neutral)	Protein (Position)	EMBL Datenbankeintrag
40	S Y E L P D G Q V I T I G N E R	1789.9	β -Actin (239-254)	V01217
50	I G P I T P L E F Y R	1304.7	Bleomycinhydrolase (245-255)	X92106
50	V A A I E A L N D G E L Q K	1469.8	HSC70-interacting protein (119-132)	U28918
50	A I D L F T D A I K	1105.6	HSC70-interacting protein (133-142)	U28918
50	A I E I N P D S A Q P Y K	1444.7	HSC70-interacting protein (174-186)	U28918
94	A T F D I S L V V P K	1188.7	PSA (198-208)	Y07701
94	L G L Q N D L F S L A R	1345.7	PSA (572-583)	Y07701
94	V L G A T L L P D L I Q K	1379.8	PSA (782-794)	Y07701
94	D A E S I H Q Y L L Q R	1471.7	PSA (901-912)	Y07701
100	E F S I T D V V P Y P I S L R	1734.9	HSP70-rel. Protein APG-2 (391-405)	L12723
100	N A V E E Y V Y E M R	1401.6	HSP70-rel. Protein APG-2 (619-629)	L12723

Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den kalkulierten Molekulargewichten aus den Gelfiltrationsexperimenten von 300 kDa für Bleomycinhydrolase, die ein Homohexamer von 300 kDa bildet (129), und 100 kDa für puromycin-sensitive Aminopeptidase. Das HSC70-interacting Protein liegt dagegen als Homotetramer von etwa 200 kDa vor, ein 300 kDa-Komplex könnte unter anderem durch Assoziation mit dem HSP70-verwandten APG-2 (oder auch anderen Proteine aus in diesen Experimenten nicht identifizierbaren Banden) gebildet werden.

Durch *in vitro* Peptidverdau und Inhibitionsexperimente mit rekombinanter puromycin-sensitiver Aminopeptidase und gereinigter Bleomycinhydrolase konnte gezeigt werden, daß die beiden identifizierten Proteasen die Selektionskriterien für die gesuchten Aminopeptidaseaktivitäten erfüllen (nicht gezeigt).

4 Diskussion

4.1 Der „Predict, Calibrate, Detect“-Ansatz zur Identifizierung tumor-assoziiertes MHC Klasse I-Liganden

Im Zentrum dieser Doktorarbeit stand die Entwicklung einer neuer Strategie zur Identifizierung und Charakterisierung von tumorassoziierten MHC-Klasse I-Liganden, die nicht auf präexistierende T-Zellen angewiesen ist. Bei dem hier beschriebenen „Predict, Calibrate, Detect“-Ansatz werden Peptide nach ihrer natürlichen Prozessierung und Präsentation auf Tumorzellen identifiziert. Dieser bioanalytische Ansatz gibt zunächst keine Information über die Immunogenität der identifizierten Peptide und bietet daher keinen vollständigen Ersatz für die Untersuchung der peptidspezifischen Erkennung von Tumorzellen durch CTL. Allerdings erlaubt er eine Fokussierung des „Reverse Immunology“-Ansatzes von einer Vielzahl vorhergesagter potentieller MHC Klasse I-Liganden auf wenige Peptide, die tatsächlich prozessiert und präsentiert werden. Als geeignetes System für diese weitergehenden Untersuchungen hat sich in den beschriebenen Fällen die HHD-Maus erwiesen. So konnten in diesen Mäusen CTL gegen das Epitop MAGE-A1₂₇₈₋₂₈₆ generiert werden, die sowohl peptidbeladene Zielzellen als auch HLA-A2⁺ MAGE-A1⁺ Tumorzellen erkannten, nicht jedoch Tumorzellen, die entweder nur HLA-A2 oder MAGE-A1 exprimieren oder keines der beiden Moleküle. Ebenso wurden HeLa-Zellen nur nach Doppeltransfektion mit den Genen für HLA-A2 und MAGE-A1 erkannt. Dagegen erwies sich die Generierung humaner CTL gegen dieses Peptid *in vitro* unter Verwendung peptidbeladener reifer dendritischer Zellen oder aktivierter B-Zellen als ungleich schwieriger und blieb bis jetzt ohne eindeutige Ergebnisse (B. Gückel, nicht publizierte Ergebnisse). Auch der Nachweis spezifischer CTL durch Tetramertechnologie im Blut von Tumorpatienten war bis jetzt nicht möglich. Andererseits konnten TILs aus Tumorpatienten mit einer HLA-A2-restringierten MAGE-A1-spezifischen Immunantwort in ersten Versuchen mit Tetramern gefärbt werden (Arnaud Moris, Ce cile Gouttefangeas, nicht publizierte Ergebnisse; TILs wurden freundlicherweise von Francine Jotereau zur Verfügung gestellt).

Dagegen sind die im Augenblick zur Verfügung stehenden Daten für CEA₆₉₄₋₇₀₂ und p53₃₂₂₋₃₃₀ noch nicht eindeutig: Zwar konnten für CEA₆₉₄₋₇₀₂ in HHD-Mäusen ebenfalls wiederholt CTL generiert werden, die peptidbeladene Zielzellen erkann-

ten. Die CEA₆₉₄₋₇₀₂-spezifischen CTL lysierten zudem SW1116-Zellen, von denen das Peptid extrahiert worden war, und konnten mit CEA₆₉₄₋₇₀₂-HLA-A2-Tetrameren spezifisch gefärbt werden. Eine vollständige Charakterisierung der Aktivität gegen Tumorzellen steht allerdings unter anderem wegen Problemen mit der permanenten Kultur dieser CTL-Linien bis zum heutigen Tag noch aus.

Für p53₃₂₂₋₃₃₀ konnte erst durch Immunisierung mit dem modifizierten Peptid AMDGEYFTL CTL erhalten werden, die Zielzellen nach Beladung mit der Wildtypsequenz PLDGEYFTL lysierten. Diese Sequenz ist Teil sowohl des humanen als auch des murinen p53-Proteins, so daß hier die negativen Ergebnisse bei Immunisierungen mit dem Wildtyppeptid möglicherweise durch Toleranz der HHD-Mäuse gegen dieses Peptid erklärt werden kann. In diesem Fall sollte in HLA-A2-transgenen p53^{-/-}-Mäusen eine Immunisierung mit p53₃₂₂₋₃₃₀ zum Erfolg führen. So konnte gegen p53₁₈₇₋₁₉₇ nur in HLA-A2-transgenen p53^{-/-} Mäusen eine spezifische CTL-Antwort nachgewiesen werden, während diese CTL in HLA-A2-transgenen p53^{+/+} Mäusen nicht nachgewiesen werden konnten (130). Ebenso konnte eine CTL-Linie gegen p53₁₄₉₋₁₅₇ zum ersten Mal in p53^{-/-} Mäusen generiert werden (131). Dagegen wurden CTL gegen ein weiteres Epitop, p53₂₆₄₋₂₇₂, sowohl in p53^{-/-} auch in p53^{+/+} HLA-A2/Kb-transgenen Mäusen gefunden. Allerdings war die Affinität der CTL aus den p53^{+/+} Mäusen um den Faktor 10 geringer (130), so daß auch hier wohl CTL mit hoher Affinität negativ selektioniert werden.

Andererseits könnte für p53₃₂₂₋₃₃₀ auch die nachgewiesene geringe Kopienzahl von 8 Kopien/Zelle einen Grund darstellen, warum der Nachweis einer CTL-Antwort gegen dieses Peptid so schwer fällt.

Bezeichnenderweise zeigt MAGE-A1₂₇₈₋₂₈₆, wie auch für CEA₆₉₄₋₇₀₂ und p53₃₂₂₋₃₃₀ beschrieben (132-135), zwar Bindung an HLA-A2 (Steve Pascolo, nicht gezeigte Ergebnisse), jedoch existieren für alle drei Proteine vorhergesagte potentielle Liganden mit einem besseren Bindungsverhalten. Daher ist davon auszugehen, daß die nachgewiesenen Peptide entweder bei der Entstehung durch proteasomalen Abbau von Polypeptiden oder bei späteren Schritten der Antigenprozessierung wie dem Transport durch TAP oder der Bindung an leere MHC-Klasse I-Moleküle bevorzugt werden. So wird durch das PapRoC-Programm zur Vorhersage proteasomaler Schnittstellen unter Verwendung der Daten des Modellsubstrates Enolase (136;137) für p53₃₂₂₋₃₃₀ und MAGE-A1₂₇₈₋₂₈₆ der entscheidende Schnitt nach der C-terminalen Ankeraminoäure durch das konstitutive Proteasom vorhergesagt (Abb. 4.1). Auch ein Schnitt vor der N-terminalen Aminosäure wird in

beiden Fällen vorhergesagt, obwohl die Generierung der N-Termini von MHC Klasse I-Liganden in vivo auch durch N-terminale Trimmproteasen, wie möglicherweise die puromycin-sensitive Aminopeptidase oder die Bleomycinhydrolase, geschehen kann.

CEA₆₉₄₋₇₀₂ stellt dagegen den C-Terminus des Proteins dar und besitzt damit von vornherein den korrekten C-Terminus. Zudem ist CEA über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker in der Zellmembran verankert. Während der Biosynthese GPI-verankerter Proteine kommt es zu einer Abspaltung der 20 bis 30 C-terminalen Aminosäuren und zur Bildung einer Amidbindung zwischen der neuen C-terminalen Carboxylgruppe und der Mannose-6-Phosphoethanolamingruppe des GPI-Ankers. Es wäre denkbar, daß das abgespaltene Peptid proteasomen- und TAP-unabhängig weiter prozessiert wird. In diesem Bereich liegt zudem mit CEA₆₉₁₋₆₉₉ ein weiteres als Epitop beschriebenes Peptid (138). Eine eventuelle proteasomen- und TAP-unabhängige Präsentation dieser Peptide könnte durch Inhibitorexperimente weiter untersucht werden, sobald stabile CTL-Linien zur Verfügung stehen.

Die durch PapRoC vorhergesagten Schnitte beruhen in Augenblick auf unquantifizierten Modelldaten und geben daher lediglich an, ob zwischen zwei Aminosäuren geschnitten werden kann oder nicht. Erst wenn gewichtende Vorhersagen anhand quantifizierter Modelldaten zur Verfügung stehen, wird absehbar sein, ob dominante Schnittstellen in der Sequenz eines Liganden selbst seine Zerstörung wahrscheinlich machen.

a)P RALAETSY V KVL EY VIKV SA RVRFFF PS.....
b) TSSS P QPKKK P LDGEYFTL Q I RGRERFEM.....
c) SAGATV GI <u>MIGVLVGV</u> ALI

Abb. 4.1: Mit dem PapRoC-Algorithmus vorhergesagte proteasomale Schnitte in den Bereichen der identifizierten tumorassoziierten HLA-A2-Liganden aus a) MAGE-A1 (Bereich aa 268-296), b) p53 (Bereich aa 312-340), c) CEA (Bereich aa 684-702); im Rahmen dieser Arbeit identifizierte Liganden sind fett gedruckt, für CEA ist ein weiteres beschriebenes Epitop in diesem Bereich unterstrichen.

Die Präsentation von MAGE-A1₂₇₈₋₂₈₆ wird zusätzlich unter Einfluß von IFN- γ und damit bei einem höheren Anteil an Immunoproteasom in der Zelle verstärkt.

Sowohl MAGE-A1 als auch CEA und p53 wurden im Laufe der letzten Jahre intensiv auf HLA-A2-präsentierte Epitope hin untersucht. Dennoch konnte bis jetzt für keines der hier beschriebenen Peptide eine natürliche Prozessierung und Präsentation oder eine Induktion tumor-spezifischer CTL nachgewiesen werden. Dies ist wohl auf die unterschiedliche „Arbeitsrichtung“ des hier beschriebenen Ansatzes (Präsentation vor Erkennung) zurückzuführen.

Während in der Literatur für MAGE-A1 bis heute kein weiteres HLA-A2-präsentiertes Epitop beschrieben ist, sind für p53 und CEA einige Peptide als HLA-A2-präsentierte CTL-Epitope beschrieben worden (p53₁₄₉₋₁₅₇, p53₂₆₄₋₂₇₂, p53₁₈₇₋₁₉₇, CEA₆₀₅₋₆₁₃, CEA₆₉₁₋₆₉₉) (130;132;135;138). Keines dieser Peptide konnte durch den „Predict, Calibrate, Detect“-Ansatz nachgewiesen werden, obwohl diese Peptide in den synthetischen Mischungen enthalten waren.

Dies kann einerseits durch sehr geringe Peptidmengen in den untersuchten Proben erklärt werden, die unterhalb der Sensitivitätsgrenze des verwendeten analytischen Systems lagen. Hier könnte entweder eine sehr geringe Kopienzahl/Zelle dieser Peptide eine Rolle spielen, die sich nur noch durch spezifische CTL ohne vorherige Isolierung der MHC-Liganden nachweisen lassen, oder der Nachweis wird durch größere Verluste während der Extraktion und Auftrennung erschwert. Dies gilt für die nach Transfektion Her-2/*neu*⁺ Zelllinie KS24.22 auch für Peptide aus Her-2/*neu*. Inzwischen sind mehrere HLA-A2-präsentierte CTL-Epitope aus Her-2/*neu* beschrieben worden (Her-2/*neu*₃₆₉₋₃₇₇, Her-2/*neu*₉₇₁₋₉₇₉, Her-2/*neu*₈₅₁₋₈₅₉, Her-2/*neu*₈₁₀₋₈₁₈, Her-2/*neu*₆₅₄₋₆₆₂, Her-2/*neu*₇₇₃₋₇₈₂, Her-2/*neu*₆₈₉₋₆₉₇, Her-2/*neu*₄₃₅₋₄₄₃, Her-2/*neu*₅₋₁₃, Her-2/*neu*₆₈₆₋₆₉₄, Her-2/*neu*₉₅₂₋₉₆₁) (44;138-143). Obwohl die Her-2/*neu*-Expression in der FACS-Analyse sichtbar ist (Brigitte Gückel, nicht gezeigt) und diese Peptide zumindest teilweise in den synthetischen Mischungen enthalten waren, konnte keines dieser Peptide hier nachgewiesen werden.

Andererseits ist es auch möglich, daß diese Peptide auf den untersuchten Tumorproben und -zellen tatsächlich nicht präsentiert wurden. Hier stellt sich die Frage ob die in der Literatur beschriebenen Epitope Prozessierungsverhalten und damit Peptidrepertoires widerspiegeln, die spezifisch für die jeweils untersuchten Zelllinien sind, jedoch möglicherweise nicht auf andere Zelllinien oder Tumorzellen *in vivo* zutreffen (144).

Obwohl die Identifizierung von Selbstpeptiden in Peptidextrakten von soliden Nierenzellkarzinomen durch Edmanabbau in der Literatur schon beschrieben worden

ist (145), war es im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal möglich, einen tumorassoziierten MHC-Liganden in einem Peptidextrakt von einem soliden Tumor zu identifizieren. Diese direkte Analyse der Peptide, die auf solidem Tumorgewebe präsentiert werden, gibt Aufschluß über das Peptidrepertoire, das auf zumindest einem signifikanten Teil der Zellen präsentiert wird. Für CCA11, für den eine Präsentation von CEA₆₉₄₋₇₀₂ nachgewiesen werden konnte, liegt damit sowohl eine Überexpression von CEA als auch eine hohe Expression von HLA-A2 vor. Zudem ist in diesem Fall eine Herabregulierung von Komponenten der MHC Klasse I-Antigenprozessierung und -präsentation, wie z. B. MHC Molekülen oder TAP, auszuschließen. Dies gilt auch für diejenigen Tumorproben, für die zumindest die Präsentation der Positivkontrollen und anderer HLA-A2-Liganden gefunden wurde. Auf der anderen Seite sind eben solche Mechanismen, mit denen sich ein Tumor dem Immunsystem entziehen kann, für all jene Tumorproben nicht auszuschließen, für die keine HLA-A2-Liganden nachgewiesen werden konnten.

Damit konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, daß der „Predict, Calibrate, Detect“-Ansatz mit seiner Kombination aus Epitopvorhersage unter Verwendung von Peptidmotiven, Extraktion der MHC-gebundenen Peptide von Tumorzellen und Analyse der Peptidgemische durch Nanokapillar-HPLC-ESI-MS und -MS/MS eine geeignete Strategie zur T-Zell-unabhängigen Identifizierung natürlichprozessierter MHC Klasse I-Liganden aus tumorassoziierten Proteinen darstellt. Neben der Bestätigung bekannter HLA-A2-Selbstpeptide gelang die Charakterisierung dreier neuer tumorassoziierter HLA-A2-Liganden. Obwohl für eines dieser Peptide auch die Präsentation auf einem soliden Gastrointestinaltumor nachgewiesen werden konnte, zeigt gerade die relativ geringe Erfolgsrate bei den soliden Tumoren, wo mögliche Ansatzpunkte zur Verbesserung und Ergänzung der Strategie liegen. Für diese Tumoren lagen keine Informationen über Expression von tumorassoziierten Proteinen, Komponenten des Antigenprozessierungsweges und vor allem MHC-Molekülen vor. Daher wird in Zukunft die quantitative Expressionsanalyse der Tumorproben durch quantitative PCR und DNA-Chips eine wichtige Ergänzung darstellen.

Ist jedoch eine tumorspezifische Expression eines Proteines bekannt, erlaubt der „Predict, Calibrate, Detect“-Ansatz eine sinnvolle Fokussierung der Versuche zur Identifizierung immuntherapeutisch interessanter CTL-Epitope. Es wäre kaum möglich, PBL mit allen vorhergesagten Peptiden zu stimulieren, um peptidspezifische CTL zu generieren. Hier erlaubt dieser Ansatz eine Beschränkung auf solche

Peptide, für die eine natürliche Prozessierung und Präsentation auch tatsächlich nachgewiesen werden können.

Dennoch bleibt ein generelles Problem weiterhin bestehen: Die Induktion einer effizienten T-Zellantwort gegen tumorassoziierte Peptide, die der Selbsttoleranz oder anderen Mechanismen unterliegen, die zum Ausbleiben einer effektiven Immunantwort führen können. Aber auch hier gilt: Ist ein Peptid einmal als erfolgversprechendes Ziel für tumorspezifische CTL identifiziert, sind die Anstrengungen gerechtfertigt, eine solche CTL-Antwort auch im Rahmen einer Immuntherapie zu erzielen. So sind verschiedene Ansätze zur Überwindung der Selbsttoleranz denkbar: Eine Vakzinierung mit antigenbeladenen dendritischen Zellen oder eine adoptive Immuntherapie mit autologen, allogenen oder eventuell auch allorestriktierten T-Zellen (146-149).

4.2 Identifizierung virusspezifischer MHC Klasse I-Liganden durch HPLC MS und MS/MS-Analyse

Der im Rahmen dieser Arbeit charakterisierte RT1.A^I-Ligand aus dem Nukleoprotein p40 des BDV stellt das erste bekannte klassische CTL-Epitop im Rattensystem dar. Die Mechanismen der Antigenprozessierung und -präsentation in der Ratte weisen einige bemerkenswerte Unterschiede zum menschlichen und murinen System auf. So existieren in der Ratte zwei funktionelle TAP-Allele, TAP-A und TAP-B, mit unterschiedlichen Peptidspezifitäten (150). RT1.A^I ist mit TAP-A assoziiert, das bevorzugt Peptide mit aromatischen C-Termini transportiert, wie es auch für das identifizierte Epitop ASYAQMTTY der Fall ist. Peptidmotive sind im Augenblick für RT1.A^I und drei weitere MHC Klasse I-Moleküle bekannt. Sie zeigen eine bevorzugte Länge der Liganden von 9-12 Aminosäuren (151), wie es auch im humanen und murinen System der Fall ist.

Die identifizierte Epitopes aus BDV in der Lewisratte, dem am besten untersuchten Tiermodell der Bornakrankheit, wird bei der Aufklärung der genauen immunpathologischen Vorgänge bei dieser Krankheit helfen. Es konnte inzwischen gezeigt werden, daß das Nukleoprotein p40 hierbei wohl eine wichtige Rolle spielt, da Zellen nach Infektion mit einem Vaccinia-p40-Konstrukt von CTL erkannt wurden. Dies war nicht der Fall, wenn p40 durch das Phosphoprotein p24, das Matrixprotein oder das Glykoprotein ersetzt wurde (82).

Letztendlich ist das Ziel jedoch die Aufklärung der Rolle des BDV bei humanen Krankheiten. Der Nachweis von BDV bei Patienten mit psychischen Störungen wirft die Frage auf, ob hier ein kausaler Zusammenhang oder nur eine sekundäre Infektion vorliegt. Auch über die Rolle einer zellulären Immunantwort in diesem Zusammenhang ist noch nichts bekannt. Ein wichtiger Schritt zur Aufklärung dieser Fragen wäre zunächst die Identifizierung HLA-restringierter CTL-Epitope aus BDV z. B. im HHD-Mausmodell.

4.3 Identifizierung von MHC Klasse II-präsentierten Peptide aus dem IDDM-assozierten Protein Glutaminsäuredecarboxylase 65

Bei Autoimmunkrankheiten, die eine starke Assoziation mit bestimmten HLA Klasse II-Allelen aufweisen, ist die Identifizierung der entsprechenden T-Zell-determinanten für eine Verbesserung von Diagnose- und Therapiemöglichkeiten entscheidend. Allerdings ist das Wissen über den MHC Klasse II-Antigenprozessierungsweg noch relativ gering im Vergleich zum MHC Klasse I-Weg. So wird es noch einige Zeit dauern, bis eine Vorhersage der Schnittstellen, die für das Proteasom inzwischen möglich ist, auch für die zahlreichen lysosomalen Proteasen alleine und im Zusammenspiel möglich sein wird. Zusätzlich ist theoretisch bei einer rezeptorvermittelten Endozytose des Antigens, wie es z. B. bei B-Zellen der Fall ist, ein Effekt dieser Rezeptorkomplexbildung auf die Erreichbarkeit des Antigens durch die Proteasen denkbar. Daneben ist, wie schon erwähnt, eine Vorhersage potentieller Liganden aus einer Proteinsequenz zwar inzwischen für einige Allele möglich, allerdings lassen sich diese Vorhersagen wegen der variablen N- und C-terminalen Verlängerungen der jeweiligen Kernsequenz kaum für eine zielgerichtete bioanalytische Strategie wie den „Predict, Calibrate, Detect“-Ansatz ausnutzen.

Im vorliegenden Fall war es zum ersten Mal möglich, einen HLA Klasse II-Liganden aus einem definierten exogenen Antigen, der IDDM-relevanten Glutaminsäuredecarboxylase 65, nach radioaktiver Markierung zu identifizieren. Im Rahmen dieser Studie wurden neben der hier beschriebenen HLA-DR1⁺ monoklonalen B-Zelllinie MICA4, deren B Zellrezeptor ein Epitop in der zentralen Region von GAD65 erkennt, in analoger Weise die Zelllinien MICA7 und MICA1 untersucht. MICA7 wurde aus einem Patienten mit dem am stärksten mit IDDM in Zusammenhang stehenden Haplotyp HLA-DRB1*0401, HLA-

DQA1*0301/DQB1*0302 isoliert und besitzt einen B Zellrezeptor, der ein Epitop in der C-terminalen Region von GAD65 erkennt. MICA1 ist wie MICA4 HLA-DR1+ und besitzt eine ähnliche BCR-Spezifität wie MICA7. Erstaunlicherweise ergaben sich in allen drei Fällen nahezu identische Radioaktivitätsprofile und folgerichtig wurden in allen Fällen ausschließlich GAD65-Fragmente mit der Kernsequenz GAD65₅₅₄₋₅₆₈ identifiziert. So konnten von W. Keilholz für MICA7 die Liganden GAD65₅₅₄₋₅₆₈, GAD65₅₅₄₋₅₇₉, und GAD65₅₅₂₋₅₇₀, sowie für MICA 1 GAD65₅₅₄₋₅₆₈ nachgewiesen werden. Tatsächlich erhält bei einer Epitopvorhersage mit SYFPEITHI für potentielle HLA-DR1- und -DR4-Liganden aus GAD65 in beiden Fällen jeweils diese Kernsequenz die beste Bewertung. Weiterhin läßt sich in zwei von drei Fällen (MICA7 und MICA1) eine Kolokalisation von BCR-Epitop und HLA-DR-Ligand im C-terminalen Teil von GAD65 feststellen. Da allerdings für MICA4 dies nicht der Fall ist, läßt sich eine Theorie der bevorzugten Generierung von HLA Klasse II-Liganden aus Antigenregionen, die durch den BCR vor lysosmalen Proteasen geschützt sind, nur anhand dieser Daten wohl nur schwer vertreten.

In weiterführenden Experimenten konnten in ELISPOT-Tests im Blut von 28 Patienten mit GAD65-abhängigen Autoimmunkrankheiten (neben IDDM auch die seltene neuronale Störung Stiff Man Syndrom) bei 43 % eine signifikant erhöhte Th1-Antwort gegen GAD65₅₅₄₋₅₇₀ gegenüber 0 % bei gesunden Personen beobachtet werden. Dies steht in Übereinstimmung mit einem GAD65₅₅₂₋₅₇₅-spezifischen Th1-Klon, der neben 4 weiteren GAD65₂₇₀₋₂₈₃-spezifischen Klonen aus einem HLA-DR4 homozygoten IDDM-Patienten isoliert werden konnte (152). Darüberhinaus wurde in HLA-DR4-transgenen Mäusen nach Immunisierung mit synthetischen Peptiden ebenfalls GAD65₅₅₄₋₅₆₆ neben GAD65₁₁₅₋₂₇₁ und GAD65₂₇₄₋₂₈₆ als eines der effektivsten T-Zellepitope identifiziert (153). Auch bei Immunisierungen mit dem gesamten Protein wurde für die Region GAD65₅₅₁₋₅₇₀ neben GAD65₂₇₁₋₂₈₅ und GAD65₄₈₁₋₄₉₅ die größte Immunogenizität gefunden (154).

Der bis zum heutigen Tage am häufigsten verwendete Ansatz zur Identifizierung von MHC-Klasse II-präsentierte Epitope aus definierten Antigenen beruht auf der kosten- und zeitintensiven Synthese überlappender Peptide, die die gesamte Proteinsequenz abdecken und anschließender Ermittlung der T-Zellreaktivität und dem MHC-Bindungsverhalten. Dieser Ansatz gibt jedoch keinen Aufschluß über natürlich prozessierte Liganden aus diesem Antigen. Deren direkte Analyse z. B. durch massenspektrometrische Verfahren wird prinzipiell durch zwei limitierende Faktoren erschwert: Zum einen die Stoffmenge an Liganden aus dem jeweiligen

Antigen, die zur Detektion zur Verfügung stehen, zum anderen stehen bis heute wenige Ansätze für eine gezielte Suche zur Verfügung.

Die hier beschriebene radioaktive Markierung des Antigens erlaubte eine Fokussierung auf wenige, Radioaktivität enthaltende HPLC-Fractionen. Es ist nicht auszuschließen, daß mit dieser Methode nur das dominant präsentierte Epitop identifiziert werden konnte. Möglicherweise wurden weitere Epitope mit einer geringeren Kopienzahl/Zelle aufgrund von Radioaktivitätssignalen unterhalb der Sensitivitätsgrenze nicht detektiert.

Als weiterer Ansatz zur Identifizierung natürlich prozessierter MHC Klasse II-präsentierter Epitope ist das zeitintensive Subtraktionsverfahren beschrieben worden, das auf der vergleichenden Analyse zweier Zellpopulationen beruht und unter anderem auf HLA-DR4-Liganden aus dem Inselzellantigen IA-2 angewandt worden ist (155). Liganden von Zellen, die mit Antigen inkubiert worden waren, und von unbehandelten Zellen wurden extrahiert, über RP-HPLC aufgetrennt und alle Fraktionen durch MALDI TOF MS analysiert. Massen, die nur in Fraktionen von Liganden einer Zellpopulation auftraten, wurden durch Tandemmassenspektrometrie sequenziert. Dabei wurden 6 Kernsequenzen identifiziert. Allerdings ist deren physiologische Relevanz unklar, da hier ein artifizielles System zur Erhöhung der Stoffmenge an Liganden aus IA-2 eingesetzt wurde. Stehen keine autoreaktiven B-Zellen zur Verfügung, so kann man sich entweder auf die ineffiziente passive Internalisierung des exogenen Antigens durch die APC verlassen, was allerdings bis heute wegen zu geringer Peptidmengen in keinem Fall zur Identifizierung von Liganden führte (156). In der IA-2-Studie wurde daher ein System angewendet, bei dem drei Moleküle biotinyliertes Antigen über Streptavidin mit einem biotinyliertem Lectin gekoppelt werden, das durch Bindung an Kohlenhydratstrukturen von Immunglobulin-ähnlichen Molekülen wie z. B. dem BCR, an der Oberfläche von B-Zellen bindet und für eine aktive Internalisierung sorgt.

Die hier beschriebenen Liganden aus GAD65 wurden dagegen von B Zelllinien identifiziert, die in unmittelbarem Zusammenhang mit der Krankheit der IDDM-Patienten stehen, aus denen sie isoliert worden waren. Durch die BCR-vermittelten Endozytose sorgen autoreaktive B-Zellen für eine effiziente Aufnahme des - allerdings in allen Arbeiten in unphysiologisch hoher Konzentration vorliegenden - Autoantigens, was wiederum zu einer effizienten Generierung von MHC-Klasse II-Liganden aus diesem Protein führt. Dadurch wurde der Nachweis von *in vivo* präsentierten MHC-Liganden aus GAD65 möglich. Allerdings bleibt zu untersuchen, inwiefern sich der Ansatz der radioaktiven Markierung auch auf Fälle

übertragen lässt, in denen keine autoreaktiven B-Zellen zur Verfügung stehen und daher von einer weniger effizienten Antigenaufnahme und -prozessierung auszugehen ist.

4.4 Identifizierung von MHC Klasse I und II-Liganden von Tumorzellen durch off-line Nanoelektrospray MS/MS Analyse

Der Versuch der Analyse möglichst vieler MHC-Liganden in einer extrahierten Peptidmischung lieferte in diesem Fall, wie zu erwarten, eine große Zahl von Liganden aus Proteinen ohne eindeutige Tumorassoziation. Daß dies allerdings prinzipiell möglich ist, zeigen Einzelfälle wie z. B. die Identifizierung von Liganden aus den mit Nierenzellkarzinomen assoziierten Proteinen Thymosin- β 10 und Met-Protoonkogen (T. Weinschenk, unveröffentlichte Ergebnisse).

Die Stärke dieses Ansatzes liegt darin, daß keine Beschränkung auf wenige ausgewählte Proteine notwendig ist und damit auch Liganden aus Proteinen identifiziert werden können, für die ein tumorspezifisch verändertes Expressionsmuster im Augenblick zumindest nicht offensichtlich ist. Dies gilt in besonderem Maße für Proteine mit noch unbekannter Funktion oder ESTs. Andererseits ist anzunehmen, daß z. B. durch die DNA-Chiptechnologie zur gleichzeitigen Expressionsanalyse einer sehr großen Zahl von Genen für eine rapide steigende Zahl von Proteinen tatsächlich eine tumorspezifische Expression oder Überexpression nachgewiesen werden wird. Als Beispiel kann hier α -Catenin dienen, aus dem ein Ligand in einem Peptidextrakt der Melanomzelllinie M18 identifiziert werden konnte. Für dieses Protein wurde inzwischen eine Überexpression in metastasierenden Tumoren nachgewiesen (157). Daneben werden für DNA-Chips in zunehmendem Maße auch Gensequenzen berücksichtigt, deren Expressionsmuster und Genprodukte noch völlig unbekannt sind (vgl. die hypothetischen KIAA-Proteine, aus denen eine Reihe von Liganden identifiziert wurden).

Neben der DNA Chiptechnologie sorgen auch eine Reihe weiterer Ansätze, wie z. B. die SEREX-Technologie, für einen ständigen Zuwachs an Proteinen, die von tumorimmunologischem Interesse sind.

Da für die auf M18-Zellen exprimierten HLA-Klasse I-Moleküle keine allelspezifischen Antikörper zu Verfügung standen, ist allerdings - trotz Hemizygotie der Zelllinie M18 - eine Zuordnung der Liganden zu den einzelnen HLA-Molekülen

schwierig. Zwar lassen sich Liganden mit großen hydrophoben Aminosäuren in P2 und P9 noch eindeutig HLA-Cw07 zuordnen (158), für das hier häufig beobachtete E in P2 ist die Lage komplizierter. Zwar ist ein Peptidmotiv für HLA-A*2902 beschrieben worden (159), das in P2 E und in P9 Y (und mit Einschränkungen auch L) vorschreibt, allerdings sind nur zwei sehr ähnliche Einzelliganden bekannt und die Proteinsequenz ähnelt stark anderen HLA-A-Allelen, die durchweg hydrophobe Aminosäuren in P2 fordern: P45 - für die Interaktion mit der Seitenkette der Aminosäure in P2 des Peptides verantwortlich – ist mit M besetzt; P67 – für die Größe der Bindungstasche maßgeblich – ist mit V besetzt. Für HLA-B*4901 sind bis jetzt weder Peptidmotiv noch Liganden bekannt, ein Vergleich mit Proteinsequenzen anderer HLA-B-Allele läßt jedoch ein Motiv vermuten, das ähnlich wie z. B. für HLA-B44 ebenfalls in P2 E und in P9 eine hydrophobe Aminosäure fordert. P45 der Proteinsequenz ist hier ein K, P67 ein S.

Die Zelllinie M18 war als HLA-DRB1*0401⁺ beschrieben worden, allerdings zeigen die HLA-DR-Liganden neben einer meist großen, hydrophoben Aminosäure in P1 fast durchweg eine saure Aminosäure in P9, wie es für HLA-DRB1*0405-Liganden typisch ist. Tatsächlich ist der Ligand RAB7₉₂₋₁₀₆ schon als HLA-DRB1*0405-Ligand beschrieben worden (160), wenn auch zu diesem Zeitpunkt die Sequenz des humanen Proteins noch nicht bekannt war. Weiterhin sind für Pyruvatkinase und Macrophage Migration Inhibitory Factor HLA-DRB1*0405-Liganden beschrieben worden, die Längenvarianten der hier identifizierten Peptide darstellen (160;161).

Für die vereinigten Nierenzellkarzinomproben ist für die meisten Liganden nur eine putative Zuordnung anhand der Peptidmotive der exprimierten HLA-Molekülen möglich. Eine Ausnahme stellt NKCP4₁₀₇₋₁₁₅ dar, das als HLA-A24-Ligand beschrieben worden ist (162).

4.5 Bestimmung und Bestätigung von MHC Peptidmotiven anhand von Einzelliganden

Die N-terminale Poolsequenzierung von HLA-B*1510-Liganden ergab sehr hohe Signale in P2 für Histidin und P9 für Leucin. Auch alle durch Nanoelektrospray MS identifizierten Liganden zeigen diese Charakteristika, mit Ausnahme des Liganden aus Arp2, der in P2 ein Q besitzt. Q könnte einerseits in Ausnahmefällen als Ankeraminosäure dienen, da in der Poolsequenzierung in Zyklus 2 auch für Q ein

geringer Anstieg beobachtet wurde, während alle anderen Aminosäuren hier ein Minimum zeigten. Allerdings zeigt Q bei Poolsequenzierungen oft einen Anstieg in Zyklus 2, was durch die Pyroglutamatbildung bei Peptiden mit N-terminalem Q in sauren Lösungen erklärt werden kann, die eine N-terminalen Blockierung dieser Peptide bedeutet. In diesem Fall wäre der Ligand aus Arp2, der bei einer Epitopvorhersage für dieses Protein trotzdem am besten bewertet wird, ein Beispiel dafür, daß eine ungewöhnliche Ankeraminosäure durch viele sonstige bevorzugte Aminosäuren toleriert werden kann. In P9 wurden in der Poolsequenzierung auch subdominante Signale für F und M beobachtet, was durch Edmanabbau von Einzelfraktionen durch Identifizierung je eines Liganden mit F und M in P9 bestätigt wurde. Das Peptidmotiv für HLA-B*1510 (Abb. 4.1) weist keine Hilfsanker auf, da nur in P2 und P9 bestimmte Aminosäuren dominieren.

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

Abb. 4.1:
Peptidmotiv für HLA-B*1510; Ankeraminosäuren sind fett gedruckt

Für die Bestimmung des HLA-DQ(α 1*0201/ β 1*0202)-Motivs wurde wegen der zu erwartenden N-terminalen Verlängerungen der Peptide keine N-terminale Poolsequenzierung durchgeführt. Aus der Sequenzinformation der identifizierten Liganden sowie weiterer publizierten Liganden (163) lässt sich folgendes Peptidmotiv ableiten (Abb. 4.2):

Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Ankeraminosäuren	I L V Y P M (S)			I L E D C A (S) (T)		I L V P E	E D			L I E D W M

Abb. 4.2:
Peptidmotiv für HLA-DQ(α 1*0201/ β 1*0202); Ankeraminosäuren sind fett gedruckt

Dieses Peptidmotiv steht weitgehend im Einklang mit zwischenzeitlich publizierten Daten anhand von extrahierten Liganden und Bindungsstudien mit Peptiden mit der Grundsequenz eines natürlichen Liganden und Einzelsubstitutionen der Aminosäuren in P1, P3, P6 und P9 (163). Allerdings wurden in den Bindungsstudien für P1 und mit Einschränkungen auch für P4 polare Aminosäuren wie S und T weniger gut toleriert. Dagegen ergaben Arbeiten mit synthetischen Peptidbibliotheken ein Bindungsmotiv, das für P1 A und K fordert, für P4 D und E, für P6 D, E und P sowie für P9 aliphatische und aromatische hydrophobe Aminosäuren (B. Fleckenstein, unveröffentlichte Ergebnisse). Der Grund für diese unterschiedlichen Ergebnisse, besonders für P1, ist noch unklar, allerdings zeigt das Peptidmotiv des eng verwandten HLA-DQ($\alpha 1^*0501/\beta 1^*0201$)-Moleküls in P1 ebenfalls aliphatische und aromatische hydrophobe Aminosäuren (164).

4.6 Massenspektrometrische Identifizierung neuer Proteasen im MHC Klasse I-Antigenprozessierungsweg

Ausgangspunkt dieser Arbeiten war die Beobachtung, daß die Generierung des H2-K^b Liganden aus dem Vesicular Stomatitis Virus Nukleoprotein (VSV NP) 52-59 RGYVYQGL von N-terminal verlängerten Minigenen oder nach Infektion von Zielzellen mit VSV durch den Proteaseinhibitor Alanin-Alanin-Phenylalanin-Chlormethylketon (AAF-CMK) inhibiert wurde. Auch die Generierung des Epitopes SIINFEKL aus Ovalbumin wurde durch AAF-CMK gehemmt, obwohl dieser Inhibitor keinen Einfluss auf das Proteasom hat. Andererseits war für die Generierung von SIINFEKL von N-terminal verlängerten Minigenen keine Inhibition durch den Proteasominhibitor Lactacystin gefunden worden (165). Auf der Suche nach weiteren Proteasen im MHC Klasse I-Antigenprozessierungsweg wurden daher zytosolische Proteasen auf folgende Selektionskriterien hin untersucht: Inhibition durch AAF-CMK, Resistenz gegen Lactacystin und die Fähigkeit, N-terminale Aminosäuren von Vorläuferpeptiden des VSV NP-Epitopes zu entfernen.

Durch Trypsinverdau und Tandemmassenspektrometrie konnten die Zinkprotease puromycin-sensitive Aminopeptidase und die Cysteinprotease Bleomycinhydrolase identifiziert werden. Für keines dieser Enzyme war bisher eine physiologische Funktion bekannt. Allerdings wurde sowohl für Metalloproteinasen eine Rolle in der

MHC Klasse-Antigenprozessierung postuliert (166) als auch für Cysteinproteasen, die wie Bleomycinhydrolase durch den Inhibitor E64 gehemmt werden (167).

Für keine der identifizierten Proteasen wurde eine Induktion durch IFN- γ gefunden (Lars Stoltze, nicht gezeigt).

Damit ist ein erweitertes Modell der MHC Klasse I-Prozessierung denkbar: Das Proteasom generiert neben exakten MHC Klasse I-Liganden auch N-terminal verlängerte Vorläuferpeptide, die im Zytosol durch die beiden identifizierten konstitutiven Trimmpeptidasen weiter prozessiert werden. Die IFN- γ -induzierbare Leucinaminopeptidase, die in diesen Experimenten nicht gefunden wurde, könnte möglicherweise eine Rolle vergleichbar mit den ebenfalls IFN- γ -induzierbaren Proteasomuntereinheiten spielen. Nach Transport der Peptide in das ER durch TAP kann es schließlich - entweder vor oder nach Bindung der Peptide an leere MHC-Moleküle - durch eine noch unbekannte ER-ständige Proteaseaktivität zu einer weiteren Prozessierung kommen (20).

Vom proteinanalytischen Standpunkt zeigte sich, daß die Elektrospraytechnik trotz des relativ hohen Zeitaufwandes unersetzlich ist. Für eine Hochdurchsatzanalyse großer Probenmengen z. B. in der Proteomforschung hat sich für die Proteinidentifizierung im Augenblick die MALDI-TOF-Analyse aufgrund der einfacheren Automatisierung durchgesetzt. Die Identifizierung erfolgt dabei meist nicht über eine eigentliche Sequenzanalyse, sondern über die Massenbestimmung der für ein Protein mehr oder weniger charakteristischen tryptischen Verdauprodukte. Allerdings ist eine solche Analyse nur dann sinnvoll, wenn eine ausreichende Zahl von Peptidsignalen zur Verfügung steht (> 20), und bleibt auch dann hin und wieder nicht eindeutig. Sind in einer Gelbande wie im vorliegenden Fall zudem mehrere Proteine enthalten, wird eine eindeutige Identifizierung schwierig und nur durch MALD-PSD-Analyse möglich. Hier bietet sich die ESI-Analyse an, entweder off-line durch Nanoelektrospray-MS/MS oder on-line durch HPLC MS mit automatischer Fragmentierung der Ionen mit den höchsten Signalen.

4.7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden neue T-zellunabhängige Methoden zur gezielten Identifizierung krankheitsassoziiierter MHC-Liganden durch massenspektrometrische Verfahren entwickelt und getestet. Mit dem neuen „Predict, Calibrate, Detect“-Ansatz zur Identifizierung natürlich prozessierter MHC Klasse I-Liganden nach Epitopvorhersage konnten neue HLA-A2-präsentierte Liganden aus den tumorassoziierten Proteinen CEA, p53 und MAGE-A1 mit einer Empfindlichkeit von bis zu <10 Kopien /Zelle identifiziert werden. Für CEA₆₉₄₋₇₀₂ konnte zudem auch die Präsentation auf einem soliden Gastrointestinalkarzinom nachgewiesen werden. MAGE-A1₂₇₈₋₂₈₆ konnte inzwischen durch Steve Pascolo in transgenen Mäusen als CTL-Epitop eindeutig verifiziert werden, für die Liganden aus p53 und CEA sind Versuche dazu noch im Gange. Diese Peptide sind damit denkbare Kandidaten für eine peptidspezifische Immuntherapie bei Tumoren.

Die Voraussetzung für den „Predict, Calibrate, Detect“-Ansatz und weitere Ansätze zur Identifizierung von CTL-Epitopen aus definierten Antigenen sind allelspezifische Peptidmotive, die eine Epitopvorhersage für diese Protein erlauben. Mit der Bestimmung des Peptidmotive für HLA-B*1510- und HLA-DQ(α 1*0201/ β 1*0202) wurden hierfür die Grundlagen erweitert.

Daneben gelang die Charakterisierung des ersten CTL-Epitops aus dem Borna Disease Virus, das zugleich den ersten virusspezifischen Liganden eines MHC-Moleküls aus der Ratte darstellt.

Weiterhin konnten durch Nanoelektrospray-MS/MS-Analyse MHC-Klasse II-Liganden aus dem IDDM-relevanten Autoantigen GAD65 identifiziert werden und damit eine neue Methode zur spezifischen Detektion von MHC-Klasse II-Liganden aus einem definierten Antigen durch radioaktive Markierung des Proteins erfolgreich getestet werden.

Schließlich konnten mit der puromycin-sensitiven Aminopeptidase und der Bleomycinhydrolase zwei zytosolische Proteasen durch Nanoelektrospray-MS/MS-Analyse identifiziert werden, die wahrscheinlich an der N-terminalen Verkürzung proteasomaler Verdauungsprodukte beteiligt sind und damit eine wichtige Rolle im Entstehungsprozess der MHC Klasse I-Liganden spielen könnten.

5. Publikationsliste

Teile dieser Doktorarbeit finden sich in folgenden Publikationen:

1. Dick, T.P., A.K. Nussbaum, M. Deeg, W. Heinemeyer, M. Groll, M. Schirle, W. Keilholz, S. Stevanović, D.H. Wolf, R. Huber, H.G. Rammensee, and H. Schild. 1998. Contribution of proteasomal beta-subunits to the cleavage of peptide substrates analyzed with yeast mutants. *J Biol Chem* 273(40):25637.
2. Nussbaum, A.K., T.P. Dick, W. Keilholz, M. Schirle, S. Stevanović, K. Dietz, W. Heinemeyer, M. Groll, D.H. Wolf, R. Huber, H.G. Rammensee, and H. Schild. 1998. Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:12504.
3. Seeger, F.H., M. Schirle, J. Gatfield, D. Arnold, W. Keilholz, P. Nickolaus, H.G. Rammensee, and S. Stevanović. 1999. The HLA-A*6601 peptide motif: prediction by pocket structure and verification by peptide analysis. *Immunogenetics* 49:571.
4. Seeger F.H., M. Schirle, W. Keilholz, H.G. Rammensee, and S. Stevanović. 1999. Peptide motif of HLA-B*1510. *Immunogenetics* 49:996.
5. Schirle, M., W. Keilholz, B. Weber, C. Gouttefangeas, T. Dumrese, H.D. Becker, S. Stevanović, and H.G. Rammensee. 2000. Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T cell-independent approach. *Eur J Immunol* 30:2216.
6. Stoltze, L., M. Schirle, G. Schwarz, C. Schröter, M.W. Thompson, L.B. Hersh, H. Kalbacher, S. Stevanović, H.G. Rammensee, and H. Schild. 2000. Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nature Immunol* 5:413.
7. Planz, O., T. Dumrese, S. Hülpusch, M. Schirle, S. Stevanović, and L. Stitz. Characterization of a naturally processed Borna Disease Virus peptide presented by a rat MHC class I molecule. *J Biol Chem* (in Druck).
8. Pascolo*, S., M. Schirle*, B. Gückel, T. Dumrese, S. Stumm, S. Kayser, A. Moris, D. Wallwieser, H.G. Rammensee, and S. Stevanović . A MAGE-A1 HLA-A*0201 epitope identified by mass spectrometry. (*both authors contributed equally) *Cancer Res* (im Druck).
9. Söhnlein, P., M. Schirle, K. Syren, W. Keilholz, T.M. Halder, H. Beck, M. Tary-Lehmann, H.M. Meinck, S. Stevanović , H.G. Rammensee, H. Kalbacher, and W. Richter. The most abundant naturally processed HLA-DR eluted GAD65 fragment VNFRRMVISNPAATH unifies autoreactive B and T-cells in type 1 diabetes and Stiff-Man syndrome. (eingereicht)
10. Toes, R.E.M., A.K. Nussbaum, M. Schirle, M. Kraft, N. Emmerich, A. Zwinderman, T.P. Dick, J. Müller, B. Schoenfisch, S. Stevanović, H.G. Rammensee, and H. Schild. Quantitative analysis of the cleavage specificities of human 20S constitutive and immunoproteasome. (eingereicht)
11. Bruder, D., A.K. Nussbaum, D.M. Gakamsky, M. Schirle, S. Stevanović, H. Singh-Jasuja, H. Schild, A. Darji, T. Chakraborty, I. Pecht, J. Wehland, and S. Weiss. Loss of immunodominance of the listeriolysin MHC class I epitope by a conservative Ile-Ala replacement: involvement of multiple synergizing factors. (eingereicht)

6. Abkürzungsverzeichnis

AAC	Amino Acid Column	PTC	Phenylthiocabamid
APC	Antigen Presenting Cell	PTH	Phenylthiohydantoin
Aa	Amino acid	RP-HPLC	Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography
ATP	Adenosintriphosphat		
AZT	Anilinothioazolinon		
BCR	B cell receptor	SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Boc	Benzyloxycarbonyl	TAP	Transporter Associated with Antigen Processing
BPI	Base Peak Ion		
CD	Cluster of Differentiation	tBu	<i>tert</i> -Butyl
CdK	Cyclin Dependent Kinase	TFA	Trifluoressigsäure
CEA	Carcinoembryonic Antigen	THF	Tetrahydrofuran
CID	Collision induced decomposition	TIC	Total Ion Current
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte	TIL	Tumor Infiltrating Lymphocyte
DAHC	Diammoniumhydrogencitrat	TOF	Time of Flight
DHAP	2,5-Dihydroxyacetophenon	Trt	Trityl
DIEA	Diisopropylethylamin		
DMF	N, N'-Dimethylformamid		
DMSO	Dimethylsulfoxid		
ER	Endoplasmatisches Retikulum		
ESI	Electrospray Ionization		
EST	Expressed Sequence Tag		
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter		
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl		
GPI	Glykosylphosphatidylinositol		
GTP	Guanosintriphosphat		
HBTU	2-(1-H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat		
HLA	Human Leucocyte Antigen		
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol		
HSP	Hitzeschockprotein		
IFN	Interferon		
Ig	Immunglobulin		
Il	Interleukin		
LMP	Low Molecular Weight Polypeptide		
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization		
MHC	Major Histocompatibility Complex		
MS	Massenspektrometrie		
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie		
MTBE	Methyl- <i>tert.</i> Butylester		
MW	Molecular Weight		
NK-Zelle	Natürliche Killer-Zelle		
P	Position		
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese		
PCR	Polymerase Chain Reaction		
PH	Potentia Hydrogenii		
PITC	Phenylisothiocyanat		
Pmc	8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl		
PSC	Peptide Synthesis Column		

Der Einbuchstabencode der Aminosäuren

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

7. Literatur

1. Saper, M.A., P.J. Björkman, and D.C. Wiley. 1991. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *J Mol Biol* 219:277.
2. Stern, L.J., J.H. Brown, T.S. Jardetzky, J.C. Gorga, R.G. Urban, J.L. Strominger, and D.C. Wiley. 1994. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* 368:215.
3. Falk, K., O. Rötzschke, S. Stevanović, G. Jung, and H.G. Rammensee. 1991. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351:290.
4. Rötzschke, O., K. Falk, K. Deres, H. Schild, M. Norda, J. Metzger, G. Jung, and H.G. Rammensee. 1990. Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells. *Nature* 348:252.
5. Stevanović, S. and G. Jung. 1993. Multiple sequence analysis: pool sequencing of synthetic and natural peptide libraries. *Anal Biochem* 212:212.
6. Seeger, F.H., M. Schirle, J. Gatfield, D. Arnold, W. Keilholz, P. Nickolaus, H.G. Rammensee, and S. Stevanović. 1999. The HLA-A*6601 peptide motif: prediction by pocket structure and verification by peptide analysis. *Immunogenetics* 49:571.
7. Hill, A.V., J. Elvin, A.C. Willis, M. Aidoo, C.E. Allsopp, F.M. Gotch, X.M. Gao, M. Takiguchi, B.M. Greenwood, and A.R. Townsend. 1992. Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria. *Nature* 360:434.
8. Schubert, U., L.C. Anton, J. Gibbs, C.C. Norbury, J.W. Yewdell, and J.R. Bennink. 2000. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404:770.
9. Reits, E.A., J.C. Vos, M. Gromme, and J. Neefjes. 2000. The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature* 404:774.
10. Cerundolo, V., A. Benham, V. Braud, S. Mukherjee, K. Gould, B. Macino, J. Neefjes, and A. Townsend. 1997. The proteasome-specific inhibitor lactacystin blocks presentation of cytotoxic T lymphocyte epitopes in human and murine cells. *Eur J Immunol* 27:336.
11. Stoltze, L., T.P. Dick, M. Deeg, B. Pömmerl, H.G. Rammensee, and H. Schild. 1998. Generation of the vesicular stomatitis virus nucleoprotein cytotoxic T lymphocyte epitope requires proteasome-dependent and -independent proteolytic activities. *Eur J Immunol* 28:4029.
12. Beninga, J., K.L. Rock, and A.L. Goldberg. 1998. Interferon-gamma can stimulate post-proteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase. *J Biol Chem* 273:18734.
13. Belich, M.P., R.J. Glynn, G. Senger, D. Sheer, and J. Trowsdale. 1994. Proteasome components with reciprocal expression to that of the MHC-encoded LMP proteins. *Curr Biol* 4:769.
14. Groettrup, M., R. Kraft, S. Kostka, S. Standera, R. Stohwasser, and P.M. Kloetzel. 1996. A third interferon-gamma-induced subunit exchange in the 20S proteasome. *Eur J Immunol* 26:863.
15. Hisamatsu, H., N. Shimbara, Y. Saito, P. Kristensen, K.B. Hendil, T. Fujiwara, E. Takahashi, N. Tanahashi, T. Tamura, A. Ichihara, and K. Tanaka. 1996. Newly identified pair of proteasomal subunits regulated reciprocally by interferon gamma. *J Exp Med* 183:1807.
16. Toes, R. E., Nussbaum, A. K., Schirle, M., Kraft, M., Emmerich, N., Dick, T. P., Müller, J., Schoenfisch, B., Stevanović, S., Rammensee, H-G., and Schild, H. Quantitative analysis of the cleavage specificities of human 20S constitutive and immunoproteasome. (submitted).

17. Ma, C.P., C.A. Slaughter, and G.N. DeMartino. 1992. Identification, purification, and characterization of a protein activator (PA28) of the 20 S proteasome (macropain). *J Biol Chem* 267:10515.
18. Arnold, D., S. Faath, H. Rammensee, and H. Schild. 1995. Cross-priming of minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T cells upon immunization with the heat shock protein gp96. *J Exp Med* 182:885.
19. Lammert, E., D. Arnold, M. Nijenhuis, F. Momburg, G.J. Hämmerling, J. Brunner, S. Stevanović, H.G. Rammensee, and H. Schild. 1997. The endoplasmic reticulum-resident stress protein gp96 binds peptides translocated by TAP. *Eur J Immunol* 27:923.
20. Paz, P., N. Brouwenstijn, R. Perry, and N. Shastri. 1999. Discrete proteolytic intermediates in the MHC class I antigen processing pathway and MHC I-dependent peptide trimming in the ER. *Immunity* 11:241.
21. Sadasivan, B., P.J. Lehner, B. Ortmann, T. Spies, and P. Cresswell. 1996. Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity* 5:103.
22. Solheim, J.C., M.R. Harris, C.S. Kindle, and T.H. Hansen. 1997. Prominence of beta 2-microglobulin, class I heavy chain conformation, and tapasin in the interactions of class I heavy chain with calreticulin and the transporter associated with antigen processing. *J Immunol* 158:2236.
23. Lindquist, J.A., O.N. Jensen, M. Mann, and G.J. Hämmerling. 1998. ER-60, a chaperone with thiol-dependent reductase activity involved in MHC class I assembly. *EMBO J* 17:2186.
24. Watts, C. 1997. Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu Rev Immunol* 15:821.
25. Kropshofer, H., S.O. Arndt, G. Moldenhauer, G.J. Hämmerling, and A.B. Vogt. 1997. HLA-DM acts as a molecular chaperone and rescues empty HLA-DR molecules at lysosomal pH. *Immunity* 6:293.
26. Rock, K.L., S. Gamble, L. Rothstein, and B. Benacerraf. 1991. Reassociation with beta 2-microglobulin is necessary for Db class I major histocompatibility complex binding of an exogenous influenza peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:301.
27. Berke, G. 1994. The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspects. *Annu Rev Immunol* 12:735.
28. Wallny, H.J., K. Deres, S. Faath, G. Jung, A. Van Pel, T. Boon, and H.G. Rammensee. 1992. Identification and quantification of a naturally presented peptide as recognized by cytotoxic T lymphocytes specific for an immunogenic tumor variant. *Int Immunol* 4:1085.
29. Boon, T. and J. Maryanski. 1985. Tumour cell variants with increased immunogenicity obtained by mutagen treatment. *Cancer Surv* 4:135.
30. van der Bruggen, P. and B. Van den Eynde. 1992. Molecular definition of tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 4:608.
31. Boon, T. 1993. Tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes: present perspectives for specific immunotherapy. *Int J Cancer* 54:177.
32. Cox, A.L., J. Skipper, Y. Chen, R.A. Henderson, T.L. Darrow, J. Shabanowitz, V.H. Engelhard, D.F. Hunt, and C.L.J. Slingluff. 1994. Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science* 264:716.
33. Türeci, O., U. Sahin, I. Schobert, M. Koslowski, H. Scmitt, H.J. Schild, F. Stenner, G. Seitz, H.G. Rammensee, and M. Pfreundschuh. 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* 56:4766.

34. van der Bruggen, P., C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, E. De Plaen, B. Van den Eynde, A. Knuth, and T. Boon. 1991. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254:1643.
35. Chen, Y.T., M.J. Scanlan, U. Sahin, O. Türeci, A.O. Gure, S. Tsang, B. Williamson, E. Stockert, M. Pfreundschuh, and L.J. Old. 1997. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1914.
36. De Smet, C., O. De Backer, I. Faraoni, C. Lurquin, F. Brasseur, and T. Boon. 1996. The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:7149.
37. Serrano, A., A. Garcia, E. Abril, F. Garrido, and F. Ruiz-Cabello. 1996. Methylated CpG points identified within MAGE-1 promoter are involved in gene repression. *Int J Cancer* 68:464.
38. Topalian, S.L., L. Rivoltini, M. Mancini, N.R. Markus, P.F. Robbins, Y. Kawakami, and S.A. Rosenberg. 1994. Human CD4+ T cells specifically recognize a shared melanoma-associated antigen encoded by the tyrosinase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9461.
39. Wölfel, T., A. Van Pel, V. Brichard, J. Schneider, B. Seliger, z.B.K. Meyer, and T. Boon. 1994. Two tyrosinase nonapeptides recognized on HLA-A2 melanomas by autologous cytolytic T lymphocytes. *Eur J Immunol* 24:759.
40. Kawakami, Y., S. Eliyahu, C. Jennings, K. Sakaguchi, X. Kang, S. Southwood, P.F. Robbins, A. Sette, E. Appella, and S.A. Rosenberg. 1995. Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-infiltrating T lymphocytes associated with in vivo tumor regression. *J Immunol* 154:3961.
41. Wölfel, T., M. Hauer, J. Schneider, M. Serrano, C. Wolfel, E. Klehmann-Hieb, E. De Plaen, T. Hankeln, z.B.K. Meyer, and D. Beach. 1995. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 269:1281.
42. Robbins, P.F., M. El-Gamil, Y.F. Li, Y. Kawakami, D. Loftus, E. Appella, and S.A. Rosenberg. 1996. A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 183:1185.
43. Pinilla-Ibarz, J., K. Cathcart, and D.A. Scheinberg. 2000. CML vaccines as a paradigm of the specific immunotherapy of cancer. *Blood Rev* 14:111.
44. Fisk, B., C. Savary, J.M. Hudson, C.A. O'Brian, J.L. Murray, J.T. Wharton, and C.G. Ioannides. 1995. Changes in an HER-2 peptide upregulating HLA-A2 expression affect both conformational epitopes and CTL recognition: implications for optimization of antigen presentation and tumor-specific CTL induction. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 18:197.
45. Greenblatt, M.S., W.P. Bennett, M. Hollstein, and C.C. Harris. 1994. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 54:4855.
46. Soussi, T., Y. Legros, R. Lubin, K. Ory, and B. Schlichtholz. 1994. Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review. *Int J Cancer* 57:1.
47. Guilloux, Y., S. Lucas, V.G. Brichard, A. Van Pel, C. Viret, E. De Plaen, F. Brasseur, B. Lethe, F. Jotereau, and T. Boon. 1996. A peptide recognized by human cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas is encoded by an intron sequence of the N-acetylglucosaminyltransferase V gene. *J Exp Med* 183:1173.
48. Lupetti, R., P. Pisarra, A. Verrecchia, C. Farina, G. Nicolini, A. Anichini, C. Bordignon, M. Sensi, G. Parmiani, and C. Traversari. 1998. Translation of a retained intron in tyrosinase-related protein (TRP) 2 mRNA generates a new cytotoxic T lymphocyte (CTL)-defined and shared human melanoma antigen not expressed in normal cells of the melanocytic lineage. *J Exp Med* 188:1005.

49. Gaugler, B., N. Brouwenstijn, V. Vantomme, J.P. Szikora, C.W. Van der Spek, J.J. Patard, T. Boon, P. Schrier, and B.J. Van den Eynde. 1996. A new gene coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human renal carcinoma. *Immunogenetics* 44:323.
50. Flad, T., B. Spengler, H. Kalbacher, P. Brossart, D. Baier, R. Kaufmann, P. Bold, S. Metzger, M. Bluggel, H.E. Meyer, B. Kurz, and C.A. Muller. 1998. Direct identification of major histocompatibility complex class I-bound tumor-associated peptide antigens of a renal carcinoma cell line by a novel mass spectrometric method. *Cancer Res* 58:5803.
51. Malarkannan, S., T. Horng, P.P. Shih, S. Schwab, and N. Shastri. 1999. Presentation of out-of-frame peptide/MHC class I complexes by a novel translation initiation mechanism. *Immunity* 10:681.
52. Ronsin, C., V. Chung-Scott, I. Poullion, N. Aknouche, C. Gaudin, and F. Triebel. 1999. A non-AUG-defined alternative open reading frame of the intestinal carboxyl esterase mRNA generates an epitope recognized by renal cell carcinoma-reactive tumor-infiltrating lymphocytes in situ. *J Immunol* 163:483.
53. Rensing, M.E., A. Sette, R.M. Brandt, J. Ruppert, P.A. Wentworth, M. Hartman, C. Oseroff, H.M. Grey, C.J. Melief, and W.M. Kast. 1995. Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity studies of HLA-A*0201-binding peptides. *J Immunol* 154:5934.
54. Zarling, A.L., S.B. Ficarro, F.M. White, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, and V.H. Engelhard. 2000. Phosphorylated Peptides Are Naturally Processed and Presented by Major Histocompatibility Complex Class I Molecules In Vivo. *J Exp Med* 192:1755.
55. Kastrup, I.B., S. Stevanović, G. Arsequell, G. Valencia, J. Zeuthen, H.G. Rammensee, T. Elliott, and J.S. Haurum. 2000. Lectin purified human class I MHC-derived peptides: evidence for presentation of glycopeptides in vivo. *Tissue Antigens* 56:129.
56. Pardoll, D.M. 1996. Cancer vaccines: a road map for the next decade. *Curr Opin Immunol* 8:619.
57. Nestle, F.O., S. Alijagic, M. Gilliet, Y. Sun, S. Grabbe, R. Dummer, G. Burg, and D. Schadendorf. 1998. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 4:328.
58. Sun, Y., A. Paschen, and D. Schadendorf. 1999. Cell-based vaccination against melanoma--background, preliminary results, and perspective. *J Mol Med* 77:593.
59. Kugler, A., G. Stuhler, P. Walden, G. Zoller, A. Zobywalski, P. Brossart, U. Trefzer, S. Ullrich, C.A. Muller, V. Becker, A.J. Gross, B. Hemmerlein, L. Kanz, G.A. Muller, and R.H. Ringert. 2000. Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. *Nat Med* 6:332.
60. Brossart, P., G. Stuhler, T. Flad, S. Stevanović, H.G. Rammensee, L. Kanz, and W. Brugger. 1998. Her-2/neu-derived peptides are tumor-associated antigens expressed by human renal cell and colon carcinoma lines and are recognized by in vitro induced specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res* 58:732.
61. Altman, J.D., P.A.H. Moss, P.J.R. Goulder, D.H. Barouch, M.G. McHeyzer-Williams, J.I. Bell, A.J. McMichael, and M.M. Davis. 1996. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocyte. *Science* 274:94.
62. Röttschke, O., K. Falk, S. Stevanović, G. Jung, P. Walden, and H.G. Rammensee. 1991. Exact prediction of a natural T cell epitope. *Eur J Immunol* 21:2891.
63. Pamer, E.G., J.T. Harty, and M.J. Bevan. 1991. Precise prediction of a dominant class I MHC-restricted epitope of *Listeria monocytogenes*. *Nature* 353:852.
64. Celis, E., V. Tsai, C. Crimi, R. DeMars, P.A. Wentworth, R.W. Chesnut, H.M. Grey, A. Sette, and H.M. Serra. 1994. Induction of anti-tumor cytotoxic T lymphocytes in normal hu-

mans using primary cultures and synthetic peptide epitopes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:2105.

65. Parker, K.C., M.A. Bednarek, and J.E. Coligan. 1994. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J Immunol* 152:163.
66. Hammer, J., E. Bono, F. Gallazzi, C. Belunis, Z. Nagy, and F. Sinigaglia. 1994. Precise prediction of major histocompatibility complex class II-peptide interaction based on peptide side chain scanning. *J Exp Med* 180:2353.
67. Davenport, M.P., K.J. Smith, D. Barouch, S.W. Reid, W.M. Bodnar, A.C. Willis, D.F. Hunt, and A.V. Hill. 1997. HLA class I binding motifs derived from random peptide libraries differ at the COOH terminus from those of eluted peptides. *J Exp Med* 185:367.
68. Traversari, C., P. van der Bruggen, I.F. Luescher, C. Lurquin, P. Chomez, A. Van Pel, E. De Plaen, A. Amar-Costesec, and T. Boon. 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* 176:1453.
69. Kawakami, Y., S. Eliyahu, C.H. Delgado, P.F. Robbins, K. Sakaguchi, E. Appella, J.R. Yannelli, G.J. Adema, T. Miki, and S.A. Rosenberg. 1994. Identification of a human melanoma antigen recognized by tumor-infiltrating lymphocytes associated with in vivo tumor rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:6458.
70. Röpke, M., M. Regner, and M.H. Claesson. 1995. T cell-mediated cytotoxicity against p53-protein derived peptides in bulk and limiting dilution cultures of healthy donors. *Scand J Immunol* 42:98.
71. Böhm, C.M., M.L. Hanski, S. Stefanović, H.G. Rammensee, H. Stein, J. Taylor-Papadimitriou, E.O. Riecken, and C. Hanski. 1998. Identification of HLA-A2-restricted epitopes of the tumor-associated antigen MUC2 recognized by human cytotoxic T cells. *Int J Cancer* 75:688.
72. Gjertsen, M.K., I. Saeterdal, E. Thorsby, and G. Gaudernack. 1996. Characterisation of immune responses in pancreatic carcinoma patients after mutant p21 ras peptide vaccination. *Br J Cancer* 74:1828.
73. Jäger, E., H. Bernhard, P. Romero, M. Ringhoffer, M. Arand, J. Karbach, C. Ilsemann, M. Hagedorn, and A. Knuth. 1996. Generation of cytotoxic T-cell responses with synthetic melanoma-associated peptides in vivo: implications for tumor vaccines with melanoma-associated antigens. *Int J Cancer* 66:162.
74. Thurner, B., I. Haendle, C. Roder, D. Dieckmann, P. Keikavoussi, H. Jonuleit, A. Bender, C. Maczek, D. Schreiner, P. von den Driesch, E.B. Brocker, R.M. Steinman, A. Enk, E. Kampgen, and G. Schuler. 1999. Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med* 190:1669.
75. Rensing, M.E., W.J. van Driel, R.M. Brandt, G.G. Kenter, J.H. de Jong, T. Bauknecht, G.J. Fleuren, P. Hoogerhout, R. Offringa, A. Sette, E. Celis, H. Grey, B.J. Trimbos, W.M. Kast, and C.J. Melief. 2000. Detection of T helper responses, but not of human papillomavirus-specific cytotoxic T lymphocyte responses, after peptide vaccination of patients with cervical carcinoma. *J Immunother* 23:255.
76. Wang, F., E. Bade, C. Kuniyoshi, L. Spears, G. Jeffery, V. Marty, S. Groshen, and J. Weber. 1999. Phase I trial of a MART-1 peptide vaccine with incomplete Freund's adjuvant for resected high-risk melanoma. *Clin Cancer Res* 5:2756.
77. Offringa, R., S.H. van der Burg, F. Ossendorp, R.E. Toes, and C.J. Melief. 2000. Design and evaluation of antigen-specific vaccination strategies against cancer. *Curr Opin Immunol* 12:576.

78. Riker, A., J. Cormier, M. Panelli, U. Kammula, E. Wang, A. Abati, P. Fetsch, K.H. Lee, S. Steinberg, S. Rosenberg, and F. Marincola. 1999. Immune selection after antigen-specific immunotherapy of melanoma. *Surgery* 126:112.
79. Stitz, L. and R. Rott. 1999. Borna Disease Virus (Bornaviridae). In: Encyclopedia of Virology. A. Granoff and R.G. Webster, editors. Academic Press, 167-173.
80. Deuschle, M., L. Bode, I. Heuser, J. Schmider, and H. Ludwig. 1998. Borna disease virus proteins in cerebrospinal fluid of patients with recurrent depression and multiple sclerosis. *Lancet* 352:1828.
81. Noske, K., T. Bilzer, O. Planz, and L. Stitz. 1998. Virus-specific CD4+ T cells eliminate bor-na disease virus from the brain via induction of cytotoxic CD8+ T cells. *J Virol* 72:4387.
82. Planz, O. and L. Stitz. 1999. Borna disease virus nucleoprotein (p40) is a major target for CD8(+)-T-cell-mediated immune. *J Virol* 73:1715.
83. Nepom, G.T. 1993. Immunogenetics and IDDM. *Diabetes Rev.* 93.
84. Sanjeevi, C.B., T.P. Lybrand, M. Landin-Olsson, I. Kockum, G. Dahlquist, W.A. Hagopian, J.P. Palmer, and A. Lernmark. 1994. Analysis of antibody markers, DRB1, DRB5, DQA1 and DQB1 genes and modeling of DR2 molecules in DR2-positive patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Tissue Antigens* 44:110.
85. Ziegler, R., C.A. Alper, Z.L. Awdeh, L. Castano, S.J. Brink, J.S. Soeldner, R.A. Jackson, and G.S. Eisenbarth. 1991. Specific association of HLA-DR4 with increased prevalence and level of insulin autoantibodies in first-degree relatives of patients with type I diabetes. *Diabetes* 40:709.
86. Harrison, L.C., M.C. Honeyman, H.J. DeAizpurua, R.S. Schmidli, P.G. Colman, B.D. Tait, and D.S. Cram. 1993. Inverse relation between humoral and cellular immunity to glutamic acid decarboxylase in subjects at risk of insulin-dependent diabetes. *Lancet* 341:1365.
87. Abraham, R.S. and C.S. David. 2000. Identification of HLA-class-II-restricted epitopes of autoantigens in transgenic mice. *Curr Opin Immunol* 12:122.
88. Andreoletti, L., D. Hober, C. Hober-Vandenberghe, I. Fajardy, S. Belaich, V. Lambert, M.C. Vantyghem, J. Lefebvre, and P. Wattré. 1998. B virus infection and beta cell autoantibodies in newly diagnosed IDDM adult patients. *Clin Diagn Virol* 9:125.
89. Horwitz, M.S., L.M. Bradley, J. Harbertson, T. Krahl, J. Lee, and N. Sarvetnick. 1998. Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry. *Nat Med* 4:781.
90. Scaglia, L., C.J. Cahill, D.T. Finegood, and S. Bonner-Weir. 1997. Apoptosis participates in the remodeling of the endocrine pancreas in the neonatal rat. *Endocrinology* 138:1736.
91. Rovere, P., C. Vallinoto, A. Bondanza, M.C. Crosti, M. Rescigno, P. Ricciardi-Castagnoli, C. Rugarli, and A.A. Manfredi. 1998. Bystander apoptosis triggers dendritic cell maturation and antigen-presenting function. *J Immunol* 161:4467.
92. Albert, M.L., B. Sauter, and N. Bhardwaj. 1998. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392:86.
93. Edman, P. 1950. Method for determination of the amino acid sequence of peptides. *Acta Chem.Scand.* 4:283.
94. Edman, P. and G. Begg. 1967. A Protein Sequenator. *Eur J Biochem* 1:80.
95. Whitehouse, C.M., R.N. Dreyer, M. Yamashita, and J.B. Fenn. 1985. Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Anal Chem* 57:675.
96. Hillenkamp, F., M. Karas, R.C. Beavis, and B.T. Chait. 1991. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Anal Chem* 63:1193A.

97. Hunt, D.F., R.A. Henderson, J. Shabanowitz, K. Sakaguchi, H. Michel, N. Sevilir, A.L. Cox, E. Appella, and V.H. Engelhard. 1992. Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. *Science* 255:1261.
98. Kaufmann, R., B. Spengler, and F. Lutzenkirchen. 1993. Mass spectrometric sequencing of linear peptides by product-ion analysis in a reflectron time-of-flight mass spectrometer using matrix-assisted laser desorption ionization. *Rapid Commun Mass Spectrom* 7:902.
99. Chait, B.T., R. Wang, R.C. Beavis, and S.B. Kent. 1993. Protein ladder sequencing. *Science* 262:89.
100. Patterson, D.H., G.E. Tarr, F.E. Regnier, and S.A. Martin. 1995. C-terminal ladder sequencing via matrix-assisted laser desorption mass spectrometry coupled with carboxypeptidase Y time-dependent and concentration-dependent digestions. *Anal Chem* 67:3971.
101. Wilm, M., A. Shevchenko, T. Houthaeve, S. Breit, L. Schweigerer, T. Fotsis, and M. Mann. 1996. Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature* 379:466.
102. Cottrell, J.S. 1994. Protein identification by peptide mass fingerprinting. *Pept Res* 7:115.
103. Kratzer, R., C. Eckerskorn, M. Karas, and F. Lottspeich. 1998. Suppression effects in enzymatic peptide ladder sequencing using ultraviolet - matrix assisted laser desorption/ionization - mass spectrometry. *Electrophoresis* 19:1910.
104. Wang, W., P.H. Gulden, R.A. Pierce, J. Shabanowitz, S.T. Man, D.F. Hunt, V.H. Engelhard, and J.A. Shabanowitz. 1997. A naturally processed peptide presented by HLA-A*0201 is expressed at low abundance and recognized by an alloreactive CD8+ cytotoxic T cell with apparent high affinity. *J Immunol* 158:5797.
105. Brockman, A.H., R. Orlando, and R.L. Tarleton. 1999. A new liquid chromatography/tandem mass spectrometric approach for the identification of class I major histocompatibility complex associated peptides that eliminates the need for bioassays. *Rapid Commun Mass Spectrom* 13:1024.
106. Morris, H.R., T. Paxton, M. Panico, R. McDowell, and A. Dell. 1997. A novel geometry mass spectrometer, the Q-TOF, for low-femtomole/attomole-range biopolymer sequencing. *J Protein Chem* 16:469.
107. Yalcin, T., C. Khouw, I.G.P.M.R. Csizmadia, and A.G. Harrison. 1995. Why Are B Ions Stable Species in Peptide Spectra? *J Am Soc Mass Spectrom* 6:1165.
108. Tsapraillis, G. and V.H. Wysocki. 2000. Another Selective Cleavage in Peptides: A Common Mechanism for the Formation of Complementary b₁y or b Ions at Protonated Histidine. *Proceedings of the 48th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics* 1446.(Extended Abstract)
109. Schirle, M. 1997. Massenspektrometrische Untersuchungen tumorspezifischer HLA-A1-Peptide nach Epitopvorhersage. (Diplomarbeit)
110. Davenport, M.P., S. Ho, I, and A.V. Hill. 1995. An empirical method for the prediction of T-cell epitopes. *Immunogenetics* 42:392.
111. Rammensee, H., J. Bachmann, N.P. Emmerich, O.A. Bachor, and S. Stevanović. 1999. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50:213.
112. Stevanović, S. and H. Schild. 1999. Quantitative aspects of T cell activation--peptide generation and editing by MHC class I molecules. *Semin Immunol* 11:375.
113. Rodrigues, N.R., A. Rowan, M.E. Smith, I.B. Kerr, W.F. Bodmer, J.V. Gannon, and D.P. Lane. 1990. p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:7555.
114. Bos, J.L. 1989. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49:4682.

115. Valassiadou, K.E., K. Stefanaki, M. Tzardi, G. Datsaris, V. Georgoulas, J. Melissas, D.D. Tsiftsis, G. Delides, and P. Kanavaros. 1997. Immunohistochemical expression of p53, bcl-2, mdm2 and waf1/p21 proteins in colorectal adenocarcinomas. *Anticancer Res* 17:2571.
116. Meltzer, S.J., D.J. Ahnen, H. Battifora, J. Yokota, and M.J. Cline. 1987. Protooncogene abnormalities in colon cancers and adenomatous. *Gastroenterology* 92:1174.
117. Muraro, R., D. Wunderlich, A. Thor, J. Lundy, P. Noguchi, R. Cunningham, and J. Schlom. 1985. Definition by monoclonal antibodies of a repertoire of epitopes on carcinoembryonic antigen differentially expressed in human colon carcinomas versus normal adult tissues. *Cancer Res* 45:5769.
118. Barouch, D., T. Friede, S. Stevanović, L. Tussey, K. Smith, S. Rowland-Jones, V. Braud, A. McMichael, and H.G. Rammensee. 1995. HLA-A2 subtypes are functionally distinct in peptide binding and presentation. *J Exp Med* 182:1847.
119. Gaugler, B., B. Van den Eynde, P. van der Bruggen, P. Romero, J.J. Gaforio, E. De Plaen, B. Lethe, F. Brasseur, and T. Boon. 1994. Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med* 179:921.
120. Zotter, S., P.C. Hageman, A. Lossnitzer, and W.J.H.J. Mooi. 1988. Tissue and tumor distribution of human polymorphic epithelial mucin. *Cancer Rev* 11:55.
121. Finn, O.J., K.R. Jerome, R.A. Henderson, G. Pecher, N. Domenech, J. Magarian-Blander, and S.M. Barratt-Boyes. 1995. MUC-1 epithelial tumor mucin-based immunity and cancer vaccines. *Immunol Rev* 145:61.
122. Rammensee, H.G., K. Falk, and O. Rötzschke. 1993. Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu Rev Immunol* 11:213.
123. Christinck, E.R., M.A. Luscher, B.H. Barber, and D.B. Williams. 1991. Peptide binding to class I MHC on living cells and quantitation of complexes required for CTL lysis. *Nature* 352:67.
124. Pascolo, S., N. Bervas, J.M. Ure, A.G. Smith, F.A. Lemonnier, and B. Perarnau. 1997. HLA-A2.1-restricted education and cytolytic activity of CD8(+) T lymphocytes from beta2 microglobulin (beta2m) HLA-A2.1 monochain transgenic H-2Db beta2m double knockout mice. *J Exp Med* 185:2043.
125. Firat, H., F. Garcia-Pons, S. Tourdou, S. Pascolo, A. Scardino, Z. Garcia, M.L. Michel, R.W. Jack, G. Jung, K. Kosmatopoulos, L. Mateo, A. Suhrbier, F.A. Lemonnier, and P. Langlade-Demoyen. 1999. H-2 class I knockout, HLA-A2.1-transgenic mice: a versatile animal model for preclinical evaluation of antitumor immunotherapeutic strategies. *Eur J Immunol* 29:3112.
126. Reizis, B., H. Schild, S. Stefanovic, F. Mor, H. Rammensee, and I.R. Cohen. 1997. Peptide binding motifs of the MHC class I molecules (RT1.A1) of the Lewis rat. *Immunogenetics* 45:278.
127. Richter, W., Y. Shi, and S. Baekkeskov. 1993. Autoreactive epitopes defined by diabetes-associated human monoclonal antibodies are localized in the middle and C-terminal domains of the smaller form of glutamate decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2832.
128. White, F.M., J.M.J.A. Lippolis, G.T. Nepom, A. Herman, J. Shabanowitz, V.H. Engelhard, and D.F. Hunt. 1999. Analysis of Naturally Processed MHC Class II Peptides from Exogenous and endogenous Proteins. *Proceedings of the 47th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics* 1932.(Extended Abstract)
129. O'Farrell, P.A., F. Gonzalez, W. Zheng, S.A. Johnston, and L. Joshua-Tor. 1999. Crystal structure of human bleomycin hydrolase, a self-compartmentalizing cysteine protease. *Structure Fold Des* 7:619.
130. Theobald, M., J. Biggs, J. Hernandez, J. Lustgarten, C. Labadie, and L.A. Sherman. 1997. Tolerance to p53 by A2.1-restricted cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 185:833.

131. McCarty, T.M., Z. Yu, X. Liu, D.J. Diamond, and J.D. Ellenhorn. 1998. An HLA-restricted, p53 specific immune response from HLA transgenic p53 knockout mice. *Ann Surg Oncol* 5:93.
132. Theobald, M., J. Biggs, D. Dittmer, A.J. Levine, and L.A. Sherman. 1995. Targeting p53 as a general tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11993.
133. Zeh, H.J., G.H. Leder, M.T. Lotze, R.D. Salter, M. Tector, G. Stuber, S. Modrow, and W.J. Storkus. 1994. Flow-cytometric determination of peptide-class I complex formation. Identification of p53 peptides that bind to HLA-A2. *Hum Immunol* 39:79.
134. Stuber, G., G.H. Leder, W.T. Storkus, M.T. Lotze, S. Modrow, L. Szekeley, H. Wolf, E. Klein, K. Karre, and G. Klein. 1994. Identification of wild-type and mutant p53 peptides binding to HLA-A2 assessed by a peptide loading-deficient cell line assay and a novel major histocompatibility complex class I peptide binding assay. *Eur J Immunol* 24:765.
135. Ras, E., S.H. van der Burg, S.T. Zegveld, R.M. Brandt, P.J. Kuppen, R. Offringa, S.O. Warnarr, d. van, V, and C.J. Melief. 1997. Identification of potential HLA-A *0201 restricted CTL epitopes derived from the epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) and the carcinoembryonic antigen (CEA). *Hum Immunol* 53:81.
136. Kuttler, C., A.K. Nussbaum, T.P. Dick, H.G. Rammensee, H. Schild, and K.P. Haderler. 2000. An algorithm for the prediction of proteasomal cleavages. *J Mol Biol* 298:417.
137. Nussbaum, A.K., C. Kuttler, K.P. Haderler, H.G. Rammensee, and H. Schild. 2000. Pa-pRoC: A Prediction Algorithm for Proteasomla Cleavages available on the WWW. *Immunogenetics* in press:
138. Kawashima, I., S.J. Hudson, V. Tsai, S. Southwood, K. Takesako, E. Appella, A. Sette, and E. Celis. 1998. The multi-epitope approach for immunotherapy for cancer: identification of several CTL epitopes from various tumor-associated antigens expressed on solid epithelial tumors. *Hum Immunol* 59:1.
139. Fisk, B., J.M. Hudson, J. Kavanagh, J.T. Wharton, J.L. Murray, C.G. Ioannides, and A.P. Kudelka. 1997. Existent proliferative responses of peripheral blood mononuclear cells from healthy donors and ovarian cancer patients to HER-2 peptides. *Anticancer Res* 17:45.
140. Peiper, M., P.S. Goedegebuure, D.C. Linehan, E. Ganguly, C.C. Douville, and T.J. Eberlein. 1997. The HER2/neu-derived peptide p654-662 is a tumor-associated antigen in human pancreatic cancer recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol* 27:1115.
141. Lustgarten, J., M. Theobald, C. Labadie, D. LaFace, P. Peterson, M.L. Disis, M.A. Cheever, and L.A. Sherman. 1997. Identification of Her-2/Neu CTL epitopes using double transgenic mice expressing HLA-A2.1 and human CD.8. *Hum Immunol* 52:109.
142. Kono, K., Y. Rongcun, J. Charo, F. Ichihara, E. Celis, A. Sette, E. Appella, T. Sekikawa, Y. Matsumoto, and R. Kiessling. 1998. Identification of HER2/neu-derived peptide epitopes recognized by gastric cancer-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int J Cancer* 78:202.
143. Rongcun, Y., F. Salazar-Onfray, J. Charo, K.J. Malmberg, K. Evrin, H. Maes, K. Kono, C. Hising, M. Petersson, O. Larsson, L. Lan, E. Appella, A. Sette, E. Celis, and R. Kiessling. 1999. Identification of new HER2/neu-derived peptide epitopes that can elicit specific CTL against autologous and allogeneic carcinomas and melanomas. *J Immunol* 163:1037.
144. Morel, S., F. Levy, O. Bulet-Schiltz, F. Brasseur, M. Probst-Kepper, A.L. Peitrequin, B. Monsarrat, R. Van Velthoven, J.C. Cerottini, T. Boon, J.E. Gairin, and B.J. Van den Eynde. 2000. Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immuno-proteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity* 12:107.
145. Stevanović, S., S. Pomer, and H.-G. Rammensee. 1995. Oberflächenantigene im Nierenzellkarzinom - Präsentation von MHC I-gebundenen Selbstpeptiden. *Akt.Urol.* 26:45.
146. Rammensee, H.G. and M.J. Bevan. 1984. Evidence from in vitro studies that tolerance to self antigens is MHC-restricted. *Nature* 308:741.

147. Sadovnikova, E., L.A. Jopling, K.S. Soo, and H.J. Stauss. 1998. Generation of human tumor-reactive cytotoxic T cells against peptides presented by non-self HLA class I molecules. *Eur J Immunol* 28:193.
148. Obst, R., C. Münz, S. Stevanović, and H.G. Rammensee. 1998. Allo- and self-restricted cytotoxic T lymphocytes against a peptide library: evidence for a functionally diverse allo-restricted T cell repertoire. *Eur J Immunol* 28:2432.
149. Münz, C., R. Obst, W. Osen, S. Stevanović, and H.G. Rammensee. 1999. Alloreactivity as a source of high avidity peptide-specific human CTL. *J Immunol* 162:25.
150. Joly, E. and G.W. Butcher. 1998. Why are there two rat TAPs? *Immunol Today* 19:580.
151. Stevens, J., K.H. Wiesmuller, P. Walden, and E. Joly. 1998. Peptide length preferences for rat and mouse MHC class I molecules using random peptide libraries. *Eur J Immunol* 28:1272.
152. Endl, J., H. Otto, G. Jung, B. Dreibusch, F. Donie, P. Stahl, R. Elbracht, G. Schmitz, E. Meini, M. Hummel, A.G. Ziegler, R. Wank, and D.J. Schendel. 1997. Identification of naturally processed T cell epitopes from glutamic acid decarboxylase presented in the context of HLA-DR alleles by T lymphocytes of recent onset IDDM patients. *J Clin Invest* 99:2405.
153. Wicker, L.S., J.A. Todd, and L.B. Peterson. 1995. Genetic control of autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Annu Rev Immunol* 13:179.
154. Patel, S.D., A.P. Cope, M. Congia, T.T. Chen, E. Kim, L. Fugger, D. Wherrett, and G. Sonderstrup-McDevitt. 1997. Identification of immunodominant T cell epitopes of human glutamic acid decarboxylase 65 by using HLA-DR(alpha*0101,beta*0401) transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8082.
155. Peakman, M., E.J. Stevens, T. Lohmann, P. Narendran, J. Dromey, A. Alexander, A.J. Tomlinson, M. Trucco, J.C. Gorga, and R.M. Chicz. 1999. Naturally processed and presented epitopes of the islet cell autoantigen IA-2 eluted from HLA-DR4. *J Clin Invest* 104:1449.
156. Phelps, R.G., A.N. Turner, and A.J. Rees. 1996. Direct identification of naturally processed autoantigen-derived peptides bound to HLA-DR15. *J Biol Chem* 271:18549.
157. Clark, E.A., T.R. Golub, E.S. Lander, and R.O. Hynes. 2000. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature* 406:532.
158. Falk, K., O. Rötzschke, B. Grahovac, D. Schendel, S. Stevanović, V. Gnau, G. Jung, J.L. Strominger, and H.G. Rammensee. 1993. Allele-specific peptide ligand motifs of HLA-C molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:12005.
159. Boisgerault, F., I. Khalil, V. Tieng, F. Connan, T. Tabary, J.H. Cohen, J. Choppin, D. Charon, and A. Toubert. 1996. Definition of the HLA-A29 peptide ligand motif allows prediction of potential T-cell epitopes from the retinal soluble antigen, a candidate autoantigen in birdshot retinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3466.
160. Friede, T., V. Gnau, G. Jung, W. Keilholz, S. Stevanović, and H.G. Rammensee. 1996. Natural ligand motifs of closely related HLA-DR4 molecules predict features of rheumatoid arthritis associated peptides. *Biochim Biophys Acta* 1316:85.
161. Kinouchi, R., H. Kobayasi, K. Sato, S. Kimura, and M. Katagiri. 1994. Peptide motifs of HLA-DR4/DR53 (DRB1*0405/DRB4*0101) molecules. *Immunogenetics* 40:376.
162. Kubo, R.T., A. Sette, H.M. Grey, E. Appella, K. Sakaguchi, N.Z. Zhu, D. Arnott, N. Sherman, J. Shabanowitz, and H. Michel. 1994. Definition of specific peptide motifs for four major HLA-A alleles. *J Immunol* 152:3913.
163. van de Wal, Y., Y.M. Kooy, J.W. Drijfhout, R. Amons, G.K. Papadopoulos, and F. Koning. 1997. Unique peptide binding characteristics of the disease-associated DQ(alpha 1*0501, beta 1*0201) vs the non-disease-associated DQ(alpha 1*0201, beta 1*0202) molecule. *Immunogenetics* 46:484.

164. Vartdal, F., B.H. Johansen, T. Friede, C.J. Thorpe, S. Stevanović, J.E. Eriksen, K. Sletten, E. Thorsby, H.G. Rammensee, and L.M. Sollid. 1996. The peptide binding motif of the disease associated HLA-DQ (alpha 1* 0501, beta 1* 0201) molecule. *Eur J Immunol* 26:2764.
165. Craiu, A., T. Akopian, A. Goldberg, and K.L. Rock. 1997. Two distinct proteolytic processes in the generation of a major histocompatibility complex class I-presented peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:10850.
166. Lopez, D., B.C. Gil-Torregrosa, C. Bergmann, and M. Del Val. 2000. Sequential cleavage by metallopeptidases and proteasomes is involved in processing HIV-1 ENV epitope for endogenous MHC class I antigen presentation. *J Immunol* 164:5070.
167. Lopez, D. and M. Del Val. 1997. Selective involvement of proteasomes and cysteine proteases in MHC class I antigen presentation. *J Immunol* 159:5769.

8. Danksagung:

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee für sein großes Interesse, die ausgezeichnete Betreuung und die großzügige Förderung bedanken.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Günther Jung für die bereitwillige Übernahme der Berichterstattung bedanken.

Weiterhin danke ich Herrn PD Dr. Stefan Stevanović und Herrn Dr. Wieland Keilholz für die kompetente Einführung in die Protein- und Peptidanalytik und ihre ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. Steve Pascolo, Frau Dr. Cecile Gouttefangeas, Herrn Alexander Nussbaum, Herrn Lars Stoltze, Herrn Dr. Arnaud Moris, Herrn Florian Seeger und Herrn Dr. Tilman Dumrese möchte ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit danken.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Kooperationspartnern in Nah und Fern (Herr Prof. Dr. Becker, Herr Dr. Oliver Planz, Frau Dr. Petra Söhnlein, Frau Prof. Dr. Wiltrud Richter, Herrn Dr. Mahdi Adibzadeh) für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Abschließend möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung für ein angenehmes und kompetitives Arbeitsklima bedanken.

9. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Bisswanger, Bayer, Breyer-Pfaff, Bohley, Büsen, Eisele, Fröhlich, Furter*, Gauglitz, Gebhardt, Günzl, Hagenmaier, Hamprecht, Hanack, Hoffmann, Jung, Krug, Lindner, Martz*, Mayer, Mecke, Metzner, Nakel, Pommer, Pfaff, Pfeiffer, Probst, Rammensee, Reutter, Stegmann, Voelter, Wagner, Weser, Wiesinger, Zähler

* während meines Auslandsaufenthaltes an der University of Massachusetts, Amherst, USA

10. Tabellarischer Lebenslauf

von

Markus Schirle, geb. am 28.11.1970 in Heilbronn

1977-1981	Silcher-Grundschule, Heilbronn
1981-1990	Robert-Mayer-Gymnasium, Heilbronn
5/1990	Abitur
1990-1991	Zivildienst
10/1991-11/1997	Biochemiestudium an der Universität Tübingen
1/1992	Aufnahme in die „Studienstiftung des deutschen Volkes“
5/1994	Vordiplom
9/1994-9/1995	Studienaufenthalt an der University of Massachusetts, Amherst, USA
7/96-2/97	Diplomprüfungen
3/97-11/97	Diplomarbeit bei Prof. Dr. H.-G. Rammensee am Institut für Zellbiologie, Abt. Immunologie, Universität Tübingen: „Massenspektrometrische Untersuchungen tumorspezifischer HLA-A1-Peptide nach Epitopvorhersage“
1/98-1/01	Doktorarbeit bei Prof. Dr. H.-G. Rammensee am Institut für Zellbiologie, Abt. Immunologie, Universität Tübingen: „Identifizierung krankheitsassoziierter MHC-Liganden durch massenspektrometrische Verfahren“

im Selbstverlag herausgegeben von:

Markus Schirle

Nauklerstr 37

72074 Tübingen