

Optimierung massenspektrometrischer Methoden
zur Identifizierung von HLA-Liganden und ihre
Anwendung in der klinischen Forschung

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Oliver Drews
aus Reutlingen

Tübingen
2011

Tag der mündlichen Prüfung:

13.05.2011

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Stefan Stevanović

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1	~ Teil 1 ~ Der Haupthistokompatibilitätskomplex	1
1.1.1	Über MHC-Moleküle	1
1.1.2	MHC-Klasse-I-Moleküle	2
1.1.3	MHC-Klasse-I-Antigenprozessierung	4
1.1.4	MHC-Klasse-II-Moleküle	8
1.1.5	MHC-Klasse-II-Antigenprozessierung	9
1.1.6	Die Diversität des HLA-Ligandoms	11
1.1.7	Die T-Zell-Antwort	12
1.1.8	Analyse von MHC-Peptiden	16
1.1.9	Reverse Immunologie – Vorhersage von T-Zell-Epitopen	18
1.1.10	Mögliche Ansätze zur Analyse des MHC-Ligandoms	19
1.1.11	Tumoranalytik – Die Verknüpfung von Proteom und Ligandom	23
1.2	~ Teil 2 ~ Multiple Sklerose	27
1.2.1	Multiple Sklerose	27
1.2.2	Krankheitsursachen der Multiplen Sklerose	28
1.2.3	Genetische Faktoren	28
1.2.4	Nicht-genetische Faktoren	30
1.2.5	Infektiöse Wirkstoffe als Auslöser für Multiple Sklerose	31
1.2.6	Mechanismen zur Induktion von Multipler Sklerose über infektiöse Wirkstoffe	33
	1.2.6.1 Molekulare Mimikry	33
	1.2.6.2 <i>Bystander Activation</i>	35
1.2.7	Die Rolle der einzelnen Komponenten des Immunsystems	37
	1.2.7.1 CD4 ⁺ T-Zellen	37
	1.2.7.2 CD8 ⁺ T-Zellen	40
	1.2.7.3 B-Zellen und Antikörper	40
	1.2.7.4 NK-Zellen	41
1.2.8	Die Pathogenese der Multiplen Sklerose	42
1.3	Zielsetzung dieser Arbeit	46

2. Material und Methoden

2.1	Material	47
2.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	47
2.1.2	Geräte und Zubehör	48
2.1.3	Software	50
2.1.4	Puffer und Lösungen	50
2.1.5	Zelllinien und Patientenmaterial	52
2.2	Methoden	54
2.2.1	Zellkultur	54
2.2.1.1	Auftauen von Zellen	54
2.2.1.2	Kultivierung von Zellen	54
2.2.1.3	Bestimmung der Lebendzellzahl	54
2.2.1.4	Zellernte	55
2.2.2	Immunpräzipitation von MHC-Peptid-Komplexen und Säureextraktion von MHC-Liganden	55
2.2.2.1	Herstellung der Affinitätssäule	55
2.2.2.2	Herstellung des Zellysats aus Zellpellets	56
2.2.2.3	Herstellung des Zellysats aus Gewebeproben	57
2.2.2.4	Affinitätschromatographie	58
2.2.3	Western Blot	58
2.2.3.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	59
2.2.3.2	Western Blot	60
2.2.4	Quantifizierung und Sequenzanalyse von Peptiden und Proteinen durch Edman-Abbau	60
2.2.5	Peptidsynthese	61
2.2.6	Differentielle Isotopenmarkierung von Peptiden	61
2.2.6.1	Selektive Guanidierung der ϵ -Aminogruppe von Lysinresten in Peptiden	62
2.2.6.2	Nicotinylierung der α -Aminogruppe von Peptiden	62
2.2.7	Massenspektrometrie	63
2.2.7.1	Elektrospray-Ionisation	65
2.2.7.2	Q-TOF Massenspektrometer	67
2.2.7.3	Orbitrap Massenspektrometer	70

2.2.7.4 Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie-Kopplung	74
2.2.7.5 Interpretation von Peptid-Fragmentspektren	78
2.2.7.6 Peptididentifizierung über Eichpeptide	81

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1	~ Teil 1~ Optimierung zweier Massenspektrometer für Peptidanalytik und Etablierung einer standardisierten Messmethode für HLA-Liganden	83
3.1.1	Hintergrund und Überblick über den Versuch	84
3.1.2	Das Q-TOF Ultima – Verbesserungen gegenüber dem Q-TOF I	85
3.1.3	Optimierung der HPLC-MS-Kopplung am Q-TOF Ultima	89
3.1.4	Die LTQ Orbitrap XL	92
3.1.5	Optimierung der HPLC-MS-Kopplung an der LTQ Orbitrap XL	96
3.1.6	Überprüfung der HPLC-MS-Kopplung mit HLA-Liganden aus JY	99
3.1.7	Sequenzidentifizierung von JY-Liganden	101
3.1.8	Diskussion	105
3.2	~ Teil 2 ~ Analyse natürlich präsentierter Peptide auf MHC-Klasse-I und II aus dem zentralen Nervensystem Multipler Sklerose-Patienten	111
3.2.1	Hintergrund und Überblick über den Versuch	112
3.2.2	Patientenmaterial und HLA-Typisierung	112
3.2.3	Expression von MHC-Klasse-I	113
3.2.4	Massenspektrometrische Analyse	114
3.2.5	Datenbankauswertungen und Statistik	117
3.2.6	MHC-Liganden aus dem Myelin-Basischen Protein	124
3.2.7	Diskussion	125
3.3	~ Teil 3 ~ Massenspektrometrische Identifizierung von HLA-Liganden aus dem tumorassoziierten Antigen Survivin	131
3.3.1	Hintergrund und Überblick über den Versuch	132
3.3.2	Auswahl der HLA-Liganden	133
3.3.3	Suche nach HLA-Liganden aus Survivin in vorhandenen LC-MS/MS-Daten	134
3.3.4	Modifizierung der synthetischen Peptide	136
3.3.5	Analyse der Zelllinien	138

3.3.6	Analyse der Xenotransplantate	141
3.3.7	Diskussion	143
4.	Zusammenfassung	148
5.	Abkürzungsverzeichnis	149
6.	Referenzen	153
7.	Anhang	182
7.1	Identifizierte HLA-Liganden aus JY	182
7.2	HLA-Liganden aus den Proben der Multiple Sklerose-Patienten	197
8.	Publikationen	209
9.	Danksagung	210
10.	Lebenslauf	212

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Raumstruktur von MHC-Klasse-I	3
Abb. 1.2: MHC-Klasse-I-Molekül	4
Abb. 1.3: Antigenprozessierung	7
Abb. 1.4: Raumstruktur von MHC-Klasse-II	9
Abb. 1.5: Faktoren, die das MHC-Ligandom beeinflussen	12
Abb. 1.6: Molekulare Mimikry	34
Abb. 1.7: Immundominante Regionen in MBP	39
Abb. 1.8: Pathogenese der Multiplen Sklerose	43
Abb. 2.1: Ionenbildung bei Elektrospray-Ionisation	66
Abb. 2.2: Schematischer Aufbau des Q-TOFs	69
Abb. 2.3: Schematischer Aufbau der LTQ Orbitrap XL	71
Abb. 2.4: Schnittmodell eines Orbitrap Massenanalysators	72
Abb. 2.5: Peptidfragmentierung	79
Abb. 3.1: Auflösungsvermögen der Q-TOF-Massenspektrometer	86
Abb. 3.2: Auflösungsvermögen von 100 fmol GluFib am Q-TOF Ultima	87
Abb. 3.3 Einfluss der <i>RF lens 1</i> und der Temperatur auf die Signalintensität	88
Abb. 3.4: MCP-Gain-Test	89
Abb. 3.5: Zytochrom C-Lauf über die HPLC am Q-TOF Ultima	91
Abb. 3.6: Massengenauigkeit der Orbitrap	93
Abb. 3.7: Sensitivität der Orbitrap	95
Abb. 3.8: Setup 1: HPLC-Aufbau unter Verwendung von einem Ventil	96
Abb. 3.9: Setup 2: HPLC-Aufbau unter Verwendung von zwei Ventilen	98
Abb. 3.10: Anzahl sequenzierter Peptide bei der HPLC-Optimierung	101
Abb. 3.11: Verteilung der Peptidsequenzen vor manueller Überprüfung	102
Abb. 3.12: Verteilung der Peptidsequenzen nach manueller Überprüfung	103
Abb. 3.13 Vergleich der richtig identifizierten Peptide mit allen Sequenzvorschlägen	104
Abb. 3.14 Western Blot von Patient MS34	114
Abb. 3.15: Anzahl der identifizierten MHC-Liganden aus Multiple Sklerose-Patienten	115
Abb. 3.16: Vergleich zweier natürlicher Liganden mit synthetischen Peptiden	116

Abb. 3.17: Subzelluläre, funktionelle und Krankheits-assoziierte Kategorisierung der Quellproteine	118
Abb. 3.18: Schnittstelle der Asparagin-Endopeptidase in MBP	128
Abb. 3.19: Versuchsaufbau zur Identifizierung von HLA-Liganden aus Survivin	133
Abb. 3.20: Fragmentspektrum von ELTLGEFLKL aus HeLa-Zellen	136
Abb. 3.21: Detektion von ELTLGEFLKL	140
Abb. 3.22: Fragmentspektrenabgleich der Peptide aus K562-A3	142

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Zelllinien	52
Tab. 2.2: Klinische Daten der Multiple Sklerose-Patienten	53
Tab. 2.3: α -HLA-Antikörper für Immunpräzipitation	56
Tab. 2.4: Zusammensetzung des Polyacrylamidgels	59
Tab. 2.5: Einstellungen der Ionenfalle (Ion Trap) und des Orbitrap Massenanalysators (FTMS)	78
Tab. 2.6: Aminosäuremassen	80
Tab. 3.1: Zytochrom C	90
Tab. 3.2: Retentionszeiten und Peakbreiten der Zytochrom C-Peptide	92
Tab. 3.3: Zytochrom C-Lauf über die HPLC an der LTQ Orbitrap XL mit Setup 1	97
Tab. 3.4: Zytochrom C-Lauf über die HPLC an der LTQ Orbitrap XL mit Setup 2	99
Tab. 3.5: HLA-Typisierung der Patienten	113
Tab. 3.6 Multiple Sklerose-assoziierte Proteine	119 – 123
Tab. 3.7: MHC-Liganden aus MBP	124
Tab. 3.8: Peptidkandidaten für HLA-Liganden aus Survivin	134
Tab. 3.9: Datenbankabfrage	135
Tab. 3.10: Ergebnis der Modifizierung der Peptidmischung	137
Tab. 3.11: Ergebnis der Modifizierung der einzelnen Peptide	138
Tab. 3.12: Zelllinien-Analyse	139
Tab. 3.13: Xenotransplantat-Analyse	141
Tab. 7.1: HLA-Liganden aus JY	182 – 196
Tab. 7.2: Auflistung der identifizierten HLA-Liganden aus den Proben der Multiple Sklerose-Patienten	198 – 208

Kapitel 1

Einleitung

~ Teil 1 ~

Der Haupthistokompatibilitätskomplex

1.1.1 Über MHC-Moleküle

T-Zellen spielen bei der Abwehr und Eliminierung von Pathogenen im Körper eine wichtige Rolle. Um entscheiden zu können, welche Körperzelle gesund und welche Körperzelle krank oder entartet ist, gibt es spezielle membranständige Glykoproteine auf den Zelloberflächen, über die es den T-Zellen möglich ist, den Gesundheitszustand einer Zelle zu überwachen. Diese Proteine werden MHC-Moleküle (*major histocompatibility complex*) genannt und werden von einer gleichnamigen Gruppe von Genen kodiert, die beim Menschen auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 liegen. Die Aufgabe der MHC-Moleküle besteht darin, das Proteom einer Zelle in Form von Peptiden auf der Zelloberfläche zu präsentieren, so dass den T-Zellen auf diese Weise ein Blick in das Innere der Zellen gewährt wird. Erst diese Art der

Peptidpräsentation führt zu der T-Zell-Erkennung, welche die Unterscheidung zwischen Selbst- und Fremdanigenen sowie zwischen normalen und entarteten Zellen ermöglicht. Peptide, die auf diese Weise auf der Zelloberfläche präsentiert werden, werden MHC-Liganden genannt.

Bei den MHC-Molekülen unterscheidet man zwischen zwei verschiedenen Klassen, die für die Antigenpräsentation gegenüber zwei verschiedener T-Zell-Populationen zuständig sind. Die von allen kernhaltigen Körperzellen exprimierten MHC-Moleküle der Klasse I werden von den Rezeptoren der $CD8^+$ T-Zellen, auch zytotoxischen T-Lymphozyten (*cytotoxic T lymphocytes*, CTLs) genannt erkannt, die erkrankte oder entartete Zellen lysieren. Im Gegensatz dazu werden MHC-Klasse-II-Moleküle nur auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APCs) wie beispielsweise dendritischen Zellen (DCs), Makrophagen oder B-Zellen exprimiert und von $CD4^+$ T-Zellen erkannt.

Die beiden Klassen der MHC-Moleküle unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Struktur, Synthese, Funktion, Vorkommen und der Art des präsentierten Peptids voneinander. Da in dieser Doktorarbeit sowohl Analysen von MHC-Klasse-I präsentierten Peptiden, als auch von MHC-Klasse-II präsentierten Peptiden durchgeführt wurden, wird in den folgenden Abschnitten der strukturelle Aufbau sowie die Antigenprozessierung beider Molekülarten genauer beschrieben.

1.1.2 MHC-Klasse-I-Moleküle

MHC-Klasse-I-Moleküle bestehen aus einer schweren Kette mit ungefähr 43 kDa, die aus einer transmembranen und drei extrazellulären Domänen (α_1 - α_3) besteht, und aus dem leichten β_2 -Mikroglobulin (β_2M) mit 12 kDa Gewicht, das nicht kovalent an den schweren Teil gebunden ist. Nur die α_3 -Domäne durchspannt die Membran, die beiden Domänen α_1 und α_2 bilden zusammen eine Grube, in der die präsentierten Peptide gebunden werden. Die Ränder der Grube bestehen aus jeweils einer α -Helix, die von den beiden Domänen gebildet werden, der Boden aus einem antiparallelen β -Faltblatt¹ (**Abb. 1.1**).

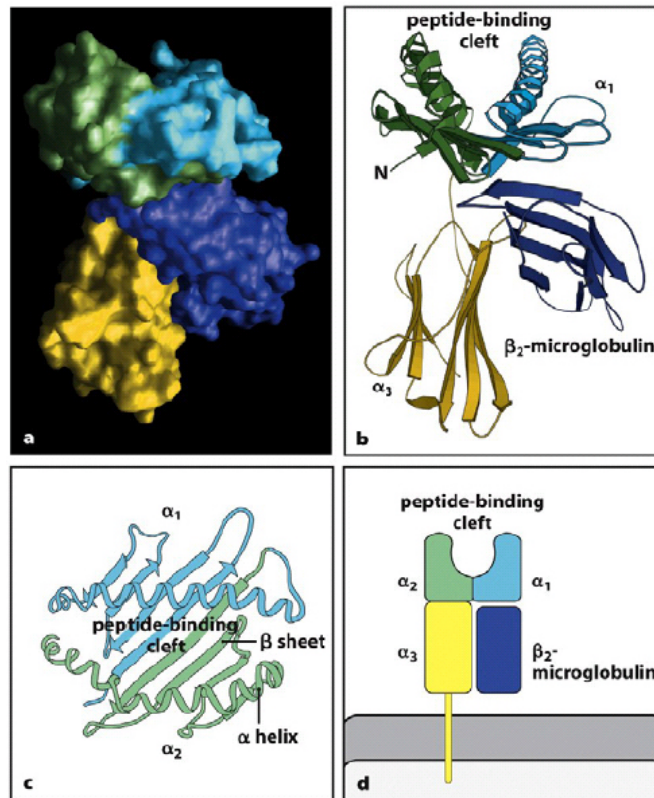


Abb. 1.1: Raumstruktur von MHC-Klasse-I. (a) Moleküloberfläche, (b) Bänderdiagramm, (c) Aufsicht auf die Peptidbindungsfurche und die zwei begrenzenden α -Helices, (d) schematische Darstellung des MHC-Moleküls und Verankerung in der Zellmembran. (Bild: © Garland Science, 2008)

Die auf MHC Klasse I präsentierten Peptide sind in der Regel acht bis zehn, in Ausnahmefällen auch bis zu 13 Aminosäuren lang und können im Gegensatz zu den auf MHC Klasse II präsentierten Peptiden nicht über die Enden der Grube hinausragen, da diese durch Wechselwirkungen zwischen konservierten Seitenketten des MHC-Moleküls und den Peptid-Termini verschlossen sind. Diese Wechselwirkungen haben den größten Einfluss auf die Stabilität des MHC-Peptid-Komplexes². Die ideale Länge von Peptiden, die in der Bindungsfurche liegen, ist neun Aminosäuren. Längere Peptide können nur dann präsentiert werden, indem sie sich nach außen wölben oder das Rückgrat abgeknickt wird (**Abb. 1.2**). Die Bindung der Peptide in die Grube findet über Interaktionen der Peptidseitenketten mit mehreren Taschen am Boden der Furche statt³. Diese Taschen nehmen die als Ankeramino-säuren bezeichneten Aminosäuren des gebundenen Peptids auf, die zu der Struktur oder dem Ladungszustand der entsprechenden Tasche komplementär sein müssen. Dabei unterscheidet man zwischen den Hauptankern eines Peptids, welche meist die

Aminosäure an Position zwei und die C-terminale Aminosäure sind, und den selteneren Hilfsankern⁴⁻⁶.

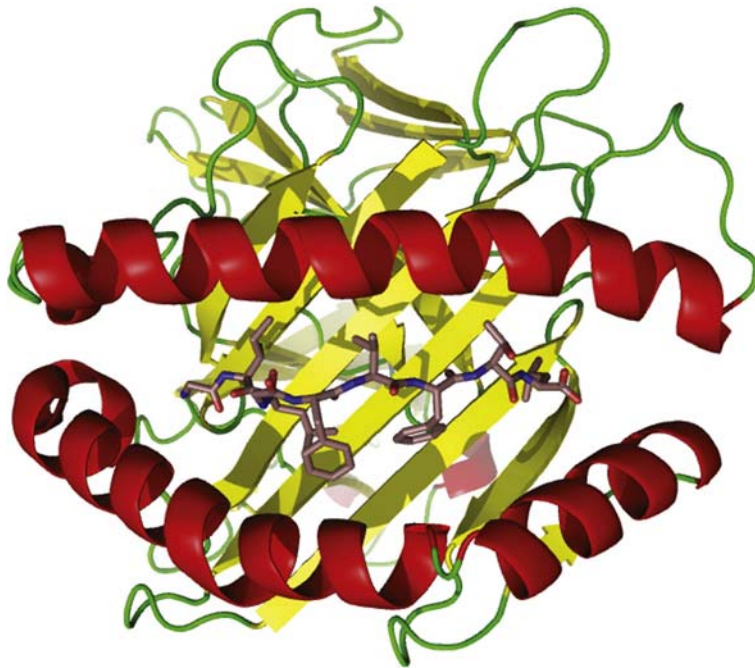


Abb. 1.2: MHC-Klasse-I-Molekül. Darstellung eines MHC-Klasse-I Moleküls in Bänderform mit gebundenem Peptid in Stäbchendarstellung. Die Länge des Peptids wird durch die beiden α -Helices an den Enden der Furche begrenzt. (Bild: www.sciencedirect.com)

Über die Ankeraminosäuren ist es möglich, ein sogenanntes Peptidmotiv aufzustellen, wobei das Augenmerk auf den Hauptankern des Peptids liegt. Da für die Wechselwirkungen zwischen Peptid und Bindungsfurche insgesamt 35 Reste innerhalb der Grube verantwortlich sind, von denen 20 polymorph sind, ist das Peptidmotiv für jedes MHC-Molekül individuell, da verschiedene MHC-Moleküle aufgrund von unterschiedlicher Aminosäurezusammensetzung der Taschen auch unterschiedliche Peptidmotive aufweisen⁷.

1.1.3 MHC-Klasse-I Antigenprozessierung

Als Antigenprozessierung wird der Vorgang bezeichnet, in dem die Peptide, die später als MHC-Peptid-Komplex auf der Zelloberfläche präsentiert werden, generiert und auf die MHC-Moleküle geladen werden. Da dieser Prozess aus vielen einzelnen Schritten mit entsprechend

vielen Spezifitäten abläuft, werden nur wenige Fragmente eines Antigens auf den MHC-Molekülen präsentiert⁸.

Die Komponenten des MHC-Klasse-I-Moleküls werden im Zytosol synthetisiert und cotranslational in das Lumen des endoplasmatischen Reticulums (ER) transportiert. Dort findet der Zusammenbau der MHC-Peptid-Komplexe statt⁹: Neu synthetisierte α -Ketten binden im ER an das Chaperon-Protein Calnexin und wird von diesem partiell gefaltet, bis das β_2M mit der α -Kette ein Heterodimer bildet, das von dem Calnexin dissoziiert. Das Heterodimer bindet an einen Proteinkomplex bestehend aus Calreticulin, Tapasin und Erp57, der auch als Peptidbeladungskomplex (*peptide-loading complex, PLC*) bezeichnet wird. Dabei stellt das Tapasin die Verbindung zu den Peptidtransportern TAP1 und TAP2 (*transporters associated with antigen processing*) her, über die der instabile MHC-Komplex mit einem Peptid beladen wird.

Die auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentierten Peptide werden im Normalfall im Zytosol durch das Proteasom generiert, welches ein aus mehreren Untereinheiten bestehender Protease-Komplex ist. Zu seinen Aufgaben gehört der Abbau von ubiquitinierten Proteinen am Ende ihrer Lebensspanne und der während der Translation entstehenden DRiPs (*defective ribosomal products*)¹⁰.

Ungefähr 70% der von den Ribosomen neu synthetisierten Proteine sind langlebig und weisen Halbwertszeiten von durchschnittlich 50 Stunden auf, bevor sie vom Proteasom abgebaut werden. Die restlichen 30% der neuen Proteine setzen sich aus kurzlebigen Proteinen (*short-lived proteins, SLiPs*) und DRiPs zusammen, die durch Fehler bei der Faltung, der Transkription oder Translation entstehen und werden nach etwa 10 min abgebaut. Die meisten Peptide, die später auf MHC Klasse I präsentiert werden stammen aus DRiPs¹¹ und machen je nach Zelltyp 20% bis 70% aller Translationsprodukte der Zelle aus¹². DRiPs stellen auch die einzige Möglichkeit dar, mit der Membranproteine oder für die Sekretion bestimmte Proteine, die aus der Zelle freigesetzt oder im endosomal-lysosomalen Kompartiment abgebaut werden, auf MHC-Klasse-I geladen werden können. Des Weiteren gibt es die Hypothese, dass sogenannte Immunribosomen, eine kleine Untereinheit der Ribosomen darauf spezialisiert sind, Peptide aus Translationsprodukten direkt dem TAP-Komplex zuzuführen¹³.

Das 26S-Proteasom besteht aus einer 20S- und zwei 19S-Untereinheiten, die ihrerseits wiederum aus mehreren Proteinen zusammengesetzt sind. Die 20S-Untereinheit besteht aus vier Ringen, die zu einem Zylinder gestapelt sind. Jeder Ring setzt sich aus sieben Untereinheiten des α - beziehungsweise des β -Typs ($\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$) zusammen. Durch diesen Aufbau entsteht ein zentraler Hohlraum, der von proteolytisch aktiven Zentren ausgekleidet

ist. Die Untereinheit β_1 schneidet abzubauen Proteine C-terminal von sauren Resten, die Untereinheit β_2 spaltet ähnlich wie Trypsin C-terminal von basischen Aminosäuren. Untereinheit β_5 besitzt chymotrypsinartige Aktivität und spaltet somit nach hydrophoben Resten. Die beiden 19S-Untereinheiten sitzen an den Enden des 20S-Komplexes und regulieren den Zugang zu selbigem, da sie zum Abbau markierte Proteine erkennen und entfalten. Hierfür werden zwei Proteine benötigt: die Rpn- und die Rpt-Proteine: Rpn erkennt Ubiquitinmoleküle, die Proteine für den Abbau markieren. Rpt hingegen hydrolysiert Adenosintriphosphat (ATP), damit die für die Entfaltung der Proteine benötigte Energie gewonnen werden kann.

Interferone (IFNs) wie beispielsweise das als Reaktion auf eine Virusinfektion gebildete IFN γ induzieren einen Austausch dieser drei konstitutiv exprimierten Untereinheiten gegen die drei Untereinheiten MECL1, LMP2 und LMP7, was zur Entstehung des Immunproteasoms führt¹⁴. Des Weiteren wird der PA28-(11S)-Aktivator synthetisiert, der durch Zusammenlagerung mit dem Immunproteasom die Peptidproduktion erhöht. Außerdem verändern sich Längenverteilung der Peptide sowie die Schnittstellenspezifität des Proteasoms¹⁵⁻¹⁷. Auf diese Weise werden vermehrt virale MHC-Liganden generiert und präsentiert, da die für die virale Replikation benötigten Proteine im Zytosol synthetisiert werden¹⁸. Die Längenverteilung der generierten Peptide entspricht einer Großraumverteilung mit einem Maximum bei einer Länge von acht bis zehn Aminosäuren¹⁹. Die dadurch entstandenen Peptide besitzen bereits den für die Beladung auf das MHC-Molekül benötigten C-Terminus, sind N-terminal jedoch noch mit zusätzlichen Resten versehen^{20,21}, welche durch Proteasen im Zytosol von den Vorläuferpeptiden abgespaltet werden^{22,23}, falls sie nicht durch die Bindung an das Chaperonin TRiC (*TCP-1 ring complex*) davor geschützt werden²⁴.

Eine weitere wichtige Quelle für MHC-Liganden sind Peptide, die über die sogenannte *cross presentation* auf dendritischen Zellen präsentiert werden. DCs haben die Fähigkeit, exogene Antigene durch Phagozytose aufzunehmen und zytotoxischen T-Zellen auf MHC-Peptid-Komplexen anzubieten^{25,26}. Welche genauen Mechanismen diesem Vorgang zugrunde liegen ist nicht bekannt, allerdings spielen die Phagosomen als eigenständig zur Antigenpräsentation fähige Organellen eine wichtige Rolle^{27,28}.

Über den TAP1 / TAP2 Transporterkomplex werden die generierten Peptide in das ER transportiert. Der TAP ist ein ATP-abhängiger Transporter, der aus zwei Untereinheiten besteht und in der Membran des ER sitzt. Er weist eine gewisse Spezifität für Peptide mit einem basischen oder hydrophoben C-Terminus und acht bis 16 Aminosäuren Länge auf, die an MHC-Klasse-I Moleküle binden können²⁹. Im ER werden die Peptide weiter durch

Aminopeptidasen wie beispielsweise ERAAP (*ER aminopeptidase associated with antigen processing*) gekürzt³⁰, wobei das MHC-Molekül als Schablone für dieses sogenannte ‚Trimming‘ verwendet wird³¹. ERAAP wird wie die beiden TAP-Untereinheiten durch IFN γ induziert und besitzt eine breite Schnittspezifität, wobei sie keine Aminosäuren vor einem Prolin abspaltet, weshalb man häufig MHC-Bindungsmotive wie beispielsweise HLA-B*07 findet, die ein Prolin an zweiter Position bevorzugen. Ein weiteres beim Trimming im ER zuständiges Protein ist die Carboxypeptidase ACE (*angiotensin converting enzyme*)³². Über den PLC wird das Peptid schließlich auf das teilweise gefaltete MHC-Molekül geladen. Erst durch das Peptid wird das MHC-Molekül stabilisiert, so dass es vollständig zusammengebaut aus dem PLC entlassen werden und über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert werden kann, um dort den zytotoxischen T-Zellen präsentiert zu werden (**Abb. 1.3**).

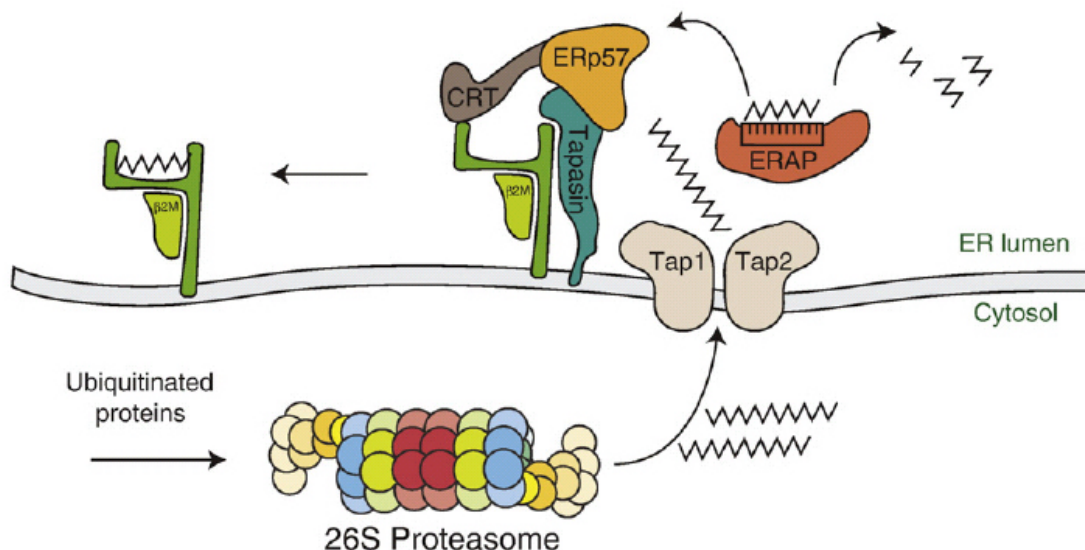


Abb. 1.3: Antigenprozessierung. Vereinfachte Darstellung der Antigenprozessierung und der Peptidbeladung: Ubiquitinierte Proteine werden vom Proteasom zerschnitten und die entstandenen Peptide werden über den TAP-Komplex ins ER-Lumen transportiert, wo ein weiteres Trimming durch ERAAP stattfindet. Die Peptide werden über den Ladekomplex auf das MHC-Molekül geladen und der fertige MHC-Peptid-Komplex Richtung Zelloberfläche transportiert. (Bild: Hoppes et al., 2010³³)

Die Antigenprozessierung ist ein äußerst ineffizienter Vorgang³⁴, da lediglich ungefähr 40% der vom Proteasom hergestellten Peptide die richtige Länge aufweisen. Die restlichen 60%

sind zu kurz als dass sie auf MHC-Molekülen präsentiert werden können²⁰. Erschwerend kommt hinzu, dass der zytosolische Peptid-Pool stetig durch Proteasen dezimiert wird, die mit dem TAP konkurrieren. Lediglich etwa 1% der zytosolischen Peptide wird vom TAP in das ER transferiert³⁵. Auch von den in das ER transportierten Peptide können vermutlich nur 3% an ein bestimmtes MHC-Molekül binden³⁶. Sollte das Peptid nicht in die Bindungsfurche passen, wird es wieder zurück in das Zytosol transportiert, wo es wiederum dem normalen Selektionsprozess unterliegt³⁷.

In vitro-Experimente an Mauszellen zeigten, dass 40 Proteinmoleküle von Ovalbumin abgebaut werden müssen, um ein einziges zytosolisches H2-K^b-bindendes SIINFEKL-Peptid (OVA₂₅₇₋₂₆₄) zu erhalten¹². Da nur eines von 50 Peptiden die Zelloberfläche zusammen mit dem K^b-Molekül erreicht, müssen folglich 2000 Proteinmoleküle von Ovalbumin abgebaut werden, um einen MHC-Peptid-Komplex zu generieren. Weitere Studien bestätigten Prozessierungseffizienzen in dieser Größenordnung^{20,38,39}. Die meisten Antigene werden noch weniger effizient prozessiert, so dass es vermutlich 10000 Proteinmoleküle benötigt, um einen einzigen MHC-Peptid-Komplex zu generieren und diesen an der Zelloberfläche zu präsentieren.

1.1.4 MHC-Klasse-II-Moleküle

MHC-Klasse-II-Moleküle werden hauptsächlich auf speziellen antigenpräsentierenden Zellen wie dendritischen Zellen, B-Zellen oder Makrophagen exprimiert. Es ist jedoch auch bekannt, dass sie auf Tumoren vorkommen können⁴⁰. Sie bestehen aus einer α -Kette, die 34 kDa wiegt und einer etwas leichteren β -Kette mit 29 kDa. Beide Ketten sind nicht kovalent miteinander verbunden, durchspannen mit ihrer α_2 - bzw. β_2 -Domäne die Zellmembran und besitzen jeweils zwei extrazelluläre Immunglobulindomänen.

Strukturell betrachtet sehen Klasse I- und Klasse II-Moleküle sehr ähnlich aus: Auch auf MHC-Klasse-II-Molekülen werden Peptide in einer Bindungsfurche bestehend aus einem β -Faltblatt präsentiert, die von den beiden membrandistalen Domänen α_1 und β_1 gebildet wird und die durch zwei α -Helices begrenzt wird (**Abb. 1.4**). Im Gegensatz zu Klasse I-Molekülen sind die Enden des peptidbindenden Spaltes bei MHC-Klasse-II weiter geöffnet, so dass auch Peptide mit bis zu 20 Aminosäuren präsentiert werden können, da diese über die Enden der Grube hinausragen können^{41,42}. Deshalb kommt es häufig vor, dass Peptide, die auf MHC-Klasse-II präsentiert werden verschiedene Längenvarianten aufweisen.

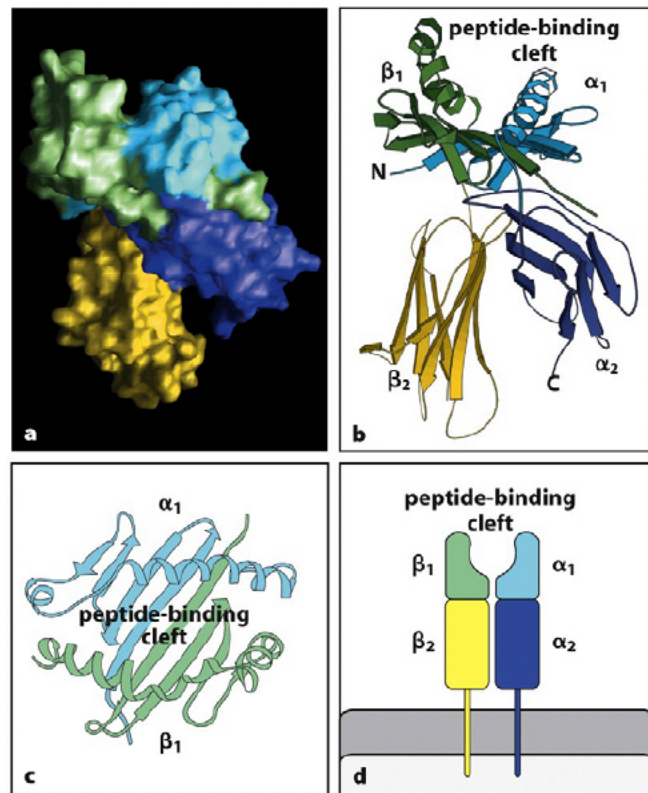


Abb. 1.4: Raumstruktur von MHC-Klasse-II. (a) Moleküloberfläche, (b) Bänderdiagramm, (c) Aufsicht auf die Peptidbindungsfurche, (d) schematische Darstellung des MHC-Moleküls und Verankerung in der Zellmembran. (Bild: © Garland Science, 2008)

1.1.5 MHC-Klasse-II Antigenprozessierung

Peptide, die auf MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden stammen aus dem endosomalen Verdau von pino- oder phagozytierten Proteinen und Organismen. Dabei werden die auf diese Weise aufgenommenen Proteine im Phagolysosom von sauren Proteasen und Cathepsinen zu Peptiden verdaut, die auf MHC-Klasse-II geladen und an die Zelloberfläche transportiert werden^{43,44}.

Im Gegensatz zum Klasse I-Prozessierungspfad findet die Prozessierung der exogenen Antigene im gleichen Kompartiment statt, in dem auch die Peptidbeladung stattfindet. Die α - und β -Kette der Klasse II-Moleküle werden direkt im ER synthetisiert und bilden dort zusammen mit der invarianten Kette (Ii, *invariant chain*) einen trimeren Komplex. Ii ist ein Chaperon, welches die Peptidbindungsfurche blockiert und den Komplex durch den Golgi-Apparat in das endosomal/lysosomale Kompartiment leitet. Nach dem Transport in ein saures

Vesikel wird II durch verschiedene Proteasen wie beispielsweise Cathepsin S in mehreren Schritten geschnitten, bis nur noch das sogenannte CLIP-Fragment (*class II invariant chain-associated peptide*) in der Bindungsgrube übrig bleibt⁴⁵⁻⁴⁷. Über HLA-DM wird das CLIP-Fragment dann durch Peptide aus aufgenommenen Proteinen ausgetauscht. Der dabei entstandene MHC-Peptid-Komplex wird anschließend an die Zelloberfläche transportiert, wo er von CD4⁺-T-Zellen erkannt wird⁴⁸. Neben den Peptiden, die aus durch Phagozytose aufgenommenen Proteinen hergestellt werden können auch zytosolische Peptide auf MHC-Klasse-II präsentiert werden⁴⁹⁻⁵¹. Bei dieser Art Prozessierung ist Autophagie, also der Abbau intrazellulärer Komponenten in Lysosomen involviert⁵².

Auf MHC-Klasse-II-Molekülen präsentierte Peptide werden über lysosomale Proteasen sowie die Asparagin-Endopeptidase (AEP) generiert^{43,45}. Makrophagen besitzen einen hohen Grad an Proteasen, weshalb sie in der Lage sind, aufgenommene Proteine schnell zu verdauen und zu präsentieren. B-Zellen und DCs haben im Gegensatz dazu nur relativ wenig lysosomale Proteasen, was dazu führt, dass der Abbau von Proteinen zwar länger dauert, diese dann aber auch über einen längeren Zeitraum präsentiert werden können⁵³. Der Abbau findet dabei in einem geordneten Ablauf statt, indem das Protein zuerst mit einigen initialen Schnitten für andere Endo- und Exoproteasen zugänglich gemacht wird⁵⁴. Dabei werden Disulfidbrücken durch die Gamma-Interferon induzierbare lysosomale Thiolreduktase (*gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase*, GILT) zerstört, was den Peptiden Zugang zur proteolytischen Prozessierung ermöglicht⁵⁵, wobei nicht genau bekannt ist, wann genau die Beladung der MHC-Klasse-II-Moleküle stattfindet.

Die meisten Peptide, die auf MHC-Klasse-II präsentiert werden sind ungefähr 12 – 20 Aminosäuren lang und besitzen einen zentralen Bindungskern, der aus neun Aminosäuren besteht. Im Falle von Peptiden, die auf HLA-DR präsentiert werden spielen aromatische und aliphatische Seitenketten in der Nähe des N-Terminus eine essentielle Rolle bei der Interaktion mit einer hydrophoben Bindungstasche auf HLA-DR-Molekülen. Neben dem zentralen Bindungskern werden als Hilfsanker saure Reste am N-Terminus, basische Reste am C-Terminus sowie N-terminale Proline als Prozessierungsmotiv bevorzugt, damit die Immunogenität der T-Zell-Epitope erhöht werden kann⁵⁶. Ähnlich wie beim MHC-Klasse-I-Prozessierungsweg fungiert auch hier ein Prolin an zweiter Position als Stoppsignal für das N-terminale Trimming⁵⁷.

1.1.6 Die Diversität des HLA-Ligandoms

Auf dem menschlichen Genom gibt es innerhalb des MHC drei verschiedene Loci, die für die MHC-Klasse-I-Moleküle codieren und als HLA-A, HLA-B und HLA-C bezeichnet werden. Da die parentalen Allele dieser Loci codominant exprimiert werden, kann jedes Individuum bis zu sechs verschiedene Klasse-I-Allele, jeweils zwei HLA-A, HLA-B und HLA-C, haben. Zusätzlich zu dieser Polygenie gibt es bei HLA-Molekülen außerdem einen ausgeprägten Polymorphismus, der die Diversität weiter erhöht. Derzeit sind für alle MHC-Klasse-I-Moleküle 4268 Allele bekannt, welche die Expression von 3238 verschiedenen Proteinen ermöglichen.

Die Gene, die im Menschen für MHC-Klasse-II-Moleküle codieren werden als HLA-DR, HLA-DP und HLA-DQ bezeichnet. Für diese sind insgesamt 1241 Allele bekannt, über die 962 verschiedene Proteine exprimiert werden können. Auch hier kann ein Mensch wieder bis zu sechs verschiedene Klasse-II-Allele besitzen (Quelle: <http://www.anthonynolan.org/HIG/>; Release: 3.2.0; Abfrage: November 2010).

Der Großteil der polymorphen Aminosäuren befindet sich in den Bindungstaschen der Peptidbindungsgrube. Aufgrund ihrer Bedeutung für die Wechselwirkungen mit dem gebundenen Peptid sind diese für die vielfältigen Peptidbindungsspezifitäten der unterschiedlichen HLA-Allele verantwortlich. Durch die Aminosäurezusammensetzungen einer Bindungstasche wird die Stereochemie und die Polarität geregelt und somit bestimmt, welche Seitenketten eines Peptids in die Tasche hineinragen können.

Die Komplexität des HLA-Ligandoms entsteht vor allem durch Polygenie und Polymorphismus. Es wird angenommen, dass mehr als 10^5 HLA-Moleküle auf der Zelloberfläche exprimiert werden und die Anzahl der identischen präsentierten Peptide zwischen einigen wenigen und bis zu 10000 Kopien pro Zelle variieren kann³⁶. Die Gesamtheit aller Peptide, die über MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche präsentiert werden, wird als das MHC-Ligandom bezeichnet. Die Peptide können potentiell aus jedem in der Zelle vorhandenem Protein stammen, wodurch das Proteom, also die Gesamtheit aller Proteine in einer Zelle, für das Immunsystem sichtbar gemacht wird⁵⁸. Verbunden wird das Proteom über das Transkriptom^{59,60} mit dem Genom⁶¹. Das Ligandom wird durch verschiedenste Faktoren wie beispielsweise den Zelltyp oder die Gewebeart, Infektion oder Transformation der Zelle oder einfach den aktuellen Zustand der Zelle, der von Nährstoffsituation oder äußeren Stressfaktoren abhängt, beeinflusst (**Abb. 1.5**)⁶²⁻⁶⁴.

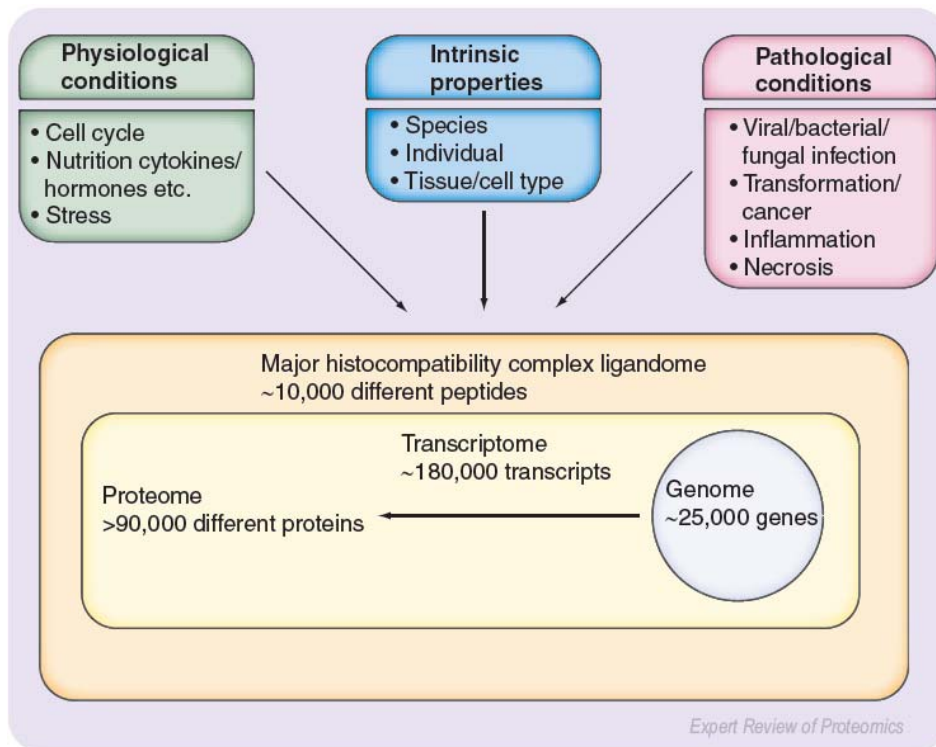


Abb. 1.5: Faktoren, die das MHC-Ligandom beeinflussen. Das MHC-Ligandom kann durch verschiedene physiologische, intrinsische sowie pathologische Faktoren beeinflusst werden, was zu Veränderungen der präsentierten Peptide führt. Auf einer Zelle werden ungefähr 10000 verschiedene Peptide in unterschiedlichen Mengen präsentiert (Bild: Hillen und Stevanović, 2006⁶⁵)

1.1.7 Die T-Zell-Antwort

Durch die Präsentation von Peptiden auf MHC-Molekülen an der Zelloberfläche wird es den T-Zellen ermöglicht, einen Blick in das Innere der Zelle und auf den Zustand des Proteoms zu werfen⁶⁶. Dies geschieht, indem die T-Zellen die MHC-Peptid-Komplexe mit Hilfe ihrer T-Zell-Rezeptoren (*T-cell receptor*, TCR) abtasten, was zu einer Signalkaskade im Inneren der T-Zelle führt.

Zusätzlich zu ihrem T-Zell-Rezeptor exprimieren die meisten reifen T-Zellen auf ihrer Oberfläche zusätzlich die Corezeptoren CD4 beziehungsweise CD8, die an konservierte Bereiche der MHC-Moleküle binden. Dabei exprimieren T-Helferzellen den CD4-Korezeptor, der ausschließlich MHC-Klasse-II-Moleküle erkennt, wohingegen die zytotoxischen T-Zellen den CD8-Korezeptor zur Erkennung von MHC-Klasse-I besitzen⁶⁷. Da die jeweiligen Corezeptoren sowohl an den TCR als auch an das jeweilige MHC-Molekül binden, wird die

Bindungsstärke des TCRs an den MHC/Peptid-Komplex um ein vielfaches erhöht. Dabei ist die Bindung des Corezeptors an das MHC-Molekül vom präsentierten Peptid unabhängig.

Der CD8-Korezeptor ist ein aus einer α - und einer β -Kette bestehendes Heterodimer, welches jedoch auch in einer α - α -heterodimeren Form auftreten kann⁶⁸. Jede Kette besteht aus einer Immunglobulin-domäne, die über eine Polypeptidkette mit der Transmembrandomäne verbunden ist. Die zytosolische Domäne der α -Kette interagiert mit der Lck-Kinase, die Bindung an das MHC-Klasse-I-Molekül findet über die α -Kette des Corezeptors an die α_3 -Domäne von MHC-I statt⁶⁹.

Im Gegensatz zu CD8 ist der CD4-Korezeptor ein Monomer, das aus vier Domänen (D1-D4) aufgebaut ist. Die beiden dicht gepackten membrandistalen Domänen D1 und D2 sind über ein kurzes, flexibles Verbindungsstück mit den ebenfalls dicht gepackten, membranständigen Domänen D3 und D4 verknüpft. Die Interaktion mit der Lck-Kinase findet über die zytosolische Domäne statt, die D1-Domäne bindet an die β_2 -Domäne des MHC-II-Moleküls. Erkennt eine T-Zelle nun ein MHC-Molekül, das heißt bindet der TCR an dieses, werden in der T-Zelle die Transkriptionsfaktoren für NF- κ B (*nuclear factor κ B*), NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) und AP-1 (*activator protein 1*) aktiviert und die Polarisierung sowie das Migrationsverhalten der Zelle beeinflusst.

Naive T-Zellen, die noch keinen Kontakt mit einem Antigen hatten rezirkulieren zwischen Lymphe und Blut und patrouillieren auf diese Weise durch die peripheren lymphatischen Organe auf der Suche nach Antigenen⁷⁰. Dort treffen sie auf professionelle APCs und durchmustern die von ihnen präsentierten Peptide⁷¹. Diese Vorgehensweise sichert nicht nur das Überleben der naiven T-Zelle, sondern ist auch für die rechtzeitige Immunantwort im Falle einer Infektion unerlässlich. Die Aktivierung der T-Zelle kann nur über zwei gleichzeitig vermittelte Signale stattfinden: Zum einen wird natürlich die Bindung des TCR an das MHC-Molekül benötigt, zum anderen muss zusätzlich dazu noch ein Signal von einem costimulatorischen Molekül, das nur von aktivierten professionellen APCs geliefert werden kann, vermittelt werden. Somit kann die Aktivierung einer naiven CD8⁺ T-Zelle zur Effektorzelle ausschließlich durch Makrophagen oder DCs stattfinden. Dabei spielt die Expression des CC-Chemokinrezeptors 7 (CCR7) eine entscheidende Rolle: Die beiden CCR7-Liganden werden zusammen mit den Chemokinen CCL19 und CCL21 von Stromazellen in den T-Zell-Zonen der Lymphknoten sowie vom HEV-Endothel sezerniert^{72,73}. Aufgrund der Expression von CCR7 auf naiven T-Zellen⁷⁴ und APCs⁷⁵ kommt

es zu einer Colokalisation von T-Zellen und APCs in den Lymphknoten und ermöglicht somit eine Interaktion der beiden Zelltypen⁷⁶.

Präsentiert eine APC ein für eine T-Zelle spezifisches Antigen, kommt es zur Ausbildung eines stabilen TCR-MHC-Komplexes, was in der Bildung einer sogenannten immunologischen Synapse resultiert⁷⁷. Im Zentrum dieser Synapse findet eine Ansammlung des TCR-Rezeptors, des Corezeptors und des CD28-Moleküls statt; um das Zentrum herum kommt es zu einer Akkumulation von LFA-1⁷⁸⁻⁸⁰. Um die vollständige Aktivierung der T-Zelle zu induzieren reichen bereits ungefähr zehn spezifische MHC-Antigen-Komplexe aus⁸¹. Andere Experimente zeigen, dass sogar schon ein einziger Komplex dafür ausreichen kann⁸². Jedoch ist nicht bekannt, wie lange diese Interaktion vonstatten gehen muss, um zu einer vollständigen Aktivierung zu führen^{83,84}.

Peptide, die auf MHC-Molekülen präsentiert werden, können entweder ‚Selbst-Peptide‘, das heißt aus körpereigenen Proteinen stammend, oder ‚Fremd-Peptide‘, die aus beispielsweise bakteriellen oder viralen Proteinen generiert wurden, sein. Auf die Erkennung von Fremd-Antigenen reagieren die T-Zellen mit der Freisetzung von zytotoxischen Substanzen wie Perforin oder Granzym, um die erkrankten Zellen zu zerstören. Das Perforin polymerisiert in der Zellmembran der Zielzelle und bildet Löcher, durch welche die Granzyme in das Zellinnere gelangen können, um dort Apoptose auszulösen. Alternativ kann die Apoptose durch die Wechselwirkung des Fas-Liganden auf der T-Zelle mit Fas auf der Zielzelle induziert werden. Im Gegensatz dazu dürfen Selbst-Peptide nicht erkannt werden, andernfalls liegt eine Autoimmunreaktion vor. Um dieser vorzubeugen, durchlaufen die T-Zellen im Thymus eine negative Selektion, während der diejenigen T-Zellen, die MHC-Selbst-Peptid-Komplexe erkennen aus dem T-Zell-Repertoire eliminiert werden. Trotz der ektopischen oder promiskuitiven Expression von gewebespezifischen Proteinen im Thymus⁸⁵⁻⁸⁷ können den T-Zellen nicht alle körpereigenen Peptide zu Selektionszwecken vorgesetzt werden. Aus diesem Grund können autoreaktive T-Zellen auch in der Peripherie durch Anergie stillgelegt werden, sobald sie MHC-Peptid-Komplexe auf anderen Zellen als auf aktivierten, professionellen APCs erkennen und daher keine costimulatorischen Signale erhalten.

Genau diese Toleranz der T-Zellen gegenüber körpereigenen Peptiden wird im Falle einer Tumorerkrankung zum Problem, da auf tumorösen Zellen eben solche präsentiert werden und die Zellen somit nicht als entartet erkannt werden. Tumorasoziierte T-Zell-Epitope können aus unterschiedlichen Arten von Tumorantigenen stammen⁸⁸. Dabei unterscheidet man zwischen tumorspezifischen Antigenen, die ausschließlich im Tumor zu finden sind und tumorassozierten Antigenen, die auch auf normalem Gewebe vorkommen.

Zu den tumorspezifischen Antigenen gehören beispielsweise *cancer-testis*-Antigene, wie MAGE-A1 oder NY-ESO-1, die normalerweise nur in Keimzellen exprimiert werden, oder oncovirale Proteine wie das Protein E7 aus den humanen Papillomaviren HPV16 und HPV18. Auch mutierte Proteine, die durch Punktmutation, Leserastermutation, Translokation, alternatives mRNA-Spleißen, Ablesen alternativer offener Leserahmen, Translation von Introns, Proteinspleißen oder ähnlichem entstanden sind, gelten als tumorspezifisch.

Tumorassoziierte Antigene sind im Vergleich zum korrespondierenden normalen Gewebe im Tumorgewebe überexprimiert. Beispiele hierfür wären MUC1, CEA oder Survivin. Differenzierungsantigene, die gewebsspezifisch auch in Normalgewebe exprimiert werden, wie die Tyrosinase und gp100 in Melanozyten oder PSA in der Prostata werden als tumorassoziiert bezeichnet.

Für eine T-zell-basierte Therapie bedeutet das, dass diese natürlich vorhandene Toleranz gegenüber Tumorantigenen zunächst gebrochen werden muss, bevor eine T-Zell-Antwort erfolgreich induziert werden kann. Dies betrifft insbesondere die tumorassoziierten Antigene, die auch im normalen Gewebe vorkommen, da diese als körpereigene Bestandteile nicht von T-Zellen erkannt werden sollten. Hinzu kommt, dass im Thymus nicht nur die Melanom-Differenzierungsantigene Melan-A und Tyrosinase exprimiert werden, sondern dort auch *cancer-testis*-Antigene wie MAGE-A1, -A3, -A4 und NY-ESO-1 nachweisbar sind⁸⁹. Somit kann im Thymus also möglicherweise eine zentrale Toleranz gegenüber tumorspezifischen Antigenen aufgebaut werden, was immuntherapeutische Ansetze erschwert. Dem gegenüber steht allerdings die Tatsache, dass alle getesteten Thymi Melan-A exprimierten, das HLA-A*02-restringierte T-Zell-Epitop ELAGIGILTV, welches aus Melan-A stammt jedoch bei vielen Menschen T-Zell-Reaktionen hervorruft. Auch gegen andere Peptide aus Melanom-Differenzierungsantigenen konnten spezifische zytotoxische T-Zellen aus peripherem Blut induziert werden⁹⁰, was bedeutet, dass trotz der Expression im Thymus spezifische T-Zellen gegen diese Antigene im Körper vorhanden sind.

Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte man in den posttranslationalen Modifizierungen der Proteine finden. So wurde die Expression von MUC1 und CEA im Thymus auf Proteinebene nachgewiesen⁹¹, allerdings waren von MUC1 lediglich die voll glykosylierte Form und die differenzierungsabhängig glykosylierte Form vorhanden, jedoch nicht die tumorassoziierte Glykoform⁹². Dies könnte zur Folge haben, dass die Toleranz gegenüber MUC1 und CEA unvollständig ist, was Glykoformen, die nur auf Tumorzellen vorkommen betrifft. Ein weiterer Faktor, der die Toleranz von T-Zellen gegenüber körpereigenen Proteinen beeinflusst scheint die Konzentration des Antigens im Thymus zu

sein. So gibt es Hinweise darauf, dass der Schwellenwert der zentralen Toleranz gegenüber gewebspezifischen Antigenen mit der Höhe der Antigenexpression korreliert.

Es steht fest, dass immuntherapeutische Ansätze durch die zentrale Toleranz der T-Zellen gegenüber Tumorantigenen erschwert werden, jedoch scheint diese Toleranz nicht vollständig zu sein, was das Vorhandensein von spezifischen T-Zellen im peripheren Blut zeigt.

1.1.8 Analyse von MHC-Peptiden

Um natürlich präsentierte MHC-Liganden von Zellen zu isolieren gibt es verschiedene Möglichkeiten: Beispielsweise können Peptide mittels einer Säurebehandlung von der Zelloberfläche abgelöst werden, was den mehrmaligen Einsatz der selben Zellen ermöglicht⁹³. Die Immunitätschromatographie von kompletten MHC-Peptid-Komplexen über eine Affinitätssäule aus Zellysaten mit anschließender Säureextraktion und darauf folgender Ultrafiltration ist jedoch eine gezieltere Methode, um Peptide zu Analysezwecken zu isolieren. Die dabei verwendeten monoklonalen Antikörper ermöglichen dabei eine spezifische Aufreinigung der MHC-Moleküle, da sie gegen deren allelische Subgruppen gerichtet sind⁹⁴. Allerdings könnten die so extrahierten MHC-Peptidrepertoires leicht von dem verwendeten Antikörper abhängen, da peptidinduzierte Konformationsänderungen das Bindungsverhalten beeinflussen können^{95,96}. Um gezielt einzelne Allele auf ihre Peptide zu untersuchen ist es des Weiteren möglich, die Peptid-Eluate durch Verwendung von homozygoten Zelllinien oder transfizierten Zellen mit stark herunterregelter Expression von endogenen MHC-Molekülen in ihrer Komplexität zu reduzieren.

Da man bei den oben genannten Methoden lediglich die Menge an MHC-Molekülen erhalten kann, die auf den Zelloberflächen vorhanden sind, wurde ein weiteres Verfahren entwickelt, um schnell große Mengen an MHC-Peptid-Komplexen zu generieren: Die Transfektion von Zellen mit einem Expressionsvektor, der für trunkierte und daher lösliche MHC-Moleküle codiert, die in das Kultivierungsmedium sezerniert werden. Diese können dann mittels Immunitätsaufreinigung aus dem Medium isoliert werden^{97,98}. Da diese Methode jedoch die Verwendung von Zelllinien voraussetzt, sich das Peptidrepertoire von kultivierten Zellen aber von dem primärer Gewebe, wie beispielsweise Biopsien von Krebspatienten, unterscheidet, muss für die Untersuchung dieser Art von Proben die Immunitätsaufreinigung nach Lyse mittels Detergenzien verwendet werden^{64,99}.

Zu Beginn der Analyse des HLA-Ligandoms wurde der Edman-Abbau verwendet, um erste Erkenntnisse über die präsentierten Peptide zu gewinnen. Zum einen war es auf diese Weise möglich, über Poolsequenzierungen das allgemeine Peptidmotiv eines Allels zu ermitteln, zum anderen konnte man über die Analyse einzelner *reversed phase high performance liquid chromatography* (RP-HPLC)-Fraktionen bereits einzelne Peptidsequenzen ermitteln^{7,94}. Auf diese Weise wurde der erste MHC-Ligand SYFPEITHI von H2-K^d-Molekülen der Maustumorzelllinie P815 entdeckt.

Erst der Einsatz moderner Massenspektrometer in der Proteomik bedeutete für die Peptidanalyse den absoluten technischen Durchbruch, da es nun möglich war, die Sequenzen vieler einzelner Liganden zu ermitteln¹⁰⁰. Erstmals stand neben der Auftrennung der Peptide nach ihren Elutionseigenschaften über die RP-HPLC noch die Auftrennung der Peptide nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) zur Verfügung. Für die dabei benötigte Ionisierung der Peptide oder Proteine finden zwei Methoden Verwendung: Die Elektrospray-Ionisation (ESI) und die *matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI). Bei der ESI ist die Kopplung mit einem RP-HPLC-System üblich. Mit zunehmender Sensitivität der Massenspektrometer wurde jedoch auch die Kapillarelektrophorese (*capillary electrophoresis*, CE) als analytische Trennmethode verwendet^{101,102}. In den letzten Jahren wurden die HPLC-Systeme weiterentwickelt, um einen höheren Probendurchsatz und eine gesteigerte Sensitivität zu erreichen. Diese sogenannten UHPLC-Systeme (*ultra high performance liquid chromatography*) benutzen als Packmaterial für Trennsäulen lediglich Materialien mit 2 μm Durchmesser, was zu einer verbesserten Geschwindigkeit, Effizienz und chromatographischen Auftrennung führt. Allerdings steigt dadurch auch der Arbeitsdruck der Geräte auf mehrere hundert bar, was von einer klassischen HPLC-Anlage nicht erreicht werden kann¹⁰³.

Die Probenanalyse für die MALDI-Massenspektrometrie (MS) erfordert in der Regel eine vorherige *offline*-Trennung der Probe^{104,105}. Diese hat den Vorteil, dass Vorläufer-Ionen sorgfältig ausgewählt werden können und auf diese Weise Redundanzen vermieden werden können. Des Weiteren können weniger intensive Peptidsignale besser detektiert werden. Ein großer Nachteil dieser Methode ist jedoch der hohe Zeitaufwand, der für die Analyse einer einzelnen Probe benötigt wird. Frühere Limitierungen der MALDI-Fragmentierung durch den *post source decay* (PSD) wurden mittlerweile durch die Einführung von TOF/TOF-Geräten (*time-of-flight*) vollständig eliminiert¹⁰⁶⁻¹⁰⁹.

Bei der ESI-Massenspektrometrie ermöglicht die direkte Kopplung von HPLC und ESI-Interface eine *online*-Trennung der Probe, was in Kombination mit einem Autosampler einen

vollständig automatisierten Ablauf der Messprozedur ermöglicht. Wegen des kontinuierlichen Lösungsmittelflusses von der HPLC können die Proben in verhältnismäßig kurzer Zeit gemessen werden, allerdings kann es dabei aufgrund der computergesteuerten datenabhängigen Auswahl der Vorläufer-Ionen (*data-dependent ion selection*, DDIS) zu Redundanzen von Peptiden beziehungsweise Proteinen während der Messung kommen.

Die ESI-Massenspektrometrie verwendet ein breites Spektrum von Instrumenten zur Analytik¹¹⁰⁻¹¹² wie beispielsweise Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometer, lineare Quadrupol-Ionenfallen¹¹³, Tripelquadrupole oder Ionenfallen-Orbitrap-Hybridsysteme^{114,115}. Auf diese Weise wurde die Identifikation von MHC-Liganden voran getrieben, was die Identifikation von hunderten Peptiden in einer Messung ermöglicht^{50,52,116,117}.

1.1.9 Reverse Immunologie – Vorhersage von T-Zell-Epitopen

Kurz nachdem bekannt war, dass allelspezifische Peptidmotive existieren, wurden erste Versuche unternommen, diese Motive für die Vorhersage von T-Zell-Epitopen aus Proteinsequenzen zu verwenden^{118,119}. Über diese als ‚reverse Immunologie‘ bezeichnete Methode konnten bereits einige T-Zell-Epitope entdeckt werden¹²⁰, wovon viele, vor allem auch im Bereich der CD4⁺-Epitope¹²¹, erst in den letzten Jahren identifiziert wurden.

Inzwischen gibt es zahlreiche Vorhersageprogramme für T-Zell-Epitope, die auf verschiedenen Algorithmen beruhen und die im Internet frei zugänglich sind^{122,123}. Die meisten davon sagen die MHC-Bindung voraus, wie beispielsweise SVMHC oder PREDEP. Andere den TAP-Transport (MHCpred) oder die proteosomale Prozessierung (PAProc, NetCHOP) und einige Programme kombinieren sogar mehrere dieser Komponenten (MHC-Pathway/IEDB, WAPP). Neben diesen Programmen gibt es noch einige weitere^{121,124}, von denen SYFPEITHI und BIMAS zu den bekanntesten gehören.

Die auf SYFPEITHI basierenden Vorhersagen von MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Liganden beruhen ausschließlich auf natürlichen MHC-Liganden. Aus diesem Grund sagt SYFPEITHI auch nicht allein die MHC-Bindung voraus, sondern berücksichtigt für die Ermittlung von Liganden zusätzlich noch die erfolgreiche Prozessierung und den Transport. Dem ganzen zugrunde liegt die Annahme, dass alle Aminosäuren des Peptids einen mehr oder weniger großen Beitrag zur Bindungsqualität beisteuern. Diese Beiträge werden durch Matrizen beschrieben, die jeder Aminosäure an jeder Position des Peptids einen bestimmten Zahlenwert zuordnen. Für die Epitopvorhersage wird die Aminosäuresequenz eines Proteins

in alle theoretisch möglichen Peptide zerlegt und die anhand der Matrix vorgegebenen Punktwerte für die entsprechenden Aminosäuren an den unterschiedlichen Positionen addiert. Die tatsächlichen T-Zell-Epitope werden unter den 2% der am höchsten bewerteten Peptide erwartet¹²⁵.

Die von BIMAS verwendete Vorhersage basiert auf Bindungsstudien mit synthetischen Peptiden. Zwar geht man auch hier davon aus, dass der Beitrag der verschiedenen Aminosäuren zur Bindungsqualität unabhängig von der kompletten Peptidsequenz ist, jedoch verwendet der Algorithmus im Gegensatz zu SYFPEITHI kein additives, sondern ein multiplikatives Verfahren, um die theoretische Bindungsstabilität der Peptide zu berechnen. Auch hier werden mögliche T-Zell-Epitope unter den ersten 2% der vorhergesagten Kandidaten erwartet¹²⁶.

Neben den *position-specific scoring matrices* (PSSMs), die von den Algorithmen von SYFPEITHI und BIMAS verwendet werden gibt es noch andere, höher entwickelte Methoden, um Bindungsstabilitäten zu berechnen, wie beispielsweise *support vector machines* (SVMs) oder *artificial neural networks* (ANNs). Letzteres wird bei dem Programm NetMHC angewandt, das unter Verwendung von *sparse encoding*, *Blosum encoding* und *hidden Markov models* (HMMs) für die Vorhersagen nicht nur die Aminosäuren an ihren einzelnen Positionen, sondern auch die Aminosäuren in Relation zueinander berücksichtigt¹²⁷. Einen Überblick und einen Vergleich dieser Methoden bieten Peters et al.¹²⁸ und Lundegaard et al.¹²⁹.

1.1.10 Mögliche Ansätze zur Analyse des MHC-Ligandoms

Der klassische Ansatz zur Analyse des MHC-Ligandoms besteht wie bereits beschrieben darin, MHC-gebundene Peptide zu isolieren und massenspektrometrisch zu messen. Diese qualitative Methode liefert einen Überblick über das MHC-Repertoire und es ist möglich, gewebsspezifische Eigenschaften zu ermitteln^{64,116,130,131}. Um Proben quantitativ zu untersuchen, ist es in der Regel notwendig, diese differentiell zu modifizieren. Zwar ermöglicht diese Vorgehensweise lediglich den Vergleich zwischen zwei Proben, jedoch eignet sich diese Art der relativen Quantifizierung dazu, Tumorgewebe mit Normalgewebe, infizierte Zellen mit nicht infizierten Zellen oder verschiedene Proben gleicher Gewebetypen miteinander zu vergleichen^{132,133}. Alternativ kann anhand eines Referenzpeptids versucht werden, eine absolute Quantifizierung durchzuführen. Zuletzt ist noch möglich, gezielt nach

Liganden aus interessanten Antigenen zu suchen, indem man Zellen mit einem entsprechenden Expressionsvektor transfiziert¹³⁴, oder man kann gezielt mittels der ‚*Predict-Calibrate-Detect*‘-Methode nach vorhergesagten Liganden aus einem Antigen suchen¹³⁵.

Die quantitative Analyse des HLA-Ligandoms bietet zunächst natürlich die Möglichkeit, eine große Menge an MHC-gebundenen Peptiden zu identifizieren. Dieser Ansatz war nicht nur in der Anfangsphase der massenspektrometrischen Sequenzanalyse von Peptiden interessant¹³¹, sondern wurde auch noch Jahre später dazu verwendet, um wenig untersuchte Gewebe- oder Tumorarten genauer zu charakterisieren⁹⁹. Auch heute werden Massenspektrometer noch für diese sogenannten ‚*large-scale*‘-Analysen eingesetzt, da permanent neue, höher entwickelte Messgeräte auf den Markt kommen und die Sensitivitätsgrenze für Peptidanalysen dadurch immer weiter nach unten gesetzt wird, was zur Identifizierung von neuen, bisher unbekanntem Liganden führt.

Mit zunehmender Sicherheit und Routine dieser Art Analysen ist man dazu übergegangen, diese Messmethode dazu zu verwenden, um mehrere Proben miteinander zu vergleichen. So nutzten Dengjel et al. 2005 diese Technik dazu, den Einfluss der Autophagie auf die *cross presentation* von Peptiden exogener Proteine auf MHC-Klasse-I sowie die Beladung von MHC-Klasse-II-Molekülen mit Peptiden zytosolischen Ursprungs zu untersuchen. Da bekannt ist, dass Autophagie eine Reaktion der Zellen auf Nährstoffmangel oder Stress ist, wurden hierfür Zellen der Zelllinie Awells in normalem Medium beziehungsweise in nährstoffarmen Medium ohne Serum und Aminosäuren kultiviert⁵². Eine qualitative Analyse des HLA-DR MHC-Klasse-II-Peptidligandoms lieferte 404 identifizierbare Peptidsequenzen von normalen Awells, die wie es für MHC-Klasse-II-Peptide üblich ist aus Längenvarianten von 173 Kernsequenzen bestehen. Ein Großteil dieser Peptide stammt aus intrazellulären Proteinen oder Membranproteinen; ein kleiner Teil der Peptide hat seinen Ursprung allerdings in Proteinen, die in anderen Kompartimenten lokalisiert sind. Um einen Vergleich zwischen normal kultivierten und in nährstoffarmen Medium kultivierten Zellen zu bekommen, wurden 54 Peptide, die auf beiden Zellen präsentiert wurden anhand ihrer Signalintensitäten in LC-MS-Messungen differentiell quantifiziert. Dabei fand man heraus, dass die Präsentation von Peptiden aus intrazellulären und lysosomalen Proteinen unter Mangelbedingungen stark erhöht ist, was einerseits wohl an der Bildung von autophagischen Vakuolen verursacht wird, andererseits aber auch durch die veränderte Aktivität lysosomaler Proteasen hervorgerufen wird. Somit beeinflussen diese beiden Dinge die Prozessierung für die Beladung der MHC-Moleküle und führen so zu einem veränderten MHC-Ligandom. Die Präsentation des

alternativen Peptidpools spiegeln die durch Autophagie verursachten Veränderungen des Proteoms wider und machen sie dem Immunsystem zugänglich.

Ähnlich wie die der Einfluss der Autophagie auf das MHC-Ligandom können auf diese Weise auch andere Aspekte, welche die Peptidpräsentation beeinflussen, untersucht werden. So beispielsweise, inwiefern IFN γ die Zusammensetzung und dadurch die proteolytischen Eigenschaften des Proteasoms verändert²³, oder um den Einfluss von Proteasominhibitoren auf das MHC-Ligandom zu untersuchen¹³⁶. Auch Tapasin-defiziente Zellen weisen ein verändertes Ligandom auf, was Untersuchungen über den Edman-Abbau und Massenspektrometrie zeigten¹³⁷. Erst ein qualitativer und quantitativer Vergleich zwischen TAP-exprimierenden und TAP-defizienten Zellen enthüllte die genaueren Unterschiede der beiden MHC-Ligandome¹³⁸.

Die Tatsache, dass sich das Ligandom durch Manipulation an der Antigenprozessierungsmaschinerie verändert, ist eine wichtige Erkenntnis und liefert Ansatzpunkte für Immuntherapien¹³⁹. Bei verschiedenen Krankheiten, sei es nun eine virale Infektion oder eine tumoröse Entartung des körpereigenen Gewebes, kommt es zur Ausbildung von Mechanismen, um die Erkennung durch T-Zellen zu umgehen, indem die Antigenprozessierung gestört oder ganz außer Kraft gesetzt wird^{140,141}. Zwar scheint diese Behinderung der Antigenprozessierung vorteilhaft für Tumor oder Pathogen zu sein, aber durch die Ligandomveränderung kann trotzdem therapeutisch dagegen vorgegangen werden. Die durch die Veränderung der Zelle einhergehende Veränderung des Proteoms bietet einen möglichen Ansatzpunkt zur Therapie, da sich dadurch ebenfalls das MHC-Ligandom der Zelle verändert. Durch die Identifizierung von krankheitsassoziierten Liganden ist es möglich, einen immuntherapeutischen Ansatz zur Behandlung über die Vakzinierung mit Impfpeptiden^{142,143} oder den adoptiven T-Zell-Transfer zu induzieren¹⁴⁴. Das größte Problem dabei ist die geringe Anzahl bekannter Tumorantigene und daraus resultierend die noch geringere Anzahl an bekannten T-Zell-Epitopen.

Ist ein krankheitsassoziiertes Antigen bekannt, so kann man mittels der ‚*Predict-Calibrate-Detect*‘-Methode gezielt nach vorhergesagten T-Zell-Epitopen aus diesem Protein suchen. Das Ziel besteht darin, das mögliche Epitop auf molekularer Ebene, das heißt als auf der Zelloberfläche präsentierter Ligand über eine massenspektrometrische Analyse nachzuweisen. Auf diese Art wurden beispielweise HLA-A*02-restringierte Epitope aus den tumorassoziierten Antigenen CEA und p53 sowie aus dem tumorspezifischen MAGE-A1 identifiziert^{131,135}. Um dies zu bewerkstelligen, wurden zunächst mit Hilfe der SYFPEITHI-

Algorithmen mögliche T-Zell-Epitope aus den eingegebenen Proteinsequenzen ermittelt. Diese wurden anschließend synthetisiert und dazu verwendet, das analytische System in LC-MS- und LC-MS/MS-Experimenten nach den Parametern Molekulargewicht, Retentionszeit und Fragmentierungsmuster zu kalibrieren. Im nächsten Schritt wurden dann Peptideluate von Geweben oder Zelllinien, in denen das entsprechende Antigen exprimiert wird bei genau den gleichen Bedingungen analysiert. Die Detektion der vorhergesagten T-Zell-Epitope erfolgt durch einen Abgleich der Parameter der Peptide aus der natürlichen Probe mit den ermittelten Parametern der synthetischen Standardpeptide. Diese Methode eignet sich auch zur Detektion von viralen Peptiden¹⁴⁵.

Die ‚*Predict-Calibrate-Detect*‘-Methode ist dafür geeignet, T-Zell-Epitope zu identifizieren, unterliegt aber gleichzeitig einigen Limitierungen: Zunächst einmal muss ein Antigen bekannt sein, um überhaupt eine Epitopvorhersage durchführen zu können. Außerdem kann nur eine bestimmte Anzahl an Peptiden synthetisiert und für die Kalibrierung verwendet werden, da dieses Verfahren recht zeitaufwändig ist. Um einen Vergleich zwischen zwei komplexen Proben, beispielsweise Tumor- und Normalgewebe oder virusinfizierten mit nicht infizierten Zellen anzustellen und auf diese Weise tumorassoziierte Liganden zu finden, müssen diese zunächst mit einer differentiellen Isotopenmarkierung versehen werden. Deshalb werden die N-Termini der Peptide mit zwei unterschiedlich schweren Formen des Nikotinsäure-Succinimids modifiziert^{132,146}. Durch äquivalente Mischung und anschließender Messung in einem LC-MS-Experiment ist es möglich, Peptide, die in beiden Proben vorhanden sind, sowie Peptide, die nur in einer der beiden Proben vorkommen zu detektieren. Über einen Vergleich der Signalintensitäten des mit dem schweren Isotop markierten mit dem Peptid, das die leichte Isotopenmarkierung trägt findet eine relativ Quantifizierung statt. Das Verhältnis der Signale repräsentiert dabei das Verhältnis der Peptidpräsentation. Einzelne Signale im Übersichtsscan des Massenspektrometers können von Peptiden stammen, die nur in einer der beiden Proben vorkommen, was unter Umständen auf tumorspezifische Peptide hindeuten könnte. Mittels dieser Technik ist es möglich, großangelegte differentielle Analysen zwischen Tumor- und Normalgeweben durchzuführen¹³³ oder Tumoren mit Metastasen zu vergleichen¹⁴⁷.

Diese Art der differentiellen Quantifizierung eignet sich auch dazu, einen Vergleich zwischen untransfizierten Zellen und transfizierten Zellen, die ein Antigen von Interesse exprimieren zu ziehen. Beispielsweise wurden normale A-wells-Zellen mit Transfektanten des

tumorassoziierten Antigens Keratin 18 verglichen, von dem man weiß, dass es in einigen Tumorarten überexprimiert ist. So konnte ein Keratin 18-Ligand identifiziert werden¹³².

An diesen beiden Beispielen kann man sehen, dass die differentielle Isotopenmarkierung mit anschließender relativer Quantifizierung eine sehr gute Methode auf der Suche nach krankheitsassoziierten MHC-Liganden ist. Ob die identifizierten Liganden jedoch auch Epitope sind, die T-Zell-Reaktionen hervorrufen können, muss in weiteren immunologischen Experimenten validiert werden.

1.1.11 Tumoranalytik – Die Verknüpfung von Proteom und Ligandom

Der Begriff MHC-Ligandom bezeichnet die Gesamtheit aller Peptide, die auf MHC-Molekülen an der Zelloberfläche präsentiert werden. Dieses Repertoire ist stark mit dem Proteom, also der Gesamtheit aller Proteine, die einem Genom entsprechen¹⁴⁸ verknüpft und ermöglicht die Überwachung des Körpers durch das Immunsystem. Somit ist auch die Analyse des Proteoms von immunologischem Interesse. Ein gemeinsames Ziel, das sowohl die Proteomik als auch die Ligandomik verfolgt, ist die Identifizierung von Biomarkern¹⁴⁹, deren Charakterisierung für die klinische Anwendung bei Diagnose, Therapie, Prognose und Monitoring sowie bei der Entwicklung von neuen Medikamenten und der Überwachung klinischer Studien von großer Wichtigkeit ist¹⁵⁰. Der Fokus bei diesen Untersuchungen liegt dabei oft auf Körperflüssigkeiten, da diese leicht zugänglich sind¹⁵¹, jedoch spielen auch Gewebebiopsien für die erste Definition eines Biomarkers eine wichtige Rolle¹⁵².

Gerade für die Ligandomik ist die Identifizierung von Biomarkern von größtem Interesse, da diese als tumorassoziiert oder sogar tumorspezifisch gelten. Eine krankhafte Entartung einer Zelle macht sich zuerst am Proteom bemerkbar, jedoch bedarf es erst der Präsentation von Peptiden auf der Zelloberfläche, damit das Immunsystem dem entgegenwirken kann. Allerdings hängen die Veränderung des Proteoms und des Ligandoms nicht unbedingt zusammen, da weder das Transkriptom mit dem Proteom¹⁵³ noch das Transkriptom mit dem Ligandom korreliert¹³³. Ein Grund dafür könnte sein, dass das MHC-Ligandom nicht nur von Proteinabundanzen, sondern auch von Synthese- und Abbau-Arten beeinflusst wird^{154,155}.

Einer der größten Vorteile der Proteomik besteht in der massenspektrometrischen Analyse von posttranslationalen Modifikationen (PTMs) an Proteinen¹⁵⁶. Da PTMs viele zentrale Aufgaben bei der Struktur von Proteinen und von regulatorischen Prozessen übernehmen,

sind auch T-Zellen dazu in der Lage, PTMs zu erkennen und auf Veränderungen, die beispielsweise durch onkogene Transformation, Dysregulation oder Entzündungsprozesse entstanden sind zu reagieren. Genauso wie bei der Analyse von unmodifizierten Proteinen oder Peptiden bedient man sich bei der Charakterisierung von PTMs Massenspektrometern, denen inzwischen neben der Standard-Fragmentierungsmethode *collision-induced dissociation* (CID) auch andere, geeignetere Methoden der Fragmentierung, wie beispielsweise *higher-energy collisionally induced dissociation* (HCD) oder *electron transfer dissociation* (ETD) zur Detektion von PTMs zur Verfügung stehen¹⁵⁷⁻¹⁵⁹.

Obwohl MHC-Liganden in viel geringeren Mengen als Proteine zu Analysezwecken zur Verfügung stehen, gelang es bereits 2000 nachzuweisen, dass phosphorylierte Peptide natürlich prozessiert und auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden¹⁶⁰. Später entdeckte man dann, dass auch MHC-Klasse-II-präsentierte Peptide posttranslationale Phosphorylierungen tragen können^{161,162}. Es wurde gezeigt, dass sowohl CD8⁺ als auch CD4⁺ T-Zellen zwischen phosphorylierten und nicht phosphorylierten Peptiden unterscheiden können^{160,161}, was Phosphopeptide zu potentiellen neuen Zielen in der Krebsimmuntherapie macht.

Des Weiteren wurden zwei natürliche MHC-Klasse-II-Liganden aus CD53 identifiziert, deren N-Termini glykosyliert sind¹⁶³. Für Klasse I-Peptide wurde bereits gezeigt, dass T-Zellen Glykosylierungen erkennen können^{164,165}, was auch für Klasse II-präsentierte Liganden zutreffen könnte. Hinweise darauf liefern Versuche, in denen CD4⁺ T-Zellen mit dem konservierten mycobakteriellen Lipoglykoprotein LprG stimuliert wurden. Nur mit der glykosylierten Form des Proteins konnten CD4⁺ T-Zellen rekrutiert werden, wohingegen der Effekt bei der unglykosylierten Form des Proteins ausblieb¹⁶⁶.

Neben den Phosphorylierungen und Glykosylierungen können MHC-präsentierte Peptide noch andere PTMs tragen, welche die Komplexität des MHC-Peptidrepertoires deutlich erhöht¹⁶⁷. Dies ist jedoch auch unerlässlich, da das Ligandom nur auf diese Weise seiner Aufgabe, Veränderungen des Proteoms widerzuspiegeln nachkommen kann.

Sowohl die Ligandomik als auch die Proteomik sind denselben Limitierungen der Massenspektrometrie bei den Analysen unterworfen. Das größte Problem dabei ist wohl die enorme Variationsbreite der Peptid- beziehungsweise Proteinkonzentration in einer Probe: Im Fall von MHC-Liganden liegt diese bei ungefähr fünf Größenordnungen und bei Proteomen sogar bei mehr als zehn Größenordnungen, was Analysen am humanen Plasma-Proteom zeigten¹⁶⁸. Solch hohe Konzentrationsunterschiede führen zwangsläufig dazu, dass häufiger vorkommende Moleküle auch mit höherer Wahrscheinlichkeit bei einer Messung detektiert

werden und seltenere Bestandteile oftmals ignoriert oder nicht detektiert werden. Zum einen liegt das an der *data-dependent ion selection* der Massenspektrometer, die normalerweise nach den intensivsten Signalen scannen um diese dann zu fragmentieren, zum anderen liegt es aber auch an den technischen Grenzen der Massenspektrometer selbst. Die heutigen Massenspektrometer sind dazu in der Lage, Peptide auch im Subfemtomol-Bereich zu detektieren. Ein größeres Problem bei der Analyse von komplexen Proben stellt vielmehr der sogenannte ‚dynamische Bereich‘ eines Detektors. Dieser bezeichnet den Faktor, um welchen das Signal einer bestimmten Masse kleiner als das Signal anderer Massen sein darf, ohne durch zu falschen Zeiten ankommende Ionen dieser anderen Massen verdeckt zu werden. Eluieren also ein abundantes und ein wenig abundantes Peptid gleichzeitig von der Säule, kann es passieren, dass das abundante Signal das weniger abundante unterdrückt und es dadurch nicht mehr detektierbar ist¹⁶⁹.

Die Proteomik bedient sich im Normalfall zweier Methoden, um Proteinanalysen durchzuführen: Um großangelegte Proteomcharakterisierungen durchzuführen bedient man sich der sogenannten ‚*shotgun proteomics*‘-Methode, bei der das Proteom von beispielsweise lysierten Zellen verdaut auf eine HPLC-Säule geladen und analysiert wird^{169,170}. Um ein einzelnes Protein zu analysieren muss das Proteom zunächst über zweidimensionale (2D-) Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Teile des Proteoms wie beispielsweise membranassoziierte oder membrangebundene Proteine sind dabei allerdings aufgrund ihrer extremen physikochemischen Eigenschaften, wie dem isoelektrischen Punkt oder dem Molekulargewicht nicht einfach zu untersuchen¹⁷¹. Obwohl über eine 2D-Gelelektrophorese Hunderte von Proteinspots aufgetrennt werden können¹⁷², beträgt das gerade einmal einen Bruchteil des gesamten menschlichen Proteoms. Dieses wird durch ungefähr 25000 Gene codiert⁶¹, die in verschiedenen Spleißvarianten exprimiert werden und unterschiedlich posttranslational modifiziert vorliegen können, was die Komplexität des Proteoms weiter erhöht. Dies und weitere Faktoren gestalten die Untersuchung des Proteoms nach wie vor weiterhin schwierig¹⁷³⁻¹⁷⁵.

Ähnlichen Problemen steht man auch in der MHC-Ligandomanalyse gegenüber, da auch hier im Moment nur ein kleiner Teil des komplexen Probengemischs charakterisiert werden kann. Von den etwa 10000 verschiedenen Peptiden, die auf MHC-Molekülen präsentiert werden können heute lediglich einige hundert sequenziert und damit zuverlässig identifiziert werden. Grund dafür sind neben den technischen Grenzen der Massenspektrometer auch die Probleme, die bei der automatischen Auswertung von experimenteller MS-Daten auftreten. In der Proteomik liegt der Auswertung von MS-Daten normalerweise der enzymatische Verdau

eines oder mehrerer Proteine zugrunde. Das Ziel der Analyse ist die eindeutige Identifizierung von Proteinen, das heißt mit einer zunehmenden Anzahl von sequenzierten Peptiden aus einem Protein und einer dadurch zunehmenden Sequenzabdeckung ist auch die Identität des Proteins mit entsprechender Wahrscheinlichkeit nachgewiesen. Dies trifft auf die Analyse von MHC-Liganden jedoch nicht zu, da in der Regel lediglich ein Peptid aus einem Protein entdeckt wird. Während in der Proteomik solche als ‚one hit wonders‘ bezeichnete Treffer oft als nicht zuverlässig betrachtet werden, erhöht eine größere Anzahl von MHC-Liganden aus einem Protein nicht die Sicherheit einer Identifizierung¹⁷⁶.

Ein weiteres Problem, das bei der automatischen Datenbankabfrage bei der Analyse von MHC-Liganden auftritt ist die Tatsache, dass diese Suche nicht durch die Angabe einer Schnittspezifität des zum Verdau verwendeten Enzyms beschränkt werden kann, da eine große Anzahl von Spaltspezifitäten zur Entstehung der MHC-Liganden beiträgt. Tryptisch verdaute Peptide weisen an ihren C-Termini entweder ein Arginin oder ein Lysin auf, was zu schönen Fragmentierungsmustern mit zusammenhängenden Ionenserien führt. Im Gegensatz dazu können bei MHC-Peptiden geladene Aminosäuren auch mehrfach und in der Regel mitten in der Sequenz vorkommen. Alternativ können sie nur aus hydrophoben Aminosäuren aufgebaut sein und lediglich die N-terminale Ladung tragen. So präsentiert HLA-A*02 Liganden mit hydrophoben Ankerresten in Position 2 und am C-Terminus und bindet auch in anderen Positionen nur ungern geladene Aminosäuren, was eine automatisierte Auswertung nicht unmöglich macht, aber deutlich erschwert und weshalb eine manuelle optische Kontrolle der Spektren unbedingt erforderlich ist.

Dabei ist die Optimierung der Entschlüsselungsalgorithmen für Fragmentspektren gerade auch für die *de novo*-Sequenzierung von äußerster Wichtigkeit, da über diese auch Peptidsequenzen identifiziert werden können, die beispielsweise durch *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) oder Proteinspleißen entstanden sind und in keiner Datenbank stehen¹⁷⁷.

Die Analyse von Proteom und Ligandom ist somit eng verknüpft und die Herausforderungen, denen sich die Massenspektrometrie stellen muss betreffen beide Bereiche gleichermaßen. Rückblickend auf die neuesten technischen Entwicklungen auf diesem Feld in den letzten Jahren kann man davon ausgehen, dass dieses Forschungsfeld auch in Zukunft viel Aufmerksamkeit auf sich zieht, was zu neuen Entwicklungen führt, von denen sowohl die Proteomik als auch die Ligandomik profitieren werden.

Kapitel 1

Einleitung

~ Teil 2 ~

Multiple Sklerose

1.2.1 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose ist eine chronische Entzündungskrankheit des zentralen Nervensystems (ZNS), vor allem des Gehirns und des Rückenmarks. Normalerweise beginnt die Krankheit im Alter von 20 bis 40 Jahren und macht sich durch Empfindungsdefizite sowie durch Störungen der motorischen, autonomen und neurokognitiven Funktionen bemerkbar^{178,179}.

Es gibt zwei Formen der Multiplen Sklerose: Die verbreitetste Form ist die sogenannte '*relapsing-remitting*'-Multiple Sklerose und kommt in 85% – 90% der Fälle vor, wobei Frauen doppelt so oft betroffen sind wie Männer. Die meisten Patienten, die an RR-MS erkrankt sind entwickeln im späteren Krankheitsverlauf eine '*secondary progressive*'-Multiple Sklerose. In einem kleinen Teil der Patienten (10% – 15%) beginnt die Krankheit sofort in einem fortwährend progressiven Stadium, weshalb diese Form als '*primary progressive*'-Multiple Sklerose bezeichnet wird¹⁸⁰. Obwohl die Krankheitsursache noch nicht endgültig geklärt ist,

gibt es Hinweise darauf, dass es sich dabei um eine Autoimmunkrankheit handelt, bei der CD4⁺T-Zellen des Typs 1 (Th1) verschiedene Teile der Myelinscheide als immunologisch relevantes Antigen erkennen¹⁸¹⁻¹⁸³. Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass auch genetische sowie nervensystemspezifische Faktoren wie die Reaktivierung stillgelegter Signalwege¹⁸⁴ oder Glutamatexcitotoxizität¹⁸⁵ eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Multipler Sklerose spielen.

1.2.2 Krankheitsursachen der Multiplen Sklerose

Da der genaue Ursprung der Krankheit noch nicht bekannt ist geht man davon aus, dass mehrere Faktoren für die Ausbildung der Multiplen Sklerose verantwortlich sind. Untersuchungen von Bevölkerungsgruppen, Familien und Zwillingen zeigen, dass die Prävalenz in Familien mit Multiple Sklerose-Patienten erhöht ist. So haben Verwandte ersten Grades ein 2% - 5% höheres Risiko an Multipler Sklerose zu erkranken und bei eineiigen Zwillingen beträgt die Rate sogar 25%¹⁸⁶. Um die genetischen Risikofaktoren, die zu Multipler Sklerose führen können zu ermitteln, wurden mehr als 20 Genomanalysen von unterschiedlichen Multiple Sklerose-Populationen in verschiedenen geographischen Gebieten durchgeführt¹⁸⁷. Unter Verwendung von über 6000 Mikrosatellitmarkern und verschiedenen Methoden entdeckte man, dass für die Prädisposition eine Häufung bei Genen auf dem Chromosom 6p21 im Bereich des *major histocompatibility complex* auftritt. Man nimmt an, dass die MHC-Gene 10% - 60% des genetischen Risikos in Bezug auf Multiple Sklerose ausmachen^{188,189}.

1.2.3 Genetische Faktoren

Ähnlich wie bei anderen Autoimmunerkrankungen werden auch bei der Multiplen Sklerose die HLA-DR- und HLA-DQ-Gene, vor allem der HLA-DR15-Haplotyp (DRB1*15:01, DRB5*01:01, DQA1*01:02, DQB1*06:02) als größte Risikofaktoren assoziiert¹⁸⁹. Dies gilt im Speziellen für HLA-DRB1*15:01 und HLA-DRB5*01:01, die in einem sehr engen *linkage disequilibrium* zueinander stehen¹⁹⁰. Im Gegensatz dazu scheinen die HLA-Klasse-I-Allele weniger stark mit der Krankheit assoziiert zu sein. HLA-A*03 und HLA-B*07 sind in Patienten mit Multipler Sklerose überrepräsentiert und HLA-A*02 scheint einen schützenden

Effekt zu haben^{189,191,192}. Inwiefern die MHC-Klasse-II-Gene und die molekularen Mechanismen, die zum Ausbruch von Multipler Sklerose führen können zusammenhängen, ist nicht genau bekannt. Man vermutet, dass die krankheitsassoziierten HLA-DR- und -DQ-Moleküle Bindeeigenschaften aufweisen, die zur bevorzugten Präsentation bestimmter Selbst-Peptide, beispielsweise von Myelinpeptiden führen. In diesem Zusammenhang wird spekuliert, ob die krankheitsassoziierten HLA-Moleküle nicht sogar nur ein sehr eingeschränktes Set von Peptiden präsentieren kann, was zu einer weniger vollständigen negativen Selektion selbstreaktiver T-Zellen im Thymus führt¹⁹³. Eine weitere Theorie besagt, dass polymorphe Reste der Oberflächen der α -Helices der DR/DQ- α - und - β -Ketten, die dem T-Zell-Rezeptor dargelegt werden oder einzelne Aminosäuren des präsentierten Peptids für die Autoimmunanfälligkeit des T-Zell-Repertoires verantwortlich sind^{194,195}.

Ebenso unklar ist ob und inwiefern MHC-Klasse-I als Krankheitsursache für Multiple Sklerose anzusehen ist. Es wurde beobachtet, dass die Anzahl der mit Selbst-Peptid beladenen Lymphozyten in Multiple Sklerose-Patienten reduziert ist, was die Autoraktivität von CD8⁺ T-Zellen erklären könnte¹⁹⁶. Des Weiteren wurde die Infiltration von CD8⁺ T-Zellen in die Zerebrospinalflüssigkeit (ZSF) das Plaque-Gewebe bei Multiple Sklerose-Patienten^{197,198}, sowie eine Hochregulation von MHC-Klasse-I im Gehirn der Patienten¹⁹⁹ beobachtet. All dies deutet auf eine Beteiligung der CD8⁺ T-Zellen bei der Entstehung von Multipler Sklerose hin. Neben den Genen für MHC-Klasse-II wurde in Zusammenhang mit Multipler Sklerose auch eine erhöhte Transkriptionsrate von Genen des Komplements, von T-Zell- und B-Zell-Genen, einigen Zytokingenen (IL-17) und ihren Rezeptoren (IL-1R, TNF p75 Rezeptor) sowie den Genen für das *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) und einiger Transkriptionsfaktoren entdeckt²⁰⁰. Generell kann gesagt werden, dass Gene, die mit dem Immunsystem in Beziehung stehen speziell in der akuten Phase der Multiplen Sklerose deutlich höher exprimiert werden und es eher quantitative als qualitative Unterschiede zwischen den frühen und den späten Phasen der Krankheit gibt. Untersuchungen an der weißen Substanz des Gehirns, die makroskopisch zwar normal, mikroskopisch aber als verändert identifiziert wurde zeigten, dass dort Gene, die mit Homöostase und neuronalen Schutzfunktionen assoziiert sind hochreguliert sind²⁰¹.

1.2.4 Nicht-genetische Faktoren

Aufgrund der Tatsache, dass das Risiko unter eineiigen Zwillingen an Multipler Sklerose zu erkranken, zwar deutlich erhöht, aber nicht sicher ist, kann man davon ausgehen, dass neben den genetischen auch andere Faktoren eine Rolle beim Ausbruch der Krankheit spielen. Es ist bekannt, dass Frauen 1,6 bis zwei mal häufiger von Multipler Sklerose betroffen sind als Männer. Der Grund dafür könnte hormonell bedingt sein. So wurde beispielsweise beobachtet, dass es während einer Schwangerschaft zu geringeren Rückfallquoten kommt, die Krankheit nach der Schwangerschaft jedoch in einer verstärkten Form wieder auftritt²⁰². Auch während der Menstruation verschlechtert sich der Zustand der Multiplen Sklerose. Auf hormoneller Ebene betrachtet wurde festgestellt, dass ein hoher Estradiol- und ein niedriger Progesteronspiegel mit einer erhöhten Magnetresonanztomographieaktivität der Krankheit korreliert. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Östriol einen therapeutischen Effekt bei der Behandlung von ‚relapsing-remitting‘ Multipler Sklerose hat²⁰³. Wie genau Sexualhormone die Anfälligkeit von Multipler Sklerose beeinflussen ist noch nicht genau bekannt, aber der stimulatorische Effekt von Östrogenen die proinflammatorische Zytokinsekretion und der umgekehrte Effekt bei Androgenen könnte einen möglichen Mechanismus repräsentieren.

Betrachtet man die Verteilung von Multipler Sklerose aus geographischer Sicht, so stellt man fest, dass es ein typisches Nord-Süd-Gefälle der Krankheit abzeichnet. Diese Verteilung kann allerdings nicht allein mit genetischen Faktoren der Bevölkerung erklärt werden, da Migrationsstudien zeigen, dass sich die Krankheitsrate unter Nordeuropäern, die in den Süden ausgewandert sind im Vergleich zu der ursprünglichen Krankheitsrate halbiert hat. Auch scheint das Alter dabei eine Rolle zu spielen: So hat sich das Risiko an Multipler Sklerose zu erkranken bei Personen unter 15 bis 16 Jahren verringert, wohingegen es bei Personen über 15 bis 16 Jahren gleich blieb²⁰⁴. Eine mögliche Ursache dafür könnte die mit dem Längengrad abnehmende Menge Sonnenlichts sein, der man ausgesetzt ist, da die UV-Strahlung nicht nur Einfluss auf immunregulatorische Zellen nimmt, sondern auch für die Produktion von Vitamin D essentiell ist, welches als natürlicher Inhibitor von Multipler Sklerose angesehen wird²⁰⁵. Auch die Melatoninausschüttung hängt vom Sonnenlicht ab. Ein Mangel an Sonnenlicht führt zu einem Überfluss an Melatonin, welches Th1-Antworten erhöht.

Die geographische Verteilung der Krankheit spiegelt auch die ökonomische Ebene des Landes wider: In Asien ist die Rate von Ausbrüchen Multipler Sklerose eher gering, wobei die höchste Prävalenz in Japan, dem am höchsten entwickelten Land, auftritt. Generell erhöhen sich die Verbreitungsraten mit zunehmender Industrialisierung, Urbanisierung und

Umweltverschmutzung eines Landes. Nicht nur eine Veränderung der Ernährungsweise oder der reduzierte Kontakt zu UV-Strahlen, sondern der verspätete beziehungsweise gänzlich fehlende Kontakt zu Kindheitserkrankungen könnte ein weiterer wichtiger Faktor bei der Entwicklung von Multipler Sklerose sein, was zur sogenannten 'Hygienehypothese' führt. Demnach kann es dabei zu verzogenen Immunantworten und zum Hang, Autoimmunkrankheiten oder Allergien auszubilden kommen. Obwohl sie durch Untersuchungen an anderen Autoimmunkrankheiten, wie beispielsweise Typ 1 Diabetes oder der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), einer der Multiplen Sklerose sehr ähnlichen Krankheit im Mausmodell, gestützt wird, kann diese Hypothese nur sehr schwer bewiesen werden¹⁸⁰.

1.2.5 Infektiöse Wirkstoffe als Auslöser für Multiple Sklerose

In Hinblick auf die äußeren Einflüsse, die zum Ausbruch von Multipler Sklerose führen können ist es logisch anzunehmen, dass bakterielle oder virale Infektionen dabei eine entscheidende Rolle spielen können. Studien haben gezeigt, dass auf Multiple Sklerose-Rückfälle oftmals virale Infektionen folgen²⁰⁶. In diesem Zusammenhang konzentriert sich der Fokus auf Viren, von denen bekannt ist, dass sie demyelinisierende Krankheiten auslösen können, wie beispielsweise das JC Papovavirus, das die Progressive Multifokale Leukoenzephalopathie hervorruft, das Masernvirus, das Auslöser für die Postinfektiöse Enzephalitis und die Subakute Sklerosierende Panencephalitis (SSPE) ist, das Herpes Simplex Virus (HSV) oder HIV^{207,208}. Die letzteren beiden Viren persistieren im menschlichen Körper und gerade HSV ist dafür bekannt, dass es einen ausgeprägten Neurotropismus hat und die Tendenz besitzt, latente, wiederkehrende Infektionen zu verursachen. Aus diesem Grund wurden das Humane Herpesvirus 6 (HHV6) und das Epstein-Barr-Virus (EBV) genauer auf ihren Zusammenhang mit Multipler Sklerose untersucht, da die Seroprävalenz innerhalb der Bevölkerung sehr hoch ist (>80% bei HHV6 und >90% bei EBV).

Das Humane Herpesvirus 6 kann im Menschen eine Meningoenzephalitis verursachen und auch andere Beobachtungen verleiten zu der Annahme, dass das Virus mit Multipler Sklerose in Zusammenhang steht, beispielsweise die Detektion in Oligodendrozyten in Multiple Sklerose-Plaques²⁰⁹ sowie im normalen Gehirn, die Infektion von Astrozyten und der Nachweis von HHV6-DNA im Serum und der ZSF von Multiple Sklerose-Patienten²¹⁰. Zwar weisen die Ergebnisse der Untersuchungen von DNA und die serologischen Daten

untereinander Diskrepanzen auf, jedoch kann das unter Umständen mit der Existenz zweier verschiedener Stämme des HHV6 erklärt werden. HHV6 Variante A zeichnet sich durch einen höheren Neurotropismus aus und kann in Patienten erhöhte lymphoproliferative Immunantworten auslösen²¹¹. Ebenso konnte seine DNA in der ZSF nachgewiesen werden.

Auch EBV wird mit Multipler Sklerose in Zusammenhang gebracht. So wurde in Patienten ein erhöhter Titer an anti-EBV-Antikörpern gemessen und auch die Seropositiv-Rate lag bei Multiple Sklerose-Patienten bei 100%, im Vergleich zu den 90% der gesamten Bevölkerung. Des Weiteren erleiden Patienten mit latenter EBV-Infektion häufiger eine Reaktivierung des Virus, was mit Multiple Sklerose-Rückfällen korreliert²¹². Die Menge von anti-EBV Immunglobulin G (IgG) im Serum vor dem Ausbruch der Multiplen Sklerose hat sich als eine zuverlässige Vorhersagemethode für die Anfälligkeit gegenüber der Krankheit herausgestellt. Die durch EBV ausgelöste infektiöse Mononukleose ist in Patienten mit Multipler Sklerose häufiger als in anderen Individuen und das Risiko, an Multipler Sklerose zu erkranken steigt, wenn man in jungen Jahren an infektiöser Mononukleose erkrankt war²¹³.

Als weitere mögliche Auslöser der Krankheit wurden das Herpes Simplex Virus 1 (HSV1) und das Varicella Zoster Virus (VZV) gehandelt was vor allem an Untersuchungen von Antikörpern in der ZSF und an der Tatsache, dass VZV eine demyelinisierende Form der Enzephalitis auslösen kann, festgemacht wurde^{214,215}. Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen deuten jedoch darauf hin, dass es keine Verbindung zwischen VZV und Multipler Sklerose gibt²¹⁶.

Unter den Bakterien wurde *Chlamydia pneumoniae* als möglicher infektiöser Stoff in Zusammenhang mit Multipler Sklerose behandelt²¹⁷. Auch hier gibt es verschiedene Ergebnisse, die einen Nachweis von *C. pneumoniae* in der ZSF verifizieren²¹⁸ oder falsifizieren²¹⁹.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es nicht möglich ist einen einzelnen Mikroorganismus als Auslöser für die Multiple Sklerose zu identifizieren. Die Komplexität der Krankheit legt nahe, dass es sich wenn, dann vielmehr eine Kombination aus mehreren mikrobiellen Infektionen benötigt, um die Krankheit ausbrechen zu lassen.

1.2.6 Mechanismen zur Induktion von Multipler Sklerose über infektiöse Wirkstoffe

Um die Induktion von Multipler Sklerose über infektiöse Agenzien zu erklären, wurden zwei Mechanismen aufgestellt: Eine Möglichkeit wäre Molekulare Mimikry, bei der autoreaktive Zellen durch eine Kreuzreaktivität zwischen Selbst- und Fremdanitigenen aktiviert werden. Die andere Möglichkeit ist die sogenannte ‚*bystander activation*‘, bei der autoreaktive Zellen durch unspezifische inflammatorische Vorgänge, die während einer Infektion auftreten, aktiviert werden. Des Weiteren wird gemutmaßt, dass Multiple Sklerose aus einer Kombination aus diesen beiden Möglichkeiten ausgelöst werden kann.

1.2.6.1 Molekulare Mimikry

Die Aktivierung autoreaktiver T- und B-Zellen über Kreuzreaktivität zwischen Selbst- und Fremdanitigenen wird als Molekulare Mimikry bezeichnet. Die Erkennung von Selbst-Antigenen durch T-Zellen mit durchschnittlicher Affinität führt während der T-Zell-Selektion im Thymus zu einer positiven Selektion, weshalb diese T-Zellen in die Peripherie exportiert werden. Kreuzreaktivität dieser potentiellen selbstreaktiven T-Zellen mit fremden Antigenen kann während einer Infektion zu ihrer Aktivierung führen. Nach der Passage der Blut-Hirn-Schranke (BHS) infiltrieren sie das zentrale Nervensystem, wo sie Antigene, die im Gehirn exprimiert werden erkennen, was zu schweren Gewebeschäden und möglicherweise zu einer Autoimmunerkrankung wie der Multiplen Sklerose führen kann (**Abb. 1.6**).

Ein möglicher Kandidat für ein Autoantigen bei Multipler Sklerose ist das Myelin-Basische Protein (MBP), das stark mit der Krankheit in Zusammenhang gebracht wird¹⁸³. MBP-spezifische T-Zellen können sowohl aus Multiple Sklerose-Patienten als auch aus gesunden Individuen isoliert werden²²⁰⁻²²². Jedoch zeigten die T-Zellen aus Multiple Sklerose-Patienten in ihrem Aktivierungszustand, dem proinflammatorischen Phänotyp und der erhöhten Antigenavidität, so dass es nahe liegt, dass diese T-Zellen *in vivo* aktiviert wurden. Zunächst ging man davon aus, dass die humorale und zelluläre Immunantwort äußerst spezifisch ist und dass deshalb eine komplette Übereinstimmung zwischen MBP und dem fremden Protein vorliegen muss.

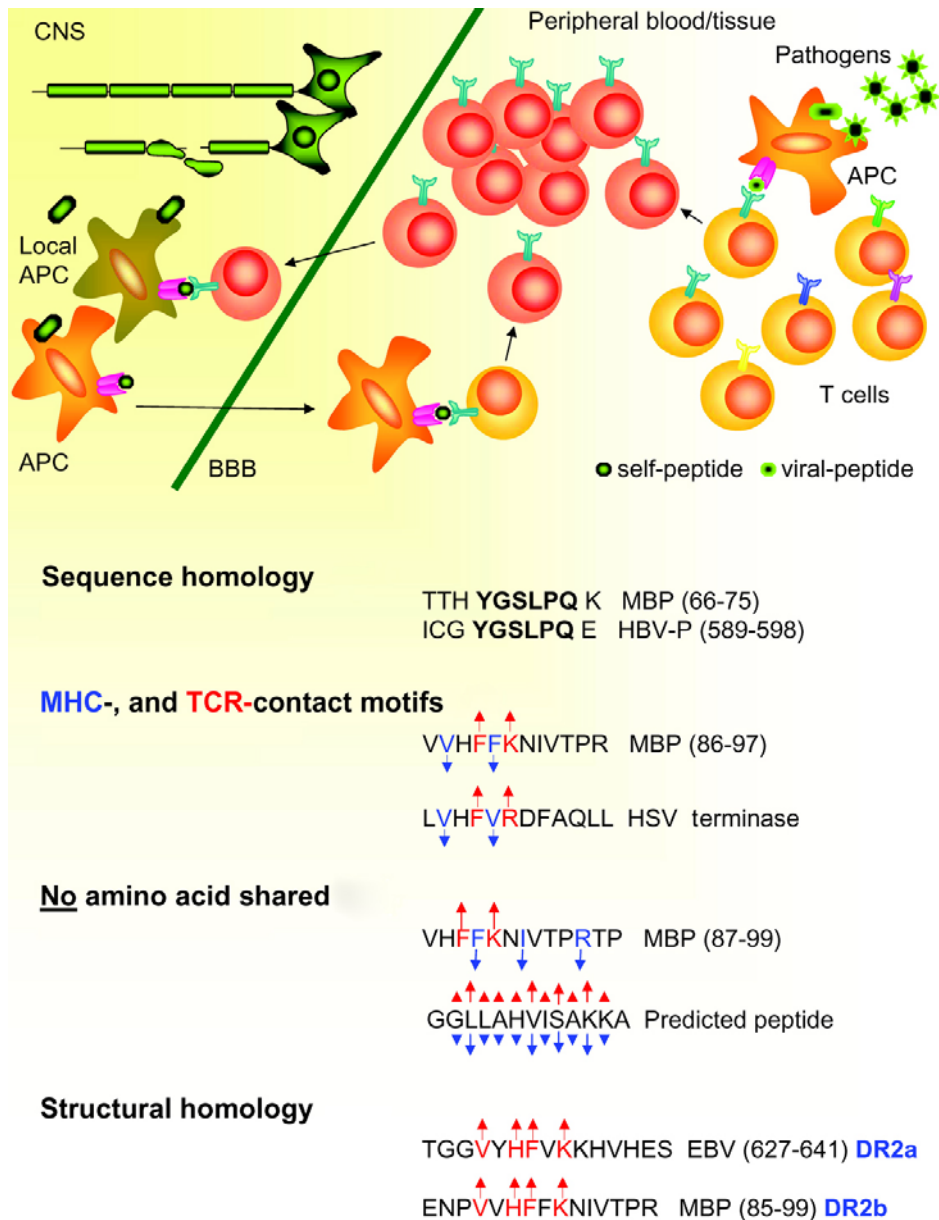


Abb. 1.6: Molekulare Mimikry. Das Modell der Molekularen Mimikry und Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen über Kreuzreaktivität mit körperfremden Peptiden. Die Kreuzreaktivität kann hervorgerufen werden durch teilweise Sequenzübereinstimmungen zwischen körpereigenen und körperfremden Peptiden, durch MHC- und TCR-Kontaktmotive, durch strukturelle Ähnlichkeiten sowie durch ein vorhergesagtes Peptid, das keine Aminosäure mehr mit dem körpereigenen Peptid gemeinsam hat. (Modifiziert nach Sospedra und Martin, 2005¹⁸⁰).

Tatsächlich sind Sequenzübereinstimmungen zwischen MBP und einigen viralen Proteinen gefunden worden^{223,224}, jedoch kommt dies zu selten vor, als dass an damit die Molekulare Mimikry erklären könnte. Später fand man heraus, dass einzelne Aminosäurepositionen

wichtiger für die T-Zell-Erkennung sind als andere, und dass einzelne Aminosäuren in bestimmten Positionen deshalb variiert werden können²²⁵. Aufgrund dieser Beobachtung wurde über einen Suchalgorithmus die These aufgestellt, dass Molekulare Mimikry immer dann auftreten kann, solange ein MHC-TZR-Kontaktmotiv bewahrt bleibt. Gestützt wird diese These durch Versuche, in denen MBP-spezifische T-Zell-Klone (*t-cell clone*, TCC) aus Multiple Sklerose-Patienten durch virale und bakterielle Peptide, die ein solches Motiv mit MBP teilen aktiviert werden konnten²²⁶. Basierend auf diesen Ergebnissen konnten sogar T-Zell-Klone, die für das Peptid MBP₍₈₃₋₉₉₎ spezifisch waren mit einem vorhergesagten Peptid stimuliert werden, das an jeder Position einen Aminosäureaustausch erfahren hat²²⁷. Andere Ergebnisse zeigen, dass verschiedene Peptide auf verschiedenen MHC-Molekülen mit einem bestimmten TZR kreuzreagieren können, solange diese Komplexe Übereinstimmungen in Ladungsverteilung und Gesamtform vorweisen²²⁸. Basierend auf diesen Beobachtungen kann man davon ausgehen, dass Kreuzreaktivität ausgelöst durch Molekulare Mimikry häufig in Multipler Sklerose vorkommen könnte.

1.2.6.2 *Bystander Activation*

Die Mechanismen der *bystander activation* können in zwei Kategorien aufgeteilt werden. Die erste Kategorie ist unabhängig vom TZR und aktiviert autoreaktive T-Zellen über inflammatorische Zytokine, Superantigene oder molekulare Mustererkennung, wie beispielsweise Toll-like-Rezeptor (TLR)-Aktivierung. Die zweite Kategorie beinhaltet die Präsentation von Wirtsantigenen und den adjuvantischen Effekt infektiöser Partikel auf APCs. Während einer Infektion werden verschiedene proinflammatorische Zytokine und Chemokine produziert, die virus-spezifische CD8⁺ T-Zellen aktivieren und damit den autoimmunen Prozess in Gang setzen²²⁹. Da die meisten der CD8⁺ T-Zellen jedoch spezifisch für ein virales Antigen sind und die Zytokine in Abwesenheit eines spezifischen Antigens allein nicht ausreichen, um eine Aktivierung und Differenzierung der T-Zellen zu induzieren²³⁰, kann man davon ausgehen, dass es für die *bystander activation* mehrere Mechanismen benötigt, um eine Autoimmunität hervorzurufen.

Superantigene könnten eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die *bystander activation* sein. Es wurde gezeigt, dass diese Stoffe durch Interaktion mit MBP-spezifischen TCCs, die eine bestimmte Form der V β -Kette am TZR besitzt, Rückfälle im EAE-Modell hervorrufen können²³¹.

Ebenso wurde die *bystander activation* durch TLRs beschrieben. Das Lipopolysaccharid (LPS) bindet an TLR4 und initiiert dadurch die angeborene Immunantwort gegen gewöhnliche, gramnegative Bakterien wie beispielsweise *C. pneumoniae*. Im ZNS wird TLR4 hauptsächlich auf Mikroglia exprimiert und kommt auf Astrozyten und Oligodendrozyten nicht vor. Bei Multipler Sklerose kann es während einer bakteriellen Infektion zur Interaktion zwischen TLR4 und LPS kommen, was zur Aktivierung von Monozyten und Mikroglia, das heißt zu adjuvantischen Effekten auf APCs führt. Alternativ kann der LPS-TLR4-Kontakt gegebenenfalls auch autoreaktive T-Zellen in der Peripherie aktivieren, da Bakterien, die ins das Gehirnparenchym injiziert wurden erst nach einer peripheren Sensibilisierung dazu in der Lage waren Immunantworten zu induzieren²³².

Die *bystander activation* kann auch durch das Selbst-Antigene ausgelöst werden, die durch virale Gewebeschädigungen zugänglich gemacht werden. Aktivierte virus-spezifische T-Zellen wandern zum infizierten Gewebe, wo sie virale Epitope erkennen und die infizierten Zellen lysieren. Die dadurch entstehende Zerstörung körpereigenen Gewebes führt zur Freisetzung von Autoantigenen. Die Kombination der Präsentation der Autoantigene zusammen mit dem adjuvantischen Effekt der infektiösen Wirkstoffe kann dann zur *de novo*-Aktivierung Autoreaktiver T-Zellen führen. Dies tritt beispielsweise bei Theilers murinen Enzephalomyelitis-Virus (TMEV) in einem Mausmodell für Multiple Sklerose auf, in dem sich eine anfängliche virusspezifische T-Zell-Antwort ausweitet und während einer persistenten Infektion des ZNS auf Myelinproteine übergreift²³³. Das Ausweiten der T-Zell-Antwort kann dazu führen, dass kryptische Epitope präsentiert werden, die normalerweise nicht als immundominante Epitope prozessiert oder präsentiert würden, die jedoch aufgrund der speziellen Bedingungen, die durch die Virusinfektion hergestellt werden, trotzdem präsentiert werden²³⁴. Während einer viralen Infektion ist die Expression von Selbst-Antigenen im infizierten Gewebe oftmals hochreguliert²³⁵, was zu einer Aktivierung gewebsspezifischer APCs führt. Das Expressionsmuster von Proteasen in diesen APCs kann verändert worden sein, was zur Prozessierung von kryptischen Epitopen führt, die nicht während des regulären Prozessierungswegs hergestellt worden wären²³⁶. Die Expression dieser kryptischen Epitope ist möglicherweise auch für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der Autoimmunantwort wichtig.

Eine letzte Theorie besagt, dass Multiple Sklerose ähnlich wie andere chronische Autoimmunkrankheiten aufgrund der Infektion autoreaktiver B-Lymphozyten durch EBV entsteht. In diesem Modell proliferieren die EBV-infizierten B-Lymphozyten und werden zu latent infizierten B-Zellen, die durch die Expression entsprechender viruscodierter Proteine

apoptoseresistent sind. Die Anwesenheit der infizierten B-Zellen im betroffenen Gewebe kann zu einer Costimulation autoreaktiver T-Zellen führen, was diese Zellen davon abhält, sich aktivierungsinduzierter Apoptose zu unterziehen²³⁷.

1.2.7 Die Rolle der einzelnen Komponenten des Immunsystems

Ebenso wie der Mechanismus, der zur Entwicklung der Multiplen Sklerose führt, ist auch die Rolle der einzelnen Komponenten des Immunsystems bei dieser Krankheit nicht genau bekannt. Dennoch scheinen einigen Bestandteile wichtiger für den Ausbruch und den Verlauf der Krankheit zu sein als andere.

1.2.7.1 CD4⁺ T-Zellen

Bereits 1933 konnte gezeigt werden, dass die Injektion von Rückenmarks- oder Gehirnhomogenisaten in gesunde Primaten eine Krankheit auslösen kann, die der Multiplen Sklerose ähnlich ist²³⁸. Jahrzehnte später wurde durch die Injektion bestimmter Proteinkomponenten der Myelinscheide zusammen mit einem Adjuvans in Mäuse eine akute, chronische oder *relapsing-remitting* Enzephalomyelitis hervorgerufen, die unter dem Überbegriff experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis zusammengefasst wurden²³⁹⁻²⁴¹. Die Beobachtung, dass passiv oder adoptiv transferierte, *in vitro* reaktivierte, myelinspezifische CD4⁺ T-Zellen in gesunden Tieren ebenfalls EAE auslöst führte zu der Annahme, dass Multiple Sklerose eine durch T-Zellen ausgelöste Autoimmunkrankheit sei. Diese These wird durch weitere Beobachtungen gestützt, wie beispielsweise der Nachweis von CD4⁺ T-Zellen im ZNS und der ZSF unter den inflammatorischen Zellen. Auch der genetische Risikofaktor und die Assoziation der Krankheit mit HLA-DR und HLA-DQ ist bekannt (vgl. Abschnitt 1.2.3) und wurde bereits an humanisierten transgenen Mäusen bestätigt²⁴²⁻²⁴⁴. Zuletzt konnten über einen veränderten HLA-Liganden aus MBP₍₈₃₋₉₉₎ kreuzreaktive T-Zellen mit Th1-Phänotyp induziert werden, was zu einer Verschlimmerung der Symptome in Multiple Sklerose-Patienten führte²⁴⁵.

Mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) konnte die ungefähre Zahl der CD4⁺ autoreaktiven T-Zellen auf etwa eine pro 1000 Zellen festgesetzt werden^{246,247}, was über durchflusszytometrische Methoden bestätigt werden konnte²⁴⁸. Ein

Vergleich der Mengen von MBP-spezifischen T-Zellen in Multiple Sklerose-Patienten und gesunden Individuen zeigte, dass die Anzahl in den Patienten stark erhöht war²⁴⁹. Genmutationstests ergaben, dass auch die Anzahl von myelinspezifischen T-Zellen, die eine Mutation in der Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT1) tragen in Patienten im Vergleich zu gesunden Menschen erhöht ist²⁵⁰. T-Zellen mit hoher Avidität zu Myelinproteinen beziehungsweise Myelinpeptiden sind in den Patienten ebenfalls erhöht, was ein Test, bei dem nur geringe Antigenkonzentrationen verwendet wurden, zeigte²⁵¹.

Das im Zusammenhang mit Multipler Sklerose am besten untersuchte Protein ist das Myelin-Basische Protein, welches das zweithäufigste Myelinprotein (~30% - 40%) nach dem Proteolipidprotein ist. Es kommt in fünf Isoformen vor, die zwischen 14 und 21,5 kDa schwer sind und durch differentielles Spleißen des Golli-MBP-Genlokus entstehen²⁵², wobei die häufigste Isoform diejenige mit 18,5 kDa ist. Von MBP ist bekannt, dass es in verschiedenen Nagetieren sowie in Affen EAE induzieren kann²⁵³. Die wichtigsten enzephalitogenen Bereiche sind in **Abbildung 1.7** dargestellt.

Bemerkenswert ist dabei die Überlappung zwischen den Epitopen, die in Nagern und Primaten EAE-assoziierte MHC-Klasse-II-Liganden liefern und den Bereichen aus MBP, aus denen Multiple Sklerose-assoziierte Liganden für die HLA-DR-Allele im Menschen stammen^{254,255}. Es ist bekannt, dass T-Zellen eine große Anzahl an MBP-Epitopen, die auf verschiedenen MHC-Molekülen präsentiert werden, erkennen können²⁵⁶. Vor allem die beiden MBP-Epitope MBP₍₈₃₋₉₉₎ und MBP₍₈₄₋₁₀₂₎ sind häufige Liganden auf vielen Multiple Sklerose-assoziierten HLA-DR-Molekülen²⁵⁷⁻²⁵⁹, doch auch andere Regionen scheinen kombiniert mit bestimmten HLA-DR-Molekülen immundominanten Charakter zu besitzen.

Das Proteolipid-Protein (PLP) ist das am häufigsten vorkommende Myelinprotein im ZNS (~50%) und ist in allen Spezies hochkonserviert. In Mäusen existieren zwei Isoformen, eine mit der vollen Länge von 271 Aminosäuren und die Isoform DM-20, die um 35 Aminosäuren kürzer ist als das komplette Protein. DM-20 wird hauptsächlich im Gehirn und im Rückenmark exprimiert, aber auch in den lymphoiden Organen, wo das komplette Protein kaum zu finden ist. Die unterschiedliche periphere Expression ist wichtig für eines der hauptenzephalitogenen und immundominanten Peptide aus PLP, PLP₍₁₃₉₋₁₅₄₎, das nur im kompletten Protein und nicht in der DM-20-Variante vorkommt und deshalb nicht für die negative Selektion im Thymus zur Verfügung steht^{260,261}. Entsprechend können große Mengen spezifische T-Zellen gegen dieses Peptid in Mäusen detektiert werden^{261,262}. Im

Vergleich zu MBP ist PLP stärker enzephalitogen und es gibt neben PLP₍₁₃₉₋₁₅₄₎ noch eine Vielzahl weitere Peptide, die in Mäusen als EAE-assoziiert identifiziert wurden^{263,264}. Auch im Menschen wurden einige PLP-Liganden im Zusammenhang mit den Multiple Sklerose-assoziierten DR2-Allelen als immundominant identifiziert^{265,266}. Vor allem PLP₍₁₃₉₋₁₅₁₎ und PLP₍₁₇₈₋₁₉₁₎ gelten als Ziele für hochavide CD4⁺ T-Zellen und sind in Multiple Sklerose-Patienten deutlich erhöht²⁵¹.

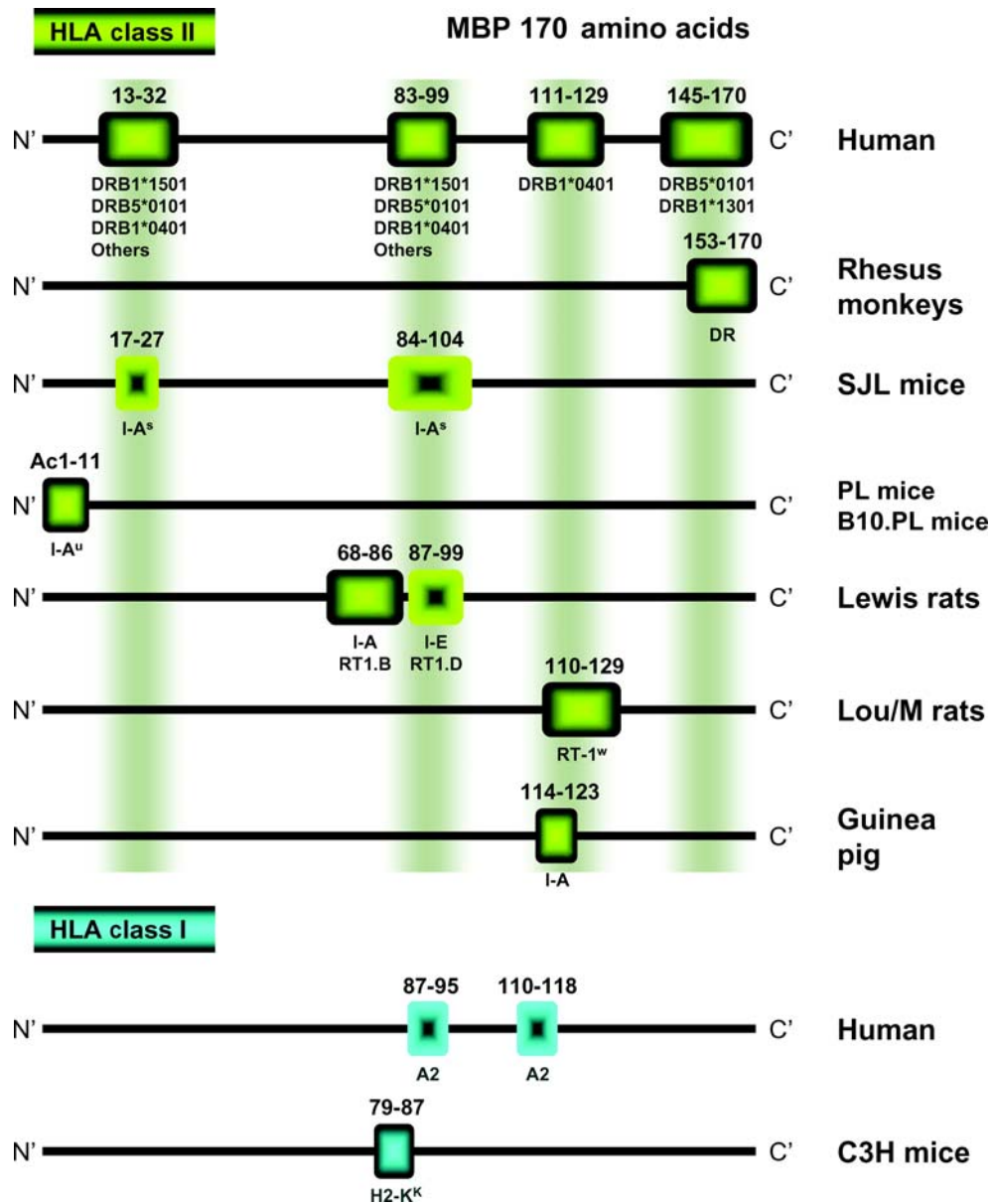


Abb. 1.7: Immundominante Regionen in MBP. Die Regionen, die bei dem MBP als immundominant identifiziert wurden sind in vielen Spezies hochkonserviert. MHC-Klasse-II-restringierte Epitope sind in grün, Epitope, die auf MC-Klasse I und in EAE-Modellen präsentiert werden in blau dargestellt. (Sospedra und Martin, 2005¹⁸⁰)

Neben den beiden abundantesten Myelinproteinen gibt es noch etliche andere Proteine, die in Verdacht stehen, potentielle Auslöser für Multiple Sklerose zu sein. So konnten beispielsweise für das Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG) über einen ELISPOT-Assay spezifische T- und B-Zellen in der ZSF von Patienten nachgewiesen werden²⁶⁷, und auch für das Myelin-assoziierte Oligodendrozytische Basische Protein (MOBP) wurde eine immundominante Region identifiziert²⁶⁸.

1.2.7.2 CD8⁺ T-Zellen

Über die Funktion von CD8⁺ T-Zellen bei der Multiplen Sklerose ist nur sehr wenig bekannt. Aufgrund ihrer Effektorfunktionen sind sie jedoch bedeutend besser dazu geeignet Gewebeschäden anzurichten als CD4⁺ T-Zellen. So ist nur von Mikrogliazellen bekannt, dass sie MHC-Klasse-II exprimieren und dass MHC-II auf Astrozyten durch IFN- γ induziert werden kann¹⁹⁹. Oligodendrozyten und Neuronen exprimieren nur MHC-Klasse-I und können deshalb nur von CD8⁺ T-Zellen bemerkt werden^{269,270}. Des Weiteren konnten oligoklonale Ausbreitungen von CD8⁺ Memory-T-Zellen in der ZSF¹⁹⁹ und im Gehirn²⁷¹, sowie persistente CD8⁺ T-Zell-Klone in CSF und im Blut nachgewiesen werden²⁷¹. Überhaupt ist die Zahl der CD8⁺ T-Zellen im Gehirn höher als die der CD4⁺ T-Zellen²⁷². Es wurde gezeigt, dass MHC-Klasse-I in funktionell beeinträchtigten Neuronen induziert werden kann²⁷³ und dass Neuronen direkt von Virus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen über Fas/Fas-L-vermittelte Zytolyse lysiert werden können²⁷⁰.

Aus den Multiple Sklerose-assoziierten Proteinen MBP und PLP sowie anderen Proteinen wurden Epitope für CD8⁺ T-Zellen beschrieben^{248,274,275}. Entsprechend ist die zytotoxische T-Zell-Antwort gegen MBP in Multiple Sklerose-Patienten erhöht²⁷⁶. Somit steht fest, dass CD8⁺ T-Zellen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Multiplen Sklerose spielen, auch wenn der genaue Mechanismus dafür nicht bekannt ist.

1.2.7.3 B-Zellen und Antikörper

Die Beobachtung, dass Immunglobuline in Multiple Sklerose-Patienten erhöht sind ist ein Anzeichen dafür, dass B-Zellen und Antikörper an der Entwicklung der Krankheit beteiligt sind²⁷⁷. B-Zellen sind nicht dazu in der Lage, die intakte Blut-Hirn-Schranke zu passieren.

Sobald die inflammatorischen Prozesse jedoch einmal angefangen haben, können B-Zellen, Antikörper und andere Bestandteile des Komplementsystems in das ZNS gelangen. Da die Immunglobuline nur in der ZSF und nicht im Serum von Patienten nachgewiesen wurden deutet das auf eine lokale Produktion der Stoffe hin. Untersuchungen der variablen Region der Immunglobuline der B-Zellen zeigten, dass viele der in der ZSF und in Läsionen vorkommenden B-Zellen die variable schwere Kette Typ 4 exprimieren²⁷⁸⁻²⁸⁰, was eine Aktivierung durch ein bestimmtes Antigen nahe legt.

B-Zellen und Antikörper können auf verschiedene Weise zur Pathogenese von Multipler Sklerose beitragen: B-Zellen können autoreaktiven T-Zellen als APCs dienen^{281,282} und autoreaktive T-Zellen in das ZNS rekrutieren²⁸³. In den Plaques von Multiple Sklerose-Patienten und in Bereichen aktiver Demyelinisierung konnten B-Zellen, Plasmazellen und myelinspezifischen Antikörper nachgewiesen werden²⁸⁴⁻²⁸⁶. Die Produktion myelinspezifischer Antikörper und die Zerstörung von Myelin innerhalb der Plaques ist wohl der wichtigste Mechanismus, über den B-Zellen zur Pathogenese von Multipler Sklerose beitragen. Die Demyelinisierung kann über zwei verschiedene Wege erfolgen: Entweder über Opsonisierung und Phagozytose²⁸⁷⁻²⁸⁹ oder über Komplementaktivierung, was zur Ablagerung eines Membran-Angriffs-Komplexes (*membrane attack complex*, MAC) und zur Komplement-vermittelten Zytolyse führt²⁹⁰. Die genaue Antigen-spezifität beziehungsweise Antigen-spezifitäten der Antikörper sind nicht bekannt. Neben den beiden Hauptbestandteilen des Myelins, MBP^{291,292} und PLP^{293,294} scheint ein drittes Myelinprotein, das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) ein vielversprechender Kandidat für ein B-Zell-Autoantigen in der Multiplen Sklerose zu sein. Für Anti-MOG-Antikörper wurde gezeigt, dass sie in der EAE dazu in der Lage sind, Myelin zu zerstören²⁹⁵⁻²⁹⁸, was mit Antikörpern, die gegen MBP oder PLP gerichtet sind nicht gelingt²⁹⁹. Auch die B-Zell-Antwort gegen MOG ist bei der Multiplen Sklerose erhöht^{300,301}.

1.2.7.4 NK-Zellen

Bereits 1980 hat man herausgefunden, dass zwischen Multipler Sklerose und einer verringerten NK-Zell-Aktivität ein Zusammenhang besteht³⁰². Gerade kurz vor und während der akuten Verschlimmerung ist die NK-Lyse im Vergleich zur chronischen Phase der Krankheit verringert^{303,304}. Generell ist die Anzahl an NK-Zellen in Patienten reduziert³⁰⁵ und es bestehen in Multiple Sklerose-Patienten Defizite von NK-Zellen im peripheren Blut, in den

Plaques und in der ZSF³⁰⁶. Die Depletion von NK-Zellen führte in zwei verschiedenen EAE-Modellen zu einer Verschlimmerung der Krankheit^{307,308}, wohingegen der Transfer von *in vitro*-generierten NK-Zellen zu einer Verbesserung der Autoimmunität führte³⁰⁹. Grund hierfür könnte die Unterdrückung der Autoimmunität über Zytokinproduktion durch NK-Zellen sein.

1.2.8 Die Pathogenese der Multiplen Sklerose

Nach dem heutigen Stand der Forschung verläuft die Pathogenese der Multiplen Sklerose in etwa folgendermaßen: Im ersten Schritt werden autoreaktive CD4⁺ T-Zellen in der Peripherie aktiviert, indem sie beispielsweise ein virales Peptid, das im Zusammenhang mit der Costimulation steht erkennen. Dazu kommen noch andere, weniger genau definierte Signale (**Abb. 1.8**). Die Faktoren, die zu der proinflammatorischen Umgebung beitragen beinhalten verschiedene Zytokine wie IL-12 oder IFN- γ , die von T-Zellen und APCs produziert werden, die Stärke der Aktivierung und den infektiösen Kontext. Die autoreaktiven T-Zellen adhären an das Endothel der Blut-Hirn-Schranke über die Adhäsionsmoleküle LFA-1 und VLA-4 und wandern über zerebrovaskuläre Endothelzellen in das Gehirn ein. Wie genau dies vonstatten geht ist nicht bekannt, gegebenenfalls spielt Antigenpräsentation in den Halslymphknoten eine Rolle, oder aber es existiert während der Anfangsphase der Krankheit ein Chemokingradient aus dem Inneren des Gehirnparenchyms in Richtung Blut, der die Migration auslöst³¹⁰. Zytokine (IFN- γ , IL-23, TNF- α oder LT) und Chemokine (RANTES, IP-10, IL-8, u.a.) aktivieren im Gehirn ansässige Zellen wie Mikroglia-Zellen oder Astrozyten und rekrutieren andere Immunzellen, darunter Monozyten, CD8⁺ T-Zellen, B-Zellen und Mastzellen aus dem peripheren Blut, was zur Ausbildung einer inflammatorischen Läsion führt. Diese zeichnet sich durch eine offene Blut-Hirn-Schranke mit Gewebeödemen aus, die einerseits durch Mediator- und Proteaseabgabe durch Mastzellen, Monozyten und T-Zellen, und andererseits durch eine Gruppe proinflammatorischer Proteine sowie durch Sauerstoff- und Stickstoffradikale entstehen. Bereits in diesem frühen Stadium findet die Schädigung der Myelinscheide, der Oligodendrozyten und der Axone statt.

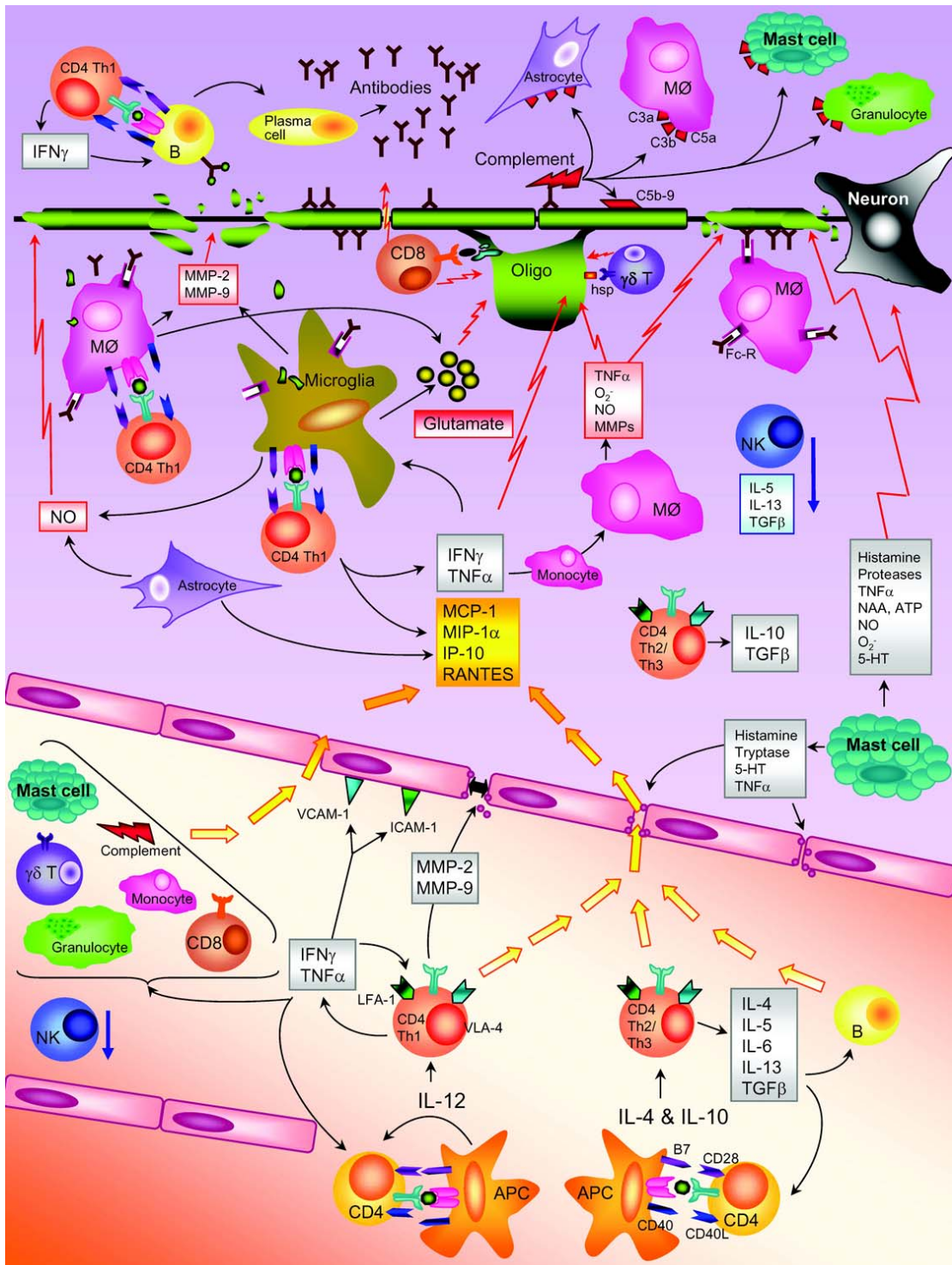


Abb. 1.8: Pathogenese der Multiplen Sklerose. Schematische Darstellung der verschiedenen Schritte der Pathogenese inklusiver der daran beteiligten Faktoren, die zur Gewebeschädigung führen. (Sospedra und Martin, 2005¹⁸⁰)

Während der ersten Schritte sind autoreaktive CD4⁺ T-Zellen die Hauptantriebskraft der autoreaktiven Prozesse, wohingegen ihre Rolle in der Effektorphase eher zweitrangig ist.

Zahlreiche Prozesse können an der Beschädigung und Zerstörung von Myelin, Oligodendrozyten und Axonen beteiligt, wie beispielsweise Radikale, TNF- α , LT, direkte Komplementanlagerungen, antikörpervermittelte Komplementaktivierung, antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität über die FC-Rezeptoren, Myelin-Phagozytose, die direkte Lyse von Axonen durch CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten, der Absonderung von Proteasen und Apoptose der Oligodendrozyten. Des Weiteren führt die erhöhte Produktion und der verringerte Abbau beziehungsweise die Wiederaufnahme des stimulierenden Neurotransmitters Glutamat durch Astrozyten zu einer glutamatvermittelten Excitotoxizität bei Oligodendrozyten aufgrund eines durch den Glutamatrezeptor ausgelösten Calciumeinstroms in die Zelle¹⁸⁵.

Dieser inflammatorische Zustand hält einige Tage bis ungefähr zwei Wochen an. Die Folgezeit ist durch die Ausdehnung der demyelinisierten Axone, apoptotische Oligodendrozyten und T-Zellen, Durchtrennung der Axone, was zu einer Unterbrechung des axonalen Transports führt³¹¹, sowie durch Makrophagen die mit phagozytierten Myelinlipiden beladen sind und durch die Aktivierung und beginnende Proliferation von Astrozyten gekennzeichnet.

In den aufgetretenen Läsionen sind Th2/Th3-Zytokine wie IL-10 oder TNF- β genauso deutlich erhöht wie die Sekretion diverser Wachstumsfaktoren wie der *brain-derived growth factor*, der *platelet-derived growth factor*, der *ciliary neurotrophic factor* und der *fibroblast growth factor* durch dort ansässige Zellen sowie durch T-Zellen. Vorläuferzellen von Oligodendrozyten, die im ausgewachsenen Gehirn immer noch vorhanden sind werden ebenso aktiviert und überlebende Oligodendrozyten beginnen damit, demyelinisierte Nervenknäuel wieder zu myelinisieren. Die ursprüngliche Dicke des kompakten Myelins kann dabei aber nicht wieder hergestellt werden, was an einer abweichenden isoformen Zusammensetzung des neuen Myelins sowie an anderen posttranslationalen Modifikationen liegt³¹², weshalb die Nervweiterleitung in diesen Bereichen verlangsamt ist.

In den Monaten und Jahren, die auf ein inflammatorisches Ereignis folgen verändert sich die zelluläre Zusammensetzung eines Plaques dramatisch: Chronische Plaques zeigen Anzeichen von schwelenden Entzündungsprozessen, sind aber oftmals frei von inflammatorischen Zellen und zeichnen sich durch den Verlust von Myelin und von Axonen aus. Die Anzahl der Astrozyten nimmt zu, die Zelldichte insgesamt jedoch ab und es kommt zur Bildung von Narbengewebe.

Die genaue zelluläre Zusammensetzung eines Plaques und die darin verwickelten molekularen Signalwege variieren zwischen einzelnen Patienten. Inzwischen unterscheidet

man aus pathologischer Sicht zwischen vier verschiedenen Subtypen der Multiplen Sklerose, die sich anhand der Verteilung der verschiedenen Immunzellen, der Antikörper- und Komplementverteilung, der Demyelinisierung und dem Absterben der Oligodendrozyten unterscheiden³¹³:

Subtyp I. In diesem Subtyp kommen vor allem T-Zellen und Makrophagen vor. Effektormoleküle beinhalten TNF- α , IFN- γ und Radikale.

Subtyp II. In diesem Subtyp sind überwiegend MBP- und MOG-spezifische Antikörper sowie Komplementanlagerungen vorhanden.

Subtyp III. Die Läsionen dieses Subtyps entstehen durch den Verlust des Myelin-assoziierten Glykoproteins und durch Oligodendrogliopathie. Die Verwundbarkeit der Oligodendrozyten in diesem Subtyp wird durch die Immunantwort gegen Hitzeschock-Proteine erhöht.

Subtyp IV. Dieser Subtyp kennzeichnet sich durch nicht-apoptotischen Abbau von Oligodendrozyten und kommt vorwiegend in der primär-progressiven Form der Multiplen Sklerose vor. Unter allen Subtypen ist der vierte der seltenste.

Diese Unterteilung verdeutlicht, dass es sich bei der Multiplen Sklerose um eine komplexe Autoimmunkrankheit handelt, die starke individuelle Unterschiede zwischen einzelnen Patienten aufweist. Die Rolle aller beteiligten Agonisten sowie deren Zusammenspiel während der einzelnen Phasen des Krankheitsverlaufs ist noch längst nicht verstanden, weshalb es wohl noch einige Jahre dauern wird, bis man wirksam gegen die Multiple Sklerose vorgehen kann.

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Identifikation neuer MHC-Liganden steht in dieser Arbeit im Vordergrund. Mit der Beschaffung neuer Massenspektrometer war es notwendig, diese auf die speziellen Analysemethoden abzustimmen, die für die erfolgreiche Charakterisierung von MHC-präsentierten Peptiden benötigt werden. Nach der Entwicklung neuer und der Verbesserung bestehender Methoden wurden ‚*large scale*‘-Analysen von Zelllysaten durchgeführt, um Hinweise darauf zu erlangen, wie viele Peptide jetzt auch bei kleinen Probenmengen sequenziert werden können. In diesem Zusammenhang wurde auch eine Software getestet, über die diese Sequenzierung automatisiert ablaufen soll.

Ein zweites Projekt widmet sich der Analyse von MHC-Klasse-II-Liganden, die in den Gehirnen von Multiple Sklerose-Patienten präsentiert werden. Da die genauen Mechanismen der Zerstörung der Myelinscheiden an Axonen immer noch nicht bekannt sind und potentielle Liganden für CD4⁺ T-Zellen im Menschen kaum beschrieben sind, bestand mit diesem Projekt die Möglichkeit, potentielle T-Zell-Epitope zu entdecken und diese in einem Mausmodell zu überprüfen.

Zuletzt sollen noch verschiedene Zelllinien auf die Präsentation von HLA-Liganden des tumorspezifischen Proteins Survivin untersucht werden. Diese Liganden, die ebenfalls potentielle T-Zell-Epitope darstellen könnten als zukünftige Grundlage für eine Peptidvakzine gegen verschiedenste Krebsarten wie beispielsweise das Nierenzellkarzinom dienen.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

0,2 μm -Sterilfilter	Millipore, Schwalbach
1-([H ₄]Nicotinoyloxy)-Succinimid	Institut für Anorganische Chemie, Tübingen
1-([D ₄]Nicotinoyloxy)-Succinimid	Institut für Anorganische Chemie, Tübingen
10% Ammoniumpersulfat	Sigma, München
10 μl -Quarzküvette	Hellma, Müllheim
100 \times nicht-essentielle Aminosäuren	Sigma, München
1 ml- / 50 ml-Spritze Plastipak TM	Becton Dickinson, Heidelberg
40% Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (29:1)	Roth, Karlsruhe
15 ml- und 50 ml-Röhrchen	greiner bio-one, Frickenhausen
Antikörper, rabbit α - β_2 -Mikroglobulin	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Antikörper, α -MHC-Klasse-I, W6/32	Immunologie Tübingen
Antikörper, α -MHC-Klasse-II, L243	Immunologie Tübingen
Antikörper, α -rabbit, horseradish peroxidase, F(ab) ₂ Fragment	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe

CHAPS	Roche, Mannheim
CNBr-acticated Sepharose 4B	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Diamond Tips, 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Gilson, Inc., Middleton, WI, USA
FCS	WAA Laboratories, Cölbe
Filterpapier Whatman 3mm	Whatman, Maidstone, UK
[Glu1]-Fibrinopeptid B	Sigma, München
Glutamin	PAA Laboratories, Cölbe
Hydroxylamin	Sigma, München
Mikrolitersprizen Hamilton Gastight Syringe	CS – Chromatographie Service GmbH, Langerwehe
LC-MS-ACN J.T.Baker	Th. Greyer GmbH, Renningen
LC-MS-Wasser, J.T. Baker	Th. Greyer GmbH, Renningen
LC-MS-Wasser, LiChrosolv	Merck, Darmstadt
Membranfilter diverser Größen	Sartopure, Epsom, UK
Nitrozellulosemembran Hybond ECL	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Nonidet-P40	Sigma, München
O-Methyl-Isothioharnstoff	Acros Organics, Geel, Belgien
Pasteurpipette, 230mm	Fortuna, Wertheim
PBS	Immunologie Tübingen
Penicillin-Streptomycin-Mix, je 10 mg/ml	PAA Laboratories, Cölbe
Peptide Cleanup C18 Spin Tubes	Agilent, Palo Alto, CA, USA
Proteaseinhibitor-Tabletten „complete“	Roche, Mannheim
Quarzküvetten, Schichtdicke 10 mm, Zentrum 15 mm	Hellma, Müllheim
Reaktionsgefäße diverser Größen	Eppendorf, Hamburg
RPMI-Medium	Immunologie Tübingen
See Blue Plus 2 Prestained Standard	Invitrogen, Karlsruhe
TFA	Applied Biosystems, Foster City, USA
TEMED	Sigma, München
Trypanblaulösung (0,05% w/v)	Gibco, Karlsruhe
Universalindikator pH 0-14	Merck, Darmstadt
Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus	NEN Life Science Products, Boston, USA
Zellkulturflaschen 100, 250, 550 ml, steril	greiner bio-one, Frickenhausen
Zentrifugalkonzentratoren Amicon Ultra-15	
Centrifugal Filter Units, 10 kDa	Millipore, Schwalbach
Zentrifugalkonzentratoren centricon filtrators 10	Millipore, Schwalbach
Zytochrom C-Verdau mit Trypsin	Dionex / LC Packings, Germering

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

2.1.2 Geräte und Zubehör

Branson Sonifier 250	Branson Ultrasonics, Danbury, USA
ABI 433A Peptide Synthesizer	Applied Biosystems, Foster City, USA
ABI „Procise“ 494A Protein Sequencer	Applied Biosystems, Foster City, USA
Autosampler MikroAS	Spark Holland, Emmen, Niederlande

Economy Peptide Synthesizer EPS221	ABIMED, Langenfeld
<i>fused-silicia</i> - μ Kapillarsäule	
(5 μ m C18, 75 μ m ID x 250mm)	Dionex / LC Packings, Germering
Gelkammer Mini-Protean II Electrophoresis Cell	Bio-Rad, München
Glashomogenisator	Sartorius, Göttingen
Q-TOF-Massenspektrometer, Typ Q-TOF I	Waters / Micromass, Manchester, UK
Q-TOF-Massenspektrometer, Typ Q-TOF Ultima	Waters / Micromass, Manchester, UK
Image-Station LAS-1000	FujiFilm, Düsseldorf
37°C Inkubator, 7,5% CO ₂ -Begasung	
Forma Scientific	Labotect, Göttingen
Kühlzentrifuge RC 5C Plus,	
Rotor SLA 3000, Rotor GS-3	Sorvall, Langenselbold
Lichtmikroskop	Leica DMIL Leica, Bensheim
Lyophilisieranlage Vaco5	ZIRBUS, Bad Grund
Magnetrührer RCT basic	IKA, Staufen
Membran-Vakuumpumpe	Vacuubrand, Wertheim
Mini-Tischzentrifuge	Qualitron, KOR
NanoLC-2D	Eksigent, Dublin, CA
<i>offline</i> -ESI-Nadel Medium Capillaries	
Q-TOF ES387	Proxeon, Odense, DK
<i>online</i> -ESI-Nadel, SilicaTips for Micromass	
ZSpray NanoFlow (D), 360/20 μ m OD/ID	
Kapillare, 10 μ m ID Auslassöffnung,	
distal coating	New Objective, Woburn, USA
<i>online</i> -ESI-Nadel SilicaTips for Thermo Finnigan	
Nanospray Ion Source 1(N) 360/20 μ m	
OD/ID Kapillare, 10 μ m ID	
Auslassöffnung, normal coating	New Objective, Woburn, USA
Orbitrap-Massenspektrometer,	
Typ LTQ Orbitrap XL	Thermo Fisher Scientific, Bremen
Peristaltische Pumpe P-1	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
pH-Meter 765	Knick, Berlin-Zehlendorf
Rollergestell	
Rotator	Bachofer, Reutlingen
Schütteltisch Duomax 1030	Heidolph Instruments, Schwalbach
Semi-Dry-Elektroblotgerät Transfer-Blot	
Kammer SD1	CTI, Idstein
Spannungsquelle Power Pac 200	Bio-Rad, München
SpeedVac Vacuum Concentrator	Bachofer, Reutlingen
Sterilbank Technoflow	Integra Biosciences, Fernwald
Thermoschüttler Thermometer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischkühlzentrifuge Biofuge 13	Heraeus, Hanau
Tischkühlzentrifuge Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Tischkühlzentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau
Tischkühlzentrifuge Megafuge 2.0	Heraeus, Hanau
Ultrazentrifuge L-80, Rotor Ti45, Rotor Ti70	Beckman Coulter, Krefeld
UV-Spektrometer Ultrospec 3000	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Wasserbad Thermomix BM-S	Braun Biotech, Göttingen
Vortexer Minishaker MS 1	IKA, Staufen
Vorsäule C-18-Material, 300 μ m, 10 mm	Dionex / LC Packings, Germering
Zählkammer Neubauer, Tiefe 0,1 mm	LO - Laboroptik, Friedrichsdorf

2.1.3 Software

Image Gauge V3.0	FujiFilm, Dortmund
Image Reader LAS-1000 V1	FujiFilm, Dortmund
LTQ Tune	Thermo Fisher Scientific, Bremen
Mascot Server, V2.2	Matrix Science, London, UK
MassLynx, V4.0, SP4	Waters / Micromass, Manchester, UK
Proteome Discoverer V1.1.0 263	Thermo Fisher Scientific, Bremen
Xcalibur, V2.0.7, SP1	Thermo Fisher Scientific, Bremen

2.1.4 Puffer und Lösungen

Anodenpuffer	50 mM Natriumtetraborat 20% Methanol pH auf 9,0 einstellen
2x Aufschlusspuffer	200 ml PBS 0,6% CHAPS 3 Tabletten Proteaseinhibitoren „complete“
Coomassie Blue Staining	0,25% Brilliant Blue R 45% Methanol 45% ddH ₂ O 10% Essigsäure
Coomassie Destaining	45% Methanol 45% H ₂ O 10% Essigsäure
(d)NIC-Reagenz	2,2 mg (d)NIC 1 ml 50 mM Phosphatpuffer
GUA-Reagenz	100 mg O-Methyl-Isothioharnstoff 102 µl Lichrosolv-H ₂ O
Kathodenpuffer	50 mM Natriumtetraborat 0,05% SDS pH auf 9,0 einstellen
Kopplungspuffer	0,5 M NaCl 0,1 M NaHCO ₃ pH 8,3 mit NaOH einstellen
Lösungsmittel A	2% ACN 0,1% FA in Baker-H ₂ O

Lösungsmittel B	80% ACN 0,1% FA in Baker-H ₂ O
Na ₂ HPO ₄ -Puffer	0,78 g Na ₂ HPO ₄ mit Lichrosolv-H ₂ O auf 100 ml auffüllen
NaH ₂ PO ₄ -Puffer	0,88 g NaH ₂ PO ₄ mit Lichrosolv-H ₂ O auf 100 ml auffüllen
Nanoflow-Lösungsmittel	50% Methanol 1% Ameisensäure in Baker-H ₂ O
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 12 mM Na ₂ HPO ₄ + KH ₂ PO ₄ (pH 7,4 einstellen) ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺
Phosphatpuffer (50 mM)	100 ml 50 mM Na ₂ HPO ₄ -Puffer mit ca. 1 ml 50 mM NaH ₂ PO ₄ -Puffer auf pH 8,5 einstellen
2x Probenpuffer	250 mM Tris-HCl, pH 6,8 4% SDS 20% Glycerin 10% β-Mercaptoethanol 0,002% Bromphenolblau durch 3 mm Whatman-Filterpapier filtern
RPMI-Zellkulturmedium	2,0 g/l NaHCO ₃ 2,4 g/l HEPES 2,0 mM L-Glutamin 30,0 μM β-Mercaptoethanol 100,0 μg/ml Penicillin 100,0 μg/ml Streptomycin
10x SDS-Laufpuffer	0,25 M Tris-HCl 1,9 M Glycin 1% SDS mit ddH ₂ O auf 1 l auffüllen
TBB	5 mM EDTA 0,1% Nonidet P-40 5% Milchpulver in TBS
10x TBS	500 mM Trizma base 1,5 M NaCl pH auf 8,0 einstellen (HCl oder NaOH)

TWB	0,1% Nonidet P-40 in TBS
1,0 M Tris-HCl	1 M Trizma base pH mit HCl auf 6,8 einstellen
1,5 M Tris-HCl	1,5 M Trizma base pH mit HCl auf 8,6 einstellen

2.1.5 Zelllinien und Patientenmaterial

Für die Arbeit wurden verschiedene Zelllinien zur Detektion der Spikepeptide sowie als Peptidmischung zur Optimierung der LTQ Orbitrap XL verwendet (**Tab. 2.1**). RCC68_ZL wurde aus dem Tumorgewebe des Nierenkrebspatienten RCC68 generiert, bei A-498 handelt es sich ebenfalls um eine Nierenzellkarzinomzelllinie, die aus einer 52-jährigen Frau isoliert wurde. Bei JY handelt es sich um eine EBV-transformierte B-lymphoblastoide Zelllinie (B-LCL).

Tab. 2.1: Zelllinien. Auflistung der für die Detektion der Eichpeptide sowie für die Optimierung der LTQ Orbitrap XL verwendeten Zelllinien.

Zelllinie	Herkunft	HLA-Typisierung	Wachstumsverhalten	Referenz
RCC68	Humane	A*02:01, A*29,	adhärent	
	Nierenzellkarzinomzelllinie	B*15:01, B*45:01		
A-498	Humane	A*02:01, A*24,	adhärent	Giard et al., 1973 ³¹⁴
	Nierenzellkarzinomzelllinie	B*08		
JY	Humane B-LCL	A*02:01, B*07:02 Cw*07:02	Suspension	Engelhard et al., 1978 ³¹⁵

Für die Xenotransplantate, die zur Detektion der Survivin-Liganden verwendet werden, wurden die Zelllinien K562-A1 und K562-A3 verwendet. Die Transplantate wurden von den Kooperationspartnern in SCID-Mäusen generiert und für die Untersuchungen zur Verfügung

gestellt. Die Gesamtmenge an Gewebe betrug für das K562-A1-Xenotransplantat 16 g und für das K562-A3-Xenotransplantat 19 g.

Das für die Multiple Sklerose-Studie verwendete Patientenmaterial stammt von der UK Multiple Sklerosis Tissue Bank. Es handelt sich dabei um Gehirnautopsien von acht verschiedenen Patienten, die an verschiedenen Formen der Multiplen Sklerose erkrankt waren (**Tab. 2.2**). Für die Analysen wurde genug Gewebematerial zur Verfügung gestellt, dass pro Patient jeweils 50 g Gewebe verwendet werden konnte.

Tab. 2.2: Klinische Daten der Multiple Sklerose-Patienten. Angaben über Alter und Geschlecht der Patienten, der Dauer bis zur Probenentnahme, der Form der Multiplen Sklerose, der Krankheitsdauer sowie der Todesursache.

Patient Nummer	Alter / Geschlecht	Post Mortem Intervall (h)	Krankheitsverlauf	Dauer der Krankheit (y)	Todesursache
MS12	58/F	8	SP	31	Mammakarzinom
MS22	57/F	38	P	17	Pneumonie
MS27	65/M	8	SP	33	Emphysem, Diabetes
MS29	59/F	16	SP	30	Harnwegs- und Brustkorbinfektion
MS31	71/F	10	NC	41	Brustkorbinfektion
MS32	72/F	23	SP	26	Aspiration, Pneumonie
MS34	70/F	43	SP	25	Bilaterale Bronchopneumonie
MS46	40/M	18	SP	23	Dehydrierung, Multiple Sklerose

P: progressive Multiple Sklerose, SP: Sekundär Progressive Multiple Sklerose, NC: not clear

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Auftauen von Zellen

Ein Cryoröhrchen mit tiefgefrorenen Zellen wird vorsichtig im 37°C warmen Wasserbad angetaut und in ein Röhrchen, in das 50 ml 4°C kaltes Medium vorgelegt wurden überführt und durch Schwenken gut vermischt. Nach Zentrifugation bei 415 g für 5 min bei Raumtemperatur wird der Überstand dekantiert und die Zellen erneut in 50 ml 37°C warmen Mediums resuspendiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt und Abschütten des Überstands werden die Zellen in 10 ml warmen Medium resuspendiert und in eine mittlere Zellkulturflasche überführt.

2.2.1.2 Kultivierung von Zellen

Alle Zelllinien wurden in RPMI 1640-Medium kultiviert, dem zusätzlich NaHCO₃ (2,0 g/l), HEPES (2,4 g/l), L-Glutamin (2,0 µmol/l), β-Mercaptoethanol (50 µmol/l), Penicillin (50 U/ml), Streptomycin (50 mg/ml sowie 10% fötales Kälberserum (FCS) zugesetzt wurden. In kleinem Maßstab wurden die Zellen in Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37°C und 1,5% CO₂ in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre gehalten. Für größere Mengen wurden die Zellen in 2 l-Glasflaschen transferiert und bei 37°C auf einem Rollergestell bei ~1,5 Umdrehungen pro Minute kultiviert. Alle Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen auf Mycoplasmen getestet.

2.2.1.3 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wird ein 50 µl-Aliquot der zu zählenden Zellsuspension mit 50 µl Trypanblau vermischt und in eine Neubauer-Zählkammer gefüllt. Unter

dem Mikroskop werden alle vier Großquadrate ausgezählt. Die Membran toter Zellen ist für den Farbstoff durchlässig, so dass diese Zellen blau erscheinen, weshalb für die Vitalitätsbestimmung zunächst die toten und danach alle Zellen gezählt werden. Das Ergebnis der Zellgesamtzahl wird mit 10^4 und dem Verdünnungsfaktor multipliziert, um die Zellzahl pro Milliliter zu erhalten.

2.2.1.4 Zellernte

Für die MHC-Präzipitation wird der Überstand der in 2 l-Glasflaschen gehaltenen Zellen abgeschüttet und 10 min bei 415 g und 4°C abzentrifugiert und auf Eis in PBS resuspendiert. Adhärente Zellen werden mit PBS/EDTA abgelöst (15 min Inkubation auf dem Rollergestell) und ebenfalls in eiskaltes PBS gegeben. Nach erneuter Zentrifugation (415 g, 15 min, 4°C) wird der Überstand abgeschüttet und das feuchte Zellpellet bei -80°C tiefgefroren und gelagert.

2.2.2 Immunpräzipitation von MHC-Peptid-Komplexen und Säureextraktion von MHC-Liganden

Um die auf MHC präsentierten Peptide zu isolieren ist es notwendig, die tiefgefrorenen Zellpellets beziehungsweise Gewebeproben zu lysieren, um membranständige Proteine in Lösung zu bringen. Mit an ein Säulenmaterial gekoppelten Antikörpern werden die MHC-Peptid-Komplexe als Ganzes abgetrennt und anschließend die Peptide unter sauren Bedingungen aus den Bindungsgruben eluiert.

2.2.2.1 Herstellung der Affinitätssäule

Abhängig von der HLA-Typisierung der Zellen oder Gewebeproben können für die Affinitätschromatographie verschiedene Antikörper verwendet werden, um die Komplexität der Eluate so weit wie möglich zu reduzieren (**Tab. 2.3**).

Tab. 2.3: α -HLA-Antikörper für Immunpräzipitation. Verschiedene Antikörper werden nach sinkender Spezifität nacheinander verwendet.

Antikörper	anti-HLA-	Referenz
W6/32	A, B, C	Barnstable et al., 1978 ³¹⁶
B1.23.2	B, C	Rebai und Malissen, 1983 ³¹⁷
BB7.2	A2	Parham und Brodsky, 1981 ³¹⁸
GAP-A3	A3	Berger et al., 1982 ³¹⁹
L243	DR	Fong et al., 1981 ³²⁰

Für jeden verwendeten Antikörper wird eine Säule hergestellt, die eingesetzte Menge Antikörper richtet sich dabei nach der Zellmenge bzw. nach dem Gewicht des Gewebes: Pro 1 ml Zellpellet und pro 1 g Gewebe wird 1 mg Antikörper eingesetzt. Der Antikörper wird an CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelt, wobei für 1 mg Antikörper 37,5 mg Sepharose eingesetzt werden. Die Sepharose wird in ein 50 ml-Röhrchen eingewogen und zur Aktivierung mit 1 mM HCl aufgefüllt. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur im Rotator wird die Sepharose in der Megafuge abzentrifugiert (4 min, 60 g, ohne Bremse, RT) und der Überstand vorsichtig abgenommen.

Zur Kopplung der Antikörper werden diese in Kopplungspuffer zu der Sepharose zugegeben (Endvolumen ungefähr 45 ml) und 2 h bei Raumtemperatur rotiert. Nach Ablauf dieser Zeit wird die Kopplungseffizienz eines abzentrifugierten Aliquots (Tischzentrifuge, 10000 g, 30 sec, RT) bei OD₂₈₀ bestimmt, welche über 90% liegen sollte. Die restliche Sepharose wird erneut in der Megafuge abzentrifugiert und der Überstand verworfen.

Um unspezifische Bindungen zu verhindern, werden die verbleibenden Bindungsstellen der Sepharose 60 min bei Raumtemperatur mit 0,2 M Glycin blockiert. Nach Zentrifugation und Abnahme des Überstands wird die Sepharose noch zwei Mal mit PBS gewaschen, mit PBS aufgeschlämmt und schließlich in die Säule überführt.

2.2.2.2 Herstellung des Zelllysats aus Zellpellets

Das Volumen des gefrorenen Zellpellets wird bestimmt und unter langsamem Rühren in der gleichen Menge zweifach konzentrierten Aufschlusspuffers bei 4°C aufgetaut. Nachdem das

Zellpellet vollständig aufgetaut ist, wird ein weiteres Volumen einfach konzentrierten Aufschlusspuffers zugegeben und die Zellsuspension eine Stunde bei 4°C gerührt.

Anschließend werden die Zellen durch Beschallung mit einer Ultraschallsonde (3 x 20 sec mit jeweils 20 sec Pause dazwischen, *Duty Cycle* 50%, *Output* 5) auf Eis weiter aufgeschlossen. Ein weiteres Volumen einfach konzentrierten Aufschlusspuffers wird zugegeben und das Zelllysate eine weitere Stunde bei 4°C gerührt.

Nachdem die Zellen aufgeschlossen wurden, werden Zelltrümmer durch Zentrifugation in der Megafuge (3350 g, 20 min, 4°C) und daraufhin folgend in der Ultrazentrifuge (125000 g, 70 min, 4°C) entfernt. Abhängig vom Volumen des Lysats wurde für die Ultrazentrifugation entweder der Rotor Ti45 (~ 85 ml Fassungsvermögen pro Röhrchen) oder Ti70 (~ 27 ml Fassungsvermögen pro Röhrchen) verwendet. Zuletzt wird der Überstand vollständig durch einen 0,2 µm-Sterilfilter gepresst.

2.2.2.3 Herstellung des Zelllysats aus Gewebeproben

Die gefrorenen Gewebeproben werden gewogen und auf Eis in eine Petrischale mit dem entsprechenden Volumen zweifach konzentrierten Aufschlusspuffers gelegt. Danach werden sie mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten. Handelt es sich um große Gewebeproben (> 5 g), können diese auch mit zweifach konzentriertem Aufschlusspuffer in einen Mixbecher gegeben und auf diese Weise mechanisch zerkleinert werden. Das Gewebe wird zusammen mit dem Lysepuffer in ein Potterglas überführt und so lange auf Eis gepottert, bis sich die Gewebestücke weitgehend aufgelöst haben. Die Petrischale beziehungsweise der Mixbecher, das Potterglas und der Potterstößel werden mit einem Volumen einfach konzentrierten Aufschlusspuffers gewaschen und dieser dann dem Lysat zugeführt.

Nachdem das Lysat eine Stunde bei 4°C gerührt wurde, wird wie bereits beschrieben eine Ultraschallbehandlung durchgeführt und ein weiteres Volumen einfachen Aufschlusspuffers zugegeben. Nach einer weiteren Stunde des Rührens werden die Zelltrümmer durch Zentrifugation in der Mega- und Ultrazentrifuge entfernt und das Lysat durch einen Sterilfilter gedrückt.

2.2.2.4 Affinitätschromatographie

Das Lysat wird in einem ersten Schritt linear über die Säulen gepumpt, im Anschluss daran dann zyklisch über Nacht. Um das Lysat zu entfernen werden die Säulen zunächst 30 min mit PBS, anschließend 60 min mit ddH₂O gewaschen und werden zuletzt trocken laufen gelassen. Zur Elution der MHC-Peptid-Komplexe wird das Gelbett in acht aufeinander folgenden Schritten mit so viel 0,25%iger TFA getränkt, dass sich ein dünner Flüssigkeitsfilm auf dem Sepharosekissen bildet (bei 10 mg Antikörper und 375 mg Sepharose ca. 200 µl). Beim ersten Elutionsschritt werden zusätzlich noch 10 – 30 µl 10%ige TFA zugegeben, um den pH-Wert trotz des verbleibenden Wassers im Gelbett in den sauren Bereich zu erniedrigen.

Die Eluate werden nach jedem Elutionsschritt in ein Amicon mit einem 10 kDa Ausschlussfilter gepumpt, das zuvor über Nacht mit 0,2%iger TFA gewaschen wurde, um eine Anreicherung von Polyethylenglycol (PEG) zu verhindern.

Zur Bestimmung der Menge an MHC-Molekülen können 5% des vereinigten Eluats abgenommen und mittels Edman-Abbau, Western Blot oder Silberfärbung eines SDS-Gels analysiert werden. Der Rest des Eluats wird durch das Amicon gefiltert (Megafuge, 3350 g, 4°C, Dauerbetrieb) und bei -80°C eingefroren. Da das Volumen des Eluats zu groß ist, muss die Probe vor der massenspektrometrischen Analyse lyophilisiert und in einem kleineren Volumen eines entsprechenden Puffers, meist Lösungsmittel A, wieder aufgenommen werden.

2.2.3 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode, zuverlässig und hoch spezifisch Proteine aus einem Proteingemisch zu detektieren. Der Ablauf ist in zwei Versuchsteile unterteilt: Zunächst findet eine Auftrennung des Proteingemischs wie beispielsweise eines Zelllysats oder der säureeluierten MHC-Peptid-Komplexe einer CNBr-Säule nach ihrem Molekulargewicht unter denaturierenden Bedingungen mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) statt. Im Anschluss werden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen, wo sie über spezifische fluoreszenzmarkierte Antikörper detektiert werden können.

2.2.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

In eine zusammengebaute Gelgießapparatur wird das Trenngel gegossen und in flüssigem Zustand vorsichtig mit Isopropanol überschichtet, um die Kante zu begradigen und das Gel unter Sauerstoffausschluss auspolymerisieren zu lassen. Nachdem der Polymerisierungsprozess abgeschlossen ist, wird das Isopropanol entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel (**Tab. 2.4**) gegossen, in welches sofort der Kamm gesteckt wird, um die Probenaschen zu erhalten. Die Glasplatten mit dem Gel werden in eine Laufapparatur gesetzt und diese mit SDS-Laufpuffer befüllt.

Tab. 2.4: Zusammensetzung des Polyacrylamidgels. Zusammensetzung des Trenngels und des Sammelgels. Die angegebenen Mengen richten sich nach der Menge für ein Gel.

	Trenngel (15%)	Sammelgel (4,5%)
Acrylamid 40%	2,25 ml	0,40 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,6	1,50 ml	0,30 ml
H ₂ O	2,10 ml	1,75 ml
10% SDS	60 µl	25 µl
10% APS	60 µl	25 µl
TEMED	7,5 µl	3,75 µl
Summe	6,00 ml	2,50 ml

Die Proben werden mit demselben Volumen 2x Probenpuffer gemischt und durch Zugabe von 1 µl 10 M NaOH alkalisiert. Zum Nachweis von MHC-Molekülen kann als Mengenstandard 0,01 – 0,05 µg biotinyliertes HLA-Monomer verwendet werden. Die Proben werden 5 min bei 95°C denaturiert und auf das Gel geladen. Des Weiteren wird als Größenstandard 3 µl eines *Prestained Protein Marker* in eine der Probenkammern gefüllt. Das Füllvolumen der Taschen beträgt insgesamt 15 (14 Probenkammern) – 20 (10 Probenkammern) µl.

Um das Gel laufen zu lassen wird eine konstante Spannung von 120 V angelegt, die Elektrophorese ist dann beendet, sobald die Lauffront am unteren Ende des Trenngels ankommt. Falls kein Western Blot durchgeführt werden soll, wird das Gel über Nacht in Coomassie-Färbelösung gelegt und geschwenkt, anschließend mit Wasser gewaschen und so lange mit Entfärbelösung entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich zu erkennen sind.

2.2.3.2 Western Blot

Um die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine zu detektieren, müssen diese auf eine Nitrocellulosemembran transferiert werden. Dazu werden vier in Anodenpuffer getränkte Filterpapiere, die Membran, das Gel und vier in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere gestapelt, luftblasenfrei zusammengepresst und in die *semi-dry* Transferapparatur gelegt. Der Transfer findet über drei Stunden bei 42 mA (ungefähr 1 mA/cm²) statt.

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wird die Membran eine Stunde mit TBB inkubiert und anschließend der Erstantikörper (α - β_2 -Mikroglobulin, 1:5000 in TBB mit 0,02% Natriumazid) über Nacht zugegeben. Am nächsten Tag wird die Membran zweimal je 10 min mit TWB und einmal 10 min mit TBB gewaschen. Nachdem der Zweitantikörper (α -*rabbit*, gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase, 1:5000 in TBB) auf die Membran gegeben wurde, folgt eine zweistündige Inkubationspause, nach welcher die Membran erneut dreimal jeweils für 10 min auf dem Schwenker mit TWB gewaschen wird.

Zur Detektion des Zweitantikörpers werden zwei Chemolumineszenz-Reagenzien im Verhältnis 1:1 gemischt und auf die Membran aufgetragen. Die Membran wird in Plastikfolie eingeschlagen aus der die Reagenzien nach 3 Minuten ausgestrichen werden. Die bei der Umsetzung der Reagenzien durch die Meerrettich-Peroxidase entstehende Chemolumineszenz kann in einer Dunkelkammer mit einer hochgradig lichtempfindlichen Kamera aufgenommen werden.

2.2.4 Quantifizierung und Sequenzanalyse von Peptiden und Proteinen durch Edman-Abbau

Bereits 1949 entwickelte Pehr Edman eine Methode zum sequentiellen Abbau von Peptiden, um deren Aminosäuresequenz zu ermitteln³²¹. Diese wurde später von Edman und Begg weiterentwickelt und auf Proteinen angewandt. Es handelt sich dabei um eine zyklische Reaktionskaskade, bei der pro Zyklus eine Aminosäure (AS) vom N-Terminus abgespalten und chromatographisch detektiert wird. Auf diese Weise ist es möglich, Sequenz und Menge eines Proteins oder Peptids zu ermitteln³²². Die Nachweisgrenze dieses Verfahrens liegt bei einem Picomol.

Der Reaktionszyklus besteht aus drei Schritten: Kupplung, Spaltung und Konvertierung. Zunächst bindet Phenylisothiocyanat (PITC) an die freie N-terminale Aminogruppe des Peptids oder Proteins, so dass ein Phenylthiocarbamoylpeptid (PTC-Peptid) entsteht. Dieser nukleophile Angriff findet unter alkalischen Bedingungen bei etwa 55°C statt.

Anschließend wird das PTC-Peptid durch Behandlung mit einer wasserfreien Säure gespalten. Dabei greift der aus dem PITC stammende Schwefel des PTC-Peptids die Carbonylgruppe der ersten Peptidbindung an, wodurch das Peptid unter Freisetzung einer Anilinothiazolinon-Aminosäure (ATZ-Aminosäure) um eins verkürzt wird. Diese wird mit einem hydrophoben Lösungsmittel vom Restpeptid durch Extraktion abgetrennt.

Bei der Konvertierung wird schließlich die relativ instabile ATZ-Aminosäure unter Einwirkung von wässriger Säure und erhöhter Temperatur in ein stabileres Phenylthiohydantoin-Derivat (PTH-Derivat) umgewandelt, welches durch *reversed-phase*-HPLC anhand der Retentionszeit identifiziert und UV-spektroskopisch bei 269 nm quantifiziert werden kann. Der Rest des Peptids kann in folgenden Abbauzyklen weiter analysiert werden.

2.2.5 Peptidsynthese

Alle verwendeten synthetischen Peptide wurden von Patricia Hrستیć, Nicole Zuschke und Stefan Stevanović nach der Standard Fmoc-Chemie im Abimed Economy Peptide Synthesizer EPS 221 oder ABI 433A Peptid-Synthesizer synthetisiert.

2.2.6 Differentielle Isotopenmarkierung von Peptiden

Durch eine Immunpräzipitation isolierte HLA-Liganden können an ihren N-Termini mittels 1-(Nicotinoyloxy)-Succinimid (NIC-NHS) differentiell modifiziert werden. Dabei wird die Nicotinsäure kovalent über eine Amid-Bindung an den N-Terminus des Peptids gebunden. Die Nicotinsäure existiert in zwei verschiedenen schweren Derivaten, wobei beim 1-([H₄]Nicotinoyloxy)-Succinimid vier H-Atome des aromatischen Ringes der Nicotinsäure durch Deuteriumatome ersetzt wurden. Das dabei entstandene

1-([D₄]Nicotinoyloxy)-Succinimid (dNIC-NHS) ist um 4,025 Da schwerer als die normale Form des NIC-NHS. Hat man zwei verschiedene Peptidproben, kann man diese anhand der differentiellen Modifizierung voneinander unterscheiden und quantifizieren. Biochemisch betrachtet unterscheiden sich die Eigenschaften differentiell modifizierter gleicher Peptide praktisch nicht voneinander. Bei der HPLC-Auftrennung erkennt man allerdings einen leichten Isotopen-Effekt, der sich insofern bemerkbar macht, als dass dNIC-modifizierte Peptide einige Sekunden früher als die entsprechenden NIC-modifizierten Peptide eluieren^{132,138}.

2.2.6.1 Selektive Guanidierung der ϵ -Aminogruppe von Lysinresten in Peptiden

Das lyophilisierte Eluat wird in 500 μ l Lichrosolv-H₂O gelöst und mit 92 μ l GUA-Reagenz (2,5 M) gemischt. Für die Guanidierungsreaktion wird der pH-Wert mit 30 μ l 10 M NaOH auf 10,5 eingestellt und die Probe für exakt 10 min in ein 65°C heißes Wasserbad gestellt. Die Reaktion wird auf Eis mit 4 – 5 Tropfen konzentrierter Ameisensäure abgestoppt und der pH-Wert überprüft, der bei ca. 3 – 4 liegen muss.

2.2.6.2 Nicotinylierung der α -Aminogruppe von Peptiden

Die N-terminale Modifizierung der Peptide findet auf *peptide cleanup spin tubes* statt, die mit C₁₈-Material gefüllt sind. Dazu werden die Säulen durch dreimaliges Auftragen von 50% ACN mit 1% FA und anschließender Zentrifugation (Tischzentrifuge, 8 g, 15 sec) aktiviert und danach mit 0,1% TFA äquilibriert (3x 200 μ l). Die Probe wird in 200 μ l-Aliquots auf die Säule gegeben und so oft geladen, bis die komplette Probe drei Mal die Säule passiert hat. Zum Entsalzen wird drei Mal mit 200 μ l Lichrosolv-H₂O gewaschen und im Anschluss 500 μ l der NIC- bzw. dNIC-Reagenz zugegeben. Für die Nicotinylierungsreaktion werden die *spin columns* auf eine abgeschnittene 1 ml-Spritze aufgesetzt und jeweils 50 μ l des Reagenz in 1,5 min-Schritten mit Hilfe des Stempels langsam durch das C₁₈-Material gesogen. Nach einem weiteren Waschschrift (3x 200 μ l H₂O) werden Nicotinylierungen von Tyrosinseitenketten durch 10-minütige Behandlung mit 500 μ l 50% Hydroxylamin (50

µl/min) ebenfalls über eine abgeschnittene 1 ml-Spritze entfernt. Nach einem letzten Waschschrift (3x 200µl H₂O) werden die Peptide mit 4x 50 µl 50% ACN 1 % FA eluiert und die Fraktionen vereinigt.

Zur Ermittlung der Peptidmenge werden jeweils 10 µl der mit NIC und 10 µl der mit dNIC modifizierten Probe im Photometer gemessen. Dazu wird zunächst das ACN in der SpeedVac abgedampft und die Probe anschließend mit 0,1% FA in H₂O auf 200 µl aufgefüllt. Die Proben werden bei 260 nm (Absorptionswellenlänge der Nicotinsäure) gemessen. Um den genauen Peptidgehalt der Proben bestimmen zu können werden die Messwerte um den einer Blindprobe (H₂O + NIC/dNIC-Reagenz über die Säule) korrigiert. Anschließend werden die beiden Proben äquivalent gemischt und massenspektrometrisch analysiert. Die Reste der beiden anderen Proben können in zwei separaten Messungen ebenfalls analysiert und fragmentiert werden.

Eine genauere Methode zur Bestimmung der Peptidmenge zweier Proben besteht allerdings darin, zuerst beide Proben getrennt voneinander im Massenspektrometer zu messen und über das Integral des BPI-Chromatogramms die ungefähre Peptidmenge zu ermitteln. Ein Vergleich der Integrale der beiden Messungen gibt an, in welchem Verhältnis die beiden Proben gemischt werden müssen. Der Vorteil dieser Methode gegenüber der anderen ist, dass sie weder von schwankenden Photometerwerten beeinflusst wird noch eine Blindprobe benötigt.

2.2.7 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist eine Methode zur Bestimmung von Molekülmassen geladener Teilchen in der Gasphase. Die hierfür benötigten Ionen werden zuerst in einer Ionenquelle erzeugt, anschließend in einem Masseanalysator nach ihrem Masse/Ladungs-Quotienten (m/z-Wert) aufgetrennt und zuletzt von einem Detektor qualitativ nach ihrem m/z-Wert und quantitativ nach ihrer relativen Menge aufgezeichnet.

Für die Messung von großen Biomolekülen wie Peptiden oder Proteinen ist es notwendig, eine möglichst schonende Methode der Ionisation zu verwenden, damit diese nicht zerstört werden. In der Protein- und Peptidanalytik werden deshalb hauptsächlich zwei Methoden verwendet, um solche Biomoleküle zu messen:

Bei der Matrix-unterstützten Laser Desorption/Ionisation (*matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI*) werden die Moleküle mit einer Matrix vermischt und gemeinsam auskristallisiert. Durch Beschuss mit kurzen, hochenergetischen Laserimpulsen wird das Molekül-Matrix-Gemisch angeregt, was bei der darauf folgenden Relaxation im Kristallgitter zu explosionsartigen Teilchenablösungen von der Matrixoberfläche führt. Die dabei entstehenden Matrix- und Molekülteilchen können auf diese Weise in den Analysator des Massenspektrometers überführt werden.

Alternativ können aufgereinigte Biomoleküle in einem sauren oder basischen Lösungsmittel resolubilisiert und auf diese Weise positiv bzw. negativ ionisiert werden. Durch Erzeugung eines feinen Elektroprays (*electrospray ionization, ESI*) können die ionisierten Moleküle in die Gasphase überführt und massenspektrometrisch gemessen werden.

Die Qualität eines Massenspektrometers wird über drei Parameter definiert: Die Empfindlichkeit, die Massenauflösung und die Massengenauigkeit. Die Auflösung des Massenspektrometers bezeichnet den minimalen Massenunterschied, den zwei Ionen haben dürfen, um noch getrennt voneinander detektiert werden zu können. Dieser Wert trägt die Einheit Thomson [Th] und ist definiert als $Th = u/e$, wobei u die atomare Masseneinheit und e die elementare Ladungseinheit sind. Normalerweise wird in den Systemspezifikationen der Massenspektrometer jedoch das Auflösungsvermögen R angegeben. Dieses berechnet sich nach $R = m/\Delta m$, wobei m die Masse des selektierten monoisotopischen Peaks im unteren Massenbereich ist und Δm der Massenunterschied der am nächsten noch detektierbaren Masse ist. Dabei gibt es zwei verschiedene Arten, nach denen Δm definiert sein kann: bei der 10%-beziehungsweise 50%-Tal-Auflösung ist Δm der dichteste Abstand zweier gleich intensiver Peaks zueinander mit einem Tal auf 10% (50%) der Peakhöhe. Im Gegensatz dazu berechnet sich Δm bei der Halbwertsbreitenmethode (*FWHM, full width at half maximum*) durch die volle Peakbreite bei halber Peakhöhe. Nach dieser Methode berechnen sich in der Regel auch die Angaben der Hersteller für das Auflösungsvermögen. Der angegebene Wert wird dabei bei einem festgelegten m/z -Wert ermittelt und nimmt oberhalb dieses Wertes ab und unterhalb des Wertes zu. Die Massengenauigkeit ist der Wert, der angibt, wie genau die Masse eines Moleküls ermittelt werden kann. Diese Angabe erfolgt in *parts per million* (ppm) und liegt bei modernen Massenspektrometern unter einem ppm. Praktisch bedeutet das, dass ein Molekül mit der nominellen Masse 1000,00 Da bei einer Genauigkeit von 1 ppm auf 0,001 Da genau gemessen werden kann.

Die Daten der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich über die Elektrospray-Ionisierung durch Messungen an einem Q-TOF-Massenspektrometer beziehungsweise einem LTQ-

Orbitrap-Hybrid-Massenspektrometer erzeugt, weshalb auf diese Systeme genauer eingegangen wird.

2.2.7.1 Elektrospray-Ionisation

Die Elektrospray-Ionisation ist eine Möglichkeit, Peptide oder Proteine zu Ionisieren, ohne diese dabei zu zerstören. Der Übergang von der Flüssigkeit in die Gasphase wird durch das Versprühen der Probenlösung durch eine feine Kapillare in einem elektrischen Feld bewerkstelligt. Da sich an der Spitze der Kapillare ein Überschuss an gleichartig geladenen Ionen befindet, bildet sich ein Taylor-Kegel³²³. Aufgrund von hohen Temperaturen im Quellenbereich verdampft das Lösungsmittel in den Tröpfchen, weshalb sich dabei die Ladungsdichte an der Tröpfchenoberfläche erhöht. Hat die Abstoßungsenergie der geladenen Teilchen innerhalb des schrumpfenden Tropfens einen bestimmten Schwellenwert, die so genannte Rayleigh-Grenze überschritten, entstehen Coulomb-Explosionen, welche die Tröpfchengröße weiter minimieren³²⁴. Wie genau der Übergang der Ionen in die Gasphase stattfindet, ist nicht genau geklärt, jedoch gibt es zwei Modellvorstellungen, wie der Prozess ablaufen könnte: Das Modell des geladenen Rückstandes (*charge residue model, CRM*) besagt, dass letztlich winzige Tropfen von etwa 1 nm Durchmesser übrig bleiben, die nur ein ionisiertes Analytmolekül enthalten^{325,326}. Im Gegensatz dazu postuliert das Ionenemissionsmodell (*ion evaporation model, IEM*), dass bereits aus größeren geladenen Tropfen freie Ionen in die Gasphase emittiert werden³²⁷ (**Abb. 2.1**). Die sich in der Gasphase befindlichen geladenen Moleküle werden schließlich in das Massenspektrometer überführt^{328,329}.

Für die von John B. Fenn entwickelte Methode der Elektrospray-Ionisation wird zwischen einer leitfähigen Kapillare und der Interface-Platte am Eingang des Massenspektrometers ein hohes Spannungspotential von etwa 2000 – 3000 Volt angelegt³³⁰ wodurch sich aus der Analytlösung in der Kapillare ein feines Spray bildet. Die Bildung dieses Sprays wird zusätzlich durch ein *nebulizer gas* (Stickstoff), welches koaxial zur Kapillare verläuft unterstützt. Dieser Prozess findet bei Atmosphärendruck statt, während die Analyse der Ionen im Massenspektrometer im Hochvakuum durchgeführt wird. Senkrecht zur Flugrichtung der Tröpfchen fließt das erhitzte *curtain gas* (Stickstoff) an der Mikroöffnung des Massenspektrometers, um Neutralteilchen nicht in das Hochvakuum zu saugen.

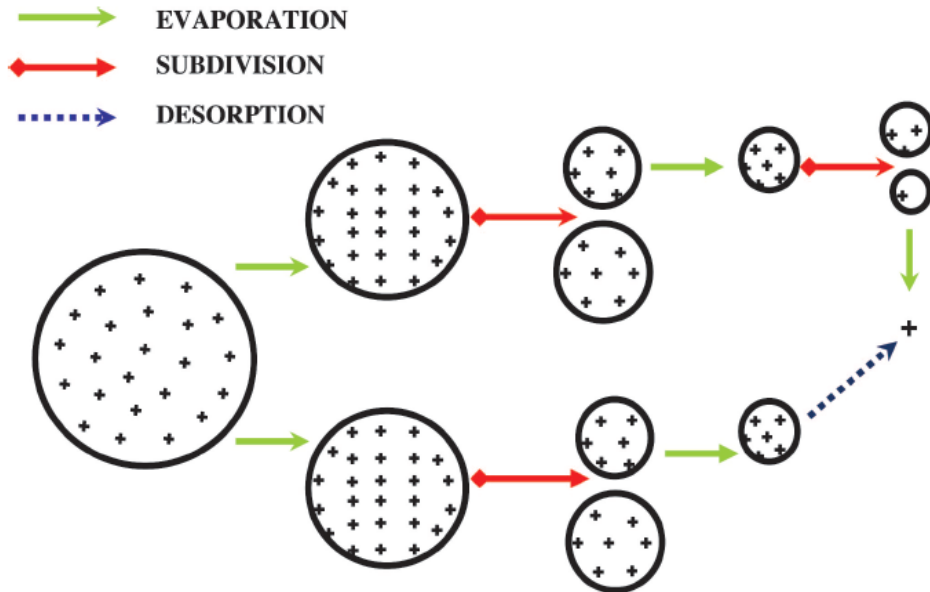


Abb. 2.1: Ionenbildung bei Elektrospray-Ionisation. Schematische Darstellung der beiden Modelle zur Ionenentstehung aus einem geladenen Flüssigkeitstropfen. Der obere Weg beschreibt das Modell des geladenen Rückstandes, der untere das Ionenemissionsmodell (Bild: Nguyen und Fenn, 2006³³¹).

Ein besonderes Merkmal des ESI-Verfahrens ist die Bildung von mehrfach geladenen Ionen $[M + nH^+]^{n+}$, was im Übersichtsspektrum zu charakteristischen Serien von Ionensignalen mit $m/z = (M + nH^+) / n$ führt, die sich in der Anzahl n der angelagerten Protonen und somit im Ladungszustand unterscheiden. Je nach Proteingröße können so leicht Serien von zehn oder mehr Ionensignalen entstehen. Bei Peptiden im Massenbereich zwischen 800 und 2000 Dalton dominieren zwei- und dreifach geladene Ionensignale, die anhand der Abstände zu den Isotopensignalen identifiziert werden können.

Anstatt die Proben über eine Kapillare zu messen, ist es auch möglich, eine *offline*-Messung mittels der von Wilm und Mann entwickelten Nanoflow-Elektrospray-Methode³³² durchzuführen. Dabei werden einige wenige μl der Probe in eine goldbeschichtete, fein ausgezogene Glasnadel gefüllt, an die ebenfalls eine Spannung von mehreren Kilovolt angelegt wird. Die dabei entstehenden Flussraten liegen im Bereich um 20 nl/min , weshalb auch ein geringes Probenvolumen verhältnismäßig lang gemessen werden kann. Des Weiteren ist diese Art der Messung im Vergleich zur herkömmlichen Methode deutlich sensitiver.

2.2.7.2 Q-TOF Massenspektrometer

Ein Q-TOF-Massenspektrometer besteht im Wesentlichen aus drei verschiedenen Komponenten: Dem Quellenbereich, in dem die Analytlösung über das ESI-Verfahren ionisiert und in das Massenspektrometer geleitet wird, dem Analysator, bestehend aus Quadrupol und Kollisionsgaszelle, sowie dem Massendetektor, der aus dem Flugrohr (*time-of-flight*-Rohr, TOF-Rohr) und der Photomultiplier-Detektorplatte besteht.

Einfache Quadrupole bestehen aus vier stabförmigen, parallel angeordneten Metallelektroden in einem Hochvakuum ($p < 3,5 \cdot 10^{-5}$ bar), wobei zwei dieser Stäbe eine positive und die beiden anderen Stäbe eine gleich starke negative Ladung tragen, weshalb sich bei entgegengesetzter Anordnung zwei Dipole bilden. Durch Varianz der beiden Spannungen ist es möglich festzulegen, welche Ionen mit einem bestimmten m/z -Wert den Quadrupol aufgrund von stabiler Oszillation passieren dürfen, und welche Ionen an den Stäben verloren gehen. Neuere Q-TOF-Massenspektrometer enthalten anstatt des Quadrupols einen Massentransit-Ionentunnel, der aus hintereinander liegenden Ringelektroden besteht, jedoch die gleiche Funktion eines Quadrupols bei erhöhter Sensitivität erfüllt.

Flugzeitmassenspektrometer (*time-of-flight mass spectrometers*, TOF-MS) bestimmen Ionenmassen anhand der Zeit, welche die Ionen benötigen, um die Flugstrecke im TOF-Rohr zwischen Pusher und Detektor zurückzulegen. Dabei gilt, dass mit längerer Flugbahn innerhalb des Rohres die Massengenauigkeit und Auflösung zunehmen, die Sensitivität jedoch wegen des Auffächerns des Ionenstroms abnimmt. Üblicherweise werden Messungen im sogenannten V-Modus durchgeführt: Hierfür werden die Ionen im Hochvakuum ($p < 3,5 \cdot 10^{-7}$) in der Pusher-Region mittels eines elektrostatischen Feldes zu Beginn der Flugstrecke orthogonal abgelenkt und durchfliegen eine feldfreie Driftstrecke Richtung eines Reflektors, der die Ionen v-förmig ablenkt und durch eine zweite feldfreie Driftstrecke zum Detektor lenkt. Da die Ionen am Anfang ihrer Flugstrecke alle dieselbe kinetische Energie aufnehmen, jedoch entsprechend ihres m/z -Wertes unterschiedliche Geschwindigkeiten erreichen, ist es möglich anhand der Flugdauer der Ionen vom Pusher zum Detektor deren Masse zu berechnen:

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

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

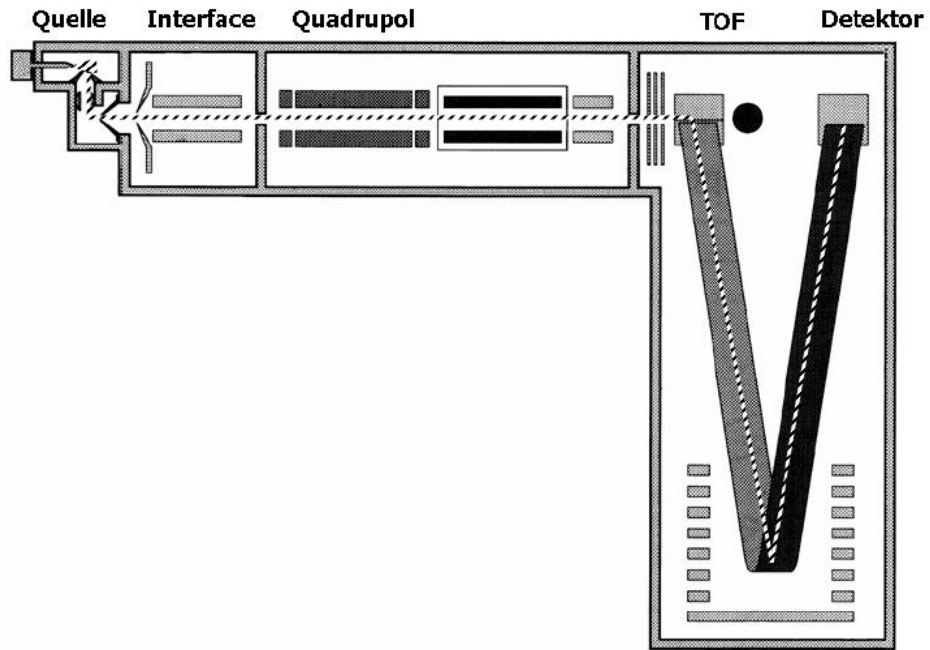
mit

m	=	Masse des Ions
v	=	Geschwindigkeit des Ions nach der Beschleunigungsstrecke
z	=	Ladungszahl
e	=	Elementarladung
t	=	Gesamtflugzeit
L	=	Länge der feldfreien Driftstrecke des Flugrohrs
U	=	Spannung

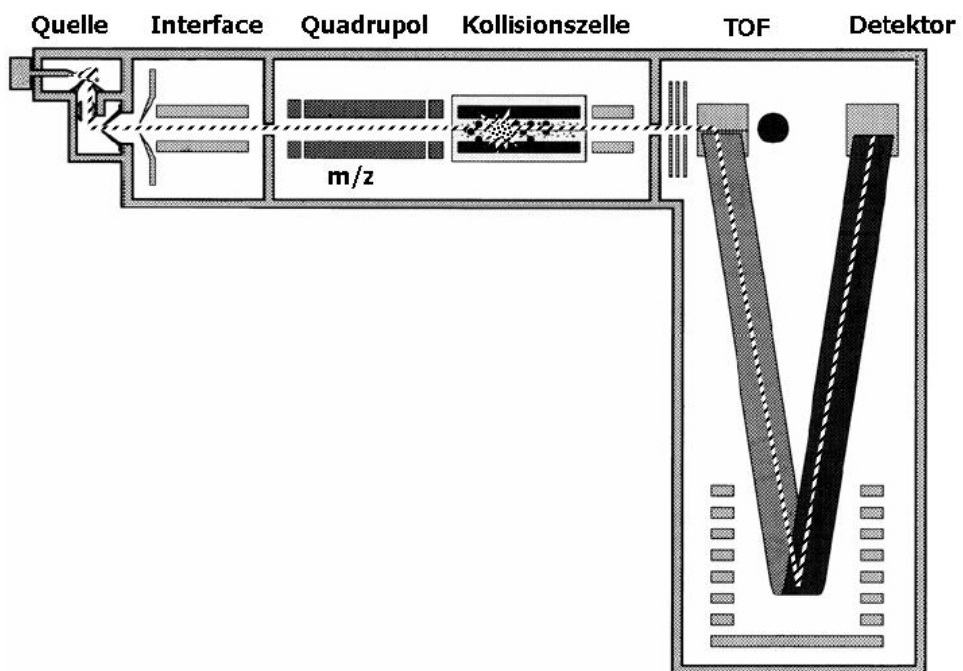
Die Detektion erfolgt an einer Mikrokanalplatte (*micro-channel plate*, MCP), einer speziellen Form des Sekundärelektronenvervielfachers (SEV). Die Ober- und Unterseite der MCP ist mit Metall überzogen, um eine Beschleunigungsspannung anlegen zu können. Die Platte selbst besteht aus einem Halbleiter, der von feinen Mikrokanälen mit wenigen μm Durchmesser durchzogen ist. Da die Kanäle schräg durch die Platte verlaufen, treffen einfallende Elektronen auf die Kanalwände, an denen eine Spannung anliegt und werden so durch eine Elektronenkaskade beschleunigt und vervielfacht. Der austretende Elektronenschauer ist dann stark genug, um gemessen zu werden (**Abb. 2.2**).

Die Datenanalyse am Q-TOF findet in zwei voneinander getrennten Messmodi statt: Man unterscheidet zwischen dem sogenannten MS-Survey-Modus, bei dem in einem Übersichtsscan alle momentan vorhandenen Ionen detektiert werden, und dem MS/MS-Modus, der Fragmentspektren einzeln selektierter Ionen aufzeichnet.

Am Anfang beider Messmodi werden die durch ESI gebildeten Ionen durch die evakuierte Ionenoptik des Quellenbereichs in den Quadrupol-Analysator geleitet. Ab hier unterscheiden sich die beiden Messmodi dann: Im MS-Survey-Modus passieren sämtliche Ionen, die in das System geleitet wurden den Quadrupol und fliegen durch die ausgeschaltete Kollisionsgaszelle, weshalb die im TOF-Rohr ermittelten m/z -Werte denen der Gesamtmasse der ionisierten Moleküle entspricht und man eine Übersicht der Gesamtheit aller Ionen dargestellt bekommt.



(a) MS-Modus



(b) MS/MS-Modus

Abb. 2.2: Schematischer Aufbau des Q-TOFs. Q-TOF im MS-Survey-Modus (a) zur Detektion aller von der Säule eluierenden Peptide und im MS/MS-Modus mit eingeschalteter Kollisionszelle (b) zur Aufnahme von Fragmentspektren. (Q-TOF Handbuch, Micromass/Waters)

Im Gegensatz dazu werden im MS/MS-Modus die Spannungen des Quadrupols so moduliert, dass lediglich Ionen eines festgelegten m/z -Wertes in der Lage sind, diesen zu passieren. Andere Ionen werden aufgrund von instabiler Oszillation an den Stabelektroden abgefangen und gelangen so nicht in die Kollisionsgaszelle, welche mit einem Edelgas, z.B. Argon gefüllt ist. Bei Niedrig-Energie-Zusammenstößen der Ionen auf die Gasatome wird kinetische Energie auf die Ionen übertragen und in Schwingungsenergie umgewandelt, was dazu führt, dass die Moleküle in Fragmentationen zerbrechen (*collision-induced dissociation, CID*). Um diesen Effekt beizuführen ist es notwendig, an die Ionen eine Beschleunigungsspannung anzulegen. Diese richtet sich hauptsächlich nach dem Ladungszustand und Aufbau des Moleküls und liegt bei etwa 15 – 60 V. Molekülfragmente werden dann genau so wie ihre Vorläuferionen im TOF-Analysator detektiert.

Das für diese Arbeit verwendete Q-TOF Ultima besitzt ein Auflösungsvermögen von ~ 10000 FWHM, wobei ab einem Auflösungsvermögen von 2000 FWHM die Grundlinientrennung der Isotopenpeaks im m/z -Bereich der Peptidionen (450 – 750 m/z) erreicht wird. Der maximal für eine Messung zugängliche Messbereich liegt zwischen 50 und 2000 m/z , in dem jedoch auch Moleküle, die größer als 2000 Da sind aufgrund von mehreren Ladungszuständen gemessen werden können. Die Massengenauigkeit des Q-TOF Ultima liegt bei ungefähr 50 ppm.

2.2.7.3 Orbitrap Massenspektrometer

Die LTQ Orbitrap XL ist ein Massenspektrometer der neueren Generation und besteht aus fünf Hauptbestandteilen: Der ESI-Quelle, der linearen Ionenfalle, einer C-Trap, dem Orbitrap-Massenanalysator und der HCD-Kollisionszelle (**Abb. 2.3**). Zunächst passieren die an der Quelle erzeugten Ionen zwei Hochfrequenz-Quadrupole, den *guide quadrupole* ($p = 10^{-2}$ mbar) und den *transport quadrupole* ($p = 10^{-5}$ mbar) und gelangen in den *storage quadrupole* ($p = 10^{-3}$ mbar), der die eigentliche lineare Ionenfalle darstellt.

Das Prinzip, Ionen in einem elektrostatischen Feld einzufangen und zu speichern ist bereits seit Anfang des 20. Jahrhunderts bekannt³³³. Die Grundbestandteile von linearen Ionenfallen bestehen aus einem durch Isolatorringe dreigeteilten Quadrupol, an dessen Enden jeweils eine Endkappenelektrode sitzt. Durch Anlegen einer Gleich- und einer überlagernden hochfrequenten Wechselspannung von ungefähr einem Megahertz ist es möglich, Ionen

innerhalb eines elektrischen Feldes anzusammeln. Im Inneren der Falle wirken zwei verschiedene Kräfte in der Frequenz der Wechselfeldes auf die Ionenwolke: Zunächst findet eine Fokussierung in der x-y-Ebene (durch den Quadrupol) bei gleichzeitiger defokussierender Kraft senkrecht dazu (z-Dimension) statt, beim Phasenwechsel dann eine Fokussierung in z-Dimension (durch die Endkappenelektroden) bei Defokussierung in x-y-Ebene. Bei einer entsprechend schnellen Wechselfrequenz der beiden Felder findet auf diese Weise eine Fokussierung der Ionen in allen drei Dimensionen, also eine Speicherung statt. Zur Ermittlung der Molekülmasse der Ionen wird während einer Analyse die Amplitude des Wechselspannungsanteils erhöht. Je nach Ionenmasse werden die Ionen bei Erreichen unterschiedlicher Amplituden aus der Ionenfalle geschleudert und gelangen zum Detektor, der aus einer Konversionsdynode, einer Form des Sekundärelektronenvervielfachers, besteht.

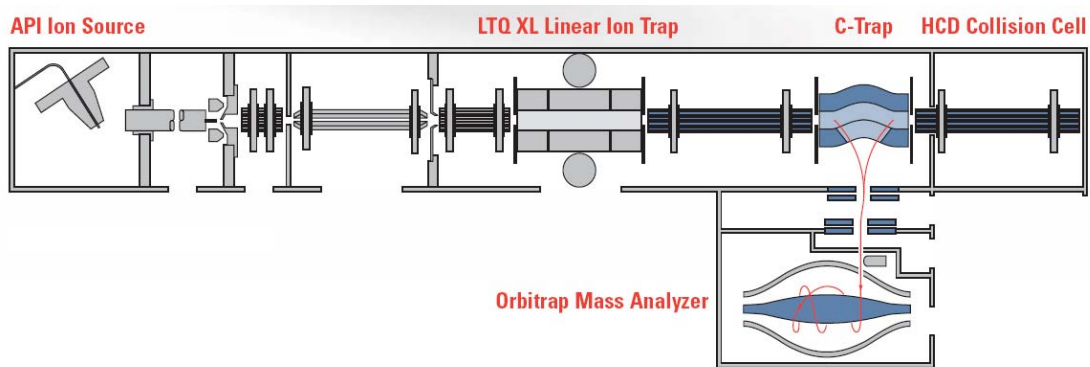


Abb. 2.3: Schematischer Aufbau der LTQ Orbitrap XL. Auflistung der Hauptkomponenten des Orbitrap XL Massenspektrometers bestehend aus Ionenquelle (*API Ion Source*), der linearen Ionenfalle (*LTQ XL Linear Ion Trap*), der für den Ionentransfer verantwortlichen C-Trap, der HCD Kollisionszelle (*HCD Collision Cell*) und dem Orbitrap Massenanalysator (*Orbitrap Mass Analyzer*). (Bild aus der Orbitrap XL-Broschüre, leicht modifiziert, Thermo Fisher Scientific).

Bei der LTQ Orbitrap XL befindet sich am Ende des *storage quadrupoles* eine Ringelektrode, an die eine Gleichstrom-Vorspannung angelegt werden kann, um ein kleines axiales Potential innerhalb des Quadrupols zu erzeugen, das die Ionen im Kollisionsgas gerade soweit abbremst, dass sie an dieser Stelle akkumulieren können. Nach ungefähr 10 – 400 ms haben sich genug Ionen angesammelt, so dass die Linse am Ende des Quadrupols einen Impuls bekommt, sich zu öffnen. Dies erzeugt ein starkes elektrisches Feld entlang der Achse des Quadrupols, was zu einer raschen Entleerung der aufkonzentrierten Ionen führt. In kurzen Zeitimpulsen (100 – 200 ns) werden so kleine Ionenpakete in die C-Trap weitergeleitet^{114,334}.

Die C-Trap ist eine Ionenfalle, deren Name sich vom c-förmigen Aufbau herleitet und die zum Transfer der Ionen zwischen des *storage quadrupoles*, der HCD-Kollisionszelle und der Orbitrap dient. Hierzu werden Ionen durch ein Linsensystem in den Eingangsbereich der Orbitrap geleitet, dessen Deflektorlinse für die Ionen durchlässig ist, indem eine adäquate Spannung angelegt wird.

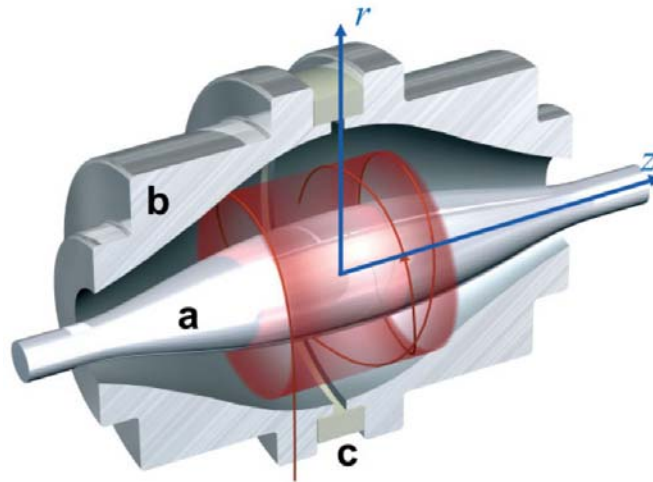


Abb. 2.4: Schnittmodell eines Orbitrap Massenanalysators. Ionen bewegen sich spiralförmig um eine innere Elektrode (a); die äußere Elektrode (b) wird durch einen Keramikring (c) in zwei Hälften geteilt. Der Spiegelstrom, der durch die Ionenbewegung entlang der inneren Elektrode entsteht, wird durch differentielle Verstärkung zwischen den beiden Hälften der äußeren Elektrode detektiert. Das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis verschiedener Ionen kann aufgrund ihrer spezifischen Oszillation über eine Fouriertransformation ermittelt werden. (Scigelova und Makarov, 2006³³⁵)

Die Orbitrap besteht aus einer zentralen und einer äußeren Elektrode (**Abb. 2.4**), die ein elektrostatisches Feld erzeugen, in dem Ionen eingefangen werden. Ionen, die in die Orbitrap eingeleitet werden, erfahren eine elektrostatische Anziehung in Richtung der axialen Elektrode. Diese wird jedoch aufgrund der Tangentialgeschwindigkeit, welche die Ionen beim Eintritt in die Orbitrap haben kompensiert. Dies führt dazu, dass die Ionen in Orbits mit dem Abstand r um die innere Elektrode herum fliegen und sich gleichzeitig oszillierend in z -Richtung entlang der inneren Elektrode bewegen. Dabei ist die Amplitude aller Ionen gleich, jedoch unterscheiden sich unterschiedliche Ionen in ihrer Frequenz, mit der sie die Flugbahn ausführen. Da es sich bei der Bewegung entlang der z -Achse um eine harmonische Oszillation handelt, kann über diese das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis der Ionen berechnet werden³³⁶:

$$\omega = \sqrt{\frac{z}{m}} k$$

mit:

ω = Winkelgeschwindigkeit

m = Masse

z = Ladung

k = Feldkrümmung

Die Detektion des Ionenspiegelstroms entlang der inneren Elektrode ist nur möglich, so lange die Ionenpakete ihre räumliche Kohärenz beibehalten. Dies wird gewährleistet, indem die äußere Elektrode in zwei Teile getrennt ist, die bei $z = 0$ durch einen isolierenden Keramikring miteinander verbunden sind. Auf diese Weise kann der Spiegelstrom, der durch die axiale Bewegung entsteht, gemessen werden, indem jede der beiden äußeren Elektrodenhälften die Stromstärke unterschiedlich verstärken. Unter Anwendung einer schnellen Fourier-Transformation (*fast Fourier transformation, FFT*) wird das in einem bestimmten Zeitbereich aufgenommene Signal in ein Masse-zu-Ladungs-Spektrum umgewandelt³³⁷.

Neben der bereits beschriebenen CID-Fragmentierung besitzt die Orbitrap XL die Option, Peptide in einem Hochenergiefeld zu fragmentieren. Diese als HCD (*higher-energy C-Trap dissociation* oder *higher-energy collisionally induced dissociation*) bezeichnete Fragmentierungsmethode wurde ursprünglich in der C-Trap durchgeführt, indem die Radiofrequenz-Spannungen (RF) von 1500 V auf 2500 V angehoben wurden. Durch die Erhöhung der RF-Spannung in der C-Trap können Ionen vor allem im niedrigen Massenbereich viel schlechter eingefangen werden als bei normalen RF-Werten. Aus diesem Grund wurde bei der LTQ Orbitrap XL eine speziell für die HCD-Fragmentierung konzipierte Oktapol-Kollisionsgaszelle eingebaut, die sich an die C-Trap anschließt (**vgl. Abb. 2.3**). Die Peptidfragmentierung unter HCD-Bedingungen in dieser Kollisionszelle führt zu Spektren, die von der Intensität her mit denen einer CID-Fragmentierung vergleichbar sind, jedoch auch Ionen im niedrigen Massenbereich zeigen, so dass es möglich ist, auch kleine Fragmente wie a_2 -, b_2 -, y_1 - und y_2 -Ionen sowie die Immoniumionen eines Peptids zu detektieren. Auch die

Detektion von phosphorylierten Aminosäuren gelingt durch eine HCD-Fragmentierung besser¹⁵⁹.

Das Auflösungsvermögen des Orbitrap-Massenanalysators liegt zwischen 7500 und 100.000 FWHM und kann variabel eingestellt werden. Da es für eine Erhöhung der Auflösung notwendig ist, die Wegstrecke, welche die Ionen im Massenanalysator zurücklegen zu verlängern, steigt folglich auch die Verweildauer der Ionen in der Orbitrap während eines Übersichtsscans. Ein Übersichtsscan bei einer Auflösung von 60.000 bei $m/z = 400$ dauert eine Sekunde. Die Massengenauigkeit liegt dabei bei < 5 ppm unter Verwendung der externen Kalibrierung³³⁸. Diese kann jedoch deutlich erhöht werden, indem man den kompletten Messvorgang über eine interne Kalibrierung hinzuschaltet: Für diese als Lockmasse (*lock mass*) bezeichnete interne Kalibrierungsmasse verwendet man typischerweise eine Substanz, die stets detektierbar ist, da sie als Kontaminierung in Lösungsmitteln oder in der Raumluft vorkommt. Beispiele hierfür wären lineare oder cyclische Siloxane oder Polyethylenglycole (PEGs). Da die genaue atomare Zusammensetzung dieser Kohlenwasserstoffverbindungen bekannt ist, kann die theoretische molekulare Masse der Verbindungen berechnet und als Standardmasse an Stelle des tatsächlich gemessenen Wertes verwendet werden. Da die LTQ Orbitrap XL während der Datenaufnahme ein Mal pro Scanzzyklus nach den eingegebenen Lockmassen scannt ist es auf diese Weise möglich, eventuell auftretende Masseschwankungen während einer Messung auszugleichen und hohe Massengenauigkeiten von einem ppm und weniger zu erreichen³³⁹.

2.2.7.4 Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie-Kopplung

Zahlreiche Proben beinhalten viel zu viele unterschiedliche Moleküle, um direkt im Massenspektrometer gemessen werden zu können. Deshalb ist es notwendig, die Probenkomplexität mittels eines *high performance liquid chromatography* (HPLC)-Systems zu reduzieren. Diese Art der *online*-Detektion verwendet die Mikrospray-Methode, bei der eine μ -Kapillarsäule an der HPLC mit einem leitfähig beschichteten Emitter im ESI-Quellenbereich des Massenspektrometers verbunden wird (*liquid chromatography mass spectrometry* (LC-MS)-Kopplung). Auf diese Weise erhält man Software-gesteuert eine kontinuierliche Aufnahme von MS- und MS/MS-Spektren der eluierenden Moleküle, die Daten zur eindeutigen Identifikation enthalten (Masse, Retentionszeit, Fragmentspektrum).

Als Packmaterial für die Säulen wird Kieselgel, an welches mit RMe_2SiCl behandelt wurde, wobei R eine geradkettige Alkylgruppe wie beispielsweise $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ (C18) oder C_8H_{17} (C8) ist, verwendet. Peptide bleiben aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen unter wässrigen Bedingungen an einer C18-Säule haften, für Proteine wird in der Regel eine C8-Säule verwendet. Durch prozentuale Erhöhung eines unpolaren Lösungsmittels wie beispielsweise Acetonitril in der mobilen Phase ist es möglich, an die Säule gebundene Peptide wieder abzulösen, wobei der strukturelle Aufbau des Peptids ausschlaggebend dafür ist, wie hoch der Anteil des unpolaren Laufmittels sein muss. Auf diese Weise ist es möglich, komplexe Probengemische aufzutrennen und die von der Säule eluierenden Ionen nach und nach im Massenspektrometer zu detektieren. Ein weiterer Vorteil dieses Systems ist, dass kleine Elutionsvolumina von der Säule erreicht werden, was zu einer Aufkonzentrierung der Peptide und damit zu einer Steigerung der Sensitivität führt.

Das für diese Arbeit verwendete HPLC-System ist eine Eksigent nanoLC-2D, welche im Gegensatz zu vielen anderen HPLC-Systemen splitfrei arbeitet. Praktisch bedeutet das, dass die HPLC mit zwei getrennten Pumpensystemen ausgestattet ist (Channel 1 und Channel 2), wovon die Pumpe des Kanals 1 mit einer hohen Flussrate (1 – 20 $\mu\text{l}/\text{min}$) pumpt, und die Pumpe des Kanals 2 die niedrige Flussrate (20 – 1000 nl/min), die für die Elution der Probe von der Säule benötigt wird, liefert. Um die HPLC für eine Messung vorzubereiten, wird das komplette System zunächst 30 Minuten mit Lösungsmittel B (80% ACN, 0,1% FA) bei 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ Flussrate gewaschen und 40 Minuten mit Lösungsmittel A (2% ACN, 0,1% FA) äquilibriert. Parallel dazu wäscht Channel 2 eine μ -Kapillar-Trennsäule 30 Minuten mit Lösungsmittel B und äquilibriert 40 Minuten bei 92% Lösungsmittel A. Die lyophilisierte Probe wird in Lösungsmittel A resuspendiert und in eine Probenschleife injiziert, von dem aus sie anschließend 30 Minuten auf eine C18-Vorsäule geladen wird, die zur Aufkonzentrierung und Entsalzung dient. Der Vorsäule angeschlossen ist eine μ -Kapillartrennsäule, die ebenfalls mit C18-Kieselgel beschichtet ist und von der Vorsäule eluierende Molekülgruppen weiter auftrennt. Eine metallbeschichtete Kapillarnadel (PicoTip) dient als ESI-Quelle und generiert durch die kontinuierliche Flussrate des Channels 2 bei 300 nl/min ein Elektrospray. Der Gradient, über den die säulengebundenen Peptide eluiert werden beginnt anteilig bei 8% Lösungsmittel B und wird linear innerhalb von 95 Minuten auf 55% Lösungsmittel B erhöht, was einem Acetonitrilgradienten von 8,24% ACN auf 44,9% ACN entspricht. Ein anschließender Anstieg auf 60% Lösungsmittel B (48,8% ACN) innerhalb von 5 Minuten sowie darauf folgend auf 100% Lösungsmittel B (80% ACN) wäscht verbleibende Peptide von der Säule und das System kann für die nächste Probe äquilibriert werden.

Für Messungen an der Orbitrap wurde dieser Aufbau insofern modifiziert, als dass ein Spark MicroAS Autosampler an die HPLC angeschlossen wurde, um das Injizieren der Proben in die Probenschleife zu automatisieren. An das Ventil des Autosamplers wurde Channel 2 als einzige Pumpe angeschlossen, so dass sich die Flussraten für das Waschen und Äquilibrieren der Probenschleife, der Vor- und der Trennsäule auf 500 nl/min reduziert. Dies hat zur Folge, dass die Waschzeit am Anfang eines Laufes auf 60 Minuten erhöht wird, die anschließende Äquilibrierung dauert 180 Minuten. Danach wird die Probe in die Probenschleife aufgezogen und bei auf 300 nl/min reduzierter Flussrate 90 Minuten bei 100% Lösungsmittel A auf die Vorsäule geladen und im Anschluss 120 Minuten bei dem wie oben beschriebenen Lösungsmittelgradienten eluiert. Da der Autosampler nach jedem Durchlauf die Spritze mit Methanol wäscht, ist es wichtig darauf zu achten, dass das Ventil in beiden Positionen mit Lösungsmittel A gewaschen wird, da das Methanol ansonsten das Binden der Peptide an die Säule verhindert. Bei diesem Setup sind Vor- und Trennsäule in Reihe geschaltet. Dadurch ist es möglich zu überprüfen, ob Peptide wirklich an die Säulen binden, da die Orbitrap bereits beim Ladevorgang mit der Datenaufnahme starten kann. Der Nachteil dieses Setups ist, dass es aufgrund der geringen Flussraten im System bei installierter 10 µl-Probenschleife ungefähr 50 Minuten dauert, bis das Lösungsmittel vom Pumpenausgang zum PicoTip-Emitter gelangt. Dies hat somit zur Folge, dass es auch 50 Minuten länger dauert, bis der Gradient, nachdem die HPLC diesen schon gefahren hat, am Massenspektrometer ankommt und gemessen werden kann. Deshalb wurde das Programm der HPLC so modifiziert, dass die Pumpe nach Beendigung des Gradienten noch eine Stunde mit der Endkonzentration des Gradienten (55% Lösungsmittel B) weiterläuft. Dies erhöht die Messdauer auf insgesamt 8 Stunden und 55 Minuten pro Lauf.

Im Rahmen der Optimierungsarbeiten wurde diese Konfiguration als Grundlage für ein Setup benutzt, das beide Pumpensysteme der Eksigent-HPLC verwendet. Dazu wurde die Pumpe des Channels 1 mit dem Ventil des Autosamplers verbunden, die Vorsäule, Trennsäule und Pumpenkapillare des Channels 2 an dem zweiten Ventil der HPLC angeschlossen. Dadurch ist es möglich, den Wasch- und Äquilibrierungsvorgang sowie das Laden der Probe auf die Vorsäule bei einer Flussrate von 20 µl/min durchzuführen. Das komplette Programm sieht dann wie folgt aus: Zunächst wird die Probenschleife und die Vorsäule bei 20 µl/min für 30 min mit Lösungsmittel B gewaschen und anschließend 40 min mit Lösungsmittel A äquilibriert. Danach wird das Ventil des Autosamplers von dem Methanol gereinigt, das durch das Reinigen der Spritze in den Anschlüssen zurückgeblieben ist, indem diese erst auf der *inject*-Position und dann auf der *load*-Position mit einigen Mikrolitern Lösungsmittel A

durchgespült werden, bevor 5 µl der Probe in den Probenloop aufgezogen werden. Daraufhin wird die Probe 30 min auf die Vorsäule geladen. Parallel dazu wird die Trennsäule 100 min mit Lösungsmittel A bei 300 µl/min (*standby-flow*) äquilibriert. Nach dem Ladevorgang schaltet das zweite Ventil der HPLC von der *Load*-Position auf die *Inject*-Position, so dass Pumpe 2 den Gradienten zur Elution der Peptide über die Vor- und die Trennsäule laufen lassen kann. Das Umschalten des Ventils ist gleichzeitig das Startsignal für die Orbitrap, um mit der Datenakquisition zu beginnen. Der Gradient beginnt bei 0% Lösungsmittel B (2% ACN) und steigt innerhalb von 120 min auf 55% Lösungsmittel B (44,9% ACN) an. In den darauf folgenden 5 min wird der Anteil von Lösungsmittel B auf 60% (48,8% ACN) erhöht, um dann für 30 min bei 100% Lösungsmittel B (80% ACN) zu laufen, um die Trennsäule vor dem Äquilibrierungsvorgang im *standby-flow* zu waschen. Damit der *standby-flow* auch bei 100% Lösungsmittel A läuft, endet der Gradient, indem der Lösungsmittelfluss in den letzten 5 min auf 100% A gestellt wird. Dieses Setup ist von der Performance her vergleichbar mit dem vorherigen, die Laufzeit eines kompletten Laufs verkürzt sich jedoch auf 4 Stunden und 25 Minuten.

Bei beiden Massenspektrometern wurden die Vorläuferionen zur Fragmentierung ($[M+2H]^{2+}$ und $[M+3H]^{3+}$) automatisch durch die Software ausgewählt: Beim Q-TOF Ultima wurde MassLynx 4.0 mit Service Pack 4 verwendet, um die Einstellungen für die Selektionsparameter festzulegen (*data-dependent ion selection, DDIS*). Die Integrationszeit des TOF-Analysators beträgt beim MS-Survey-Scan 2 Sekunden, im MS/MS-Modus 4 Sekunden bei einer Interscanverzögerung von 0,1 Sekunde; die Daten wurden kontinuierlich aufgezeichnet. Bei der Orbitrap wurden ebenfalls zwei- und dreifach geladene Ionen zur Fragmentierung selektiert, die dazu verwendete Software ist Xcalibur 2.0.7 mit Service Pack 1. Für die Messungen wurden die Einstellungen für Ionenfalle und Orbitrap wie in **Tabelle 2.5** eingestellt. Der Übersichtsscan wird in der Orbitrap bei einer Auflösung von 60000 aufgenommen, parallel dazu werden die selektierten Vorläuferionen in der Ionenfalle über CID fragmentiert und gemessen. Die Datenaufzeichnung erfolgte ebenfalls kontinuierlich.

Tab. 2.5: Einstellungen der Ionenfalle (Ion Trap) und des Orbitrap Massenanalysators (FTMS). Aufgelistet wird die maximal akkumulierte Anzahl von Ionen (Events), der Microscans und der Zeit, welche die Akkumulation der Ionen maximal dauern darf (Max Ion Time (ms)).

	Events	Microscans	Max Ion Time (ms)
Ion Trap Zoom AGC Target	3000.00	1	50.00
Ion Trap Full AGC Target	30000.00	1	50.00
Ion Trap SIM AGC Target	10000.00	1	50.00
Ion Trap MSn AGC Target	5000.00	3	100.00
FTMS Full AGC Target	1000000.00	1	500.00
FTMS SIM AGC Target	50000.00	1	500.00
FTMS MSn AGC Target	100000.00	1	1000.00

2.2.7.5 Interpretation von Peptid-Fragmentspektren

Die durch die Elektrospray-Ionisation erzeugten Peptidionen haben die Eigenschaft, dass sich Protonen besonders leicht an basischen Stellen, beispielsweise der N-terminalen Aminosäure anlagern können. Da sich die Basizität der Seitenketten von Histidin, Lysin und Arginin in der Gasphase erhöht, können sich Protonen aber auch dort anheften und bleiben auch bei der während der Fragmentierung stattfindenden Stoßaktivierung an dieser Stelle lokalisiert. Die Protonen an den N-Termini der Peptide können bei der Fragmentierung jedoch zu jeder beliebigen Peptidbindung wandern (Migration durch interne Solvatisierung) und sich dort an den Carbonylsauerstoff anlagern. So entsteht eine heterogene Population von Protonen, die sich hinsichtlich der Position der Protonen an den Amidbindungen unterscheiden³⁴⁰, weshalb jedes Vorläuferion des gleichen Peptids bei der Fragmentierung unterschiedliche Ionen bildet, so dass eine Serie von Fragmentionen entsteht, aus der sich die Sequenz des Peptids ermitteln lässt³⁴¹⁻³⁴³.

Die Fragmentierung des Peptids wird an der protonierten Stelle initiiert und führt zu einem zyklischen Intermediat, das durch eine von zwei unterschiedlichen Reaktionen schrittweise fragmentiert. Dabei entstehen entweder zwei einfach geladene Fragmentionen oder ein zweifach geladenes und ein neutrales Fragment, wobei Fragmentionen zur Detektion wenigstens eine Ladung tragen müssen. Fragmente, die den N-Terminus des Peptids enthalten werden als a-, b- oder c-Fragmente bezeichnet. Im Gegensatz dazu bilden geladene C-Termini x-, y- und z-Serien³⁴⁴ (**Abb. 2.5**). Die in einem Fragmentspektrum am häufigsten auftretenden

Serien sind y- und b-Serien wobei bei manchen b-Ionen ihr korrespondierendes a-Ion auch oft zu sehen ist. Des Weiteren erhält jedes Fragment zusätzlich zu seiner Buchstabenbezeichnung noch einen zusätzlichen Index, der die Anzahl der im Fragment vorhandenen Aminosäuren angibt.

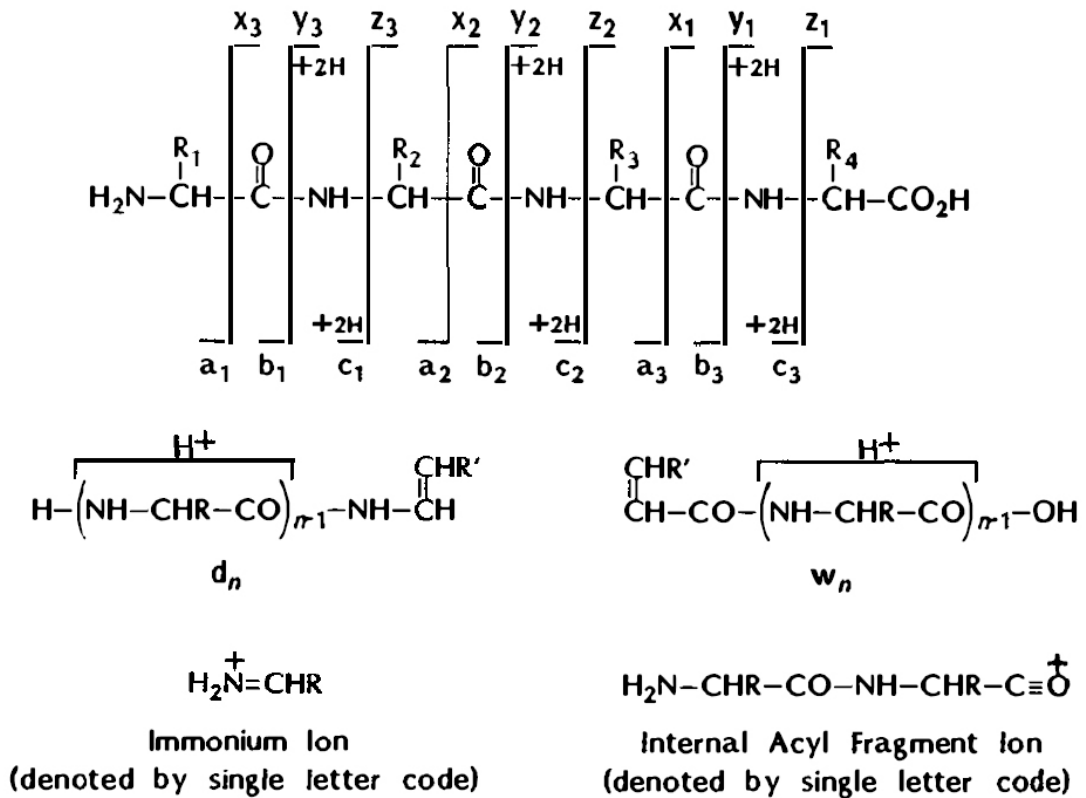


Abb. 2.5: Peptidfragmentierung. Dargestellt sind die Bruchstellen in einem Peptid und die entsprechenden Fragmente, die dabei entstehen, sowie die Struktur von Immoniumionen und internen Fragmenten mit einer Acylgruppe. Fragmente, die den N-Terminus des Peptids enthalten, werden als a- b- oder c-Ionen bezeichnet, Fragmente, die den C-Terminus des Peptids enthalten als x- y- oder z-Ionen (Bild: Biemann 1992³⁴⁵).

Die durch CID erzeugten Fragmentspektren enthalten hauptsächlich b- und y-Ionen. Durch den neutralen Verlust einer CO-Gruppe aus den b-Ionen entsteht die a-Serie ($\Delta m = 28$ Da). Weitere neutrale Verluste, die bei der Fragmentierung von Peptiden auftreten können sind der Verlust von Wasser ($\Delta m = 18$ Da) aus a-, b- und y-Fragmenten sowie aus den Seitenketten von Serin, Threonin, Asparaginsäure und Glutaminsäure, der Verlust von Ammoniak ($\Delta m = 17$ Da) aus Asparagin, Glutamin, Lysin und Arginin und die Abspaltung von

Dehydroalanin aus Cystein ($\Delta m = 34$ Da). Durch Bruch von zwei Peptidbindungen können außerdem interne Fragmente entstehen.

Die Auswertung der mit dem Q-TOF aufgezeichneten Fragmentspektren erfolgte größtenteils manuell, wobei der Abstand zwischen zwei benachbarten Peaks einer Serie dem Verlust einer Aminosäure entspricht. Durch Berechnung der Differenz der m/z-Werte kann die Identität der Aminosäure ermittelt werden. Eine Auflistung der Aminosäuren und ihrer Massen in der Peptidbindung befindet sich in **Tabelle 2.6**. Zusätzlich geben Immoniumionen ($H_2N=CHR^+$), für bestimmte Aminosäuren charakteristische m/z-Werte im unteren Massenbereich des Fragmentspektrums weitere Hinweise auf die Zusammensetzung des Peptids³⁴⁶.

Tab. 2.6: Aminosäuremassen: Auflistung der Aminosäuren mit ihrem Drei- und Einbuchstabencode sowie der zugehörigen Massen ihrer korrespondierenden Immoniumionen, ihrer y_1 -Ionen und ihrer molekularen Masse in der Peptidbindung.

Aminosäure			Immoniumion	MW	y_1
Glycin	Gly	G	30.03383	57.02146	76.03930
Alanin	Ala	A	44.04948	71.03711	90.05495
Serin	Ser	S	60.04439	87.03203	106.04987
Prolin	Pro	P	70.06513	97.05276	116.07060
Valin	Val	V	72.08078	99.06841	118.08626
Threonin	Thr	T	74.06004	101.04768	120.06552
Cystein	Cys	C	76.02155	103.00918	122.02703
Leucin	Leu	L	86.09643	113.08406	132.10191
Isoleucin	Ile	I	86.09643	113.08406	132.10191
Asparagin	Asn	N	87.05529	114.04293	133.06077
Asparaginsäure	Asp	D	88.03930	115.02694	134.04478
Glutamin	Gln	Q	101.07094	128.05858	147.07642
Lysin	Lys	K	101.10732	128.09496	147.11280
Glutaminsäure	Glu	E	102.05495	129.04259	148.06043
Methionin	Met	M	104.05285	131.04048	150.05833
Histidin	His	H	110.07127	137.05891	156.07675
Phenylalanin	Phe	F	120.08078	147.06841	166.08626
Arginin	Arg	R	129.11347	156.10111	175.11895
Tyrosin	Tyr	Y	136.07569	163.06333	182.08117
Tryptophan	Trp	W	159.09167	186.07931	205.09715

Durch die Ermittlung einer Teilsequenz (*sequence-tag*) des Peptids ist es möglich, über eine Datenbanksuche die vollständige Sequenz des Peptids zu bekommen. Hierfür wird das Computerprogramm Mascot Ver. 2.2 verwendet^{347,348}, dem der MOWSE-Algorithmus (*molecular weight search*) zur Identifizierung von Fragmentspektren zugrunde liegt³⁴⁹. Ein

Merkmal dieses Suchalgorithmus ist, dass man bei längeren Teilsequenzen, mit denen die Suche durchgeführt wird, auch signifikantere Treffer erhält, weshalb Suchen für MHC-Klasse-I-Liganden nur selten signifikante Treffer ergeben. Des Weiteren wird die Massentoleranz für Vorläuferion und Signalen in MS/MS-Spektren angegeben, wobei auch hier eine Verringerung der Massentoleranz zu weniger und genaueren Treffern führt.

Die Massengenauigkeit des Q-TOF Ultima liegt bei Peptiden mit dem Molekulargewicht von ~ 1000 Da bei ungefähr 50 ppm. Deshalb wurde die Massenabweichung für die Mascot-Suche auf 0,2 Da für die Signale in Übersichtsscans und Fragmentspektren festgelegt. Als Referenz-Datenbanken für die Suchen wurde entweder die ‚IPI Human‘ oder die ‚NCBI nr‘ verwendet. Mittels der Q-TOF Software ist es möglich, die gefundenen Sequenzvorschläge mit dem Fragmentspektrum abzugleichen, und auf diese Weise die Peptidsequenz zu finden, die am besten zum Fragmentierungsmuster passt. Eine endgültige Bestätigung der Sequenz ist nur durch den Abgleich mit einem Fragmentspektrum des entsprechenden synthetischen Peptids möglich.

2.2.7.6 Peptididentifizierung über Eichpeptide

Um HLA-Liganden eines interessanten Proteins zu identifizieren, ist es möglich, sich über ein spezielles Vorhersageprogramm wie beispielsweise SYFPEITHI¹²⁵ mögliche Epitope unter Berücksichtigung der Ankeraminosäuren aus diesem Protein vorhersagen zu lassen. Nach einem MS/MS-Experiment kann man im Anschluss nach den Massen der vorhergesagten Peptide im Chromatogramm suchen und so feststellen, ob die Peptide wirklich vorhanden sind oder nicht. Auf diese Weise wurden schon einige Epitope entdeckt^{131,135}.

Eine Verfeinerung dieser Methode besteht darin, sich vorhergesagte Peptide synthetisieren zu lassen und diese als Eichpeptide der zu analysierenden Probe zuzusetzen. Dazu werden die beiden Peptidproben differentiell isotonenmarkiert (vgl. 2.2.6), wobei die synthetischen Eichpeptide mit dNIC, die natürlichen Liganden mit NIC modifiziert werden, um zu verhindern, dass der Isotopeneffekt des synthetischen Peptids das Signal des natürlich präsentierten Peptids überdeckt. Da verschiedene Peptide unterschiedlich gut über ESI ionisiert werden können, ist es zu empfehlen, die synthetischen Peptide jeweils einzeln zu modifizieren und gesondert über *direct infusion* im Massenspektrometer anzuschauen um abzuschätzen, welche Menge des Peptids für einen HPLC-Lauf eingesetzt werden muss. Die

Modifizierung einer Peptidmischung führt häufig dazu, dass manche der Eichpeptide nur noch schwach oder gar nicht mehr zu sehen sind.

In einem ersten Experiment werden die synthetischen Peptide einzeln in je einem LC/MS-Lauf gemessen, um deren Retentionszeit und Intensität im Massenspektrometer zu messen. Anhand dieser Daten können die Eichpeptide so zusammengemischt werden, dass sie ungefähr mit gleicher Intensität im Übersichtslauf zu sehen sind, was in einem weiteren LC/MS-Lauf überprüft wird. Erst nachdem sämtliche Eichpeptide in ungefähr gleicher Intensität detektiert wurden, werden diese in entsprechenden Mengen der natürlichen Probe zugesetzt und diese daraufhin gemessen.

Da die Retentionszeit, zu der die Eichpeptide eluieren bekannt ist, kann man nun anhand des Übersichtschromatogramms überprüfen, ob zu den entsprechenden Zeiten nur das dNIC-modifizierte Peptid, oder auch ein entsprechendes NIC-modifiziertes Peptid vorkommt: Da der Massenunterschied der beiden Nicotinsäurederivate 4,025 Da beträgt, ist bei einem natürlich vorkommenden Liganden im Übersichtsscan ein Signalpaar zu sehen, die um diese Massedifferenz auseinanderliegen. Bei doppelt geladenen Signalen beträgt die Differenz 2,013, bei dreifach geladenen Signalen 1,341. Jedoch bringt erst der Abgleich des Fragmentspektrums des natürlichen Liganden mit dem des Eichpeptids Gewissheit darüber, ob es sich bei den beiden Peptiden wirklich um die gleichen handelt, oder es nur zwei Peptide mit nahezu ähnlicher Masse und Elutionseigenschaften sind, die sich jedoch in ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden.

Kapitel 3

Ergebnisse und Diskussion

~ Teil 1 ~

Optimierung zweier Massenspektrometer für
Peptidanalytik und Etablierung einer
standardisierten Messmethode für HLA-
Liganden

3.1.1 Hintergrund und Überblick über den Versuch

Die beste Möglichkeit, um die Aminosäuresequenzen von HLA-Liganden zu identifizieren, ist der Einsatz einer HPLC und eines Massenspektrometers. Die beiden Systeme übernehmen dabei unterschiedliche Aufgaben: Mit dem Massenspektrometer wird das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis der Peptide gemessen, welche in einem Übersichtsscan dargestellt werden, und es können Fragmentierungen der im Übersichtsscan aufgenommenen Peptidsignale durchgeführt werden, um später die Aminosäuresequenz eines Peptids zu ermitteln. Dabei wird nur jeweils ein Peptid ausgewählt und fragmentiert, da es ansonsten nicht möglich wäre zu entschlüsseln, welches Signal im Spektrum von welchem Peptid stammt. Deshalb müssen diese beiden Schritte bei vielen Massenspektrometern nacheinander erfolgen, wie es beispielsweise bei dem für die Optimierungen verwendeten Q-TOF-Massenspektrometer der Fall ist. Dort sind ein Analysator und eine Kollisionszelle in Reihe geschaltet, weshalb entweder bei ausgeschalteter Kollisionszelle ein Übersichtsscan, und bei eingeschalteter Kollisionszelle ein Fragmentspektrum aufgenommen werden kann (vgl. Kap. 2.7.2). Eleganter ist es bei dem Aufbau der LTQ Orbitrap XL gelöst: Durch die Vereinigung zweier separater Analysatoren, der linearen Ionenfalle und der Orbitrap ist es möglich, Übersichtsscan und Fragmentspektren parallel aufzunehmen, was einen deutlichen Geschwindigkeitsgewinn bei den Messungen zur Folge hat (vgl. Kap. 2.7.3). Da es dennoch nicht möglich ist, sämtliche MHC-Liganden aus einer Immunpräzipitation gleichzeitig zu messen, wird eine HPLC benötigt, über welche die Probe aufgetrennt wird. Durch das Aufkonzentrieren der Probe auf eine *reversed-phase*-Säule und durch das Anlegen eines Lösungsmittelgradienten werden die Peptide nach und nach von der Säule eluiert und somit für das Massenspektrometer besser detektierbar, da nun eine Auftrennung nach Retentionszeit und Masse-zu-Ladungs-Verhältnis möglich ist.

Zum einen gilt es also, den Gradienten der HPLC so zu optimieren, dass die Peptide gut aufgetrennt, aber immer noch detektierbar, also in einem scharfen Elutionspeak von der Säule abgelöst werden. Und zum anderen müssen die Einstellungen des Massenspektrometers so eingestellt werden, dass die Peptide gerade so lange detektiert und fragmentiert werden, dass sie bei der Auswertung sequenziert werden können. Das Ziel ist es also, das HPLC-MS-System so zu optimieren, dass ein bestmögliches Verhältnis von identifizierbaren Peptidspektren in so kurz wie möglicher Zeit aufgenommen werden.

Diese Daten zuverlässig auszuwerten stellt ein großes Problem dar, da viele Auswertprogramme nicht mit dem Sequenzieren natürlich prozessierter Peptide zurecht kommen. Deswegen ist ein weiterer Bestandteil dieses Versuchs, die von Thermo Fisher

Scientific entwickelte Software ‚Proteome Discoverer‘ auf Funktionalität bezüglich der Identifizierung von HLA-Liganden zu testen.

3.1.2 Das Q-TOF Ultima – Verbesserungen gegenüber dem Q-TOF I

Die Qualität eines Massenspektrometers definiert sich durch drei Faktoren, das Auflösungsvermögen, die Massengenauigkeit und die Sensitivität. Dabei gelten folgende Grundsätze: Je größer das Auflösungsvermögen ist, desto genauer können Peptidsignale im Übersichtsscan voneinander getrennt werden, je höher die Massengenauigkeit ist, desto niedriger kann die Massentoleranz bei der Auswertung eingestellt werden, und je besser die Sensitivität ist, desto kleiner können die Peptidkonzentrationen noch sein, um immer noch detektiert werden zu können.

Das Q-TOF Ultima ist ungefähr fünf Jahre jünger als das Q-TOF I und stellt die dritte Generation der Q-TOF Massenspektrometer der Firma Waters dar. Die meisten der Geräteeinstellungen wurden schon während der Installation vom Servicetechniker individuell eingestellt, so dass die Optimierungsarbeiten auf einige wenige Spannungswerte fokussiert werden konnten. Das Auflösungsvermögen des Massenspektrometers liegt laut Spezifikation bei 10000 FWHM. Um dies zu überprüfen wurde [Glu1]-Fibrinopeptid B (GluFib) in einer Konzentration von 1 pmol/μl über die Spritzenpumpe gemessen und die Anzahl an Scans aufsummiert, die einem Picomol des Peptids entsprechen. Das Auflösungsvermögen von einem Picomol GluFib wurde auf ~11500 berechnet, was eine Trennung zweier Signalpeaks von 1000.00 Da und 1000.08 Da im Übersichtsscan ermöglicht. Im Vergleich dazu lag das Auflösungsvermögen des Q-TOF I bei ~3200, was lediglich eine Auftrennung zweier Signale von 1000.00 Da und 1000.31 Da ermöglicht. Auch wurde bei einer solch niedrigen Auflösung keine Grundlinientrennung erreicht (**Abb. 3.1**). Diese Werte ermitteln sich aus dem V-Modus des Flugrohres.

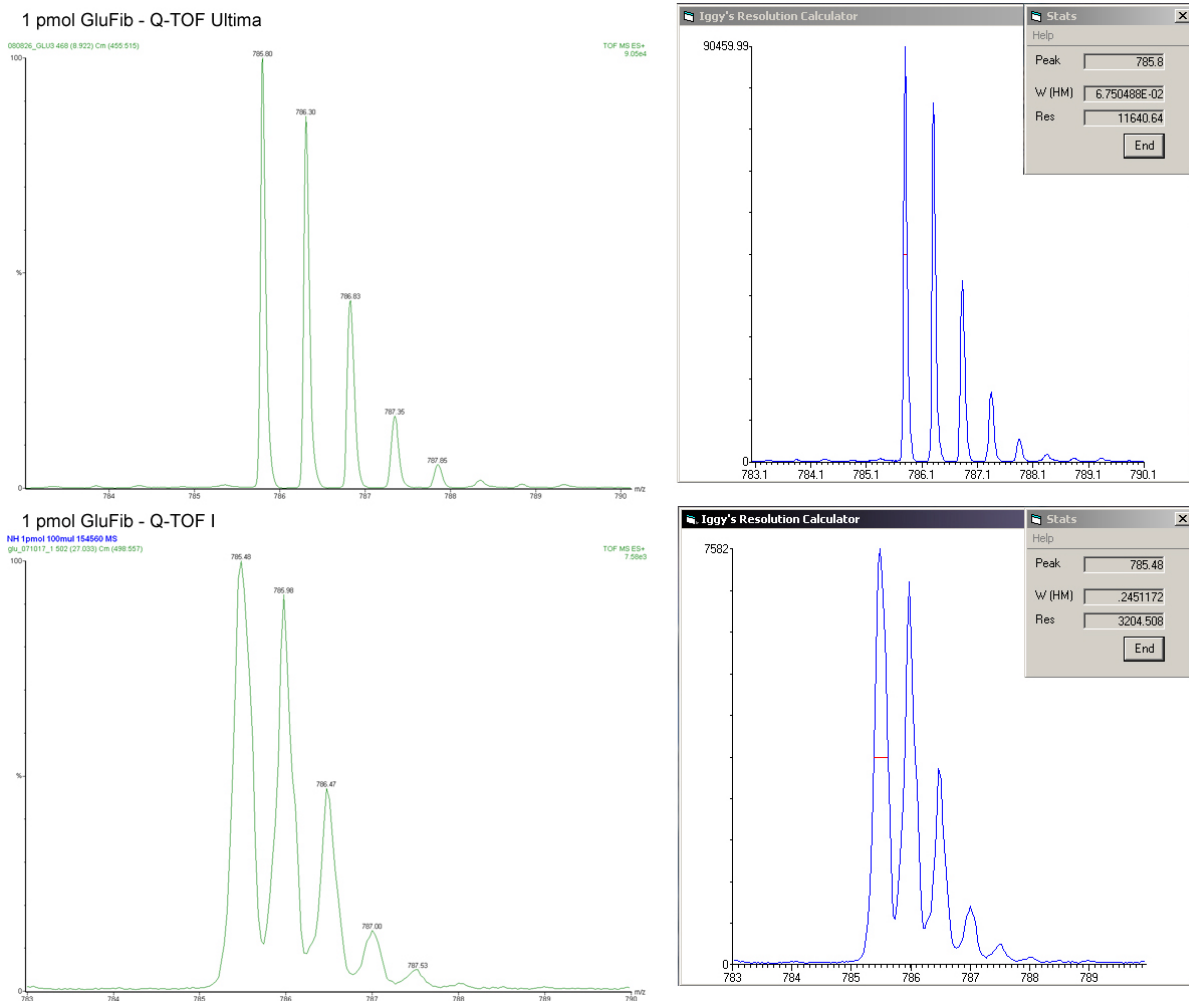


Abb. 3.1: Auflösungsvermögen der Q-TOF-Massenspektrometer. Das Auflösungsvermögen des Q-TOF Ultima (oben) liegt bei einem Picomol GluFib mit $m/z = 785,84$ bei etwa 11500 FWHM und ist somit um den Faktor 3,5 höher als beim Q-TOF I (unten). Diese Auflösung ermöglicht auch schon die Grundlinientrennung von Haupt- und Isotopensignalen des Peptids. (Auflösungsvermögen berechnet mit Iggy's Resolution Calculator).

Leider scheint das Auflösungsvermögen nicht nur von der Flugstrecke und dem m/z -Wert des Peptids abzuhängen, sondern auch von der Konzentration, was eine Messung bei 100 fmol GluFib zeigt (**Abb. 3.2**). Dort liegt der Wert bei ~ 8500 , was ungefähr 74% von dem bei einem Picomol GluFib ermittelten Wert entspricht.

Auf die Massengenauigkeit kann kaum Einfluss genommen werden. Bei täglicher Kalibrierung des Geräts liegt sie bei ungefähr 0,1 Da und hängt mit der Länge der Flugstrecke im TOF-Rohr zusammen, die korrekt berechnet werden muss.

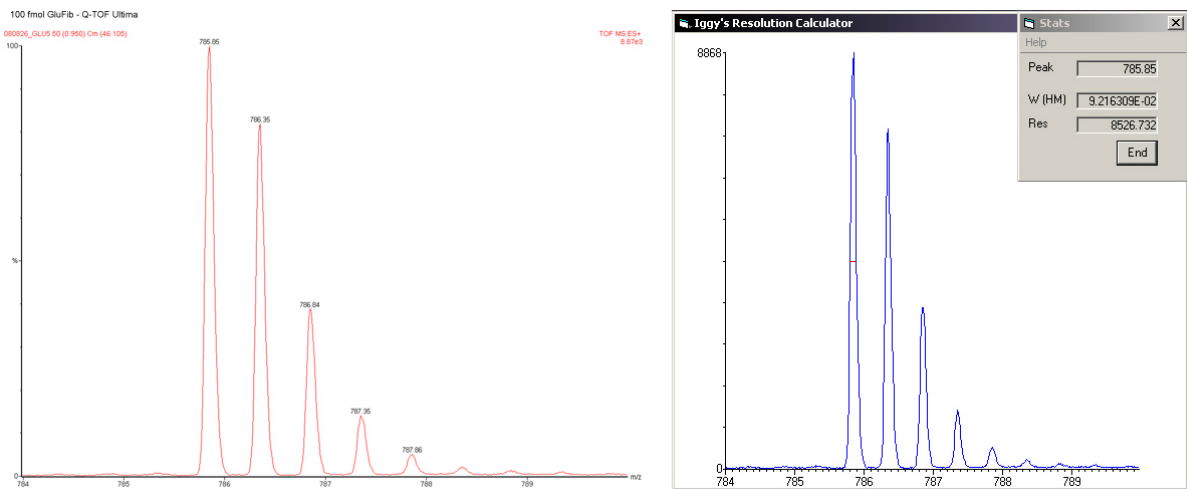


Abb. 3.2: Auflösungsvermögen von 100 fmol GluFib am Q-TOF Ultima. Das Auflösungsvermögen beträgt nur noch 74% des Wertes von einem Picomol des Peptids, was jedoch immer noch für die Grundlinientrennung ausreichend ist.

Die Sensitivität des Q-TOF-Massenspektrometers wird durch mehrere Faktoren beeinflusst. Den wohl größten Einfluss auf die Signalintensität nimmt die Spannung, die an der *RF lens 1*, liegt. Diese Linse liegt direkt vor dem Analysatorbereich und filtert störende ionisierte Partikel aus der Umgebung des Quellenbereichs, die ansonsten als Störsignale im Übersichtsscan zu sehen wären. Ist die Spannung allerdings zu hoch gewählt, so kommt es bereits vor dem Analysatorbereich in der Quellenregion zu Peptidfragmentierungen. Ebenso beeinflusst die Temperatur des Quellenbereichs die Intensität von Peptidsignalen. Um die optimalen Werte für beide Faktoren zu ermitteln, wurde über die Spritzenpumpe eine GluFib-Lösung von 500 fmol/μl bei einer Flussrate von 4 μl/min direkt in das Massenspektrometer injiziert und die aufsummierte Peptidintensität von zehn Scans mit einer Dauer von einer Sekunde notiert. Dabei stellte sich heraus, dass die Erhöhung der Spannung der *RF lens 1* zu einer starken Verringerung des Peptidsignals führt (**Abb. 3.3A**). Nicht ganz so dramatisch fällt der Effekt bei der Temperatur der Quelle aus, bei der sich erst bei über 100°C eine Verringerung der Intensität abzeichnet (**Abb. 3.3B**). Diese Werte wurden ermittelt, indem 25 Scans mit einer Dauer von einer Sekunde aufsummiert wurden. Aus diesem Grund wurde der Wert der *RF lens 1* auf 30 V und die Temperatur der Quelle auf 80°C für zukünftige Messungen festgelegt.

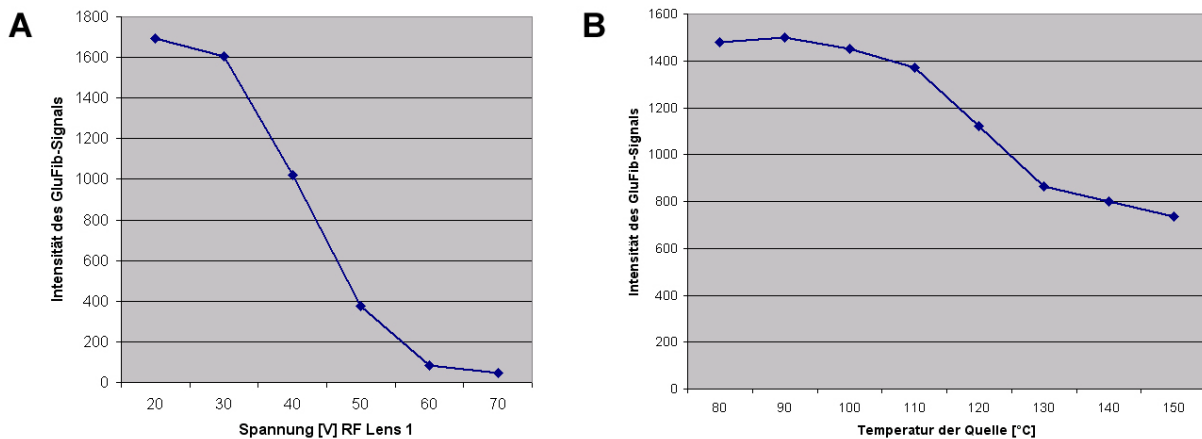


Abb. 3.3 Einfluss der RF lens 1 und der Temperatur auf die Signalintensität. A: Bei zunehmender Spannung der RF lens 1 nimmt die Intensität des GluFib-Signals ab. **B:** Auch bei einer höheren Temperatur des Quellenbereichs verschlechtert sich das Signal.

Der dritte Faktor, der die Intensität des Peptidsignals beeinflusst ist die Spannung, die an der Mikrokanalplatte (MCP), also am Detektor angelegt ist. Je nach Abnutzungszustand muss diese höher oder niedriger eingestellt werden, um Peptidsignale optimal detektieren zu können. Aus diesem Grund wurde ein sogenannter *MCP-gain-test* durchgeführt, über den die beste Spannung an der MCP herausgefunden werden kann. Dafür wurde eine GluFib-Lösung mit der Konzentration von 500 fmol/ μ l bei 4 μ l/min direkt ins Massenspektrometer injiziert und gemessen. Bei kontinuierlicher Datenaufnahme wurde die Spannung der MCP bei 1500 V beginnend in Hunderterschritten bis auf 2000 erhöht. Dabei wurde sowohl die Intensität des *total ion current* (TIC)-Chromatogramms, als auch die Intensität des GluFib-Signals im *base peak intensity* (BPI)-Chromatogramm beobachtet (**Abb. 3.4**). Erst ab einer Spannung von 1700 V am MCP-Detektor wurde ein Anstieg des detektierten GluFib-Signals im BPI verzeichnet (Zeitindex 3,00 min – 4,00 min), das sich bei 1800 V noch verstärkte (Zeitindex 4,00 min – 5,00 min). Parallel dazu stieg auch die Intensität des TIC ebenfalls stark an. Eine weitere Erhöhung der Spannung auf 1900 V resultierte zwar im TIC in einem weiteren Zuwachs der Intensität, jedoch konnte im BPI eine deutliche Verringerung des GluFib-Signals verzeichnet werden (Zeitindex 5,00 min – 5,75 min). Selbst eine Abweichung von 50 V von den 1800 V führt zu einer geringeren Signalintensität (Zeitindizes 5,70 min – 6,50 min und 7,00 min – 7,75 min). Warum der TIC bei 1750 V ebenfalls einbricht, ist nicht bekannt. Der für diesen Test festgelegte Endwert von 2000 V führt ebenfalls zu nur noch geringer Peptidintensität im BPI (Zeitindex 8,00 min – 8,25 min), wohingegen das Signal im TIC

wieder auf den Wert zuvor hochschnellt. Basierend auf diesen Ergebnissen ist die für den MCP-Detektor geeignetste Spannung bei 1800 V (Stand Juni 2008).

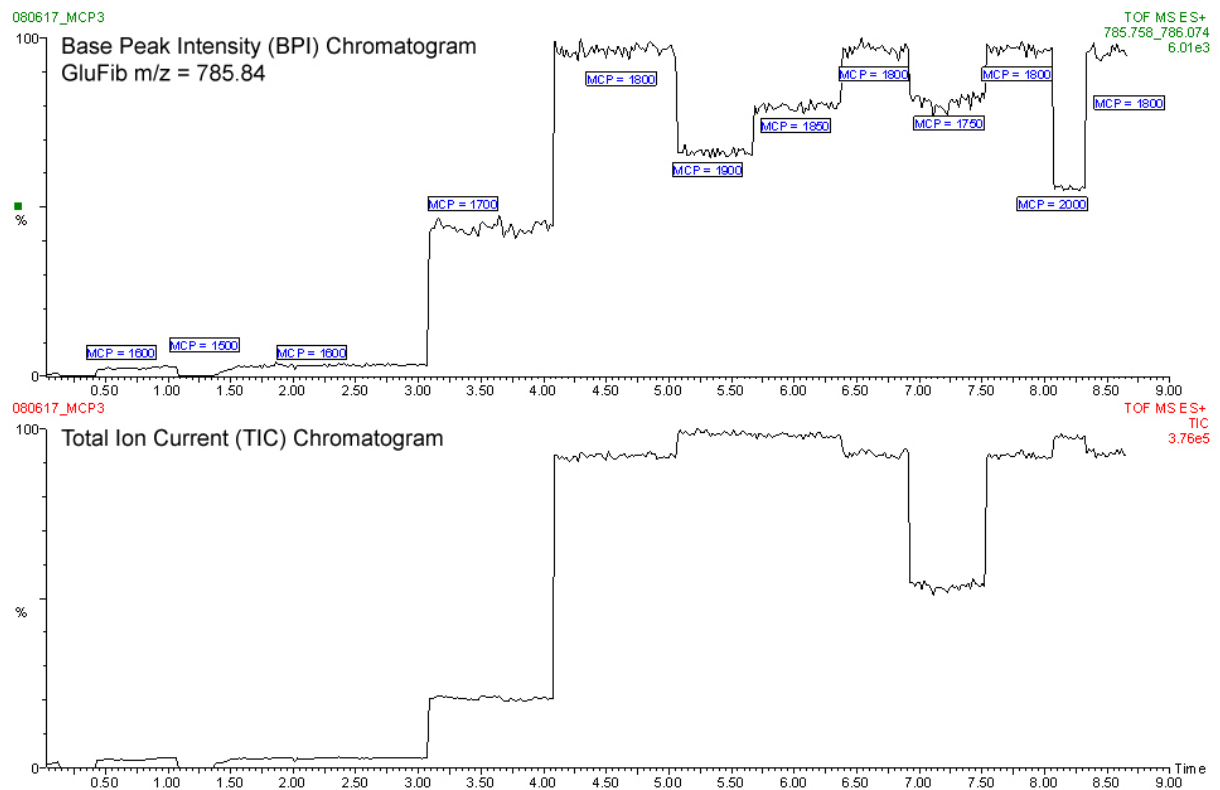


Abb. 3.4: MCP-Gain-Test. Der Test wurde bei einer Spannung von 1500 V bis 2000 V an der Mikrokanalplatte des Detektors unter Beobachtung des TIC und des BPI von GluFib durchgeführt. Die Signalintensität des Peptids erreicht bei 1800 V ihr Maximum und selbst Abweichungen von +/- 50 V resultieren in einem Verlust der Signalintensität.

3.1.3 Optimierung der HPLC-MS-Kopplung am Q-TOF Ultima

Um die Verbindung zwischen HPLC und Q-TOF einzurichten und den Lösungsmittelgradienten, mit dem später die MHC-Peptide eluiert werden sollen einzustellen, wurde ein Trypsinverdau von Zytochrom C verwendet, da dieser in großen Mengen verfügbar ist und einige Peptide, die von der Anzahl der Aminosäuren her Ähnlichkeiten mit HLA-Liganden aufweisen enthält (**Tab. 3.1**). Für die Optimierungsarbeiten an der HPLC wurde jeweils 1 pmol Zytochrom C eingesetzt, um die Dauer des Gradienten und das Elutionsprofil der Proben einzustellen. Dabei wurde versucht, vor allem die Peptide 4 – 12 zu detektieren, da diese den MHC-Klasse-I- und -Klasse-II-Liganden am ähnlichsten sind.

Tab. 3.1: Zytochrom C. Auflistung der Peptide eines Zytochrom C-Verdaus mit Trypsin in ihrer Elutionsreihenfolge, sowie deren m/z-Verhältnis und deren Ladungszustand.

Signal #	Sequenz	m/z (Ladungszustand)
1	KYIPGTK	403,7422 (2+)
2	YIPGTK	678,3821 (1+)
3	IFVQK	634,3923 (1+)
4	KTGQAPGFSYTDANK	528,9266 (3+)
5	TGQAPGFSYTDANK	728,8378 (2+)
6	GEREDLIAYLKK	478,9365 (3+)
7	TGPNLHGLFGR	390,2122 (3+)
8	MIFAGIK	390,2278 (2+)
9	EDLIAYLK	482,7711 (2+)
10	IFVQKCAQCHTVEK	545,2778 (3+)
11 ^{*)}	GITWGEETLMEYLENPKK	713,3539 (3+)
12 ^{*)}	GITWGEETLMEYLENPK	1005,4798 (2+)

^{*)} Laut Hersteller können die Signale dieser Peptide aufgrund von Adsorption an die Gefäßwand nur sehr schwach oder gar nicht detektierbar sein.

Die zwei Dinge, die den größten Einfluss auf das Elutionsprofil der Peptide haben, sind die beiden verwendeten Lösungsmittel und der eingestellte Gradient der entscheidet, ob die Peptide zu schnell aufeinander folgend oder zu breit eluieren. Auf den Test verschiedener Säulen wurde aufgrund des Drucks der HPLC verzichtet, da dieser bei den angelegten Flussraten schon bei ungefähr 60% vor der automatischen Abschaltung des Systems liegt und die Verringerung der Partikeldichte von 5 µm auf 3 µm einen Druckanstieg bewirken würde. Da schon mit dem alten Gradienten 10% B auf 55% B in 95 min und den damit verwendeten Lösungsmitteln (A: 0,1% FA, B: 80% ACN, 0,1% FA) MHC-Liganden gemessen wurden, konnten bereits mit diesen Einstellungen die Peptide 4 – 6, 9, 11 und 12 detektiert werden. Die Peptide 7 und 8 eluieren nahezu gleichzeitig von der Säule und sind aufgrund ihrer fast identischen Masse nicht im Q-TOF voneinander zu unterscheiden, sind also nur als Doppelpeak im Übersichtsscan zu sehen. Nur die Peptide 1 – 3 und 10 waren gar nicht zu sehen.

Nach Veränderung von Lösungsmittel A (2% ACN, 0,1% FA) und Angleichen des Gradienten von 8% B auf 55% B in 95 Minuten hat sich an dem Elutionsprofil nichts geändert, weshalb er so für die zukünftigen Messungen übernommen wurde (**Abb. 3.5A**).

Zum Test der Sensitivität wurde neben den für die Etablierung verwendeten 1 pmol Zytochrom C auch noch ein Testlauf mit 100 fmol durchgeführt (Abb. 3.5B). Dabei war zu sehen, dass das Peptid Nummer 4 (KTGQAPGFSYTDANK) nur sehr schwach zu detektieren war.

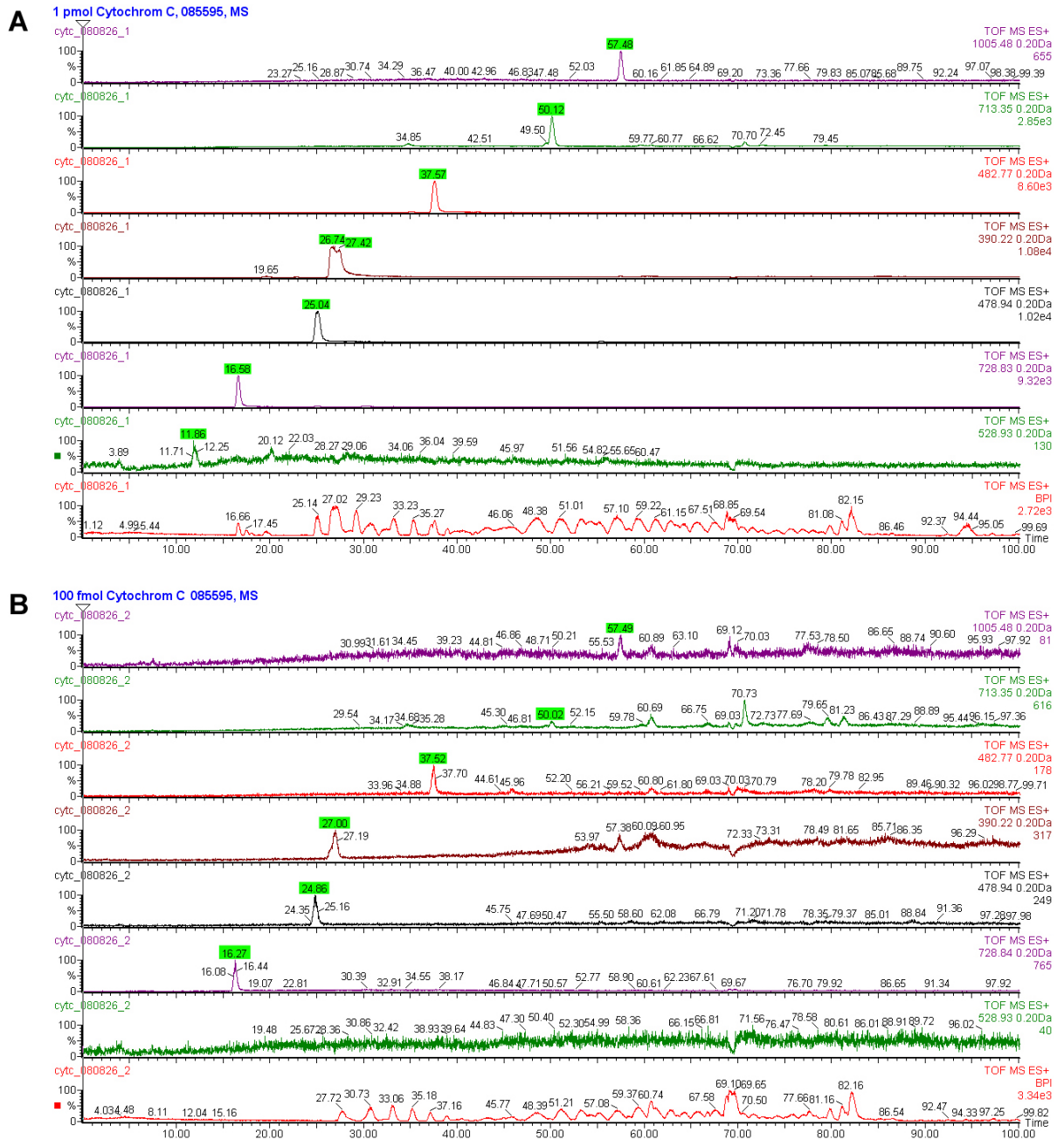


Abb. 3.5: Zytochrom C-Lauf über die HPLC am Q-TOF Ultima. A: 1 pmol Zytochrom C, B: 100 fmol Zytochrom C. Dargestellt sind jeweils das BPI-Chromatogramm sowie die Massenchromatogramme der einzelnen Peptide. Die Retentionszeiten der Elutionsmaxima sind grün unterlegt. Die einzelnen Peptidmassen wurden mit einer Massentoleranz von 0,2 Da gesucht.

Ein Vergleich der Retentionszeiten zeigt außerdem, dass die Peptide auch in verschiedenen Messungen nahezu zur selben Zeit eluieren, was auf eine gute Reproduzierbarkeit hindeutet (**Tab. 3.2**). Mit diesen Ergebnissen galt die Optimierung des Q-TOF Ultima als abgeschlossen und wurde für die Messung von HLA-Liganden freigegeben.

Tab. 3.2: Retentionszeiten und Peakbreiten der Zytochrom C-Peptide. Tabellarische Auflistung der Elutionszeiten und der Peakbreiten der Peptide in den Massenchromatogrammen zweier aufeinander folgender Zytochrom C-Messungen über die HPLC.

Signal #	Retentionszeit (1 pmol)	Retentionszeit (100 fmol)	Peakbreite (1 pmol)	Peakbreite (100 fmol)
4	11,86 min	11,27 min	0,83 min	Nicht feststellbar
5	16,58 min	16,27 min	0,83 min	0,84 min
6	25,04 min	24,86 min	1,23 min	0,91 min
7	26,74 min	27,00 min ^{*)}	2,09 min ^{*)}	1,32 min ^{*)}
8	27,24 min			
9	37,57 min	37,52 min	0,98 min	0,93 min
11	50,12 min	50,02 min	0,85 min	0,61 min
12	57,48 min	57,49 min	0,80 min	0,69 min

^{*)} Da diese beiden Peptide gleichzeitig eluieren, war eine Trennung in zwei separate Messwerte nicht möglich.

3.1.4 Die LTQ Orbitrap XL

Gut eineinhalb Jahre nach der Etablierung des Q-TOF Ultima galt es, das neue Massenspektrometer des SFB 685 für die Messungen von HLA-Liganden einzustellen. Die LTQ Orbitrap XL ist das nach der LTQ Orbitrap Velos das zweitneueste Modell der LTQ Orbitrap Hybridmassenspektrometer und enthält neben einer linearen Ionenfalle eine Orbitrap als zweiten Massenanalysator. Auch die Optimierung dieses Geräts wird nach den Kriterien des Auflösungsvermögens, der Massengenauigkeit und der Sensitivität durchgeführt.

Genauso wie bei dem Q-TOF Ultima das Auflösungsvermögen fix eingestellt war, können auch bei der Orbitrap keine Zahlenwerte verstellt werden, um Einfluss darauf zu nehmen. Allerdings besitzt der Orbitrap-Massenanalysator die Option, das Auflösungsvermögen

zwischen 7500, 15000, 30000, 60000 oder 100000 frei zu wählen. Da die Auflösung mit der zurückgelegten Flugstrecke und somit mit der Verweildauer in der Orbitrap zusammenhängt bedeutet ein hoher Wert gleichzeitig eine erhöhte Dauer des Übersichtsscans, für den bei 60000 ungefähr eine Sekunde benötigt wird.

Die Massengenauigkeit der Orbitrap liegt nach der Kalibrierung nach eigener Beobachtung bei ungefähr 5 ppm. Dieser Wert kann jedoch durch die Verwendung einer internen Kalibrierung weiter herunter gesetzt werden. Dabei wird in jedem Übersichtsscan der Orbitrap nach Massen von Substanzen gesucht, die generell immer zu detektieren sind, da sie beispielsweise in den Lösungsmitteln oder in der Luft vorkommen³⁵⁰. Als interne Kalibrierung wurde deshalb die Masse eines Polysiloxanes angegeben, die 445,12003 Da schwer ist ($[\text{C}_2\text{H}_6\text{SiO}]_6$). Da dieses Signal den kompletten Zeitraum der Messung zur Verfügung steht, können so eventuelle Masseschwankungen während der Messungen ausgeglichen werden und die m/z-Verhältnisse von Peptiden auf unter 1 ppm genau bestimmt werden (**Abb. 3.6**).

Peptidsequenz: NIC-ALAEIAK_(Gua)AEL

Berechnete Masse [M⁺]: 1175,6420 Da

Gemessene Masse [M⁺]: 1175,6421 Da

$\Delta m = 0,0001 \text{ Da}$

$\Delta m = 0,1 \text{ ppm}$

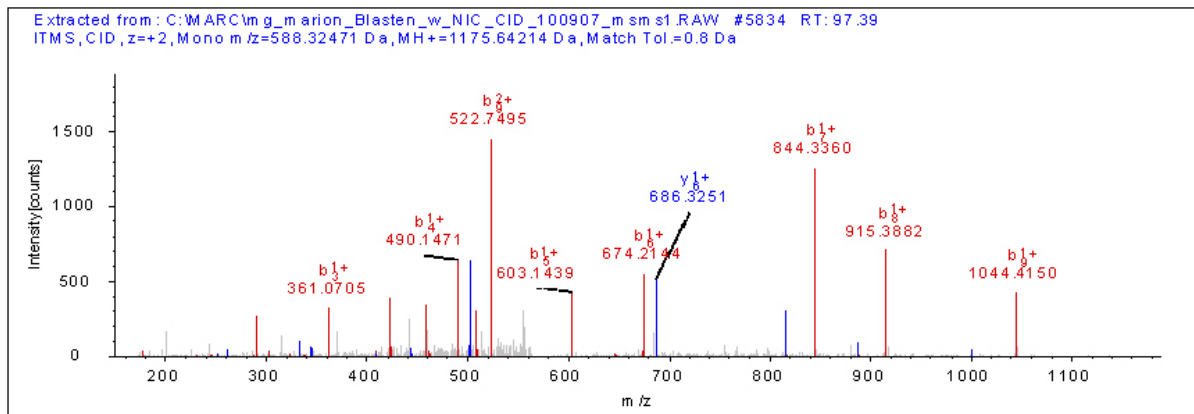
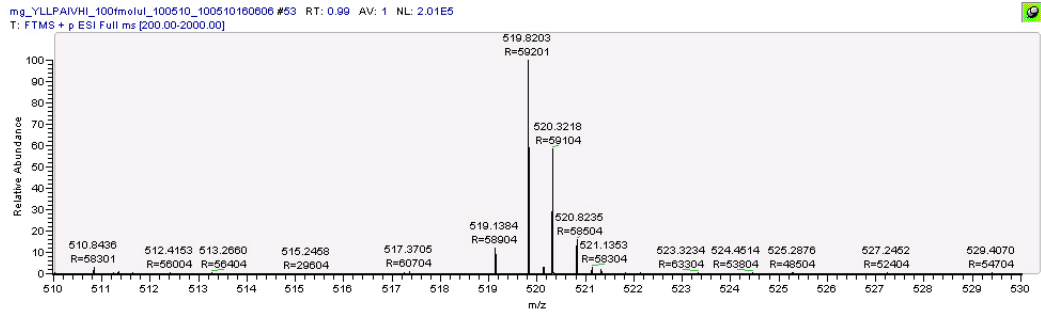


Abb. 3.6: Massengenauigkeit der Orbitrap. Fragmentspektrum des modifizierten Peptids mit der Sequenz ALAEIAKAEEL. Die gemessene Masse des einfach geladenen Peptids liegt unter Verwendung der internen Kalibrierung bei 1175,6421 Da, was um 0,1 ppm von der theoretisch berechneten Masse abweicht.

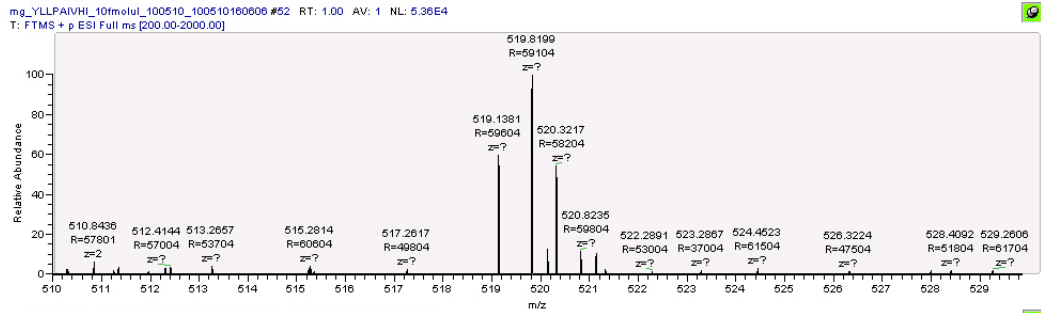
Die Sensitivität der Orbitrap wurde mit dem synthetischen Peptid YLLPAIVHI in Konzentrationen von 100 fmol/ μ l, 10 fmol/ μ l und 1 fmol/ μ l direkt über die Spritzenpumpe bei einer Flussrate von 5 μ l/min und einem Auflösungsvermögen von 60000 getestet. Unter der Annahme, dass die Dauer eines Scans dabei etwa eine Sekunde dauert, bedeutet das, dass pro Scan eine Stoffmenge von 8,33 fmol, 833,33 amol und 83,33 amol des Peptids detektiert werden (**Abb. 3.7**). Da das Peptid zweifach geladen ist, wird im Übersichtsscan ein bei $m/z = 519,8210$ erwartet. Bei der Konzentration von 100 fmol/ μ l ist das Peptid abundant im Übersichtsscan mit einer Intensität von $2,01 \cdot 10^5$ zu sehen. Geht man in der Verdünnungsreihe um den Faktor zehn nach unten, so kann das Peptid immer noch mit einer Intensität von $5,36 \cdot 10^4$ zu detektieren, wobei sich hier schon abzeichnet, dass ein zweites Signal bei $m/z = 519,13$ kurz davor ist, das Peptidsignal zu überlagern beziehungsweise durch die hohe Intensität zu unterdrücken. Dieses Signal gehört zu Polysiloxan $[C_2H_6SiO]_7$ und ist somit kontinuierlich in den Scans vorhanden. Entsprechend war YLLPAIVHI in einer Konzentration von 1 fmol/ μ l kaum zu detektieren, jedoch konnte das Peptid durch gezieltes Suchen im entsprechenden Massenbereich doch noch mit einer Intensität von $1,02 \cdot 10^3$ ausgemacht werden.

Obwohl bei diesen Messungen über die Spritzenpumpe ohne interne Kalibrierung gearbeitet wurde, sind die gemessenen m/z -Werte der einzelnen Peptidsignale in den verschiedenen Verdünnungsstufen äußerst genau. Die Abweichung vom theoretisch errechneten Wert liegt bei der Peptidlösung mit einer Konzentration von 100 fmol/ μ l bei 0,7 ppm. Die beiden Verdünnungsstufen weisen eine Abweichung von 1,1 ppm (10 fmol/ μ l) und 1,9 ppm (1 fmol/ μ l) auf, wobei es sich allerdings um die Werte des in **Abbildung 3.7** dargestellten Scans bei der Datenaufnahme handelt. Dies zeigt jedoch, dass die Peptidkonzentration nur einen geringen Einfluss auf das von der Orbitrap ermittelte m/z -Verhältnis der Peptidsignale hat.

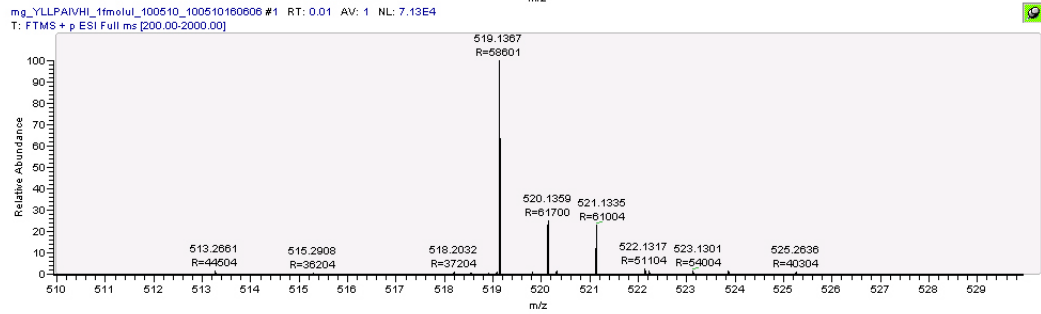
YLLPAIVHI
 c = 100 fmol/ μ l
 n = 8,33 amol
 m/z = 519,8203



YLLPAIVHI
 c = 10 fmol/ μ l
 n = 833,33 amol
 m/z = 519,8199



YLLPAIVHI
 c = 1 fmol/ μ l
 n = 83,33 amol
 m/z = 519,8191



YLLPAIVHI
 c = 1 fmol/ μ l
 n = 83,33 amol
 m/z = 519,8191
 zoom

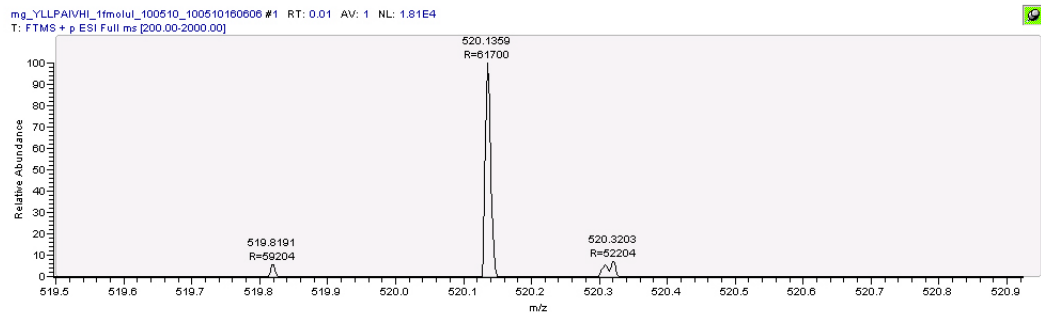


Abb. 3.7: Sensitivität der Orbitrap. Sensitivitätstest an der Orbitrap unter Verwendung einer Peptidlösung von YLLPAIVHI in drei verschiedenen Konzentrationen. Das Peptid war in allen drei Messungen detektierbar, wurde allerdings vor allem bei einer Konzentration von 1 fmol/ μ l stark durch einen Signalpeak von Polysiloxan unterdrückt.

3.1.5 Optimierung der HPLC-MS-Kopplung an der LTQ Orbitrap XL

Für die Optimierung der HPLC-MS-Kopplung wurde ebenfalls der Verdau von Zytochrom C mit Trypsin verwendet, um die Qualität des Gradienten zu überprüfen. Da sich an der HPLC seit dem Einsatz am Q-TOF Ultima nichts geändert hat, wurde der alte Gradient zur HLA-Liganden-Analyse für die neuen Messungen von Zytochrom C übernommen. Zusätzlich zu der HPLC wurde allerdings ein Spark MicroAS Autosampler angeschlossen, der den Kanal 1 der Eksigent nanoLC 2D ersetzt. Da die Ergebnisse unter Verwendung des Autosampler-Ventils zusammen mit dem Ventil von Kanal 2 der HPLC zu unbefriedigenden Ergebnissen führte, wurde die Kapillare vom Pumpenausgang 2 der HPLC direkt an den Autosampler angeschlossen, damit das komplette Programm zur Messung des Verdaus über dieses Ventil geregelt wurde, was allerdings zu einer starken Erhöhung der Wasch- und Äquilibrierungszeiten vor dem Ladeprozess der Peptide auf die Säule führte. Der Aufbau dieses Setups ist in **Abb. 3.8** dargestellt.

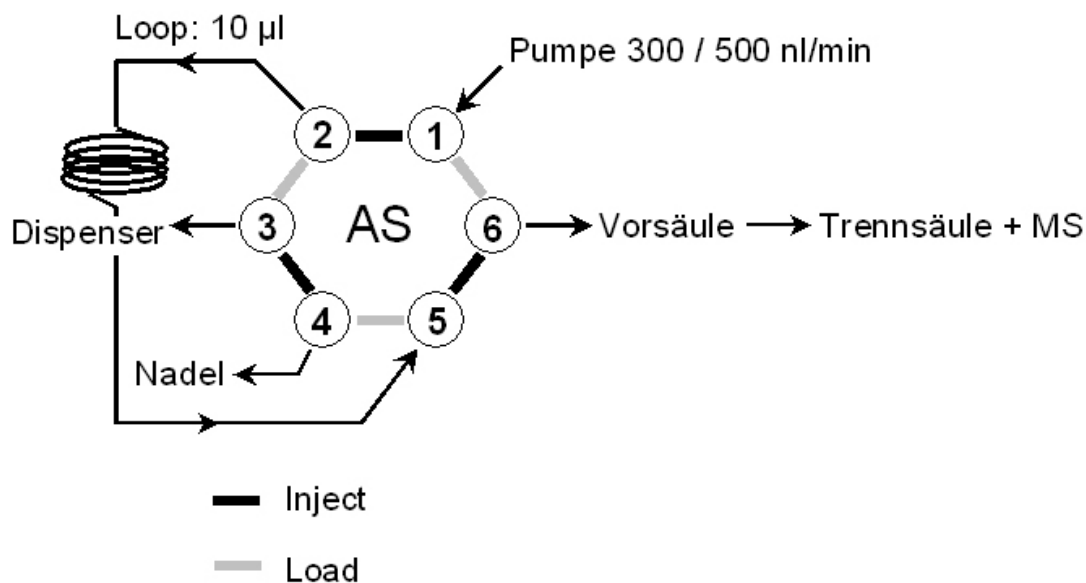


Abb. 3.8: Setup 1: HPLC-Aufbau unter Verwendung von einem Ventil. Bei diesem Setup wird nur das Ventil des Autosamplers zum Fahren des Gradienten verwendet. Der Wasch- und Äquilibrierungsvorgang sowie das Laden der Peptide vom Probenloop auf die Vorsäule wird mit 500 nl/min durchgeführt, der Gradient wird mit 300 nl/min gefahren. Vorsäule und Kapillartrennsäule sind bei diesem Aufbau in Reihe geschaltet.

Da der Wasch- und Äquilibrierungsvorgang der beiden Säulen durch dieses Setup bedingt nicht mehr mit einer Flussrate von 20 µl/min, sondern lediglich bei 500 nl/min durchgeführt werden kann, mussten diese Zeiten entsprechend angeglichen und bestmöglich eingestellt werden, so dass in möglichst kurzer Zeit alle Peptide binden. Anfänglich auftretende Bindeprobleme der Peptide an die Vorsäule konnten behoben werden, indem das Ventil des Autosamplers bevor die Peptide in die Probenschleife gezogen werden auf beiden Positionen mit Lösungsmittel A durchgespült wird und der Gradient bei 0% Lösungsmittel B anstatt bei 8% Lösungsmittel B startet.

Nach mehreren HPLC-Läufen von Zytochrom C stellt sich heraus, dass eine Waschzeit von 80 min und eine Äquilibrierungszeit von 180 min ausreichend sind, um die Peptide in einem 90-minütigen Ladevorgang an die Säule binden zu lassen und sie dort aufzukonzentrieren; der Gradient läuft von 0% B auf 55% B in 120 min. Bei der Messung von Zytochrom C wurden von den in **Tabelle 3.1** aufgelisteten Peptide lediglich die Peptide 4 – 9 detektiert. Die Peptide 11 und 12 sind vermutlich aufgrund der langen Lagerungszeit der Probe wie vom Hersteller vermerkt aufgrund von Adsorption nicht mehr in der Lösung vorhanden. Im Vergleich zum Q-TOF Ultima liegen die Intensitäten der Peptide etwa um den Faktor 100 höher. Die Ergebnisse einer solchen Zytochrom C-Messung inklusive des dafür verwendeten HPLC-Programms sind exemplarisch in **Tabelle 3.3** dargestellt.

Tab. 3.3: Zytochrom C-Lauf über die HPLC an der LTQ Orbitrap XL mit Setup 1. Auflistung der detektierten Peptide von Zytochrom C an der Orbitrap inklusive derer Retentionszeiten und Intensitäten sowie des verwendeten HPLC-Programms. Im Gegensatz zum Q-TOF Ultima sind die Peptide 11 und 12 nicht mehr detektierbar.

	HPLC-Programm			Zytochrom C – 1 pmol		
	%A	%B	Dauer [min]	m/z	RT [min]	Intensität
Waschen	0	100	80	528,9266	403,86	3,86·10 ⁶
Äquilibrierung	100	0	180	728,8387	411,70	1,97·10 ⁶
Laden	100	0	90	478,9365	419,87	4,68·10 ⁶
Gradient	100 → 45	0 → 55	120	390,2122	423,18	2,76·10 ⁶
	45	55	60	390,2278		
	45 → 40	55 → 60	5	482,7711	436,26	6,02·10 ⁶
	0	100	10	713,3539	nicht detektiert	---
	100	0	10	1005,4798	nicht detektiert	---
Total			555			

Da diese Methode zwar gut dazu geeignet ist, sowohl Zytochrom C als auch HLA-Liganden zu analysieren, aber mit einer Dauer von 9 h und 15 min extrem lange dauert, bestand der nächste Schritt bei der Optimierung des Messsystems darin, das zweite Pumpensystem der HPLC wieder in den Kreislauf mit einzugliedern, um das Waschen und Äquilibrieren der Vorsäule zu beschleunigen. Zu diesem Zweck wurden die Kapillarverbindungen zwischen dem Ventil des Autosamplers und dem zweiten Ventil der HPLC wie in **Abbildung 3.9** umgebaut.

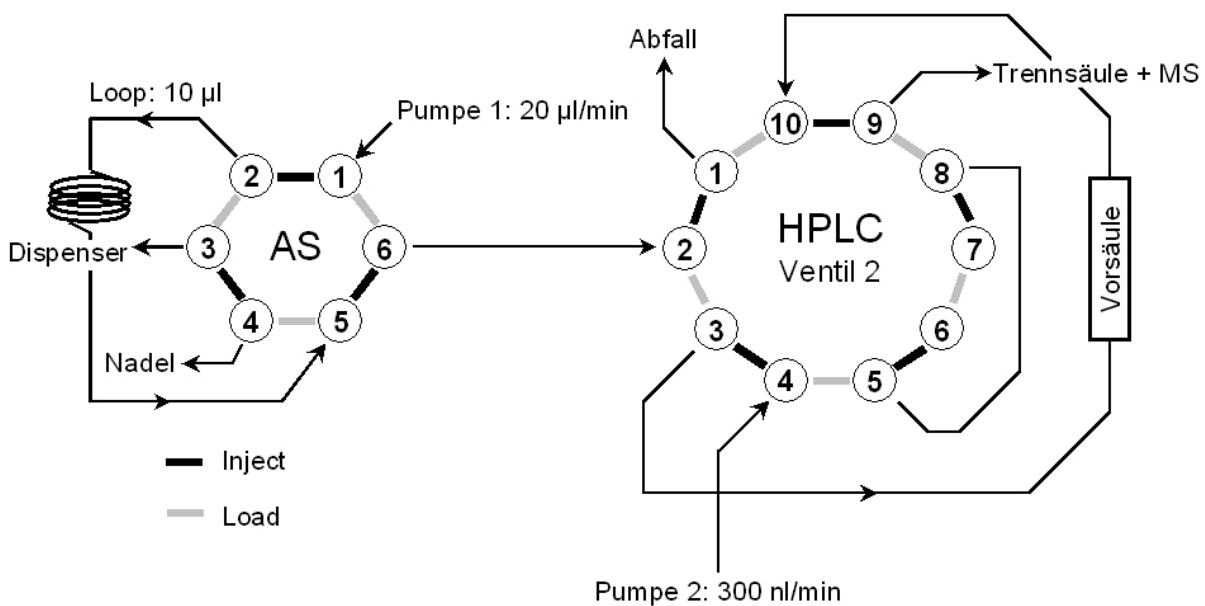


Abb. 3.9: Setup 2: HPLC-Aufbau unter Verwendung von zwei Ventilen. Dieser Aufbau ermöglicht es, die Lösungsmittel mit einer Flussrate von 20 µl/min über die Vorsäule zu pumpen, während die Trennsäule separat von Pumpe 2 bei 300 nl/min gewaschen und äquilibriert wird.

Eine Vergleichsmessung von einem Picomol Zytochrom C bei Übernahme der alten Wasch- und Äquilibrierungszeiten von 30 min beziehungsweise 40 min lieferte ähnlich gute Ergebnisse wie die Messungen mit dem alten HPLC-Setup (**Tab. 3.4**). Die Peptidintensitäten sind ungefähr gleich hoch, einzig der Doppelpeak bei $m/z = 390,2122$ und $m/z = 390,2278$ liegt im Vergleich zum alten Aufbau um eine Zehnerpotenz höher. Die Retentionszeiten sind aufgrund des unterschiedlichen Startsignals an die Orbitrap natürlich anders, allerdings stimmen die Zeitabstände zwischen den beiden HPLC-Setups für die einzelnen Signalpeaks überein, weshalb sich diese HPLC-Konfiguration für die Messung von Zytochrom C genauso gut eignet wie der alte Aufbau. Eine Veränderung der Äquilibrierungszeit von 40 min auf 60

min brachte keine Verbesserung. Der Versuch, den Gradienten von 120 min auf 180 min zu verlängern, führte zu einem schlechteren Elutionsprofil der Peptide und wurde deshalb wieder verworfen.

Tab. 3.4: Zytochrom C-Lauf über die HPLC an der LTQ Orbitrap XL mit Setup 2. Die Peptide sind mit hoher Intensität und sauber voneinander getrennt detektierbar. Die Zeitabstände zwischen den Elutionszeiten entsprechen denen der mit Setup 1 aufgenommenen Messung.

	HPLC-Programm			Zytochrom C – 1 pmol		
	%A	%B	Dauer [min]	m/z	RT [min]	Intensität
Waschen	0	100	30	528.9266	39,62	$3,13 \cdot 10^6$
Äquilibrierung	100	0	40	728.8387	47,58	$2,67 \cdot 10^6$
Laden	100	0	30	478.9365	56,75	$2,35 \cdot 10^6$
Gradient	100 → 45	0 → 55	120	390.2122	59,45	$1,88 \cdot 10^7$
	45	55	60	390.2278		
	45 → 40	55 → 60	5	482.7711	73,00	$2,11 \cdot 10^6$
	0	100	30	713.3539	nicht detektiert	---
	100	0	5	1005.4798	nicht detektiert	---
Total	320					

3.1.6 Überprüfung der HPLC-MS-Kopplung mit HLA-Liganden aus JY

Dass die beiden HPLC-Programme dazu in der Lage sind, ein einfaches Peptidgemisch wie den Verdau von Zytochrom C ordentlich aufzutrennen und zu detektieren ist zwar eine gute Grundlage, jedoch geben diese Ergebnisse noch keinerlei Hinweise darauf, wie es sich bei einer hochkomplexen Probe wie einem Ligandengemisch aus einer Immunpräzipitation verhält. Aus diesem Grund wurden einige der Optimierungsschritte für Zytochrom C parallel mit einer Probe von JY-Liganden durchgeführt.

Da die LTQ Orbitrap XL neben der Ionenfalle auch die Orbitrap als Masseanalysator besitzt, können durch die geschickte Kombination der beiden Analysatorsysteme Peptidsignale bedeutend schneller zu gemessen und zu fragmentiert werden als beim Q-TOF Ultima. Außerdem können diese beiden Aktionen parallel durchgeführt werden. Dabei werden die Übersichtsscans in der Orbitrap gemessen, die eine hohe Auflösung und Massengenauigkeit besitzt. Das Auflösungsvermögen wird dabei auf 60000 gesetzt, so dass ein Übersichtsscan etwa eine Sekunde dauert. Parallel dazu werden die fünf höchsten Peptidsignale aus dem

vorhergegangenen Scan ausgewählt und in der Ionenfalle über CID fragmentiert, wobei eine Fragmentierung maximal 250 ms dauert. Die Vorteile der Ionenfalle bei der Aufzeichnung der Fragmentspektren liegen in ihrer hohen Sensitivität und in der hohen Geschwindigkeit, mit der die Fragmentierungen durchgeführt werden können. Dafür ist sie mit einer Massengenauigkeit von nur 0,8 Da sehr ungenau, was die Ermittlung der korrekten Masse eines Fragmentesignals im Spektrum angeht. Über diese Einstellungen könnte es theoretisch möglich sein, bestenfalls fünf Fragmentspektren pro Sekunde aufnehmen zu können.

Als Probe für die Messungen wurde eine Mischung von HLA-Peptiden von JY gewählt, die auf 500 Mio. Zellen präsentiert wird. Um die Datensätze schnell miteinander vergleichen zu können und einen Überblick über die Qualität des neuen HPLC-Setups zu erhalten, wurden jeweils zwei Messungen der JY-Proben durchgeführt und die Datensätze über die Software ‚Proteome Discoverer V. 1.1‘ ausgewertet, indem eine Mascot-Suche auf dem Mascot-Server (Software Version 2.2) durchgeführt wurde. Die erhaltenen Peptidlisten wurden nach den folgenden drei Kriterien bearbeitet und mit einer Messung von JY-Liganden, die noch unter dem alten HPLC-Setup 1 aufgenommen wurde verglichen:

- Ion Score des Treffers liegt bei ≥ 20
- Δ ppm des Peptidtreffers kleiner als +/- 3,00
- Das Peptid muss auf der Vorschlagliste auf Rang 1 oder Rang 2 stehen

Außerdem werden doppelte Peptidsequenzen oder Sequenzen, in denen eine Aminosäure mit ‚x‘ bezeichnet wird, gelöscht.

Für die Tests des HPLC-Programms wurden folgende Modifikationen durchgeführt:

- Messung 1: Referenzwert unter Setup 1 (**Tab. 3.3**)
- Messung 2 + 3: HPLC-Programm von Setup 2 (**Tab. 3.4**)
- Messung 4 + 5: Wiederholung des HPLC-Programms von Setup 2
- Messung 6 + 7: Wie Setup 2, allerdings mit 60 min Äquilibrierungszeit
- Messung 8 + 9: Wie Setup 2, allerdings Verlängerung des Gradienten auf 180 min

Die Anzahl der in den jeweiligen Messungen und nach den durchgeführten Filterkriterien gefundenen HLA-Liganden sind in **Abbildung 3.10** dargestellt. Dabei erkennt man, dass in allen bis auf einer Messung weit über 1000 Peptidsequenzen nach dem Filterprozess als potentielle korrekte HLA-Liganden übrig blieben. Lediglich Messung Nr. 7 hat enthält nur knapp über 900 Sequenzen und wird als Ausrutscher gewertet. Wenn man die Messungen 2 – 9 untereinander vergleicht sieht man, dass weder die Erhöhung der Äquilibrierungszeit

(Messung 6 + 7) noch die Verlängerung des Gradienten (Messung 8 + 9) zu einer erhöhten Peptidsequenzausbeute im Vergleich zu den Messungen 2 – 4 führt. Da sich die Messzeit von Setup 1 auf Setup 2 allerdings knapp halbiert, scheint das zweite Setup in unveränderter Form die geeignetste Wahl zur Messung von HLA-Liganden zu sein.

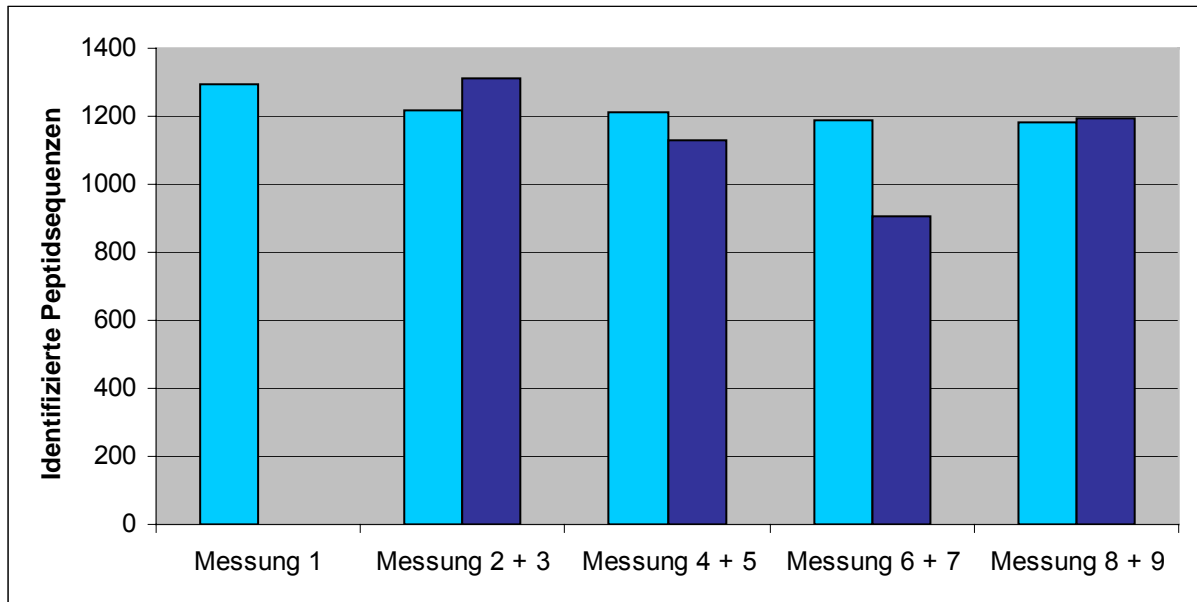


Abb. 3.10: Anzahl sequenzierter Peptide bei der HPLC-Optimierung. Vergleich zwischen dem HPLC-Setup 1 und 2 sowie von verschiedenen Modifikationen an Setup 2. Details sind im Text zu finden.

3.1.7 Sequenzidentifizierung von JY-Liganden

Da die Qualität aller Peptidlisten aus den Messungen der HPLC-Optimierungsversuche gleich gut zu sein scheint, wurde um die Funktionalität der Proteome Discoverer-Software sowie die Sequenzierung von HLA-Liganden durch den MOWSE-Algorithmus des Mascot-Servers zu testen, die Liste von Messung 1 zur manuellen Überprüfung ausgewählt. Insgesamt blieben nach dem Filterprozess nach den genannten Kriterien 1294 Sequenzvorschläge in der Liste stehen. Ohne die Peptidsequenzen dabei auf ihre Korrektheit überprüft zu haben, verteilen sich deren Eigenschaften folgendermaßen: Vom Mascot Ion Score her liegen lediglich 23% der Sequenzen im Bereich von > 30 , in dem die Vorschläge noch sehr zuverlässig sind. Weitere 25% liegen im mittleren Bereich von 29 – 25, und über die Hälfte der Sequenzvorschläge (52%) bekam einen Score von 20 – 24 zugewiesen (**Abb. 3.11A**). Knapp über dreiviertel der

Peptide (76%) sind dabei auf Rang 1 der Vorschlagsliste (**Abb. 3.11B**). Ungefähr 68% der vorgeschlagenen Peptidsequenzen würden vom Bindungsmotiv auf die MHC-Moleküle von JY passen (31% HLA-A*02:01, 38% HLA-B*07:02, < 1% HLA-Cw*07:02), wohingegen 24% der Peptide nicht das Motiv eines der HLA-Moleküle von JY tragen. Bei 8% der Sequenzvorschläge ist bekannt, dass sie von Messartefakten kommen; Fragmente von MHC-Liganden sind kaum zu finden (< 1%) (**Abb. 3.11C**).

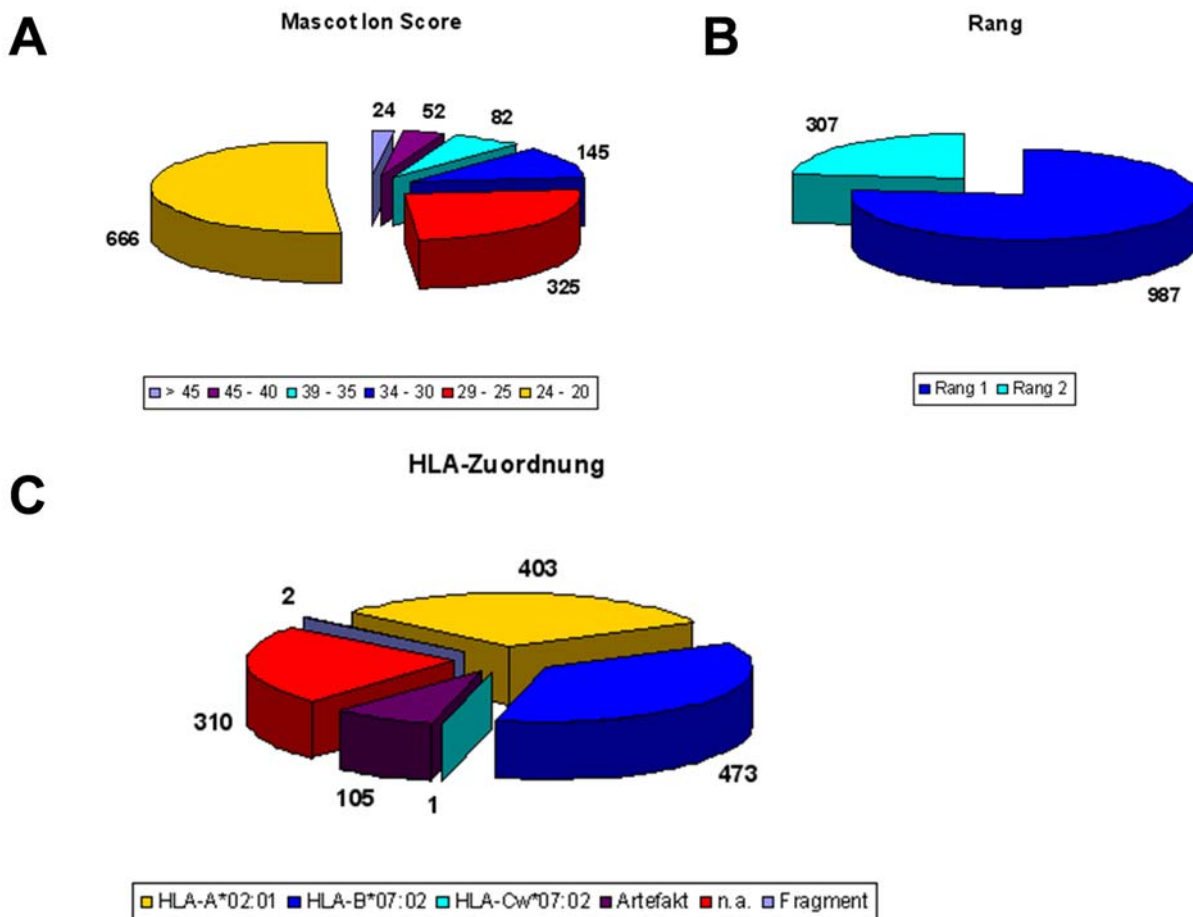


Abb. 3.11: Verteilung der Peptidsequenzen vor manueller Überprüfung. **A:** Kreisdiagramm, das die Zuordnung der Sequenzvorschläge zum entsprechenden Mascot-Score anzeigt, wobei diese immer in Fünferschritten zusammengenommen wurden. **B:** Verteilung der Peptide auf Rang 1 und Rang 2 der Vorschlagsliste. **C:** Zuordnung der Peptide auf die vom Bindungsmotiv her entsprechenden MHC-Moleküle.

Die Auswertung der Liste erfolgte durch manuelle Sichtung der einzelnen Fragmentspektren, um die korrekte Annotation der Fragmentensignale zu beurteilen. Für die dabei als richtig

identifizierten Peptidsequenzen wurde die selbe Statistik wie für die Liste mit allen Sequenzvorschlägen erhoben. Insgesamt wurden von den ursprünglich 1294 Sequenzvorschlägen 757 als für korrekt befunden. Dabei zeigt sich, dass nun gut ein Drittel (34%) der Peptide im oberen Bereich des Mascot Ion Score liegen. Die Menge der Peptide im mittleren Bereich (Ion Score 25 – 29) liegt bei 27% und die im unteren Bereich (Ion Score 20 – 24) bei 39% (**Abb. 3.12A**).

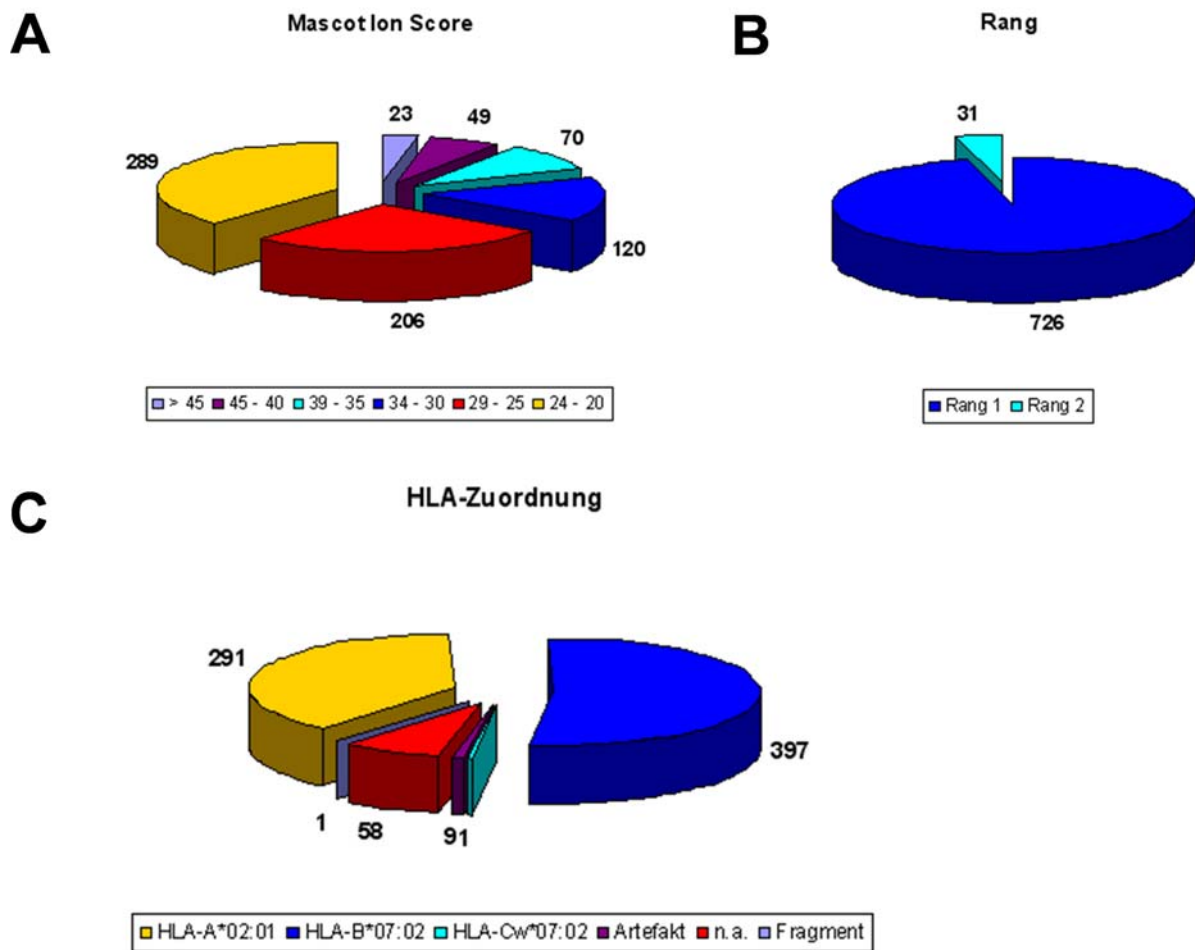


Abb. 3.12: Verteilung der Peptidsequenzen nach manueller Überprüfung. **A:** Kreisdiagramm, das die Zuordnung der Sequenzvorschläge zum entsprechenden Mascot Ion Score anzeigt, wobei diese immer in Fünferschritten zusammengenommen wurden. **B:** Verteilung der Peptide auf Rang 1 und Rang 2 der Vorschlagsliste. **C:** Zuordnung der Peptide auf die vom Bindungsmotiv her entsprechenden MHC-Moleküle.

96% der Sequenzvorschläge lagen dabei auf Rang 1, lediglich in 4% der Fälle wurde ein Rang-2-Peptid einem Rang-1-Peptid vorgezogen (**Abb. 3.12B**). Das bedeutet, dass lediglich

10% der Sequenzvorschläge auf Rang 2 korrekt waren. Nach Überprüfung der Sequenzen besitzen etwa 91% der Peptide ein Bindungsmotiv für die MHC-Moleküle (38% HLA-A*02:01, 53% HLA-B*07:02, < 1% HLA-Cw*07:02). 8% der Peptide kann nach wie vor kein MHC zugeordnet werden; die Anzahl der Artefakte (1%) und Fragmente (< 1%) ist verschwindend gering (**Abb. 3.12C**). Eine komplette Liste der identifizierten HLA-Liganden befindet sich im Anhang (**Tab. 7.1**).

Zieht man nun einen Vergleich zwischen der kompletten Peptidliste und der Liste, die nur die korrekten Peptidsequenzen enthält, dann ergibt sich folgendes Bild: Bei einem Ion Score von > 40 waren jeweils über 90% der angegebenen Sequenzen korrekt, bei einem Score von 39 – 35 und 35 – 30 waren jeweils über 80% der Peptide korrekt sequenziert. Im mittleren Bereich (Ion Score 29 – 25) waren immerhin noch knapp zwei Drittel (63%) der Sequenzvorschläge richtig, im unteren Bereich (Ion Score 24 – 20) waren es gerade noch 43% (**Abb. 3.13A**). Für die HLA-Zuordnung der Peptide bedeutet das, dass 72% der zu HLA-A*02:01- und 84% der zu HLA-B*07:02 passenden Sequenzen richtig identifiziert wurden. Von den Sequenzen, die keinem MHC-Molekül zuzuordnen waren, sind etwa 19% korrekt, bei den Artefakten waren es 9% (**Abb. 3.13B**).

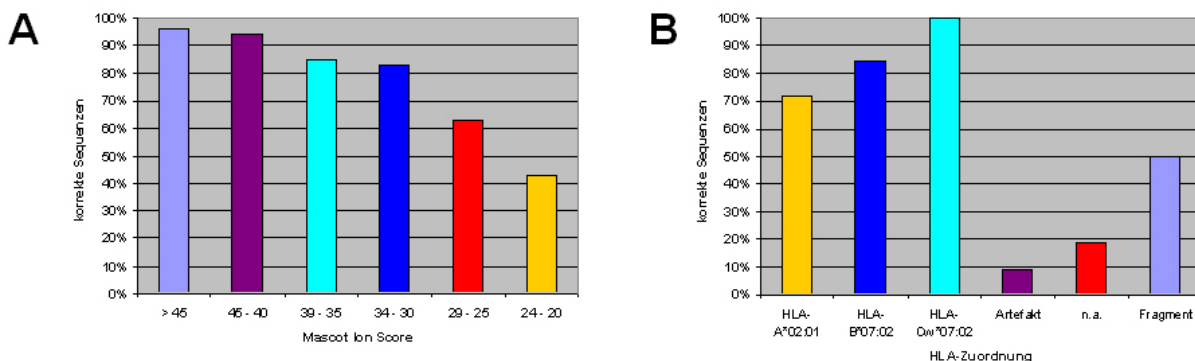


Abb. 3.13 Vergleich der richtig identifizierten Peptide mit allen Sequenzvorschlägen. A: Prozentuale Auflistung der korrekt sequenzierten Peptide in Bezug auf ihren Mascot Ion Score. **B:** Darstellung der richtig identifizierten Peptide in Zusammenhang mit ihrer HLA-Zuordnung.

3.1.8 Diskussion

Die Identifizierung von HLA-Liganden mittels einer HPLC-Massenspektrometrie-Kopplung gestaltet sich nach wie vor sehr schwierig. Das generelle Problem, das bei den Analysen immer besteht, ist die geringe Menge an Peptiden, die normalerweise zur Verfügung steht, da die Anzahl an MHC-Liganden deutlich geringer ist als die Menge an Peptiden, die beispielsweise durch einen proteasomalen Verdau generiert werden kann. Deshalb ist es schwer, die einzelnen Hardware-Komponenten gut aufeinander abzustimmen und zu optimieren, da man meist nicht ausreichend Material zur Verfügung stehen hat, um ausreichend Versuche dafür durchzuführen.

Im Falle von HLA-Liganden eignen sich *reversed-phase*-Säulen zur Anreicherung und Auftrennung der Peptide am besten. Für solche Analysen wird im Normalfall ein C18-Säulenmaterial gewählt, da es die Peptide gut bindet und diese über einen Lösungsmittelgradienten beispielsweise mit Acetonitril scharf getrennt eluiert werden können. Die Größe der Kieselgelkugeln ist dabei ein Maß für die Auftrennung. Peptide eluieren im bestmöglichen Fall in einem kurzen Zeitraum von nur wenigen Sekunden von der Säule, so dass im UV-Detektor der HPLC oder im Massenchromatogramm des Massenspektrometers ein hohes, intensives Signal zu sehen ist. Je kleiner die Kügelchen in der Säule sind, desto besser wird dies gewährleistet. Allerdings steigt mit Abnahme der Kügelchengröße auch der Druck, der sich in der HPLC aufbaut, so dass die Gefahr steigt, dass Kapillarverbindungen reißen und sich so Lecks bilden. Hat man eine geeignete Säule gefunden, ist es möglich, auch Peptide in schwachen Konzentrationen zuverlässig zu fragmentieren und zu identifizieren, da viele Ionen zur Verfügung stehen, aus denen das Spektrum generiert wird. Ist die Auftrennung aufgrund eines falsch gewählten Säulenmaterials oder eines zu flachen Elutionsgradienten schlecht, so kann es passieren, dass ein Peptidsignal über mehrere Minuten zu detektieren ist, allerdings dann mit so schwacher Intensität, dass kein Fragmentspektrum aufgenommen wird. Andererseits kann es bei einem zu steilen Gradienten passieren, dass die Peptide zwar allesamt in einem scharfen Signal zu sehen sind, dafür aber unzureichend aufgetrennt werden, weshalb zu viele Signale auf einmal zu sehen sind, die nicht alle zur Fragmentierung ausgewählt werden können.

Somit ist neben der Wahl der richtigen Säule auch die richtige Wahl des Lösungsmittelgradienten von großer Bedeutung für eine erfolgreiche Messung. Eine der HPLC-MS-Messung vorhergehende *offline*-Auftrennung der Peptide über eine andere Säule, beispielsweise einen starken Kationenaustauscher (*strong cation exchanger*, SCX), führt zu

einer erhöhten Ausbeute an identifizierten Sequenzen, was für den Verdau eines Proteoms bereits gezeigt wurde¹⁷⁰. Ebenso könnte es zu einer erhöhten Ausbeute an identifizierten HLA-Liganden führen, jedoch gestaltet sich die Etablierung einer solchen Methode aufgrund der bereits erwähnten Knappheit an Probenmaterial nicht einfach, zumal die meisten kommerziell erwerblichen SCX-Säulen 15 bis 20 cm lang sind und damit die Gefahr besteht, dass ein Großteil der eingesetzten Peptide irreversibel an das Säulenmaterial binden und deshalb nicht mehr detektierbar sind. Ein weiteres Problem stellt die extrem hohe Salzkonzentration dar, die für die Elution bei dieser Methode verwendet wird. Das Salz kann dazu führen, dass es vor allem in beheizten Kapillaren auskristallisiert und die HPLC an dieser Stelle verstopft, falls es vor der *online*-Messung nicht ausreichend gut entfernt wird.

Obwohl die HPLC bei der Analyse von HLA-Liganden eine wichtige Rolle spielt, ist das Herzstück des Versuchs das Massenspektrometer. Die technische Weiterentwicklung, welche die Geräte durchlaufen ist rasant und generell gilt der Grundsatz, dass neue Geräte auch bessere Ergebnisse liefern. Bei dem Q-TOF Ultima liefen Übersichtsscan und Peptidfragmentierungen noch nacheinander ab. Das bedeutet, dass über zwei Sekunden ein Übersichtsscan aufgenommen wurde und im Anschluss die drei höchsten Peptidsignale für jeweils vier Sekunden fragmentiert wurden, weshalb das Massenspektrometer für diese Zeit für andere Peptide, die von der Säule eluieren blind ist und auf diese Weise einige Liganden für die Messung verloren gehen. Neben der Geschwindigkeit der Datenaufnahme sind die Auflösung und die geringe Massengenauigkeit weitere Nachteile des Q-TOF Ultima. Erstere hängt von der freien Driftstrecke der Ionen im Flugrohr ab, für die beim Q-TOF Ultima zwei Optionen zur Verfügung stehen: Der V- und der W-Modus. Beim V-Modus fliegen die Ionen einmal nach unten, werden am Boden des Rohres reflektiert und an der MCP detektiert. Alternativ wird beim W-Modus noch ein weiterer Reflektor in der Mitte des Flugrohres zugeschaltet, so dass die Ionen erst am Boden, dann in der Mitte und nochmals wieder am Boden reflektiert werden, was die Auflösung deutlich erhöht. Leider fächert dabei der Ionenstrahl während seines Fluges durch die feldfreien Bereiche auf, weshalb er nicht mehr gebündelt den Detektor erreicht, sondern auffächert und viele Ionen neben dem Detektor einschlagen. Auch die Massengenauigkeit könnte erhöht werden, indem ein sogenanntes Lockspray verwendet wird, über das Substanzen mit bekannten m/z -Werten in das Massenspektrometer gesprüht werden, anhand derer die m/z -Werte der Peptide angeglichen werden. Dabei ersetzt das Lockspray alle paar Sekunden das normale Elektrospray von der HPLC, weshalb in diesem Zeitraum wieder keine Liganden gemessen werden können, was wiederum zu einer noch schlechteren Ausbeute an Peptidsequenzen führt.

Somit stellt die LTQ Orbitrap XL eine echte Verbesserung in allen drei Punkten, die ein Massenspektrometer auszeichnen dar. Die Ergebnisse, die während der Optimierungsarbeiten mit dem Gerät aufgenommen wurden sehen vielversprechend aus und es wird möglich sein, die Peptidausbeute aus einzelnen Proben deutlich zu erhöhen. Gerade die Schnelligkeit, mit der die Fragmentspektren aufgezeichnet werden können ist ein großer Pluspunkt des Systems, da auf diese Weise nicht nur die abundanten Signale, sondern auch Peptide, die nur in geringer Konzentration in der Probe vorkommen und unter denen wohl viele tumorassoziierte und tumorspezifische Antigene zu finden sind, fragmentiert werden. Auch die Art der Fragmentierung könnte zur Identifikation neuer tumorassoziiierter Liganden beitragen. Da die Orbitrap XL neben der CID auch die Möglichkeit der HCD bietet, wäre es wichtig in Erfahrung zu bringen, inwiefern sich die Peptidlisten zweier identischer Proben unterscheiden, wenn sie einmal auf die eine und ein weiteres mal auf die andere Art gemessen werden. Ein Nachteil der HCD ist allerdings, dass die Fragmente nicht in der Ionenfalle detektiert werden können, sondern wie auch schon der Übersichtsscan in der Orbitrap gemessen werden müssen, weshalb die Geschwindigkeit der Messzyklen und damit die Ausbeute an Fragmentspektren reduziert wird. Dennoch könnte es sich lohnen diesen Messmodus zu verwenden, wenn darüber viele andere Liganden als über die CID gefunden werden können.

Da Inhalt und Größe der generierten Datensätze zunehmen, benötigt es auch eine Software, über welche die Peptide zuverlässig sequenziert und identifiziert werden können. Die meisten der dazu zur Verfügung stehenden Programme und Algorithmen sind auf die Identifizierung trypsinverdauter Proteine spezialisiert und haben oft Probleme damit, Sequenzen natürlicher prozessierter Peptide wie es bei HLA-Liganden der Fall ist herauszufinden. Mit dem Mascot-Programm wurden schon zu Zeiten des Q-TOF I manuell gefundene *sequence-tags* über Datenbankabfragen vervollständigt, um die Aminosäuresequenzen fragmentierter MHC-Peptide zu ermitteln. Dadurch, dass der ‚Proteome Discoverer‘ die integrierte Funktion besitzt, Datenbanksuchen über einen Mascot-Server durchzuführen, bietet es sich natürlich an, dieses Programm für die Auswertung zu etablieren. Um die Peptidsequenz eines Fragmentspektrums zu ermitteln wird zunächst ein erster Datenbankabgleich mit der gemessenen Vorläuferionenmasse durchgeführt. Da diese in der Orbitrap aufgenommen wurde, kann die Massentoleranz bei der Suche entsprechend niedrig eingestellt werden (3 ppm), was die Anzahl an in Frage kommenden Sequenzen deutlich verringert. Deshalb ist es auch nicht vonnöten, die in der Ionenfalle kollidierten Peptidfragmente in der Orbitrap zu messen, obwohl diese eine sehr hohe Massenabweichung besitzen. Das Fragmentspektrum

dient bei der Auswertung vielmehr als Muster, über das die im Vorfeld ermittelten Peptidsequenzen verifiziert oder falsifiziert werden.

Dass diese Art der Datenanalyse erfolgsversprechend aussieht zeigt die Auswertung der JY-Liganden, die im Rahmen der Optimierungsarbeiten verwendet wurden. Jedoch bedarf es nach wie vor einiger Tests des Programms, um die richtigen Peptidsequenzen von allen vorgeschlagenen zu trennen. Insgesamt wurden bei der ausgewerteten Messung 6808 Fragmentspektren aufgezeichnet, zu denen es 20237 Sequenzvorschläge gibt. Da es viel zu lange dauern würde, jedes der Fragmentspektren manuell zu überprüfen, muss vorab eine Filterung der Ergebnisse stattfinden. Der Mascot Ion Score sowie der Rang, den der Sequenzvorschlag bei dem korrespondierenden Fragmentspektrum einnimmt sind zwei Werte, die sich dafür anbieten. Bei der Analyse der Sequenzen zeigte sich, dass schon Peptidsequenzvorschläge, die auf Rang zwei liegen meist nicht korrekt sind, da Rang 1 besser in das Spektrum passt. Der Auswertung des Datensatzes nach zu urteilen wurden lediglich 10% der ursprünglichen Rang 2-Peptide als richtig identifiziert, somit wäre es wohl sinnvoll, in Zukunft generell nur die Peptide auf Rang 1 weiter zu bearbeiten. Der Ion Score ist ein Maß dafür, wie gut die Sequenz zu dem Spektrum passt, wobei eine höhere Zahl bedeutet, dass die Sequenz mit zunehmender Wahrscheinlichkeit korrekt ist. Da das System der Punktevergabe abhängig von der Länge der Peptide ist, ist es bei MHC-Klasse-I-Liganden mit ungefähr neun Aminosäuren schwer, einen so hohen Treffer zu bekommen, dass dieser im signifikanten Bereich liegt. Aus diesem Grund muss die Schwelle, bis zu welchem Ion Score sich die Auswertung von der Ausbeute her noch lohnt selbst gefunden werden. Die Analyse der JY-Liganden zeigte hier, dass bei einem Ion Score von > 40 über 90% der Peptide richtig sind und auch in einem Bereich von 39 – 35 bzw. 34 – 30 die Rate an korrekten Sequenzen bei über 80% liegt. Erst bei einem Score von 29 – 25 (63%) und 24 – 20 (43%) nimmt die Anzahl an korrekt sequenzierten Peptiden ab. Gegebenenfalls liegt der Wert allerdings höher, wenn man sich nur die Rang 1-Peptide anschaut, da Peptidvorschläge auf niedrigerem Rang gleichzeitig einen niedrigeren Ion Score zugewiesen bekommen. Entsprechend könnte es sich trotzdem lohnen, sich die Scores bis 20 oder sogar darunter noch anzuschauen, um sich ein Bild von der Stimmigkeit der Sequenzvorschläge zu machen. Sobald eine größere Datenmenge vorliegt, kann man darüber genauere Aussagen treffen.

Ein großes Problem besteht allerdings nach wie vor: die Auswertungen von Hand – sei es jetzt die manuelle Auswertung einer Q-TOF-Messung oder das Sichten der automatisch ausgewerteten Daten aus einem Orbitrap-Lauf ist nach wie vor sehr zeitaufwändig. Um zukünftig Zeit zu sparen, sollte ein Datenbankabgleich erfolgen, in der bereits gefundene und

als richtig identifizierte Peptide eingetragen sind, um einen Anhaltspunkt dafür zu bekommen, ob ein Peptid schon einmal identifiziert wurde oder nicht. Bestenfalls könnte man einen Großteil der Sequenzvorschläge aus einer Auswertung ungeprüft übernehmen, allerdings unter der Voraussetzung, dass ein Peptid schon in einer bestimmten Anzahl anderer Experimente, beispielsweise fünf, bereits identifiziert wurde, für den Fall, dass es sich um einen falschen Eintrag in der Datenbank handelt. Das selbe Konzept könnte auch in einer Negativ-Datenbank Verwendung finden, in der sich nur Einträge von falsch identifizierten Sequenzen befinden, die aus einer ungeprüften Peptidliste ebenfalls im Vorfeld herausgefiltert werden könnten. Wenn dies erst für Peptide zulässig ist, die schon eine bestimmte Anzahl von Datenbankeinträgen vorweisen können, dann vermindert das auch die Gefahr, dass sich falsch positive beziehungsweise falsch negative Peptide in den Datenbanken befinden.

Dennoch ist es aufwändig, eine solche Datenbank mit ausreichend vielen Einträgen zu versorgen, da das HLA-Ligandom stark vom Gewebetyp abhängig ist und es aufgrund des HLA-Polymorphismus eine hohe Anzahl an verschiedenen MHC-Molekülen gibt, die allesamt ein unterschiedliches Bindungsmotiv besitzen und entsprechend unterschiedliche MHC-Moleküle präsentieren. Vielleicht wäre es also das beste, einen Grundstock an Peptiden aus *large-scale*-Analysen von Zellpellets zu generieren, da diese in großem Maße produziert und für die MHC-Präzipitation verwendet werden können, was ein deutlicher Vorteil gegenüber Gewebeproben ist, von denen oftmals nur wenige Milligramm für die Experimente zur Verfügung stehen. Unter Verwendung dieses Konzepts könnte es dann möglich sein, gerade bei Tumoranalysen noch Peptide zu finden, die ohne die Datenbankabfrage nicht identifizierbar gewesen wären.

Kapitel 3

Ergebnisse und Diskussion

~ Teil 2 ~

Analyse natürlich präsentierter Peptide auf MHC-Klasse-I und -II aus dem zentralen Nervensystem Multipler Sklerose-Patienten

Dieser Ergebnisteil wurde bereits in *Molecular and Cellular Proteomics*, 8, 2090-2101 (2009) von den folgenden Autoren publiziert:

Nicolas Fissolo, Sabrina Haag, Katrien L. de Graaf, Oliver Drews, Stefan Stevanović, Hans-Georg Rammensee und Robert Weissert

Oliver Drews war dabei für die Planung und Durchführung sämtlicher LC-MS- und LC-MS/MS-Experimente sowie für einen Teil der Fragmentspektrenauswertung und für die Messung der synthetischen Peptide zuständig. Außerdem wurden von ihm zwei von acht der Immunpräzipitationen und ein Teil der Western Blots durchgeführt.

3.2.1 Hintergrund und Überblick über den Versuch

Es ist bekannt, dass es sich bei Multipler Sklerose um eine Autoimmunkrankheit handelt, in der vermutlich sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺ T-Zellen eine entscheidende Rolle spielen. Diese Zellen richten sich gegen die Myelinscheiden an den Axonen von Nervenzellen und zerstören diese, so dass es zu dauerhaften Nervenschädigungen kommt. Obwohl nicht nur die Beteiligung der T-Zellen bekannt ist, sondern bei Patienten auch ein überdurchschnittlich hohes Vorkommen des HLA-Haplotypen HLA-DRB1*15 beobachtet wurde (vgl. Abschnitt 1.2.3), sind bisher kaum Liganden von Patienten charakterisiert worden.

Das Ziel des Versuchs ist es, die Gehirne von verstorbenen Multiple Sklerose-Patienten auf MHC-Expression zu untersuchen. Eluierte HLA-Liganden sollen über massenspektrometrische Analysen fragmentiert und sequenziert werden, um die Peptidsequenz und den Ursprung der Liganden festzustellen. Dabei stehen vor allem Peptide aus Myelinproteinen, wie beispielsweise MBP, PLP oder MOG im Fokus, da diese als besonders interessante Kandidaten für Antigene autoreaktiver T-Zellen gelten.

Zu diesem Zweck wurden Proben aus Gehirnautopsien verschiedener Patienten mit unterschiedlichen klinischen Subtypen der Multiplen Sklerose und verschiedenen HLA-Haplotypen untersucht. Die Proben wurden lysiert und die im Überstand befindlichen MHC-Peptid-Komplexe über ein Immunaффinitätsverfahren isoliert. Die dabei verwendeten Antikörper isolieren wahlweise alle MHC-Klasse-I-Moleküle (W6/32) oder die HLA-DR-Moleküle von MHC-Klasse-II (L243). Die lyophilisierten Proben wurden in Lösungsmittel A resolubilisiert und auf diese Weise für die massenspektrometrischen Messungen vorbereitet. Im Anschluss an die Messungen wurden die Fragmentspektren sequenziert und über eine Datenbankabfrage die komplette Peptidsequenz ermittelt.

3.2.2 Patientenmaterial und HLA-Typisierung

Für diese Studie wurden Proben von Gehirnautopsien acht verschiedener Multiple Sklerose-Patienten verwendet (**Tab. 2.2**), von denen der Subtyp der Multiplen Sklerose sowie die HLA-Typisierung bekannt ist. Deshalb konnte bereits im Vorfeld der MHC-Ligandenanalyse festgestellt werden, dass vier der Patienten ein oder sogar zwei HLA-DR- und HLA-DQ-Allele besitzen (HLA-DRB1*15-Haplotyp), die im Verdacht stehen, mit Multipler Sklerose

assoziiert zu sein (grau unterlegt). Des Weiteren sind einige der MHC-Gene der Patienten homozygot (**Tab. 3.5**).

Tab. 3.5: HLA-Typisierung der Patienten. Die beiden Allele jedes Gens sind in jeweils zwei verschiedenen Spalten dargestellt. Die mit Multipler Sklerose assoziierten HLA-Allele des HLA-DR*15-Haplotyps sind grau unterlegt.

Patient Nr.	HLA-A		HLA-B		HLA-C		HLA-DR		HLA-DQ	
MS12	A*01	A*03	B*08	B*51	Cw*07	Cw*15	DRB1*03	DRB1*04	DQB1*0302	DQB1*0201
MS22	A*01	A*25	B*08	B*44	Cw*07	Cw*05	DRB1*03	DRB1*15	DQB1*0201	DQB1*0602
MS27	A*02	A*02	B*15	B*44	Cw*05	Cw*03	DRB1*03	DRB1*15	DQB1*0201	DQB1*0602
MS29	A*01	A*11	B*07	B*35	Cw*07	Cw*04	DRB1*0103	DRB1*13	DQB1*0501	DQB1*06
MS31	A*03	A*30	B*18	B*35	Cw*05	Cw*04	DRB1*01	DRB1*03	DQB1*0501	DQB1*0201
MS32	A*01	A*02	B*08	B*08	Cw*07	Cw*07	DRB1*03	DRB1*03	DQB1*0201	DQB1*0201
MS34	A*01	A*01	B*08	B*08	Cw*07	Cw*07	DRB1*03	DRB1*03	DQB1*0201	DQB1*0201
MS46	A*03	A*68	B*07	B*14	Cw*07	Cw*08	DRB1*13	DRB1*1501	DQB1*0301	DQB1*0602

3.2.3 Expression von MHC-Klasse-I

Von den acht zur Verfügung stehenden Proben der Gehirnautopsien wurden jeweils 50 g für die Immunpräzipitation der MHC-Peptid-Komplexe verwendet. Das hergestellte Gewebelysat wurde über zwei Antikörpersäulen gegeben, um sämtliche MHC-Klasse-I-Moleküle (verwendeter Antikörper: W6/32) und die MHC-Klasse-II HLA-DR-Moleküle (verwendeter Antikörper: L243) zu extrahieren. Schon vor der massenspektrometrischen Analyse könnte über einen Western Blot die MHC-Klasse-I-Expression im Gehirn durch spezifische Detektion der β_2m -Kette des MHC-Moleküls überprüft werden. Die Anwesenheit der Banden bei 12 kDa zeigt, dass MHC-Klasse-I im Gehirn der Patienten exprimiert wurde. Exemplarisch ist in **Abbildung 3.14** der Western Blot eines Patienten abgebildet.

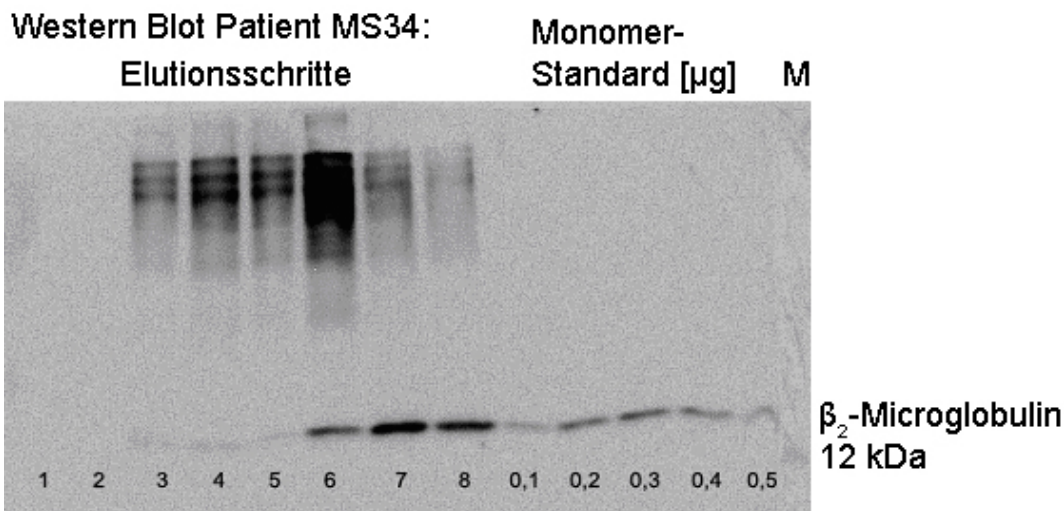


Abb. 3.14 Western Blot von Patient MS34. Detektion der β_2 -Mikroglobulinkette des MHC-Klasse-I-Moleküls bei 12 kDa. Der Großteil des MHC-Peptid-Komplexes eluiert in den Schritten 6 bis 8, als Referenz wurde eine Monomer-Verdünnungsreihe von 0,1 bis 0,5 µg verwendet. M: Proteinstandard

3.2.4 Massenspektrometrische Analyse

Die Liganden der eluierten MHC-Peptid-Komplexe wurden lyophilisiert und in 150 µl Lösungsmittel A resolubilisiert. Für eine Messung wurden davon jeweils 50 µl bzw. 75 µl pro Messung verwendet. Die gelösten Peptide wurden über eine HPLC aufkonzentriert, getrennt und im Anschluss massenspektrometrisch detektiert und fragmentiert.

Die Analyse der 16 Proben ermöglichte die Identifizierung von insgesamt 309 MHC-Liganden, von denen 118 auf MHC-Klasse-I-Molekülen und 191 auf MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert wurden, wobei die Anzahl der für die einzelnen Patienten identifizierten Peptide stark variiert (**Abb. 3.15**). Eine komplette Liste der identifizierten Peptide befindet sich im Anhang (**Tab. 7.2**).

Über die SYFPEITHI *epitope prediction* wurde für jedes identifizierte Peptid die Stärke der Bindungsaffinität zu den MHC-Molekülen ermittelt, wobei die individuellen HLA-Typisierungen der Patienten berücksichtigt wurden. Bei MHC-Klasse-I-Liganden gilt ein Zahlenwert über 20 als ausreichend hoch um sagen zu können, dass das Peptid dem entsprechenden MHC-Molekül zugewiesen werden kann. MHC-Klasse-II-Liganden wurde unabhängig vom SYFPEITHI-Wert ein HLA-Allel zugeordnet, da die Zahlenwerte für die Bindungsaffinität generell niedriger ausfielen als für MHC-Klasse-I.

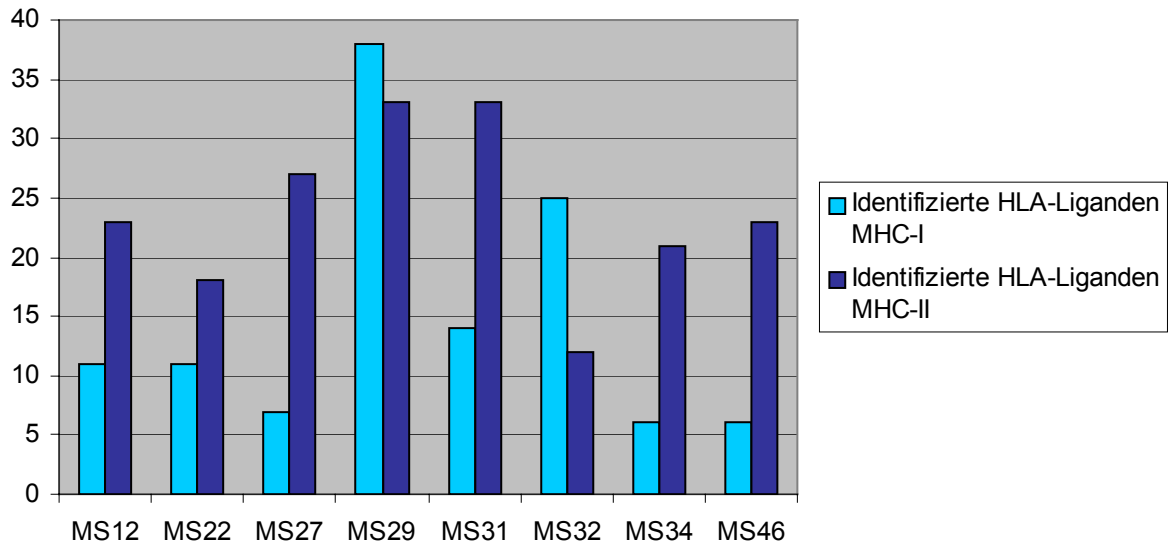
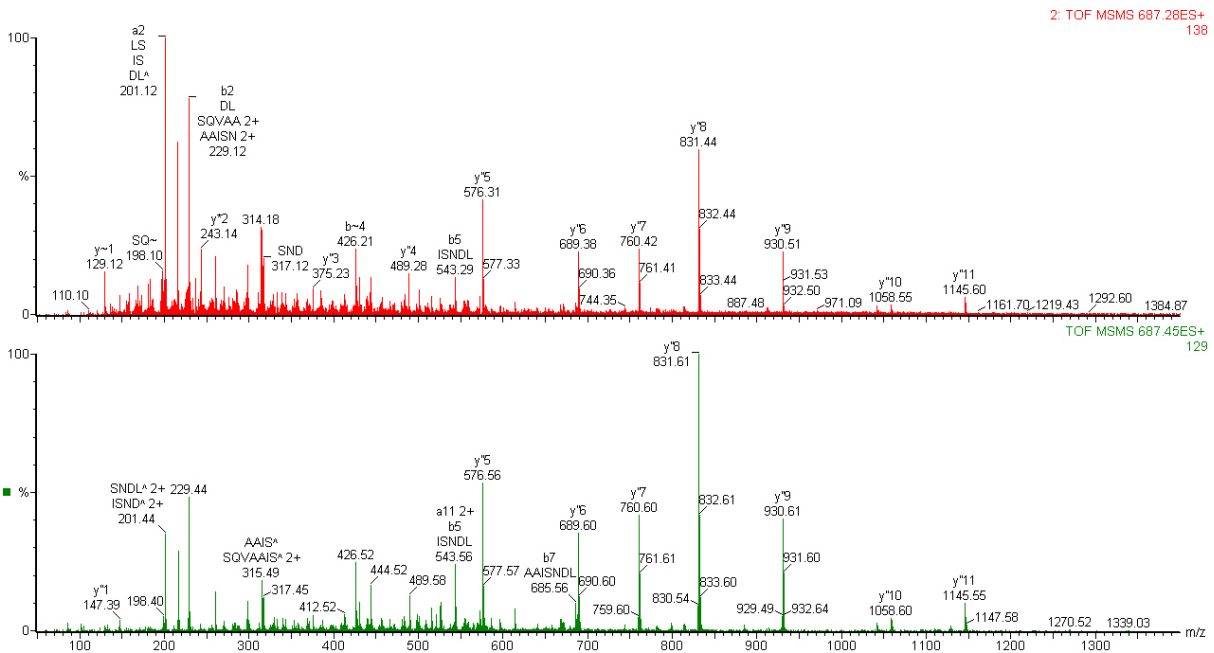


Abb. 3.15: Anzahl der identifizierten MHC-Liganden aus Multiple Sklerose-Patienten. Anzahl der identifizierten HLA-Liganden auf MHC-Klasse-I (hellblau) und MHC-Klasse-II (dunkelblau) der acht verschiedenen Patientenproben.

Um die Sequenz der identifizierten Peptide zu bestätigen, wurde ein ausgewählter Teil der Peptide synthetisiert und über direkte Infusion in das Massenspektrometer fragmentiert. Die Fragmentspektren der synthetischen Peptide wurden mit den entsprechenden Fragmentspektren der natürlich im Gehirngewebe vorkommenden Liganden verglichen, um die Identität zu bestätigen. Ausschlaggebend für diese Beurteilung war die Sichtbarkeit der gleichen b- bzw. y-Serien innerhalb des Fragmentspektrums sowie ein ähnliches Verteilungsmuster der Fragmente sowie deren Intensitäten. In **Abbildung 3.16** sind zwei Beispiele für einen solchen Vergleich dargestellt: Die Fragmentspektren des auf MHC-Klasse-I präsentierten Neurofilament light polypeptide₍₇₂₋₈₄₎ und der auf MHC-Klasse-II präsentierten Glutamin Synthetase₍₃₆₂₋₃₇₃₎ wurden mit den Fragmentspektren der entsprechenden synthetischen Peptide verglichen. Die Übereinstimmung zeigt, dass die Interpretation der Fragmentspektren der natürlichen Liganden korrekt ist.

Neurofilament light polypeptide (72-84)
Sequenz: DLSQVAAISNDLK



Glutamin Synthetase (361-373)
Sequenz: LNETGDEPFQYKN

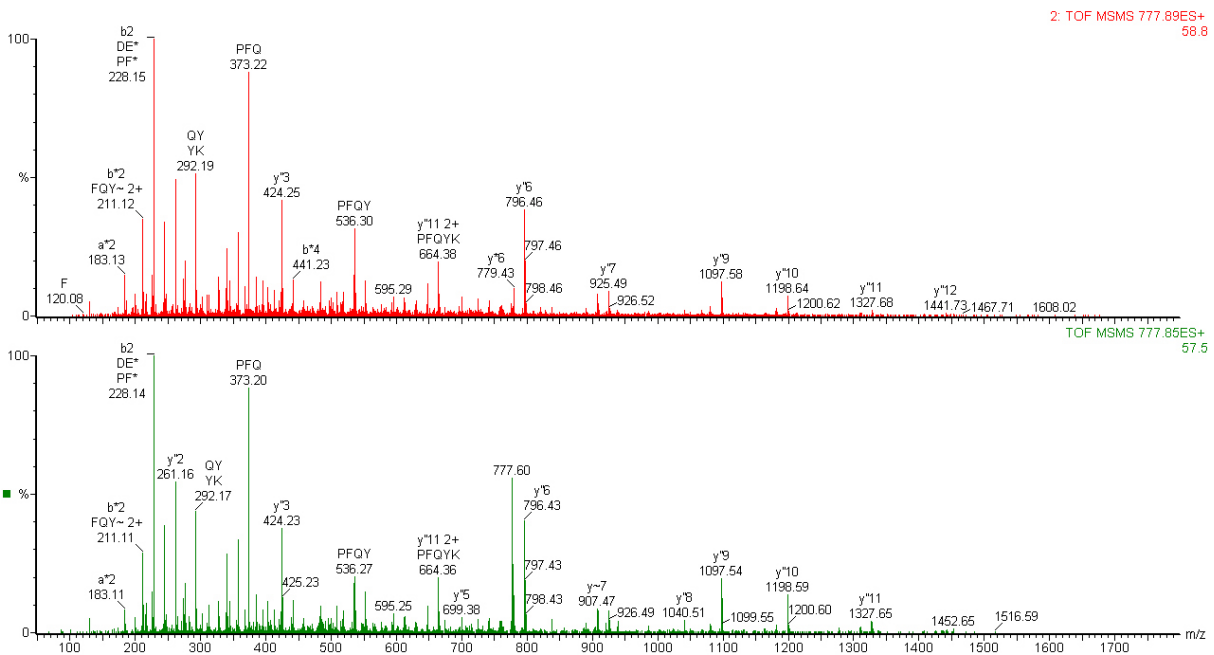


Abb. 3.16: Vergleich zweier natürlicher Liganden mit synthetischen Peptiden. Die Fragmentspektren der natürlichen Liganden des Neurofilament light polypeptides und der Glutamin Synthetase (rot) im Vergleich zu den Fragmentspektren der synthetischen Peptide (grün). Fragmentierungsmuster und Ionenserien stimmen in beiden Fällen überein.

3.2.5 Datenbankauswertungen und Statistik

Die Analyse des grundlegenden HLA-Peptid-Repertoires, das auf den verschiedenen HLA-Allotypen der Gehirnproben der Multiple Sklerose-Patienten präsentiert wurde ermöglichte die Identifizierung von 239 nicht redundanten Peptiden aus 174 nicht redundanten Proteinen. Unter diesen Proteinen befinden sich 40, die mit Multipler Sklerose oder der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis assoziiert sind. Diese Proteine wurden in Abhängigkeit zu ihrer Funktion und ihrer Gewebezugehörigkeit in eine der folgenden Kategorien eingeteilt: ‚Apoptose-assoziiert‘, ‚Zytoskelett‘, ‚Enzyme‘, ‚Immunantwort‘, ‚ZNS‘, ‚Serum‘ und ‚Andere‘ (**Tab. 3.6**).

Durch eine Untersuchung der 174 Quellproteine mit Ingenuity Pathways Analysis[®] konnte festgestellt werden, dass die meisten der Proteine aus dem Zytoplasma stammen (34%), gefolgt von Proteinen aus der Plasmamembran (25%), dem Nukleus (17%) und dem extrazellulären Raum (11%). Für 13% der Proteine konnte kein Ursprung festgestellt werden (**Abb. 3.17A**). 68% der auf MHC-Klasse-II präsentierten Peptide stammen aus extrazellulären Proteinen; 77% der aus nukleären Proteinen stammenden Peptide wurden auf MHC-Klasse-I präsentiert. Im Gegensatz dazu wurden Peptide aus zytoplasmatischen Proteinen sowie Proteinen der Plasmamembran gleichermaßen auf MHC-I- und MHC-II-Molekülen präsentiert.

Zusätzlich wurde das Programm dazu verwendet, die Proteine mit verschiedenen Krankheiten zu verknüpfen. Dabei lag der Fokus insbesondere auf neurologischen Krankheiten (28%) sowie auf Krankheiten mit inflammatorischem oder immunologischen Hintergrund (8%). Dabei stellte sich heraus, dass viele der Proteine auch mit anderen Krankheiten assoziiert sind und dass eine erhebliche Anzahl der Proteine mehr als einer Gruppe zugeordnet werden kann (**Abb. 3.17B**).

In Hinblick auf ihre biologischen Funktionen konnten die Proteine in 10 funktionelle Gruppen eingeteilt werden (**Abb. 3.17C**). Die meisten der Proteine sind am zellulären Aufbau und der zellulären Organisation beteiligt (35), 26 an der Zellmigration und 25 an der Entwicklung und Funktionalität des Nervensystems. Des Weiteren konnten 19 Proteine mit dem Zelltod, 16 mit dem Zellzyklus und 13 mit dem molekularen Transport in Verbindung gebracht werden. Jeweils 10 Proteine sind mit Zellwachstum und Proliferation beziehungsweise mit Zell-zu-Zell Signalisierung und zellulärer Interaktion assoziiert, und jeweils 6 Proteine mit Genexpression und der Immunantwort.

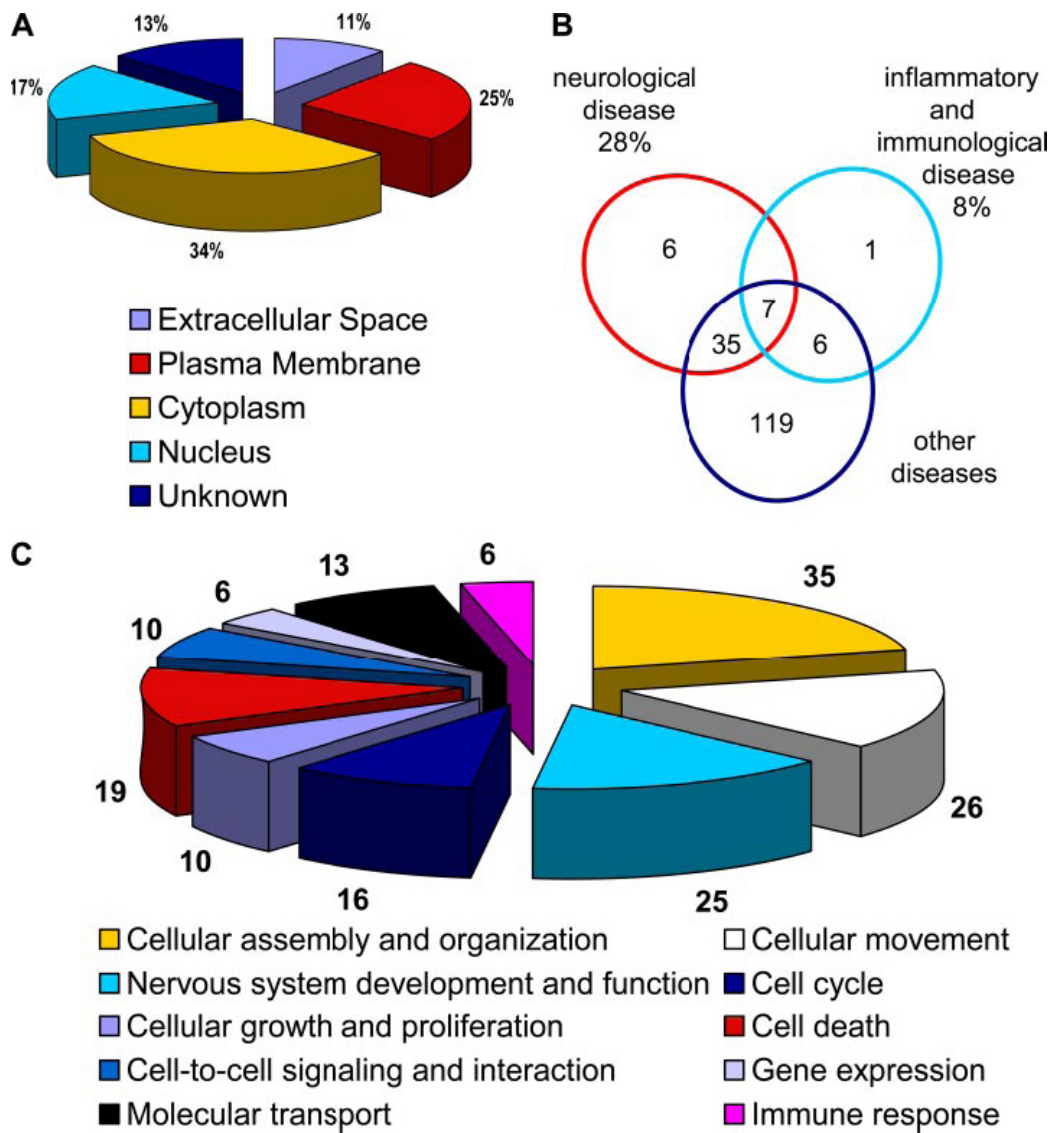


Abb. 3.17: Subzelluläre, funktionelle und Krankheits-assoziierte Kategorisierung der Quellproteine. **A:** Kreisdiagramm, das die prozentuale Menge der Proteine bezüglich ihrer subzellularen Lokalisierung angibt. **B:** Ein Venn-Diagramm, das die Anzahl der Proteine in Bezug auf Krankheitsassoziation mit einer neurologischen, inflammatorischen bzw. immunologischen oder einer anderen Krankheit darstellt. **C:** Kreisdiagramm, in dem die Proteine einer von zehn funktionellen Gruppen zugeordnet werden. (Bild: Fissolo et al., 2009³⁵¹).

Tab. 3.6 Multiple Sklerose-assoziierte Proteine. Auflistung aller Proteine, zu denen bereits ein Zusammenhang mit Multipler Sklerose entdeckt wurde und die im Rahmen der HLA-Ligandomanalyse bei den acht Patienten identifiziert wurden.

Entrez ID	Protein	Patient Nummer	Zusammenhang mit Multipler Sklerose
Apoptose			
311	Annexin A1	MS12, MS22, MS29, MS34	Potentieller neuer Marker für aktive Multiple Sklerose ³⁵²
9774	Bcl-2 associated transcription factor 1	MS29, MS32	Antiapoptotische Moleküle erhöht in kortikalen Neuronen von Multipler Sklerose ³⁵³
332	Survivin	MS22	Erhöhte Expression in aktivierten T-Zellen von Multiple Sklerose-Patienten ³⁵⁴
Zytoskelett			
60	Actin	MS12, MS22, MS29, MS31, MS32, MS34, MS46	Biomarker für axonale und neuronale Schäden ³⁵⁵
10376	α -Tubulin	MS29, MS31, MS32, MS34	Biomarker für axonale und neuronale Schäden ³⁵⁵
2934	Gelsolin	MS31	Geringere Gelsolin-Konzentration in ZSF von Multiple Sklerose-Patienten, möglicher Nutzen als diagnostischer Marker ³⁵⁶
4131	Microtubule-associated protein 1B (MAP1B)	MS27	Marker für aktiv myelinisierende Oligodendrozyten im adulten Rattengehirn ³⁵⁷
3925	Stathmin 1	MS29	Erhöhte Expression in Gehirnen von Multiple Sklerose-Patienten ³⁵⁸
Enzyme			
801	Calmodulin 1	MS31	Calmodulin bindet MBP in Abhängigkeit von Ca ²⁺ -Ionen ³⁵⁹
805	Calmodulin 2 (phosphorylase kinase)	MS29, MS32	Beteiligt an der Migration von γ/δ T-Zellen in Läsionen von Multipler Sklerose ³⁶⁰

Entrez ID	Protein	Patient Nummer	Zusammenhang mit Multipler Sklerose
Enzyme			
2747	Glutamate dehydrogenase (GDH)	MS27, MS31 (GDH); MS12, MS27, MS29, MS31, MS34, MS46 (GS)	Glutamat-Exotoxizität aufgrund von erhöhter Glutamathomöostase. GS und GDH sind in Oligodendrozyten aus normaler weißer Gehirnsubstanz vorhanden, jedoch nicht in aktiven und chronischen Läsionen von Multipler Sklerose ³⁶¹
2597	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	MS12, MS27, MS29, MS32, MS34	Autoantikörper in ZSF von Multiple Sklerose-Patienten ³⁶²
51564	Histone deacetylase 7a	MS32	Histon-Deacetylase-Inhibitoren sind im Gespräch als zweifach therapeutisches Mittel bei Multipler Sklerose ³⁶³
4696	NADH dehydrogenase	MS29, MS31	Tendenz von geminderter NADH Dehydrogenase-Aktivität in Zusammenhang mit oxidativen Schäden an mitochondrialer DNA in Plaques von Multiple Sklerose-Patienten ³⁶⁴
113791	Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)	MS12	Migration von V δ 2 γ/δ T-Zellen durch Endothelzellen durch Aktivierung des PI3K-Pathways bei Patienten mit <i>relapsing-remitting</i> Multipler Sklerose ³⁶⁵
Immunantwort			
336	Early pregnancy factor (EPF)	MS12, MS27, MS29, MS31, MS46	EPF hat eine schützenden Effekt vor EAE in LEW-Ratten ³⁶⁶
3577	Interleukin 8 receptor, CXCR1	MS46	Behandlung mit Methylprednisolon und Mitoxantron moduliert die Expression von CXCR1 auf PBMCs ³⁶⁷ ; CXCR1 ist auf Oligodendrozyten konstitutiv exprimiert und in aktiven und stillen Läsionen der Multiplen Sklerose hochreguliert ³⁶⁸

Entrez ID	Protein	Patient Nummer	Zusammenhang mit Multipler Sklerose
Immunantwort			
3594	Interleukin 12 receptor	MS12	Möglicherweise ein Biomarker, mit dem man zwischen <i>relapsing-remitting</i> und sekundär-progressiver Form der Multiplen Sklerose unterscheiden kann ³⁵⁵
4282	Macrophage migration-inhibitory factor	MS29	Therapeutisches Ziel bei inflammatorischen Krankheiten ³⁶⁹
3119	MHC class antigen II HLA-DQβ1	MS22	HLA-DR- und -DQ-Gene sind das höchste genetische Risiko bei Multipler Sklerose ^{180,370}
ZNS			
6622	α-Synuclein	MS29	Hochreguliert in Neuronen und Gliazellen ³⁷¹
2670	GFAP	MS22, MS31, MS32, MS46	Erhöht in der ZSF von Multiple Sklerose-Patienten ³⁷² ; Biomarker für Gliose ³⁵⁵
4155	MBP	MS12, MS27, MS32, MS34, MS46	Anti-MBP-Antikörper möglicherweise an Entwicklung von Multipler Sklerose beteiligt; Biomarker für Demyelinisierung ³⁵⁵
4741	Neurofilament-3, NF-M	MS32, MS46	Biomarker für axonale und neuronale Schäden ³⁵⁵ ; Autoantikörper in Serum und ZSF ³⁷³ ; transgene MOG ₍₃₅₋₅₅₎ -reaktive T-Zellen reagieren auf ein NF-M-Epitop in MOG-defizienten Mäusen ³⁷⁴
4747	Neurofilament light polypeptide, NF-L	MS27, MS32	Biomarker für axonale und neuronale Schäden ³⁵⁵ ; erhöht in ZSF von Multiple Sklerose-Patienten ³⁷² ; Immunisierung mit NF-L induziert Nervenkrankheiten und axonale Demyelinisierung in Mäusen ³⁷⁵ ; Autoantikörper im Serum und ZSF ³⁷⁶
6285	S100 calcium-binding protein	MS22	Erhöhte Konzentration in ZSF von Patienten mit <i>relapsing-remitting</i> Multipler Sklerose ³⁷⁷

Entrez ID	Protein	Patient Nummer	Zusammenhang mit Multipler Sklerose
ZNS			
8404	SPARC-like protein	MS12, MS22, MS27, MS31	Detektierbar in der ZSF von Multiple Sklerose-Patienten ³⁷⁸
Serum			
2	α_2 -Macroglobulin	MS22, MS46	Signifikant erhöhte Fraktionen von transformiertem α_2 -Macroglobulin im Vergleich zu normalem α_2 -Macroglobulin im Plasma von Multiple Sklerose-Patienten ^{379,380}
347	Apolipoprotein D (apoD)	MS22	Intrathekale Produktion von apoD erhöht bei Multipler Sklerose; Menge von apoD in ZSF korreliert mit Dauer der Krankheit, Behandlung mit Corticosteroiden erhöht Menge von apoD in ZSF ³⁸¹
348	Apolipoprotein E (apoE)	MS29	Peptide aus apoE bewirken Verbesserung gegenüber inflammatorischen Infiltraten im Rückenmark bei EAE ³⁸²
2512	Ferritin	MS22, MS46	Erhöhte Ferritin-Mengen bei Patienten mit chronisch progressiver aktiver Form der Multiplen Sklerose ³⁸³ ; erhöhte Ferritin-Mengen bei geringer Anzahl von Patienten ³⁸⁴
7018	Transferrin	MS22	Eisen-Dysregulation bei der Pathogenese von Multipler Sklerose; gegenteilig zu Ferritin, Transferrin-Mengen sind bei Patienten normal ³⁸³
7450	von Willebrand factor	MS34	CXCR3 ^{-/-} -Mäuse zeigen mehr von Willebrand Faktor-immunreaktive Zellen bei Entzündung des Rückenmarks bei EAE im Vergleich zu CXCR3 ^{+/+} -Mäusen ³⁸⁵
Andere			
2784	Guanine nucleotide-binding Protein (GNB)	MS29	Tendenz zu einem erhöhten GNB-Polymorphismus bei primärer chronisch-progressiver Multiple Sklerose ³⁸⁶

Entrez ID	Protein	Patient Nummer	Zusammenhang mit Multipler Sklerose
Andere			
4600	Interferon-regulated resistance GTP-binding protein (MX1)	MS27	Biomarker zur Messung von IFN- β -Aktivität in Mäusen ³⁸⁷
10226	Mannose 6-phosphat receptor (IGF-II)	MS29	Keine Expression in Plaques von Multiple Sklerose-Patienten, die sich durch ein dichtes Netzwerk von Astrozyten auszeichnete. IGF-II-Rezeptoren vermutlich nicht an Astrogliose beteiligt ³⁸⁸
7157	p53 tumor suppressor	MS22	Defekte im ATM-CHK2-p53-Pathway bei Multiple Sklerose-Patienten erhöhen die Regulierung von Immunzellen und tragen u.U. zum Fortschreiten der Krankheit bei ³⁸⁹ ; erhöhte p53-Expression in Oligodendrozyten in aktiven Läsionen führen zu Apoptose und Verlust an Zellen ³⁹⁰
7082	Tight junction protein ZO-1	MS29	Abnormale <i>tight junctions</i> sind häufig in aktiven Läsionen in der weißen Gehirns substanz, bleiben aber auch persistent in inaktiven Läsionen ³⁹¹

3.2.6 MHC-Liganden aus dem Myelin-Basischen Protein

MBP ist das am zweithäufigsten vorkommende Myelinprotein und wurde im Zusammenhang mit Multipler Sklerose am besten untersucht. Es gilt als immunogen und T-Zellen sind dazu in der Lage, eine große Anzahl von MBP-Epitopen zu erkennen (vgl. Abschnitt 1.2.7.1). Die Analyse der MHC-Liganden ergab, dass in sieben von acht Patienten Peptide aus MBP präsentiert werden, wobei 11 der insgesamt identifizierten Peptide auf MHC-Klasse-II und lediglich zwei Peptide auf MHC-Klasse-I präsentiert wurden (**Tab. 3.7**).

Tab. 3.7: MHC-Liganden aus MBP. Bei sieben von acht Patienten konnten Peptide aus MBP identifiziert werden. Insgesamt 13 Liganden wurden sequenziert, wobei 2 auf MHC-Klasse-I und 11 auf MHC-Klasse-II präsentiert wurden.

Protein (Position)	Peptidsequenz	Patient Nummer
MHC-Klasse-I		
MBP ₍₃₅₋₄₅₎	DTGILDSIGRF	MS32, MS34
MBP ₍₃₆₋₄₅₎	TGILDSIGRF	MS34
MHC-Klasse-II		
MBP ₍₁₀₋₁₉₎	RHGSKYLATA	MS27
MBP ₍₁₀₋₂₇₎	RHGSKYLATASTMDHARH	MS27
MBP ₍₁₁₋₂₅₎	HGSKYLATASTMDHA	MS46
MBP ₍₂₁₋₃₀₎	TMDHARHGFL	MS27
MBP ₍₇₇₋₉₁₎	SHGRTQDENPVVHF	MS46
MBP ₍₈₄₋₉₄₎	DENPVVHFFKN	MS12, MS27
MBP ₍₉₅₋₁₀₆₎	IVTPRTPPPSQG	MS12, MS29
MBP ₍₉₅₋₁₁₀₎	IVTPRTPPPSQGKGRG	MS27
MBP ₍₉₅₋₁₁₂₎	IVTPRTPPPSQGKGRGLS	MS27
MBP ₍₉₆₋₁₁₁₎	VTPRTPPPSQGKGRGL	MS31
MBP ₍₁₃₉₋₁₅₃₎	HKGFKGVDAQGTLS	MS27

3.2.7 Diskussion

Durch die Immunpräzipitation von MHC-Molekülen sowie der massenspektrometrischen Analysen der präsentierten Peptide gelang es zum ersten Mal für eine Krankheit des zentralen Nervensystems, Liganden, die auf MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert wurden zu identifizieren. Bei der Multiplen Sklerose handelt es sich um eine neurodegenerative Autoimmunkrankheit, bei der inflammatorische Ereignisse zu Beginn der Krankheit in späteren Stadien zu Demyelinisierung der Nervenaxone, zum Verlust von Axonen und Neuronen und schließlich zur Bildung von Narbengewebe führen. Bisher ist bekannt, dass die Autoimmunantwort hauptsächlich gegen die Myelinproteine wie beispielsweise MBP gerichtet ist²⁵⁶⁻²⁵⁹, aber auch andere Teile des Nervensystems wie axonale und neuronale Komponenten oder astrozytische Proteine scheinen Reaktionen des Immunsystems hervorrufen zu können³⁹².

In dieser Studie konnte nachgewiesen werden, dass Selbst-Antigene, die bereits seit längerer Zeit bekannt waren, tatsächlich während des Krankheitsverlaufs der Multiplen Sklerose auf MHC-Molekülen präsentiert werden. Des Weiteren konnten Peptide aus dem *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) und aus Neurofilament gefunden werden, von denen bekannt ist, dass sie in der ZSF von Multiple Sklerose-Patienten in erhöhten Werten vorkommen³⁷². Für das Neurofilament wurde außerdem gezeigt, dass es in Mäusen zu Nervenkrankheiten und axonalen Beschädigungen führen kann³⁷⁵. Auch das erste Beispiel von immunologischer Selbst-Mimikry wurde im Zusammenhang mit Neurofilament demonstriert³⁷⁴: Dabei entwickeln MOG-defiziente Mäuse, die einen transgenen MOG₍₃₅₋₅₅₎ T-Zell-Rezeptor exprimieren trotzdem EAE, da die T-Zellen ein Epitop aus dem mittleren Neurofilament-Protein NF-M erkennen. Möglicherweise ist die kombinierte Immunantwort gegen MOG und NF-M durch enzephalitogene T-Zellen ausreichend, um die natürliche Resistenz gegen EAE in C57BL/6-Mäusen zu überwinden. Diese Art der kumulativen Verstärkung durch die immunologische Selbst-Mimikry könnte eine erhebliche Rolle in der Pathogenese der Multiplen Sklerose spielen.

Für viele der Proteine, aus denen in dieser Studie Liganden identifiziert wurden (**Tab 3.6**), wurde bereits eine mögliche Relevanz für die Multiple Sklerose gezeigt. So gelten die Proteine NF-L und GFAP als Biomarker für Multiple Sklerose, da sie in der ZSF von Patienten stark erhöht sind³⁷², die Glyceraldehyde-3-Phosphat Dehydrogenase als Ziel für Autoantikörper³⁶¹ und das Gelsolin als wichtiger Marker für die Diagnose von Multipler

Sklerose³⁵⁶. Um sagen zu können, dass diese Proteine und im speziellen die identifizierten Liganden für die Multiple Sklerose relevant sind, bedarf es allerdings noch weiterer Untersuchungen. Neben den bereits beschriebenen Proteinen wurde zusätzlich eine Vielzahl neuer Proteine aus verschiedenen Zelltypen entdeckt, die bisher noch nicht im Zusammenhang mit Multipler Sklerose beschrieben wurden. Eine Möglichkeit wäre, dass einige diese Peptide Ziele für doppelt-reaktive T-Zellen darstellen könnten, wie es schon in EAE-Modellen gezeigt wurde³⁷⁴. Eine genauere Untersuchung der Kontaktpunkte der T-Zell-Rezeptoren mit immundominanten Epitopen, wie beispielsweise mit MBP₍₈₅₋₉₉₎, könnte Aufschluss darüber geben, ob dies der Fall ist oder nicht.

Der Nachweis des MBP₍₈₅₋₉₉₎-MHC-Komplexes wurde unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers durchgeführt³⁹³. Der Beweis für die immunbiologische Relevanz des Peptids zeigt sich an Versuchen im Mausmodell, in dem transgene Mäuse, die sowohl HLA-DRB1*15:01 als auch den aus Multiple Sklerose-Patienten abgeleiteten MBP₍₈₄₋₁₀₂₎-TZR exprimieren spontan EAE entwickeln³⁹⁴. Durch weitläufiges *epitope mapping* in Tieren und Menschen konnte MBP₍₈₃₋₉₉₎ als immundominantes Epitop identifiziert werden, das dazu in der Lage ist, in Tieren EAE und im Menschen Multiple Sklerose auszulösen¹⁸³. Das Peptid kann an mehrere verschiedene HLA-DR-Moleküle binden, die mit Multipler Sklerose assoziiert sind. Man nimmt an, dass die unnatürlich hohe Bindungsaffinität des Peptids an HLA-DR15-Moleküle zur Auslöschung von MBP₍₈₃₋₉₉₎-spezifischen T-Zellen mit hoher Avidität aus dem Repertoire der peripheren T-Zellen führt. Bei der Untersuchung anderer Peptide aus MBP zeigte sich, dass auch andere Epitope ähnlich dominant sind und sich dazu eignen, zwischen Patienten und gesunden Menschen zu unterscheiden. Dazu gehören beispielsweise das bereits bekannte und genauer untersuchte MBP₍₈₄₋₁₀₂₎ sowie MBP₍₁₄₋₃₃₎ und das auf HLA-DRB1*04:01 präsentierte MBP₍₁₁₁₋₁₂₉₎.

MHC-Klasse-I-restringierte MBP-Peptide wurden bisher weniger gut charakterisiert, da die stärkste genetische Assoziation mit Multipler Sklerose bisher nur für MHC-Klasse-II-Allele und nicht für MHC-Klasse-I-Allele festgestellt wurde³⁹⁵, weshalb die Multiple Sklerose oftmals immer noch für eine von CD4⁺ T-Zellen ausgelöste Krankheit gehalten wird. Dennoch wanderten CD8⁺ T-Zellen in den letzten Jahren in den Fokus der Erforschung der Krankheit, da gezeigt werden konnte, dass CD8⁺ CTLs in Läsionen von Multipler Sklerose stark vertreten sind und dort in größerer Anzahl als CD4⁺ T-Zellen vorkommen¹⁹⁷. Bisher gibt es lediglich Hinweise darauf, dass HLA-A*02 einen schützenden Effekt vor Multipler Sklerose zu haben scheint, und HLA-A*03 das Fortschreiten der Krankheit begünstigt^{192,396}. Als immundominante HLA-A*02-restringierte Liganden wurden bisher MBP₍₈₈₋₉₆₎ und

MBP₍₁₁₂₋₁₂₀₎ identifiziert²⁷⁶. Die beiden in dieser Studie identifizierten HLA-Klasse-I-Liganden MBP₍₃₅₋₄₅₎ und MBP₍₃₆₋₄₅₎ wurden noch nicht im Zusammenhang mit pathogenen CD8⁺ T-Zell-Antworten in der Multiplen Sklerose beschrieben. Unklar ist auch, ob es sich um zwei separate Liganden handelt, die vermutlich von HLA-A*01 präsentiert werden, oder ob MBP₍₃₆₋₄₅₎ lediglich ein Fragment von MBP₍₃₅₋₄₅₎ ist.

In Bezug auf die Klasse-II-restringierten Liganden aus MBP stammen die meisten der natürlich prozessierten Peptide aus Regionen des Proteins, die bereits als immundominant beschrieben wurden¹⁸³. Vier der identifizierten Liganden (MBP₍₁₀₋₁₉₎, MBP₍₁₀₋₂₇₎, MPB₍₁₁₋₂₅₎ und MBP₍₂₁₋₃₀₎) überlappen deshalb auch partiell mit dem bekannten MHC-Klasse-II-Epitop MBP₍₁₄₋₃₃₎. Andere Liganden überlappen teilweise mit der Region MBP₍₈₄₋₁₀₂₎, aus der immundominante Epitope stammen (**vgl. Tab. 3.7**). Interessanterweise passt jedoch keines der sequenzierten Peptide aus dieser Region zu dem gut charakterisierten Epitop MBP₍₈₃₋₉₉₎. Tatsächlich konnten jedoch in zwei der Patienten zusammenhängende Sequenzen identifiziert werden (für Patient MS12 MBP₍₈₄₋₉₄₎ und MBP₍₉₅₋₁₀₆₎ und für Patient MS27 MBP₍₈₄₋₉₄₎ und MBP₍₉₅₋₁₁₀₎ beziehungsweise MBP₍₉₅₋₁₁₂₎), die innerhalb dieser Region liegen und zwischen Asn₍₉₄₎ und Ile₍₉₅₎ geschnitten wurden. Interessanterweise wurde schon zuvor gezeigt, dass diese Stelle in MBP eine Schnittstelle für die Asparagin-Endopeptidase (AEP) darstellt, ein Enzym, das im frühen Stadium der Proteolyse während der Antigenprozessierung wichtig ist³⁹⁷ (**Abb. 3.18**).

Diesen Ergebnissen nach zu urteilen spielt die AEP auch bei der Prozessierung von MBP in den Gehirnen von Patienten mit Multipler Sklerose eine wichtige biologische Rolle. Studien in SJL/J-Mäusen haben gezeigt, dass die Induzierung einer immunologischen Toleranz mit MBP₍₈₉₋₁₀₁₎ ineffektiv ist, da die Behandlung mit diesem Peptid nicht auf die krankheitsrelevanten T-Zellen abzielt, die entweder MBP₍₈₉₋₉₄₎ oder MBP₍₉₅₋₁₀₁₎ als Epitop erkennen³⁹⁸. Diese Beobachtungen in einem EAE-Modell zusammen mit den Ergebnissen dieser Studie stärkt die Ansicht, dass relevante Antigen-spezifische Therapien gegen Multiple Sklerose in der Hinsicht konzipiert werden sollten, dass sie auf die Stimulation von T-Zellen, die auf die natürlich prozessierten Epitope des Autoantigens reagieren, hin zielen. Zwar konnten einige Liganden aus MBP in dieser Studie identifiziert werden, allerdings war es nicht möglich, Peptide aus den anderen Myelinproteinen wie PLP oder MOG zu detektieren. Für letzteres könnte die Erklärung in der Häufigkeit der Proteine in der Zelle und damit der Häufigkeit der Peptide, die auf MHC präsentiert werden liegen. Das häufigste Myelinprotein ist PLP (~50%), gefolgt von MBP (~30% - 40%). Im Gegensatz dazu macht MOG gerade einmal 0,01% - 0,05% des Myelins aus, was bedeutet, dass davon viel weniger Proteine

prozessiert und auf MHC präsentiert werden und die Peptide aufgrund der Limitierungen in Sachen Sensitivität des Massenspektrometers entsprechend nur sehr schwer beziehungsweise gar nicht zu detektieren sind. Ein möglicher Grund für die Abwesenheit von HLA-Liganden aus PLP könnte der sein, dass PLP ein Protein ist, das viele Palmitoylierungen trägt^{399,400}. Bei dieser posttranslationalen Modifikation wird Palmitinsäure an Cysteinreste angehängt. Eventuell könnten deshalb Probleme bei der Antigenprozessierung auftreten, oder aber es ist nicht möglich, mit den hier verwendeten Methoden diese Art Peptide aus den Proben zu isolieren oder im Massenspektrometer zu detektieren.

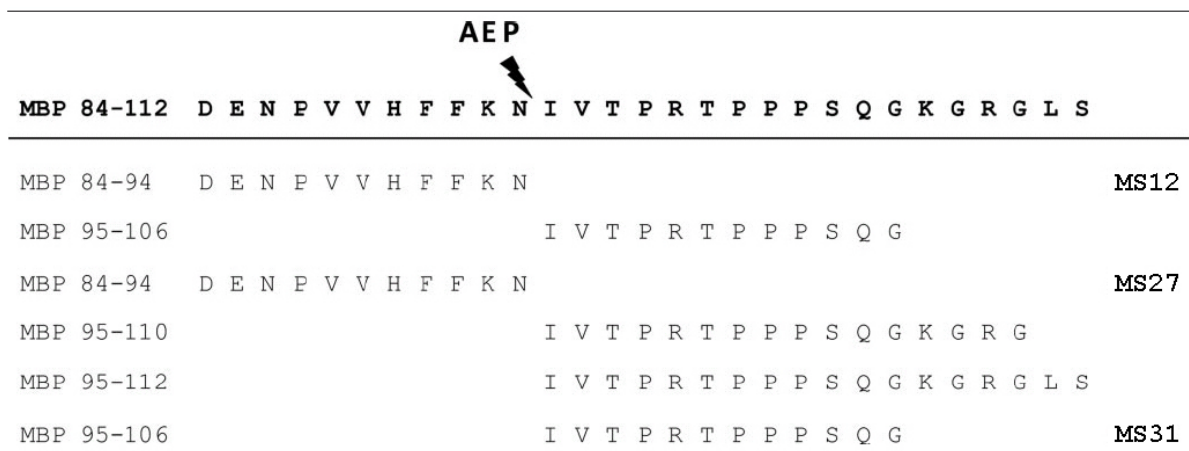


Abb. 3.18: Schnittstelle der Asparagin Endopeptidase in MBP. AEP schneidet MBP während der Antigenprozessierung zwischen Asn₍₉₄₎ und Ile₍₉₅₎. (Bild modifiziert nach Fissolo et al., 2009³⁵¹).

Die meisten der in dieser Studie identifizierten MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II Peptide wiesen bei SYFPEITHI einen signifikant hohen Zahlenwert bezüglich der Bindungsstärke auf. Dennoch gab es einige MHC-Liganden, die nur eine geringe Punktzahl zugewiesen bekamen, was aufgrund des ausgeprägten Peptidmotivs für MHC-Klasse-I-Moleküle unerwartet ist. Eine mögliche Erklärung hierfür könnten unzureichende Sequenzinformationen über HLA-Liganden von selteneren MHC-Allotypen sein, so dass es noch nicht möglich war, diesen Peptide über den Algorithmus des Programms eine adäquate Punktzahl zuzuweisen.

Für die Analyse der MHC-Liganden konnte leider lediglich das Gehirngewebe von Multiple Sklerose-Patienten untersucht werden, da kein Gewebe von gesunden Individuen zu Kontrollzwecken zur Verfügung stand. Ein Grund hierfür ist, dass man generell nur sehr schwer an gesundes Gewebe des ZNS, speziell von jungen gesunden Personen kommt, und

dass der Vergleich zwischen normalem Gewebe und den Proben aus den Multiple Sklerose-Patienten nur dann Schlussfolgerungen auf die Krankheit zulassen würde, wenn der MHC-Haplotyp der beiden Vergleichsproben übereinstimmt. Ein weiteres Problem, das im Zusammenhang mit der MHC-Klasse-II-Analyse auftreten könnte ist die Tatsache, dass MHC-Klasse-II normalerweise nur auf speziellen APCs exprimiert wird, welche unter den pathologischen Bedingungen der Multiplen Sklerose im ZNS stark erhöht sind³⁷⁰. Im Gegensatz dazu ist die MHC-Expression in gesundem ZNS-Gewebe gering. Im Umkehrschluss bedeutet das, dass man die für die MHC-Präzipitation eingesetzte Menge an Gewebe drastisch erhöhen müsste, um auf die für die Analyse benötigte Anzahl von Zellen zu kommen. Man nimmt an, dass die minimale Anzahl an Zellen, die für die Analyse von MHC-gebundenen Peptiden benötigt wird bei ungefähr 10^9 liegt.

Im Gegensatz zu den traditionellen Herangehensweisen zur Antigenanalytik in der Proteomik⁴⁰¹ hat der für diese Studie verwendete Ansatz den klaren Vorteil, dass genau die Teile des Proteins identifiziert werden können, die auch für das Immunsystem sichtbar sind und die deshalb eher in den Prozess der Immunantwort involviert sind als Peptide, die über das klassische ‚*epitope mapping*‘ als Kandidaten für T-Zell-Epitope definiert werden. Des Weiteren spiegelt das MHC-Ligandom das Proteom wider, das sich je nach Subtyp und Stadium der Krankheit unterscheiden kann. So war es möglich Proteine zu identifizieren, welche für die verschiedenen Merkmale der Multiplen Sklerose charakteristisch sind. GFAP, Tubulin und Actin sind Biomarker für Neurodegeneration, Annexin, der Bcl-2-assoziierte Transkriptionsfaktor 1 und Survivin Proteine, die mit der Apoptose in Zusammenhang stehen und das Mikrotubuli-assoziierte Protein 1B ein Marker für die aktive Remyelinisierung von Oligodendrozyten. Deshalb wird es vermutlich möglich zu sein, auf der Basis dieser Daten krankheitsrelevante Informationen zu gewinnen, indem man die B- und T-Zell-Antworten auf Peptide der Proteine, die während der Entwicklung der Multiplen Sklerose auftreten, beobachtet. Mit Hilfe dieser Daten könnte es möglich sein, die Autoantigene, die für das Fortschreiten der Krankheit verantwortlich sind, besser zu definieren. Außerdem könnten auf diese Weise unter Umständen neue Biomarker für die Multiple Sklerose bestimmt werden.

Die eluierten Peptide sind in Bezug auf das ‚*antigen spreading*‘ hochinteressant, das in die Chronizität von Autoimmunerkrankungen involviert ist. Es wäre eine Herausforderung zu überprüfen, in welcher Reihenfolge beziehungsweise in welcher Rangfolge die Peptide entstehen und wie sie sich während des Krankheitserlaufs zu T-Zell-Epitopen entwickeln,

doch würde es zum Verständnis der Krankheit beitragen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass das Hervorrufen einer Toleranz gegenüber Autoantigenen, die auf MHC-Molekülen präsentiert werden einen großen therapeutischen Effekt hat⁴⁰², weshalb die in dieser Studie identifizierten Peptidsequenzen auch für die Entwicklung von Tolerogenen, also von Antigenen, die Immuntoleranz in einem Organismus erzeugen können, von großem Interesse sein dürften.

Kapitel 3

Ergebnisse und Diskussion

~ Teil 3 ~

Massenspektrometrische Identifizierung von
HLA-Liganden aus dem tumorassoziierten
Antigen Survivin

3.3.1 Hintergrund und Überblick über den Versuch

Survivin ist ein Apoptose-hemmendes Protein, das in gesundem Gewebe vor allem während der Entwicklung und von noch nicht ausdifferenzierten Zellen exprimiert wird. Es spielt dort vor allem im Fortschreiten des Zellzyklus und bei der Regelung der Apoptose eine wichtige Rolle. Im adulten Körper ist Survivin im normalen Gewebe nicht mehr vorhanden und wird nur noch in Malignomen exprimiert⁴⁰³, weshalb es schon kurz nach seiner Entdeckung als potenzieller Biomarker für die Diagnostik und Prognose von Krebserkrankungen sowie als mögliches Ziel in der Krebstherapie vorgeschlagen wurde^{404,405}. Inzwischen gibt es Studien, die sich die hohe Survivin-Konzentration in Tumorzellen zu therapeutischen Zwecken zu Nutze machen^{406,407}. Dabei werden verschiedene Ansätze verfolgt, um den Tumor im Körper zu eliminieren: (1) Inhibition der Survivin-Expression; (2) Suppression der Survivin-Funktion durch Verwendung von dominant negativen Mutanten, pharmazeutischen Inhibitoren oder Survivin-*peptidomimetic*; (3) Nutzung des Survivin-Promotors, um zytotoxische Gene spezifisch in Tumoren exprimieren zu lassen; (4) Etablierung einer Immuntherapie gegen Survivin.

Eine Immuntherapie gegen Survivin könnte beispielsweise durch die Verwendung einer Peptid-basierten Vakzine erfolgen⁴⁰⁸, indem gegen bestimmte Liganden aus Survivin eine T-Zell-Antwort induziert wird. Aus diesem Grund sollen in diesem Projekt verschiedene Zelllinien und Xenotransplantate auf ihre HLA-Expression und im Speziellen auf die Präsentation bestimmter vorhergesagter und bereits bekannter MHC-Liganden aus Survivin überprüft werden. Um dies zu bewerkstelligen wird eine Kombination aus der *predict-calibrate-detect*-Methode und der differentiellen Isotopenmarkierung von Peptiden sowie die massenspektrometrische Peptidanalyse verwendet, um potentielle neue Epitope, die auf den Zelloberflächen präsentiert werden zu identifizieren (**Abb. 3.19**).

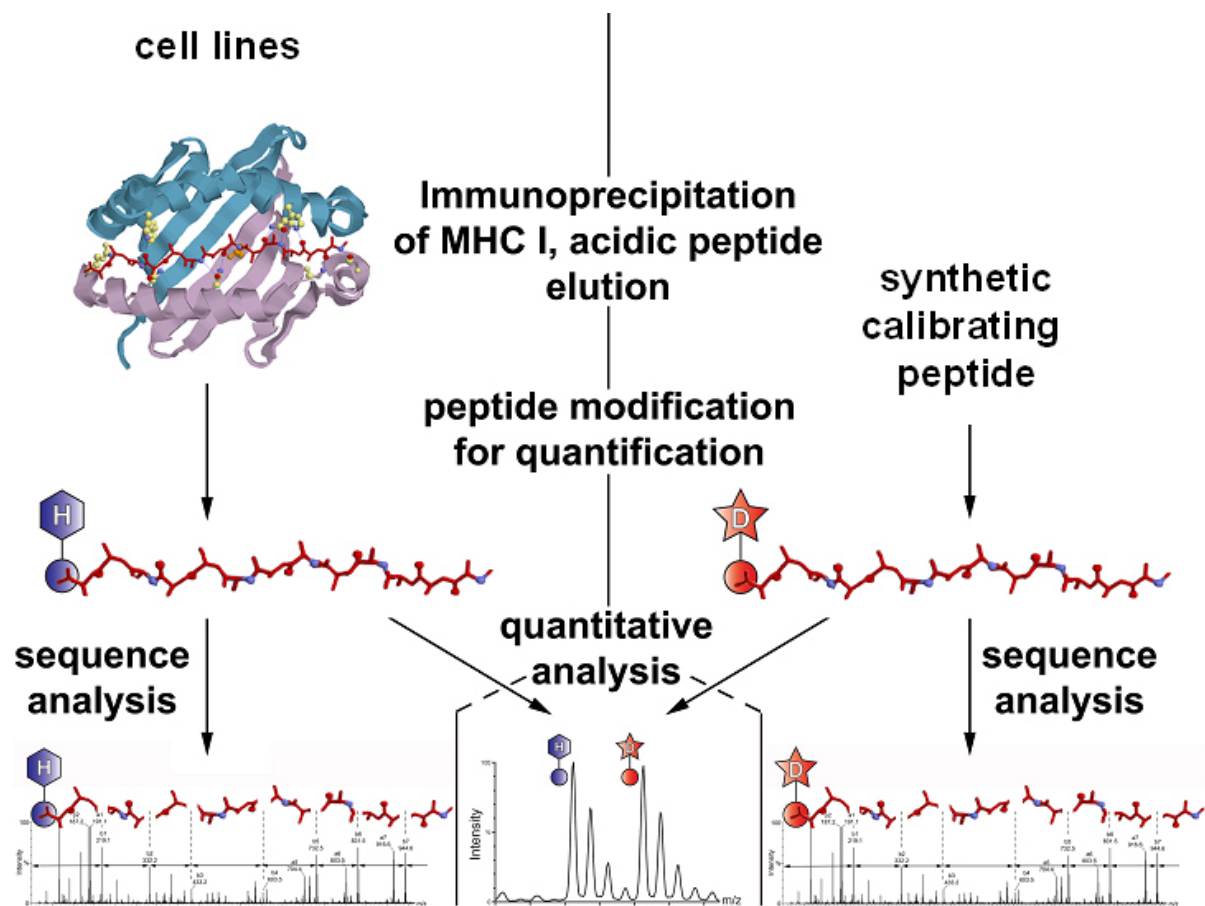


Abb. 3.19: Versuchsaufbau zur Identifizierung von HLA-Liganden aus Survivin. MHC-Peptid-Komplexe werden aus den Zelllinien immunpräzipitiert und die isolierten Liganden mit NIC, parallel dazu synthetische Kalibrierungspeptide mit dNIC modifiziert. Durch das Versetzen der Probe mit den synthetischen Peptiden können in einem LC-MS-Übersichtsscan Signalpaare von natürlichen Liganden und synthetischen Peptiden gefunden werden; eine Identifizierung der Peptidsequenz sowie die Verifizierung des Survivin-Liganden erfolgt über den Vergleich von Fragmentspektren.

3.3.2 Auswahl der HLA-Liganden

Für die Untersuchungen verschiedener Zelllinien und Xenotransplantaten auf die Präsentation von HLA-Liganden aus Survivin wurde eine Liste von größtenteils publizierten Survivin-Peptiden zusammengestellt, die als mögliche Kandidaten für Impfpeptide gelten (**Tab. 3.8**). Bei vier dieser Peptide wurden einzelne Aminosäuren ausgetauscht, um die Bindungseigenschaften auf das entsprechende HLA-Molekül zu optimieren beziehungsweise um eine verbesserte T-Zell-Antwort zu induzieren. In diesen Fällen wurde auch nach dem entsprechenden natürlichen Liganden aus dem Antigen gesucht.

Tab. 3.8: Peptidkandidaten für HLA-Liganden aus Survivin: Auflistung der Peptide unter Zuordnung zu dem entsprechenden MHC-Allotyp. Ausgetauschte Aminosäuren in den Peptiden sind fett hervorgehoben.

HLA	Sequenz	Position	Aminosäure-austausch	Referenz
HLA-A*01	FTE LT LGEF		(2): E → T	Reker et al., 2004 ⁴⁰⁹
	FE EL TLGEF	93-101		
HLA-A*02	L ML GEFLKL		(2): T → M	Andersen et al., 2001a ⁴¹⁰
	L TL GEFLKL	96-104		Andersen et al., 2001 ⁴¹¹
	E LT LGEFLKL	95-104		Schmitz et al., 2000 ⁴¹²
	TL PP AWQPFL	5-14		Schmitz et al., 2000 ⁴¹²
HLA-A*03	R IST FKNW PK		(10): F → K	Reker et al., 2004 ⁴⁰⁹
	R IST FKNW PF	18-27		
HLA-A*11	D LA QCFFCFK	53-62		Reker et al., 2004 ⁴⁰⁹
HLA-A*24	S T FKNW PFL	20-28		Andersen et al., 2006 ⁴¹³
HLA-B*07	L PP AWQPFL	6-14		Reker et al., 2004a ⁴¹⁴
HLA-B*35	E P DLAQCF Y		(9): F → Y	Reker et al., 2004a ⁴¹⁴
	E P DLAQCF F	51-59		Reker et al., 2004a ⁴¹⁴

3.3.3 Suche nach HLA-Liganden aus Survivin in vorhandenen LC-MS/MS-Daten

In einem ersten Schritt wurden bereits vorhandene LC-MS/MS-Daten auf HLA-Liganden, die aus Survivin stammen, untersucht. Dazu wurde zunächst eine Datenbank auf dem Mascot-Server angelegt, welche die 13 Aminosäuresequenzen der Peptidkandidaten enthält und gegen welche die Suchen durchgeführt werden. Die Rohdaten der MS-Läufe wurden in pkl-Dateien prozessiert, die für die Suche verwendet werden. Eine Auflistung der überprüften Zelllinien befindet sich in **Tabelle 3.9**.

Bei der automatisierten Auswertung der LC-MS/MS-Läufe lieferte ein Fragmentspektrum eines Peptids, das auf HeLa-Zellen präsentiert wurde, welches trotz seiner geringen Signalintensität positiv als das Peptid ELTLGEFLKL aus Survivin identifiziert werden konnte (**Abb. 3.20**).

Tab. 3.9: Datenbankabfrage. Auflistung aller auf HLA-Liganden aus Survivin überprüften Zelllinien mit Anzahl der durchsuchten LC-MS/MS-Läufe und abgeglichenen Fragmentspektren.

Zelllinie	LC-MS/MS-Läufe	Fragment-spektren	Passende Peptidsequenz	Signifikante Treffer	HLA-Klasse-I-Typisierung
AML01	1	580	FTELTGGEF	0	A*01,A*32,B*08,B*14,C*07,C*08
			FEELTLGEF	0	
AML03	3	2150	RISTFKNWPK	0	A*03, A*32, B*35, C*04
			RISTFKNWPF	0	
BM15	8	6008	FTELTGGEF	0	A*01:01, B*49:01, C*07:01
			FEELTLGEF	0	
CML-85	3	2444	DLAQCFFCFK	0	A*02:01, A*11:01, B*15:01, B*27
EOL-1	4	4513	STFKNWPFL	0	A*24, A*29, B*35, B*44:03, C*04, C*16
HeLa	1	653	LMLGEFLKL	0	A*33, A*68:02, B*14, B*44
			LTLGEFLKL	0	
			ELTLGEFLKL	1	
			TLPPAWQPFL	0	
			LPPAWQPFL	0	
JY	8	4177	LMLGEFLKL	0	A*02:01; B*07:02; C*07:02
			LTLGEFLKL	0	
			ELTLGEFLKL	0	
			TLPPAWQPFL	0	
			LPPAWQPFL	0	
MEG-01	1	981	STFKNWPFL	0	A*24, B*52, B*54, C*01, C*12
MV4-11	1	630	RISTFKNWPK	0	A*03, A*68, B*14, B*18, C*15
			RISTFKNWPF	0	
RCC68_ZL	6	948	LMLGEFLKL	0	A*02:01, A*29, B*15:01, B*45:01
			LTLGEFLKL	0	
			ELTLGEFLKL	0	
			TLPPAWQPFL	0	
Total	36	23084		1	

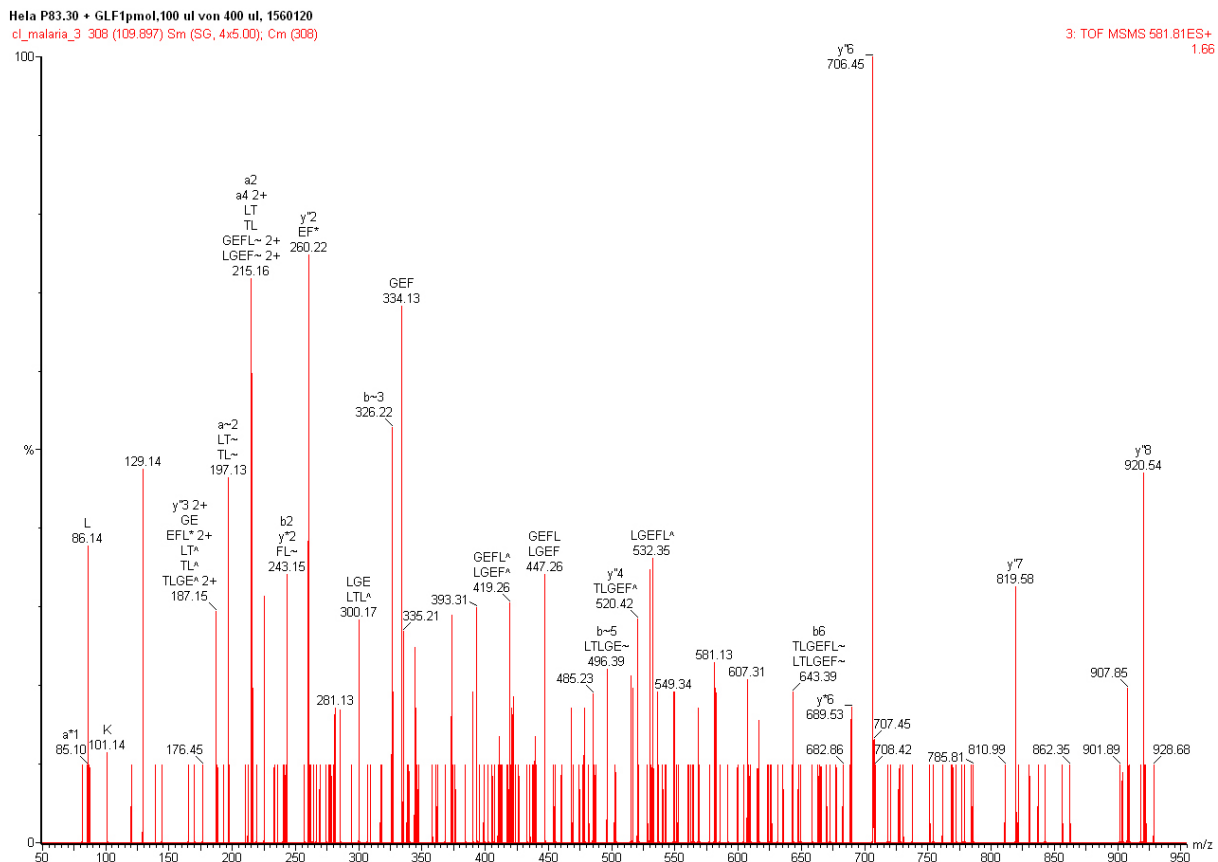


Abb. 3.20: Fragmentspektrum von ELTLGGEFLKL aus HeLa-Zellen: Trotz der geringen Signalintensität kann das Fragmentspektrum aufgrund der prominenten y-Serie dem Survivin-Peptid ELTLGGEFLKL zugeordnet werden.

3.3.4 Modifizierung der synthetischen Peptide

Die synthetisierten Peptide wurden mit einer Konzentration von 1 nmol/ μ l in H₂O/DMSO gelöst und jeweils 10 nmol jedes einzelnen Peptids für die Modifizierung vereint. Diese Peptidmischung wurde nach Protokoll guanidiert und mit der schweren Form des Nicotinsäure-Succinimids (dNIC) modifiziert. Bei einer LC-MS-Messung dieser Peptidmischung konnten allerdings lediglich acht der 13 synthetischen Peptide detektiert werden. Auch bei einer direkten Messung der Peptidmischung über die Spritzenpumpe des Massenspektrometers konnten nicht alle modifizierten synthetischen Peptide gefunden werden. (**Tab. 3.10**).

Tab. 3.10: Ergebnis der Modifizierung der Peptidmischung. Bei einer Modifizierung aller Peptide in einem Schritt waren nach der HPLC-Auftrennung nur acht der 13 Peptide im Massenspektrometer detektierbar.

Sequenz	m/z (dNIC)	Ladungszustand	Spritzenpumpe	HPLC-Retentionszeit
FTELTGGEF	583,29	2	nicht detektierbar	nicht detektierbar
FEELTLGEF	597,29	2	nicht detektierbar	nicht detektierbar
LMLGEFLKL	607,85	2	detektierbar	81,56 min
LTLGEFLKL	592,85	2	detektierbar	76,01 min
ELTLGEFLKL	657,37	2	detektierbar	73,72 min
TLPPAWQPFL	639,84	2	detektierbar	79,91 min
RISTFKNWPK	735,41	2	detektierbar	31,80 min
RISTFKNWPF	723,88	2	detektierbar	54,74 min
DLAQCFCFK	686,81	2	nicht detektierbar	69,68 min
STFKNWPF	645,83	2	detektierbar	65,35 min
LPPAWQPFL	589,32	2	nicht detektierbar	nicht detektierbar
EPDLAQCFY	597,76	2	nicht detektierbar	nicht detektierbar
EPDLAQCF	589,76	2	nicht detektierbar	nicht detektierbar

Deshalb wurden in einem zweiten Ansatz jeweils 10 nmol der Peptide gelöst und separat mit dNIC modifiziert. Um zu überprüfen, ob die Modifizierung funktioniert hat, wurden die Peptide auf eine Konzentration von 1 pmol/ μ l verdünnt und einzeln über direkte Infusion am Massenspektrometer gemessen. Nachdem sichergestellt wurde, dass jedes der 13 Peptide detektierbar war, wurden die Signalintensitäten der Peptide miteinander verglichen, indem jeweils 15 Scans einer Messung aufsummiert wurden, was bei einer Flussrate von 4 μ l/min und einem Scanintervall von 1 Scan/sek 1 pmol Peptid entspricht.

Anhand der ermittelten Peptidintensitäten wird ein Peptidmix angesetzt, in dem jedes Peptid anteilig so enthalten ist, dass es mit gleicher Intensität im Übersichtslauf der LC-MS-Messung zu sehen sind (**Tab. 3.11**). Für die LC-MS-Messung über die HPLC wurde die Intensität des Peptids LTLGEFLKL als Bezugswert gewählt, da dieses mit der höchsten Intensität bei der Messung über die Spritzenpumpe zu sehen ist. Als Grundlage für den neuen Peptidmix wurde 1 pmol des Peptids eingesetzt, alle anderen Peptide entsprechend ihrer gemessenen Intensität in anteilig höherer Konzentration. Über die LC-MS-Messung wird die Retentionszeit der Peptide ermittelt; in einer zweiten LC-MS/MS-Messung werden die Fragmentspektren der Peptide aufgenommen.

Tab. 3.11: Ergebnis der Modifizierung der einzelnen Peptide. Nach separater Modifizierung konnte jedes der synthetischen Peptide über die Spritzenpumpe und bei der LC-MS-Messung detektiert werden.

Sequenz	m/z (dNIC)	Ladungszustand	Intensität über Spritzenpumpe	HPLC-Retentionszeit
FTELTGGEF	583,29	2	$1,21 \cdot 10^4$	82,67 min
FEELTLGGEF	597,29	2	$8,82 \cdot 10^3$	83,36 min
LMLGGEFLKL	607,85	2	$7,71 \cdot 10^4$	82,31 min
LTLGGEFLKL	592,85	2	$1,17 \cdot 10^5$	75,97 min
ELTLGGEFLKL	657,37	2	$9,50 \cdot 10^4$	73,62 min
TLPPAWQPFL	639,84	2	$5,82 \cdot 10^4$	79,11 min
RISTFKNWPK	735,41	2	$2,42 \cdot 10^4$	30,95 min
RISTFKNWPF	723,88	2	$3,38 \cdot 10^4$	51,21 min
DLAQCFCK	685,81 ^{*)}	2	$2,86 \cdot 10^3$	69,42 min
STFKNWPFL	645,83	2	$8,86 \cdot 10^3$	64,78 min
LPPAWQPFL	612,26 ^{*)}	2	$6,75 \cdot 10^3$	85,99 min
EPDLAQCFY	621,41 ^{*)}	2	$6,77 \cdot 10^4$	75,01 min
EPDLAQCF	589,76	2	$4,49 \cdot 10^4$	85,99 min

^{*)} Gemessene Masse durch Reaktion der Mercaptogruppe an Cysteinen während der Peptidmodifizierung.

3.3.5 Analyse der Zelllinien

Für die Detektion der Survivin-Liganden wurden zwei Zelllinien ausgewählt: Zum einen wurde die humane Nierenzellkarzinomzelllinie RCC68_ZL ausgewählt, von der bekannt ist, dass sie Survivin exprimiert. Als zweite Zelllinie wurde A498 ausgewählt, bei der es sich ebenfalls um eine humane Nierenzellkarzinomzelllinie handelt.

Für beide Zelllinien sind die HLA-Typisierungen bekannt und lauten für RCC68_ZL: A*02:01, A*29, B*15:01, B*45:01 und für A498: A*02:01, A*24, B*08. Somit kann die Suche der Survivin-Peptide, die in den LC-MS/MS-Läufen auftauchen können, auf diejenigen Liganden eingeschränkt werden, die auch auf das entsprechende HLA-Molekül passen (**vgl. Tab. 3.8**). Um einen Vergleich zwischen natürlichen HLA-Liganden und synthetischen Peptiden ziehen und diese voneinander unterscheiden zu können, wurden die auf den Zelllinien natürlich präsentierten MHC-Peptide mit der leichten Form des Nicotinsäure-Succinimids (NIC) modifiziert. Die Verifizierung eines natürlich präsentierten Survivin-Liganden erfolgt über das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis, die Retentionszeit der eluierenden Peptide und über den Abgleich des Fragmentspektrums. Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analysen sind in **Tabelle 3.12** dargestellt:

Tab. 3.12: Zelllinien-Analyse: Auflistung der möglichen Survivin-Liganden aus RCC68_ZL und A498. Bei der Auswertung der MS-Daten konnte das Peptid ELTLGEFLKL auf RCC68_ZL identifiziert werden, das Peptid STFKNWPFL war auch in der Probe der natürlichen Liganden von A498 mit m/z und Retentionszeit detektierbar, jedoch liegt kein Fragmentspektrum zum Vergleich vor.

HLA	Sequenz	m/z (NIC/dNIC)	RT* [min] (NIC/dNIC)	Anmerkungen
RCC68_ZL				
HLA-A*02	LMLGEFLKL	605,85 / 607,85	--- / 80,91	Fragmentspektren identisch
	LTLGEFLKL	590,85 / 592,85	--- / 75,71	
	ELTLGEFLKL	655,37 / 657,37	73,33 / 73,13	
	TLPPAWQPFL	637,84 / 639,84	--- / 71,27	
A498				
HLA-A*02	LMLGEFLKL	605,85 / 607,85	--- / 81,48	
	LTLGEFLKL	590,85 / 592,85	--- / 76,01	
	ELTLGEFLKL	655,37 / 657,37	--- / 72,93	
	TLPPAWQPFL	637,84 / 639,84	--- / 78,61	
HLA-A*24	STFKNWPFL	643,83 / 645,83	64,29 / 64,12	Kein Fragmentspektrum im LC-MS/MS-Lauf von A498

^{*)} Dieser Versuch wurde unter einem anderen HPLC-Setup durchgeführt, bei dem der 30-minütige Ladeprozess der Peptide auf die Vorsäule mit in den MS-Daten aufgenommen wurde. Diese Zeitspanne wurde zur Ermittlung der korrekten Elutionszeiten wieder abgezogen.

Die Auswertung der LC-MS-Daten zu RCC68_ZL ergab eine Übereinstimmung eines Peptids, das zur selben Zeit wie das synthetische ELTLGEFLKL eluiert und das gleiche m/z-Verhältnis besitzt (**Abb. 3.21A,B**). Der Vergleich zwischen dem Fragmentspektrum des synthetischen Peptids mit dem des natürlich prozessierten Liganden zeigt, dass es sich dabei um das selbe Peptid handelt (**Abb. 3.21C**), so dass das natürliche Survivin-Peptid ELTLGEFLKL als positiv auf RCC68_ZL nachgewiesen werden konnte. Weitere Übereinstimmungen von m/z-Verhältnis und Retentionszeit bei anderen HLA-A*02-Liganden wurden in dieser Probe nicht gefunden.

Eine Analyse der LC-MS-Daten von A498 ergab keinerlei Treffer bei den HLA-A*02-restringierten Peptiden. Bei dem HLA-A*24-restringierten Peptid STFKNWPFL gab es im Übersichtsscan des LC-MS-Laufes eine Übereinstimmung mit einem unbekanntem Peptid gleichen m/z-Verhältnisses, das zur selben Retentionszeit wie das synthetische Kalibrierungspeptid von der Säule eluiert. Da das Peptid jedoch nicht zur Fragmentierung ausgewählt wurde und somit kein Fragmentspektrum des natürlichen Liganden zu Vergleichszwecken vorliegt, kann die Peptidsequenz und somit das Protein, aus dem das Peptid stammt nicht bestätigt werden.

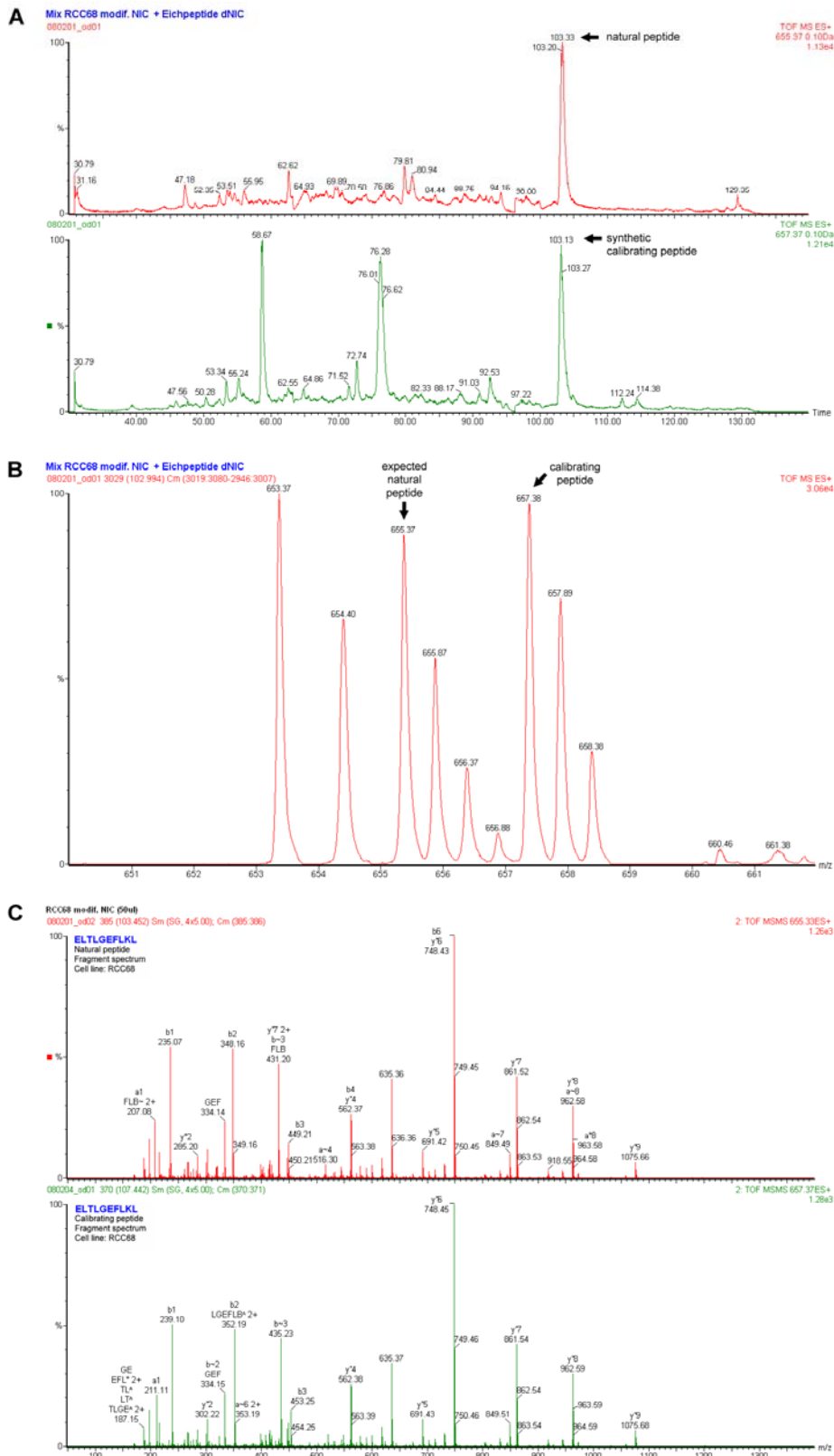


Abb. 3.21: Detektion von ETLTGEFLKL. A: Massenchromatogramm von synthetischem (grün) und natürlichem Peptid (rot). B: Übersichtsscan mit den beiden Peptidsignalen. C: Vergleich der Fragmentspektren von synthetischem (grün) und natürlichem Peptid (rot).

3.3.6 Analyse der Xenotransplantate

Bei der Analyse der Xenotransplantate aus K562-A1 und K562-A3 wurde genauso vorgegangen wie bei den Analysen der Zelllinien. Die aus der Immunpräzipitation gewonnenen natürlichen Peptidliganden werden mit NIC modifiziert und die mit dNIC modifizierten synthetischen Kalibrierungspeptide einzeln zugesetzt. Eine Verifizierung eines potentiellen Survivin-Liganden erfolgt wie bei der Analyse der Zelllinien auch zunächst durch einen Abgleich des m/z-Verhältnisses mit den Retentionszeiten, mit denen die Peptide von der Vorsäule eluieren. Die endgültige Bestätigung findet ebenfalls erst mit dem Vergleich des synthetischen Fragmentspektrums mit dem des natürlichen Liganden statt. Wie auch schon bei den Zelllinien wird auch bei den Xenotransplantaten gezielt nach den Survivin-Kandidatenpeptiden gesucht, die auch auf das HLA-Molekül passen. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in **Tabelle 3.13** aufgelistet.

Tab. 3.13: Xenotransplantat-Analyse. In K562-A1 wurde keine Übereinstimmung von natürlichen Liganden mit den beiden vorhergesagten Peptiden aus Survivin, die auf HLA-A*01 präsentiert werden können, gefunden. Bei K562-A3 gab es für beide Peptide, die ein Bindungsmotiv für HLA-A*03 besitzen, Signalpaare im Übersichtsscan. Der Abgleich mit den Fragmentspektren zeigt, dass das Peptid RISTFKNWPF als natürlicher Ligand präsentiert wird.

HLA	Sequenz	m/z (NIC/dNIC)	RT [min] (NIC/dNIC)	Anmerkungen
K562-A1				
HLA-A*01:01	FTELTGGEF	581,29 / 583,29	--- / 79,40	
	FEELTLGGEF	595,29 / 527,29	--- / 75,41	
K562-A3				
HLA-A*03:01	RISTFKNWPK	489,26 / 490,60	29,89 / 29,79	Fragmentspektren nicht identisch
	RISTFKNWPF	721,88 / 723,88	49,27 / 49,27	Fragmentspektren identisch

Die Auswertung der K562-A1-Probe brachte keine positiven Ergebnisse, da im Übersichtsscan des LC-MS-Laufs keine Signalpaare der Peptide zu finden waren. Im Gegensatz dazu waren in der Probe K562-A3 gleich beide Peptide in der LC-MS-Messung als Signalpaare detektierbar. Durch einen letzten Abgleich der Fragmentspektren konnte festgestellt werden, dass die Spektren der m/z-Verhältnisse 489.26 und 490.60 nicht übereinstimmen, obwohl der Massenunterschied aufgrund des dreifachen Ladungszustandes

der Peptide bei 4,02 Da liegt. Dennoch handelt es sich hierbei um zwei verschiedene Peptide (**Abb. 3.22A**). Die beiden Fragmentspektren des Peptidpaares mit $m/z = 721.88$ und $m/z = 723.88$ sehen allerdings sehr ähnlich aus, weshalb man sagen kann, dass das Peptid RISTFKNWPF auf dem Xenotransplantat präsentiert wurde (**Abb. 3.22B**). Zur absoluten Gewissheit benötigt man jedoch ein Fragmentspektrum mit höherer Intensität aus der natürlichen Probe.

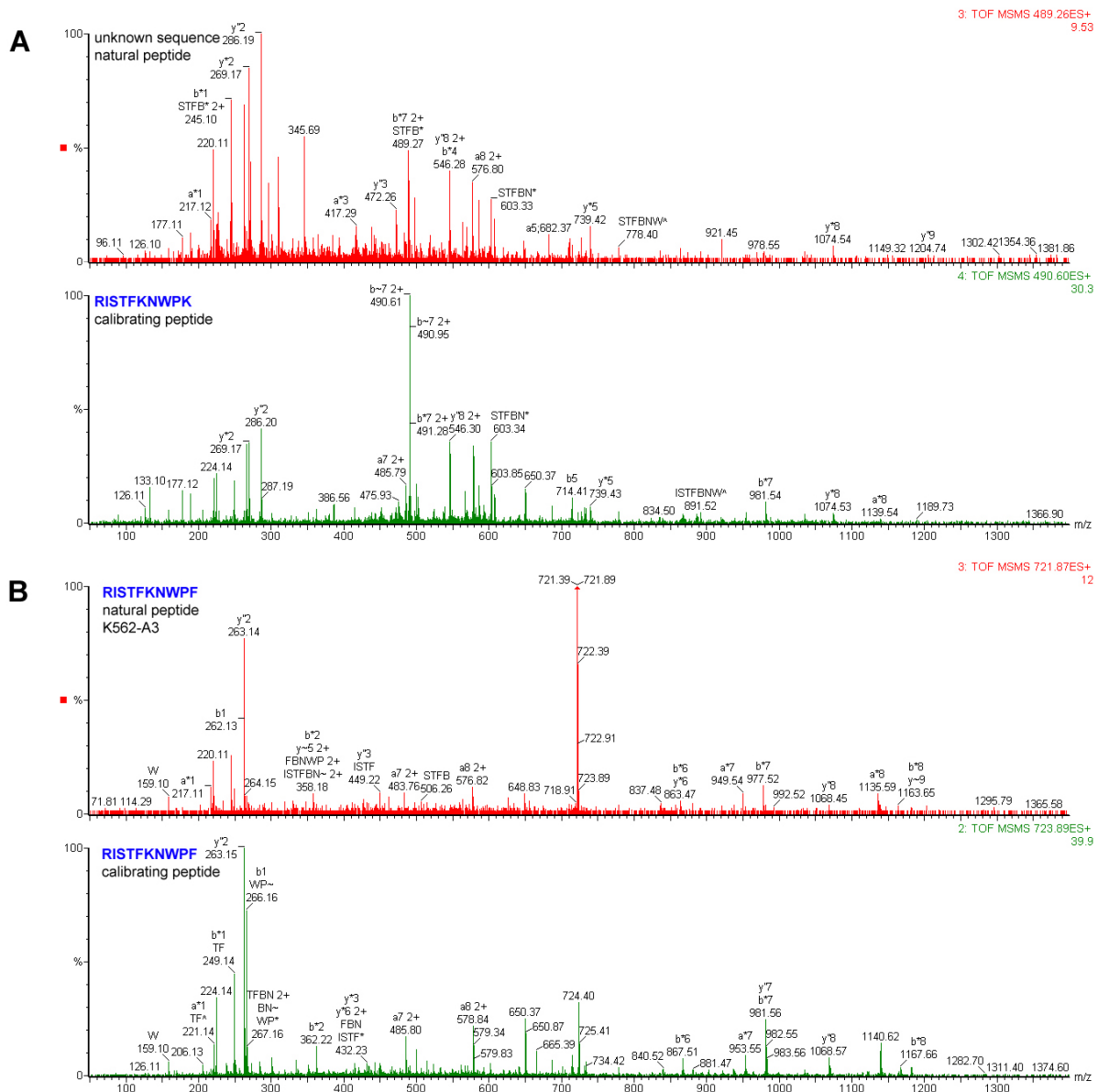


Abb. 3.22: Fragmentspektrenabgleich der Peptide aus K562-A3. **A:** Ein Vergleich der beiden Fragmentspektren zeigt, dass es sich um zwei unterschiedliche Peptide handelt. **B:** Die Fragmentspektren zeigen ein ähnliches Verteilungsmuster der Ionen und recht hohe Übereinstimmungen in den Ionenserien, weshalb es sich um die selben Peptide handelt.

3.3.7 Diskussion

Von Survivin ist bekannt, dass es ein tumorassoziiertes Antigen ist^{403,415}, was es zu einem interessanten Kandidaten für die Entwicklung einer Vakzine gegen Krebs macht. Die verschiedenen Herangehensweisen an diese Aufgabe sind breit gestreut. So gibt es Studien, die DNA⁴¹⁶⁻⁴¹⁸ oder RNA⁴¹⁹ als Impfstoff verwenden, um eine Immunreaktion hervorzurufen. Der Ansatz, der in diesem Versuch verfolgt wird ist der, T-Zellen über Peptide, die auf MHC-Molekülen präsentiert werden zu aktivieren, um eine Immunantwort gegen das tumoröse Gewebe hervorzurufen. So wurde bereits gezeigt, dass CD8⁺ T-Lymphozyten über dendritische Zellen aktiviert werden können, die zuvor mit dem rekombinanten Survivin-Protein oder mit Peptiden aus Survivin stimuliert wurden⁴¹². Auch die Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen⁴²⁰ oder die kombinierte Stimulation beider T-Zell-Populationen⁴²¹ wurden bereits in verschiedenen Studien erprobt. Inzwischen gibt es bereits eine Phase I klinische Studie, in der das Peptid Survivin-2B₍₈₀₋₈₈₎ mit der Sequenz AYACNTSTL als Impfpепtid zur Behandlung von Patienten mit Brustkrebs im fortgeschrittenen Stadium eingesetzt wird⁴²².

Viele der Peptide, die als mögliche Kandidaten für eine Peptidvakzine gehandelt werden, wurden von Vorhersageprogrammen für HLA-Liganden ermittelt. Obwohl *in vitro* überprüft werden kann, ob CD8⁺ T-Zellen dazu in der Lage sind, das Peptid zu erkennen und entsprechend aktiviert werden können, tritt die Lyse von Tumorgewebe nur dann ein, wenn das entsprechenden Peptid auch auf den Tumorzellen präsentiert wird. Deshalb ist es von Vorteil, eine Methode zu entwickeln, mit der zuverlässig festgestellt werden kann, ob das der Fall ist.

In diesem Zusammenhang entsteht durch die Kombination der ‚*predict-calibrate-detect*‘-Methode zusammen mit der differentiellen Isotopenmarkierung von Peptiden Methode, mit der man zuverlässig und sicher HLA-Liganden aus jedem beliebigen Protein, beispielsweise dem tumorassoziierten Survivin, identifizieren kann. Die Vorteile dieser Methode liegt in der hohen Genauigkeit, mit der ein HLA-Ligand und ein synthetisches Peptid verglichen werden können, da für den Abgleich nicht nur die Retentionszeit und das m/z-Verhältnis der Peptide, sondern auch die Fragmentspektren der beiden Peptide zur Verfügung stehen.

Allerdings ist die Methode noch einigen Einschränkungen unterworfen: Als Grundlage für die Analysen benötigt man die Aminosäuresequenz des Proteins von Interesse, aus dem nach Peptiden gesucht werden soll. Mögliche Kandidaten für MHC-Liganden können über eine Vielzahl von Computerprogrammen wie beispielsweise SYFPEITHI vorhergesagt werden.

Voraussetzung dafür ist allerdings, dass man sich bei der Peptidvorhersage auf ein bestimmtes HLA-Allel oder wenige bestimmte Allele festlegt, da MHC-Moleküle einen hohen Polymorphismus aufweisen und jeder MHC-Haplotyp ein unterschiedliches Bindungsmotiv für Peptide besitzt. Sinnvoll ist dabei, Allele zu wählen, die in der Bevölkerung häufig verbreitet sind, wie HLA-A*02, HLA-A*24 oder HLA-B*35. Das bedeutet gleichzeitig, dass für die Untersuchungen lediglich Zelllinien oder Gewebeproben verwendet werden können, bei denen die MHC-Typisierung bekannt ist. Zelllinien stellen in diesem Zusammenhang das geringere Problem dar, da in vielen immunologischen Laboren mit etablierten Linien gearbeitet wird, die HLA-typisiert sind. Problematischer sieht es da mit dem Patientenmaterial in Form von beispielsweise Tumorgewebe aus, bei dem die HLA-Typisierung oftmals unbekannt ist, das für die Ergebnisse allerdings wichtiger ist, da es näher am eigentlichen Organismus ist. Für die Entwicklung eines Impfstoffes auf Peptidbasis bedeutet das, dass man bestenfalls eine Vakzine entwickeln kann, die einen Teil der Bevölkerung abdeckt, da man aufgrund des hohen HLA-Polymorphismus keinen Peptidcocktail zusammenstellen kann, der als Universalimpfstoff verwendet werden kann. In diesem Versuch wurde nur das Ligandom von Zelllinien beziehungsweise von aus Zelllinien gewachsenen Xenotransplantaten auf Survivin-Peptide untersucht, um generell festzustellen, ob diese überhaupt auf MHC-Molekülen präsentiert werden. Erst die Analyse von Primärgewebe kann jedoch Aufschluss darüber geben, ob die gefundenen Liganden auch für einen Impfstoff in Frage kämen.

Ein weiteres Problem der Methode stellt die Auswahl der vorhergesagten Peptide dar. Abhängig von der Größe des Proteins können unter Umständen sehr viele Kandidaten für MHC-Liganden bei der Vorhersage auftreten. Die Methode der Verifizierung wie sie hier vorgestellt wurde ist jedoch sehr aufwändig, da jedes Peptid, das untersucht werden soll einzeln synthetisiert, modifiziert und am Massenspektrometer gemessen werden muss. Das bedeutet, dass man sich bei der Suche nach den Liganden auf maximal 20 beschränken muss, da sowohl die Synthese und Modifizierung der Peptide, als auch das Zusammenstellen der Peptidmischung, bei dem jedes der Eichpeptide in unterschiedlicher Konzentration vorkommt, viel zu zeitaufwändig wäre.

Für die N-termiale Modifizierung der Peptide empfiehlt es sich, die schwere Form der Isotopenmarkierung zu verwenden (dNIC), da es im Übersichtsspektrum rechts von dem Massesignal des natürlichen Peptids erscheint und somit nicht die Gefahr besteht, dass die Isotopenpeaks des synthetischen Peptids das Signal des natürlichen Peptids überdecken, falls das synthetische Peptid in zu hoher Konzentration eingesetzt wurde. Aus diesem Grund ist es auch notwendig, die modifizierten Peptide vor den Messungen über die HPLC einzeln in

definierter Konzentration zu messen, um ihre Intensität zu ermitteln. Davon ausgehend wird die Peptidmischung den Intensitäten entsprechend zusammengestellt und in einem LC-MS/MS-Lauf gemessen, um die Retentionszeiten und Fragmentspektren der modifizierten synthetischen Peptide zu ermitteln. Auch die Peptidintensitäten werden dabei nochmals kontrolliert und die Konzentration einzelner Kalibrierungspeptide angeglichen werden.

Bei der Modifizierung der Peptide kann es zu Problemen kommen, sobald die Aminosäuresequenz eines Peptids Cysteine enthält. Die Mercaptogruppe in der Seitenkette ist hochreaktiv, weshalb es zu ungewollten chemischen Nebenreaktionen während des Modifizierungsprozesses kommt. Generell haben gelöste Peptide mit Cysteinen die Tendenz zu dimerisieren. Da dies jedoch erst nach einer gewissen Zeit passiert, kann dieser Effekt einfach umgangen werden, indem die lyophilisierten Peptide erst kurz vor der Modifikation im Lösungsmittel aufgenommen werden. Während der Isotopenmarkierung treten zwei chemische Reaktionen auf: Falls das Peptid nur ein Cystein enthält, wie bei diesem Versuch bei den Peptiden EPDLAQCFE und EPDLAQCFY der Fall ist, so kann man nach der Modifizierung einen unbekanntem Massenzuwachs von 47 Da beobachten. Möglich wäre eine mehrfache Oxidation des Schwefels, wobei das einen Massezuwachs von 48 Da zur Folge hätte. Eventuell verliert diese Gruppe noch ein H-Atom, jedoch würde das zu einem freien Sauerstoffradikal am Aminosäurerest führen, das wiederum hochreaktiv ist. Enthält ein Peptid zwei Cysteine wie bei DLAQCFFCFK, dann bildet sich eine Disulfidbrücke zwischen den beiden Aminosäureresten, weshalb das Peptid durch den Verlust von zwei H-Atomen zwei Dalton leichter ist.

Für die Durchführung dieses Versuchs wurden 13 Peptidkandidaten ausgewählt, bei denen überprüft werden soll, ob sie auch als natürlich prozessierte Peptide auf MHC-Molekülen präsentiert werden. Dabei handelt es sich um bereits publizierte Peptidsequenzen, von denen bekannt ist, dass sie CD8⁺ T-Zellen aktivieren können, was in ELISPOT-Assays^{409-411,413,414} beziehungsweise mit einem *chromium-release-assay*^{412,414} nachgewiesen wurde. Unter den 13 Peptiden aus Survivin befinden sich vier bei denen ein Aminosäureaustausch durchgeführt wurde, damit die Peptide ein besseres Bindungsmotiv für bestimmte MHC-Moleküle aufweisen. In einer früheren Studie wurde bereits gezeigt, dass die Vakzinierung mit einem modifizierten Peptid zu einer Erhöhung von Lymphozytenvorläuferzellen in einem Großteil der Patienten kommt, doch konnte kein positiver Effekt bei der Immunantwort gegen den Tumor beobachtet werden⁴²³. Die Gründe hierfür sind nicht bekannt, denkbar wäre allerdings, dass das native Peptid entweder nicht als natürlicher HLA-Ligand auf den Tumoren

präsentiert wurde, oder aber dass die T-Zellen die natürliche Form des Peptids nicht erkannt haben. Wäre letzteres der Fall, so müsste man zunächst überprüfen, ob CTLs, die mit der modifizierten Version eines Peptids stimuliert wurden auch dazu in der Lage sind, die native Form des Peptids zu erkennen, bevor das Peptid als Kandidat für einen Impfstoff in Frage käme. Voraussetzung dafür wäre jedoch, dass das native Peptid auch als HLA-Ligand auf Zellen vorkommt, was zunächst überprüft werden müsste.

Die Suche nach HLA-Liganden aus Survivin wurde an vier verschiedenen Proben durchgeführt. Zum einen wurden die beiden humanen Nierenzellkarzinomzelllinien RCC68_ZL und A498 verwendet und zum anderen zwei aus K562-Transfektanten hergestellte Xenotransplantate, die von dem kooperierenden Pharmaunternehmen in SCID-Mäusen generiert wurden. Im Falle der Nierenzellkarzinomzelllinien ist eine Expression von Survivin möglich, da diese auch schon in anderen RCC-Zelllinien nachgewiesen wurde⁴²⁴. Bei K562 handelt es sich um eine immortalisierte myeloische Leukämie-Zelllinie, die aus einer 53 Jahre alten CML-Patientin isoliert wurde⁴²⁵. Informationen über die Expression von Survivin liegen bei dieser Zelllinie nicht vor. K562 exprimiert von sich aus keine MHC-Moleküle, deshalb ist es möglich, Zellen eines spezifischen HLA-Haplotypen zu generieren, indem man die Zellen mit dem entsprechenden Vektor transfiziert. Die für diesen Versuch verwendeten Zellen sind HLA-A*01:01- beziehungsweise HLA-A*03:01-positiv, weshalb gezielt nach den Peptiden gesucht wird, die auf diesen HLA-Molekülen präsentiert werden können.

Bei der Analyse von RCC68_ZL konnte der HLA-A*02-Ligand ELTLGEFLKL positiv als natürlich präsentiertes Peptid identifiziert werden. Obwohl A498 von gleicher Abstammung wie RCC68_ZL ist und ebenfalls HLA-A*02 exprimiert, konnte das Peptid auf dieser Zelllinie nicht als natürlicher Ligand nachgewiesen werden. Eventuell exprimiert A498 kein Survivin oder aber die Survivin-Expression ist im Vergleich zu RCC68_ZL deutlich geringer. Eine Untersuchung von A498 auf Survivin-Expression könnte Aufschluss darüber geben, ob das Protein überhaupt in der Zelle vorkommt und über einen Vergleich der Genexpressionsdaten mit RCC68_ZL könnte man erfahren, in welchem Verhältnis Survivin falls es exprimiert wird in der Zelle vorkommt.

Bei der Untersuchung der K562-A1-Probe konnten keine Peptidsignalpaare im Übersichtslauf der LC-MS-Messung detektiert werden, was bedeutet, dass die beiden Peptide nicht auf diesem Xenotransplantat als natürliche HLA-Liganden nachweisbar sind. Jedoch waren bei beiden Peptiden, die HLA-A*03-restringiert sind (RISTFKNWPF und RISTFKNWPK) Signalpaare detektierbar. Das ist nicht nur deshalb unerwartet, da nichts über die Survivin-

Expression in K562 bekannt war, sondern vor allem aufgrund der Tatsache, da bei dem Peptid RISTFKNWPK das C-terminale Phenylalanin durch ein Lysin ersetzt wurde. Ein Vergleich der Fragmentspektren zeigte, dass es sich um zwei Peptide mit vollkommen unterschiedlichen Aminosäuresequenzen handelt. Dies unterstreicht die Wichtigkeit des Vergleichs der Fragmentspektren bei der Ligandenidentifizierung: Da man gerade bei der Analyse von MHC-Peptiden tausende unterschiedlicher Peptide in einem sehr engen Massenbereich hat, kann es vorkommen, dass zwei verschiedene Peptide mit gleicher Masse zur selben Retentionszeit von der HPLC eluieren und im Massenspektrometer gemessen werden. Bei dem nativen Peptid mit der Sequenz RISTFKNWPF zeigte der Vergleich der Fragmentspektren deutliche Übereinstimmungen im Verteilungsmuster der Fragmentensignale und in der Annotation der Ionenserien, so dass es sich um den natürlich präsentierten Liganden handelt. Da das Fragmentspektrum nur von geringer Intensität ist, sollte der Versuch mit einer höheren Konzentration von natürlichen Peptiden wiederholt werden. Eventuell würde sich dabei herausstellen, dass sich die Spektren doch voneinander unterscheiden, da neue Signale im Spektrum auftauchen, die vorher aufgrund ihrer geringen Intensität im Hintergrundrauschen nicht sichtbar waren.

In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, natürlich präsentierte HLA-Liganden aus dem tumorassoziierten Protein Survivin auf Zelllinien beziehungsweise Xenotransplantaten nachzuweisen. Für die Entwicklung von Peptidvakzinen könnte das von entscheidendem Vorteil sein, da man diese zukünftig nicht nur anhand von den Daten aus ELISPOT-Assays zusammenstellen kann, sondern auch nach dem Kriterium, ob ein Peptid bereits schon einmal als natürlicher HLA-Ligand identifiziert wurde. Leider kann man nicht davon ausgehen, dass auf jedem Tumor oder jeder Zelllinie, die Survivin exprimieren auch die entsprechenden HLA-Liganden passend zum MHC-Bindungsmotiv präsentiert werden, aber dennoch könnte der Aspekt der nachgewiesenen Präsentation der Peptide eine Verbesserung von Impfstoffen darstellen.

4. Zusammenfassung

Die Massenspektrometrie ist derzeit die geeignetste Methode wenn es darum geht, HLA-Liganden auf ihre Sequenz hin zu charakterisieren. Da die Probenmenge, die für die Experimente normalerweise zur Verfügung steht nur äußerst begrenzt ist, muss das HPLC-MS-System bestmöglich konfiguriert sein, damit bei Analysen von geringen Probenmengen die größtmögliche Anzahl von HLA-Liganden identifiziert werden kann.

Aus diesem Grund beschreibt ein Teil dieser Arbeit die Optimierung eines Eksigent NanoLC-2D HPLC-Systems sowie zweier Massenspektrometer, des Q-TOF Ultima und der LTQ Orbitrap XL, damit HLA-Ligandengemische, die durch Immunpräzipitationen isoliert werden, bestmöglich gemessen werden können. Nach Beendigung der Optimierungsarbeiten war es möglich, 757 Peptidsequenzen von HLA-Liganden, die auf einem 500 µl-Zellpellet von JY-Zellen präsentiert wurden eindeutig zu identifizieren.

Auch auf anderen Gebieten wie der klinischen Forschung führt die massenspektrometrische Charakterisierung von HLA-Liganden zu Erfolgen: So war es möglich, insgesamt 118 MHC-Klasse-I-Liganden und 191 MHC-Klasse-II-Liganden, die auf Gehirngewebe von Patienten mit Multipler Sklerose präsentiert wurden, zu sequenzieren. Unter den Liganden waren einige, die in Verdacht stehen, mit Multipler Sklerose assoziiert zu sein. Außerdem wurden 13 HLA-Liganden aus dem Myelin-Basischen Protein, das eines der Hauptziele von CD4⁺ T-Zellen darstellt und von großer klinischer Bedeutung sein könnte, identifiziert.

Zuletzt wurde die Methode zur Detektion tumorassoziierter oder tumorspezifischer MHC-Peptide auf Zellen und soliden Geweben verbessert, indem über eine Software vorhergesagte oder bereits bekannte HLA-Liganden aus Survivin synthetisiert und nach differentieller N-terminaler Isotopenmarkierung als Eichpeptide in Proben eines natürlichen Ligandengemisches von Zellen oder Xenotransplantaten zugesetzt wurden. Der Vergleich von synthetischen und natürlichen Peptiden nach drei verschiedenen Kriterien, dem m/z-Verhältnis des Signals, der Retentionszeit und dem Fragmentspektrum, ermöglicht die sichere Identifikation von Peptiden, die aus Survivin stammen, in einem natürlichen Probengemisch. Auf diese Weise war es möglich, die zwei Peptide ELTLGEFLKL und RISTFKNWPF aus diesem Protein als natürlich präsentierte HLA-Liganden in zwei der Proben nachzuweisen.

5. Abkürzungsverzeichnis

<u>ZL</u>	Zelllinie
ACE	<i>angiotensin converting enzyme</i>
ACN	Acetonitril
AEP	Asparagin-Endopeptidase
AGC	Automatische Verstärkungsregelung (<i>automatic gain control</i>)
AK	Antikörper
ANN	<i>artificial neural network</i>
AP-1	<i>activator protein 1</i>
APC	antigenpräsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>)
API	<i>atmospheric pressure ionization</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
	oder Autosampler
ATP	Adenosintriphosphat
ATZ	Anilinothiazolinon
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BPI	<i>base peak intensity</i>
β_2 M	β_2 -Mikroglobulin
C8	Kieselgel mit der chemischen Formel $C_8H_{17}Me_2SiCl$
C18	Kieselgel mit der chemischen Formel $C_{18}H_{37}Me_2SiCl$
CCR7	CC-Chemokinrezeptor 7
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CE	Kapillarelektrophorese (<i>capillary electrophoresis</i>)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CID	<i>collision-induced dissociation</i>
CLIP	<i>class II invariant chain-associated peptide</i>
CML	Chronische myeloische Leukämie
CNBr	Bromcyan
CRM	Modell des geladenen Rückstandes (<i>charged residue model</i>)
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt (<i>cytotoxic T lymphocyte</i>)
DC	dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DDIS	<i>data-dependent ion selection</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNIC	deuterierte Nicotinsäure
dNIC-NHS	1-([D ₄]Nicotinoyloxy)-Succinimid
DRiP	<i>defective ribosomal product</i>
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ELISPOT	<i>enzyme linked immuno spot technique</i>
ER	endoplasmatisches Reticulum
ERAAP	<i>ER aminopeptidase associated with antigen processing</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation
ETD	<i>electron transfer dissociation</i>
FA	Ameisensäure (<i>formic acid</i>)
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)

FFT	Schnelle Fouriertransformation (<i>fast Fourier transformation</i>)
FT	Fouriertransformation
FWHM	Halbwertsbreite (<i>full width at half maximum</i>)
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GILT	Gamma-Interferon induzierbare lysosomale Thiolreduktase
GluFib	[Glu1]-Fibrinopeptid B
GUA	Guanidin
HCD	<i>higher-energy C-trap dissociation</i> oder <i>higher-energy collisionally induced dissociation</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HEV	Hochendotheliale Venole
HHV6	Humanes Herpesvirus 6
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Humanes-Leukozyten-Antigen (<i>human leukocyte antigen</i>)
HMM	<i>hidden Markov model</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HPRT1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
HPV	Humanes Papillomavirus
HSV	Herpes Simplex Virus
IEM	Ionenemissionsmodell (<i>Ion Evaporation Model</i>)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
Ii	Invariante Kette (<i>invariant chain</i>)
IL	Interleukin
IPI	<i>International Protein Index</i>
LC	Flüssigkeitschromatographie (<i>liquid chromatography</i>)
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie (<i>lymphoblastoid cell line</i>)
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (<i>liquid chromatography mass spectrometry</i>)
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie
LFA	<i>Leukocyte function associated antigen</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Lymphotoxin
LTQ	<i>linear trap quadrupole</i>
MAC	Membran-Angriffs-Komplex (<i>membrane attack complex</i>)
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MALDI	Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation (<i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>)
MBP	Myelin-Basisches Protein (<i>myelin basic protein</i>)
MCP	Mikrokanalplatte (<i>micro-channel plate</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MOBP	Myelin-assoziiertes Oligodendrozytisches Basisches Protein
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MOWSE	<i>molecular weight search</i>
MS	Massenspektrometrie, Massenspektrometer
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
m/z	Masse-zu-Ladungs-Quotient
NCBIInr	<i>National Center for Biotechnology Information non-redundant</i>
NF	Neurofilamentprotein
NF-L	Leichtes Neurofilament-Polypeptid (<i>neurofilament light polypeptide</i>)

NF-M	mittleres Neurofilamentprotein
NF-κB	<i>nuclear factor κB</i>
NFAT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
NIC	Nicotinsäure
NIC-NHS	1-([H ₄]-Nicotinoyloxy)-Succinimid
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Saline (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglycol
PHT	Phenylthiohydantoin
PITC	Phenylisothiocyanat
PLC	Peptidbeladungskomplex (<i>peptide loading complex</i>)
PLP	Proteolipidprotein
ppm	<i>parts per million</i>
PSA	prostataspezifisches Antigen
PSD	<i>post source decay</i>
PSSM	<i>position-specific scoring matrix</i>
PTC	Phenylthiocarbamid
PTM	posttranslationale Modifikation
Q-TOF	<i>quadrupole time-of-flight</i>
R	Auflösungsvermögen (<i>resolution</i>)
RCC	Nierenzellkarzinom (<i>renal cell carcinoma</i>)
RF	Radiofrequenz
RP	<i>reversed phase</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
SCX	starker Kationenaustauscher (<i>strong cation exchanger</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SEV	Sekundärionenvervielfacher
SFB	Sonderforschungsbereich
SIM	<i>selected ion monitoring</i>
SLIP	<i>short-lived protein</i>
SNP	<i>single nucleotid polymorphism</i>
SSPE	Subakute Sklerosierende Panencephalitis
SVM	<i>support vector machine</i>
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TBB	<i>tris blocking buffer</i>
TCC	T-Zell-Klon (<i>T-cell clone</i>)
TCR	T-Zell-Rezeptor (<i>T-cell receptor</i>)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure (<i>trifluoroacetic acid</i>)
Th1	CD4 ⁺ T-Zellen des Typs 1
TIC	<i>total ion current</i>
TLR	Toll-like-Rezeptor
TMEV	Theilers murines Enzephalomyelitis-Virus
TNF	Tumor-Nekrosefaktor
TOF	Flugzeit (<i>time-of-flight</i>)
TRiC	<i>TCP-1 ring complex</i>

TWB	<i>tris washing buffer</i>
UHPLC	<i>ultra high performance liquid chromatography</i>
UV	Ultraviolett
VZV	Varicella Zoster Virus
XL	<i>extra large</i>
ZNS	zentrales Nervensystem
ZSF	Zerebrospinalflüssigkeit

6. Referenzen

1. Bjorkman, P. J. *et al.* Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* **329**, 506-512 (1987).
2. Bouvier, M. & Wiley, D. C. Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of MHC class I molecules. *Science* **265**, 398-402 (1994).
3. Saper, M. A., Bjorkman, P. J. & Wiley, D. C. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **219**, 277-319 (1991).
4. Rammensee, H. G., Bachmann, J. & Stevanovic, S. *MHC Ligands and Peptide Motifs. Molecular Biology Intelligence Unit.* Landes Bioscience, Austin, Texas, U.S.A. (1997).
5. Rötzschke, O., Falk, K., Stevanovic, S., Jung, G. & Rammensee, H. G. Peptide motifs of closely related HLA class I molecules encompass substantial differences. *Eur. J. Immunol.* **22**, 2453-2456 (1992).
6. Ruppert, J. *et al.* Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A2.1 molecules. *Cell* **74**, 929-937 (1993).
7. Falk, K. *et al.* Identification of naturally processed viral nonapeptides allows their quantification in infected cells and suggests an allele-specific T cell epitope forecast. *J. Exp. Med.* **174**, 425-434 (1991).
8. Groothuis, T. A., Griekspoor, A. C., Neijssen, J. J., Herberts, C. A. & Neefjes, J. J. MHC class I alleles and their exploration of the antigen-processing machinery. *Immunol. Rev.* **207**, 60-76 (2005).
9. Bouvier, M. & Wiley, D. C. Structural characterization of a soluble and partially folded class I major histocompatibility heavy chain/beta 2m heterodimer. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 377-384 (1998).
10. Qian, S. B., Bennink, J. R. & Yewdell, J. W. Quantitating defective ribosome products. *Methods Mol. Biol.* **301**, 271-281 (2005).
11. Yewdell, J. W., Reits, E. & Neefjes, J. Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 952-961 (2003).
12. Princiotta, M. F. *et al.* Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity* **18**, 343-354 (2003).
13. Yewdell, J. W. Plumbing the sources of endogenous MHC class I peptide ligands. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 79-86 (2007).
14. Tanaka, K. & Kasahara, M. The MHC class I ligand-generating system: roles of immunoproteasomes and the interferon-gamma-inducible proteasome activator PA28. *Immunol. Rev.* **163**, 161-176 (1998).

15. Dick, T. P. *et al.* Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands. *Cell* **86**, 253-262 (1996).
16. Ehring, B., Meyer, T. H., Eckerskorn, C., Lottspeich, F. & Tampe, R. Effects of major-histocompatibility-complex-encoded subunits on the peptidase and proteolytic activities of human 20S proteasomes. Cleavage of proteins and antigenic peptides. *Eur. J. Biochem.* **235**, 404-415 (1996).
17. Wenzel, T., Eckerskorn, C., Lottspeich, F. & Baumeister, W. Existence of a molecular ruler in proteasomes suggested by analysis of degradation products. *FEBS Lett.* **349**, 205-209 (1994).
18. Toes, R. E. *et al.* Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J. Exp. Med.* **194**, 1-12 (2001).
19. Kisselev, A. F., Akopian, T. N. & Goldberg, A. L. Range of sizes of peptide products generated during degradation of different proteins by archaeal proteasomes. *J. Biol. Chem.* **273**, 1982-1989 (1998).
20. Cascio, P., Hilton, C., Kisselev, A. F., Rock, K. L. & Goldberg, A. L. 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. *EMBO J.* **20**, 2357-2366 (2001).
21. Stoltze, L. *et al.* Generation of the vesicular stomatitis virus nucleoprotein cytotoxic T lymphocyte epitope requires proteasome-dependent and -independent proteolytic activities. *Eur. J. Immunol.* **28**, 4029-4036 (1998).
22. Seifert, U. *et al.* An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope. *Nat. Immunol.* **4**, 375-379 (2003).
23. Stoltze, L. *et al.* Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nat. Immunol.* **1**, 413-418 (2000).
24. Kunisawa, J. & Shastri, N. The group II chaperonin TRiC protects proteolytic intermediates from degradation in the MHC class I antigen processing pathway. *Mol. Cell* **12**, 565-576 (2003).
25. Ackerman, A. L. & Cresswell, P. Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nat. Immunol.* **5**, 678-684 (2004).
26. Guermonprez, P. & Amigorena, S. Pathways for antigen cross presentation. *Springer Semin. Immunopathol.* **26**, 257-271 (2005).
27. Ackerman, A. L., Kyritsis, C., Tampe, R. & Cresswell, P. Access of soluble antigens to the endoplasmic reticulum can explain cross-presentation by dendritic cells. *Nat. Immunol.* **6**, 107-113 (2005).
28. Lehner, P. J. & Cresswell, P. Recent developments in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* **16**, 82-89 (2004).
29. Neefjes, J. J., Momburg, F. & Hämmerling, G. J. Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science* **261**, 769-771 (1993).

30. Serwold, T., Gonzalez, F., Kim, J., Jacob, R. & Shastri, N. ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* **419**, 480-483 (2002).
31. Kanaseki, T., Blanchard, N., Hammer, G. E., Gonzalez, F. & Shastri, N. ERAAP synergizes with MHC class I molecules to make the final cut in the antigenic peptide precursors in the endoplasmic reticulum. *Immunity* **25**, 795-806 (2006).
32. Shen, X. Z., Lukacher, A. E., Billet, S., Williams, I. R. & Bernstein, K. E. Expression of angiotensin-converting enzyme changes major histocompatibility complex class I peptide presentation by modifying C termini of peptide precursors. *J. Biol. Chem.* **283**, 9957-9965 (2008).
33. Hoppes, R., Ekkebus, R., Schumacher, T. N. & Ovaas, H. Technologies for MHC class I immunoproteomics. *J. Proteomics* **73**, 1945-1953 (2010).
34. Yewdell, J. W. Not such a dismal science: the economics of protein synthesis, folding, degradation and antigen processing. *Trends Cell Biol.* **11**, 294-297 (2001).
35. Reits, E. *et al.* Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I. *Immunity* **18**, 97-108 (2003).
36. Stevanovic, S. & Schild, H. Quantitative aspects of T cell activation--peptide generation and editing by MHC class I molecules. *Semin. Immunol.* **11**, 375-384 (1999).
37. Koopmann, J. O. *et al.* Export of antigenic peptides from the endoplasmic reticulum intersects with retrograde protein translocation through the Sec61p channel. *Immunity* **13**, 117-127 (2000).
38. Ben-Shahar, S. *et al.* 26 S proteasome-mediated production of an authentic major histocompatibility class I-restricted epitope from an intact protein substrate. *J. Biol. Chem.* **274**, 21963-21972 (1999).
39. Montoya, M. & Del, V. M. Intracellular rate-limiting steps in MHC class I antigen processing. *J. Immunol.* **163**, 1914-1922 (1999).
40. Dengjel, J. *et al.* Unexpected abundance of HLA class II presented peptides in primary renal cell carcinomas. *Clin. Cancer Res.* **12**, 4163-4170 (2006).
41. Dessen, A., Lawrence, C. M., Cupo, S., Zaller, D. M. & Wiley, D. C. X-ray crystal structure of HLA-DR4 (DRA*0101, DRB1*0401) complexed with a peptide from human collagen II. *Immunity* **7**, 473-481 (1997).
42. Fremont, D. H., Hendrickson, W. A., Marrack, P. & Kappler, J. Structures of an MHC class II molecule with covalently bound single peptides. *Science* **272**, 1001-1004 (1996).
43. Chapman, H. A. Endosomal proteases in antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* **18**, 78-84 (2006).

44. Pieters, J. MHC class II compartments: specialized organelles of the endocytic pathway in antigen presenting cells. *Biol. Chem.* **378**, 751-758 (1997).
45. Honey, K. & Rudensky, A. Y. Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 472-482 (2003).
46. Hsing, L. C. & Rudensky, A. Y. The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation. *Immunol. Rev.* **207**, 229-241 (2005).
47. Rudensky, A. & Beers, C. Lysosomal cysteine proteases and antigen presentation. *Ernst Schering Res. Found. Workshop* 81-95 (2006).
48. Trombetta, E. S. & Mellman, I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 975-1028 (2005).
49. Chicz, R. M. *et al.* Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J. Exp. Med.* **178**, 27-47 (1993).
50. Dongre, A. R. *et al.* In vivo MHC class II presentation of cytosolic proteins revealed by rapid automated tandem mass spectrometry and functional analyses. *Eur. J. Immunol.* **31**, 1485-1494 (2001).
51. Nimmerjahn, F. *et al.* Major histocompatibility complex class II-restricted presentation of a cytosolic antigen by autophagy. *Eur. J. Immunol.* **33**, 1250-1259 (2003).
52. Dengjel, J. *et al.* Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **102**, 7922-7927 (2005).
53. Delamarre, L., Pack, M., Chang, H., Mellman, I. & Trombetta, E. S. Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science* **307**, 1630-1634 (2005).
54. Watts, C. *et al.* Creation versus destruction of T cell epitopes in the class II MHC pathway. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **987**, 9-14 (2003).
55. Hastings, K. T., Lackman, R. L. & Cresswell, P. Functional requirements for the lysosomal thiol reductase GILT in MHC class II-restricted antigen processing. *J. Immunol.* **177**, 8569-8577 (2006).
56. Godkin, A. J. *et al.* Naturally processed HLA class II peptides reveal highly conserved immunogenic flanking region sequence preferences that reflect antigen processing rather than peptide-MHC interactions. *J. Immunol.* **166**, 6720-6727 (2001).
57. Kropshofer, H. *et al.* Self-peptides from four HLA-DR alleles share hydrophobic anchor residues near the NH₂-terminal including proline as a stop signal for trimming. *J. Immunol.* **151**, 4732-4742 (1993).
58. Harrison, P. M., Kumar, A., Lang, N., Snyder, M. & Gerstein, M. A question of size: the eukaryotic proteome and the problems in defining it. *Nucleic Acids Res.* **30**, 1083-1090 (2002).

59. Carninci, P. *et al.* The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* **309**, 1559-1563 (2005).
60. Fortier, M. H. *et al.* The MHC class I peptide repertoire is molded by the transcriptome. *J. Exp. Med.* **205**, 595-610 (2008).
61. Southan, C. Has the yo-yo stopped? An assessment of human protein-coding gene number. *Proteomics*. **4**, 1712-1726 (2004).
62. Hickman, H. D. *et al.* Cutting edge: class I presentation of host peptides following HIV infection. *J. Immunol.* **171**, 22-26 (2003).
63. Rammensee, H. G., Weinschenk, T., Gouttefangeas, C. & Stevanovic, S. Towards patient-specific tumor antigen selection for vaccination. *Immunol. Rev.* **188**, 164-176 (2002).
64. Weinschenk, T. *et al.* Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. *Cancer Res.* **62**, 5818-5827 (2002).
65. Hillen, N. & Stevanovic, S. Contribution of mass spectrometry-based proteomics to immunology. *Expert Rev. Proteomics* **3**, 653-664 (2006).
66. Zinkernagel, R. M. & Doherty, P. C. Characteristics of the interaction in vitro between cytotoxic thymus-derived lymphocytes and target monolayers infected with lymphocytic choriomeningitis virus. *Scand. J. Immunol.* **3**, 287-294 (1974).
67. Janeway, C. A., Jr. The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* **10**, 645-674 (1992).
68. Gao, G. F. *et al.* Crystal structure of the complex between human CD8alpha(alpha) and HLA-A2. *Nature* **387**, 630-634 (1997).
69. Zamoyska, R. CD4 and CD8: modulators of T-cell receptor recognition of antigen and of immune responses? *Curr. Opin. Immunol.* **10**, 82-87 (1998).
70. Picker, L. J. Control of lymphocyte homing. *Curr. Opin. Immunol.* **6**, 394-406 (1994).
71. Banchereau, J. & Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-252 (1998).
72. Gunn, M. D. *et al.* A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 258-263 (1998).
73. Randolph, G. J., Angeli, V. & Swartz, M. A. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 617-628 (2005).
74. Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M. & Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**, 708-712 (1999).

75. Jang, M. H. *et al.* CCR7 is critically important for migration of dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes. *J. Immunol.* **176**, 803-810 (2006).
76. Viola, A., Contento, R. L. & Molon, B. T cells and their partners: The chemokine dating agency. *Trends Immunol.* **27**, 421-427 (2006).
77. Lee, K. H. *et al.* T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science* **295**, 1539-1542 (2002).
78. Grakoui, A. *et al.* The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* **285**, 221-227 (1999).
79. Krummel, M. F. & Davis, M. M. Dynamics of the immunological synapse: finding, establishing and solidifying a connection. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 66-74 (2002).
80. Monks, C. R., Freiberg, B. A., Kupfer, H., Sciaky, N. & Kupfer, A. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* **395**, 82-86 (1998).
81. Irvine, D. J., Purbhoo, M. A., Krogsaard, M. & Davis, M. M. Direct observation of ligand recognition by T cells. *Nature* **419**, 845-849 (2002).
82. Germain, R. N. T-cell activation: the power of one. *Curr. Biol.* **13**, R137-R139 (2003).
83. Kaech, S. M. & Ahmed, R. Memory CD8⁺ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nat. Immunol.* **2**, 415-422 (2001).
84. van Stipdonk, M. J., Lemmens, E. E. & Schoenberger, S. P. Naive CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation. *Nat. Immunol.* **2**, 423-429 (2001).
85. Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B. & Klein, L. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat. Immunol.* **2**, 1032-1039 (2001).
86. Derbinski, J., Pinto, S., Rosch, S., Hexel, K. & Kyewski, B. Promiscuous gene expression patterns in single medullary thymic epithelial cells argue for a stochastic mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **105**, 657-662 (2008).
87. Sospedra, M. *et al.* Transcription of a broad range of self-antigens in human thymus suggests a role for central mechanisms in tolerance toward peripheral antigens. *J. Immunol.* **161**, 5918-5929 (1998).
88. Stevanovic, S. Identification of tumour-associated T-cell epitopes for vaccine development. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 514-520 (2002).
89. Gotter, J., Brors, B., Hergenbahn, M. & Kyewski, B. Medullary epithelial cells of the human thymus express a highly diverse selection of tissue-specific genes colocalized in chromosomal clusters. *J. Exp. Med.* **199**, 155-166 (2004).
90. Kawakami, Y., Robbins, P. F. & Rosenberg, S. A. Human melanoma antigens recognized by T lymphocytes. *Keio J. Med.* **45**, 100-108 (1996).

91. Cloosen, S. *et al.* Expression of tumor-associated differentiation antigens, MUC1 glycoforms and CEA, in human thymic epithelial cells: implications for self-tolerance and tumor therapy. *Cancer Res.* **67**, 3919-3926 (2007).
92. Reis, C. A., David, L., Seixas, M., Burchell, J. & Sobrinho-Simoes, M. Expression of fully and under-glycosylated forms of MUC1 mucin in gastric carcinoma. *Int. J. Cancer* **79**, 402-410 (1998).
93. Storkus, W. J., Zeh, H. J., III, Salter, R. D. & Lotze, M. T. Identification of T-cell epitopes: rapid isolation of class I-presented peptides from viable cells by mild acid elution. *J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol.* **14**, 94-103 (1993).
94. Falk, K., Rötzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G. & Rammensee, H. G. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* **351**, 290-296 (1991).
95. Bluestone, J. A., Jameson, S., Miller, S. & Dick, R. Peptide-induced conformational changes in class I heavy chains alter major histocompatibility complex recognition. *J. Exp. Med.* **176**, 1757-1761 (1992).
96. Solheim, J. C. *et al.* Binding of peptides lacking consensus anchor residue alters H-2Ld serologic recognition. *J. Immunol.* **151**, 5387-5397 (1993).
97. Margulies, D. H., Ramsey, A. L., Boyd, L. F. & McCluskey, J. Genetic engineering of an H-2Dd/Q10b chimeric histocompatibility antigen: purification of soluble protein from transformant cell supernatants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **83**, 5252-5256 (1986).
98. Prilliman, K. *et al.* Large-scale production of class I bound peptides: assigning a signature to HLA-B*1501. *Immunogenetics* **45**, 379-385 (1997).
99. Krüger, T. *et al.* Lessons to be learned from primary renal cell carcinomas: novel tumor antigens and HLA ligands for immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* **54**, 826-836 (2005).
100. Hunt, D. F. *et al.* Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. *Science* **255**, 1261-1263 (1992).
101. Kolch, W., Neususs, C., Pelzing, M. & Mischak, H. Capillary electrophoresis-mass spectrometry as a powerful tool in clinical diagnosis and biomarker discovery. *Mass Spectrom. Rev.* **24**, 959-977 (2005).
102. Schiffer, E., Mischak, H. & Novak, J. High resolution proteome/peptidome analysis of body fluids by capillary electrophoresis coupled with MS. *Proteomics.* **6**, 5615-5627 (2006).
103. Chesnut, S. M. & Salisbury, J. J. The role of UHPLC in pharmaceutical development. *J. Sep. Sci.* **30**, 1183-1190 (2007).
104. Beavis, R. C. *et al.* Automated dry fraction collection for microbore high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **359**, 489-497 (1986).

105. Krokhin, O. V., Ens, W. & Standing, K. G. MALDI QqTOF MS combined with off-line HPLC for characterization of protein primary structure and post-translational modifications. *J. Biomol. Tech.* **16**, 429-440 (2005).
106. Bodnar, W. M., Blackburn, R. K., Krise, J. M. & Moseley, M. A. Exploiting the complementary nature of LC/MALDI/MS/MS and LC/ESI/MS/MS for increased proteome coverage. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **14**, 971-979 (2003).
107. Chen, H. S., Rejtar, T., Andreev, V., Moskovets, E. & Karger, B. L. Enhanced characterization of complex proteomic samples using LC-MALDI MS/MS: exclusion of redundant peptides from MS/MS analysis in replicate runs. *Anal. Chem.* **77**, 7816-7825 (2005).
108. Hofmann, S. *et al.* Rapid and sensitive identification of major histocompatibility complex class I-associated tumor peptides by Nano-LC MALDI MS/MS. *Mol. Cell. Proteomics* **4**, 1888-1897 (2005).
109. Sickmann, A. *et al.* Identification of major histocompatibility complex class II-associated peptides derived from freshly prepared rat Langerhans cells using MALDI-PSD and Edman degradation. *Analyst* **125**, 569-573 (2000).
110. de Jong, A. Contribution of mass spectrometry to contemporary immunology. *Mass Spectrom. Rev.* **17**, 311-335 (1998).
111. Domon, B. & Aebersold, R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science* **312**, 212-217 (2006).
112. Guerrero, I. C. & Kleiner, O. Application of mass spectrometry in proteomics. *Biosci. Rep.* **25**, 71-93 (2005).
113. March, R. E. Quadrupole ion trap mass spectrometry: a view at the turn of the century. *Int. J. Mass Spectrom.* **200**, 285-312 (2000).
114. Hardman, M. & Makarov, A. A. Interfacing the orbitrap mass analyzer to an electrospray ion source. *Anal. Chem.* **75**, 1699-1705 (2003).
115. Makarov, A. & Scigelova, M. Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1217**, 3938-3945 (2010).
116. Hickman, H. D. *et al.* Toward a definition of self: proteomic evaluation of the class I peptide repertoire. *J. Immunol.* **172**, 2944-2952 (2004).
117. Lemmel, C. & Stevanovic, S. The use of HPLC-MS in T-cell epitope identification. *Methods* **29**, 248-259 (2003).
118. Pamer, E. G., Harty, J. T. & Bevan, M. J. Precise prediction of a dominant class I MHC-restricted epitope of *Listeria monocytogenes*. *Nature* **353**, 852-855 (1991).
119. Rötzschke, O. *et al.* Exact prediction of a natural T cell epitope. *Eur. J. Immunol.* **21**, 2891-2894 (1991).
120. Celis, E. *et al.* Identification of potential CTL epitopes of tumor-associated antigen MAGE-1 for five common HLA-A alleles. *Mol. Immunol.* **31**, 1423-1430 (1994).

121. Kessler, J. H. & Melief, C. J. Identification of T-cell epitopes for cancer immunotherapy. *Leukemia* **21**, 1859-1874 (2007).
122. Lin, H. H., Ray, S., Tongchusak, S., Reinherz, E. L. & Brusic, V. Evaluation of MHC class I peptide binding prediction servers: applications for vaccine research. *BMC Immunol.* **9**, 8 (2008).
123. Lin, H. H., Zhang, G. L., Tongchusak, S., Reinherz, E. L. & Brusic, V. Evaluation of MHC-II peptide binding prediction servers: applications for vaccine research. *BMC Bioinformatics.* **9 Suppl 12**, S22 (2008).
124. Stevanovic, S. Antigen processing is predictable: From genes to T cell epitopes. *Transpl. Immunol.* **14**, 171-174 (2005).
125. Rammensee, H., Bachmann, J., Emmerich, N. P., Bachor, O. A. & Stevanovic, S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* **50**, 213-219 (1999).
126. Parker, K. C., Bednarek, M. A. & Coligan, J. E. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J. Immunol.* **152**, 163-175 (1994).
127. Nielsen, M. *et al.* Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations. *Protein Sci.* **12**, 1007-1017 (2003).
128. Peters, B. *et al.* A community resource benchmarking predictions of peptide binding to MHC-I molecules. *PLoS. Comput. Biol.* **2**, e65 (2006).
129. Lundegaard, C., Lund, O., Kesmir, C., Brunak, S. & Nielsen, M. Modeling the adaptive immune system: predictions and simulations. *Bioinformatics.* **23**, 3265-3275 (2007).
130. Buchsbaum, S. *et al.* Large-scale analysis of HLA peptides presented by HLA-Cw4. *Immunogenetics* **55**, 172-176 (2003).
131. Schirle, M. *et al.* Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T cell-independent approach. *Eur. J. Immunol.* **30**, 2216-2225 (2000).
132. Lemmel, C. *et al.* Differential quantitative analysis of MHC ligands by mass spectrometry using stable isotope labeling. *Nat. Biotechnol.* **22**, 450-454 (2004).
133. Weinzierl, A. O. *et al.* Distorted relation between mRNA copy number and corresponding major histocompatibility complex ligand density on the cell surface. *Mol. Cell. Proteomics* **6**, 102-113 (2007).
134. Dengjel, J. *et al.* Identification of a naturally processed cyclin D1 T-helper epitope by a novel combination of HLA class II targeting and differential mass spectrometry. *Eur. J. Immunol.* **34**, 3644-3651 (2004).
135. Pascolo, S. *et al.* A MAGE-A1 HLA-A A*0201 epitope identified by mass spectrometry. *Cancer Res.* **61**, 4072-4077 (2001).

136. Luckey, C. J. *et al.* Differences in the expression of human class I MHC alleles and their associated peptides in the presence of proteasome inhibitors. *J. Immunol.* **167**, 1212-1221 (2001).
137. Purcell, A. W. & Gorman, J. J. The use of post-source decay in matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry to delineate T cell determinants. *J. Immunol. Methods* **249**, 17-31 (2001).
138. Weinzierl, A. O. *et al.* Features of TAP-independent MHC class I ligands revealed by quantitative mass spectrometry. *Eur. J. Immunol.* **38**, 1503-1510 (2008).
139. Reits, E. A. *et al.* Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *J. Exp. Med.* **203**, 1259-1271 (2006).
140. Bubenik, J. MHC class I down-regulation: tumour escape from immune surveillance? (review). *Int. J. Oncol.* **25**, 487-491 (2004).
141. Lilley, B. N. & Ploegh, H. L. Viral modulation of antigen presentation: manipulation of cellular targets in the ER and beyond. *Immunol. Rev.* **207**, 126-144 (2005).
142. Slingluff, C. L., Jr. *et al.* Phase I trial of a melanoma vaccine with gp100(280-288) peptide and tetanus helper peptide in adjuvant: immunologic and clinical outcomes. *Clin. Cancer Res.* **7**, 3012-3024 (2001).
143. Slingluff, C. L., Jr. *et al.* Clinical and immunologic results of a randomized phase II trial of vaccination using four melanoma peptides either administered in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in adjuvant or pulsed on dendritic cells. *J. Clin. Oncol.* **21**, 4016-4026 (2003).
144. Dudley, M. E. *et al.* Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* **23**, 2346-2357 (2005).
145. Planz, O. *et al.* A naturally processed rat major histocompatibility complex class I-associated viral peptide as target structure of borna disease virus-specific CD8⁺ T cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 13689-13694 (2001).
146. Weinzierl, A. O. & Stevanovic, S. LC-MS Based Protein and Peptide Quantification Using Stable Isotope Labels: From ICAT in General to differential N-terminal Coding (dNIC) in Special. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **23**, 21-39 (2006).
147. Stickel, J. S. *et al.* HLA ligand profiles of primary renal cell carcinoma maintained in metastases. *Cancer Immunol. Immunother.* **58**, 1407-1417 (2009).
148. Wasinger, V. C. *et al.* Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* **16**, 1090-1094 (1995).
149. Biomarkers Definitions Working Group Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* **69**, 89-95 (2001).

150. Cho, W. C. & Cheng, C. H. Oncoproteomics: current trends and future perspectives. *Expert Rev. Proteomics* **4**, 401-410 (2007).
151. Hu, S., Loo, J. A. & Wong, D. T. Human body fluid proteome analysis. *Proteomics*. **6**, 6326-6353 (2006).
152. Lescuyer, P., Hochstrasser, D. & Rabilloud, T. How shall we use the proteomics toolbox for biomarker discovery? *J. Proteome. Res.* **6**, 3371-3376 (2007).
153. Gygi, S. P. *et al.* Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat. Biotechnol.* **17**, 994-999 (1999).
154. Milner, E., Barnea, E., Beer, I. & Admon, A. The turnover kinetics of major histocompatibility complex peptides of human cancer cells. *Mol. Cell. Proteomics* **5**, 357-365 (2006).
155. Yewdell, J. W. & Lev, A. Self-reporting peptides illuminate the MHC groove. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 201-202 (2007).
156. Mann, M. & Jensen, O. N. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat. Biotechnol.* **21**, 255-261 (2003).
157. Chi, A. *et al.* Analysis of phosphorylation sites on proteins from *Saccharomyces cerevisiae* by electron transfer dissociation (ETD) mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **104**, 2193-2198 (2007).
158. Molina, H., Horn, D. M., Tang, N., Mathivanan, S. & Pandey, A. Global proteomic profiling of phosphopeptides using electron transfer dissociation tandem mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **104**, 2199-2204 (2007).
159. Olsen, J. V. *et al.* Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis. *Nat. Methods* **4**, 709-712 (2007).
160. Zarling, A. L. *et al.* Phosphorylated peptides are naturally processed and presented by major histocompatibility complex class I molecules in vivo. *J. Exp. Med.* **192**, 1755-1762 (2000).
161. Depontieu, F. R. *et al.* Identification of tumor-associated, MHC class II-restricted phosphopeptides as targets for immunotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **106**, 12073-12078 (2009).
162. Meyer, V. S. *et al.* Identification of natural MHC class II presented phosphopeptides and tumor-derived MHC class I phospholigands. *J. Proteome Res.* **8**, 3666-3674 (2009).
163. Dengjel, J., Rammensee, H. G. & Stevanovic, S. Glycan side chains on naturally presented MHC class II ligands. *J. Mass Spectrom.* **40**, 100-104 (2005).
164. Haurum, J. S. *et al.* Recognition of carbohydrate by major histocompatibility complex class I-restricted, glycopeptide-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **180**, 739-744 (1994).

165. Kastrup, I. B. *et al.* Lectin purified human class I MHC-derived peptides: evidence for presentation of glycopeptides in vivo. *Tissue Antigens* **56**, 129-135 (2000).
166. Sieling, P. A. *et al.* Conserved mycobacterial lipoglycoproteins activate TLR2 but also require glycosylation for MHC class II-restricted T cell activation. *J. Immunol.* **180**, 5833-5842 (2008).
167. Engelhard, V. H., trich-Vanlith, M., Ostankovitch, M. & Zarling, A. L. Post-translational modifications of naturally processed MHC-binding epitopes. *Curr. Opin. Immunol.* **18**, 92-97 (2006).
168. Anderson, N. L. & Anderson, N. G. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol. Cell Proteomics.* **1**, 845-867 (2002).
169. Wu, L. & Han, D. K. Overcoming the dynamic range problem in mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Expert Rev. Proteomics.* **3**, 611-619 (2006).
170. Wang, N., Xie, C., Young, J. B. & Li, L. Off-line two-dimensional liquid chromatography with maximized sample loading to reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry for shotgun proteome analysis. *Anal. Chem.* **81**, 1049-1060 (2009).
171. Corthals, G. L., Wasinger, V. C., Hochstrasser, D. F. & Sanchez, J. C. The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research. *Electrophoresis* **21**, 1104-1115 (2000).
172. Gygi, S. P., Corthals, G. L., Zhang, Y., Rochon, Y. & Aebersold, R. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97**, 9390-9395 (2000).
173. Gygi, S. P., Rist, B., Griffin, T. J., Eng, J. & Aebersold, R. Proteome analysis of low-abundance proteins using multidimensional chromatography and isotope-coded affinity tags. *J. Proteome Res.* **1**, 47-54 (2002).
174. Mann, M., Hendrickson, R. C. & Pandey, A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 437-473 (2001).
175. Washburn, M. P., Wolters, D. & Yates, J. R., III Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat. Biotechnol.* **19**, 242-247 (2001).
176. Veenstra, T. D., Conrads, T. P. & Issaq, H. J. What to do with "one-hit wonders"? *Electrophoresis* **25**, 1278-1279 (2004).
177. Reinders, J., Lewandrowski, U., Moebius, J., Wagner, Y. & Sickmann, A. Challenges in mass spectrometry-based proteomics. *Proteomics.* **4**, 3686-3703 (2004).
178. McFarlin, D. E. & McFarland, H. F. Multiple sclerosis (first of two parts). *N. Engl. J. Med.* **307**, 1183-1188 (1982).
179. McFarlin, D. E. & McFarland, H. F. Multiple sclerosis (second of two parts). *N. Engl. J. Med.* **307**, 1246-1251 (1982).

180. Sospedra, M. & Martin, R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 683-747 (2005).
181. Hafler, D. A. Multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* **113**, 788-794 (2004).
182. Keegan, B. M. & Noseworthy, J. H. Multiple sclerosis. *Annu. Rev. Med.* **53**, 285-302 (2002).
183. Martin, R., McFarland, H. F. & McFarlin, D. E. Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annu. Rev. Immunol.* **10**, 153-187 (1992).
184. John, G. R. *et al.* Multiple sclerosis: re-expression of a developmental pathway that restricts oligodendrocyte maturation. *Nat. Med.* **8**, 1115-1121 (2002).
185. Pitt, D., Werner, P. & Raine, C. S. Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nat. Med.* **6**, 67-70 (2000).
186. Dyment, D. A., Ebers, G. C. & Sadovnick, A. D. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* **3**, 104-110 (2004).
187. GAMES & Transatlantic Multiple Sclerosis Genetics Cooperative A meta-analysis of whole genome linkage screens in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **143**, 39-46 (2003).
188. Haines, J. L. *et al.* Linkage of the MHC to familial multiple sclerosis suggests genetic heterogeneity. The Multiple Sclerosis Genetics Group. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 1229-1234 (1998).
189. Hillert, J. & Olerup, O. HLA and MS. *Neurology* **43**, 2426-2427 (1993).
190. Barcellos, L. F. *et al.* HLA-DR2 dose effect on susceptibility to multiple sclerosis and influence on disease course. *Am. J. Hum. Genet.* **72**, 710-716 (2003).
191. Bertram, J. & Kuwert, E. HLA antigen frequencies in multiple sclerosis. *Eur. J. Neurol.* **7**, 74-79 (1982).
192. Fogdell-Hahn, A., Ligers, A., Gronning, M., Hillert, J. & Olerup, O. Multiple sclerosis: a modifying influence of HLA class I genes in an HLA class II associated autoimmune disease. *Tissue Antigens* **55**, 140-148 (2000).
193. Ridgway, W. M., Ito, H., Fasso, M., Yu, C. & Fathman, C. G. Analysis of the role of variation of major histocompatibility complex class II expression on nonobese diabetic (NOD) peripheral T cell response. *J. Exp. Med.* **188**, 2267-2275 (1998).
194. Sospedra, M. *et al.* Redundancy in antigen-presenting function of the HLA-DR and -DQ molecules in the multiple sclerosis-associated HLA-DR2 haplotype. *J. Immunol.* **176**, 1951-1961 (2006).
195. Zhang, X. *et al.* Degenerate TCR recognition and dual DR2 restriction of autoreactive T cells: implications for the initiation of the autoimmune response in multiple sclerosis. *Eur. J. Immunol.* **38**, 1297-1309 (2008).

196. Li, F., Linan, M. J., Stein, M. C. & Faustman, D. L. Reduced expression of peptide-loaded HLA class I molecules on multiple sclerosis lymphocytes. *Ann. Neurol.* **38**, 147-154 (1995).
197. Babbe, H. *et al.* Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J. Exp. Med.* **192**, 393-404 (2000).
198. Jacobsen, M. *et al.* Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain* **125**, 538-550 (2002).
199. Head, J. R. & Griffin, W. S. Functional capacity of solid tissue transplants in the brain: evidence for immunological privilege. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **224**, 375-387 (1985).
200. Lock, C. *et al.* Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat. Med.* **8**, 500-508 (2002).
201. Graumann, U., Reynolds, R., Steck, A. J. & Schaeren-Wiemers, N. Molecular changes in normal appearing white matter in multiple sclerosis are characteristic of neuroprotective mechanisms against hypoxic insult. *Brain Pathol.* **13**, 554-573 (2003).
202. Runmarker, B. & Andersen, O. Pregnancy is associated with a lower risk of onset and a better prognosis in multiple sclerosis. *Brain* **118 (Pt 1)**, 253-261 (1995).
203. Sicotte, N. L. *et al.* Treatment of multiple sclerosis with the pregnancy hormone estriol. *Ann. Neurol.* **52**, 421-428 (2002).
204. Kurtzke, J. F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* **33**, 1444-1452 (1983).
205. Hayes, C. E. Vitamin D: a natural inhibitor of multiple sclerosis. *Proc. Nutr. Soc.* **59**, 531-535 (2000).
206. Sibley, W. A., Bamford, C. R. & Clark, K. Clinical viral infections and multiple sclerosis. *Lancet* **1**, 1313-1315 (1985).
207. Johnson, R. T. The virology of demyelinating diseases. *Ann. Neurol.* **36 Suppl**, S54-S60 (1994).
208. Soldan, S. S. & Jacobson, S. Role of viruses in etiology and pathogenesis of multiple sclerosis. *Adv. Virus Res.* **56**, 517-555 (2001).
209. Challoner, P. B. *et al.* Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**, 7440-7444 (1995).
210. Moore, F. G. & Wolfson, C. Human herpes virus 6 and multiple sclerosis. *Acta Neurol. Scand.* **106**, 63-83 (2002).
211. Soldan, S. S., Leist, T. P., Juhng, K. N., McFarland, H. F. & Jacobson, S. Increased lymphoproliferative response to human herpesvirus type 6A variant in multiple sclerosis patients. *Ann. Neurol.* **47**, 306-313 (2000).

212. Wandinger, K. *et al.* Association between clinical disease activity and Epstein-Barr virus reactivation in MS. *Neurology* **55**, 178-184 (2000).
213. Martyn, C. N., Cruddas, M. & Compston, D. A. Symptomatic Epstein-Barr virus infection and multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **56**, 167-168 (1993).
214. Sotelo, J., Ordonez, G. & Pineda, B. Varicella-zoster virus at relapses of multiple sclerosis. *J. Neurol.* **254**, 493-500 (2007).
215. Sotelo, J., Martinez-Palomo, A., Ordonez, G. & Pineda, B. Varicella-zoster virus in cerebrospinal fluid at relapses of multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **63**, 303-311 (2008).
216. Burgoon, M. P. *et al.* Varicella zoster virus is not a disease-relevant antigen in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **65**, 474-479 (2009).
217. Sriram, S., Mitchell, W. & Stratton, C. Multiple sclerosis associated with Chlamydia pneumoniae infection of the CNS. *Neurology* **50**, 571-572 (1998).
218. Sriram, S. *et al.* Chlamydia pneumoniae infection of the central nervous system in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **46**, 6-14 (1999).
219. Pucci, E. *et al.* Lack of Chlamydia infection of the central nervous system in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **48**, 399-400 (2000).
220. Burns, J., Rosenzweig, A., Zweiman, B. & Lisak, R. P. Isolation of myelin basic protein-reactive T-cell lines from normal human blood. *Cell Immunol.* **81**, 435-440 (1983).
221. Pette, M. *et al.* Myelin basic protein-specific T lymphocyte lines from MS patients and healthy individuals. *Neurology* **40**, 1770-1776 (1990).
222. Richert, J. R., McFarlin, D. E., Rose, J. W., McFarland, H. F. & Greenstein, J. I. Expansion of antigen-specific T cells from cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **5**, 317-324 (1983).
223. Fujinami, R. S. & Oldstone, M. B. Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science* **230**, 1043-1045 (1985).
224. Tejada-Simon, M. V., Zang, Y. C., Hong, J., Rivera, V. M. & Zhang, J. Z. Cross-reactivity with myelin basic protein and human herpesvirus-6 in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **53**, 189-197 (2003).
225. Evavold, B. D., Sloan-Lancaster, J., Hsu, B. L. & Allen, P. M. Separation of T helper 1 clone cytotoxicity from proliferation and lymphokine production using analog peptides. *J. Immunol.* **150**, 3131-3140 (1993).
226. Wucherpfennig, K. W. & Strominger, J. L. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* **80**, 695-705 (1995).

227. Hemmer, B. *et al.* Predictable TCR antigen recognition based on peptide scans leads to the identification of agonist ligands with no sequence homology. *J. Immunol.* **160**, 3631-3636 (1998).
228. Lang, H. L. *et al.* A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. *Nat. Immunol.* **3**, 940-943 (2002).
229. Tough, D. F. & Sprent, J. Viruses and T cell turnover: evidence for bystander proliferation. *Immunol. Rev.* **150**, 129-142 (1996).
230. Murali-Krishna, K. *et al.* Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* **8**, 177-187 (1998).
231. Brocke, S. *et al.* Induction of relapsing paralysis in experimental autoimmune encephalomyelitis by bacterial superantigen. *Nature* **365**, 642-644 (1993).
232. Waldner, H., Collins, M. & Kuchroo, V. K. Activation of antigen-presenting cells by microbial products breaks self tolerance and induces autoimmune disease. *J. Clin. Invest.* **113**, 990-997 (2004).
233. Miller, S. D. *et al.* Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading. *Nat. Med.* **3**, 1133-1136 (1997).
234. Horwitz, M. S. *et al.* Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry. *Nat. Med.* **4**, 781-785 (1998).
235. Barnaba, V. Viruses, hidden self-epitopes and autoimmunity. *Immunol. Rev.* **152**, 47-66 (1996).
236. Opdenakker, G. & Van, D. J. Cytokine-regulated proteases in autoimmune diseases. *Immunol. Today* **15**, 103-107 (1994).
237. Pender, M. P. Infection of autoreactive B lymphocytes with EBV, causing chronic autoimmune diseases. *Trends Immunol.* **24**, 584-588 (2003).
238. Rivers, T. M., Sprunt, D. H. & Berry, G. P. OBSERVATIONS ON ATTEMPTS TO PRODUCE ACUTE DISSEMINATED ENCEPHALOMYELITIS IN MONKEYS. *J. Exp. Med.* **58**, 39-53 (1933).
239. Ben-Nun, A. & Cohen, I. R. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mediated by T cell lines: process of selection of lines and characterization of the cells. *J. Immunol.* **129**, 303-308 (1982).
240. Pettinelli, C. B. & McFarlin, D. E. Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes. *J. Immunol.* **127**, 1420-1423 (1981).
241. Zamvil, S. S. & Steinman, L. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu. Rev. Immunol.* **8**, 579-621 (1990).

242. Das, P. *et al.* Complementation between specific HLA-DR and HLA-DQ genes in transgenic mice determines susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Hum. Immunol.* **61**, 279-289 (2000).
243. Forsthuber, T. G. *et al.* T cell epitopes of human myelin oligodendrocyte glycoprotein identified in HLA-DR4 (DRB1*0401) transgenic mice are encephalitogenic and are presented by human B cells. *J. Immunol.* **167**, 7119-7125 (2001).
244. Kawamura, K. *et al.* Hla-DR2-restricted responses to proteolipid protein 95-116 peptide cause autoimmune encephalitis in transgenic mice. *J. Clin. Invest.* **105**, 977-984 (2000).
245. Bielekova, B. *et al.* Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand. *Nat. Med.* **6**, 1167-1175 (2000).
246. Hong, J., Zang, Y. C., Li, S., Rivera, V. M. & Zhang, J. Z. Ex vivo detection of myelin basic protein-reactive T cells in multiple sclerosis and controls using specific TCR oligonucleotide probes. *Eur. J. Immunol.* **34**, 870-881 (2004).
247. Muraro, P. A. *et al.* Molecular tracking of antigen-specific T cell clones in neurological immune-mediated disorders. *Brain* **126**, 20-31 (2003).
248. Crawford, M. P. *et al.* High prevalence of autoreactive, neuroantigen-specific CD8+ T cells in multiple sclerosis revealed by novel flow cytometric assay. *Blood* **103**, 4222-4231 (2004).
249. Olsson, T. *et al.* Increased numbers of T cells recognizing multiple myelin basic protein epitopes in multiple sclerosis. *Eur. J. Immunol.* **22**, 1083-1087 (1992).
250. Trotter, J. L. *et al.* HPRT mutant T-cell lines from multiple sclerosis patients recognize myelin proteolipid protein peptides. *J. Neuroimmunol.* **75**, 95-103 (1997).
251. Bielekova, B. *et al.* Expansion and functional relevance of high-avidity myelin-specific CD4+ T cells in multiple sclerosis. *J. Immunol.* **172**, 3893-3904 (2004).
252. Seamons, A., Perchellet, A. & Goverman, J. Immune tolerance to myelin proteins. *Immunol. Res.* **28**, 201-221 (2003).
253. Wekerle, H., Kojima, K., Lannes-Vieira, J., Lassmann, H. & Linington, C. Animal Models. *Ann. Neurol.* **36**, S47-S53 (1994).
254. Martin, R. *et al.* A myelin basic protein peptide is recognized by cytotoxic T cells in the context of four HLA-DR types associated with multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* **173**, 19-24 (1991).
255. Pette, M. *et al.* Myelin autoreactivity in multiple sclerosis: recognition of myelin basic protein in the context of HLA-DR2 products by T lymphocytes of multiple-sclerosis patients and healthy donors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **87**, 7968-7972 (1990).
256. Meinl, E. *et al.* Myelin basic protein-specific T lymphocyte repertoire in multiple sclerosis. Complexity of the response and dominance of nested epitopes due to recruitment of multiple T cell clones. *J. Clin. Invest.* **92**, 2633-2643 (1993).

257. Valli, A. *et al.* Binding of myelin basic protein peptides to human histocompatibility leukocyte antigen class II molecules and their recognition by T cells from multiple sclerosis patients. *J. Clin. Invest.* **91**, 616-628 (1993).
258. Vogt, A. B. *et al.* Ligand motifs of HLA-DRB5*0101 and DRB1*1501 molecules delineated from self-peptides. *J. Immunol.* **153**, 1665-1673 (1994).
259. Wucherpfennig, K. W. *et al.* Structural requirements for binding of an immunodominant myelin basic protein peptide to DR2 isotypes and for its recognition by human T cell clones. *J. Exp. Med.* **179**, 279-290 (1994).
260. Bruno, R. *et al.* Multiple sclerosis candidate autoantigens except myelin oligodendrocyte glycoprotein are transcribed in human thymus. *Eur. J. Immunol.* **32**, 2737-2747 (2002).
261. Klein, L., Klugmann, M., Nave, K. A., Tuohy, V. K. & Kyewski, B. Shaping of the autoreactive T-cell repertoire by a splice variant of self protein expressed in thymic epithelial cells. *Nat. Med.* **6**, 56-61 (2000).
262. Waldner, H., Whitters, M. J., Sobel, R. A., Collins, M. & Kuchroo, V. K. Fulminant spontaneous autoimmunity of the central nervous system in mice transgenic for the myelin proteolipid protein-specific T cell receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97**, 3412-3417 (2000).
263. Kennedy, M. K. *et al.* Inhibition of murine relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis by immune tolerance to proteolipid protein and its encephalitogenic peptides. *J. Immunol.* **144**, 909-915 (1990).
264. Vanderlugt, C. L. & Miller, S. D. Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 85-95 (2002).
265. Correale, J., McMillan, M., McCarthy, K., Le, T. & Weiner, L. P. Isolation and characterization of autoreactive proteolipid protein-peptide specific T-cell clones from multiple sclerosis patients. *Neurology* **45**, 1370-1378 (1995).
266. Greer, J. M. *et al.* Increased immunoreactivity to two overlapping peptides of myelin proteolipid protein in multiple sclerosis. *Brain* **120 (Pt 8)**, 1447-1460 (1997).
267. Andersson, M. *et al.* Multiple MAG peptides are recognized by circulating T and B lymphocytes in polyneuropathy and multiple sclerosis. *Eur. J. Neurol.* **9**, 243-251 (2002).
268. Holz, A., Bielekova, B., Martin, R. & Oldstone, M. B. Myelin-associated oligodendrocytic basic protein: identification of an encephalitogenic epitope and association with multiple sclerosis. *J. Immunol.* **164**, 1103-1109 (2000).
269. Jurewicz, A., Biddison, W. E. & Antel, J. P. MHC class I-restricted lysis of human oligodendrocytes by myelin basic protein peptide-specific CD8 T lymphocytes. *J. Immunol.* **160**, 3056-3059 (1998).
270. Medana, I. M. *et al.* MHC class I-restricted killing of neurons by virus-specific CD8+ T lymphocytes is effected through the Fas/FasL, but not the perforin pathway. *Eur. J. Immunol.* **30**, 3623-3633 (2000).

271. Skulina, C. *et al.* Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8⁺ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **101**, 2428-2433 (2004).
272. Cabarrocas, J., Bauer, J., Piaggio, E., Liblau, R. & Lassmann, H. Effective and selective immune surveillance of the brain by MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **33**, 1174-1182 (2003).
273. Neumann, H. Molecular mechanisms of axonal damage in inflammatory central nervous system diseases. *Curr. Opin. Neurol.* **16**, 267-273 (2003).
274. Honma, K. *et al.* Identification of an epitope derived from human proteolipid protein that can induce autoreactive CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes restricted by HLA-A3: evidence for cross-reactivity with an environmental microorganism. *J. Neuroimmunol.* **73**, 7-14 (1997).
275. Tsuchida, T. *et al.* Autoreactive CD8⁺ T-cell responses to human myelin protein-derived peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **91**, 10859-10863 (1994).
276. Zang, Y. C. *et al.* Increased CD8⁺ cytotoxic T cell responses to myelin basic protein in multiple sclerosis. *J. Immunol.* **172**, 5120-5127 (2004).
277. KABAT, E. A., FREEDMAN, D. A., Murray, J. P. & Knaub, V. A study of the crystalline albumin, gamma globulin and total protein in the cerebrospinal fluid of 100 cases of multiple sclerosis and in other diseases. *Am. J. Med. Sci.* **219**, 55-64 (1950).
278. Baranzini, S. E. *et al.* B cell repertoire diversity and clonal expansion in multiple sclerosis brain lesions. *J. Immunol.* **163**, 5133-5144 (1999).
279. Owens, G. P. *et al.* Restricted use of VH4 germline segments in an acute multiple sclerosis brain. *Ann. Neurol.* **43**, 236-243 (1998).
280. Qin, Y. *et al.* Clonal expansion and somatic hypermutation of V(H) genes of B cells from cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* **102**, 1045-1050 (1998).
281. Wang, L. Y. & Fujinami, R. S. Enhancement of EAE and induction of autoantibodies to T-cell epitopes in mice infected with a recombinant vaccinia virus encoding myelin proteolipid protein. *J. Neuroimmunol.* **75**, 75-83 (1997).
282. Wucherpfennig, K. W. *et al.* Recognition of the immunodominant myelin basic protein peptide by autoantibodies and HLA-DR2-restricted T cell clones from multiple sclerosis patients. Identity of key contact residues in the B-cell and T-cell epitopes. *J. Clin. Invest.* **100**, 1114-1122 (1997).
283. Lou, Y. H., Park, K. K., Agersborg, S., Alard, P. & Tung, K. S. Retargeting T cell-mediated inflammation: a new perspective on autoantibody action. *J. Immunol.* **164**, 5251-5257 (2000).
284. Esiri, M. M. Immunoglobulin-containing cells in multiple-sclerosis plaques. *Lancet* **2**, 478 (1977).

285. Genain, C. P., Cannella, B., Hauser, S. L. & Raine, C. S. Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat. Med.* **5**, 170-175 (1999).
286. Mattson, D. H., Roos, R. P. & Arnason, B. G. Isoelectric focusing of IgG eluted from multiple sclerosis and subacute sclerosing panencephalitis brains. *Nature* **287**, 335-337 (1980).
287. Goldenberg, P. Z. *et al.* Opsonization of normal myelin by anti-myelin antibodies and normal serum. *J. Neuroimmunol.* **23**, 157-166 (1989).
288. Trotter, J., DeJong, L. J. & Smith, M. E. Opsonization with antimyelin antibody increases the uptake and intracellular metabolism of myelin in inflammatory macrophages. *J. Neurochem.* **47**, 779-789 (1986).
289. van der Laan, L. J. *et al.* Macrophage phagocytosis of myelin in vitro determined by flow cytometry: phagocytosis is mediated by CR3 and induces production of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide. *J. Neuroimmunol.* **70**, 145-152 (1996).
290. Mead, R. J., Singhrao, S. K., Neal, J. W., Lassmann, H. & Morgan, B. P. The membrane attack complex of complement causes severe demyelination associated with acute axonal injury. *J. Immunol.* **168**, 458-465 (2002).
291. Cortese, I. *et al.* Identification of peptides specific for cerebrospinal fluid antibodies in multiple sclerosis by using phage libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93**, 11063-11067 (1996).
292. O'Connor, K. C. *et al.* Myelin basic protein-reactive autoantibodies in the serum and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients are characterized by low-affinity interactions. *J. Neuroimmunol.* **136**, 140-148 (2003).
293. Sun, J. B. *et al.* Autoreactive T and B cells responding to myelin proteolipid protein in multiple sclerosis and controls. *Eur. J. Immunol.* **21**, 1461-1468 (1991).
294. Warren, K. G., Catz, I., Johnson, E. & Mielke, B. Anti-myelin basic protein and anti-proteolipid protein specific forms of multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **35**, 280-289 (1994).
295. Linington, C., Bradl, M., Lassmann, H., Brunner, C. & Vass, K. Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *Am. J. Pathol.* **130**, 443-454 (1988).
296. Litzemberger, T. *et al.* B lymphocytes producing demyelinating autoantibodies: development and function in gene-targeted transgenic mice. *J. Exp. Med.* **188**, 169-180 (1998).
297. Schluesener, H. J., Sobel, R. A., Linington, C. & Weiner, H. L. A monoclonal antibody against a myelin oligodendrocyte glycoprotein induces relapses and demyelination in central nervous system autoimmune disease. *J. Immunol.* **139**, 4016-4021 (1987).

298. Storch, M. K. *et al.* Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. *Brain Pathol.* **8**, 681-694 (1998).
299. Genain, C. P. *et al.* Antibody facilitation of multiple sclerosis-like lesions in a nonhuman primate. *J. Clin. Invest.* **96**, 2966-2974 (1995).
300. Lindert, R. B. *et al.* Multiple sclerosis: B- and T-cell responses to the extracellular domain of the myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Brain* **122 (Pt 11)**, 2089-2100 (1999).
301. Sun, J. *et al.* T and B cell responses to myelin-oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis. *J. Immunol.* **146**, 1490-1495 (1991).
302. Benczur, M. *et al.* Dysfunction of natural killer cells in multiple sclerosis: a possible pathogenetic factor. *Clin. Exp. Immunol.* **39**, 657-662 (1980).
303. Kastrukoff, L. F. *et al.* A role for natural killer cells in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **86**, 123-133 (1998).
304. Kastrukoff, L. F. *et al.* Clinical relapses of multiple sclerosis are associated with 'novel' valleys in natural killer cell functional activity. *J. Neuroimmunol.* **145**, 103-114 (2003).
305. Munschauer, F. E., Hartrich, L. A., Stewart, C. C. & Jacobs, L. Circulating natural killer cells but not cytotoxic T lymphocytes are reduced in patients with active relapsing multiple sclerosis and little clinical disability as compared to controls. *J. Neuroimmunol.* **62**, 177-181 (1995).
306. Weber, W. E., Buurman, W. A., Vandermeeren, M. M., Medaer, R. H. & Raus, J. C. Fine analysis of cytolytic and natural killer T lymphocytes in the CSF in multiple sclerosis and other neurologic diseases. *Neurology* **37**, 419-425 (1987).
307. Matsumoto, Y. *et al.* Role of natural killer cells and TCR gamma delta T cells in acute autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* **28**, 1681-1688 (1998).
308. Zhang, B., Yamamura, T., Kondo, T., Fujiwara, M. & Tabira, T. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer (NK) cells. *J. Exp. Med.* **186**, 1677-1687 (1997).
309. Smeltz, R. B., Wolf, N. A. & Swanborg, R. H. Inhibition of autoimmune T cell responses in the DA rat by bone marrow-derived NK cells in vitro: implications for autoimmunity. *J. Immunol.* **163**, 1390-1397 (1999).
310. Flügel, A. *et al.* Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunity* **14**, 547-560 (2001).
311. Trapp, B. D. *et al.* Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **338**, 278-285 (1998).
312. Whitaker, J. N. *et al.* An immunochemical comparison of human myelin basic protein and its modified, citrullinated form, C8. *J. Neuroimmunol.* **36**, 135-146 (1992).

313. Brück, W., Lucchinetti, C. & Lassmann, H. The pathology of primary progressive multiple sclerosis. *Mult. Scler.* **8**, 93-97 (2002).
314. Giard, D. J. *et al.* In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **51**, 1417-1423 (1973).
315. Engelhard, V. H., Strominger, J. L., Mescher, M. & Burakoff, S. Induction of secondary cytotoxic T lymphocytes by purified HLA-A and HLA-B antigens reconstituted into phospholipid vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **75**, 5688-5691 (1978).
316. Barnstable, C. J. *et al.* Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis. *Cell* **14**, 9-20 (1978).
317. Rebai, N. & Malissen, B. Structural and genetic analyses of HLA class I molecules using monoclonal xenoantibodies. *Tissue Antigens* **22**, 107-117 (1983).
318. Parham, P. & Brodsky, F. M. Partial purification and some properties of BB7.2. A cytotoxic monoclonal antibody with specificity for HLA-A2 and a variant of HLA-A28. *Hum. Immunol.* **3**, 277-299 (1981).
319. Berger, A. E., Davis, J. E. & Cresswell, P. Monoclonal antibody to HLA-A3. *Hybridoma* **1**, 87-90 (1982).
320. Fong, S. *et al.* Fractionation of human lymphocyte subpopulations on immunoglobulin coated Petri dishes. *J. Immunol. Methods* **44**, 171-182 (1981).
321. Edman, P. A method for the determination of amino acid sequence in peptides. *Arch. Biochem.* **22**, 475 (1949).
322. Edman, P. & Begg, G. A protein sequenator. *Eur. J. Biochem.* **1**, 80-91 (1967).
323. Taylor, G. Disintegration of Water Drops in an Electric Field. *Proc. R. Soc. Lond. A* **280**, 383-397 (1964).
324. Rayleigh, L. On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity. *Philos. Mag.* **14**, 184-186 (1882).
325. Dole, M., Mack, L. L. & Hines, R. L. Molecular Beams of Macroions. *J. Chem. Phys.* **49**, 2240-2249 (1968).
326. Mack, L. L., Kralik, P., Rheude, A. & Dole, M. Molecular Beams of Macroions. II. *J. Chem. Phys.* **52**, 4977-4986 (1970).
327. Iribarne, J. V. & Thomson, B. A. On the evaporation of small ions from charged droplets. *J. Chem. Phys.* **64**, 2287-2294 (1975).
328. de la Mora, J. F. *et al.* Electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry - Discussion. *J. Mass Spectrom.* **35**, 939-952 (2000).

329. Smith, R. D., Loo, J. A., Edmonds, C. G., Barinaga, C. J. & Udseth, H. R. New Developments in Biochemical Mass-Spectrometry - Electrospray Ionization. *Anal. Chem.* **62**, 882-899 (1990).
330. Whitehouse, C. M., Dreyer, R. N., Yamashita, M. & Fenn, J. B. Electrospray Interface for Liquid Chromatographs and Mass Spectrometers. *Anal. Chem.* **57**, 675-679 (1985).
331. Nguyen, S. & Fenn, J. B. Gas-phase ions of solute species from charged droplets of solutions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **104**, 1111-1117 (2007).
332. Wilm, M. & Mann, M. Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal. Chem.* **68**, 1-8 (1996).
333. Kingdon, K. H. A method for the neutralization of electron space charge by positive ionization at very low gas pressures. *Phys. Rev.* **21**, 408-418 (1923).
334. Hu, Q. *et al.* The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J. Mass Spectrom.* **40**, 430-443 (2005).
335. Scigelova, M. & Makarov, A. Orbitrap mass analyzer--overview and applications in proteomics. *Proteomics*. **6 Suppl 2**, 16-21 (2006).
336. Makarov, A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Anal. Chem.* **72**, 1156-1162 (2000).
337. Senko, M. W., Canterbury, J. D., Guan, S. & Marshall, A. G. A high-performance modular data system for Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**, 1839-1844 (1996).
338. Makarov, A. *et al.* Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. *Anal. Chem.* **78**, 2113-2120 (2006).
339. Olsen, J. V. *et al.* Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. *Mol. Cell. Proteomics* **4**, 2010-2021 (2005).
340. Wysocki, V. H., Tsaprailis, G., Smith, L. L. & Brechi, L. A. Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation. *J. Mass Spectrom.* **35**, 1399-1406 (2000).
341. Hunt, D. F., Yates, J. R., III, Shabanowitz, J., Winston, S. & Hauer, C. R. Protein sequencing by tandem mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **83**, 6233-6237 (1986).
342. Kinter, M. & Sherman, N. E. *Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry.*, pp. 64-116 (Wiley,2000).
343. Papayannopoulos, I. A. The Interpretation of Collision-Induced Dissociation Tandem Mass-Spectra of Peptides. *Mass Spectrom. Rev.* **14**, 49-73 (1995).
344. Roepstorff, P. & Fohlman, J. Proposal for A Common Nomenclature for Sequence Ions in Mass-Spectra of Peptides. *Biomed. Mass Spectrom.* **11**, 601 (1984).

345. Biemann, K. Mass spectrometry of peptides and proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 977-1010 (1992).
346. Falick, A. M., Hines, W. M., Medzihradzky, K. F., Baldwin, M. A. & Gibson, B. W. Low-Mass Ions Produced from Peptides by High-Energy Collision-Induced Dissociation in Tandem Mass-Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **4**, 882-893 (1993).
347. Koenig, T. *et al.* Robust prediction of the MASCOT score for an improved quality assessment in mass spectrometric proteomics. *J. Proteome Res.* **7**, 3708-3717 (2008).
348. Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M. & Cottrell, J. S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20**, 3551-3567 (1999).
349. Pappin, D. J., Hojrup, P. & Bleasby, A. J. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr. Biol.* **3**, 327-332 (1993).
350. Schlosser, A. & Volkmer-Engert, R. Volatile polydimethylcyclosiloxanes in the ambient laboratory air identified as source of extreme background signals in nanoelectrospray mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **38**, 523-525 (2003).
351. Fissolo, N. *et al.* Naturally presented peptides on major histocompatibility complex I and II molecules eluted from central nervous system of multiple sclerosis patients. *Mol. Cell. Proteomics* **8**, 2090-2101 (2009).
352. Alexander, J. S. *et al.* Proteomic analysis of human cerebral endothelial cells activated by multiple sclerosis serum and IFNbeta-1b. *J. Mol. Neurosci.* **32**, 169-178 (2007).
353. Dutta, R. *et al.* Activation of the ciliary neurotrophic factor (CNTF) signalling pathway in cortical neurons of multiple sclerosis patients. *Brain* **130**, 2566-2576 (2007).
354. Sharief, M. K. & Semra, Y. K. Heightened expression of survivin in activated T lymphocytes from patients with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **119**, 358-364 (2001).
355. Bielekova, B. & Martin, R. Development of biomarkers in multiple sclerosis. *Brain* **127**, 1463-1478 (2004).
356. Kulakowska, A., Drozdowski, W., Sadzynski, A., Bucki, R. & Janmey, P. A. Gelsolin concentration in cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis and other neurological disorders. *Eur. J. Neurol.* **15**, 584-588 (2008).
357. Wu, H. Y., Dawson, M. R., Reynolds, R. & Hardy, R. J. Expression of QKI proteins and MAP1B identifies actively myelinating oligodendrocytes in adult rat brain. *Mol. Cell Neurosci.* **17**, 292-302 (2001).
358. Liu, A. *et al.* Expression of stathmin, a developmentally controlled cytoskeleton-regulating molecule, in demyelinating disorders. *J. Neurosci.* **25**, 737-747 (2005).
359. Libich, D. S. *et al.* Interaction of the 18.5-kD isoform of myelin basic protein with Ca²⁺-calmodulin: effects of deimination assessed by intrinsic Trp fluorescence

- spectroscopy, dynamic light scattering, and circular dichroism. *Protein Sci.* **12**, 1507-1521 (2003).
360. Poggi, A. *et al.* Transendothelial migratory pathways of V delta 1+TCR gamma delta+ and V delta 2+TCR gamma delta+ T lymphocytes from healthy donors and multiple sclerosis patients: involvement of phosphatidylinositol 3 kinase and calcium calmodulin-dependent kinase II. *J. Immunol.* **168**, 6071-6077 (2002).
 361. Werner, P., Pitt, D. & Raine, C. S. Multiple sclerosis: altered glutamate homeostasis in lesions correlates with oligodendrocyte and axonal damage. *Ann. Neurol.* **50**, 169-180 (2001).
 362. Kolln, J. *et al.* Triosephosphate isomerase- and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-reactive autoantibodies in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J. Immunol.* **177**, 5652-5658 (2006).
 363. Gray, S. G. & Dangond, F. Rationale for the use of histone deacetylase inhibitors as a dual therapeutic modality in multiple sclerosis. *Epigenetics* **1**, 67-75 (2006).
 364. Lu, F. *et al.* Oxidative damage to mitochondrial DNA and activity of mitochondrial enzymes in chronic active lesions of multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **177**, 95-103 (2000).
 365. Poggi, A. *et al.* Adhesion molecules and kinases involved in gammadelta T cells migratory pathways: implications for viral and autoimmune diseases. *Curr. Med. Chem.* **14**, 3166-3170 (2007).
 366. Harness, J., Cavanagh, A., Morton, H. & McCombe, P. A protective effect of early pregnancy factor on experimental autoimmune encephalomyelitis induced in Lewis rats by inoculation with myelin basic protein. *J. Neurol. Sci.* **216**, 33-41 (2003).
 367. Bielecki, B., Mazurek, A., Wolinski, P. & Glabinski, A. Treatment of multiple sclerosis with methylprednisolone and mitoxantrone modulates the expression of CXC chemokine receptors in PBMC. *J. Clin. Immunol.* **28**, 122-130 (2008).
 368. Omari, K. M., John, G. R., Sealson, S. C. & Raine, C. S. CXC chemokine receptors on human oligodendrocytes: implications for multiple sclerosis. *Brain* **128**, 1003-1015 (2005).
 369. Hoi, A. Y., Iskander, M. N. & Morand, E. F. Macrophage migration inhibitory factor: a therapeutic target across inflammatory diseases. *Inflamm. Allergy Drug Targets* **6**, 183-190 (2007).
 370. Höftberger, R. *et al.* Expression of major histocompatibility complex class I molecules on the different cell types in multiple sclerosis lesions. *Brain Pathol.* **14**, 43-50 (2004).
 371. Papadopoulos, D., Ewans, L., Pham-Dinh, D., Knott, J. & Reynolds, R. Upregulation of alpha-synuclein in neurons and glia in inflammatory demyelinating disease. *Mol. Cell Neurosci.* **31**, 597-612 (2006).
 372. Malmeström, C., Haghighi, S., Rosengren, L., Andersen, O. & Lycke, J. Neurofilament light protein and glial fibrillary acidic protein as biological markers in MS. *Neurology* **61**, 1720-1725 (2003).

373. Bartos, A. *et al.* Elevated intrathecal antibodies against the medium neurofilament subunit in multiple sclerosis. *J. Neurol.* **254**, 20-25 (2007).
374. Krishnamoorthy, G. *et al.* Myelin-specific T cells also recognize neuronal autoantigen in a transgenic mouse model of multiple sclerosis. *Nat. Med.* **15**, 626-632 (2009).
375. Huizinga, R. *et al.* Immunization with neurofilament light protein induces spastic paresis and axonal degeneration in Biozzi ABH mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **66**, 295-304 (2007).
376. Bartos, A. *et al.* Antibodies against light neurofilaments in multiple sclerosis patients. *Acta Neurol. Scand.* **116**, 100-107 (2007).
377. Rejdak, K., Petzold, A., Stelmasiak, Z. & Giovannoni, G. Cerebrospinal fluid brain specific proteins in relation to nitric oxide metabolites during relapse of multiple sclerosis. *Mult. Scler.* **14**, 59-66 (2008).
378. Hammack, B. N. *et al.* Proteomic analysis of multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *Mult. Scler.* **10**, 245-260 (2004).
379. Gunnarsson, M., Sundstrom, P., Stigbrand, T. & Jensen, P. E. Native and transformed alpha2-macroglobulin in plasma from patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol. Scand.* **108**, 16-21 (2003).
380. Jensen, P. E., Humle, J. S., Datta, P. & Sorensen, P. S. Significantly increased fractions of transformed to total alpha2-macroglobulin concentrations in plasma from patients with multiple sclerosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1690**, 203-207 (2004).
381. Reindl, M. *et al.* Increased intrathecal production of apolipoprotein D in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **119**, 327-332 (2001).
382. Li, F. Q. *et al.* Apolipoprotein E-derived peptides ameliorate clinical disability and inflammatory infiltrates into the spinal cord in a murine model of multiple sclerosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **318**, 956-965 (2006).
383. Sfagos, C. *et al.* Serum ferritin, transferrin and soluble transferrin receptor levels in multiple sclerosis patients. *Mult. Scler.* **11**, 272-275 (2005).
384. Orbach, H. *et al.* Novel biomarkers in autoimmune diseases: prolactin, ferritin, vitamin D, and TPA levels in autoimmune diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1109**, 385-400 (2007).
385. Liu, L. *et al.* Severe disease, unaltered leukocyte migration, and reduced IFN-gamma production in CXCR3^{-/-} mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* **176**, 4399-4409 (2006).
386. Haase, C. G., Schmidt, S. & Faustmann, P. M. Frequencies of the G-protein beta3 subunit C825T polymorphism and the delta 32 mutation of the chemokine receptor-5 in patients with multiple sclerosis. *Neurosci. Lett.* **330**, 293-295 (2002).
387. Petry, H. *et al.* Mx1 and IP-10: biomarkers to measure IFN-beta activity in mice following gene-based delivery. *J. Interferon Cytokine Res.* **26**, 699-705 (2006).

388. Wilczak, N. *et al.* Insulin-like growth factor II receptors in human brain and their absence in astrogliotic plaques in multiple sclerosis. *Brain Res.* **863**, 282-288 (2000).
389. Deng, X., Ljunggren-Rose, A., Maas, K. & Sriram, S. Defective ATM-p53-mediated apoptotic pathway in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **58**, 577-584 (2005).
390. Wosik, K. *et al.* Oligodendrocyte injury in multiple sclerosis: a role for p53. *J. Neurochem.* **85**, 635-644 (2003).
391. Leech, S., Kirk, J., Plumb, J. & McQuaid, S. Persistent endothelial abnormalities and blood-brain barrier leak in primary and secondary progressive multiple sclerosis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **33**, 86-98 (2007).
392. Mathey, E. K. *et al.* Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury. *J. Exp. Med.* **204**, 2363-2372 (2007).
393. Krogsgaard, M. *et al.* Visualization of myelin basic protein (MBP) T cell epitopes in multiple sclerosis lesions using a monoclonal antibody specific for the human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DR2-MBP 85-99 complex. *J. Exp. Med.* **191**, 1395-1412 (2000).
394. Madsen, L. S. *et al.* A humanized model for multiple sclerosis using HLA-DR2 and a human T-cell receptor. *Nat. Genet.* **23**, 343-347 (1999).
395. Yeo, T. W. *et al.* A second major histocompatibility complex susceptibility locus for multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **61**, 228-236 (2007).
396. Brynedal, B. *et al.* HLA-A confers an HLA-DRB1 independent influence on the risk of multiple sclerosis. *PLoS One* **2**, e664 (2007).
397. Manoury, B. *et al.* Destructive processing by asparagine endopeptidase limits presentation of a dominant T cell epitope in MBP. *Nat. Immunol.* **3**, 169-174 (2002).
398. Anderton, S. M., Viner, N. J., Matharu, P., Lowrey, P. A. & Wraith, D. C. Influence of a dominant cryptic epitope on autoimmune T cell tolerance. *Nat. Immunol.* **3**, 175-181 (2002).
399. Bizzozero, O. A., Malkoski, S. P., Mobarak, C., Bixler, H. A. & Evans, J. E. Mass-spectrometric analysis of myelin proteolipids reveals new features of this family of palmitoylated membrane proteins. *J. Neurochem.* **81**, 636-645 (2002).
400. Tetzloff, S. U. & Bizzozero, O. A. Palmitoylation of proteolipid protein from rat brain myelin using endogenously generated 18O-fatty acids. *J. Biol. Chem.* **273**, 279-285 (1998).
401. Han, M. H. *et al.* Proteomic analysis of active multiple sclerosis lesions reveals therapeutic targets. *Nature* **451**, 1076-1081 (2008).
402. Harrison, L. C. *et al.* Type 1 diabetes: lessons for other autoimmune diseases? *J. Autoimmun.* **31**, 306-310 (2008).
403. Ambrosini, G., Adida, C. & Altieri, D. C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat. Med.* **3**, 917-921 (1997).

404. Altieri, D. C. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 46-54 (2003).
405. Schimmer, A. D. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res.* **64**, 7183-7190 (2004).
406. Li, F. Survivin study: what is the next wave? *J. Cell Physiol.* **197**, 8-29 (2003).
407. Wu, J. *et al.* Molecular mechanism of inhibition of survivin transcription by the GC-rich sequence-selective DNA binding antitumor agent, hedamycin: evidence of survivin down-regulation associated with drug sensitivity. *J. Biol. Chem.* **280**, 9745-9751 (2005).
408. Schmidt, W. *et al.* Cell-free tumor antigen peptide-based cancer vaccines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **94**, 3262-3267 (1997).
409. Reker, S. *et al.* Identification of novel survivin-derived CTL epitopes. *Cancer Biol. Ther.* **3**, 173-179 (2004).
410. Andersen, M. H. *et al.* Spontaneous cytotoxic T-cell responses against survivin-derived MHC class I-restricted T-cell epitopes in situ as well as ex vivo in cancer patients. *Cancer Res.* **61**, 5964-5968 (2001).
411. Andersen, M. H., Pedersen, L. O., Becker, J. C. & Straten, P. T. Identification of a cytotoxic T lymphocyte response to the apoptosis inhibitor protein survivin in cancer patients. *Cancer Res.* **61**, 869-872 (2001).
412. Schmitz, M. *et al.* Generation of survivin-specific CD8⁺ T effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides. *Cancer Res.* **60**, 4845-4849 (2000).
413. Andersen, M. H., Soerensen, R. B., Becker, J. C. & Straten, P. T. HLA-A24 and survivin: possibilities in therapeutic vaccination against cancer. *J. Transl. Med.* **4**, 38 (2006).
414. Reker, S. *et al.* HLA-B35-restricted immune responses against survivin in cancer patients. *Int. J. Cancer* **108**, 937-941 (2004).
415. Satoh, K. *et al.* Expression of survivin is correlated with cancer cell apoptosis and is involved in the development of human pancreatic duct cell tumors. *Cancer* **92**, 271-278 (2001).
416. Lladser, A. *et al.* Naked DNA immunization as an approach to target the generic tumor antigen survivin induces humoral and cellular immune responses in mice. *Immunobiology* **211**, 11-27 (2006).
417. Lladser, A. *et al.* Intradermal DNA electroporation induces survivin-specific CTLs, suppresses angiogenesis and confers protection against mouse melanoma. *Cancer Immunol. Immunother.* **59**, 81-92 (2010).
418. Xiang, R. *et al.* A DNA vaccine targeting survivin combines apoptosis with suppression of angiogenesis in lung tumor eradication. *Cancer Res.* **65**, 553-561 (2005).

419. Zeis, M. *et al.* Generation of cytotoxic responses in mice and human individuals against hematological malignancies using survivin-RNA-transfected dendritic cells. *J. Immunol.* **170**, 5391-5397 (2003).
420. Wang, X. F. *et al.* Comprehensive analysis of HLA-DR- and HLA-DP4-restricted CD4+ T cell response specific for the tumor-shared antigen survivin in healthy donors and cancer patients. *J. Immunol.* **181**, 431-439 (2008).
421. Casati, C. *et al.* The apoptosis inhibitor protein survivin induces tumor-specific CD8+ and CD4+ T cells in colorectal cancer patients. *Cancer Res.* **63**, 4507-4515 (2003).
422. Tsuruma, T. *et al.* Clinical and immunological evaluation of anti-apoptosis protein, survivin-derived peptide vaccine in phase I clinical study for patients with advanced or recurrent breast cancer. *J. Transl. Med.* **6**, 24 (2008).
423. Clay, T. M. *et al.* Changes in the fine specificity of gp100(209-217)-reactive T cells in patients following vaccination with a peptide modified at an HLA-A2.1 anchor residue. *J. Immunol.* **162**, 1749-1755 (1999).
424. Zamparese, R. *et al.* Survivin expression in renal cell carcinoma. *Cancer Invest.* **26**, 929-935 (2008).
425. Lozzio, C. B. & Lozzio, B. B. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* **45**, 321-334 (1975).

7. Anhang

7.1 Identifizierte HLA-Liganden aus JY

Tab. 7.1: HLA-Liganden aus JY. Liste der 757 Liganden inklusive m/z-Verhältnis, Ladungszustand, einfach geladene Masse und HLA-Zuordnung

Sequence	Charge	m/z [Da]	MH+ [Da]	HLA
AALAARGAAL	2	442.76914	884.53101	A*02:01
AARAIISEL	2	472.28210	943.55693	n.a.
AARAVTGVL	2	429.26373	857.52019	n.a.
AARPATSTL	2	444.25061	887.49394	A*02:01
AASGAAAARL	2	429.74313	858.47898	n.a.
AASKERSGVSL	2	552.80372	1104.60017	A*02:01
AAYLRALSL	2	489.29230	977.57732	A*02:01
AFPPSVRAL	2	479.27914	957.55101	n.a.
AIVDKVPSV	2	464.27879	927.55031	A*02:01
ALAEIAKAEL	2	514.80277	1028.59827	A*02:01
ALATLIHQV	2	483.29256	965.57785	A*02:01
ALDPLADKILI	2	591.36008	1181.71287	A*02:01
ALFKAWAL	2	460.27349	919.53970	A*02:01
ALFPERITV	2	523.30536	1045.60344	A*02:01
ALFQRPPLI	2	527.82391	1054.64055	A*02:01
ALGAPRNSV	2	442.75094	884.49460	A*02:01
ALIEKLVEL	2	514.32307	1027.63887	A*02:01
ALITRIFGV	2	495.31079	989.61431	A*02:01
ALLDKLYAL	2	510.30991	1019.61255	A*02:01
ALLDRIVSV	2	493.30534	985.60340	A*02:01
ALLEQVNAL	2	485.78250	970.55773	A*02:01
ALLKIEGVYA	2	538.82062	1076.63396	A*02:01
ALMELFPKL	2	531.30621	1061.60515	A*02:01
ALMPVLNQV	2	492.78061	984.55393	A*02:01
ALNEEAGRLLL	2	599.84302	1198.67876	A*02:01
ALPEIFTEL	2	516.78387	1032.56047	n.a.
ALQEKLWNV	2	550.80725	1100.60723	A*02:01
ALRKNTALLL	2	621.38406	1241.76084	A*02:01
ALRLPSLLL	2	498.33378	995.66029	A*02:01
ALSDHHIYL	2	534.77661	1068.54595	A*02:01
ALSKEGIVAL	2	500.80499	1000.60271	A*02:01
ALTELLAKI	2	486.31027	971.61327	A*02:01
ALVDQLWKL	2	543.32082	1085.63437	A*02:01
ALVDQRELYL	2	610.33735	1219.66742	A*02:01
ALWDKLFNL	2	560.31311	1119.61894	A*02:01
AMFGKLMTI	2	506.27165	1011.53602	A*02:01
APAGGSPRML	2	478.75238	956.49748	B*07:02

APAGRKVG	2	434.77170	868.53612	B*07:02
APAGTRSQV	2	443.74062	886.47396	B*07:02
APALARTLQSL	2	570.84015	1140.67302	B*07:02
APAMIRISL	2	486.28857	971.56987	B*07:02
APAPAAHVA	2	402.72184	804.43641	B*07:02
APAPAAQRL	2	447.76112	894.51496	B*07:02
APAPAEKTPV	2	490.77380	980.54033	B*07:02
APAPAQHI	2	402.72186	804.43644	B*07:02
APAPIHNQF	2	497.75842	994.50957	B*07:02
APAPPKAEA	2	426.23481	851.46235	B*07:02
APAPPRSL	2	404.73758	808.46788	fragment
APAPRPSLL	2	461.27903	921.55079	B*07:02
APAPSKGQTL	2	485.27127	969.53526	B*07:02
APASPFQRQL	2	493.77423	986.54119	A*02:01
APDGSQRAVL	2	507.27188	1013.53649	B*07:02
APDKHHITPLL	2	621.35364	1241.70000	B*07:02
APELLRALL	2	498.31592	995.62456	B*07:02
APFLRNVEL	2	529.80298	1058.59868	B*07:02
APGPGRKEL	2	462.76672	924.52617	B*07:02
APGPPGRSM	2	435.21829	869.42931	B*07:02
APGPPGRSML	2	491.76027	982.51327	B*07:02
APGQRVGML	2	464.75497	928.50267	B*07:02
APGVRAVEL	2	456.26874	911.53020	B*07:02
APGVRVLSL	2	456.28716	911.56705	B*07:02
APIAKVGV	2	434.28643	867.56558	B*07:02
APILKRAL	2	441.30002	881.59276	B*07:02
APKPGGLSL	2	420.25277	839.49827	B*07:02
APKRPPSAF	2	485.77625	970.54521	B*07:02
APKSQIVML	2	493.78833	986.56938	B*07:02
APLPRPGAVL	2	495.80790	990.60852	B*07:02
APMSAAHQL	2	463.23160	925.45592	B*07:02
APNYRLKSL	2	531.30853	1061.60979	B*07:02
APPEYHRKAV	2	584.31689	1167.62651	B*07:02
APRAGEQGEAM	2	558.75867	1116.51006	B*07:02
APRAGQPLQL	2	525.80591	1050.60454	B*07:02
APRALLLLL	2	490.33652	979.66576	B*07:02
APREALAQTVL	2	584.83751	1168.66774	B*07:02
APREGISQEAL	2	585.80945	1170.61162	B*07:02
APREGQGSSAV	2	529.76456	1058.52184	B*07:02
APRELGLGL	2	463.27696	925.54665	B*07:02
APREPPPVEL	2	552.80551	1104.60374	B*07:02
APRGGAQTPL	2	484.26950	967.53172	B*07:02
APRGKSGAAL	2	464.27180	927.53633	B*07:02
APRGTWSTGL	2	523.27454	1045.54180	B*07:02
APRHGSLGF	2	471.25128	941.49529	B*07:02
APRIITGPAPVL	2	602.87378	1204.74028	B*07:02
APRKKSPDL	2	506.30039	1011.59351	B*07:02
APRLGISL	2	413.75995	826.51262	B*07:02
APRLPITGL	2	469.29480	937.58233	B*07:02
APRLQSEVAEL	2	606.83252	1212.65776	B*07:02
APRNSPTGL	2	456.74850	912.48973	B*07:02
APRPAGSYL	2	466.25320	931.49913	B*07:02

APRPDSRHHS	2	636.83126	1272.65525	B*07:02
APRPFPEVSL	2	556.80823	1112.60918	B*07:02
APRPPPKPM	2	495.78067	990.55406	B*07:02
APRPPQDLIGL	2	588.83980	1176.67233	B*07:02
APRQPGLMA	2	470.75485	940.50243	B*07:02
APRQPGLMAQM	2	600.30443	1199.60159	B*07:02
APRTVALTA	2	450.26839	899.52950	B*07:02
APRTVALTAL	2	506.81069	1012.61410	B*07:02
APRTVALTALL	2	563.35270	1125.69812	B*07:02
APRTVLLLLSA	2	577.36829	1153.72930	B*07:02
APSEYRYTLL	2	606.81622	1212.62517	B*07:02
APSGGRLLSA	2	464.76385	928.52043	B*07:02
APSGTRVVQVL	2	563.83221	1126.65715	B*07:02
APSHLMALLTL	2	583.83344	1166.65959	B*07:02
APSLKQFSL	2	495.78394	990.56059	B*07:02
APSPPLRAL	2	461.27921	921.55114	B*07:02
APSPRPLSL	2	469.27658	937.54588	B*07:02
APSPVIPRL	2	475.29526	949.58324	B*07:02
APSQQRQQI	2	528.28278	1055.55828	B*07:02
APTKRKSL	2	450.78488	900.56249	B*07:02
APTPARPVL	2	461.27893	921.55058	B*07:02
APVLPHTAV	2	452.76596	904.52464	B*07:02
APYMRSMMQSL	2	657.80383	1314.60039	B*07:02
APYSRPKQL	2	530.30054	1059.59380	B*07:02
ATREAGSAL	2	438.23264	875.45800	A*02:01
AVDPNRAVPL	2	526.29781	1051.58835	A*02:01
AVEQVSQLL	2	493.78027	986.55327	A*02:01
AVERLISSL	2	494.29486	987.58245	A*02:01
DLRNSLSL	2	459.25623	917.50517	A*02:01
DPGLGLRLIY	2	558.82404	1116.64079	n.a.
EENVIKLNK	3	400.57152	1199.70002	artefact
ELLDEGAKLL	2	550.81338	1100.61948	A*02:01
ELQQLSLEL	2	536.79755	1072.58782	A*02:01
ELRGRSEAEI	2	580.30866	1159.61005	A*02:01
EVRQLFKL	2	516.81311	1032.61894	A*02:01
FASHVSPEV	2	486.74261	972.47795	A*02:01
FIIQLRSV	2	516.81309	1032.61891	A*02:01
FLADPSAFVAA	2	554.78699	1108.56670	A*02:01
FLAKLIAQA	2	487.80511	974.60295	A*02:01
FLASESLIKQI	2	624.86338	1248.71949	A*02:01
FLEKLLPPV	2	528.32827	1055.64926	A*02:01
FLFDTQHFI	2	584.29484	1167.58240	A*02:01
FLFEPVVKA	2	525.30477	1049.60226	A*02:01
FLIRESETL	2	554.30574	1107.60420	A*02:01
FLLDGFPRTV	2	582.82392	1164.64057	A*02:01
FLLDKKIGV	2	516.82577	1032.64427	A*02:01
FLLEGIRSL	2	524.31311	1047.61895	A*02:01
FLLEKGYEV	2	549.29688	1097.58647	A*02:01
FLLEKPFVS	2	540.31006	1079.61284	A*02:01
FLLGPRLVLA	2	549.85510	1098.70293	A*02:01
FLLPHPGLQV	2	560.82910	1120.65093	A*02:01
FLLPKVQSIQL	2	643.39697	1285.78667	A*02:01

FLPPYTFQI	2	563.30220	1125.59713	A*02:01
FLSELTQQL	2	539.79224	1078.57720	A*02:01
FLTKQEILL	2	552.83621	1104.66515	A*02:01
FLVQNIHTL	2	542.81055	1084.61382	A*02:01
FLWDEGFHQL	2	646.30908	1291.61089	A*02:01
FLYAGHIFL	2	540.79705	1080.58683	A*02:01
FMLPDPQNI	2	537.76756	1074.52785	A*02:01
FPMELRQFL	2	590.81207	1180.61687	B*07:02
FPNIPGKSL	2	486.77901	972.55075	B*07:02
FPRFGGSL	2	440.73749	880.46770	B*07:02
FPRSPGQPSSL	2	586.80615	1172.60503	B*07:02
FPSLREAAL	2	502.28146	1003.55565	B*07:02
FQNPFRSEL	2	569.28778	1137.56828	n.a.
FRNVEVLIY	2	576.82410	1152.64092	n.a.
FRTPHVLVL	2	541.32928	1081.65129	n.a.
FVDDYTVRV	2	557.28210	1113.55693	A*02:01
GLADASLLKKV	2	557.84454	1114.68181	A*02:01
GLADKVVYFL	2	513.28674	1025.56620	A*02:01
GLGPPGRSV	2	420.24014	839.47301	A*02:01
GLGRATAAGAL	2	479.27720	957.54712	A*02:01
GLIDKVNEL	2	500.78714	1000.56700	A*02:01
GLIEILKKV	2	506.84127	1012.67527	A*02:01
GLTSTDLLFHL	2	608.83203	1216.65679	A*02:01
GLVTPRGSSL	2	493.78455	986.56182	A*02:01
GLWGPEEPPHL	2	632.30377	1263.60027	A*02:01
GLYGAIFRL	2	505.29523	1009.58318	A*02:01
GLYPNLIQV	2	508.79212	1016.57696	A*02:01
GMYGKIAVMEL	2	606.31146	1211.61565	A*02:01
GPALGRSFL	2	459.26368	917.52009	B*07:02
GPLPGNPIL	2	487.78687	974.56645	B*07:02
GPNPKSSRTTL	2	579.31708	1157.62688	B*07:02
GPREADFRQL	2	537.29572	1073.58415	B*07:02
GPREADVSGL	2	443.24302	885.47876	B*07:02
GPRFTLKLRSI	3	429.93451	1287.78897	B*07:02
GPRPITQSEL	2	549.30084	1097.59441	B*07:02
GQTLGKPLLI	2	520.32867	1039.65007	n.a.
GVAESIHLWEV	2	620.32129	1239.63530	A*02:01
GVRPPAPSL	2	447.26337	893.51946	A*02:01
HAAAYRNAL	2	493.76168	986.51609	n.a.
HLANIVERV	2	525.80548	1050.60369	A*02:01
HLLLARQI	2	482.30856	963.60985	A*02:01
HLLNESPML	2	527.27307	1053.53887	A*02:01
HLSIINEYL	2	551.30017	1101.59307	A*02:01
HPAGPRTVF	2	491.26602	981.52477	B*07:02
HPINPRVAL	2	508.80298	1016.59868	B*07:02
HPIYNIKSL	2	542.81055	1084.61382	B*07:02
HPRDPNLLL	2	537.80582	1074.60436	B*07:02
HPRDPNLLLSV	2	630.85619	1260.70510	B*07:02
HPREPALGP	2	487.26401	973.52074	n.a.
HPRSPNVLSV	2	553.30872	1105.61016	B*07:02
HPRSPNVLSVAL	2	645.36945	1289.73161	B*07:02
HPRVPSLTTV	2	553.81891	1106.63054	B*07:02

HPSRPSLLL	2	510.30309	1019.59889	B*07:02
HRNEVTVEL	2	548.79047	1096.57366	n.a.
IAAQDLLLAV	2	513.81323	1026.61919	A*02:01
IARLPSSTL	2	479.28940	957.57152	A*02:01
IISTLDGRI	2	494.29605	987.58483	A*02:01
IKEVDIYTV	2	540.30231	1079.59734	n.a.
ILDKKVEKV	2	536.34216	1071.67704	A*02:01
ILDPHVLL	2	509.81822	1018.62917	A*02:01
ILDQKINEV	2	536.30536	1071.60344	A*02:01
ILLKDILSV	2	507.33392	1013.66057	A*02:01
ILLRDLPTL	2	527.33679	1053.66631	A*02:01
ILMEHIHKL	2	567.32806	1133.64885	A*02:01
ILQNKIDL	2	528.32617	1055.64507	A*02:01
ILSKDGVLYV	2	553.82605	1106.64482	A*02:01
ILTDITKGV	2	480.29196	959.57665	A*02:01
ILVPSEKKV	2	506.82309	1012.63890	A*02:01
IMLEALERV	2	537.30444	1073.60161	A*02:01
INPYVAVQV	2	501.78409	1002.56090	n.a.
IPAEGRVAL	2	463.27660	925.54593	B*07:02
IPAKLHNSL	2	496.79764	992.58800	B*07:02
IPAKPPVSF	2	478.28387	955.56047	B*07:02
IPDASKLQFIL	2	622.86597	1244.72466	B*07:02
IPKQVSISF	2	509.79959	1018.59191	B*07:02
IPMILLALI	2	498.83144	996.65560	B*07:02
IPNERTMQL	2	551.28918	1101.57109	B*07:02
IPRPVDGVEV	2	540.80569	1080.60410	B*07:02
IPRTPLSPSPM	2	598.32831	1195.64934	B*07:02
IPSIRNGIL	2	491.80547	982.60367	B*07:02
IPTSARSML	2	488.26763	975.52798	B*07:02
IPYGERITL	2	531.30298	1061.59868	B*07:02
IQSSHNFQL	2	537.27356	1073.53984	n.a.
IRKPYIWEY	2	634.34515	1267.68303	n.a.
IVISSARAGGLA	2	557.83331	1114.65935	n.a.
KAAAKRQVL	2	492.81891	984.63054	A*02:01
KAASVRPVL	2	470.80034	940.59341	A*02:01
KDARKGPLVP	2	540.83128	1080.65529	artefact
KIADFGWSV	2	511.76863	1022.52999	A*02:01
KIFEMGPVFTL	2	641.34897	1281.69067	A*02:01
KILDLETQL	2	536.81592	1072.62456	A*02:01
KILPTLEAV	2	492.30963	983.61199	A*02:01
KIMTEKELLAV	2	637.87274	1274.73821	A*02:01
KINKKRIAL	2	542.37141	1083.73554	A*02:01
KIRNFVVVF	2	561.34480	1121.68233	n.a.
KIYEGQVEV	2	532.78436	1064.56145	A*02:01
KLFDRPQEL	2	573.31885	1145.63042	A*02:01
KLFDTQQFL	2	570.30811	1139.60893	A*02:01
KLFGMIITI	2	518.31744	1035.62761	A*02:01
KLHGVNINV	2	497.29541	993.58354	A*02:01
KLIGDTPIDTFL	2	666.87396	1332.74065	A*02:01
KLILLITQV	2	520.85681	1040.70635	A*02:01
KLIPLLLQL	2	525.86737	1050.72746	A*02:01
KLISELQKL	2	536.34180	1071.67632	A*02:01

KLLAVIHEL	2	518.33142	1035.65557	A*02:01
KLLDISELDMV	2	638.34650	1275.68572	A*02:01
KLLDLMPRL	2	549.83862	1098.66997	A*02:01
KLLDPEDVAVQL	2	670.37701	1339.74675	A*02:01
KLLEPVLLL	2	519.35156	1037.69585	A*02:01
KLLFWVTEV	2	567.83142	1134.65557	A*02:01
KLLQFYPSL	2	554.82312	1108.63896	A*02:01
KLLTEVHAA	2	491.28958	981.57189	A*02:01
KLMDHIYAV	2	545.29144	1089.57561	A*02:01
KLMDLDVEQL	2	602.31787	1203.62846	A*02:01
KLQDQIFNL	2	559.81311	1118.61894	A*02:01
KLQEFLQTL	2	560.32336	1119.63945	A*02:01
KLQELNRL	2	571.82947	1142.65166	A*02:01
KLQELNYNL	2	567.81070	1134.61412	A*02:01
KLQEQIFHL	2	578.32928	1155.65129	A*02:01
KLSEIPLTL	2	507.31540	1013.62352	A*02:01
KLVEFDLGA	2	569.81025	1138.61322	A*02:01
KLWEMDNML	2	590.28003	1179.55278	A*02:01
KLWEMDNMLI	2	646.82224	1292.63720	A*02:01
KLYDIDVAKV	2	582.33643	1163.66557	A*02:01
KLYNPENIYL	2	633.83997	1266.67266	A*02:01
KLYTGLREV	2	539.81543	1078.62358	A*02:01
KMAEMLVEL	2	532.27948	1063.55168	A*02:01
KMWEEAISL	2	553.78060	1106.55393	A*02:01
KPAGPPGIL	2	425.26324	849.51921	B*07:02
KPAGPPGILAL	2	517.32343	1033.63957	B*07:02
KPATKTAEL	2	479.78167	958.55607	B*07:02
KPGRKGISL	2	478.30558	955.60388	B*07:02
KPIAVGSMML	2	567.30591	1133.60454	B*07:02
KPILSTRSL	2	507.81848	1014.62969	B*07:02
KPINVRVTTM	2	579.83606	1158.66484	B*07:02
KPIQRTILM	2	550.33594	1099.66460	B*07:02
KPKAPPPSL	2	467.78946	934.57164	B*07:02
KPKDPLKISL	2	569.86267	1138.71807	B*07:02
KPKEADESL	2	508.76619	1016.52510	B*07:02
KPKSAPWNSF	2	581.30560	1161.60393	B*07:02
KPKSVSKKL	2	507.83624	1014.66521	B*07:02
KPKTPSLTVF	2	559.33398	1117.66069	B*07:02
KPLDNASKL	2	493.28691	985.56655	B*07:02
KPMEKLLGL	2	514.81163	1028.61598	B*07:02
KPNANRIAL	2	498.80078	996.59429	B*07:02
KPQDYKKRLSV	3	454.60123	1361.78913	B*07:02
KPQQQRTSL	2	507.78790	1014.56853	B*07:02
KPQTKLLIL	2	527.35470	1053.70213	B*07:02
KPRDVSSVELL	2	621.85602	1242.70476	B*07:02
KPRKPAGAA	2	448.27719	895.54711	B*07:02
KPRLDTEQL	2	550.30823	1099.60918	B*07:02
KPRNVFVDM	2	602.82837	1204.64946	B*07:02
KPRPDVTNEL	2	584.81934	1168.63140	B*07:02
KPRSLQTGF	2	517.29260	1033.57793	B*07:02
KPRVPPATAF	2	542.31841	1083.62954	B*07:02
KPSGVSAAL	2	415.24248	829.47767	B*07:02

KPSLNKSNV	2	493.78461	986.56194	B*07:02
KPSLPFTSL	2	495.28656	989.56584	B*07:02
KPSSTTPRL	2	493.78482	986.56237	B*07:02
KPTGARPSAL	2	499.29281	997.57834	B*07:02
KPTHVVVTL	2	497.30753	993.60777	B*07:02
KPVHKHREM	2	581.31873	1161.63017	B*07:02
KPVKPHSSF	2	513.78984	1026.57241	B*07:02
KPVNRISL	2	463.79242	926.57756	B*07:02
KPVPGKALL	2	461.80774	922.60820	B*07:02
KPVYPGQTL	2	501.78378	1002.56029	B*07:02
KVIDEIRV	2	567.82889	1134.65049	A*02:01
KVIEINPYL	2	544.82056	1088.63384	A*02:01
KVLDFEHFL	2	574.31024	1147.61321	A*02:01
KVLDLKINL	2	528.34430	1055.68132	A*02:01
KVLERVNAV	2	514.31641	1027.62554	A*02:01
KVLEYVIKV	2	545.84681	1090.68635	A*02:01
KVRPSTGNSA	2	508.77737	1016.54747	n.a.
KYFDEHYEY	2	647.27477	1293.54226	Cw*07:02
KYPSPFFVF	2	566.29675	1131.58623	n.a.
LAALQPGLI	2	448.28393	895.56058	A*02:01
LAQGARALVL	2	506.31873	1011.63017	n.a.
LARPALLLL	2	490.33642	979.66557	A*02:01
LASKDGAVL	2	437.25607	873.50486	A*02:01
LAVDQLERLY	2	610.33735	1219.66742	n.a.
LAVGFSLAL	2	445.77063	890.53398	A*02:01
LHLGYLPNQL	2	584.32904	1167.65080	n.a.
LIPRASLLL	2	498.33401	995.66075	A*02:01
LLDPNVKSIFV	2	622.86658	1244.72588	A*02:01
LLDRFLATV	2	524.31336	1047.61945	A*02:01
LLFEGEKITI	2	581.83862	1162.66997	A*02:01
LLIDDKGTIKL	2	614.87921	1228.75115	A*02:01
LLIENVASL	2	486.29202	971.57677	A*02:01
LLLDMQNR	2	558.31531	1115.62334	A*02:01
LLNDRIWLA	2	557.32405	1113.64082	A*02:01
LLPVLEISLI	2	555.36218	1109.71709	A*02:01
LLRAAPLLL	2	490.33635	979.66542	A*02:01
LLWGNLPEI	2	527.80005	1054.59282	A*02:01
LLYDLADQLHA	2	636.33472	1271.66216	A*02:01
LMISRTPEV	2	523.28882	1045.57036	A*02:01
LPALRSIGL	2	470.30252	939.59776	B*07:02
LPAPWPHRGL	2	523.79816	1046.58904	B*07:02
LPDERTISL	2	522.28986	1043.57244	B*07:02
LPDLQRSKQAL	2	634.86920	1268.73113	B*07:02
LPFLRITSL	2	530.33112	1059.65495	B*07:02
LPFSRSLEL	2	531.30298	1061.59868	B*07:02
LPHAPGVQM	2	475.24963	949.49199	B*07:02
LPKPPGRGV	2	460.78717	920.56706	B*07:02
LPKQPPLAL	2	488.81274	976.61821	B*07:02
LPKSPPYTAF	2	560.80420	1120.60112	B*07:02
LPKTTALEL	2	493.29962	985.59197	B*07:02
LPLAHVLEL	2	502.81015	1004.61302	B*07:02
LPPQGMLVQPGM	3	423.22177	1267.65076	B*07:02

LPQANRDTL	2	514.27966	1027.55205	B*07:02
LPQGIVREL	2	512.81086	1024.61445	B*07:02
LPRAVGTQTL	2	528.31360	1055.61992	B*07:02
LPRGGLTSI	2	457.27652	913.54576	B*07:02
LPRGLAGALLTL	2	597.88196	1194.75664	B*07:02
LPRLTPPVL	2	503.32594	1005.64460	B*07:02
LPRPPMLLAL	2	560.84857	1120.68987	B*07:02
LPRPPPEM	2	517.27832	1033.54936	B*07:02
LPRSIGNLTQL	2	606.35849	1211.70971	B*07:02
LPRTIFPTSTI	2	623.36371	1245.72014	B*07:02
LPRVADILTQL	2	619.87676	1238.74625	B*07:02
LPSASHFSQL	2	543.78223	1086.55718	B*07:02
LPSDLRTISL	2	557.82666	1114.64604	B*07:02
LPSGSGNRAIL	2	542.80878	1084.61028	B*07:02
LPSKPSSTL	2	465.26843	929.52959	B*07:02
LPSLRILYM	2	553.32465	1105.64202	B*07:02
LPSRKLVAL	2	498.83144	996.65560	B*07:02
LPSSGRSSL	2	452.24844	903.48961	B*07:02
LPSSIRTKAL	2	543.33710	1085.66692	B*07:02
LPSTRLGTL	2	479.28976	957.57225	B*07:02
LPSWGRAEL	2	514.77924	1028.55120	B*07:02
LRPGTAQKL	2	492.30322	983.59917	B*07:02
LRPPIMIMM	2	551.30217	1101.59707	n.a.
LTKFLLDRA	2	538.82605	1076.64482	n.a.
LTLFPVRL	2	536.34906	1071.69084	A*02:01
LVDLRAVLV	2	499.32339	997.63951	A*02:01
LVIDGLRVLE	2	563.84479	1126.68230	artefact
LVLAAAGNLLI	2	534.34424	1067.68120	A*02:01
LVMAPRTVL	2	500.30444	999.60161	A*02:01
LVQNNQLVSL	2	564.32452	1127.64177	A*02:01
LVTALIKDKIL	3	409.60783	1226.80895	A*02:01
LVTGILSRI	2	486.31580	971.62432	A*02:01
MIRAAPPPL	2	483.28333	965.55937	A*02:01
MLFFQTIA	2	485.75555	970.50383	n.a.
MLFGHPLL	2	513.79346	1026.57964	A*02:01
MLPLLGAULL	2	520.33405	1039.66081	A*02:01
MPRGVVVT	2	486.28961	971.57195	B*07:02
MPSEQIRNQL	2	608.31049	1215.61370	B*07:02
MPSQFRDIL	2	553.78656	1106.56584	B*07:02
MPYSNGRPAL	2	553.27649	1105.54570	B*07:02
MRTEAQVPAL	2	558.29773	1115.58818	n.a.
MVPRLTAVL	2	500.30405	999.60083	A*02:01
NAAERRGPL	2	492.27232	983.53737	A*02:01
NGLKISGVT	2	494.29474	987.58220	n.a.
NLTLHLEL	2	533.31848	1065.62969	A*02:01
NLYPFVKTV	2	540.80743	1080.60759	A*02:01
NMVDIIHSV	2	514.26544	1027.52361	A*02:01
NPDHARNSL	2	512.25152	1023.49576	B*07:02
NPKNPGLWL	2	519.78943	1038.57158	B*07:02
NPNLRKNVL	2	534.31926	1067.63124	B*07:02
NPNMRLSQL	2	536.78168	1072.55608	B*07:02
NPQERTLTL	2	536.29266	1071.57805	B*07:02

NPRDPSSSSSM	2	582.75076	1164.49424	B*07:02
NPRIPYTEL	2	551.79785	1102.58843	B*07:02
NPRLIASSL	2	485.78766	970.56804	B*07:02
NPRQAAAYEM	2	540.25018	1079.49309	B*07:02
NPRQINWTVL	2	620.84332	1240.67937	B*07:02
NPRQPLPASGL	2	575.32199	1149.63670	B*07:02
NPRSVTLII	2	506.81056	1012.61385	B*07:02
NPRVKAAAL	2	470.28992	939.57256	B*07:02
NSPVLTLTKV	2	536.32330	1071.63932	n.a.
NTVHKSVAI	2	484.77955	968.55183	A*02:01
NVKKSRRLII	3	409.60786	1226.80902	A*02:01
NVRIATTAL	2	479.78754	958.56780	A*02:01
NVRPPNTAL	2	491.27710	981.54692	A*02:01
NYHDKNIVL	2	558.29706	1115.58684	n.a.
PEYHRKAV	2	500.27197	999.53667	n.a.
PQLRLSL	2	413.76059	826.51390	artefact
PRAVEAAEL	2	478.26355	955.51982	n.a.
PRPSPASSP	2	448.23513	895.46298	n.a.
PRSVLEAAV	2	471.27399	941.54070	n.a.
PSAALEKVML	2	529.79895	1058.59062	n.a.
PSASPLKSI	2	450.26328	899.51927	n.a.
PSLSPTLLAL	2	506.30698	1011.60668	n.a.
PSRLLAILL	2	498.33398	995.66068	n.a.
PSRTLFPSSL	2	509.28968	1017.57208	B*07:02
PSSRPQAALI	2	520.29993	1039.59258	n.a.
QAAEDADILI	2	529.77191	1058.53655	A*02:01
QILETIGGKQL	3	400.57157	1199.70014	A*02:01
QIRDIMQAL	2	544.29967	1087.59206	A*02:01
QKSSWLML	2	496.76526	992.52324	n.a.
QLIDKVWQL	2	571.83142	1142.65557	A*02:01
QLLEKVIEL	2	542.83396	1084.66064	A*02:01
QLVDIIEKV	2	528.81808	1056.62888	A*02:01
QPDQTRIVAL	2	570.82189	1140.63651	B*07:02
QPTGGKARL	2	464.27194	927.53661	B*07:02
QPTLLVNGR	2	499.29274	997.57820	n.a.
QVFPGLLERV	2	579.33740	1157.66753	A*02:01
QVTQPTVGMNFK	2	675.34821	1349.68913	n.a.
QVTVPKIITI	2	556.35742	1111.70756	A*02:01
RADSSRASL	2	481.75411	962.50093	n.a.
RIIDVVYNA	2	531.80060	1062.59392	A*02:01
RLAQHITYV	2	550.81353	1100.61978	A*02:01
RLAVYIDKV	2	538.82635	1076.64543	A*02:01
RLDELGGVYL	2	567.81122	1134.61516	A*02:01
RLINQVLEL	2	549.33722	1097.66716	A*02:01
RLIPTLVSI	2	506.33133	1011.65538	A*02:01
RLLDLENIQI	2	613.85846	1226.70964	A*02:01
RLLDYVVNI	2	552.82410	1104.64092	A*02:01
RLLEATSYL	2	533.30011	1065.59294	A*02:01
RLLEQKVEL	2	564.34210	1127.67693	A*02:01
RLLGYVATL	2	503.30704	1005.60680	A*02:01
RLLPPGAVVAV	2	546.35034	1091.69341	A*02:01
RLNSPVTI	2	450.26894	899.53060	A*02:01

RLPLAVALL	2	483.32889	965.65050	A*02:01
RLQEDPPAGV	2	541.28516	1081.56304	A*02:01
RLQEDPPVGV	2	555.30054	1109.59380	A*02:01
RLQEEINEV	2	565.29553	1129.58379	A*02:01
RLTDYISKV	2	547.81342	1094.61955	A*02:01
RLTDYVAFL	2	549.30273	1097.59819	A*02:01
RLWEKLTLL	2	586.36328	1171.71929	A*02:01
RLWGEPVNL	2	542.30052	1083.59376	A*02:01
RLYDGLFKV	2	555.81842	1110.62956	A*02:01
RLYPWGVVEV	2	609.33716	1217.66704	A*02:01
RMCVASSSSAL	2	556.26447	1111.52165	A*02:01
RMLDSVEKL	2	545.79926	1090.59123	A*02:01
RPAAIPIEI	2	490.30007	979.59286	B*07:02
RPADPEKNQSL	2	627.82585	1254.64441	B*07:02
RPAEVRLIL	2	590.38147	1179.75566	B*07:02
RPAFFAERL	2	553.80841	1106.60954	B*07:02
RPAGEPYNRKTL	3	467.92450	1401.75895	B*07:02
RPAGLSPTL	2	456.26862	911.52995	B*07:02
RPALFANLF	2	524.80005	1048.59282	B*07:02
RPANHRQLTF	3	413.89536	1239.67151	B*07:02
RPAPPPEAL	2	474.26877	947.53026	B*07:02
RPAYRKVFL	2	575.34790	1149.68852	B*07:02
RPDTAGSSL	2	452.23000	903.45272	B*07:02
RPEDRILVL	2	555.83496	1110.66265	B*07:02
RPEEGRPVV	2	519.78744	1038.56761	B*07:02
RPFERTITM	2	575.80511	1150.60295	B*07:02
RPGVKLTL	2	442.28970	883.57213	B*07:02
RPGWLTVSL	2	514.79785	1028.58843	B*07:02
RPILTIITL	2	520.34663	1039.68599	B*07:02
RPISDFLTL	2	531.30322	1061.59917	B*07:02
RPITDSPVL	2	499.28704	997.56680	B*07:02
RPKALTQVL	2	513.32672	1025.64617	B*07:02
RPKENS MSTL	2	581.79795	1162.58862	B*07:02
RPKETDHKSL	3	404.22278	1210.65377	B*07:02
RPKGESKDL	2	515.28754	1029.56780	B*07:02
RPKKPGQSF	2	522.80060	1044.59393	B*07:02
RPKLPEDPLL	2	589.34992	1177.69256	B*07:02
RPKLSSPAL	2	484.79736	968.58745	B*07:02
RPKPSSSPVIF	2	607.84796	1214.68865	B*07:02
RPKR PANQF	2	557.31716	1113.62704	B*07:02
RPKSGGSGHAV	2	526.78290	1052.55852	B*07:02
RPKSNIVLL	2	520.33403	1039.66079	B*07:02
RPKSNIVLLS	2	563.85010	1126.69292	artefact
RPKTFGM DM	2	541.75938	1082.51149	B*07:02
RPKYQFLSL	2	576.33191	1151.65654	B*07:02
RPLGKAASL	2	456.78488	912.56249	B*07:02
RPLVVK TSL	2	506.82892	1012.65056	B*07:02
RPLYKNIVL	2	558.35013	1115.69299	B*07:02
RPMKTSVL	2	466.27292	931.53856	B*07:02
RPNGTKVAVL	2	527.82135	1054.63542	B*07:02
RPNGTKVAVLL	2	584.36346	1167.71965	B*07:02
RPPKYNAVL	2	529.31104	1057.61479	B*07:02

RPPPPGMRGLL	2	595.84458	1190.68188	B*07:02
RPPRPPPPP	2	505.79792	1010.58857	artefact
RPQDKFLVL	2	558.33185	1115.65642	B*07:02
RPQEV SAYL	2	531.78204	1062.55681	B*07:02
RPQGGQDIL	2	492.26657	983.52587	B*07:02
RPQLKGVVL	2	505.32947	1009.65166	B*07:02
RPQLQRQVL	2	569.34589	1137.68450	B*07:02
RPQLRSVLL	2	541.34503	1081.68277	B*07:02
RPQSGANGL	2	450.23821	899.46914	B*07:02
RPQTGLSFL	2	509.78708	1018.56689	B*07:02
RPQVAKTLL	2	513.32635	1025.64543	B*07:02
RPRAA TVVA	2	470.78773	940.56819	B*07:02
RPRAGRREAG	2	620.83276	1240.65825	artefact
RPRARYYVQV	2	654.36975	1307.73223	B*07:02
RPRASGEAGPRAL	3	465.59156	1394.76013	B*07:02
RPRDKQMELL	3	429.23984	1285.70496	B*07:02
RPREAEVRFL	3	424.91040	1272.71665	B*07:02
RPRGLALVL	2	497.82923	994.65119	B*07:02
RPRGRLVQSL	2	591.36464	1181.72200	B*07:02
RPRPDEERPL	3	422.22991	1264.67518	B*07:02
RPRPGNILLQL	2	638.89618	1276.78508	B*07:02
RPRPGTGLGRVM	3	432.91519	1296.73102	B*07:02
RPRPSEDTFL	2	609.31665	1217.62602	B*07:02
RPSAAGINL	2	449.75873	898.51018	B*07:02
RPSASTQAL	2	465.75363	930.49999	B*07:02
RPSGPGPEL	2	455.24231	909.47734	B*07:02
RPSGPSKAL	2	456.76657	912.52586	B*07:02
RPSGRRLLL	2	534.34445	1067.68163	B*07:02
RPSLNIATVL	2	542.32922	1083.65115	B*07:02
RPSQFPHSL	2	534.78223	1068.55718	B*07:02
RPSQNLLQL	2	534.81128	1068.61528	B*07:02
RPSSQYIVAL	2	567.31903	1133.63078	B*07:02
RPSTPHTITL	2	561.81683	1122.62639	B*07:02
RPTDKPLRL	2	548.33466	1095.66203	B*07:02
RPTLPVKSL	2	505.82095	1010.63463	B*07:02
RPVAPSGTAL	2	484.77945	968.55162	B*07:02
RPVPPPPSL	2	480.28696	959.56664	B*07:02
RPWLEGRHTL	3	422.23529	1264.69132	B*07:02
RPWSETIKL	2	565.32129	1129.63530	B*07:02
RPWSNSRGL	2	536.78546	1072.56364	B*07:02
RPYAAGGKKLAL	3	415.58734	1244.74747	B*07:02
RPYEPINSI	2	544.79010	1088.57292	B*07:02
RPYGALDSGFNSV	2	691.83868	1382.67009	B*07:02
RPYSHALVA	2	507.27908	1013.55089	B*07:02
RPYTNKVITL	2	602.85565	1204.70403	B*07:02
RTLDFDPLL	2	545.30035	1089.59343	A*02:01
RVAEHHVATL	2	566.81431	1132.62134	n.a.
RVKEIGSTM	2	510.77860	1020.54993	n.a.
RVLPPSALQSV	2	583.84798	1166.68868	A*02:01
RVLTGDALLEL	3	400.57171	1199.70057	A*02:01
RVRFATHAAAL	3	404.90341	1212.69568	n.a.
RVSDINFTL	2	532.78992	1064.57256	A*02:01

RVSPPHLTL	2	510.30307	1019.59886	A*02:01
SIIGRLLEV	2	500.31299	999.61871	A*02:01
SINAQRNAL	2	493.77218	986.53709	A*02:01
SIRDFLVTL	2	532.31063	1063.61398	A*02:01
SLAQYLINA	2	496.77388	992.54049	A*02:01
SLAQYLINV	2	510.78964	1020.57201	A*02:01
SLDQPTQTV	2	494.75085	988.49443	A*02:01
SLGFGLDTVEV	2	568.79484	1136.58241	A*02:01
SLIEKLWQT	2	559.31598	1117.62468	A*02:01
SLIEKYFSV	2	543.29645	1085.58562	A*02:01
SLIGHLQTL	2	491.28964	981.57201	A*02:01
SLIKQIPRI	2	534.34949	1067.69170	A*02:01
SLITRLLEV	2	522.32611	1043.64495	A*02:01
SLLDEFYKL	2	564.30225	1127.59722	A*02:01
SLLDRFLATV	2	567.82904	1134.65080	A*02:01
SLLLENLEKI	2	529.80762	1058.60796	A*02:01
SLLHLGALYGI	2	578.83966	1156.67204	A*02:01
SLLPPDALVGL	2	547.82599	1094.64471	A*02:01
SLLQTLYKV	2	532.82068	1064.63408	A*02:01
SLLSHVEQL	2	513.28474	1025.56221	A*02:01
SLQDEIQRV	2	544.29108	1087.57488	A*02:01
SLRPQVSSI	2	493.78485	986.56243	A*02:01
SLSVHPVVAV	2	504.29748	1007.58769	A*02:01
SLYSQVHQI	2	537.78241	1074.55754	A*02:01
SMLQKTWLL	2	560.31464	1119.62200	A*02:01
SPADHRGYASL	2	587.28632	1173.56536	B*07:02
SPAFSTRVL	2	489.27400	977.54073	B*07:02
SPAGKRYLL	2	502.79770	1004.58812	B*07:02
SPAGKTNAL	2	429.73755	858.46783	B*07:02
SPAPRPWL	2	510.78433	1020.56139	B*07:02
SPAPTHNSL	2	462.23288	923.45848	B*07:02
SPASPKISL	2	450.26328	899.51927	B*07:02
SPASRSISL	2	459.25595	917.50463	B*07:02
SPAVERLISSL	2	586.33728	1171.66728	B*07:02
SPEDRGSSL	2	474.22458	947.44188	B*07:02
SPEETRAAL	2	487.25067	973.49407	B*07:02
SPEGSRKLL	2	493.78650	986.56572	B*07:02
SPETRENAL	2	508.75388	1016.50047	B*07:02
SPFFERSGL	2	520.26373	1039.52019	B*07:02
SPFHRNFLFL	2	565.80865	1130.61003	B*07:02
SPFPVQDRPESSL	2	729.86499	1458.72270	B*07:02
SPGAQPRV	2	406.22488	811.44249	B*07:02
SPGERATL	2	415.72186	830.43644	B*07:02
SPGGPRAAV	2	406.22478	811.44228	B*07:02
SPGPSRPGL	2	434.23807	867.46886	B*07:02
SPGQRAVLL	2	470.78177	940.55626	B*07:02
SPGSPRPAL	2	441.24545	881.48363	B*07:02
SPGVGKTSL	2	423.23981	845.47234	B*07:02
SPGWVRLAL	2	499.79255	998.57783	B*07:02
SPKLPVSSL	2	464.27868	927.55009	B*07:02
SPKTNILYL	2	524.80536	1048.60344	B*07:02
SPLRSSSAL	2	459.25585	917.50442	B*07:02

SPLTKSISL	2	473.28406	945.56084	B*07:02
SPMMPRITSVF	2	633.32275	1265.63823	B*07:02
SPMSDVVSREL	2	610.30280	1219.59831	B*07:02
SPNAIFKAL	2	480.77890	960.55052	B*07:02
SPNGHRPQL	2	503.26459	1005.52190	B*07:02
SPNLRLLDL	2	520.80823	1040.60918	B*07:02
SPNQARAQAAL	2	563.80151	1126.59575	B*07:02
SPNQSLRLGL	2	542.80853	1084.60979	B*07:02
SPNRSTNTL	2	495.25373	989.50019	B*07:02
SPQEARNML	2	523.25830	1045.50932	B*07:02
SPQGRVMTI	2	494.76532	988.52336	B*07:02
SPQLGRAVQL	2	534.81152	1068.61577	B*07:02
SPQLGRAVQLL	2	591.35358	1181.69988	B*07:02
SPRASGSGL	2	416.21969	831.43211	B*07:02
SPRDPVLT	2	499.28709	997.56691	B*07:02
SPRENILVSL	2	564.32397	1127.64067	B*07:02
SPRFPAQYL	2	539.78741	1078.56755	B*07:02
SPRGEASSL	2	452.22995	903.45262	B*07:02
SPRGFPLGL	2	472.27139	943.53551	B*07:02
SPRPGQGSGHL	2	575.29138	1149.57549	B*07:02
SPRISPATTL	2	521.79681	1042.58635	B*07:02
SPRKPIDSL	2	506.79303	1012.57878	B*07:02
SPRLMSNAL	2	494.76517	988.52306	B*07:02
SPRLPVGGF	2	465.26379	929.52031	B*07:02
SPRLPVGGFRSL	3	429.25062	1285.73731	B*07:02
SPRLSQTF	2	524.79260	1048.57791	B*07:02
SPRLSQTFQL	2	645.36353	1289.71977	B*07:02
SPRPNIILGL	2	540.33173	1079.65618	B*07:02
SPRSSLNNSL	2	537.77997	1074.55266	B*07:02
SPRTPVSPVKF	3	405.56805	1214.68961	B*07:02
SPRVHSLIL	2	511.31076	1021.61424	B*07:02
SPRVQFQSL	2	531.29022	1061.57317	B*07:02
SPRYIFTML	2	564.29934	1127.59140	B*07:02
SPSAAHFITRL	2	600.32983	1199.65239	B*07:02
SPSDRPLSL	2	486.26138	971.51549	B*07:02
SPSKPAKSL	2	457.76871	914.53014	B*07:02
SPSMKKAVSLI	2	580.83862	1160.66997	B*07:02
SPSTNRGPIQM	2	594.29578	1187.58428	B*07:02
SPVFRLETL	2	531.30316	1061.59905	B*07:02
SPVVRVAV	2	413.76074	826.51421	B*07:02
SPYPTKTQTM	2	577.28076	1153.55425	B*07:02
SPYQNIKIL	2	538.31018	1075.61308	B*07:02
SVIEQIVYV	2	525.29681	1049.58635	B*07:02
SVNKKDLSI	2	502.29407	1003.58086	A*02:01
TIIDLPGITRV	2	599.36340	1197.71953	A*02:01
TLADLVHHV	2	502.77951	1004.55174	A*02:01
TLAEIAKVEL	2	543.82294	1086.63860	A*02:01
TLFDYEVRL	2	578.30518	1155.60307	A*02:01
TLIDLPGITRV	2	599.36340	1197.71953	A*02:01
TLNDREYQL	2	576.28766	1151.56804	A*02:01
TLPRSVLIV	2	499.32349	997.63970	A*02:01
TLSDLRVYL	2	540.30841	1079.60954	A*02:01

TLSERLWGL	2	537.80023	1074.59319	A*02:01
TLVYHVGV	2	493.78680	986.56633	A*02:01
TLWGGLLRL	2	514.81598	1028.62468	A*02:01
TLWVDPYEV	2	561.27896	1121.55063	A*02:01
TLYEAVREV	2	540.29004	1079.57280	A*02:01
TPAVGRLEV	2	471.27416	941.54104	B*07:02
TPAWVRQVL	2	535.31079	1069.61431	B*07:02
TPDTGRILSKL	2	600.85080	1200.69431	B*07:02
TPETVRMVL	2	523.28857	1045.56987	B*07:02
TPFGGRLLVL	2	536.82901	1072.65075	A*02:01
TPISRLVAL	2	485.30786	969.60845	B*07:02
TPKEKAQAL	2	493.28716	985.56704	B*07:02
TPNEERNVM	2	545.25299	1089.49870	B*07:02
TPRGGVGIATVM	2	579.81842	1158.62956	B*07:02
TPRPMTAEL	2	508.26569	1015.52410	B*07:02
TPSASRKSL	2	473.76926	946.53124	B*07:02
TPSEPHPVL	2	488.75815	976.50902	B*07:02
TPSGSREGSL	2	495.74583	990.48438	B*07:02
TPSLVKSTSQL	2	580.82920	1160.65111	B*07:02
TPSSRPASL	2	458.24792	915.48857	B*07:02
TPSTSARPSS	2	495.74600	990.48472	artefact
TPTVRAALI	2	471.29175	941.57622	B*07:02
TREDPNLVPSI	2	620.83203	1240.65677	n.a.
TTLHRLAL	2	519.32648	1037.64568	A*02:01
TVPPRPGSSL	2	505.78497	1010.56267	A*02:01
VAAAAGRGAAL	2	464.27183	927.53638	n.a.
VARPLSTAL	2	464.28441	927.56154	B*07:02
VIAEILRGV	2	485.30804	969.60881	A*02:01
VLDDKLVFV	2	524.30750	1047.60771	A*02:01
VLFENTDSVHL	2	637.32501	1273.64275	A*02:01
VLIDYQRNV	2	560.31095	1119.61463	A*02:01
VLIPKLPQL	2	510.84391	1020.68053	A*02:01
VLLDHLSLA	2	490.79222	980.57716	A*02:01
VLLGHIFYV	2	530.81244	1060.61760	A*02:01
VLLGKVYVV	2	495.32299	989.63870	A*02:01
VLMDRLPSL	2	522.29909	1043.59090	A*02:01
VLMTEDIKL	2	531.29858	1061.58989	A*02:01
VLSSRLAFA	2	482.28454	963.56180	A*02:01
VLWDRTFSL	2	568.80774	1136.60820	A*02:01
VLWDRTFSLF	2	642.34296	1283.67864	n.a.
VMDSKIVQV	2	509.78340	1018.55951	A*02:01
VMNLTQSIVL	2	559.31726	1117.62724	A*02:01
VPAEPKLAFL	2	486.28143	971.55559	B*07:02
VPAKKITAA	2	449.78952	898.57175	B*07:02
VPALKDSNL	2	478.77386	956.54045	B*07:02
VPASQAASGKTL	2	565.31372	1129.62016	B*07:02
VPASKRPPL	2	482.80012	964.59296	A*02:01
VPATDRNAL	2	478.76124	956.51521	B*07:02
VPDSSGPERIL	2	585.31129	1169.61530	B*07:02
VPDTSRIYVAL	2	617.34534	1233.68341	B*07:02
VPEEARPAL	2	491.27109	981.53490	B*07:02
VPFERPAVI	2	514.29987	1027.59245	B*07:02

VPKVVGSAV	2	428.26852	855.52977	B*07:02
VPMFRNVSL	2	531.79163	1062.57598	B*07:02
VPMTSRLGL	2	487.27826	973.54924	B*07:02
VPNQKRLTL	2	534.82899	1068.65070	B*07:02
VPNQKRLTLL	2	591.37115	1181.73503	B*07:02
VPPPPHRPL	2	505.30051	1009.59374	B*07:02
VPRAAFSPLLLPL	2	697.43178	1393.85629	B*07:02
VPRGQGSQF	2	488.25336	975.49944	B*07:02
VPRPPQTSL	2	497.78711	994.56694	B*07:02
VPRPPSLLATL	2	582.36011	1163.71294	B*07:02
VPRSQGTEAEL	2	593.80670	1186.60613	B*07:02
VPVAKTAEAL	2	464.27881	927.55034	B*07:02
VRNNVIIVM	2	529.31232	1057.61736	n.a.
VRPPVQVY	2	479.27902	957.55077	n.a.
VRTPYTMSY	2	559.27057	1117.53386	n.a.
VVARATGAI	2	429.26351	857.51975	A*02:01
VVKPPGSSL	2	442.26559	883.52391	A*02:01
VVLRSDTIANI	3	400.90329	1200.69532	A*02:01
VVSQALDGYNGN	2	618.79465	1236.58202	artefact
WGTEGPFAL	2	489.24142	977.47557	n.a.
WLKNGAALVL	2	542.82916	1084.65105	A*02:01
WSFAGPVVL	2	488.26791	975.52855	n.a.
YGLPVVVKL	2	494.31512	987.62297	n.a.
YIYDKDMEII	2	651.81772	1302.62815	A*02:01
YKVEYPIMY	2	603.29907	1205.59087	n.a.
YLADIFTKL	2	542.30713	1083.60698	A*02:01
YLADTVQKL	2	525.79430	1050.58132	A*02:01
YLFERIKEL	2	605.84473	1210.68218	A*02:01
YLINEIDRI	2	574.81860	1148.62993	A*02:01
YLKDLIEEV	2	561.30750	1121.60771	A*02:01
YLLPAIVHI	2	519.82039	1038.63350	A*02:01
YLLPYENLL	2	569.31268	1137.61809	A*02:01
YLRPPNTSL	2	530.79199	1060.57671	A*02:01
YLTNEGIQYL	2	607.30829	1213.60930	A*02:01
YMAELIERL	2	569.30176	1137.59624	A*02:01
YPAERKQAL	2	538.29816	1075.58904	A*02:01
YPPFRGVTI	2	550.29962	1099.59197	B*07:02
YPFKPPKVAF	2	597.33923	1193.67119	B*07:02
YPLLKNISM	2	539.80133	1078.59538	B*07:02
YPLVLQKLL	2	543.84929	1086.69130	B*07:02
YPRSILTSL	2	525.30280	1049.59831	B*07:02
YPRSLFPSL	2	540.29761	1079.58794	B*07:02
YQDTYGQQWK	2	658.79858	1316.58989	B*07:02
YRPPELLL	2	500.79465	1000.58202	n.a.

7.2 HLA-Liganden aus den Proben der Multiplen Sklerose-Patienten

Die Tabellen der identifizierten HLA-Liganden aus den Gewebeproben der Multiple Sklerose-Patienten befinden sich auf den folgenden Seiten.

Tab. 7.2: Auflistung der identifizierten HLA-Liganden aus den Proben der Multiple Sklerose-Patienten.

MS 12

HLA-Klasse-I: A*01, A*03, B*08, B*51, C*07, C*15

HLA-Klasse-II: DRB1*03, DRB1*04, DQB1*0302, DQB1*0201

Entrez		Source protein		m/z	Charge	Peptide sequence	HLA assignment	
No.	gene ID						SYFPEITHI	
MHC class I restriction								
1	118	alpha-Adducin		584.25	2	LTDRELEEEY		A*01 (33)
2	147463	Ankyrin repeat domain-containing protein 2 9		506.78	2	VIRLLLASGA		NA
3	256949	Ankyrin repeat domain-containing protein 4 7		598.88	2	ALMLAISHGRQ		NA
4	311	Annexin A1 1		677.25	2	ETDLLDIRSEY		A*01 (34)
5	3481	Insulin-like growth factor II precursor		488.26	2	IPMGKSMLV		B*5101 (22)
6	8543	LIM domain-only protein 4		569.82	2	KIADRFLLY		A*03 (24)
7	51604	Phosphatidylinositol glycan		615.22	2	DTDHYFLRY		A*01 (37)
8	4735	Septin 2		631.77	2	YIDEQFERY		A*01 (30)
9	9201	Serine/threonine-protein kinase DCLK1		653.21	2	YTERDASGMLY		A*01 (31)
10	85358	SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 3		515.77	2	CPLSLAAQLD		NA
11	7401	USH3A (clarin 1)		564.26	2	TTGILSILFY		A*01 (24)
MHC class II restriction								
1	60	Actin		677.71	3	WISKQEYDESGPSIVHR		DRB1*0401 (18)
2	3040	alpha2-Globin		506.30	4	AAHLPAEFTPAVHASLDKF		DRB1*0401 (28)
3	347	Apolipoprotein D		822.45	2	NQELRADGTVNQIEG		DRB1*0401 (26)
4	3043	beta-Globin		623.70	3	YQKVVAGVANALAHKYH		DRB1*0401 (26)
5	22883	Calsynenin 1		767.48	2	DPPLIALDKDAPLR		DRB1*0301 (31)
6	1363	Carboxypeptidase E		649.99	3	EPGEPEFKYIGNMHGNE		DRB1*0401 (22)
7	83692	CD99 antigen-like 2		635.89	2	AEP PPPPEPARI		DRB1*0301 (9)
8	8760	CDP-diacylglycerol synthase 2		613.41	2	PEVLN RALS NL		DRB1*0301 (21)
9	3336	Early pregnancy factor (EPF) (chaperonin 10)		699.41	2	FRDGDILGKYVD		DRB1*0301 (19)
10	2752	Glutamine synthetase		777.89	2	LNETGDEPFQYKN		DRB1*0301 (20)

11	2597	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	845.95	2	YDNEFGYSNRVVDL	DRB1*0401 (22)
12	3040	Hemoglobin alpha-2	586.37	2	VLSPADKTNVK	DRB1*0401 (20)
13	3903	Leukocyte-associated Ig-like receptor (LAIR)	626.34	2	FRIDSVSEGNAG	DRB1*0301 (20)
14	3916	Lysosome-associated membrane glycoprotein-1	786.00	2	LNTILPDARDPAFK	DRB1*0301 (29)
15	3107	MHC class I protein HLA-C heavy chain	642.67	3	VDDTQFVRFSDAASPR	DRB1*0401 (28)
16	4155	MBP-(84-94)	673.39	2	DENPVVHFFKN	DRB1*0401 (18)
17	4155	MBP-(95-106)	625.38	2	IVTPRTPPPSQG	DRB1*0401 (14)
18	9378	Neurexin 1	857.98	2	ESNAIINDGKYHVVR	DRB1*0301 (28)
19	9379	Neurexin 2	562.00	3	EPNAIVSDGKYHVVR	DRB1*0301 (29)
20	113791	Phosphoinositide 3-kinase	764.41	2	GHLYREDQTSAPG	DRB1*0401 (28)
21	84898	Plexin domain-containing 2	725.45	2	LDFLKAVDTNRAS	DRB1*0401 (26)
22	8404	SPARC-like protein 1	573.06	3	KVKKIYLDEKRLLA	DRB1*0301 (37)
23	6386	Syntenin	709.92	2	ITSIVKDSAAARNG	DRB1*0301 (24)

MS 22

HLA-Typisierung: HLA-Klasse-I: A*01, A*25, B*08, B*44, C*07, C*05

HLA-Klasse-II: DRB1*03, DRB1*15, DQB1*0201, DQB1*0602

Entrez		Source protein	m/z	Charge	Peptide sequence	HLA assignment
No.	gene ID					SYFPEITHI
MHC class I restriction						
1	311	annexin A11	677.31	2	ETDLLDIRSEY	A*01(34)
2	1040	CDP-diacylglycerol synthase	660.86	2	DLPWFRTLWS	A*25
3	2194	fatty acid synthase	579.78	2	QVADVVSRSRW	A*25
4	2670	glial fibrillary acidic protein, GFAP ⁽³⁷⁵⁻³⁸⁴⁾	594.82	2	NRITIPVQTF	Cw*07
5	2052	microsomal epoxide hydrolase 1	698.82	2	WTTGTISSQRF	A*25
6	64333	Rho GTPase activating protein 9	601.74	2	DLPSEASASTAGP	NA
7	6285	S100 calcium-binding protein	608.30	2	ELINNELSHF	A*25
8	9201	serine/threonine-protein kinase	653.24	2	YTERDASGMLY	A*01(31)
9	55234	smu-1 suppressor of mec-8 and unc-52	575.81	2	DVIRLIMQY	A*25
10	81034	solute carrier family 25	566.31	2	GVIDVITKTW	A*25
11	9114	vacuolar ATPase	649.72	2	NEIEDTFRQF	B*4402(27)

MHC class II restriction									
1	60	actin	540.52	4	WISKQEYDESGPSIVHRK	DRB1*1501(14)			
2	2	alpha-2-macroglobulin	711.38	2	SSKFQVDNNRL	DRB1*0301(33)			
3	2	alpha-2-macroglobulin	817.42	2	GNRIAQWQSFQLEG	DRB1*1501(34)			
4	347	apolipoprotein D	822.40	2	NQELRADGTVNQIEG	DRB1*1501(24)			
5	3043	beta-globin	725.41	2	VVAGVANALAHKYH	DRB1*0301(21)			
6	1072	cofilin 1 (non-muscle)	550.30	3	DGVIKVFNDMKVRK	DRB1*1501(30)			
7	2064	erbB-2	841.98	2	PQRFVVIQNEDLGPA	DRB1*0301(23)			
8	2512	ferritin	752.90	2	TPDAMKAAMALEKK	DRB1*1501(24)			
9	3040	hemoglobin alpha-2	586.33	2	VLSPADKTNVK	DRB1*0301(18)			
10	3119	MHC class antigen II HLA-DQ-β-1	543.94	3	DVGVYRAVTPQGRPD	DRB1*1501(34)			
11	9378	neurexin 1	572.30	3	ESNAIINDGKYHVVR	DRB1*0301(28)			
12	9379	neurexin 2	561.97	3	EPNAIVSDGKYHVVR	DRB1*0301(29)			
13	7157	p53 tumor suppressor	617.34	2	FRELNEALEL	DRB1*0301(18)			
14	8404	SPARC-like protein precursor	573.02	3	KVKKIYLDEKRLLA	DRB1*0301(37)			
15	9806	sparc/osteonectin, (SPOCK)	855.01	2	LERIQIQEAAKKPG	DRB1*1501(18)			
16	332	survivin	501.77	2	RAIEQLAMM	DRB1*1501(4)			
17	6386	syntenin	709.88	2	ITSIVKDSAAARNG	DRB1*0301(24)			
18	7018	transferrin	568.82	2	YAVAVVKKDSG	DRB1*0301(17)			

MS 27

HLA-Typisierung: HLA-Klasse-I: A*02, A*02, B*15, B*44, C*05, C*03

HLA-Klasse-II: DRB1*03, DRB1*15, DQB1*0201, DQB1*0602

Entrez							
No.	gene ID	Source protein	m/z	Charge	Peptide sequence	HLA assignment	SYFPEITHI
MHC class I restriction							
1	80724	acyl-Coenzyme A dehydrogenase family, member 10	580.68	2	ALMEGGENGPW	B*15(15)	
2	4600	INF-regulated resistance GTP-binding protein (MX1)	599.33	2	TIIDLPGITRV	A*0201(24)	
3	201294	munc13-4	564.25	2	DVIGDLHQCCQ	NA	

4	4747	neurofilament light polypeptide	687.28	2	DLSQVAAISNDLK	NA
5	4784	nuclear factor I/X (CCAAT-binding transcription factor)	528.74	2	LLPPPPPPVAR	NA
6	4735	septin 2	609.28	2	RLYPWGVVEV	A*0201(31)
7	55258	threonine synthase-like 2	616.82	2	LDTHPLPLVEV	NA
MHC class II restriction						
1	3040	alpha-2-globin	842.84	3	VLSPADKTNVKAAWGKVGHAHAGEYG	DRB1*1501(20)
2	3043	beta-globin	806.97	2	GKVNVDVGGGALGRL	DRB1*0301(21)
3	3043	beta-globin	623.74	3	YQKVVAGVANALAHKYH	DRB1*0301(21)
4	1072	cofilin 1 (non-muscle)	550.36	3	DGVIKVFNDMKVRK	DRB1*1501(30)
5	3336	early-pregnancy factor, EPF (chaperonin 10)	699.42	2	FRDGDILGKYVD	DRB1*0301(19)
6	2747	glutamate dehydrogenase	614.86	2	KVYNEAGVTFT	DRB1*1501(20)
7	2752	glutamine synthetase	721.36	2	NETGDEPFQYKN	DRB1*0301(20)
8	2597	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	845.91	2	YDNEFGYSNRVVDL	DRB1*1501(18)
9	2597	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1039.03	2	ISWYDNEFGYSNRVVDL	DRB1*1501(28)
10	3039	hemoglobin, alpha 1	634.91	2	LASVSTVLTSKY	DRB1*1501(24)
11	26119	low density lipoprotein receptor, LDLR	662.92	2	IVYYPVHGFMY	DRB1*1501(20)
12	4131	microtubule-associated protein 1B	832.96	2	AVVDKAAEAGGAEQQYG	DRB1*1501(18)
13	4155	myelin basic protein (MBP10-19)	552.34	2	RHGSKYLATA	DRB1*1501(10)
14	4155	myelin basic protein (MBP10-27)	680.38	3	RHGSKYLATASTMDHARH	DRB1*1501(24)
15	4155	myelin basic protein (MBP21-30)	592.84	2	TMDHARHGFL	DRB1*0301(18)
16	4155	myelin basic protein (MBP84-94)	673.40	2	DENPVVHFFKN	DRB1*1501(10)
17	4155	myelin basic protein (MBP95-110)	550.01	3	IVTPRTPPPSQGGKGRG	DRB1*1501(18)
18	4155	myelin basic protein (MBP95-112)	616.74	3	IVTPRTPPPSQGGKGRGLS	DRB1*1501(18)
19	4155	myelin basic protein (MBP139-153)	722.94	2	HKGFKGVDAQGTLTSL	DRB1*1501(24)
20	9378	neurexin 1	529.32	3	SNAINDGKYHVVR	DRB1*0301(28)
21	9379	neurexin 2	562.01	3	EPNAIVSDGKYHVVR	DRB1*0301(29)
22	29114	neuronal protein NP25 (NP22)	709.43	2	VDWILQCAEDI	DRB1*1501(18)
23	5037	neuropolypeptide h3	699.94	2	PVDLSKWSGPLSL	DRB1*1501(28)
24	283297	olfactory receptor	570.35	2	FSVATVQTTW	DRB1*1501(12)
25	8404	SPARC-like protein 1 precursor	592.07	3	KVKKIYLDKRLLAG	DRB1*0301(37)
26	9806	sparc/osteonectin, (SPOCK)	570.36	3	LERIQIEAAAKKPG	DRB1*1501(18)
27	6421	splicing factor proline/glutamine-rich	576.35	2	FSQFGPIERA	DRB1*1501(32)

MS 29

HLA-Typisierung: HLA-Klasse-I: A*01, A*11, B*07, B*35, C*07, C*04

HLA-Klasse-II: DRB1*0103, DRB1*13, DQB1*0501, DQB1*06

Entrez		Source protein			m/z	Charge	Peptide sequence	HLA assignment	
No.	gene ID							SYFPEITHI	
MHC class I restriction									
1	6767	aging-associated protein 14b			603.83	2	ISKLSAKFGGQA	NA	
2	79026	AHNAK nucleoprotein			412.21	2	GTFGGGLGSK	A*1101(25)	
3	118	alpha-adducin			530.32	2	VTASKAIIIEK	A*1101(28)	
4	301	annexin A1			494.30	2	ATIIDILTK	A*1101(29)	
5	241	arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein			602.33	2	LGSVAGIFNYY	NA	
6	476	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 1 polypeptide			583.80	2	SVFQQGMKMK	A*1101(24)	
7	9774	bcl-2 associated transcription factor 1			541.75	2	NTEEEGLKY	A*01(33)	
8	805	calmodulin 2 (Phosphorylase kinase)			404.69	2	VQMMTAK	A*1101	
9	4267	CD99 molecule			529.30	2	AVQRTLLEK	A*1101(28)	
10	55748	CNDP dipeptidase 2			491.24	2	YEVSQLKD	NA	
11	57325	cysteine-rich protein 2-binding			441.24	2	ATVAGVHVK	A*1101(26)	
12	2784	guanine nucleotide binding protein protein			465.27	2	AVTDVIAK	A*1101(30)	
13	92906	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like			490.28	2	SVSPVVHVR	A*1101(24)	
14	135114	histidine triad nucleotide binding protein 3			543.77	2	VYRVNSYW	NA	
15	8932	methyl-CpG binding domain			524.29	2	SIFKQPVTK	A*1101(25)	
16	54516	mitochondrial translational release factor 1-like			492.29	2	QVLGVVARAA	NA	
17	4154	muscleblind-like 2			486.29	2	ATANQIILK	A*1101(31)	
18	4696	NADH dehydrogenase			672.89	2	AVILPPLSPYFK	A*01(19)	
19	4718	NADH-ubiquinone oxidoreductase			557.79	2	KTYGEIFEK	A*1101(23)	
20	2824	neuronal membrane glycoprotein M6-b			536.29	2	TTYNYAVLK	A*1101(27)	
21	64710	nuclear casein kinase			450.25	2	ATVTPSPVK	A*1101(25)	
22	114299	paralemmin 2			576.79	2	STIGPEGVHQK	A*1101(19)	
23	553115	penta-EF-hand domain (peflin)			505.25	2	VTMTASRML	NA	
24	51604	phosphatidylinositol glycan			615.27	2	DTDHYFLRY	A*01(37)	
25	29968	phosphoserine aminotransferase			489.78	2	GTINIVHPK	A*1101(25)	
26	5356	pleiotropic regulator 1			470.80	2	AVALPLQTK	A*1101(24)	

27	23328	SAM and SH3 domain containing 1 (SASH1)	501.78	2	ALYSGVHKK	A*1101(21)
28	10483	sec23 protein	554.79	2	STIEYVIQR	A*1101(27)
29	10993	serine dehydratase	522.78	2	AVYSHVIQK	A*1101(29)
30	22933	sirtuin	512.26	2	FGESLPARF	A*01(10)
31	6709	spectrin, alpha, non-erythrocytic	492.28	2	FTRSLFVN	NA
32	6711	spectrin, beta, non-erythrocytic	565.30	2	KPRDVSSVEL	B*0702(25)
33	3925	stathmin 1	599.33	2	SVPEFPLSPPK	A*1101(19)
34	10189	THO complex 4	516.24	2	GTADVHFER	A*1101(25)
35	9168	thymosin beta-10	504.27	2	ASFDKAKLK	A*1101(29)
36	7082	tight junction protein ZO-1	591.82	2	IPKNRAEQL	B*0702(22)
37	8295	transformation-transcription domain-associated	498.30	2	SITSVFITK	A*1101(25)
38	6299	zinc finger protein SALL1	453.23	2	ASSSVLSSPA	NA
MHC class II restriction						
1	60	actin	720.35	3	WISKQEYDESGPSIVHRK	DRB1*0101(25)
2	60	actin	604.76	2	GRTTGIVMDSGD	DRB1*0101(11)
3	6622	alpha-synuclein	674.24	2	YEMPSEEGYQD	DRB1*0101(17)
4	10376	alpha-tubulin	678.84	2	FSETGAGKHVPR	DRB1*0101(20)
5	348	apolipoprotein E	697.32	2	AAVGTSAAPVPSDNH	DRB1*0101(24)
6	20	ATP-binding cassette, sub-family A, member 2	641.78	2	KPTISVKEAFY	DRB1*0101(15)
7	506	ATP synthase, H+ transporting, F1 complex	688.79	2	AGEYDHLPEQAF	DRB1*0101(26)
8	506	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	660.33	2	FRDQEGQDVLL	DRB1*0101(35)
9	3043	beta-globin	655.84	2	VHLKNASRGSAGN	DRB1*0101(19)
10	3043	beta-globin	743.40	2	VDPENFRLLGNVL	DRB1*0101(24)
11	5834	brain glycogen phosphorylase	567.28	2	GRTLQNTMVN	DRB1*0101(19)
12	274	bridging integrator 1 (Amphiphysin II)	831.41	2	QEELPSLWNSRVGF	DRB1*0101(24)
13	10814	complexin 2 (synaphin-1)	718.87	2	KYLPGLQDMFK	DRB1*0101(18)
14	1808	dihydropyrimidinase-like 2	591.33	3	TSPAKQQAPPVVRNLHQ	DRB1*0101(24)
15	3336	early-pregnancy factor, EPF (chaperonin 10)	699.33	2	FRDGDILGKYVD	DRB1*0101(23)
16	2108	electron transfer flavoprotein	514.97	3	KVVPEMTEILKKK	DRB1*0101(23)
17	1915	elongation factor 1-alpha	759.40	2	AQVIILNHPGQISAG	DRB1*0101(24)
18	8857	fc fragment of IgG binding protein	733.36	2	ASVDLKNLTGREEF	DRB1*0101(18)
19	2752	glutamine synthetase	777.83	2	LNETGDEPFQYKN	DRB1*0101(18)
20	2597	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	845.87	2	YDNEFGYSNRVVDL	DRB1*0101(18)

21	2784	guanine nucleotide-binding protein	509.26	2	LVSASQDGKL	DRB1*0101(17)
22	135114	histidine triad nucleotide binding protein 3	519.62	3	FITADHLIEKLR	DRB1*0101(10)
23	10314	LanC lantibiotic synthetase component C-like 1	801.46	2	LLVPTKARFPAFEL	DRB1*0101(26)
24	11343	lysophospholipase-like protein	765.37	2	WVSQRTATAGTASPP	DRB1*0101(31)
25	4282	macrophage migration inhibitory factor	851.42	2	TNVPRASVPDGFLESEL	DRB1*0101(18)
26	10226	mannose 6 phosphate receptor (IGF-II)	833.39	2	DVASVQQQRQEQQSY	DRB1*0101(22)
27	4155	myelin basic protein (MBP95-106)	625.33	2	IVTPRTPPPSQG	DRB1*0101(23)
28	25983	neuroguidin	515.32	2	LGVLESDLPS	DRB1*0101(31)
29	29114	neuronal protein NP25 (NP22)	709.36	2	VDWILQCAEDI	DRB1*0101(31)
30	5037	neuropolypeptide h3	699.87	2	PVDLSKWSGPLSL	DRB1*0101(26)
31	6616	synaptosomal-associated protein 25	659.33	2	VEESKDAGIRTL	DRB1*0101(18)
32	135644	tripartite motif-containing 40	639.31	2	ERTAKELDTNT	DRB1*0101(3)
33	29979	Ubiquilin 1	602.78	2	MLSNPDLMRQ	DRB1*0101(8)

MS 31

HLA-Typisierung: HLA-Klasse-I: A*03, A*30, B*18, B*35, C*05, C*04

HLA-Klasse-II: DRB1*01, DRB1*03, DQB1*0501, DQB1*0201

Entrez		Source protein		Charge Peptide sequence		HLA assignment
No.	gene ID			m/z		SYFPEITHI
MHC class I restriction						
1	23461	ATP-binding cassette protein, member 5		485.27	2 TVFSTHFM	NA
2	3043	beta-globin		652.37	2 YQKVAVAGVANALA	NA
3	1272	contactin 1		511.74	2 VTNPDTGRY	NA
4	6477	E3 ubiquitin-protein ligase SIAH1		473.76	2 ATALPTGTSK	A*03(21)
5	8857	fc gamma binding protein		630.86	2 LRPIQALGTEY	NA
6	53826	FXYD domain containing ion transport regulator 6		693.83	2 ITANATEPQKAEN	NA
7	2934	gelsolin		497.78	2 IYKGGTSR	A*03(26)
8	9848	microfibrillar-associated protein 3		497.27	2 VTSPIRASY	A*03
9	374291	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 7		458.76	2 IVAGLTLNK	A*03(26)
10	201305	protein spinster homolog 3		517.32	2 VLGDLFVRD	NA
11	6235	ribosomal protein S29		607.79	2 QLYWSHIPRK	A*03(26)

12	5520	serine/threonine-protein phosphatase 2A	537.33	2	IFANAHTYH	NA
13	22933	sirtuin	580.28	2	ERIAGLEQED	NA
14	10944	small acidic protein	636.30	2	QSMDSKLSGRY	NA
MHC class II restriction						
1	60	actin	630.31	2	YDESGPSIVHR	DRB1*0101(25)
2	60	actin	615.63	3	ISKQEYDESGPSIVHR	DRB1*0101(25)
3	60	actin	720.34	3	WISKQEYDESGPSIVHRK	DRB1*0101(25)
4	3040	alpha-globin	666.84	2	FTPAVHASLDKF	DRB1*0301(19)
5	3040	alpha-globin	529.27	3	LSFPTTKTYFPHF	DRB1*0101(24)
6	10376	alpha-tubulin	678.85	2	FSETGAGKHVPRA	DRB1*0101(20)
7	10376	alpha-tubulin	692.88	2	VDLEPTVIDEVR	DRB1*0101(16)
8	335	apolipoprotein A-I	819.43	2	LSALEEYTKKLNTQ	DRB1*0301(18)
9	3043	beta-globin	655.83	2	VHLTPEEKSAVT	DRB1*0301(20)
10	3043	beta-globin	806.93	2	GKVNVDVGGGALGRL	DRB1*0101(31)
11	3043	beta-globin	863.46	2	GKVNVDVGGGALGRLL	DRB1*0101(31)
12	801	calmodulin 1	701.33	2	IREADIDGGDQVN	DRB1*0101(16)
13	6359	chemokine CC-2 (MIP 5)	589.33	2	SVAALSCLMLVA	DRB1*0101(24)
14	1808	dihydropyrimidinase-like 2	591.30	3	TSPAKQQAPPVRNLHQ	DRB1*0101(24)
15	3336	early-pregnancy factor, EPF (chaperonin 10)	699.36	2	FRDGDILGKYVD	DRB1*0101(23)
16	8857	fc fragment of IgG binding protein	789.91	2	ASVDLKNLTGREEFL	DRB1*0301(26)
17	8857	fc fragment of IgG binding protein	875.93	2	ASVDLKNLTGREEFLTA	DRB1*0301(26)
18	3959	galectin-3-binding protein	767.72	3	QTPQHPSFLFQDKRVSWSL	DRB1*0301(28)
19	2670	glial fibrillary acidic protein (GFAP149-160)	701.87	2	ATVRQKLQDETN	DRB1*0301(18)
20	2670	glial fibrillary acidic protein (GFAP388-398)	639.33	2	QIRETSLDTKS	DRB1*0301(13)
21	2747	glutamate dehydrogenase	801.39	2	MSILGMTPGFGDKTF	DRB1*0101(21)
22	2752	glutamine synthetase	777.82	2	LNETGDEPFQYKN	DRB1*0301(20)
23	3039	hemoglobin, alpha 1	634.86	2	LASVSTVLTISKY	DRB1*0101(21)
24	135114	histidine triad nucleotide binding protein 3	519.63	3	FITADHLIEKIRT	DRB1*0301(21)
25	4155	myelin basic protein (MBP96-111)	549.97	3	VTPRTPPPSQGKGRGL	DRB1*0101(23)
26	9378	neurexin 1	529.28	3	SNAIINDGKYHVVR	DRB1*0301(28)
27	9378	neurexin 1	572.30	3	ESNAIINDGKYHVVR	DRB1*0301(28)
28	9379	neurexin 2	561.96	3	EPNAIVSDGKYHVVR	DRB1*0301(29)
29	5037	neuropolyptide h3	699.88	2	PVDLSKWSGPLSL	DRB1*0101(26)

30	8404	SPARC-like protein 1	573.02	3	KVKKIYLDEKRLLA	DRB1*0301(37)
31	8404	SPARC-like protein 1	592.02	3	KVKKIYLDEKRLLAG	DRB1*0301(37)
32	8404	SPARC-like protein 1	630.37	3	KVKKIYLDEKRLLAGD	DRB1*0301(37)
33	6616	synaptosomal-associated protein 25	659.34	2	VEESKDAGIRTL	DRB1*0101(18)

MS 34

HLA-Typisierung: HLA-Klasse-I: A*01, A*01, B*08, B*08, C*07, C*07

HLA-Klasse-II: DRB1*03, DRB1*03, DRB1*03, DQB1*0201, DQB1*0201

Entrez		Source protein		Charge Peptide sequence		HLA assignment
No.	gene ID			m/z		SYFPEITHI
MHC class I restriction						
1	311	annexin A11		677.31	ETDLLDIRSEY	A*01(34)
2	79152	fatty acid 2-hydroxylase		608.31	LILPEAVGGTVF	NA
3	4155	myelin basic protein (MBP36-45)		539.75	TGILDSIGRF	NA
4	4155	myelin basic protein (MBP35-45)		595.75	DTGILDSIGRF	NA
5	6637	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide G		607.87	VWIRGNSIIML	NA
6	7450	von Willebrand factor		668.83	VTVFPIGIDRY	NA
MHC class II restriction						
1	60	actin		720.35	WISKQEYDESGPSIVHRK	DRB1*0301(11)
2	10376	alpha-tubulin		692.76	VDLEPTVIDEVR	DRB1*0301(13)
3	10376	alpha-tubulin		678.86	FSETGAGKHVPRA	DRB1*0301(11)
4	8907	AP-1 complex subunit mu-1		718.85	ITQNGDYQLRTQ	DRB1*0301(20)
5	9551	ATP synthase, H+ transporting, F0 complex		666.31	FLGVAYGATRYN	DRB1*0301(11)
6	9551	ATP synthase, H+ transporting, F0 complex		643.35	PKFEVIEKPQA	DRB1*0301(15)
7	3043	beta-globin		492.75	VGGEALGRLL	DRB1*0301(18)
8	5576	cAMP-dependent protein kinase		614.78	RQQPPDLVEF	DRB1*0301(10)
9	1212	clathrin, light polypeptide		580.81	MSLKQTPLSR	DRB1*0301(12)
10	161436	echinoderm microtubule associated protein like 5		656.24	PSIHWDTEI	DRB1*0301(10)
11	2271	fumarate hydratase		771.89	DEWVKPKDMLGPK	DRB1*0301(15)
12	7107	G protein-coupled receptor 137B		656.84	LWVYFFRVRN	DRB1*0301(18)
13	2752	glutamine synthetase		777.81	LNETGDEPFQYKN	DRB1*0301(20)

14	2597	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	750.38	2	TTMEKAGAHLQGGAK	DRB1*0301(12)
15	2597	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	585.27	2	FGYSNRVVDL	DRB1*0301(15)
16	3039	hemoglobin, alpha 1	634.86	2	LASVSTVLTISKY	DRB1*0301(20)
17	4741	neurofilament-3 (medium polypeptide)	731.35	2	EIIIEETKVEDEK	DRB1*0301(19)
18	64115	platelet receptor G _i 24 precursor	606.27	2	VVYPSSSQESE	DRB1*0301(13)
19	5901	ran 25kDa, ras-related protein	686.81	2	ARKLIGDPNLEF	DRB1*0301(37)
20	5649	reelin	595.80	2	SCGDLHSMVLE	DRB1*0301(11)
21	10975	ubiquinol-Cytochrome c reductase	804.93	2	WVPYINGKFKKDN	DRB1*0301(17)

MS 46

HLA-Typisierung: HLA-Klasse-I: A*03, A*68, B*07, B*14, C*07, C*08

HLA-Klasse-II: DRB1*13, DRB1*1501, DQB1*0301, DQB1*0602

Entrez		Source protein	m/z	Charge	Peptide sequence	HLA assignment
No.	gene ID					SYFPEITHI
MHC class I restriction						
1	3577	interleukin 8 receptor (CXCR1)	537.29	2	LFALTLPIW	NA
2	2670	glial fibrillary acidic protein, GFAP(375-384)	594.75	2	NRITIPVQTF	Cw*07
3	255626	histone H2B	576.73	2	FVNDIFERI	NA
4	9600	phosphatidylinositol transfer protein	569.81	2	QLYMIQKKS	NA
5	64840	porcupine homolog	538.82	2	LASGVHGLPLL	B*07(17)
6	7401	USH3A (clarin 1)	564.22	2	TTGILSILFY	A*03(10)
MHC class II restriction						
1	60	actin	548.79	2	DESGPSIVHR	DRB1*1501(14)
2	60	actin	694.37	2	YDESGPSIVHRK	DRB1*1501(14)
3	60	actin	657.39	3	ISKQEYDESGPSIVHRK	DRB1*1501(14)
4	60	actin	720.35	3	WISKQEYDESGPSIVHRK	DRB1*1501(14)
5	3040	alpha-globin	1065.97	3	VLSPADKTNVKAAWGKVGHAHAGEYGAEALER	DRB1*1501(20)
6	3040	alpha-globin	578.33	3	FLSFTTKTYFPHF	DRB1*1501(26)
7	3040	alpha-globin	666.90	2	FTPAVHASLDKF	DRB1*1501(14)
8	2	alpha-2-macroglobulin	711.41	2	SSKFQVDNNRL	DRB1*1501(16)
9	3043	beta-globin	1092.33	3	VHLTPEEKSAVTALWGKVVNDEVGGEALGRL	DRB1*1501(20)

10	3336	early-pregnancy factor, EPF (chaperonin 10)	699.40	2	FRDGDILGKYVD	DRB1*1501(18)
11	8857	fc fragment of IgG binding protein	876.01	2	ASVDLKN TGREEFLTA	DRB1*1501(14)
12	2512	ferritin	502.30	3	TPDAMKAAMALEKK	DRB1*1501(24)
13	2512	ferritin, light polypeptide	612.01	3	VSHFFRELAEEKREG	DRB1*1501(24)
14	2670	glial fibrillary acidic protein (GFAP389-400)	668.38	2	IRETSLDTKSVS	DRB1*1501(14)
15	2752	glutamine synthetase	777.88	2	LNETGDEPFQYKN	DRB1*1501(10)
16	3039	hemoglobin, alpha 1	634.88	2	LASVSTVLT SKY	DRB1*1501(24)
17	26119	low density lipoprotein receptor, LDLR	662.90	2	IVYYPVHGFMY	DRB1*1501(20)
18	4155	myelin basic protein (MBP11-25)	795.41	2	HGSKYLATASTMDHA	DRB1*1501(24)
19	4155	myelin basic protein (MBP77-91)	811.93	2	SHGRTQDENPVVHF	DRB1*1501(14)
20	4741	neurofilament-3 (medium polypeptide)	666.88	2	IIETKVEDEK	DRB1*1501(16)
21	5037	neuropolypeptide h3	699.93	2	PVDLSKWSGPLSL	DRB1*1501(28)
22	9806	sparc/osteonectin, (SPOCK)	855.02	2	LERIQIQEA AKKPKG	DRB1*1501(18)
23	7341	SUMO1 (sentrin)	655.07	3	GWSSHPPPPSPCREQEIR	DRB1*1501(8)

8. Publikationen

HLA ligand profiles of primary renal cell carcinoma maintained in metastases.

Stickel JS, Weinzierl AO, Hillen N, **Drews O**, Schuler MM, Hennenlotter J, Wernet D, Müller CA, Stenzl A, Rammensee HG, Stevanović S
Cancer Immunol Immunother. 2009 Sep;58(9):1407-17.

Identification of natural MHC class II presented phosphopeptides and tumor-derived MHC class I phospholigands.

Meyer VS, **Drews O**, Günder M, Hennenlotter J, Rammensee HG, Stevanović S.
J Proteome Res. 2009 Jul;8(7):3666-74.

Naturally presented peptides on major histocompatibility complex I and II molecules eluted from central nervous system of multiple sclerosis patients.

Fissolo N, Haag S, de Graaf KL, **Drews O**, Stevanović S, Rammensee HG, Weissert R.
Mol Cell Proteomics. 2009 Sep;8(9):2090-101.

9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Stefan Stevanović für die Aufnahme in seine super miteinander harmonisierende Arbeitsgruppe, für sein reges Interesse an den neuesten Entwicklungen im MS-Bereich und dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, mich all die Jahre nach Herzenslust an den Massenspektrometern austoben zu können.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee dafür, dass er mich in seinen Arbeitskreis aufgenommen hat, für die Anregungen und Diskussionen und für die hervorragende Arbeitsatmosphäre in der gesamten Abteilung.

Meinen tiefsten Dank richte ich an Marc Günder, der echtes Durchhaltevermögen an den Massenspektrometern bewiesen hat, auch dann, wenn wieder mal gar nichts mehr funktionieren wollte, der mir bei der Lösung so vieler Probleme geholfen hat und es immer wieder verstand, mich mit einem fröhlichen ‚Tja, Oli... There’s no easy way out!‘ aufzumuntern. Ohne ihn hätte die Arbeit nicht ansatzweise so viel Spaß gemacht.

Matthias Wenzel danke ich für den ganzen Bastelspaß, den wir zusammen hatten, für die immer wieder erheiternden Geschichten rund ums Auto und dafür, dass er mich regelmäßig auf echte Insider-Tipps im Bereich der Unterhaltungssoftware aufmerksam gemacht hat.

Ich danke Andi Weinzierl, Margret Müller und Nina Hillen dafür, dass sie mich aufopferungsvoll in die Geheimnisse der Massenspektrometrie eingeweiht haben, so dass ein Fragmentspektrum für mich nicht mehr länger eine wirre Ansammlung von Strichen war.

Meiner Musterdiplomandin Vanessa Hoffmann danke ich für die gemeinsame Zusammenarbeit an unserem ‚Super-Duper-HLA-Projekt‘ und möchte ihr nochmals dazu gratulieren, dass sie mich auf dem Nordring so schön ‚versägt‘ hat.

Ein dickes Lob geht an Mathias Walzer, der in der kurzen Zeit, in der er bei uns in der Gruppe ist schon so viele Verbesserungen in der Peptiddatenbank eingeführt hat, die mir das Leben um so vieles erleichtert haben. Vielen Dank dafür.

Ein dickes Dankeschön geht auch an all meine Bürokolleginnen und Bürokollegen, die inzwischen in ganz alt (Andi Weinzierl, Nina Hillen, Florian Altenberend), alt (Marc Günder und Gabor Mester), neu (Felix Klug und Hans-Henning Schmidt), neuer (Vanessa Hoffmann und Melanie Märklin) und am neuesten (Felix Dingler und Nico Trautwein) eingeteilt werden können, für den gemeinsamen Spaß, den wir zusammen hatten. Es ist in meinen Augen in jeder Besetzung das lustigste Büro im ganzen Verfügungsgebäude gewesen.

Ich danke Patricia Hršić und Nicole Zuschke für die vielen synthetischen Peptide, die für die Versuche milligrammweise verschwendet wurden, Claudia Falkenburger für den stetigen Nachschub an Antikörpern, Zellkulturmedium und PBS, Franziska Löwenstein für all die sauberen Gefäße und Pipettenspitzen, bei denen es nie einen Engpass gab, sowie Beate Pömmerl für ihr Talent, jedes noch so abwegige Verbrauchsmaterial irgendwo her aufzutreiben, wenn es am allernötigsten gebraucht wurde.

Meinen Kollegen aus dem T-Zell-Büro: Desi Rudolph, Dominik Maurer, Stefan Löb, Thomas Feger, Christina Kyzirakos, Matthias Miller, Janet Peper, Christina Christ und Chris Hotz, und meinen Kollegen aus dem Büro Richtung Sekretariat, Heiko Schuster und Martin Klatt, ohne die das Arbeitsklima in der Gruppe nur halb so toll gewesen wäre, gilt ebenfalls mein Dank.

Außerdem danke ich meiner Alternativgruppe bestehend aus Martin Hofmann, Karolin Schwartz, Michael Durben, Max Bamberg, Karoline Laske, Christian Barthels und Melanie Widenmeyer dafür, dass sie mich immer dann adoptiert und zum Essen mitgenommen hat, wenn der Hunger um halb zwölf noch nicht so groß war.

Lynne Yakes und Gerhard Hörr danke ich von ganzem Herzen für ihre zuverlässigen organisatorischen Meisterleistungen in allen nur erdenklichen Bereichen, die viele Dinge um so viel leichter gemacht haben. Lynne danke ich zusätzlich noch für die ganzen Brezeln, und Shortbreads, die mich über so manchen Vormittag gerettet haben.

Nicolas Fissolo und Sabrina Haag danke ich für die tolle Kooperation in unserem Multiple Sklerose-Projekt und dafür, dass die Zusammenarbeit auch über dieses Projekt hinaus weiter bestand.

Gerade in Sachen Autosampler und Orbitrap wäre vieles nicht ohne die Hilfe von Stephan Jung, Stuart Pengelley und Johannes Madlung so schnell vorangegangen, wie es der Fall war, weshalb ich mich hierfür nochmals bei ihnen bedanken will.

Unserem Hausmeister Georg ‚Schorsch‘ Tiedemann danke ich für seine ständige Bereitschaft, bei Problemen aller Art zu helfen und dafür, uns beim Aufbau irgendwelcher Last-Minute-Festivitäten tatkräftig zu unterstützen.

All den anderen Elchen – den Jungs, den ehemaligen Steinles, den Deckers, den Gückels, den Gouttefangas’ und all den eigenständigen assoziierten Personen – danke ich für die besondere Atmosphäre, die im Arbeitskreis herrscht.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder, die mich allesamt in den Jahren meines Studiums und meiner Doktorarbeit unterstützt haben und ohne die ich das alles nicht so ohne weiteres hätte durchziehen können.

Zuletzt danke ich Gaby, die in den letzten viereinhalb Jahren immer für mich da war. Ohne ihren Rückhalt und ihre Unterstützung wäre mir die Arbeit viel schwerer gefallen.