

**HLA-Ligandenanalysen im Kontext
der Tumorummunologie, der
Autoimmunität und der parasitären
Onchozerkose**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN

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

vorgelegt von
Christian Thomas Hotz
aus Lindau (B)

Tübingen, 2014

Tag der mündlichen Prüfung

30.10.2014

Dekan

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter

Prof. Dr. Stefan Stevanović

2. Berichterstatter

Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee

Die vorliegende Dissertation wurde unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. Stefan Stevanović

in der Zeit von November 2010 bis August 2014 am Interfakultären Institut für Zellbiologie, in der Abteilung Immunologie der Universität Tübingen durchgeführt.

Ich versichere, dass ich die Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt habe. Von anderen Personen übernommene Daten oder durchgeführte Arbeiten sind als solche gekennzeichnet

Tübingen, den 30.10.2014

Christian Hotz

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.1.1 Die Haupthistokompatibilitätskomplex-Moleküle	2
1.1.2 Aufbau und Funktion der MHC-Klasse-I/-II-Moleküle	4
1.1.3 MHC-Klasse-I-Antigenprozessierung	6
1.1.4 MHC-Klasse-II-Antigenprozessierung	10
1.2 Die Prostata	13
1.2.1 Aufbau und Struktur der Prostata	13
1.2.2 Das Prostatakarzinom	14
1.3 Die Immuntherapie	19
1.3.1 Die allgemeine Immuntherapie	19
1.3.2 Die Krebsimmuntherapie	19
1.3.3 Immuntherapie gegen Prostatakrebs	20
1.4 Multiple Sklerose	25
1.4.1 Ursachen der Multiplen Sklerose	26
1.4.2 Genetische Faktoren als Ursache der Multiplen Sklerose	26
1.5 <i>Onchocerca volvulus</i>	29
1.5.1 Lebenszyklus von <i>O. volvulus</i>	29
1.5.2 Epidemiologie der Onchozerkose (Flussblindheit)	31
1.5.3 Die Onchozerkose und das Immunsystem	31
2 Material und Methoden	33
2.1 Material	33
2.1.1 Verbrauchsmittel	33
2.1.2 Geräte und Zubehör	34
2.1.3 Chemikalien und Lösungen	37
2.1.4 Puffer	39
2.1.5 Antikörper	40
2.1.6 Zytokine und Enzyme	41
2.1.7 Zelllinien	41
2.1.8 Software	41
2.1.9 Datenbanken	42
2.1.10 Analytierte Prostatagewebeprobe	42
2.1.11 Onchozerkome und Hautgewebeprobe	43
2.2 Methoden	44

2.2.1	Bestimmung der Lebendzellzahl.....	44
2.2.2	Einfrieren von Zellen.....	45
2.2.3	Lymphozytenseparation aus Leukapheresen.....	45
2.2.4	PBMC-Isolation aus Spendervollblut	46
2.2.5	Magnetunterstützte Zellseparation von T-Zellen (MACS).....	46
2.2.6	Künstliche antigenpräsentierende Zellen (aAPC)	47
2.2.7	Biotinylierung des anti-CD28-Antikörpers	48
2.2.8	aAPC-Synthese.....	48
2.2.9	<i>In vitro</i> -Stimulation naiver CD8 ⁺ T-Zellen mittels aAPCs.....	49
2.2.10	Tetramerisierung von MHC-Monomeren.....	50
2.2.11	Tetramerfärbung von CD8 ⁺ T-Zellen.....	50
2.2.12	Durchflusszytometrische Analyse antigenspezifischer T-Zellen.....	51
2.2.13	Aufreinigung von MHC- Liganden aus Zell- oder Gewebeproben mittels Affinitätschromatographie	52
2.2.14	Herstellung der Antikörper-gekoppelten CNBr-Sepharose-Säule.....	53
2.2.15	Homogenisierung von Gewebe oder Zelllinien.....	53
2.2.16	HLA-Affinitätschromatographie	54
2.2.17	Enzymatischer Verdau von MHC-Molekülen aus Gewebeproben.....	54
2.3	Massenspektrometrie	55
2.3.1	Elektrosprayionisation (ESI)	57
2.3.2	Aufbau und Funktionsweise des Massenspektrometers LTQ Orbitrap XL	59
2.3.3	Vorbereitung der Proben für die Messung	65
2.3.4	<i>Online</i> -Kopplung von Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie	65
2.4	Auswertung	69
2.4.1	Prozessierung und Auswertung massenspektrometrischer Daten	69
2.4.2	Interpretation von Fragmentspektren.....	72
2.4.3	Strategien für die Identifikation tumorassoziierter HLA-Klasse-I-Liganden aus Prostatagewebe.....	75
2.4.4	Zuordnung der HLA-Motive	77
3	Ergebnisse	80
3.1	Identifikation tumorassoziierter HLA-Klasse-I-Liganden für die Immuntherapie des Prostatakarzinoms.....	80
3.1.1	Auswahl der Prostata-Gewebeproben	80
3.1.2	Anzahl identifizierter Peptide auf Prostatagewebe.....	81
3.1.3	Ausbeute und Sequenzgewinn bei Vernachlässigung der FDR	83
3.1.4	Sequenzausbeute pro Gramm eingesetztem Gewebe.....	84
3.1.5	Identifikation tumorassoziierter Antigene über den <i>classical approach</i>	86
3.1.6	Analyse der Immunhistologie der selektierten tumorassozierten Antigene über den Humanen Protein Atlas (HPA)	90
3.1.7	Identifizierte HLA-Klasse-I-Liganden aus tumorassozierten Antigenen	93
3.1.8	Bestätigung der Peptidsequenzen über synthetische Peptide	96
3.1.9	Bestimmung der HLA-Expression verschiedener Prostatagewebe	101
3.1.10	Bestimmung der HLA-Restriktion relevanter HLA-Liganden aus TAA der Prostata.....	112

3.1.11	Charakterisierung neuer T-Zellepitope für die Behandlung des Prostatakarzinoms.....	114
3.2	Charakterisierung HLA-DR15-assoziiierter HLA-Klasse-II-Liganden	119
3.2.1	Funktion des HLA-DR15-Haplotyps in der autologen Proliferation bei MS.....	124
3.3	HLA-Ligandenanalyse von mit <i>O. volvulus</i> infizierten Knoten und Hautgewebe	125
3.3.1	Identifikation von HLA-Liganden aus <i>O. volvulus</i> und <i>Wolbachia</i> innerhalb humaner Gewebeprobe.....	125
3.3.2	HLA-Liganden aus <i>O. volvulus</i> und <i>Wolbachia</i>	128
4	Diskussion	130
4.1	Identifikation tumorassoziierter HLA-Klasse-I-Liganden für die Immuntherapie des Prostatakarzinoms	130
4.1.1	HLA-Klasse-I-Liganden für die Immuntherapie des Prostatakarzinoms	130
4.1.2	Peptidcocktail für die Immuntherapie des Prostatakarzinoms	133
4.2	HLA-DR15-Ligandenanalyse im Kontext der Multiplen Sklerose	135
4.2.1	HLA-Klasse-II-Liganden in Präsentation auf HLA-DR15	135
4.3	HLA-Liganden im Kontext der parasitären Onchozerkose	137
4.3.1	HLA-Klasse-I- und -Klasse-II-Liganden aus <i>O. volvulus</i> und <i>Wolbachia</i>	137
5	Zusammenfassung.....	139
6	Abkürzungsverzeichnis	140
7	Danksagung.....	144
8	Literaturverzeichnis	145

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur des humanen MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküls	5
Abbildung 2: Röntgenstruktur und räumliche Interpretation des menschlichen MHC ...	5
Abbildung 3: Schematischer Überblick über den MHC-Klasse-I-Antigenprozessierungsweg.....	10
Abbildung 4: Schematischer Überblick über den MHC-Klasse-II-Antigenprozessierungsweg.....	12
Abbildung 5: Darstellung der Prostatazonen in der Sagittalebene	13
Abbildung 6: Inzidenz und Mortalität häufiger Krebserkrankungen bei Männern in Deutschland 2007/2008.....	15
Abbildung 7: Schematische Darstellung des <i>Gleason-Score-Systems</i>	17
Abbildung 8: Beispiele für antigenspezifische Immuntherapien beim Prostatakarzinom	23
Abbildung 9: Immuntherapieformen beim Prostatakarzinom, die nicht gegen ein einzelnes Antigen gerichtet sind	24
Abbildung 10: Der Lebenszyklus von <i>Onchocerca volvulus</i>	30
Abbildung 11: Zeitverlauf der <i>in vitro</i> -Stimulation mit aAPCs.....	49
Abbildung 12: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers	52
Abbildung 13: Schematische Darstellung beider Modelle der Ionenbildung bei der Elektrosprayionisation.....	59
Abbildung 14: Schematischer Aufbau des Massenspektrometers LTQ Orbitrap XL	60
Abbildung 15: Querschnitt und Funktion eines Orbitrap-Massenanalysators	62
Abbildung 16: Schematische Darstellung der Peptidfragmentierung und entsprechender Nomenklatur der Fragmentionen.....	73
Abbildung 17: Durchschnittliche Ausbeute an Peptidsequenzen von Prostatagewebe....	84
Abbildung 18: Gewebemasse und Sequenzausbeute pro Gewebe bei einer FDR $\leq 5\%$	85
Abbildung 19: Anzahl der vorgeschlagenen HLA-Liganden in Abhängigkeit von der eingesetzten Gewebemenge	86
Abbildung 20: Vergleichende Darstellung des mRNA-Levels von KLK3 in diversen normalen humanen Gewebeproben.....	87
Abbildung 21: Validierung der Fragmentspektren über synthetische Peptide gleicher Sequenz	97
Abbildung 22: Verteilung der HLA-Restriktion der Peptidsequenzen aus Pro006	104

Abbildung 23: *Gating*-Strategie bei der Charakterisierung von CD8 T-Zell Epitopen. 116

Abbildung 24: Analyse des KLK4-abgeleiteten HLA-B*07-Liganden HPEYNRPLL:... 117

Abbildung 25: Analyse des HDGF-abgeleiteten HLA-B*07-Liganden APGIRDHESL:117

Abbildung 26: Vergleichende Peptidannotation derselben m/z in *O. volvulus* und *H. sapiens*..... 127

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Anzahl der klassischen MHC-Klasse-I- und -Klasse-II-Allele im Menschen.....	3
Tabelle 2:	Einteilung der Krebsimmuntherapie mit Beispielen	20
Tabelle 3:	Verwendete Antikörper für die MHC-Isolierung	40
Tabelle 4:	Verwendete Antikörper zur Oberflächenfärbung	41
Tabelle 5:	Für die aAPC-Synthese eingesetzte Antikörper	41
Tabelle 6:	Übersicht über die verwendeten Zelllinien	41
Tabelle 7:	Humane Prostatagewebe für die HLA-Klasse-I-Ligandenanalyse	43
Tabelle 8:	Humane Gewebeproben mit Onchozerkose	44
Tabelle 9:	Ablauf des Lösungsmittelflusses der Eksigent-HPLC.....	67
Tabelle 10:	Die 20 proteinogenen Aminosäuren und ihre Massen.....	75
Tabelle 11:	Anzahl sequenzierter Peptide pro Gewebeprobe.....	83
Tabelle 12:	Übersicht über die nach dem <i>classical approach</i> identifizierten Antigene für die Immuntherapie des Prostatakarzinoms	89
Tabelle 13:	Analyse der Expression aller relevanten Antigene auf Protein- und RNA-Ebene	92
Tabelle 14:	Übersicht über die identifizierten HLA-Klasse-I-Liganden von Prostatagewebe.....	94
Tabelle 14:	Fortsetzung 1	95
Tabelle 15:	Identifizierte HLA-Klasse-I-Liganden mit synthetischer Peptidverifikation	99
Tabelle 15:	Fortsetzung 1	100
Tabelle 15:	Fortsetzung 2	101
Tabelle 16:	Übersicht der HLA-Typisierung der Prostatagewebe	107
Tabelle 17:	Nach der <i>shotgun</i> -Methode identifizierte tryptische Peptide aus HLA-A und HLA-B.....	108
Tabelle 17:	Fortsetzung 1	109
Tabelle 17:	Fortsetzung 2	110
Tabelle 17:	Fortsetzung 3	111
Tabelle 18:	HLA-Restriktion der HLA-Liganden in SYFPEITHI und NetMHC	113
Tabelle 18:	Fortsetzung 1	114

Tabelle 19:	Charakterisierung neuer T-Zellepitope von TAA der Prostata im Rahmen der MultiPro-Kooperation.....	118
Tabelle 20:	HLA-Klasse-II-Liganden aus DR2a-transfizierten BLS-Zellen	120
Tabelle 20:	Fortsetzung	121
Tabelle 21:	HLA-Klasse-II-Liganden aus DR2b-transfizierten BLS-Zellen	122
Tabelle 21:	Fortsetzung	123
Tabelle 22:	Vergleichende Analyse der Peptidannotation innerhalb verschiedener Datenbanken	126
Tabelle 23:	Identifizierte HLA-Liganden aus <i>O. volvulus</i> und <i>Wolbachia</i>	129
Tabelle 24:	Berechnungen zur kumulativen Allelhäufigkeit.....	134

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Der menschliche Körper ist während seines Lebens einer enormen Anzahl von Pathogenen wie Bakterien, Viren, Pilzen oder Parasiten ausgesetzt. Das Immunsystem (IS) hat dabei die zentrale Rolle der Erkennung und Abwehr dieser Fremdstoffe. Im Laufe der Evolution haben sich in Säugetieren Abwehrmechanismen entwickelt, die es ihnen ermöglichen körperfremde Strukturen zu erkennen und bekämpfen. Dabei unterscheidet das Immunsystem nicht nur zwischen körpereigenen und -fremden Substanzen, vielmehr entscheidet es ob eine vorliegende Struktur als gefährlich oder ungefährlich eingeschätzt wird ¹. Das Immunsystem bedient sich dabei zweierlei Wege diese gefährlichen Strukturen zu erkennen und zu eliminieren: dem angeborenen und dem erworbenen bzw. dem adaptiven Immunsystem. Das angeborene Immunsystem ist bereits kurz nach der Geburt vollständig entwickelt und umfasst Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen (DC), Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und nicht zelluläre Komponenten wie das Komplementsystem. Physische Barrieren des Körpers wie die Epidermis und die Schleimhäute zählen ebenfalls zu dem angeborenen Immunsystem, da sie ein Eindringen von Pathogenen zusätzlich erschweren. Das angeborene oder auch nicht-adaptive Immunsystem erkennt Pathogen-assoziierte Strukturen (engl. *pathogen-associated molecular patterns*; PAMPS), die auf einem breiten Spektrum von Pathogenen zu finden sind. Die Erkennung durch die zelluläre Komponente der angeborenen unspezifischen Immunabwehr erfolgt hierbei über spezielle Rezeptoren (engl. *pattern-recognition receptor*; PRR), die eine Erkennung von PAMPS ermöglichen. Neben der direkten und schnellen Erkennung und Abwehr von gefährlichen Pathogenen besteht die Aufgabe des angeborenen Immunsystems in der Instruktion und Aktivierung der adaptiven Immunität während einer Infektion. Von zentraler Bedeutung sind hier vor allem die antigenpräsentierenden Zellen (engl. *antigen presenting cells*; APC), die eine Verbindung zwischen angeborener und erworbener Immunität darstellen. Im Unterschied zur adaptiven Immunität besitzen die Zellen der angeborenen Immunität eine Vielzahl von Rezeptoren, die ihnen eine breite Erkennung verschiedener Pathogene ermöglicht. Ein Beispiel für solche Rezeptoren wären die Toll-like-Rezeptoren, die verschiedene Pathogen-assoziierte Strukturen wie z.B. Lipopolysaccharid (LPS) erkennen ².

Das erworbene bzw. das adaptive Immunsystem besitzt wie das angeborene Immunsystem sowohl zelluläre als auch humorale Komponenten, die sich allerdings erst über einen gewissen Zeitraum vollständig entwickeln. Von zentraler Bedeutung in der adaptiven Immunität sind vor allem T-Zellen, die eine zelluläre Immunantwort vermitteln, aber auch B-Zellen, die für die humorale adaptive Immunantwort in Form von Antikörpern verantwortlich sind. Zellen des adaptiven Immunsystems besitzen im Unterschied zum angeborenen Immunsystem spezielle Rezeptoren, die eine spezifische Erkennung unbekannter Strukturen erst ermöglicht. Dabei bildet das adaptive Immunsystem im Laufe seines Lebens ein immunologisches Gedächtnis, das eine weitaus schnellere und effektivere Bekämpfung bei erneutem Kontakt mit einem bereits bekannten Antigen ermöglicht. Die Fähigkeit des adaptiven Immunsystems fremde oder neuartige Strukturen zu erkennen, beruht dabei auf der klonalen Selektion (engl. *clonal selection*) von Lymphozyten und deren antigenspezifischer Rezeptoren. Obwohl das adaptive Immunsystem eine spezifischere Erkennung und Bekämpfung von Pathogenen ermöglicht, ist es immer erst auf eine Aktivierung durch das angeborene Immunsystem angewiesen³.

1.1.1 Die Haupthistokompatibilitätskomplex-Moleküle

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. *major histocompatibility complex*; MHC) ist beim Menschen auf Chromosom 6 lokalisiert und hat eine Länge von ungefähr $4 \cdot 10^6$ Basenpaaren (bp). Der MHC kodiert für eine Reihe von Genen, die unter anderem wichtige Proteine für die Antigenpräsentation, aber auch viele andere für das Immunsystem wichtige Proteine enthalten⁴. Die Aufgabe der MHC-Moleküle besteht darin, das Proteom einer Zelle in Form von kurzen Peptiden auf der Zelloberfläche zu präsentieren, die ihrerseits wieder von T-Zellen erkannt werden können. Erst eine Kombination von MHC-Molekül und gebundenem Peptid ermöglichen eine spezifische Erkennung von „gefährlichen“ Strukturen durch T-Zellen.

Der Name dieser Gruppe von Genen resultiert aus ihrer Entdeckung bei Transplantationsversuchen an Mäusen, bei denen Abstoßungsreaktionen von transplantiertem Tumorgewebe unter verschiedenen Mausstämmen beobachtet wurden⁵. Wie bereits erwähnt ist der MHC-Genkomplex beim Menschen auf Chromosom 6 lokalisiert, mit Ausnahme des β 2-Mikroglobulins, welches auf Chromosom 15 kodiert ist. Die im Menschen exprimierten MHC-Moleküle werden HLA genannt (engl. *human leukocyte antigen*), wobei jeder Mensch zwei Merkmale (Allele) pro Genort (Locus) besitzt, ein mütterlich und ein väterlich ererbtes. Die sogenannten klassischen MHC-Moleküle der Klasse-I und der Klasse-II sind dabei elementare Bestandteile der Antigenpräsentation

wie auch der Antigenerkennung durch verschiedene T-Zell-Populationen. Den MHC-Klasse-I- wie MHC-Klasse-II-Molekülen ist gemeinsam, dass sie sowohl polygen als auch polymorph angelegt sind. Dies bedeutet, dass es mehrere MHC-Gene gleicher Funktion gibt, von denen wiederum hunderte verschiedener Varianten (Allele) in der Gesamtpopulation vorkommen können. Zusätzlich werden die Gene des MHC kodominant vererbt, was bedeutet, dass sowohl das mütterliche als auch das väterliche MHC-Allel exprimiert wird. Beim Menschen gibt es drei Gene für die α -Ketten der HLA-Klasse-I-Moleküle (HLA-A, -B -C) sowie drei Paare von Genen für die α -Ketten der HLA-Klasse-II-Moleküle (HLA-DR, -DP, -DQ), wobei von jedem Locus zwei Varianten exprimiert werden (väterliches und mütterliches).

Das hat zur Folge, dass Viren oder andere Pathogene, die einer Präsentation auf einem spezifischen HLA-Molekül entgehen können, beispielsweise durch Mutation und resultierenden Aminosäureaustausch, nicht automatisch ihrer Präsentation durch andere HLA-Moleküle entgehen können. Man spricht daher von der so genannten Herdenimmunität (engl. *herd immunity*). Die Herdenimmunität sorgt dafür, dass Krankheitsereger, die ihrer Präsentation und Bekämpfung in einem Individuum entgehen können, nicht automatisch zur Auslöschung der gesamten Population führen. Da verschiedene HLA-Proteine unterschiedliche Peptide binden und präsentieren und zusätzlich verschiedene Allele für jeden HLA-Locus existieren, erhöhen sowohl Polygenie als auch der Polymorphismus innerhalb des HLA-Locus das Spektrum an verschiedenen Peptidsequenzen, die von einer Zelle präsentiert werden können. Dieser Polymorphismus ist weiterhin für die Gewebeinkompatibilität bei Transplantationen verantwortlich, bei der das Immunsystem der Gewebeempfänger die MHC-Moleküle des Spenderorgans als körperfremde Strukturen erkennt und bekämpft. Es gibt derzeit über 11 000 bekannte HLA-Allele, von denen allerdings nicht alle auch ein funktionsfähiges Protein bilden. Die Anzahl der verschiedenen HLA-Allele und Proteine wächst dabei ständig, so dass fast täglich neue Allele bzw. Proteine hinzugefügt werden. Die aktuellen Zahlen der Allele und Proteine für die wichtigsten HLA-Klasse-I- und HLA-Klasse-II-Allele zum Zeitpunkt August 2014 sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Anzahl der klassischen MHC-Klasse-I- und -Klasse-II-Allele im Menschen

Typ	HLA-Klasse-I				HLA-Klasse-II						
	HLA-A	HLA-B	HLA-C	Summe	DRA	DRB	DQA1	DQB1	DPA1	DPB1	Summe
Allele	2884	3590	2375	8849	7	1642	52	664	38	422	2825
Proteine	2041	2668	1677	6386	2	1211	32	435	19	351	2050
Null-Allele	133	119	71	323	0	37	1	16	0	10	64

Abgebildet ist die Anzahl der Allele, die Anzahl der Proteine sowie die Null-Allele für die HLA-Klasse-I- und Klasse-II-Loci des Menschen: Stand August 2014 ⁶.

1.1.2 Aufbau und Funktion der MHC-Klasse-I/-II-Moleküle

Allgemein wird die MHC-Genregion in drei Klassen unterteilt: MHC-Klasse-I-III: MHC-Moleküle der Klasse-I und Klasse-II sind elementarer Bestandteil der Antigenpräsentation, wobei Klasse-III-MHC-Gene andere für das Immunsystem wichtige Proteine wie beispielsweise Komplementfaktoren kodieren ⁷. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich vor allem mit der Analyse von MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Molekülen, die sich aufgrund ihres strukturellen Aufbaus, ihrer Peptidbindung, der Herkunft der präsentierten Peptide sowie in ihrer Expression unterscheiden.

Alle MHC-Klasse-I-Moleküle sind aus zwei Teilen aufgebaut, einer in drei Domänen gegliederten, variablen α -Kette (43 kDa) und einer immer konstanten, eine Domäne enthaltenden invarianten leichten β -Kette (β 2-Mikroglobulin; β 2m; 12 kDa) ⁸. Die α -Kette verfügt über eine Transmembrandomäne, sowie drei extrazelluläre Immunoglobulin-domänen (α 1- α 3). Die extrazellulären Domänen α 1 und α 2 bilden zusammen die peptidbindende Furche, die durch α -Helices und β -Faltblätter geformt wird (s. Abbildung 1). Die peptidbindende Furche der MHC-Klasse-I-Moleküle ist an den Enden geschlossen ⁹.

Im Gegensatz dazu sind MHC-Klasse-II-Moleküle aus einer zwei Domänen umfassenden α -Kette (24 kDa) und einer ebenfalls zwei Domänen umfassenden β -Kette (29 kDa) aufgebaut. Im Unterschied zu MHC-Klasse-I-Molekülen besitzen MHC-Klasse-II-Moleküle zwei Transmembrandomänen. Die beiden extrazellulären Domänen α 1 und β 1 bilden zusammen die peptidbindende Furche, die bei MHC-Klasse-II-Molekülen an den Enden geöffnet ist (s. Abbildung 1).

MHC-Klasse-I-Moleküle werden vor allem auf kernhaltigen Körperzellen exprimiert und von den Rezeptoren der CD8⁺ T-Zellen (engl. *cytotoxic T lymphocytes*; CTLs) erkannt, die infizierte oder entartete Zellen lysieren können. Im Gegensatz dazu werden MHC-Klasse-II-Moleküle hauptsächlich auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen wie beispielsweise Makrophagen, dendritischen Zellen (DCs), aber auch B-Zellen exprimiert und von Rezeptoren der CD4⁺ T-Zellen erkannt. Die Röntgenstruktur der menschlichen MHC-Klasse-I-Moleküle erinnert dabei an die Form eines Elchkopfes, bei der die Domänen α 1 und α 2 das Geweih bzw. die peptidbindende Furche und das β 2m das Maul des Elches darstellen (s. Abbildung 2).

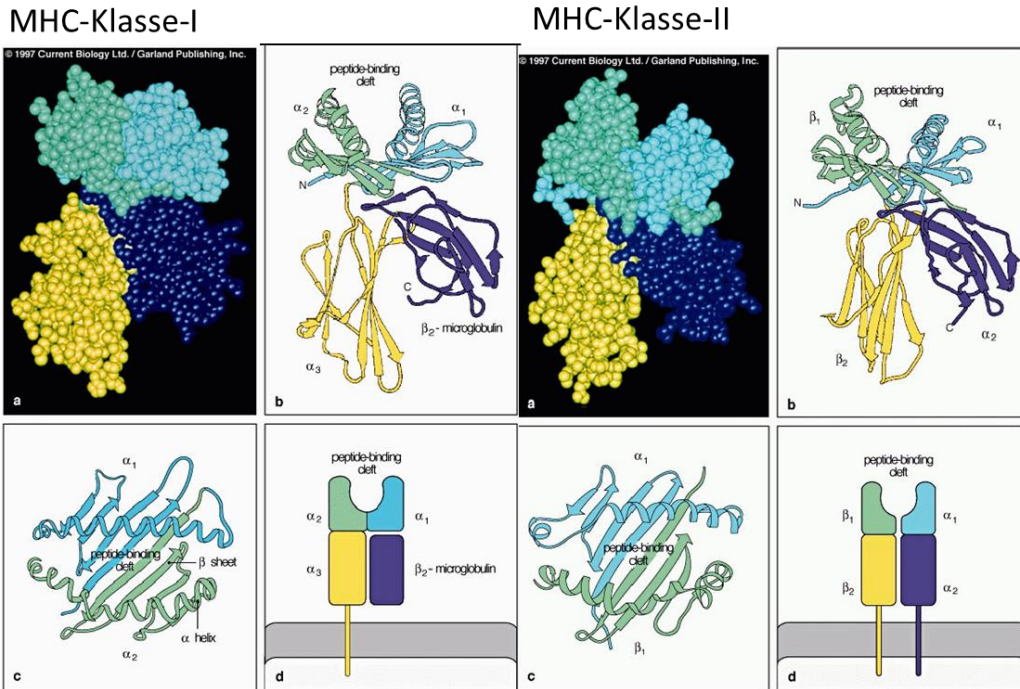


Abbildung 1: Struktur des humanen MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküls

Links: Struktur und Aufbau des MHC-Klasse-I-Moleküls. Zu erkennen sind die drei Domänen (α_1 - α_3) und das β_2 -Mikroglobulin. Dargestellt wird die Oberfläche des MHC-Klasse-I-Moleküls im Kalottenmodell (a) sowie die verschiedenen Sekundärstrukturen im Bändermodell (b). Die Peptidbindungsfurche wird durch die Domänen α_1 und α_2 gebildet (c). Eine schematische Darstellung der Domänen sowie der Membranverankerung ist in Abbildung (d) dargestellt.

Rechts: Struktur und Aufbau des MHC-Klasse-II-Moleküls. Dargestellt wird die Oberfläche des MHC-Klasse-II-Moleküls im Kalottenmodell (a) sowie die verschiedenen Sekundärstrukturen im Bändermodell (b). Die Peptidbindungsfurche wird durch die Domäne α_1 und β_1 gebildet (c). Eine schematische Darstellung der Domänen sowie der Membranverankerung ist in Abbildung (d) dargestellt. Abbildung entnommen aus ¹⁰.

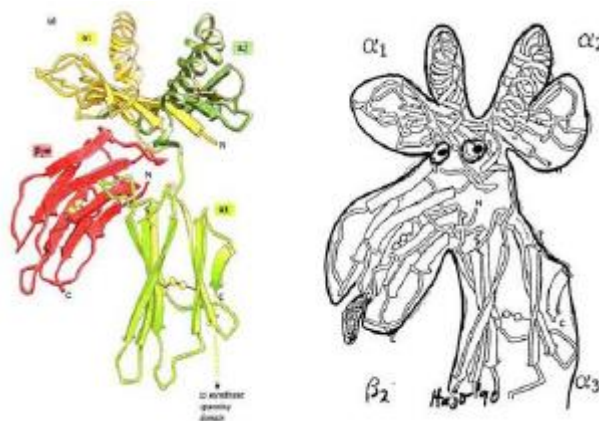


Abbildung 2: Röntgenstruktur und räumliche Interpretation des menschlichen MHC

Röntgenstruktur des HLA-A*02-Moleküls dargestellt im Bändermodell nach ⁸ (links) und graphische Interpretation durch Hansjörg Schild (1990) (rechts): Die Peptidbindungsfurche befindet sich auf dem Kopf zwischen den Hörnern des Elches.

Beide Klassen von HLA-Molekülen dienen der Präsentation von Peptiden für T-Zellen, unterscheiden sich aber stark in der Bindungsspezifität und somit der Art der präsentierten Peptide. HLA-Klasse-I-bindende Peptide sind in der Regel 8-10 Aminosäuren lang und werden über deren freien Amino- und Carboxy-Terminus, aber auch über allelspezifische Ankeraminosäuren in der Bindungsfurche gehalten. Bei typischen Peptiden von einer Länge mit 9 Aminosäuren (Nonamere) befinden sich diese Ankeraminosäuren Allotyp-abhängig oft an der zweiten und neunten Stelle, begonnen am N-Terminus ¹¹. Die Bindungsfurche bei HLA-Klasse-II-Molekülen bindet hingegen Peptide mit einer Länge von ca. 13 bis über 20 Aminosäuren. Die Bindung des Peptides erfolgt dabei nicht über den Carboxy- bzw. Aminoterminus, sondern durch die Interaktion des Aminosäurerückgrates (engl. *backbone*) des Peptids mit den Seitenketten der Bindungstasche, die das Peptid in der Furche stabilisiert. Ähnlich den HLA-Klasse-I- besitzen HLA-Klasse-II-Moleküle ebenfalls Präferenzen für Ankeraminosäuren, die sich zumindest in folgenden relativen Positionen zueinander wiederfinden: 1, 4, 6, und 9. Im Gegensatz zu Proteinen der HLA-Klasse-I sind die Ankeraminosäurepräferenzen der HLA-Klasse-II-Moleküle weniger ausgeprägt. So lässt sich mittels motivbasierter Vorhersageprogramme recht zuverlässig die HLA-Klasse-I-Restriktion eines Peptides anhand der gegebenen Ankeraminosäuren vorhersagen, nicht aber die Restriktion der HLA-Klasse-II-gebundenen Peptide ¹².

HLA-Moleküle unterscheiden sich nicht nur in ihrer Struktur oder Expression, sondern auch im Ursprung der präsentierten Peptide. So binden HLA-Moleküle der Klasse-I vorwiegend Peptide aus intrazellulären Proteinen, wobei MHC-Klasse-II-präsentierte Peptide vor allem aus dem extrazellulären Raum stammen. Der unterschiedliche Ursprung der präsentierten Peptide ist das Ergebnis unterschiedlicher Prozessierungswege für MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Proteine sowie deren gebundenen Peptide ¹³. Allerdings ist diese Einteilung nicht strikt. So können exogene Antigene mittels der sogenannten Kreuzpräsentation (engl. *cross-presentation*) auch auf Molekülen der MHC-Klasse-I gebunden werden ¹⁴. Zusätzlich können zytosolische Antigene auf MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden, falls diese zuvor mittels Autophagie oder einem anderen Stoffwechselweg in die MHC-Klasse-II-Prozessierung geschleust wurden ¹⁵.

1.1.3 MHC-Klasse-I-Antigenprozessierung

Als Antigenprozessierung werden alle Vorgänge bezeichnet, die nötig sind, um einen MHC:Peptid-Komplex auf der Oberfläche einer Zelle zu präsentieren. Dieser Prozess besteht aus vielen einzelnen Schritten und beinhaltet dementsprechend viele verschie-

dene Spezifitäten, woraufhin nur wenige Teile eines Antigens tatsächlich auf MHC-Molekülen präsentiert werden ¹⁶.

Alle Komponenten der HLA-Klasse-I-Moleküle werden an den Ribosomen des rauen endoplasmatischen Reticulums (ER) synthetisiert und kotranslational in das Lumen des ER transportiert, wo der Zusammenbau der MHC:Peptid-Komplexe stattfindet ¹⁷. Dabei binden neu synthetisierte α -Ketten zuerst an das im ER vorkommende Chaperon Calnexin, welches die α -Ketten teilweise faltet und sie mit β 2-Mikroglobulin zu einem Heterodimer verknüpft. Nach der Dissoziation von Calnexin bindet das Heterodimer einen Proteinkomplex mit Calreticulin, Erp57 und Tapasin, auch bekannt als Peptidbeladungskomplex (engl. *peptide-loading complex*; PLC). Über die Verbindung von Tapasin zu den Peptidtransportern TAP1 und TAP2 (engl. *transporters associated with antigen processing*) wird der instabile MHC-Komplex mit einem Peptid beladen und dadurch stabilisiert. Im Normalfall werden die MHC-Klasse-I-präsentierten Peptide im Zytosol durch das Proteasom, einem aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzten Protease-Komplex, gebildet. Als Substrat für das Proteasom dienen sowohl „ausgediente“ Proteine, die am Ende ihrer Lebensspanne mittels Ubiquitinierung dem Proteasom zugeführt werden, aber auch die so genannten DRiPs (engl. *defective ribosomal products*) ¹⁸. DRiPs sind nicht funktionale Proteine, die kurz nach ihrer Entstehung am Ribosom wieder dem Proteinabbau über das Proteasom zugeführt werden ¹⁹. Sie können durch eine fehlerhafte Transkription oder Translation, durch die Nutzung eines alternativen offenen Leserasters (engl. *open reading frame*; ORF) wie auch durch den fehlerhaften Zusammenbau größerer Proteinkomplexe entstehen ²⁰⁻²⁴. Je nach Zellart umfassen DRiPs 30% bis 70% aller in einer Zelle hergestellten Proteine ²⁵. Obwohl sich nur ungefähr 30% der neu synthetisierten Proteine einer Zelle aus kurzlebigen Proteinen oder DRiPs zusammensetzen, stammen die meisten auf MHC-Klasse-I-präsentierten Peptide aus DRiPs ²⁶.

Die meisten vom Ribosom neu synthetisierten Proteine weisen eine relativ lange Halbwertszeit (ca. 50 Stunden) auf, bevor sie mittels Ubiquitinierung dem Proteasom für den Abbau zugeführt werden. Neben der Kreuzpräsentation stellen DRiPs zudem die einzige Möglichkeit dar, Peptide aus membranständigen oder sekretierten Proteinen, die aus der Zelle freigesetzt oder im endosomal/lysosomalen Kompartiment abgebaut werden, auf MHC-Klasse-I-Molekülen zu präsentieren.

Das 26S-Proteasom ist ein Multiproteinkomplex, aufgebaut aus einer 20S- und zwei 19S-Untereinheiten. Die 20S-Untereinheit bildet den katalytischen Kern, der aus vier Ringen aufgebaut ist und einen Zylinder formt. Die zwei äußeren Ringe bestehen ihrer-

seits aus sieben α -Untereinheiten ($\alpha 1$ - $\alpha 7$). Die von den zwei α -Ringern eingeschlossenen β -Ringe enthalten ebenfalls sieben Untereinheiten ($\beta 1$ - $\beta 7$), von denen drei Untereinheiten ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$) eine Threonin-Proteaseaktivität aufweisen. Die $\beta 1$ - oder δ -Untereinheit hat eine Caspase-ähnliche Proteaseaktivität und schneidet nach sauren Aminosäuren; $\beta 2$ oder Z zeigt eine Trypsin-ähnliche Proteaseaktivität die basische Aminosäuren bevorzugt; die Untereinheit $\beta 5$ oder auch MB1 genannt, schneidet, ähnlich dem Enzym Chymotrypsin, bevorzugt nach hydrophoben Aminosäuren²⁷. Die konstitutiv exprimierten β -Untereinheiten ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$) lassen sich, beispielsweise als Reaktion auf Interferone, durch die drei Untereinheiten LMP2, LMP7 und MECL austauschen, was zu der Entstehung des Immunproteasoms führt²⁸. Verglichen mit dem 20S-Proteasom, zeigt das Immunproteasom eine schwächere Proteaseaktivität für saure Aminosäuren, schneidet aber bevorzugt hinter hydrophoben oder basischen Resten²⁹. Als eine weitere Reaktion auf eine Interferonausschüttung wird der Aktivator PA28 $\alpha\beta$ gebildet, der durch die Zusammenlagerung mit dem Immunproteasom die Peptidproduktion nochmals erhöht³⁰. Zudem verändert sich die Längenverteilung der generierten Peptide, sodass in der Regel Peptide mit 8 bis 10 Aminosäuren entstehen³¹. Im Falle einer Virusinfektion werden durch diesen Prozess vom Immunproteasom vermehrt Peptide aus viralen Proteinen zur Präsentation auf MHC-Klasse-I generiert, da die für die virale Replikation benötigten Proteine im Zytosol synthetisiert werden. Die auf diese Weise generierten Peptide besitzen bereits den für die Beladung auf MHC-Klasse-I notwendigen C-Terminus. Der N-Terminus ist oft noch mit zusätzlichen Resten versehen, die durch im Zytosol vorkommende Proteasen von den Vorläuferpeptiden abgespalten werden, falls diese nicht durch die Bindung an das Chaperon TRiC (engl. *TCP-1 Ring Complex*) davor geschützt werden^{29,32-35}. Der Transporterkomplex TAP1/TAP2 transportiert die im Zytosol generierten Peptide dabei aktiv unter Verbrauch von ATP in das Lumen des ER. TAP1 und TAP2 enthalten jeweils eine Transmembran- und eine zytosolische Nukleotidbindungsdomäne, die durch Zusammenlagerung eine Transmembranpore bilden^{36,37}. Der Peptidtransport durch den TAP-Komplex findet dabei nach dem „ATP switch model“ statt^{38,39}. TAP transportiert vorwiegend Peptide einer Länge von 8 bis 12 Aminosäuren mit hydrophoben oder basischen C-Termini für die Beladung auf MHC-Klasse-I-Molekülen⁴⁰⁻⁴³. Teilweise werden auch längere Peptide von TAP in das ER transportiert, allerdings mit geringerer Effizienz⁴⁴. Zu lange Peptide, die nicht in die Bindungsfurche des MHC-Klasse-I-Moleküls passen, können durch spezielle im ER vorkommende Aminopeptidasen, wie beispielsweise ERAAP (engl. *ER aminopeptidase associated with antigen processing*), noch weiter gekürzt (engl. *trimming*) werden⁴⁵. ERAAP kürzt bevorzugt Peptide mit einer Länge von 9 - 16 Aminosäuren wobei Peptide mit 8 - 9 Aminosäuren verschont wer-

den, da diese bereits die typische Länge für MHC-Klasse-I-assoziierte Peptide aufweisen⁴⁶. ERAAP bevorzugt weiterhin Peptide mit einem hydrophoben C-Terminus und wird, wie auch die TAP-Untereinheiten, über Interferone induziert⁴⁷. Alternativ können zu lange Peptide auch wieder über TAP ins Zytosol der Zelle geschleust werden, wo sie anschließend von zytosolischen Aminopeptidasen gekürzt und TAP-abhängig zurück in das ER transportiert werden⁴⁸. Die im ER vorliegenden Peptide der richtigen Länge werden mit Hilfe der vier Chaperone (Calnexin, ERp57, Calreticulin, Tapasin) auf die teilweise gefalteten MHC-Klasse-I-Moleküle geladen⁴⁹⁻⁵¹. Dieser Proteinkomplex in Kombination mit TAP bildet den PLC, der sowohl die Aktivität des Peptidtransports, als auch die Beladung der MHC-Klasse-I-Moleküle übernimmt⁵².

Neben ihrer Funktion in der Antigenprozessierung übernehmen Proteasomen noch weitere wichtige Aufgaben. Sie sind an der Entstehung biologisch aktiver Proteine, wie z.B. Zytokine, beteiligt, die ihrerseits wiederum bei der Entzündungsreaktion, der T-Zelldifferenzierung, sowie bei der Reifung der Thymozyten im Thymus beteiligt sind.

Die MHC-Klasse-I-Antigenprozessierung ist ein komplexer zellulärer Prozess der in 4 Hauptschritte unterteilt werden kann und immer mit dem Abbau ubiquitiniertes Proteine im Proteasom beginnt. Eine Übersicht über die zellulären Abläufe der MHC-Klasse-I-Antigenprozessierung ist in Abbildung 3 abgebildet.

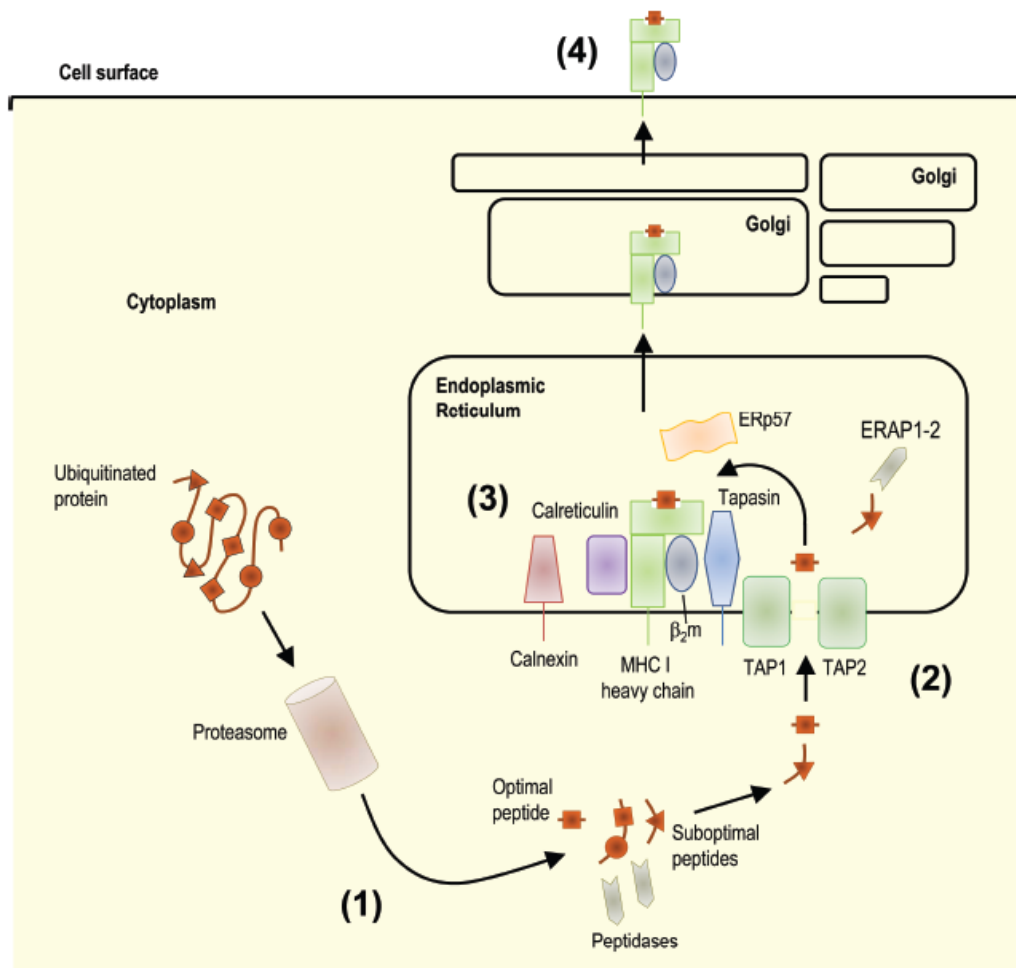


Abbildung 3: Schematischer Überblick über den MHC-Klasse-I-Antigenprozessierungsweg

1. Peptidgenerierung und „trimming“; 2. Peptid-Transport über TAP1/2; 3. Zusammenbau des Peptidbeladungskomplex PLC; und 4. Antigenpräsentation an der Zelloberfläche. Abbildung entnommen aus ⁵³.

1.1.4 MHC-Klasse-II-Antigenprozessierung

Im Gegensatz zu MHC-Klasse-I-Molekülen, die ubiquitär auf allen kernhaltigen Zellen eines Organismus exprimiert sind, werden MHC-Klasse-II-Moleküle nur von professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC), wie beispielsweise DCs, Makrophagen oder B-Zellen exprimiert. Ein weiterer Unterschied besteht im Ursprung der präsentierten Peptide. Die auf MHC-Klasse-II präsentierten Peptide stammen aus dem endosomalen Verdau von phagozytierten Proteinen oder ganzen Organismen und sind somit exogenen Ursprungs. Die aufgenommenen Proteine werden im Phagolysosom von Proteasen zu Peptiden verdaut, bevor sie auf MHC-Klasse-II geladen und für die Präsentation an die Zelloberfläche transportiert werden ^{54,55}. Im Gegensatz zur MHC-Klasse-I-Antigenprozessierung werden bei der MHC-Klasse-II-Antigenprozessierung

die exogenen Antigene im gleichen Kompartiment prozessiert, in der auch die Peptidbeladung der MHC-Klasse-II-Moleküle stattfindet.

Die α - und β -Ketten des MHC-Klasse-II-Moleküls werden nach ihrer Synthese im ER zusammengesetzt, wo sie anschließend mit der invarianten Kette (engl. *invariant chain*; Ii) einen Komplex bilden²⁴. Erst der homotrimere Komplex aus drei invarianten Ketten ermöglicht die Bindung der MHC-Klasse-II-Moleküle, die bis dahin noch an Calnexin gebunden sind. Anschließend werden die Ii-MHC-Klasse-II-heterotrimeren Komplexe über den Golgi-Apparat direkt oder indirekt über die Plasmamembran zu einem endosomal/lysosomalen Kompartiment, dem MHC-Klasse-II-Beladungskompartiment (engl. *MHC class II loading compartment*, MIIC), geleitet.

Die invariante Kette (Ii) dirigiert neu entstandene MHC-Klasse-II-Heterotrimere in das endosomal/lysosomale Kompartiment. Zusätzlich blockieren Teile der invarianten Kette die Peptidbindungsfurche, was eine Bindung anderer Peptide an den MHC-Klasse-II im ER verhindert²⁴. Die invariante Kette wird nach ihrer Ankunft im endosomal/lysosomalen Kompartiment von verschiedenen Proteasen in mehreren Schritten geschnitten, sodass nur noch ein kurzes Peptidfragment die Peptidbindungsfurche besetzt. Dieses sogenannte CLIP-Fragment (engl. *class II invariant chain-associated peptide*; CLIP) wird anschließend mit Hilfe des Moleküls HLA-DM durch Peptide aus exogenen Proteinen ausgetauscht. HLA-DM kann dabei über die Interaktion mit einem zweiten Molekül, dem HLA-DO, welches besonders stark in B-Zellen exprimiert wird, zusätzlichen Einfluss auf das Peptidrepertoire nehmen⁵⁶. Durch die Assoziation von HLA-DM mit HLA-DO verringert sich die katalytische Aktivität von HLA-DM, was eine verminderte Peptidbeladung der MHC-Klasse-II-Moleküle zur Folge hat. Die im MIIC gebildeten MHC-Klasse-II:Peptid-Komplexe werden an die Zelloberfläche transportiert, wo sie von CD4⁺ T-Zellen mit entsprechender Rezeptorspezifität erkannt werden⁵⁷. Neben der Fähigkeit Peptide aus exogenen Antigenen zu binden und zu präsentieren, können MHC-Klasse-II-Moleküle auch Peptide aus zytosolischen Proteinen präsentieren^{58–60}. Von zentraler Bedeutung für diese Art der Kreuzrepräsentation ist die Autophagie, also der intrazelluläre Abbau von zellulären Komponenten durch die Interaktion der Lysosomen⁶¹. In Abbildung 4 ist eine graphische Darstellung der MHC-Klasse-II-Antigenprozessierung sowie eine Zusammenfassung der Vorgänge abgebildet.

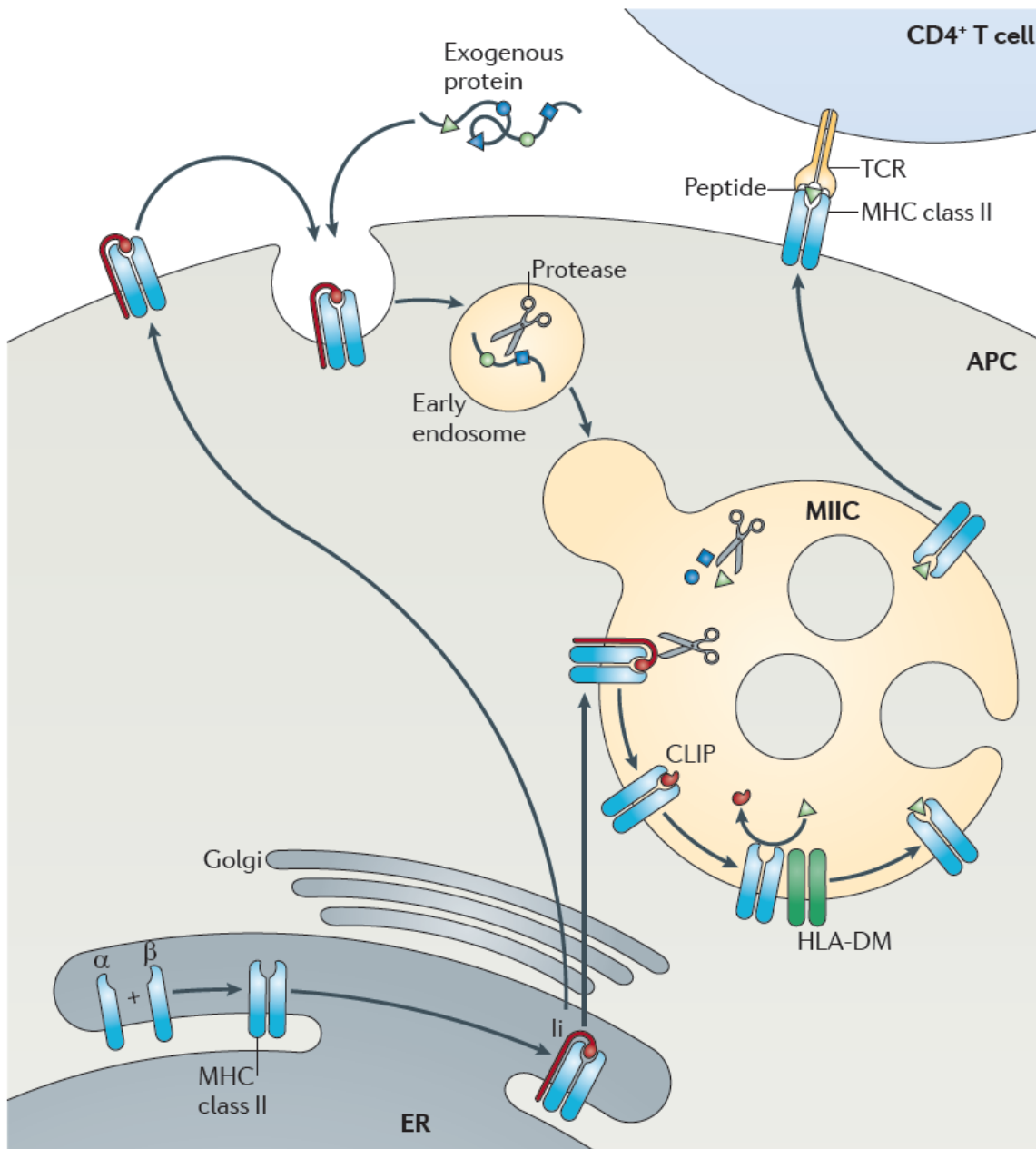


Abbildung 4: Schematischer Überblick über den MHC-Klasse-II-Antigenprozessierungsweg.

Die Komponenten des MHC-Klasse-II werden direkt in das ER synthetisiert, wo sie zusammen mit der invarianten Kette (Ii) einen trimeren Komplex bilden. Das Ii-MHC-Klasse-II-Trimer wird dabei über den Golgi-Apparat entweder direkt oder indirekt über die Plasmamembran der Zelle zum MHC-Klasse-II-Beladungskompartiment (MIIC) geleitet. Proteine, die mittels Endo- oder Phagozytose in den MHC-Klasse-II-Antigenprozessierungsweg gelangen, sammeln sich zunächst in kleinen Vesikeln, den frühen Endosomen (engl. *early endosomes*). Die Absenkung des pH-Wertes führt zu einer Aktivierung von Aspartat- und Cystein-Proteasen, die die aufgenommenen Proteine in Peptide abbauen. Endozytierte Proteine wie auch die invariante Kette (Ii) werden im MHC-Klasse-II-Beladungskompartiment (MIIC) durch Proteasen abgebaut, wobei das CLIP-Fragment in der Bindungsfurche des MHC-Moleküls zurückbleibt. Durch die Hilfe der Chaperone HLA-DM oder HLA-DO wird das CLIP-Fragment in der Bindungsfurche des MHC-Klasse-II-Moleküls durch ein entsprechendes Peptid ersetzt. Die MHC-Klasse-II-Komplexe mit gebundenem Peptid werden an die Zelloberfläche der antigenpräsentierenden Zelle (APC) transportiert, wo sie von CD4 T-Zellen mit entsprechendem Rezeptor erkannt werden. Abbildung entnommen aus ²⁴.

1.2 Die Prostata

1.2.1 Aufbau und Struktur der Prostata

Bei der Prostata oder auch Vorsteherdrüse handelt es sich um ein walnussgroßes Organ, das unterhalb der Harnblase lokalisiert ist und die dort beginnende Harnröhre (Urethra) ringförmig bis zum Beckenboden umschließt. Die Prostata ist eine exokrine Drüse, die zu den akzessorischen Geschlechtsdrüsen zählt, da sie ihr Sekret in die Harnröhre abgibt. Neben Bindegewebe und Muskelfasern befinden sich im Inneren der Prostata vor allem Drüsenzellen. Diese Drüsenzellen produzieren ein für das Überleben und den Transport von Spermien essentielles Sekret, das beim Menschen etwa 30% des Ejakulates ausmacht ⁶². Aus embryologischer und klinisch-pathologischer Sicht lässt sich die Prostata in drei verschiedene Zonen einteilen.

Die Periurethrale Mantelzone (TZ), die 5 - 10% der Prostatamasse ausmacht.

Die Innenzone (CZ), die etwa 20 - 25% der Drüsen enthält, und durch die der Spritzkanal (*Ductus ejaculatorius*) verläuft.

Die Außenzone, die mit 70% den Hauptteil der Organmasse der Prostata ausmacht.

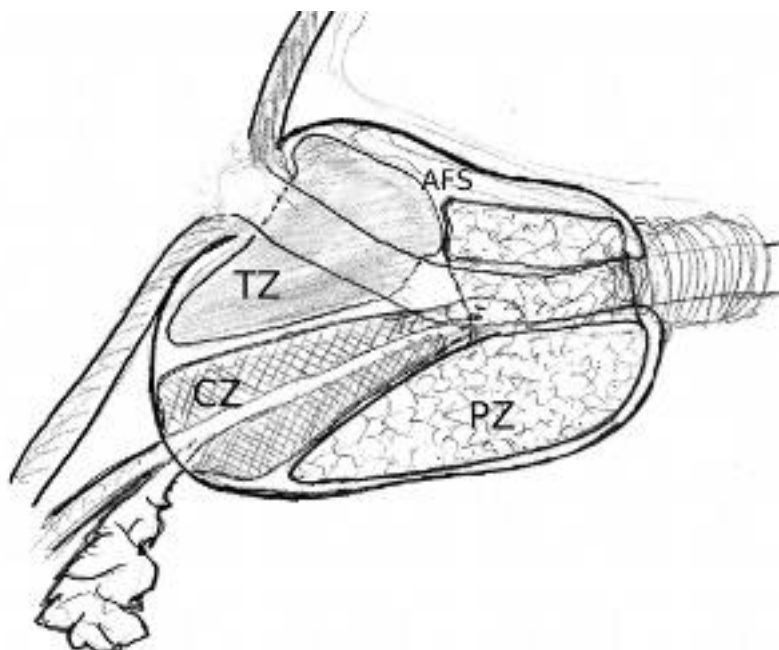


Abbildung 5: Darstellung der Prostatazonen in der Sagittalebene

Die Periurethrale Mantelzone (TZ) umgibt die Harnröhre. Die Innenzone (CZ) umgibt den *Ductus ejaculatorius*. Die Außenzone enthält die peripheren Drüsenabschnitte der Prostata (PZ). Ventral der periurethralen Mantelzone liegt das anteriore fibromuskuläre Stroma (AFS). Abbildung entnommen aus ⁶³.

1.2.2 Das Prostatakarzinom

Prostatakrebs (medizinisch: Prostatakarzinom, PCa) ist die am häufigsten diagnostizierte Krebserkrankung bei Männern in Europa, gefolgt von Lungen- und Darmkrebs⁶⁴. Beim Prostatakarzinom handelt es sich um eine bösartige Transformation des Drüsengewebes der Vorsteherdrüse (Prostata). Nur ungefähr 3% aller Prostatatumore sind Nicht-Adenokarzinome und meist urothelialer Herkunft. Bei Frauen existiert mit der Paraurethraldrüse ein Homolog zur Prostata des Mannes, das histologisch und klinisch sehr ähnliche Tumore entwickeln kann^{65,66}. Allerdings stellen diese Tumore nur einen Bruchteil (<0,0003%) der malignen Erkrankungen des Reproduktionssystems bei Frauen dar⁶⁷.

Obwohl das Prostatakarzinom wie bereits erwähnt mit 22,8% die am häufigsten diagnostizierte Krebserkrankung darstellt, ist sie doch nur für ungefähr 10% aller durch Krebs verursachten Todesfälle bei Männern verantwortlich⁶⁴. Das Prostatakarzinom ist somit die dritthäufigste tödlich verlaufende Krebserkrankung des Mannes⁶⁸ (s. Abbildung 6). Die Diskrepanz zwischen der Inzidenz und der Mortalität bei Prostatakrebs resultiert aus der Pathogenese des Prostatakarzinoms. So wachsen die meisten Prostatatumore sehr langsam, wobei es auch aggressive Tumorformen gibt⁶⁹. Die langsame Pathogenese von Prostatakrebs spiegelt sich unter anderem in der hohen relativen Fünf-Jahres-Überlebensrate von 87 - 94% (2007 - 2008) wider⁶⁸. Damit besitzt Prostatakrebs neben Hodenkrebs bei Männern in Deutschland die höchste 5-Jahres-Überlebensrate⁷⁰.

In Deutschland lag die Zahl der Neuerkrankungen im Jahr 2010 bei 65 830 Männern, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei 70 Jahren lag⁷⁰. Verglichen mit dem Jahr 1999 bedeutet dies einen Anstieg um rund 50% der jährlichen Neuerkrankungen, wobei die relative altersstandardisierte Erkrankungsrate um 25% angestiegen ist. Der jährliche Anstieg der Erkrankungsrate seit den frühen 1980er Jahren ist hauptsächlich auf die frühere und vor allem vermehrte Diagnose von Prostatakrebs durch den Prostata-spezifischen Antigentest zurückzuführen⁶⁸. Allerdings ist die altersstandardisierte Erkrankungsrate seit 2003 weitgehend konstant. Dieser Trend ist ebenfalls in anderen westlichen Industrienationen zu beobachten und dürfte auf die zuletzt stagnierende Nutzung des PSA-Tests bzw. am allgemeinen Zweifel der Spezifität dieser Form der Diagnosestellung liegen⁶⁸.

Prostatakrebs betrifft vor allem ältere Männer, da er nur selten vor dem 50. Lebensjahr auftritt. So liegt das Risiko eines 35-jährigen Mannes in den kommenden 10 Jahren an

Prostatakrebs zu erkranken bei unter 0,1%, wohingegen das Risiko eines 75-jährigen Mannes bei etwa 6% liegt ⁷⁰.

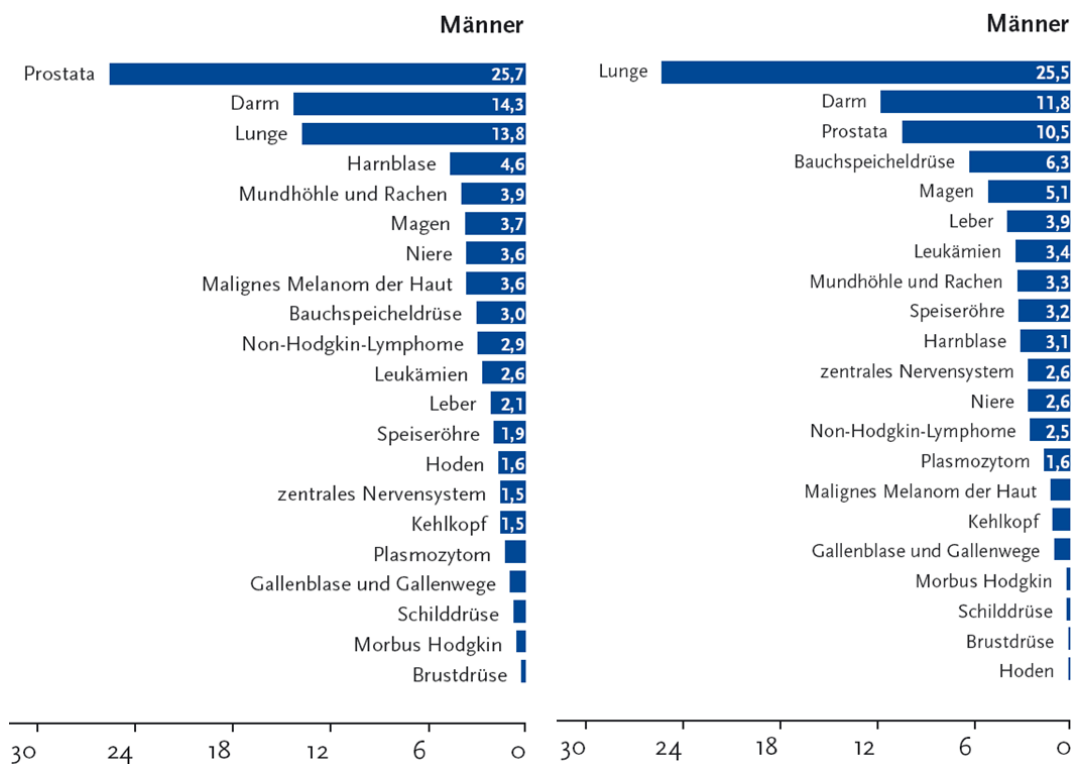


Abbildung 6: Inzidenz und Mortalität häufiger Krebserkrankungen bei Männern in Deutschland 2007/2008

Gezeigt wird der prozentuale Anteil der häufigsten Tumorentitäten an allen Krebsneuerkrankungen (links, Inzidenz) und der Anteil der häufigsten Tumorentitäten an allen Krebssterbefällen (rechts, Mortalität) in Deutschland 2007/2008. Abbildung entnommen aus ⁶⁸.

Die Ursachen für die Entstehung von Prostatakrebs sind bislang noch nicht vollständig aufgeklärt, obwohl weitgehend bekannt ist, dass diverse Faktoren die Entstehung von Prostatakrebs begünstigen. Wie bereits erwähnt, steigt das Risiko an Prostatakrebs zu erkranken mit zunehmendem Alter. Umwelteinflüsse wie Rauchen, hoher Alkoholkonsum und eine übermäßige Ernährung durch tierische Fette in Kombination mit wenigen Ballaststoffen erhöht das Erkrankungsrisiko ebenfalls deutlich. Als weiterer Risikofaktor wird eine genetische Prädisposition diskutiert, da die Erkrankung unter nahen Angehörigen verstärkt auftritt. Desweiteren ist bekannt, dass Prostatakrebs verstärkt bei Männern schwarzafrikanischen Ursprungs auftritt, verglichen mit kaukasischen oder asiatischen Populationen ⁷¹.

Eine wichtige Rolle spielen auch die männlichen Geschlechtshormone (Androgene), ohne die es nicht zur Entwicklung von Prostatakrebs kommt⁷⁰. Ähnlich wie bei vielen anderen Krebsarten gibt es beim Prostatakarzinom keine typischen Symptome, die eine Früherkennung ermöglichen, obwohl gezeigt wurde, dass eine frühere Diagnosestellung die Prognose deutlich verbessern könnte. Das liegt vor allem daran, dass das Prostatakarzinom im Frühstadium oftmals gut operabel ist^{66,72}. Aus diesem Grund sieht der Leistungskatalog der gesetzlichen Krankenversicherung in Deutschland vor, dass Männer ab einem Alter von 45 Jahren einmal jährlich über mögliche Beschwerden und gesundheitliche Veränderungen befragt, sowie eine Tastuntersuchung der Prostata (engl. *digital rectal examination*; DRE; lat. *Palpatio per anum*, PPA) und der Lymphknoten vorgenommen wird. Der PSA-Test ist nicht Bestandteil dieser Früherkennung, da der Nutzen eines PSA-Screenings im Blut für die zweifelsfreie Diagnose von Prostatakrebs bis jetzt nicht belegt werden konnte. Symptome treten beim Prostatakarzinom erst dann auf, wenn der Tumor bereits in die umliegenden Organe und Gewebe eingewachsen ist oder sogenannte Tochtergeschwüre (Metastasen) in den Knochen oder Lymphknoten gebildet hat. Zu den möglichen Symptomen von Prostatakrebs gehören Schwierigkeiten beim Wasserlassen und Blasenentleerungsstörungen, örtliche Schmerzen sowie Blutbeimengungen in Sperma oder Urin. Das Auftreten dieser Symptome ist nicht nur typisch für Prostatakrebs, bei dem sie allerdings erst im fortgeschrittenen Stadium auftreten, sondern auch für die gutartige Vergrößerung der Prostata (engl. *benign prostatic hyperplasia*; BPH), was eine zweifelsfreie Diagnose ebenfalls erschwert. Ein positiver Befund der Tastuntersuchung der Prostata (tastbarer holzharter Knoten) wird anschließend durch Entnahme einer Prostatabiopsie abgesichert, bei dem die Tumorzellen feingeweblich (histologisch) nach Gleason beurteilt und in die häufigsten und zweithäufigsten Tumorgewebemuster eingeteilt werden⁷³. Mittels einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (engl. *H&E staining*) wird der häufigste und zweithäufigste morphologische Entdifferenzierungsgrad der Gewebeprobe bestimmt und nach Abbildung 7 bewertet. Der *Gleason Score* liefert dabei wichtige Informationen sowohl für die Prognose des Tumorwachstums als auch für die des krankheitsfreien Überlebens nach radikaler Prostatektomie⁷⁴. Eine weitere Möglichkeit der Stadieneinteilung von malignen Tumoren stellt die TNM-Klassifikation (engl. *TNM staging system*; *T = tumor*; *N = nodes*; *M = metastasis*) dar, die in den Jahren 1943 - 1952 von dem Franzosen Pierre Denoix entwickelt wurde⁷⁵. Dabei erlaubt eine Einstufung einer Tumorerkrankung in die einzelnen Kategorien des TNM-Systems eine starke prognostische Aussage über den Krankheitsverlauf und bestimmt häufig die weitere Form der Therapie beim Prostatakarzinom.

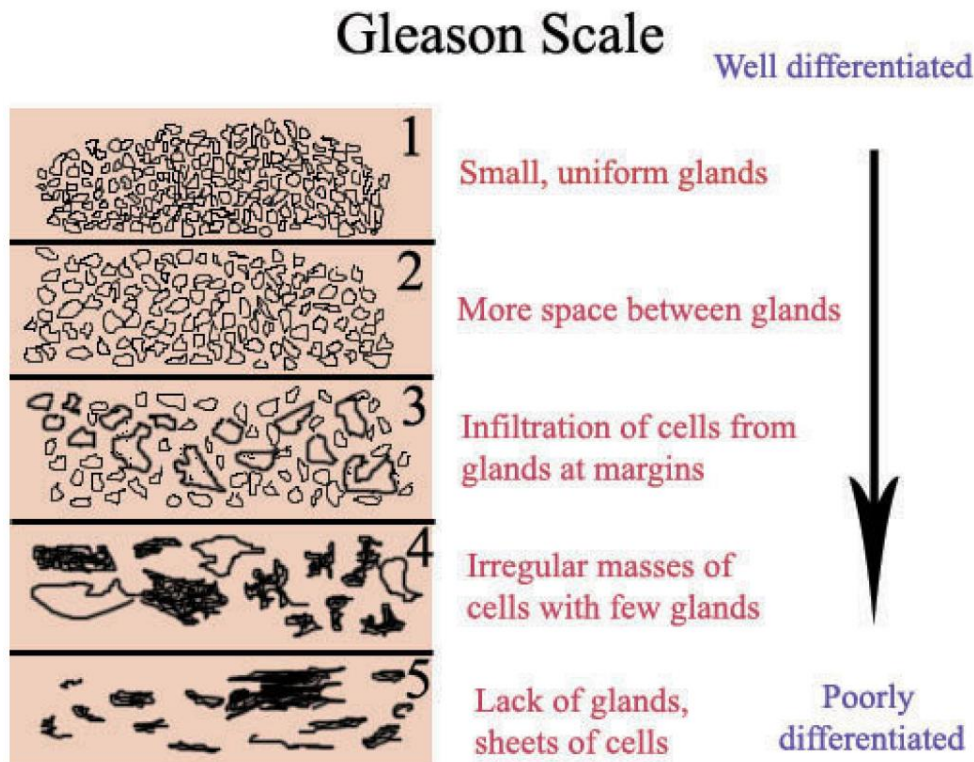


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Gleason-Score-Systems

Der *Gleason Score* setzt sich aus der Summe der beiden häufigsten morphologischen Wachstumsmuster zusammen. Der resultierende *Score* liegt zwischen 2 und 10 und gibt Aufschluss darüber, wie wahrscheinlich sich ein Tumor weiter ausbreitet. Zusätzlich korreliert der *Gleason Score* stark mit der Aggressivität der Tumore, da die Tumore im Laufe der Zeit immer stärker entdifferenzieren (Pfeil rechts). Abbildung entnommen aus ⁷⁶

Die konventionelle Therapie von Prostatakrebs beinhaltet die operative Entfernung der Prostata (medizinisch: Prostatektomie), die Strahlentherapie (engl. *radiation therapy*, RT), die chemische Androgensuppression (engl. *androgen deprivation therapy*, ADT) und vor allem bei metastasierenden Tumoren die Chemotherapie. Zusätzlich gibt es die Möglichkeit des sogenannten „kontrollierten Beobachtens“ (engl. *watchful waiting*). Diese Form der Therapie wird vor allem für Patienten hohen Alters und/oder beim Vorhandensein schwerer Nebenerkrankungen angewendet, da eine mögliche Einschränkung der Lebensqualität durch Nebenwirkungen der Therapie, nicht aber durch die Krankheit, befürchtet wird.

Bei Patienten mit guter Konstitution und lokal begrenztem Tumorwachstum (T1/T2 nach TMN-Klassifikation) bietet die operative Entfernung der Prostata meist die beste Vorgehensweise, die in günstigen Fällen eine vollständige Heilung herbeiführen kann. In einigen Fällen kommt es jedoch vor, dass postoperativ nach vollständiger Entfernung der Prostata ein langsamer Anstieg des PSA-Levels im Blut detektiert wird. Da

PSA ausschließlich von Prostatazellen produziert wird, deutet ein erneuter PSA-Anstieg im Blut auf eine Rückkehr der Krankheit (medizinisch: Rezidiv) hin.

Im weiteren Therapieverlauf kann durch eine Blockade der Androgene zumindest temporär die Tumorprogression verlangsamt werden, da die Tumorzellen häufig noch über Testosteronrezeptoren Wachstumssignale erhalten^{72,77}. Jedoch entwickeln sich Prostatakarzinome unter kontinuierlicher Androgenblockade nach einigen Jahren zu hormonrefraktärem Prostatakrebs. Um dieser Entwicklung entgegenzuwirken, wird bei einigen Patienten die intermittierende Hormonblockade angewendet, in der bewusst therapiefreie Intervalle eingeplant werden, um so die Testosteronabhängigkeit des Tumors zu gewährleisten⁷⁸. Die Chemotherapie des Prostatakarzinoms galt lange Zeit als wenig wirksam, so ließ sich durch die Therapie mit Chemotherapeutika etwa die Lebensqualität der Patienten steigern, nicht aber die Lebensdauer. Das anti-mitotische Chemotherapeutikum Docetaxel ist heutzutage allerdings das wirksamste Medikament für die Therapie des hormonrefraktären Prostatakrebs. Im Jahr 2004 wurde gezeigt, dass Patienten mit fortgeschrittenem Prostatakrebs unter wöchentlicher Einnahme von Docetaxel einen statistisch signifikanten Überlebensvorteil von im Median 2,5 Monaten zeigten⁷⁹.

Die Chemotherapie kommt allerdings nur dann zum Einsatz, wenn alle anderen therapeutischen Maßnahmen ausgeschöpft wurden. Mit einer Ansprechrate von 20% hat die Chemotherapie dennoch ihren Platz bei der Behandlung eines Tumorrezidivs, versagender Hormontherapie oder vorhandener Metastasierung in Lymphknoten oder Knochen.

Neben den beschriebenen Komplikationen bei der einwandfreien Diagnose des Prostatakarzinoms bedarf es insbesondere neuer Strategien und Therapieansätze für Patienten mit einem Rezidiv, fortgeschrittener oder metastasierender Krankheit. Als Hoffnungsträger für die Therapie des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms gilt die Krebsimmuntherapie, die im Gegensatz zu der Chemotherapie auf die Stärkung der Immunabwehr bei der Bekämpfung von Krebszellen setzt.

1.3 Die Immuntherapie

1.3.1 Die allgemeine Immuntherapie

Die Immuntherapie ist ein medizinischer Begriff und umfasst im Allgemeinen alle Behandlungsformen, bei denen Krankheiten durch die Induktion, das Verstärken oder Unterdrücken einer Immunantwort bekämpft werden⁸⁰. Dank des besseren Verständnisses der elementaren Immunologie durch die ständig fortschreitende Forschung auf diesem Gebiet in den letzten Jahren und Jahrzehnten ist es heutzutage möglich, die grundlegenden Mechanismen des Immunsystems besser zu verstehen und dementsprechend zu manipulieren. Generell wird zwischen aktivierenden und supprimierenden Immuntherapieformen unterschieden. Die aktivierende Immuntherapie zielt auf die Stimulation des Immunsystems ab, um so gezielt eine gewünschte Immunantwort zu induzieren. Die supprimierende Immuntherapie hingegen hat als Ziel, eine unerwünschte Immunantwort zu reduzieren oder zu unterdrücken. Gerade im Kontext von Autoimmunerkrankungen sowie Organtransplantationen ist eine Modulation bzw. Unterdrückung des Immunsystems notwendig, um eine schädigende Wirkung auf den eigenen Körper zu unterbinden⁸¹.

1.3.2 Die Krebsimmuntherapie

Die Krebsimmuntherapie gehört zu der Klasse der aktivierenden Immuntherapien. Ziel der Krebsimmuntherapie ist dabei die Mobilisierung der körpereigenen Abwehrkräfte eines Patienten zur Bekämpfung seiner Krebszellen. Weiterhin kann bei der Immuntherapie noch zwischen einer aktiven und einer passiven Form unterschieden werden. Bei der aktiven Immuntherapie werden dem Patienten Substanzen verabreicht, die aktiv die Stimulation des Patienten eigenen Immunsystems gegen die Krankheit vermitteln. Im Unterschied dazu handelt es sich bei der passiven Immuntherapie um ein Verfahren, bei dem die verabreichten Substanzen selbst den gewünschten Schutz vor der Krankheit vermitteln. Beiden Therapieansätzen ist gemein, dass die verabreichten Substanzen entweder spezifisch oder unspezifisch wirken können. Bei der unspezifischen Immuntherapie wird das Immunsystem durch Gabe einer Arznei in seiner Gesamtheit stimuliert, wohingegen bei der spezifischen Immuntherapie nur bestimmte Zellen angeregt werden. Die in der Krebsimmuntherapie verwendeten Substanzen und deren Wirkung sind beispielhaft in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Einteilung der Krebsimmuntherapie mit Beispielen

Krebsimmuntherapie				
passive Immunisierung			aktive Immunisierung	
	unspezifisch	spezifisch	unspezifisch	spezifisch
Moleküle	Zytokine	Antikörper	Keyhole Limpet Hemocyanin, Ipilimumab, Nivolumab	Vakzine auf der Basis von TAA
Zellen	lymphokin-aktivierte NK-Zellen	adoptiver Transfer von T-Zellen	APCs, DCs	Vakzine aus abgetöteten Tumorzellen

Tabelle modifiziert nach ⁸².

1.3.3 Immuntherapie gegen Prostatakrebs

Mit einigen wenigen Ausnahmen entwickeln sich die meisten menschlichen Tumore in immunologisch intakten Individuen ⁸³. Wie bei den meisten Krebsarten, ist die genaue Ätiologie des Prostatakarzinoms bisher nicht genau geklärt, man weiß jedoch, dass sowohl genetische als auch Umweltfaktoren eine wichtige Rolle spielen ^{84,85}. Wie auch bei der Entwicklung von Magen- oder Darmkrebs spielen Entzündungsreaktionen (engl. *inflammation*) bei der Entstehung von Prostatakrebs eine wichtige Rolle ^{86,87}. Obwohl die Beziehung zwischen einer fortwährenden Entzündungsreaktion und der Entstehung von Prostatakrebs noch nicht vollständig aufgeklärt ist, gibt es doch substantielle epidemiologische Anhaltspunkte für die Assoziation von Entzündungsreaktionen und der Entstehung von Prostatakrebs. So tritt Prostatakrebs vermehrt in demographischen Gruppen auf, in denen die bekannte Basislinie für Entzündungsreaktionen erhöht ist ⁸⁶. Nach der Diagnose von Prostatakrebs beinhaltet die Therapie in erster Linie die lokale Entfernung der Prostata durch Operation oder die lokale Bestrahlung. Für ungefähr 80% der behandelten Patienten ist die lokale Therapie erfolgreich, sodass eine Rückkehr oder die Metastasierung der Krankheit innerhalb der nächsten 15 Jahre ausbleibt ⁸⁸. Letztendlich entwickelt sich in vielen Männern trotz der Anwendung der Androgenablation eine metastasierende Krankheit (engl. *metastatic castration-resistant prostate cancer*; mCRPC). Patienten mit mCRPC zeigen eine mediane Überlebensrate von ~16 Monaten, was wiederum die Durchführung klinischer Studien mit dem Überleben als Endpunkt zulässt. Vom immunologischen Standpunkt gesehen ist die therapeutische Intervention zum Zeitpunkt des biochemischen Rezidivs am sinnvollsten, da sich viele der immunsuppressiven Mechanismen eines Tumors erst mit steigender Tumormasse zeigen ^{83,89}.

Aus diesem Grund wurden auch die meisten immuntherapeutischen Heilversuche zum Zeitpunkt der CRPC-Diagnose durchgeführt und klinisch evaluiert ^{79,83,90}.

Der Mangel an therapeutischen Optionen sowie die mit der Krankheit assoziierte Morbidität führte zu der Suche neuer Behandlungsmöglichkeiten wie beispielsweise die Immuntherapie ⁸².

Für das Prostatakarzinom wurde bereits gezeigt, dass im Rahmen einer Therapie die bereits bestehende und komplexe Entzündungsreaktion zum Verlauf der Krankheit beiträgt. So konnte gezeigt werden, dass CD4⁺ wie auch CD8⁺ T-Zellen in der Prostata-drüse vorhanden sind, wobei die CD4⁺ T-Zell-Untertypen sowohl T-17-Helferzellen (TH17), als auch regulatorische T-Zellen (Tregs) umfassen ⁹¹⁻⁹⁴. Die in der Prostata enthaltenen CD8⁺ T-Zellen sind allerdings nichtfunktional und zeigen keine erhöhte CD137- oder CD69-Expression nach einer Stimulation mit Ionomycin oder PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) ⁹⁵. Die meisten Ansätze der Krebsimmuntherapie zielen darauf ab, eine Population von Effektor-T-Zellen über ein Antigen zu aktivieren, welche die spezifische Lyse der Krebszellen auslösen sollen. Bei der antigenspezifischen Immuntherapie werden tumorassoziierte Antigene (TAA) direkt als Ziel gewählt. Dabei werden die TAA *ex vivo* entweder direkt auf antigenpräsentierende Zellen geladen oder über einen Vakzinvektor auf DNA- oder Proteinebene eingeführt ⁸². Immunologisch betrachtet besitzen Patienten mit CRPC einige Mechanismen, um der Erkennung des Tumors durch das Immunsystem zu umgehen ⁸⁹. Zu diesen Mechanismen gehört unter anderem die erhöhte Produktion des Zytokins TGFβ (engl. *transforming growth factor beta*), das eine unterdrückte Aktivität der CD8⁺ und der CD4⁺ T-Zellen, aber auch der NK-Zellen bewirkt ⁹⁶.

Ein mögliches Immunotherapeutikum von Prostatakrebs ist Sipuleucel-T (APC8015: Provenge; Dendreon Inc.). Es ist das erste therapeutische Vakzin zur Behandlung von Prostatakrebs, das in den USA von der amerikanischen Arzneimittelbehörde (engl. *Food and Drug Administration*; FDA) im April 2010 unter dem Handelsnamen Provenge für die Behandlung des asymptomatischen oder minimal symptomatischen hormonresistenten Prostatakarzinoms zugelassen wurde. Es handelt sich um eine autologe zelluläre Therapieform und ähnelt dabei Impfstoffen mit dendritischen Zellen, die bereits ausgiebig für verschiedene Tumorarten untersucht wurden ⁹⁷. Sipuleucel-T ist ein personalisiertes Produkt, das individuell für jeden Patienten mit Prostatakrebs hergestellt wird ⁹⁸ (s. Abbildung 8b). Dabei werden mittels einer Leukapherese den Prostatakrebspatienten autologe mononukleäre Zellen entnommen und mit dem Fusionsprotein PA2024 inkubiert. PA2014 ist ein Fusionsprotein bestehend aus der sauren Prostata-

spezifischen Phosphatase (engl. *prostatic acid phosphatase*, PAP), das mit dem Glykoprotein GM-CSF (engl. *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) verbunden ist. Die saure Prostata-spezifische Protease ist dabei das Antigen der Wahl, da es sowohl in der Prostata wie auch in Prostatakrebs, kaum aber in anderen Geweben exprimiert wird⁹⁹. Das so entstandene aktive Blutprodukt (APC8015) wird schließlich zurück in den Patienten infundiert, was zu einer spezifischen Immunantwort gegen das Prostata-spezifische PAP-Protein und somit gegen das gesamte Prostatagewebe führt. Neben dem adoptiven Transfer antigenpräsentierender Zellen bzw. autologer antigenspezifischer CTLs stellt die Vakzinierung mit Peptiden eine vielversprechende Strategie dar, um eine spezifische Immunantwort gegen die Tumormasse zu induzieren. Vor allem Prostatakrebs eignet sich für die Therapie mit Peptidvakzinen aus verschiedenen Gründen: Während bei Tumoren, die aus lebenswichtigen Organen entstehen, eine differentielle Analyse der MHC-präsentierten Peptide zwischen Normal- und Tumorgewebe eine fehlerhafte Induktion von Autoimmunität gegen gesundes Normalgewebe vermeiden soll, ist die Induktion von Autoimmunität bei der Therapie des Prostatakarzinoms zu vernachlässigen. Da die Prostata nicht für das Überleben des Menschen nötig ist, können grundsätzlich tumorspezifische, aber auch Prostata-spezifische Proteine, welche in Teilen auf MHC-Molekülen präsentiert werden, einen wirksamen Angriffspunkt für die Immunotherapie darstellen¹⁰⁰. Vor allem nach initialer Therapie wie der Prostatektomie ermöglichen Prostata-spezifische Proteine eine Erkennung der verbliebenen oder neu aufkeimenden Krebszellen durch das Immunsystem, da sämtliche Krebszellen ihren Ursprung in der Prostata haben. Eine Strategie, die bereits erfolgreich bei Nierenzellkarzinom angewandt wurde, ist die Peptidvakzinierung mit verschiedenen tumorspezifischen Antigenen, um sowohl dem *Immunoediting* des Tumors als auch der Selektion antigennegativer Tumorzellen vorzubeugen^{101,102}.

Das Prostatakarzinom ist in vielerlei Hinsicht ein typisches epitheliales Adenokarzinom, sodass Fortschritte der verschiedenen Ansätze der Immuntherapie bei Prostatakrebs Einsicht in die Behandlung weiterer epithelialer Krebsarten wie Kolon-, Bronchial- und Gebärmutterhalskarzinom liefern können⁸². Eine Übersicht über die gegenwärtigen antigenspezifischen Immuntherapien sowie Therapieansätze die nicht gegen ein einzelnes spezifisches Antigen gerichtet sind, ist in Abbildung 8 und 9 dargestellt.

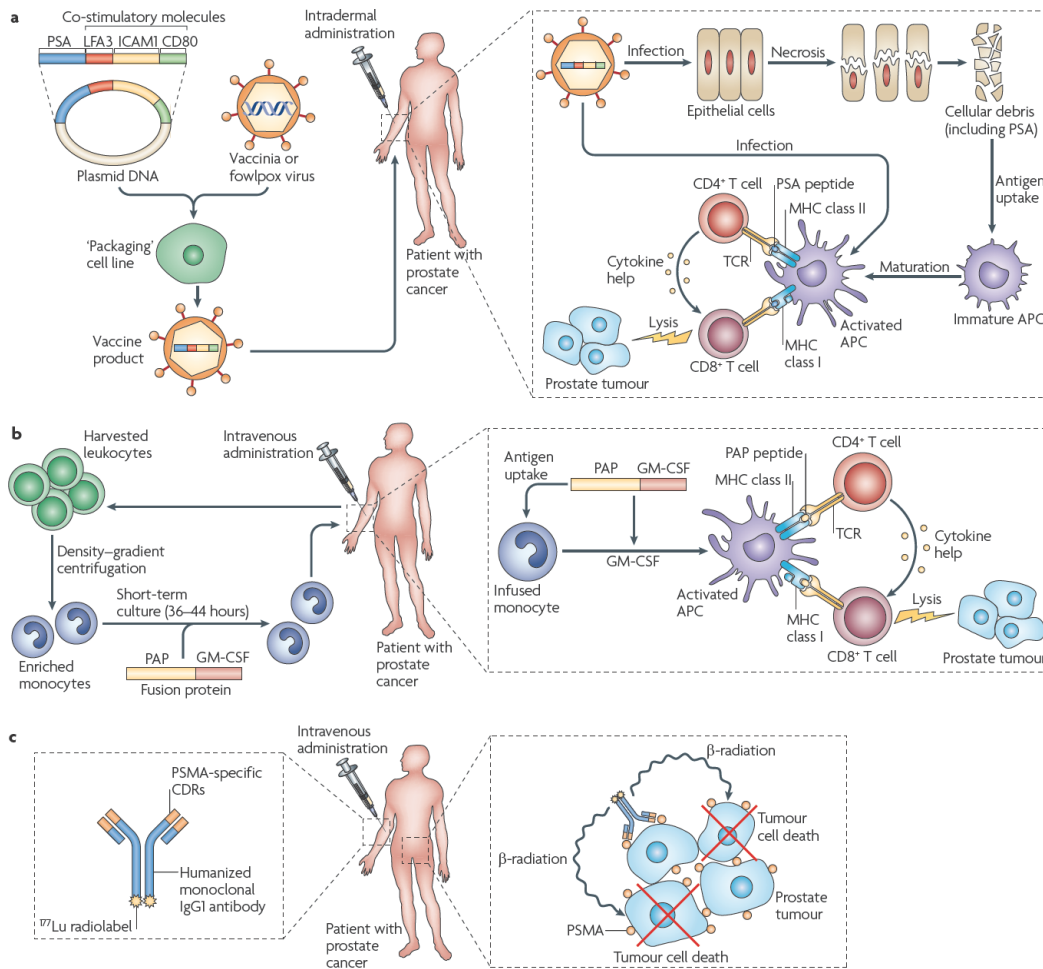


Abbildung 8: Beispiele für antigenspezifische Immuntherapien beim Prostatakarzinom

a) Das Vakzin ProstVac VF besteht aus einem ringförmigen DNA-Plasmid, das für das Zielantigen PSA, aber auch für 3 kostimulatorische Moleküle LFA3 (*lymphocyte function-associated antigen 3*), CD80 und ICAM1 (engl. *intercellular adhesion molecule 1*) kodiert. Das Plasmid wird erst in einem Pockenvirus verpackt und über die „Packaging cell line“ in den Patienten injiziert. Auf den ersten Kontakt des Patienten mit dem Plasmid im Vakzinivirus folgt eine sogenannte „Booster“-Vakzinierung mit Hühnerpocken, die ebenfalls das Plasmid tragen.

b) Die Sipuleucel-T Immuntherapie basiert auf autologen Zellen des Leukaphereseprodukts eines Prostatakrebspatienten. Nach Anreicherung der Monozyten werden diese für 36 - 44 Stunden mit dem Fusionsprotein PAP-GM-CSF inkubiert, bevor die Zellen intravenös zurück in den Patienten gelangen. Sobald die Zellen im Patienten sind, reifen sie zu kompetenten antigenpräsentierenden Zellen (APCs) heran und präsentieren die Peptide aus PAP dem Immunsystem des Patienten, woraufhin CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen antigenabhängig aktiviert werden.

c) Dargestellt ist die passive Immuntherapie mit dem humanisierten monoklonalen Antikörper J591 (Cornell Weill Medical College) der spezifisch das Prostata-spezifische Membranantigen (PSMA) bindet. Gegenwärtige klinische Studien beinhalten eine Radioisotopen-markierte Variante von J591. Der ¹⁷⁷Lu-markierte Antikörper (Lutetium) bindet an das Zielgewebe (Prostata) und vermittelt den lokalen Tumorzelltod mittels ionisierender Strahlung (β-Strahlung). Abbildung entnommen aus ⁸³.

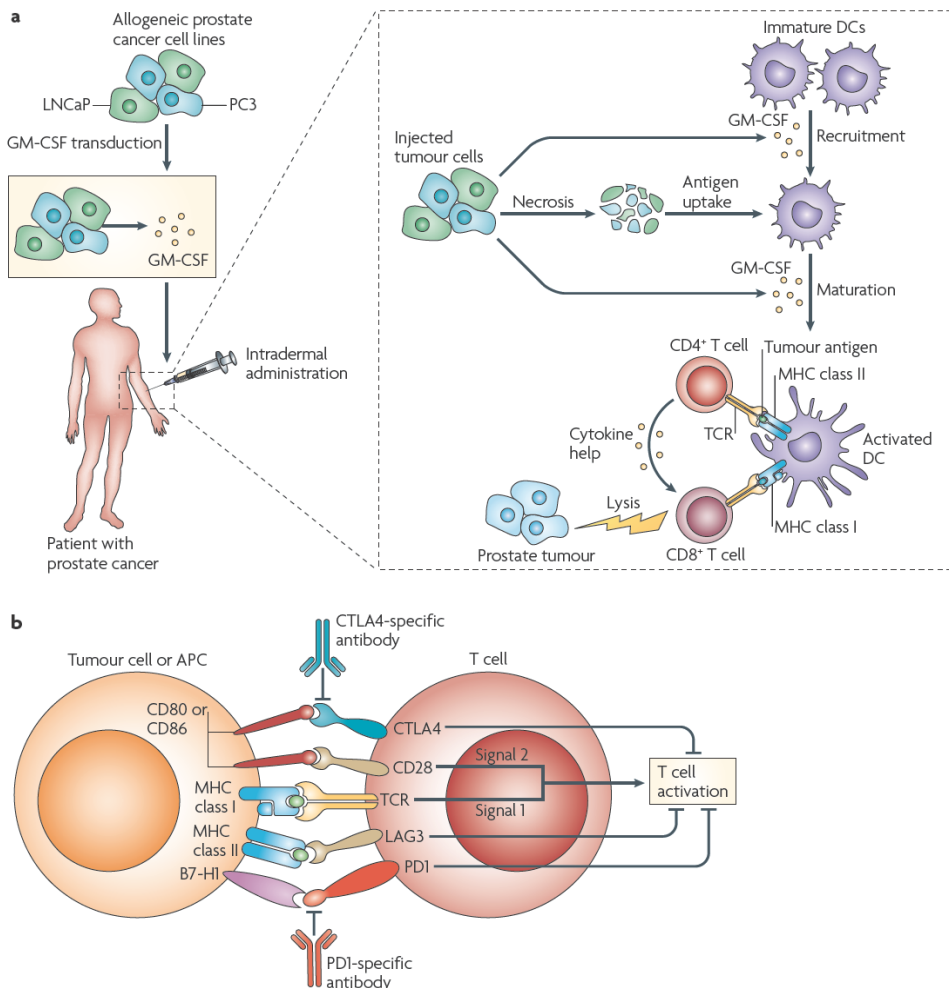


Abbildung 9: Immuntherapieformen beim Prostatakarzinom, die nicht gegen ein einzelnes Antigen gerichtet sind

a) In der zellbasierten Immunotherapie werden allogene Krebszelllinien mittels GM-CSF transduziert, bevor sie intradermal einem Patienten verabreicht werden. Nach ihrer Injektion werden die Zellen nekrotisch, woraufhin dendritische Zellen mittels freierwirdendem GM-CSF rekrutiert werden um die zellulären Trümmer der Tumorzellen aufzunehmen. Nach Reifung der dendritischen Zellen lösen diese die gewünschte Immunantwort gegen den Tumor aus, indem sie sowohl CD4⁺ wie auch CD8⁺ antigenabhängig aktivieren.

b) Der Ansatz der „Immune checkpoint blockade“ beinhaltet die Therapie von Krebspatienten mit Antikörpern gegen das zytotoxische T-Lymphozytenantigen 4 (engl. *cytotoxic T lymphocyte antigen 4*, CTLA4), wie beispielsweise Ipilimumab und Tremilimumab. Diese Antikörper blockieren die Immunsuppression, indem sie die Bindung von CD80 und CD86 an CTLA4 auf CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen unterbinden. Nivolumab ist ein weiterer Antikörper der durch die antagonistische Bindung an PD1 (engl. *programmed cell death 1*) auf T-Zellen die Bindung von B7-H1 (auch bekannt als PDL1) auf tumor- oder antigenpräsentierenden Zellen unterbindet und somit die durch PDL1 vermittelte Immunsuppression bei Antigenkontakt verhindert. Abbildung entnommen aus ⁸³.

1.4 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS), auch bekannt als *Encephalomyelitis disseminata* (ED), ist eine chronische Krankheit des zentralen Nervensystems (ZNS), die vor allem das Gehirn und das Rückenmark befällt. MS wird als eine CD4⁺ T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung angesehen, die vor allem durch Entzündungsreaktionen, Demethylierung der DNA, das Vernarben der Gliascheiden und axonale sowie neuronale Schädigungen gekennzeichnet ist ¹⁰³. Die Multiple Sklerose besitzt dabei verschiedene Verlaufsformen, die sich durch das Beschreiben der wiederkehrenden Symptome (Schübe), die länger als 24 Stunden anhalten, definieren lassen.

MS kann in die folgenden vier Verlaufsformen unterteilt werden ¹⁰⁴:

Schubförmig-remittierender Verlauf (engl. *relapsing-remitting MS*, RRMS)

RRMS ist die bekannteste Verlaufsform der Krankheit, die bei ungefähr 80% der anfänglich diagnostizierten MS-Patienten auftritt ¹⁰⁵. Die Krankheit zeichnet sich durch unvorhersehbare Schübe aus, die sich anfänglich noch komplett, im späteren Krankheitsverlauf jedoch kaum mehr zurück bilden ¹⁰⁶.

Sekundär-progredienter Verlauf (engl. *secondary-progressive MS*, SPMS)

Ungefähr 65% der initial mit RRMS diagnostizierten Patienten entwickeln früher oder später SPMS ¹⁰⁷. Sie ist charakterisiert durch eine schleichende Verschlechterung der Symptome ohne Perioden von Rückfällen oder Remission der Krankheit ^{104,105}.

Primär-progredienter Verlauf (engl. *primary progressive MS*, PPMS)

Die PPMS gehört zu den seltenen Verlaufsformen von MS, die bei ungefähr 10% der MS-Patienten auftritt. Charakteristisch für PPMS ist eine langsame Verschlechterung der Symptome von Anbeginn der Krankheit, ohne das Auftreten von Rückfällen oder Remissionen ¹⁰⁴.

Progredienter-Schubförmiger Verlauf (engl. *progressive-relapsing MS*, PRMS)

PRMS ist eine seltene Verlaufsform der Krankheit, die nur bei ungefähr 5% der MS-Patienten diagnostiziert wird. Ähnlich der PPMS bildet sich PRMS ebenfalls durch eine langsame Verschlechterung der Symptome, die sich allerdings durch akute Rückfälle ohne Remission oder Besserung der Krankheit auszeichnen.

1.4.1 Ursachen der Multiplen Sklerose

Die Ursachen der Multiple Sklerose sind bis heute trotz großer Forschungsanstrengungen noch nicht geklärt, sie ist aber neben Epilepsie eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen bei jungen Menschen und daher von erheblicher sozialmedizinischer Bedeutung. Durch die Krankheit entstehen in der weißen Substanz (lat. *Substantia alba*) von Gehirn und Rückenmark vielfache (engl. *multiple*) Entzündungs- und Entmarkungsherde, die als Ergebnis einer unkontrollierten Immunreaktion oder durch das Versagen der myelinproduzierenden Zellen entstehen¹⁰⁸. Da diese Entzündungsherde im gesamten ZNS auftreten können, äußern sich bei MS eine Vielzahl unterschiedlicher neurologischer Symptome wie beispielsweise physische, psychische aber auch mentale Probleme^{105,109}. Als mögliche Ursachen für die Ätiologie von MS werden vor allem genetische Risikofaktoren, aber auch verschiedene Umwelteinflüsse diskutiert¹¹⁰. Die genetischen Risikofaktoren stellen dabei den größten Teil der Gefahr dar, an MS zu erkranken. Die Chance innerhalb einer Gruppe Verwandter ersten Grades an MS zu erkranken liegt bei 2 - 5%; bei eineiigen Zwillingen sogar bei 25%, falls bei einem Familienmitglied die Krankheit bereits festgestellt wurde¹¹¹.

Der MHC-Komplex, eine spezifische Gruppe von Genen, die auf Chromosom 6 lokalisiert sind, scheint auf besondere Weise mit MS assoziiert zu sein¹⁰⁵. Seit mehr als 30 Jahren ist bekannt, dass die in der HLA-Region kodierten Proteine mit MS oder anderen Autoimmunerkrankungen, wie beispielsweise Diabetes mellitus Typ 1 oder Lupus erythematodes in Verbindung stehen¹¹². Es wird angenommen, dass die Gene des MHC-Komplexes ungefähr 10 - 60% des genetischen Risikos ausmachen, an MS zu erkranken^{113,114}. Zusätzlich erhöhen verschiedene Umwelteinflüsse wie z.B. ein erniedrigter Vitamin D-Wert, Rauchen oder eine Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) das Risiko einer MS-Erkrankung bei Patienten mit genetischer Prädisposition deutlich¹¹⁵.

1.4.2 Genetische Faktoren als Ursache der Multiplen Sklerose

Obwohl MS im eigentlichen Sinne keine klassische Erbkrankheit darstellt, kann eine Reihe von genetischen Variationen, so genannte Polymorphismen, zu einer Prädisposition für Multiple Sklerose beitragen. Wie bereits erwähnt, scheinen die Gene des MHC-Komplexes von besonderer Bedeutung für die Entstehung von MS zu sein. Zusätzlich sind aber auch Polymorphismen von am Interleukinsignalweg beteiligten Genen von wissenschaftlichem Interesse¹¹⁶⁻¹¹⁸. So wurde 1973 das erste Mal gezeigt, dass insbesondere HLA-DR15 (früher bekannt als DR2), das im MHC-Komplex kodiert ist, auf besondere Weise mit einer Prädisposition für MS assoziiert ist¹¹⁹. Die Verknüp-

fung der HLA-DR- und HLA-DQ-Gene mit dem erhöhten Risiko an MS zu erkranken, gehört seit damals zu dem am häufigsten reproduzierten Ergebnis der Ursachenforschung für die Multiple Sklerose ¹²⁰. Unter anderem ist mittlerweile bereits bekannt, dass HLA-DR15 die klinischen Aspekte der Multiplen Sklerose wie das Einsetzen der Symptome oder den Phänotyp der Krankheit beeinflusst ¹²¹.

Wie bereits erwähnt, ist das genetische Risiko an MS zu erkranken auf einen einzelnen HLA-DR-Haplotyp zurückzuführen ¹²⁰. Der HLA-DR15-Haplotyp besteht aus zwei Allelen, dem DRB1*15:01 (DR2b) und dem DRB5*01:01 (DR2a) ¹¹⁴. DRB1*15:01 oder DR2b ist ein Heterodimer aufgebaut aus den Ketten DRA1*01:01 und DRB1*15:01, wohingegen das DR2a genannte Molekül aus den Ketten DRA1*01:01 und DRB5*01:01 aufgebaut ist ¹²⁰. Die beiden Allele HLA-DRB1*15:01 und HLA-DRB5*01:01 stehen dabei in einem sehr engen Kopplungs-Ungleichgewicht (engl. *linkage disequilibrium*). Das Kopplungs-Ungleichgewicht beschreibt dabei den Zustand, bei dem unterschiedliche Allele, die auf verschiedenen Orten des gleichen Urchromosoms lokalisiert sind, nicht zufällig sondern abhängig voneinander exprimiert werden ¹²². HLA-Klasse-II-Moleküle werden von antigenpräsentierenden Zellen (APC) exprimiert und präsentieren vorwiegend Peptide aus exogenen Proteinen, aber auch Peptidfragmente die aus dem Abbau der HLA-Klasse-II-Moleküle selbst stammen. Die präsentierten Peptide werden dabei in Kombination mit dem HLA-Klasse-II-Molekül von CD4⁺ T-Zellen mit entsprechender Rezeptorspezifität erkannt ^{82,123}. Durch die Mechanismen der zentralen Toleranz, wie positiver und negativer Selektion, sind vor allem HLA-Klasse-II-Moleküle von elementarer Bedeutung für die Generierung des CD4⁺ T-Zellrepertoires im Thymus ^{123,124}. Sobald die T-Zellen in die Peripherie gelangen, übernimmt jedoch die homöostatische Proliferation oder die autologe Proliferation die Kontrolle über das T-Zellrepertoire. Unter normalen physiologischen Bedingungen, also bei dem Fehlen einer Infektion, bewirkt die homöostatische Proliferation den Erhalt eines differenzierten und funktionellen T-Zellkompartiments ¹²⁵. Kommt es im Zuge einer Erkrankung zu einem massiven Verlust von T-Zellen (Lymphopenie), so induziert der Kontakt des T-Zellrezeptors (engl. *T cell receptor*, TCR) mit einem MHC-Molekül die homöostatische Proliferation der T-Zelle, wobei die Zytokine Interleukin 7 (IL-7) und Interleukin 15 (IL-15) die wichtigsten Stimulantien darstellen ¹²⁶.

Die unterliegenden Mechanismen der Entstehung von MS sind bis heute noch nicht vollständig geklärt. Wie bereits erwähnt wird angenommen, dass neben Selbstpeptiden mit ähnlicher Struktur wie Fremddantigene gewebespezifische Autoantigene, eine differenzielle HLA-Expression im ZNS sowie die unvollständige Deletion autoreaktiver T-Zellen im Thymus eine wichtige Rolle spielen ¹²⁷⁻¹²⁹. Eine weitere Ursache der

MS könnte in der Struktur der HLA-DR-Moleküle selbst begründet sein, da der Komplex von HLA-Klasse-II-Molekül und gebundenem Selbstpeptid mittels der homöostatischen Proliferation das vorhandene T-Zellrepertoire gestaltet¹³⁰.

Aufgrund der beschriebenen Assoziation des Haplotyps HLA-DR15 mit dem gesteigerten Risiko an MS zu erkranken, in Kombination mit dem bis heute begrenzten Wissen zur Rolle der homöostatischen Proliferation im Kontext der Autoimmunkrankheit MS, werden in der vorliegenden Arbeit HLA-DR15-präsentierte Peptide massenspektrometrisch genauer charakterisiert.

1.5 *Onchocerca volvulus*

Onchocerca volvulus (lat. *volvulus*: kleines Knäuel) ist ein parasitischer Fadenwurm, der neben weiten Gebieten des tropischen Afrika auch im Norden Südamerikas beheimatet ist. *O. volvulus* gehört dabei zur Überfamilie der Filarien des Stammes der Nematoden (Fadenwürmer), die sich aus den Familien *Filariidea* und *Onchocercidae* zusammensetzen. Filarien sind parasitische Fadenwürmer, zu denen viele Humanpathogene, wie beispielsweise *Brugia spp.*, *Loa loa*, *Wucheria bancrofti* und *Onchocerca volvulus* gehören. Die von *O. volvulus* ausgelöste Krankheit wird als Onchocerkose bezeichnet, wobei ungefähr 10% aller Erkrankten unter Erblindung leiden. Aus der resultierenden Erblindung leitet sich auch der umgangssprachliche Name der Krankheit, die Flussblindheit, ab. Die zerstörerische Entzündungsreaktion im Auge, die ultimativ zur Erblindung der Betroffenen führt, richtet sich nicht, wie ursprünglich angenommen, gegen die Mikrofilarien selbst, sondern gegen die endosymbiotischen Bakterien des *O. volvulus*¹³¹.

1.5.1 Lebenszyklus von *O. volvulus*

Der Parasit wird über Kriebelmücken der Gattung *Simulium* auf den Menschen übertragen. Onchocercarien besitzen wie alle parasitären Filarien einen Lebenszyklus mit Wirtswechsel, wobei die weiblichen Kriebelmücke (*Simulium damnosum*) als Zwischenwirt bzw. als Vektor für die weitere Verbreitung dient. Als Endwirt befällt *Onchocerca volvulus* hauptsächlich den Menschen. Eine graphische Darstellung des Lebenszyklus von *O. volvulus* in Haupt- und Zwischenwirt ist in Abbildung 10 gezeigt.

Mücken der Gattung *Simulium* nehmen über die Blutmahlzeit die so genannten Mikrofilarien (MF) einer infizierten Person auf. Diese Mikrofilarien befinden sich in der Haut oder in den lymphatischen Gefäßen des Bindegewebes, was die Aufnahme der Mikrofilarien durch den Zwischenwirt erleichtert. In der Mücke entwickeln sich die Mikrofilarien über L1-Larven schließlich zu L3-Larven, die wiederum über eine Blutmahlzeit der Kriebelmücke zurück in den Menschen gelangen. Im Menschen angelangt, passiert *O. volvulus* den Blutstrom und gelangt so in das subkutane Gewebe, wobei die Larven auch gelegentlich das Auge befallen. Im Bindegewebe bildet *O. volvulus* subkutane Knoten, sogenannte Onchozerkome, in denen die Würmer nach ihrer Geschlechtsreife bis über Jahre hinweg eingekapselt bleiben¹³². Nach dem Erreichen der Geschlechtsreife verlassen die kleineren männlichen Würmer ihre Knoten und wandern in das subkutane Gewebe, um sich dort mit den weiblichen Wurmern zu paaren. Während sich die männlichen Nematoden nach ihrer Reifung frei im subkutanen Gewebe bewegen,

bleiben die weiblichen Nematoden permanent in einer fibrösen Kapsel eingeschlossen¹³³. Die weiblichen Würmer produzieren daraufhin 1 000 bis 3 000 Mikrofilarien pro Tag, die über das Lymphsystem des Bindegewebes wieder in den Blutkreislauf gelangen und von dort über die Blutmahlzeit erneut vom Zwischenwirt aufgenommen werden¹³⁴. Die entstandenen Mikrofilarien besitzen eine Lebensspanne von 1 bis 2 Jahren. Die Würmer lösen im Blutkreislauf keine bzw. nur geringe Immunantworten aus, da die Mikrofilarien bzw. die adulten Würmer eine Oberflächenverkleidung besitzen, die sie vor einer Erkennung durch das Immunsystem schützt¹³⁵.

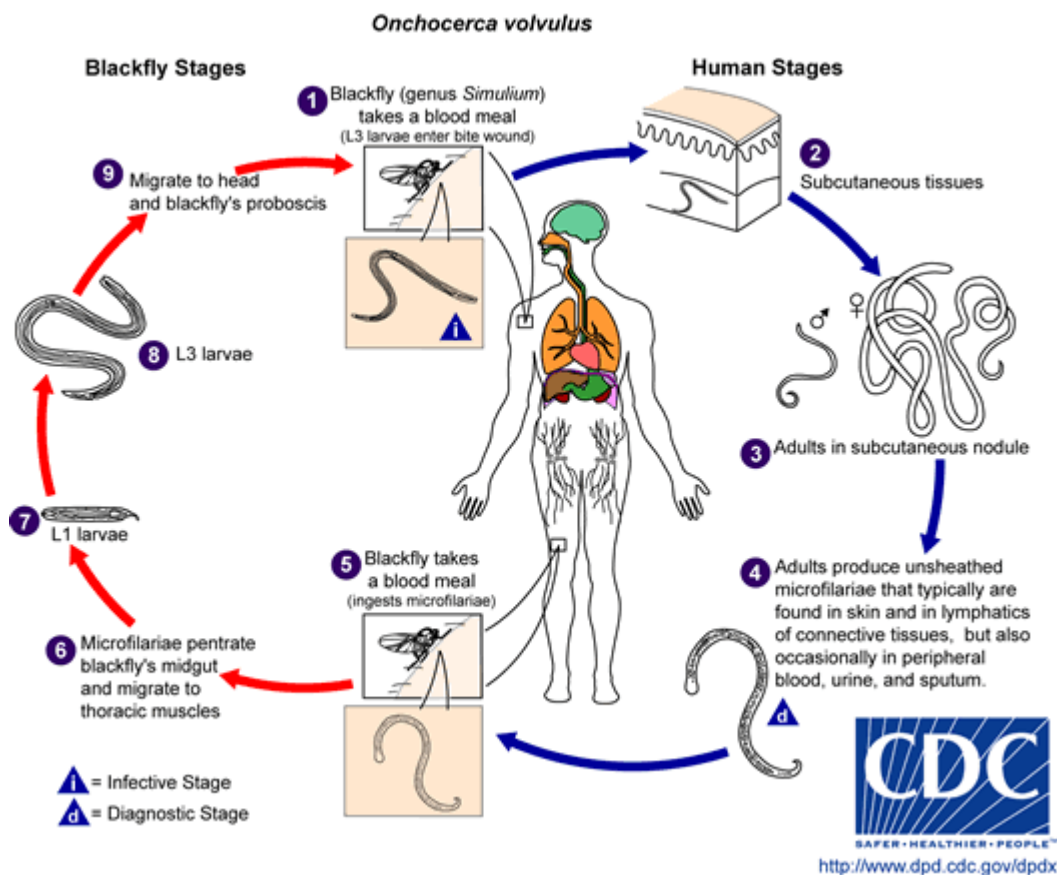


Abbildung 10: Der Lebenszyklus von *Onchocerca volvulus*

1 Die L3-Larven gelangen über die Blutmahlzeit einer infizierten Kriebelmücke in die Haut des menschlichen Hauptwirts. 2 Im subkutanen Gewebe entwickeln sich die Larven zu adulten Tieren. 3 Die adulten Tiere bilden im Bindegewebe die Onchozerkome, in denen die erwachsenen Tiere bis zu 15 Jahren leben können. 4 Nach erfolgreicher Paarung produzieren die weiblichen Tiere bis zu 3000 Mikrofilarien pro Tag, die über das Lymphsystem des Bindegewebes in die oberen Hautschichten gelangen. 5 Über die Blutmahlzeit einer Kriebelmücke gelangen die Filarien zurück in den Zwischenwirt. 6 Im Zwischenwirt wandern die Mikrofilarien vom Mitteldarm durch das Hämözöl in den Brustmuskel, wo sich die Mikrofilarien zu L1-Larven entwickeln. 7 Letztlich entwickeln sich infektiöse L3-Larven, die in den Stechrüssel der Kriebelmücke migrieren, um dort bei einer Blutmahlzeit erneut auf den Menschen übertragen werden zu können¹³⁶. Abbildung entnommen aus¹³⁶.

1.5.2 Epidemiologie der Onchozerkose (Flussblindheit)

Die Verbreitung der Onchozerkose ist unweigerlich an das Vorhandensein seines Zwischenwirtes, der Kriebelmücke, gekoppelt. Die Poolsauger (engl. *pool feeder*) gehören zu den blutsaugenden Insekten (Hämatophagen), die vor allem in der Nähe schnell fließender Gewässer innerhalb tropischer Zonen beheimatet sind. Ungefähr 37 Millionen Menschen sind von der Onchozerkose betroffen, wobei die Zahl der Erblindungen auf 300 000 geschätzt wird¹³⁷. Neben Afrika tritt die Onchozerkose in anderen Ländern auf, allerdings sind 99% aller Fälle von Onchozerkose auf Afrika beschränkt, wo die Parasitose mittlerweile in 30 Ländern endemisch ist¹³³.

Kolumbien ist seit Juli 2013 gemäß der Panamerikanischen Gesundheitsorganisation das erste Land weltweit, in dem die Krankheit vollständig ausgerottet wurde^{138,139}. Der Erfolg in Kolumbien ist auf das zu den Makroliden gehörende Ivermectin zurückzuführen. Ivermectin ist ein Breitspektrum-Antiparasitikum, das traditionell gegen viele parasitische Würmer eingesetzt wird¹³⁴. Das von der Pharmafirma Merck & Co. Inc. vermarktete Mectizan (Ivermectin) wird seit 1987 an alle Länder gespendet, die sich die Anschaffung nicht leisten können. Ivermectin hemmt die Transmission der Onchozerkose, indem die Mikrofilarien abgetötet werden und so die Verbreitung über den Zwischenwirt gestoppt wird. Ivermectin besitzt jedoch keine Toxizität gegen adulte Würmer, weshalb die Krankheit eher kontrolliert als geheilt wird^{134,140}. Zudem muss das Medikament über einen Zeitraum von 10 - 15 Jahren, entsprechend der Lebensspanne der adulten Würmer eingenommen werden, um die Menschen langfristig vor der Krankheit zu schützen¹³⁴. Seit den späten 1990er Jahren ist außerdem bekannt, dass der weibliche *O. volvulus* von endosymbiotischen Bakterien bevölkert wird, die sich über Koevolution an *O. volvulus* angepasst haben¹⁴¹.

1.5.3 Die Onchozerkose und das Immunsystem

Infektionen mit mikrobiellen Pathogenen lösen meist eine Th1-Immunantwort aus, die durch die Ausschüttung von IFN- γ , TNF- α und vor allem IL-2 charakterisiert ist¹⁴². Im Gegensatz dazu lösen Infektionen mit parasitären Helminthen eine starke Th2-Immunantwort aus. Die wichtigste Funktion der Typ2-polarisierten CD4⁺ T-Zellen ist die Aktivierung der B-Lymphozyten über die Zytokine IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13, die wiederum die Bildung der Antikörperklassen IgA, IgG und IgE erhöhen. Neben der Aktivierung der B-Zellen werden über das charakteristische Zytokinprofil zusätzlich basophile, neutrophile Granulozyten sowie Mastzellen angelockt, die wiederum den Parasiten attackieren¹⁴³. Die Onchozerkose als Krankheit beeinflusst nicht nur die Lebensqualität der Betroffenen, sondern auch die Lebensdauer¹⁴⁴.

Es wurde ebenfalls gezeigt, dass Patienten mit einer frühen *O. volvulus*-Infektion eine signifikant erhöhte zellvermittelte Immunantwort zeigen, verglichen mit Patienten mit chronischer Inflammation¹⁴⁵. Eine verlängerte Infektion vermindert die Immunantwort gegen *O. volvulus*, wobei die genauen Mechanismen nicht bekannt sind¹³³. Die Immunantwort richtet sich dabei nicht ausschließlich gegen den Parasiten selbst, sondern auch gegen das endosymbiotisch lebende Bakterium *Wolbachia*. Es wird angenommen, dass die Immunantwort auf die Antigene beider Organismen für die Entstehung der sklerosierenden Keratitis und der Dermatitis verantwortlich sind, wohingegen die Läsionen der Retina auf Kreuzreaktionen zwischen retinalen und parasitären Proteinen beruhen^{146,147}. Ein weiterer Grund für die starke Entzündungsreaktion im Auge sind die sogenannten Toll-ähnlichen Rezeptoren (engl. *Toll-like receptors*, TLR). Die Mikrofilarien infiltrieren die Hornhaut (lat. *Cornea*) des Auges, wo sie eventuell sterben und die *Wolbachien* freisetzen. *Wolbachia* aktiviert selektiv die Toll-ähnlichen Rezeptoren 2 und 6 der residenten Fibroblasten in der *Cornea*, die ihrerseits über das Adaptormolekül MyD88 die Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Zellkern induzieren¹⁴⁶. NF- κ B vermittelt die Ausschüttung proinflammatorischer und chemoattraktiver Zytokine, woraufhin neutrophile und eosinophile Granulozyten rekrutiert werden¹⁴⁸. Infiltrierende neutrophile Granulozyten umschließen die Mikrofilarien und nehmen die Antigene der *Wolbachien* auf, wodurch wiederum Chemokine und proinflammatorische Zytokine freigesetzt werden. Die angelockten und aktivierten neutrophilen Granulozyten produzieren daraufhin zytotoxische Mediatoren, die ihrerseits zytotoxisch auf lokale Zellen in der *Cornea* wirken und dadurch zu dem Verlauf der Keratinose beitragen¹⁴⁹. Die Pathogenese der Keratinose durch *O. volvulus* wird dabei vor allem durch neutrophile, weniger durch eosinophile Granulozyten vermittelt^{148,149}. Im Rahmen des Projekts „EPIAF“ (EU-Projekttitle: *enhanced protective immunity against filariasis*) war es das Ziel dieser Arbeit, HLA-Liganden des Parasiten *O. volvulus* bzw. seines Endosymbionten *Wolbachia* innerhalb humaner Gewebeproben mittels der Massenspektrometrie zu identifizieren und zu verifizieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien und Geräte sind in nachfolgender Liste aufgeführt. Falls nicht anders vermerkt, ist jeweils der Hauptsitz des Unternehmens bzw. des Tochterunternehmens und das Heimatland angegeben, sofern der Firmensitz außerhalb von Deutschland liegt.

2.1.1 Verbrauchsmittel

Sterilfilter 0,22 µm	Corning Inc., Corning, USA
Sterilfilter 0,20 µm	Sartorius Stedim Biotech S.A., Aubagne, France
CHAPS	Roche Diagnostics, Mannheim
CNBr-activated Sepharose 4B	GE Healthcare Bio-Science AB
Röhrchen Falcon BD Becton, 15 ml, 50 ml	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Proteaseinhibitor-Tabletten complete	Roche Diagnostics, Mannheim
Pierce Spin Columns 900 µl – Screw Cap	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Petrischalen Plastik	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
4 ml Amicon Ultra-5 Centrifugal Filter 10K	Millipore, Billerica, USA
500 µl Amicon Ultra-0,5 Centrifugal Filter 10K	Millipore, Billerica, USA
Wasser, Ultra LC/MS J.T. Baker	Th. Greyer GmbH, Renningen
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging
pH-Indikator Stäbchen pH-Fix 0-14	Macherey-Nagel, Düren
Pipettenspitzen 1000, 200, 10 µl	Starlab GmbH, Ahrensburg
1,5 ml-Eppendorf-Gefäß	Eppendorf, Hamburg
2 ml-Eppendorf-Gefäß	Eppendorf, Hamburg

96-well round-bottom plates, 3799	Corning Inc., Corning, USA
48-well cell culture plates	Corning Inc., Corning, USA
Cryoröhrchen 2 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Dreiwegehahn „Discofix C3“	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Gewebekulturflaschen 175 cm ² , 550 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Gewebekulturflaschen 75 cm ² , 250 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Kanülen 0,45 x 30 mm „Sterican“	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
MACS-Säulen „LS“	Miltenyi Biotex GmbH, Bergisch Gladbach
PEG-reduzierte Pipettenspitzen „Diamond“	Gilson inc., Middleton, USA
Spritzen 1 ml, 2,5 ml, 10 ml, 50 ml	Becton, Dickinson and Compa- ny, Franklin Lakes, USA
Serologische Pipetten 1, 2, 5, 10, 25, 50 ml	Corning Inc., Corning, USA
Reservoirs 50 ml, 100 ml	Corning Inc., Corning, USA
Cryoröhrchen, 2 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zip-Tip µ-C18, 10 µl	Millipore, Billerica, USA

2.1.2 Geräte und Zubehör

37°C Inkubator für Gewebekulturen (Labotect 3250)	Labotex, Rosdorf
Analysenwaage, 1-200 mg	Sartorius, Göttingen
Autosampler Micro AS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Branson Sonifier 250	Branson Ultrasonics, Danbury, USA
Dampfsterilisator	Sauter, Mühl Dorf
Einfrierbehälter Nalgene	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Einkanalpipetten	Gilson, Middleton, USA
Flachschüttler	IKA-Vibrax-VXR, Staufen
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank -80°C	Sanyo, Moriguchi, Japan
H ₂ O Destamet Bi 18 E	Heraeus, Waltham, USA
Lichtmikroskop, DM IL	Leica, Wetzlar
Lyophilisierungsanlage Vaco5	Zirbus, Bad Grund
MACS-Magnet-Separator	Miltenyi Biotex, Bergisch Gladbach
Magnetrührer RCT basic	IKA, Staufen
Massenspektrometer, LTQ Orbitrap XL	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Megafuge	Heraeus, Waltham, USA
Membran-Vakuumpumpe	Vacuubrand, Wertheim
Mehrkanalpipette, 200 µl	Abimed, Langenfeld
Nano- <i>HPLC</i> NanoLC 2D	Eksigent, Dublin, USA
Neubauer-Zählkammer, Tiefe 0,1 mm	LO-Laboroptik, Bad Homburg
Online-ESI-Nadel, Silica Tips for Micromass ZSpray NanoFlow (D), 360/20 µm OD/ID, 10 µm ID Auslassöffnung	New Objective, Woburn, USA
Online-ESI-Nadel SilicaTips for Thermo Finnigan Nanospray Ion Source 1 (N) 360/20 µm OD/ID, 10 µm ID Auslassöffnung	New Objective, Woburn, USA
Peptide Synthesizer ABI 433A	Applied Biosystems, Foster City, USA

Peptide Synthesizer EPS 221	Abimed, Langenfeld
Pipet Boy, Pipettierhilfe	Integra Biosciences, Zizers, Schweiz
Pneumatische Pumpe LKB P-1	McKinley Scientific, Pharmacia, New York, USA
Potter RZR 2020	Heidolph Instruments, Schwalbach
Potterglas 2 cm ³	Novodirect, Kehl
Quarzküvetten, 10 mm Zentrum	Hellmam, Müllheim
Q-TOF Ultima Massenspektrometer	Waters Micromass, Manchester, UK
Rotator	Bachofer, Reutlingen
Sterilbank, Technoflow	Integra Biosciences, Zizers, Schweiz
SpeedVac Vacuum Concentrator	Bachofer, Reutlingen
Thermoblock	Eppendorf, Hamburg
Tischkühlzentrifuge Biofuge 13	Heraeus, Waltham, USA
Tischkühlzentrifuge Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Tischkühlzentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus, Waltham, USA
UltiMate 3000 RSLCnano UHPLC system	Dionex, Sunnyvale, USA
Ultrazentrifuge L-80	Beckman Coulter, Krefeld
UV-Spektrometer Ultrospec 3000	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Vorsäule C-18-Material, 300 µm, 10 mm	Dionex / LC Packings, Germering
Vortexer	IKA-Works, Inc., Wilmington, USA
Wasserbad (Thermomix BM-S)	Braun Biotech, Melsungen

2.1.3 Chemikalien und Lösungen

Acetonitril, LC/MS Grade	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ameisensäure	Merck, Darmstadt
Ammoniumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich, St. Lois, USA
Aqua live/dead	Invitrogen, Carlsbad, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Lois, USA
Brefeldin A	Sigma-Aldrich, St. Lois, USA
CFSE	Invitrogen, Carlsbad, USA
CHAPS	Roche Diagnostics, Mannheim
Cytofix/Cytoperm	Becton, Franklin Lakes, USA
Dithiothreitol	Sigma, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	WAK Chemie Medical GmbH, Steinbach
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DNase I	Roche, Basel, Schweiz
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol p.a.	Merck, Darmstadt
Ethanol (99%, vergällt)	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach a. Inn
FACS-Clean, -Rinse, -Flow	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Flow cytometry compensation beads	Invitrogen, Carlsbad, USA
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Gentamycinsulfat	BioWhittaker, Basel, Schweiz
Glycerin	Roth, Karlsruhe

Glycin	Roth, Karlsruhe
Humanserum, Vollblutspender	laborintern hergestellt
Iodacetamid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Lonza, Köln
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Lymphozyten-Separationsmedium (Ficoll)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
MACS „Pan T Cell Isolation Kit II“ human	Miltenyi Biotex, Bergisch Gladbach
Methanol	Merck, Darmstadt
Natrium-Acetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natrium-Carbonat	Merck, Darmstadt
PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung)	Claudia Falkenburger, Tübingen
PBS, ohne Ca^{2+} Mg^{2+}	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Penicillin/Streptavidin (PenStrep, 100x)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
Saponin S-790	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Streptavidin	AppliChem, Darmstadt
Streptavidin coate4d microspheres, 5,6 μm	Bangs Laboratories, Fishers, USA
Sulfo-N-hydroxysuccinimidobiotin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trifluoressigsäure (TFA)	Applied Biosystems
Trypanblau	Merck, Darmstadt
T-Zellmedium RPMI 1640	Lonza, Köln

2.1.4 Puffer

Auftaumedium	1% PenStrep 3 µg/ml DNase I in RPMI 1640
Einfriermedium	10% DMSO in FCS
Elutionslösung	0,2% TFA in H ₂ O (MS-grade, Baker)
FACS-Fix	1% Formaldehyd in FACS Puffer
FACS-Puffer (PFEA)	2% FCS 2 mM EDTA 0,01% NaN ₃ in PBS
Kopplungspuffer	0,5 M NaCl 0,1 M NaHCO ₃ pH 8,3 mit NaOH einstellen
Lysepuffer (2x)	0,4 g CHAPS 1 Tablette Proteaseinhibitor 33,33 ml PBS
Lösungsmittel A	2% AcN 0,1% FA H ₂ O (MS-grade, Baker) pH 3 mit Ameisensäure einstellen

Lösungsmittel B	80% AcN 0,1% FA H ₂ O (MS-grade, Baker) pH 3 mit Ameisensäure einstellen
MACS-Puffer	0,5% BSA 5 mM EDTA in PBS
NH ₄ HCO ₃ -Puffer	25 mM NH ₄ HCO ₃ pH 3 mit Ameisensäure einstellen
PBS-E	2 ml EDTA in PBS
Tetramerfärbungs-Puffer (TSB)	50% FCS 2 mM EDTA 0,01% NaN ₃ in PBS
T-Zellmedium	10% Humanserum 1% PenStrep in RPMI 1640

2.1.5 Antikörper

Tabelle 3: Verwendete Antikörper für die MHC-Isolierung

Klon	Isotyp	Antigen	Referenz
W6/32	IgG2 _a	HLA-A, -B, -C	150
L243	IgG2 _a	HLA-DR	151
H0596 (DR2a)	IgM	HLA-DRB5*01:01	123
H0427A (DR2b)	IgM	HLA-DRB1*15:01	123

Pro Gramm Gewebe wurde 1 mg Antikörper an 40 mg Sepharose gekoppelt.

Tabelle 4: Verwendete Antikörper zur Oberflächenfärbung

Klon	Spezies	Antigen	Fluoreszenz-Farbstoff	Hersteller	empfohlene Verdünnung
RPA-T8	Maus	CD8	Pe-Cy7	BD	1:120
SK1	Maus	CD8	PerCp	Biolegend	1:50
RPA-T4	Maus	CD4	APC-Cy7	BD	1:100

Tabelle 5: Für die aAPC-Synthese eingesetzte Antikörper

Klon	Spezies	Antigen	Hersteller
9.3	Maus	CD28	Claudia Falkenburger, Tübingen

2.1.6 Zytokine und Enzyme

Es wurden ausschließlich rekombinante, humane Zytokine für die Experimente verwendet, die vom Hersteller auf die Abwesenheit von Endotoxin getestet wurden.

Humanes GM-CSF	Berlex, Richmond, USA
Humanes Interleukin 2 (hIL-2)	Promokine, Heidelberg
Humanes Interleukin 12 (hIL-12)	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Humanes Interleukin 6 (hIL-6)	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Trypsin, Sequence grade modified	Promega, Mannheim

2.1.7 Zelllinien

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Zelllinien

Name	Zelltyp	transfizierte Allele	Ketten
DR2a	BLS-Zellen	DRB5*01:01	DRB5*01:01, DRA*01:01
DR2b	BLS-Zellen	DRB1*15:01	DRB1*15:01, DRA*01:01

BLS, bare lymphocyte syndrome

2.1.8 Software

BD FACS Diva v. 6.1.3	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
FlowJo 7.6	TreeStar Inc., Ashland, USA
Microsoft Office 2010	Microsoft Corp., Redmond, USA

MASCOT Server 2.2.04	Matrix Science, London, UK
Proteome Discoverer 1.4	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
XCalibur 2.0.7	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.9 Datenbanken

Sofern bekannt, wurde der Hersteller, die Version oder die Internetadresse der verwendeten Datenbank angegeben.

SYFPEITHI Version 1.0	Immunologie Tübingen
NetMHC Version 3.4	Center for Biological Sequence Analysis, TU Dänemark
Ligandomat	192.168.123.62:8080/prediction
The Human Protein Atlas	http://www.proteinatlas.org
UniProtKB Proteindatenbank	http://www.uniprot.org

2.1.10 Analyierte Prostatagewebebeobachten

Die Prostatagewebe wurden im Rahmen des Routinebetriebs der Universitätsklinik Tübingen den Patienten entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Analyse von Dipl. Biol. Jörg Hennenlotter bei -80°C gelagert. Alle Patienten wurden vor ihrer Operation über die Weitergabe der Proben an die Abteilung Immunologie Tübingen aufgeklärt und stimmten der Abgabe freiwillig zu. Der Ethikkommission der Universitätsklinik Tübingen lag ein entsprechendes Ethikvotum (27/2009BO2) vor. In Tabelle 7 ist eine Übersicht über die in dieser Arbeit untersuchten Prostatagewebebeobachten abgebildet. Neben Gewebebeobachten aus histologisch gesichertem Prostatakarzinomgewebe (PrCa) wurden unter anderem auch Gewebe aus benignen Prostatahyperplasien (BPH) sowie Prostatanormalgewebe (benigne Prostata) analysiert. Die meisten Prostatakarzinome wurden nach positiver Biopsie mittels Prostatektomie (Px) entfernt, wobei auch Operationen wie die Zystektomie (Cx) oder die transurethrale Resektion (TURP) Prostatagewebe für die Analyse lieferten. Die transurethrale Vaporisation (TVP) ist neben der transurethralen Resektion der Prostata (TURP) das Standardverfahren nach der Diagnose einer benignen Hyperplasie der Prostata. Aufgrund der erschwerten und oft nicht eindeutigen Diagnosestellung können die Operationen TVP

und TURP sowohl Gewebe des Prostatakarzinoms, aber auch BPH oder benignes Prostatagewebe liefern ¹⁵². Alle erhaltenen Prostatagewebe wurden direkt nach ihrer operativen Entnahme charakterisiert und bei -80°C in der Abteilung Urologie des Universitätsklinikums Tübingen gelagert. Die Charakterisierung der Gewebe wurde über eine histologische Begutachtung durch die Pathologie bestätigt. Allerdings ist davon auszugehen, dass es sich bei der Mehrzahl der Gewebeproben um Mischgewebe aus Tumor- und Normal- bzw. Hyperplasie- und Normalgewebe handelt.

Tabelle 7: Humane Prostatagewebe für die HLA-Klasse-I-Ligandenanalyse

Gewebe	Gewicht (g)	Operation	Histologie	Klassifikation (TNM)	Gleason Score
Pro006	1,00	Px	PrCa	pT3N1M0	3+2
Pro106	2,01	Cx	PrCa	pT3bN0M0	4+3
Pro181	0,50	Px	PrCa	pT3bN1M0	3+5
Pro301	0,13	Px	PrCa	pT2cN0M0	4+4
Pro314	0,28	Px	PrCa	pT3bN0M0	5+4
Pro344	0,38	Px	PrCa	pT3aN0M0	4+4
Pro353	0,56	pall-TURP	PrCa	n.a.	5+5
Pro366	0,88	pall-TURP	PrCa	pT4NxMx	5+4
Pro383	1,70	Px	PrCa	pT3bN1M0	5+5
Pro386	1,50	Px	PrCa	pT3bN1M0	4+4
Pro407	0,60	pall-TURP	BPH	pTxNxM0	4+4
Pro373	0,50	TURP	BPH	n.a.	n.a.
Pro411	1,50	TVP	BPH	n.a.	n.a.
Pro418	1,46	TVP	BPH	n.a.	n.a.
Pro012	2,60	Cx	benigne Prostata	n.a.	n.a.
Pro089	3,00	Cx	benigne Prostata	n.a.	n.a.
Pro092	1,50	Cx	benigne Prostata	n.a.	n.a.
Pro306	3,00	TVP	benigne Prostata	n.a.	n.a.
Pro368	2,19	Cx	benigne Prostata	n.a.	n.a.
Pro381	1,60	TVP	benigne Prostata	n.a.	n.a.
Pro392	0,40	TURP	benigne Prostata	n.a.	n.a.

In dieser Tabelle ist das Gewicht aller bearbeiteten Prostatagewebe angegeben. Neben der Art der Operation sind zusätzlich die Histologie sowie die Klassifikation nach TNM bzw. Gleason angegeben.

Px, Prostatektomie; Cx, Cystektomie; pall, palliativ; TURP, transurethrale Resektion der Prostata; TVP, transurethrale Vaporisation der Prostata; n.a., nicht angegeben.

2.1.11 Onchozerkome und Hautgewebeproben

Im Rahmen des Projekts EPIAF wurden unter der Leitung von Prof. Dr. Peter Soboslay in der Republik Togo Onchozerkome sowie Hautgewebeproben mit enthaltenen Mikrofilarien gesammelt. Alle Patienten wurden über die Weitergabe der Gewebeproben an die Abteilung Immunologie der Universität Tübingen aufgeklärt und stimmten dieser

freiwillig zu. In Tabelle 8 sind alle analysierten Gewebeproben aus Patienten mit Onchozerkose aufgeführt.

Tabelle 8: Humane Gewebeproben mit Onchozerkose

Kode	Gewebe	Klassifikation	Gewicht (g)
N29#1	Knoten	Onchozerkom	0,8
N32#1	Knoten	Onchozerkom	1,6
N32#2	Knoten	Onchozerkom	2,1
N32#3	Knoten	Onchozerkom	1,8
Skin1	Haut	Mikrofilarien	0,4
Skin2	Haut	Mikrofilarien	0,5
Skin3	Haut	Mikrofilarien	0,7
Skin4	Haut	Mikrofilarien	0,4

In dieser Tabelle sind alle bearbeiteten Gewebeproben von Patienten mit Onchozerkiasis aufgeführt. Neben dem Gewicht der Probe wurde zusätzlich der Ursprung der Gewebeprobe angegeben.

2.2 Methoden

2.2.1 Bestimmung der Lebendzellzahl

Mittels leichten Druckes wurde ein intaktes Deckglas so auf einen Zählkammer-Objektträger (Hämacytometer) geschoben, bis auf der Auflagefläche zwischen Deckglas und Objektträger die Newtonschen Ringe erkennbar sind. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde zunächst die Zellsuspension durch auf- und abpipettieren so gemischt, dass die Mehrheit Zellen als Einzelzellen und nicht als Zellklumpen vorliegen. 10 µl der Zellsuspension wurden in einem Rundboden-*well* (*u-bottom*) einer 96-*well*-Platte mit 90 µl Trypanblau vermengt und ca. 30 s inkubiert, bevor 10 µl auf die Zählkammer gegeben wurden. Unter Verwendung eines Lichtmikroskops wurden alle lebenden Zellen, die aufgrund ihrer intakten Membran den Farbstoff nicht annehmen, in vier Großquadranten ausgezählt. Die Konzentration der Zellsuspension wurde dabei so gewählt, dass pro Großquadrat ca. 20 - 200 Zellen zu erkennen waren, um Ungenauigkeiten zu vermeiden. Um die Zellzahl in einem ml der Zellsuspension zu bestimmen, wurde folgende Formel verwendet.

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Gesamtzellzahl}}{\text{Anzahl der gezählten Felder}} * f * 10^4$$

Der Verdünnungsfaktor f bezieht sich auf das Volumenverhältnis von Trypanblau zu eingesetzter Zellsuspension. Bei einem Mischverhältnis von 1 zu 9 Teilen entspricht der Verdünnungsfaktor 10. Um die Zellkonzentration in einem ml zu errechnen, wurde zum Schluss mit dem Faktor 10^4 multipliziert. Der Faktor resultiert aus der Kammertiefe der verwendeten Zählkammer von $0,1 \text{ mm}^3$, was einem Volumen von $0,1 \text{ }\mu\text{l}$ entspricht. Durch die Multiplikation mit 10^4 ergibt sich die Zellkonzentration in 1 ml, mit dessen Hilfe sich die Gesamtzellzahl in der entsprechenden Menge Zellsuspension bestimmen lässt.

2.2.2 Einfrieren von Zellen

Bevor die verwendeten Zellen eingefroren wurden, wurde zunächst die Zellzahl bestimmt (siehe 2.2.1). Sobald die Zellzahl bekannt war, wurden die Zellen in ein 50 ml-*Falcon*-Röhrchen überführt und bei 13 000 rpm für 8 min zentrifugiert. Die adhärenen Zellen wurden mittels eines Zellschabers gelöst und in ein *Falcon*-Röhrchen gegeben. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 10 ml PBS resuspendiert, bevor die Zellsuspension erneut bei 13 000 rpm für 8 min zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen bevor das Zellpellet im entsprechendem Volumen Einfriermedium vollständig resuspendiert wurde. Abhängig von der Zelldichte wurden ca. $5 - 20 \cdot 10^6$ Zellen in 1,5 ml Einfriermedium suspendiert und in Kryoröhrchen eingefroren. Die Kryoröhrchen wurden zuerst über eine Kryobox mit einer Kühlungsrate von $-1^\circ\text{C}/\text{min}$ bei -80°C eingefroren, bevor sie am nächsten Tag in den Stickstofftank zur weiteren Lagerung überführt wurden.

2.2.3 Lymphozytenseparation aus Leukapheresen

Im ersten Schritt wurden die Leukaphereseanteile (ca. 60 ml je Anteil) mit drei- bis vierfachen Volumina an PBS (Raumtemperatur) versetzt und in Portionen von 30 ml über je 15 ml in ein 50 ml-*Falcon*-Röhrchen vorgelegtes Lymphozytenseparationsmedium geschichtet. Es wurde darauf geachtet, dass die mit PBS verdünnten Leukaphereseanteile langsam und vorsichtig auf das Lymphozytenseparationsmedium pipettiert wurden, um eine Vermischung der Flüssigkeiten an der Trennschicht zu vermeiden. Anschließend folgte ein 30-minütiger Zentrifugationsschritt bei 2 000 rpm und ausgeschaltener Bremse in einer Megafuge 1.0. Mittels der Dichtegradientenzentrifugation wurden die Mono- und Lymphozyten von den anderen Blutbestandteilen getrennt¹⁵³. Die entstandene PBMC-Schicht wurde an der Interphase abgenommen und die Leukaphereseanteile eines Spenders wurden daraufhin in zwei 50 ml-*Falcon*-Röhrchen vereinigt und mit kaltem PBS auf 50 ml aufgefüllt. Es folgten erneute Zentrifugationsschritte für 12

min bei 1 500 rpm, 1 300 rpm, 1 100 rpm und eingeschaltener Bremse, wobei die Interphase durch wiederholtes Waschen (Überstand verwerfen, Resuspension, Zentrifugation) angereichert wurde. Alle Zellen eines Spenders wurden in 5 ml PBS je Leukaphereseanteil resuspendiert, gepoolt und die Zellzahl bestimmt, bevor die Zellen weggefroren (siehe 2.2.2) oder direkt kultiviert wurden.

2.2.4 PBMC-Isolation aus Spendervollblut

Die Arbeitsschritte der Isolation von PBMCs aus Vollblut entsprechen den Arbeitsschritten bei der Lymphozytenseparation aus Leukapheresen mit einer Ausnahme. Im ersten Schritt der Isolierung von PBMCs aus Spenderblut wurde das erhaltene Blut 1:1 mit PBS (Raumtemperatur) durchmischt und in ein 50 ml-*Falcon*-Röhrchen überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt (2 000 rpm, 20 min, Bremse aus) wurde der sogenannte „*Buffy-Coat*“ abgenommen, vereinigt und wie in 2.2.3 beschrieben weiter bearbeitet. Das Vollblut sowie die *Buffy Coats* wurden freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Wernet vom HLA-Labor des Zentrums für klinische Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Tübingen bereitgestellt.

2.2.5 Magnetunterstützte Zellseparation von T-Zellen (MACS)

Die magnetisch aktivierte Zellsortierung (engl. *magnetic activated cell sorting*, MACS) ist eine zellbiologische Methode zur effektiven Trennung verschiedener Zellpopulationen, bei der sich die Oberflächenexpression bestimmter Antigene zunutze gemacht wird (z.B. Rezeptoren, CD8). Sie basiert auf dem Prinzip, dass Antikörper, die spezifisch für ein bestimmtes Oberflächenmerkmal der gewünschten Zellpopulation sind, sich direkt oder indirekt an magnetische Metallpartikel (engl. *Microbead*) koppeln lassen. Zellen, die aufgrund ihrer Oberflächenexpression diese Antikörper binden, lassen sich in einem magnetischen Feld von allen Zellen abtrennen, die keine Antikörper auf ihrer Oberfläche gebunden haben. Hierfür wird die Zellsuspension auf eine spezielle Säule (engl. *MACS Column*) pipettiert, die in einem starken Magneten (engl. *MACS Separator*) fixiert wurde. Je nachdem ob alle unerwünschten Zellpopulationen oder nur die gesuchte Zellpopulation durch die Antikörper in der Säule zurückgehalten wurden, wird zwischen negativer und positiver Selektion unterschieden.

Sofern nicht anders beschrieben wurden alle experimentellen Vorgänge im Einklang mit dem vom Hersteller gelieferten Protokoll durchgeführt. Es wurde darauf geachtet, dass alle Vorgänge auf Eis bzw. bei 4°C und alle Wasch- und Spülvorgänge mit MACS-Puffer durchgeführt wurden. Für die Anreicherung der CD8⁺ T-Zellen aus peri-

pereren Blut-Lymphozyten (PBL) wurde ausschließlich die positive Selektion genutzt, bei der mittels eines CD8-spezifischen *Microbead*-gekoppelten Antikörpers die CD8⁺ T-Zellen im Magnetfeld zurückgehalten werden. Im ersten Schritt wurden die peripheren Blut-Lymphozyten geerntet, gezählt und bei 2 000 rpm für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in MACS-Puffer resuspendiert, so dass die Konzentration ca. 10⁷ Zellen in 80 µl Puffer betrug. Im nächsten Schritt wurden zu den Zellen die CD8-*MicroBeads* pipettiert, wobei 20 µl *MicroBeads* pro 10⁷ Zellen eingesetzt wurden. Nach einem 15-minütigen Inkubationsschritt bei 4°C im Kühlschrank wurden die Zellen durch Zugabe von 1 - 2 ml MACS-Puffer pro 10⁷ Zellen gewaschen und abermals bei 2 000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Die so erhaltenen Zellen wurden wiederum in 500 µl MACS-Puffer gelöst, so dass die maximale Konzentration 10⁸ Zellen in 500 µl betrug. Im nächsten Schritt wurden die Säulen durch das Spülen mit 3 ml MACS-Puffer für die Auftrennung der Zellen equilibriert. Es wurden ausschließlich LS-Säulen mit einem Fassungsvermögen von maximal 2*10⁹ Zellen pro Säule für die Isolation der CD8⁺ T-Zellen verwendet. Als nächstes wurden alle nicht-CD8⁺ T-Zellen, die keine CD8-spezifischen Antikörper auf ihrer Zelloberfläche gebunden haben, durch dreimaliges Waschen mit 3 ml MACS-Puffer von der Säule eluiert und verworfen. Durch das Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld und durch die Zugabe von 5 ml MACS-Puffer wurden die verbleibenden CD8⁺ T-Zellen von der Säule eluiert. Die auf diese Weise aufgereinigten Zellen wurden gewaschen und mit einer Konzentration von 10⁷ Zellen/ml in warmes T-Zellmedium aufgenommen, bevor sie in eine 96-*well*-Platte überführt wurden. Die Konzentration wurde dabei so eingestellt, dass pro *well* 100 µl Zellsuspension vorlagen.

2.2.6 Künstliche antigenpräsentierende Zellen (aAPC)

Künstliche antigenpräsentierende Zellen (engl. *artificial antigen presenting cells*, aAPC) sind ein starkes Werkzeug für die *in vitro*-Stimulation naiver T-Zellen (engl. *priming*)¹⁵⁴. Es handelt sich um ein künstliches System der Antigenpräsentation, das vor allem für zytotoxische T-Zellen eingesetzt wird. Das Konzept der artifiziellen antigenpräsentierenden Zellen resultiert aus Beobachtungen, dass T-Zellen unabhängig vom Antigen auch mittels Antikörpern gerichtet gegen CD3 (TCR-Signal) und CD28 (Kostimulus) zur Proliferation angeregt werden können¹⁵⁵. Allerdings ist die erfolgreiche Stimulation davon abhängig, dass die Antikörper entweder über einen Fc-Rezeptor gebunden und stabilisiert werden, oder die Antikörper selbst auf einer Oberfläche immobilisiert werden¹⁵⁵. Durch die Beladung synthetischer Polystyrolkugeln mit MHC-Monomeren und kostimulatorischen Antikörpern kann das System der natürlichen Antigenpräsentation umgangen werden. Da im Normalfall die für das *in vitro priming* genutzten dendriti-

schen Zellen aus autologen Monozyten des zu testenden Spenders generiert und mit entsprechendem Antigen beladen werden müssen, erlaubt der Einsatz artifizieller antigenpräsentierender Zellen eine raschere und kostengünstigere Methode der Stimulation von T-Zellen. Die in dieser Arbeit verwendeten 5,6 µm großen synthetischen Polystyrolkugeln tragen Streptavidinmoleküle auf ihrer Oberfläche, die ihrerseits die biotinylierten MHC-Monomere sowie die biotinylierten kostimulatorischen Antikörper binden¹⁵⁶.

2.2.7 Biotinylierung des anti-CD28-Antikörpers

Mit Hilfe des Reagenz Sulfo-N-hydroxysuccinimidobiotin wurden die freien Aminogruppen des anti-CD28-Antikörpers biotinyliert, wobei ein Verhältnis von 1:20 zwischen Antikörper und Biotin gewählt wurde¹⁵⁷. Im ersten Schritt wurde die Konzentration der Biotin-Stammlösung und die Antikörperlösung auf 1 mg/ml eingestellt, wobei die Biotin-Stammlösung mit Dimethylformamid (DMF) und die Antikörperkonzentration mit 0,5 M Carbonatpuffer bei einem pH-Wert von 9,5 eingestellt wurde. Nachdem beide Reagenzien im korrekten Verhältnis miteinander vermengt wurden, folgt ein 4 stündiger Inkubationsschritt bei 4°C im Rotator. Im Anschluss wurden die so biotinylierten Antikörper mittels der schnellen Flüssigchromatographie (engl. *fast protein liquid chromatography*) aufgereinigt.

2.2.8 aAPC-Synthese

Sofern nicht anders erwähnt, wurde für alle Waschschritte sowie Stammlösungen der MACS-Puffer verwendet. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C und 2 500 rpm für 2 Minuten durchgeführt. Sowohl die Herstellung als auch die Lagerung der aAPCs erfolgte in 96-*well*-Platten.

Die Konzentration des biotinylierten Antikörpers wurde auf 60 µg/ml eingestellt, was einer Endkonzentration pro *well* von 20 pmol entspricht. Abhängig von der Monomerkonzentration wurde zwischen Monomeren mit hoher Dichte (engl. *high density*, HD) und Monomeren mit niedriger Dichte (engl. *low density*, LD) unterschieden. Eine hohe Monomerdichte entspricht einer Konzentration von 5 µg/ml (ca. 5 pmol/*well*), wohingegen die Konzentration bei niedriger Monomerdichte 0,05 µg/ml entspricht (ca. 50 fmol/*well*). Die Konzentration der Polystyrolkugeln (engl. *beads*) wurde so gewählt, dass der Ansatz für vier Stimulationen ausreichend war. Die Polystyrolkugeln wurden in einer Konzentration von 106 *beads/well* eingesetzt, zweimal mit 10 ml Puffer gewaschen und wieder in 110 µl/*well* aufgenommen. Es wurde bei der Zusammenführung

der Reagenzien darauf geachtet, dass zuerst die 50 µl der Monomer-Lösung (HD oder LD) in einer 96-*well*-Platte vorgelegt wurden, bevor 50 µl der biotinylierten Antikörper und 100 µl der *bead*-Suspension zusammen gegeben wurden. Nach 30 minütiger Inkubation auf dem Flachsüttler bei 500 rpm wurden die generierten aAPCs vier Mal gewaschen und in 200 µl Puffer aufgenommen. Bis zum weiteren Gebrauch wurden die aAPCs mit Alufolie umschlossen und bei 4°C bis zu 2 Monaten gelagert ¹⁵⁸.

2.2.9 *In vitro*-Stimulation naiver CD8⁺ T-Zellen mittels aAPCs

Sofern nicht anders erwähnt, wurden die Zellen aller Stimulationen bei 37°C und 7,5% CO₂ inkubiert, wobei das Gesamtvolumen in einem *well* während der gesamten Stimulation 200 µl entsprach.

Zunächst wurden zu den MACS-sortierten CD8⁺ T-Zellen in warmem T-Zellmedium die vorbereiteten aAPCs pipettiert. Die in 2.2.8 generierten aAPCs wurden zweimal in T-Zellmedium gewaschen und anschließend mit einer Konzentration von 20 000 *beads/well* in 100 µl 37°C warmem T-Zellmedium aufgenommen. Um die Proliferation und die Zytokinproduktion der isolierten T-Zellen bei der *in vitro*-Stimulation zusätzlich zu unterstützen, wurde Interleukin 12 (IL-12) in einer Konzentration von 10 ng/ml (5 ng/*well*) dem T-Zellmedium zugefügt ¹⁵⁹. Die Stimulation der CD8⁺ T-Zellen wurde an den Tagen 8 und 15 wiederholt. An den Tagen 4, 11 und 18 wurden die Zellen durch die Gabe von 80 ng/ml Interleukin 2 (IL-2; 4 ng/ml pro *well*) gefüttert. Durch die Gabe von Interleukin 2 wurde die Proliferation der Zellen weiter verstärkt ¹⁶⁰. Bei der Fütterung wurden 100 µl Medium pro *well* abgenommen, bevor erneut 100 µl frisches, mit IL-2 versetztes T-Zellmedium hinzugefügt wurde. Am Tag 25 erfolgte die Analyse der antigenspezifischen Zellen mittels Tetramerfärbung und Durchflusszytometrie. Eine Übersicht über den Zeitverlauf der *in vitro*-Stimulation mit aAPCs ist in Abbildung 11 gezeigt.

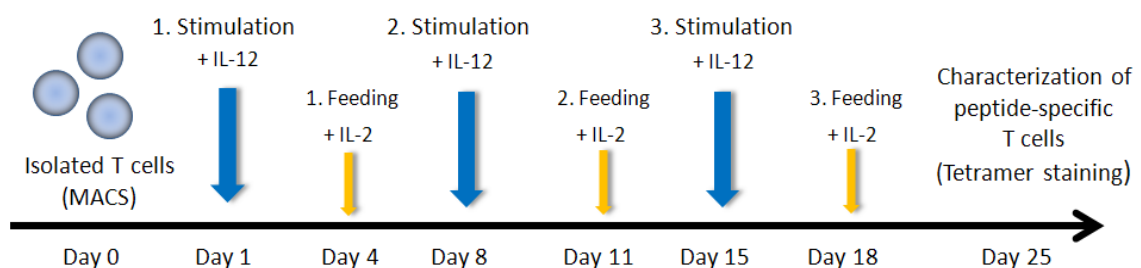


Abbildung 11: Zeitverlauf der *in vitro*-Stimulation mit aAPCs

Abbildung modifiziert nach Lea Prokop, Janet Peper und Stefanie Souczek (laborinternes Protokoll).

2.2.10 Tetramerisierung von MHC-Monomeren

Im Unterschied zu MHC-Monomeren binden MHC-Tetramere mehrere T-Zell Rezeptoren (TCR) auf den T-Zellen, was zu einer besseren immunologischen Färbung führt. Zusätzlich besitzen Tetramere eine langsamere Dissoziationsrate, was die Färbung mit nachfolgender Analyse im Durchflusszytometer weiter verbessert ¹⁶¹. Ähnlich der in 2.2.8 beschriebenen Synthese der aAPCs wurde für die Tetramerisierung der MHC-Monomere ebenfalls die Wechselwirkung zwischen Biotin und Streptavidin genutzt ¹⁶¹. Hierbei wurden die MHC-I:Peptid-Komplexe über Biotin an Streptavidin-Moleküle gekoppelt, so dass maximal vier MHC-I:Peptid-Komplexe pro *bead* (Tetramer) gebunden wurden. Die Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an das Streptavidin ermöglicht die spätere Detektion im Durchflusszytometer. Alle verwendeten Monomere wurden von Stefanie Souczek, Lea Prokop, Janet Peper oder dem Verfasser dieser Arbeit hergestellt und biotinyliert. Das Streptavidin-Fluoreszenzfarbstoff-Konjugat wurde in Teilschritten von 8 µg alle 30 Minuten hinzugegeben, sodass insgesamt 80 µg R-Phycoerythrin (PE)-konjugiertes Streptavidin auf 50 µg des aufgetauten biotinylierten Monomers gegeben wurden. Innerhalb der Intervalle wurde der Ansatz im Dunkeln und bei 4°C auf dem Rotator inkubiert. Die fertigen HLA-Tetramere wurden im Dunkeln bei 4°C gelagert und bis zu 4 Wochen aufbewahrt.

2.2.11 Tetramerfärbung von CD8⁺ T-Zellen

Die Wechselwirkung des T-Zellrezeptors mit einem passenden MHC-I-Peptidkomplex zeigt *in vitro* nur eine geringe Stabilität ¹⁶². Aus diesem sowie den in 2.2.10 genannten Gründen wurden für die Detektion peptidspezifischer T-Zellen bzw. deren Rezeptor die HLA-Tetramere hergestellt und für die Färbung der peptidspezifischen T-Zellen verwendet. Alle Vorgänge wurden im Dunkeln bei 4°C oder auf Eis durchgeführt. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Zentrifugationen bei 1 800 rpm und 4°C für 2 min durchgeführt.

Im ersten Schritt wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen, wobei der Überstand durch entschlossenes und ruckartiges Stürzen der 96-*well*-Platte entfernt wurde. Für die Färbung wurden ca. $2 - 5 \times 10^6$ Zellen pro *well* in eine neue 96-*well*-Platte überführt und in 50 µl PBS-E mit dem lebend/tot-Farbstoff (engl. *Aqua live/dead*) für 20 min inkubiert und abermals mit 150 µl PBS-E gewaschen. Die Verdünnung des lebend/tot-Farbstoffs lag zwischen 1:400 und 1:200, wobei eine höhere Konzentration des Farbstoffs nur eingesetzt wurde, falls dieser älter als zwei Wochen war. Als nächstes wurde die Oberflächenfärbung des Antigens CD8 angesetzt, indem der fluoreszenzmarkierte anti-CD8-Antikörper in der entsprechenden Verdünnung zu 50 µl

Tetramerpuffer gegeben wurde. Nach einem Inkubationsschritt von 20 min wurden die Zellen mit 150 µl Tetramerpuffer gewaschen und in 50 µl Tetramermix aufgenommen. Gegebenenfalls wurden mehrere HLA-Tetramere in einer Endkonzentration von 5 µl/ml in 50 µl Tetramerlösung pro *well* angesetzt. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 1 300 rpm wurden jeweils 50 µl der Zellen in eine neue 96-*well*-Platte überführt und erneut mit 150 µl Tetramerpuffer gewaschen. Zur weiteren Bearbeitung wurden die Zellen in Fixierlösung aufgenommen und unter Lichtausschluss bei 4°C bis zur Analyse im Durchflusszytometer gelagert.

2.2.12 Durchflusszytometrische Analyse antigenspezifischer T-Zellen

Für die Detektion Tetramer-positiver CD8⁺ T-Zellen wurde die Methode der Durchflusszytometrie verwendet¹⁶³. Der Begriff Durchflusszytometrie (engl. *flow cytometry*) beschreibt eine analytische Methode der Zellvermessung (Zytometrie), bei der suspendierte Einzelzellen aufgrund der Größe, Granularität oder anhand spezifischer Oberflächenmoleküle charakterisiert werden. Die Zellen werden in hohem Tempo einzeln an einem elektrischen Feld oder einem Laser vorbeigeführt. Aufgrund der unterschiedlich erzeugten Effekte durch die Struktur und Form der einzelnen Zellen lassen sich dadurch Rückschlüsse auf die Eigenschaften der Zellen ableiten. So beinhaltet bereits die Streuung des Laserlichts zwei wichtige Informationen: Der Anteil an Vorwärtsstreu-licht (engl. *forward scatter*, FSC) gibt Informationen über die Größe der jeweiligen Zelle, wohingegen das Seitwärtsstreu-licht (engl. *side scatter*, SSC) Informationen über die Granularität der Zelle enthält. Der SSC wird dabei im rechten Winkel zum FSC gemessen. Durch das Auftragen von FSC gegen SSC lassen sich bereits verschiedene Zellpopulationen, wie Lymphozyten von Granulozyten- oder Monozytenpopulationen abgrenzen. Einen weiteren Parameter der Analyse von Zellen bieten fluoreszenzmarkierte Antikörper, die spezifisch für ein gewünschtes Oberflächenantigen der gesuchten Zellpopulation sind. Eine Übersicht über den Aufbau eines FACS-Gerätes ist in Abbildung 12 gezeigt. Durch die Analyse im FACS-Gerät (engl. *fluorescence activated cell sorting*; FACS) lassen sich Zellen nicht nur aufgrund der gebundenen fluoreszenzmarkierten Antikörper unterscheiden, sondern auch sortieren (engl. *FACS-*, *Flow sorter*). Alle in dieser Arbeit gezeigten Messungen wurden am FACSCanto II gemäß der vom Hersteller gelieferten Bedienungsanleitung durchgeführt. Für die Kompensation der verschiedenen Fluoreszenzkanäle wurden für jedes Fluorophor entsprechende Kompensationsbeads hergestellt und für die Einstellung der jeweiligen Kanäle verwendet. Die Auswertung der Daten sowie die Visualisierung der Ergebnisse erfolgte mit den Programmen FACSDiva und FlowJo 7.6.

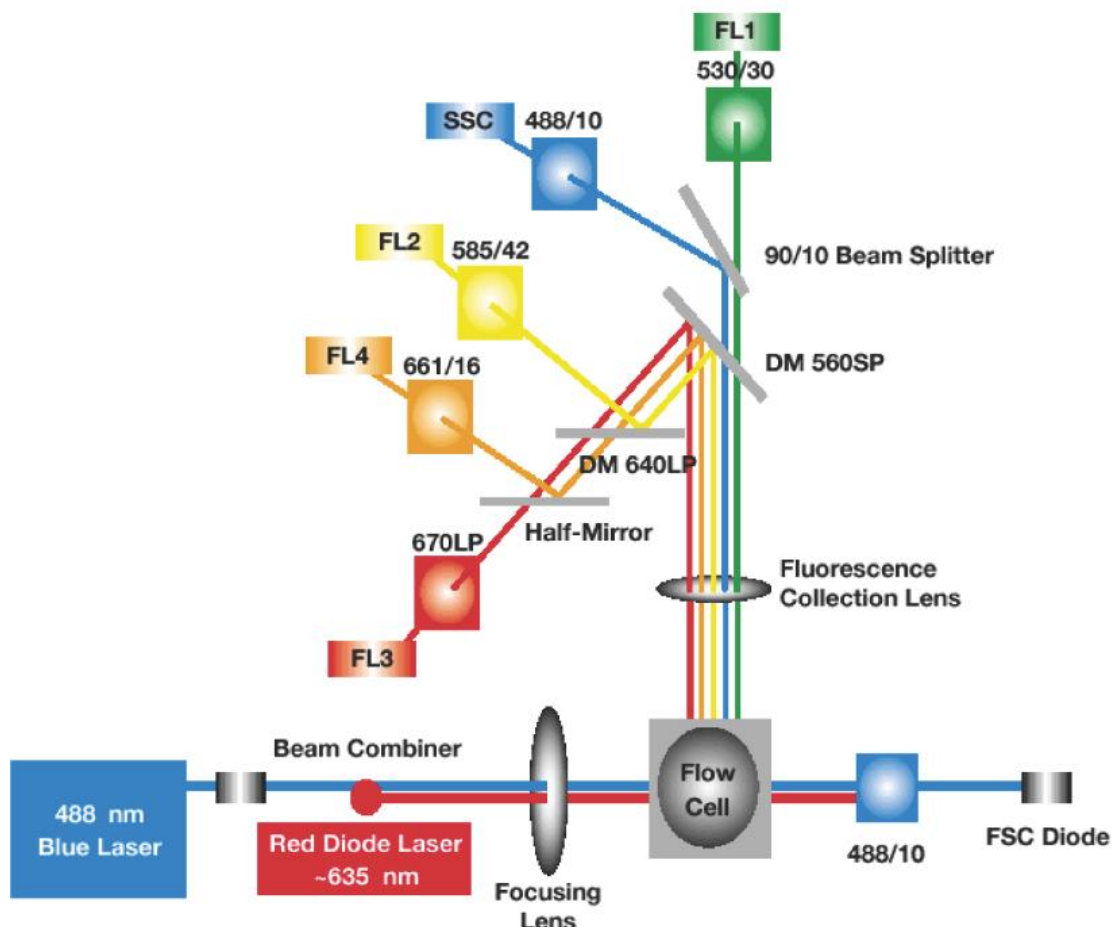


Abbildung 12: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers

Aufbau und Konfiguration eines FACSCalibur Durchflusszytometers. Abbildung entnommen aus ¹⁶⁴.

2.2.13 Aufreinigung von MHC- Liganden aus Zell- oder Gewebeproben mittels Affinitätschromatographie

Für die Isolation HLA-Klasse-I-gebundener Peptide wurden die Zellen und Gewebeproben unter der Zugabe von Detergenz homogenisiert, so dass die membranständigen MHC:Peptid-Komplexe in Lösung gebracht wurden. Dem Detergenz wurden zusätzlich Proteaseinhibitor Tabletten beigefügt, um den Abbau der Proteine über zelleigene Proteasen zu vermeiden. Zur gleichen Zeit wurde mit der Kopplung der HLA-Klasse-I-spezifischen Antikörper an die Säulenmatrix begonnen und die Säulen für die Immunaффinitätschromatographie vorbereitet. Das Lysat wurde zyklisch und über Nacht mit Hilfe peristaltischer Pumpen über die Säulen gepumpt, sodass die MHC-Klasse-I:Peptid-Komplexe an den Antikörper gebunden wurden. Am nächsten Tag wurden die Säulen mehrmals gewaschen, bevor die Peptide unter sauren Bedingungen aus der Peptidbindungsfurche eluiert wurden.

2.2.14 Herstellung der Antikörper-gekoppelten CNBr-Sepharose-Säule

Für die Herstellung der Affinitätssäulen wurden Sepharosebatches verwendet. Es wurden je 10 mg Antikörper wie folgt an 400 mg CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelt (entspricht 1 mg Antikörper pro 40 mg Sepharose), wobei pro Experiment nur ein Bruchteil der Affinitätsmatrix verwendet wurde.

Die CNBr-aktivierte Sepharose wurde unter Zugabe von 15 ml 1 mM HCl in einem 15-ml-Falcon-Röhrchen unter langsamer Rotation bei Raumtemperatur aktiviert. Nach Zentrifugation bei 300 rpm und angeschaltener Bremse bei Raumtemperatur wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und 10 mg des gelösten Antikörpers auf das nasse Gelbett pipettiert. Nach Zugabe von 15 ml Kopplungspuffer wurde der Ansatz für 2 h bei Raumtemperatur im Rotator inkubiert und im Anschluss die Kopplungseffizienz bestimmt. Für die Bestimmung der Kopplungseffizienz wurde die Absorptionsrate des Sepharoseüberstandes zu Beginn und Ende der 2 stündigen Inkubationszeit bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt und miteinander verglichen. Die angestrebte Kopplungseffizienz von 90% wurde dann erreicht, wenn zum Ende der Inkubationszeit nur noch ca. 10% der Antikörper ungebunden im Überstand vorlagen. Falls die Kopplungseffizienz unter 90% lag, wurde die Inkubationszeit verlängert, bis die gewünschte Effizienz erreicht wurde. Nach erneuter Zentrifugation bei Raumtemperatur bei 300 rpm und angeschalteter Bremse wurde der Überstand abgesaugt und die Sepharose mit 15 ml 0,2 M Glycinlösung im Rotator bei Raumtemperatur für 60 min inkubiert, um so die noch freien Bindungsstellen der Sepharose zu blockieren. Nach zweimaligem Waschen mit 15 ml PBS wurde die Sepharose in NaN_3 /PBS gelöst und in Aliquots von je 40 mg pipettiert. Für die MHC-Präzipitation wurden pro Gramm Gewebe 40 mg Sepharose in die entsprechenden Säulen überführt und für 30 min mit PBS gewaschen, bevor das Lysat auf die Säulen gegeben und der zyklische Kreislauf über Nacht geschlossen wurde.

2.2.15 Homogenisierung von Gewebe oder Zelllinien

Die Homogenisierung aller Gewebe und Zelllinien wurde bei 4°C im Kühlraum oder auf Eis durchgeführt. Für die Homogenisierung der Prostataprobe wurde ein mehrstufiges Probenaufschlussverfahren angewendet, da die erhaltenen Prostatagewebe einen hohen Anteil an Bindegewebe aufwiesen. So wurden die soliden Gewebeprobe nach der Bestimmung ihrer Masse in eine Petrischale gegeben, mit dem gleichen Volumen kaltem Lysepuffer übergossen und mithilfe eines Skalpell in möglichst kleine Stücke zerschnitten. Die zerkleinerten Gewebe wurden mittels eines Potter-Homogenisators auf Eis homogenisiert, mit dem gleichen Volumen an Lysepuffer versetzt und für 1 h im

Magnetrührer gerührt. Um die gelösten Membranproteine weiter zu vereinzeln, wurde das Lysat mit Ultraschall (3 x 20 s) auf Eis behandelt und anschließend für eine weitere Stunde gerührt. Da eine mechanische Homogenisierung bei der Analyse von Zelllinien nicht notwendig war, erfolgte der Aufschluss von Zelllinien ausschließlich im Magnetrührer und durch Ultraschallbehandlung unter Zugabe des Lysepuffers. Alle verwendeten Gefäße wurden mit Lysepuffer nachgespült, um mögliche Verluste durch oberflächliche Adsorption so gering wie möglich zu halten. Durch Zentrifugation des Lysats bei 4 000 rpm für 20 min bei 4°C wurden die größten Zelltrümmer abgetrennt. Der Überstand wurde in 2 ml-Eppendorfgefäße überführt und für 99 min bei 13 000 rpm in einer Tischzentrifuge bei 4°C zentrifugiert, um noch verbleibende Partikel zu entfernen. Im letzten Schritt wurde der Überstand in eine Spritze aufgenommen und durch einen 0,2 µm Sterilfilter gedrückt, um noch verbleibende störende Partikel für die Affinitätschromatographie zu entfernen.

2.2.16 HLA-Affinitätschromatographie

Das fertige Lysat wurde über Nacht bei einer Flussrate von 1 - 2 ml/min zyklisch über die Affinitätssäulen geleitet, wodurch die MHC:Peptid-Komplexe durch die in der Säule enthaltenen Antikörpern gebunden wurden. Das steril filtrierte Lysat wurde hierzu in einen Glasbecher gegeben und auf die Säule gepumpt, aus der es wiederum in den Glasbecher zurückfloss. Am nächsten Morgen wurde die zyklische Affinitätschromatographie linearisiert, das Lysat in 15 ml-*Falcon*-Röhrchen aufgefangen und für eventuelle spätere Analyse Zwecke bei -80°C eingefroren. Anschließend wurden die Affinitätssäulen jeweils 1 h mit PBS, dann mit mQ-H₂O bei einer Flussrate von 2 - 3 ml/min gewaschen. Für die Elution der MHC:Peptid-Komplexe wurde die Affinitätssäule zunächst trocken laufen gelassen, bevor in 8 Schritten durch die Zugabe von jeweils ca. 60 µl 0,2% TFA (w/v in Milli-Q-H₂O) die MHC:Peptid-Komplexe von der Säule eluiert wurden. Durch Ultrafiltration in einem mit 0,2% TFA (w/v in Milli-Q-H₂O) vorgewaschenen Zentrikon-Ultrafiltrationseinheit (Amicon) mit einer Molekülausschlussgröße von 10 kDa wurden schließlich die Peptide von den MHC-Molekülen getrennt, wobei die im Filter enthaltenen MHC-Proteine für spätere Analyse Zwecke bei -80°C eingefroren wurden. Der Durchfluss wurde zur Volumenreduktion lyophilisiert und bis zur massenspektrometrischen Analyse ebenfalls bei -80°C gelagert.

2.2.17 Enzymatischer Verdau von MHC-Molekülen aus Gewebeproben

Alle Verdau von Proteinen wurden von Lea Prokop unter Verwendung des proteolytischen Enzymes Trypsin durchgeführt. Bei Trypsin handelt es sich um eine Serinpro-

tease, die im Verdauungstrakt vieler Säuger vorkommt. Trypsin ist eine Endopeptidase, deren Aufgabe es ist, die im Dünndarm (lat. *Doudenum*) vorkommenden Proteine durch Hydrolyse der Peptidbindungen weiter zu zerkleinern¹⁶⁵. Die proteolytisch bevorzugten Schnittstellen von Trypsin liegen C-terminal nach Lysin und Arginin, vorausgesetzt die darauffolgende Aminosäure ist kein Prolin¹⁶⁶. Um einen vollständigen Abbau der MHC-Proteine durch Trypsin zu garantieren, wurden die Cysteinreste reduziert und die freien Schwefelwasserstoffgruppen alkyliert. Um zu gewährleisten, dass die Menge an eingesetztem Protein für jeden Verdauungsansatz vergleichbar war, wurde die theoretische Anzahl der MHC-Klasse-I-Moleküle für jedes Prostatagewebe anhand des Gewichtes errechnet. Die Konzentration der MHC-Proteine wurde dabei so gewählt, dass ca. 10 pmol MHC-Proteine in 10 µl Ammoniumcarbonatpuffer (NH₄HCO₃-Puffer) gelöst vorliegen. Im ersten Schritt wurden die Cysteinreste der MHC-Proteine für 15 min bei 56°C mit 2,5 µl Dithiotreitol (DTT) reduziert und anschließend mit 2,5 µl Iodacetamid alkyliert. Nach einer 15 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden der Probe weitere 20 µl Ammoniumcarbonatpuffer und 0,5 µg Trypsin hinzugegeben. Da es sich aber bei den im Filter zurückgehaltenen Proteinen nicht ausschließlich um MHC-Proteine handelt, wurde, wie vom Hersteller empfohlen, eine höhere Konzentration von Trypsin verwendet. Der fertige Verdauungsansatz wurde über Nacht bei 36°C im Wasserbad inkubiert, bevor am nächsten Tag das Trypsin durch die Gabe von 50 µl 1% Ameisensäure (engl. *formic acid*, FA (CH₂O₂)) inaktiviert wurde. Durch Vakuumzentrifugation wurde die Probe auf ca. 20 µl eingeeengt, bevor sie über eine C₁₈-Matrix, welche sich in einer 10 µl Pipettenspitze befindet (ZipTip_{C18}), gebunden wurde. Dabei wurde die Probe durch wiederholtes Auf- und Abziehen an die C₁₈-Matrix des ZipTip gebunden und durch abermaliges Auf- und Abziehen in 1% Ameisensäure entsalzen. Die Probe wurde im Anschluss in 50 µl 50% Acetonitril mit 1% Ameisensäure eluiert und in der Vakuumzentrifuge fast bis zur Trockenheit eingeeengt. Im letzten Schritt wurde die Probe in 24 µl Lösungsmittel A aufgenommen und bis zur weiteren Analyse im Massenspektrometer bei -20°C eingefroren.

2.3 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist eine analytische Methode zur Bestimmung des Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z -Wert) geladener Teilchen, die sich in der Gasphase befinden. Die hierfür benötigten elektrisch geladenen Moleküle (Ionen) werden in einer Ionenquelle generiert, bevor sie in einem Masseanalysator nach ihrem m/z -Wert aufgetrennt werden. Im letzten Schritt werden die Ionen nach ihrem m/z -Wert qualitativ und quantitativ nach ihrer relativen Menge aufgezeichnet. Es existieren verschiedene Typen von

Massenspektrometern, die aufgrund der verwendeten Analysetechnik unterschieden werden können. Zu den wichtigsten Typen gehören die Quadrupol-, *time of flight*- (TOF), Sektorfeld- und Ionenfalleninstrumente. Die Erzeugung der Ionen kann dabei auf unterschiedliche Arten erfolgen. Zu betonen ist die enorme Empfindlichkeit der Massenspektrometrie, besonders hinsichtlich der Kopplung mit der HPLC-Analytik, die sich bei der Peptidanalytik bis in den Subfemtombereich erstreckt, was die Analyse von geringen Probengrößen ebenfalls erleichtert. Die Analytik von Biomolekülen wie Peptiden oder Proteinen ist dabei auf eine besonders schonende Methode der Ionisation angewiesen ist, damit die Biomoleküle nicht während der Ionisation zerstört werden. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit ausschließlich die Elektrosprayionisation (engl. *electrospray ionization*, ESI) für die Ionisation der Peptide verwendet.

Die Qualität eines Massenspektrometers lässt sich über drei Parameter definieren; die Auflösung, die Massengenauigkeit und die Messspanne:

Die Auflösung (engl. *resolution*, ΔM oder R) eines Massenspektrometers gibt Auskunft darüber, wie groß ein minimaler Massenunterschied zwischen zwei Ionen sein darf, um diese noch getrennt voneinander detektieren zu können. Das Auflösungsvermögen wird dabei in Thomson [Th] angegeben und ist definiert als $Th = u/e$, wobei u die atomare Masseneinheit und e die elementare Ladungseinheit darstellen. Im Normalfall wird jedoch nur die IUPAC-Definition des Auflösungsvermögens R angegeben, die sich aus dem Quotienten der Masse des selektierten monoisotopischen Peaks (m) im unteren Massenbereich und dem Massenunterschied (Δm) der nächsten noch detektierbaren Masse zusammensetzt. Das Auflösungsvermögen berechnet sich nach $R = m/\Delta m$, allerdings kann Δm auf zwei verschiedene Arten definiert werden, über die 10% bzw. 50% Talauflösung oder über die Halbwertsbreitenmethode (engl. *full width at half maximum*, FWHM). Die Talauflösung definiert Δm als den geringsten Abstand zweier *peaks* mit gleicher Intensität zueinander mit einem Tal (geringster Wert des Signal-*peaks*) auf 10% bzw. 50% der *Peakhöhe*. Bei der 10%-Methode wird Δm als die Massenabweichung definiert, bei der die Intensität eines *peaks* auf 10% des Maximums absinkt, wohingegen bei der 50%-Methode die Intensität eines *peaks* auf 50% des Maximums absinkt. Im Unterschied dazu berechnet sich Δm bei der Halbwertsbreitenmethode durch die volle *Peakbreite* bei 50% der *Peakhöhe*. In den meisten Fällen wird für das Auflösungsvermögen eines Massenspektrometers vom Hersteller nach der Halbwertsbreitenmethode angegeben, wobei der Wert bei einem festgelegtem m/z -Wert ermittelt wird.

Die Massengenauigkeit eines Massenspektrometers gibt an, wie genau die Masse eines Moleküls detektiert werden kann. Die Massengenauigkeit wird in Teilen von einer Million (engl. *parts per million*, ppm) angegeben. Der Ausdruck beschreibt kleine Werte diverser dimensionsloser Mengen ähnlich der Prozentangabe (dem hundersten Teil, 10^{-2}), steht dabei aber für die Zahl 10^{-6} . Die Massengenauigkeit moderner Massenspektrometer, wie beispielsweise des LTQ-Orbitrap XL, liegt unter einem ppm. Dies bedeutet, dass bei einer Genauigkeit von 1 ppm ein Molekül mit einer Masse von 1 000 Da auf 0,001 Da genau gemessen werden kann. Insbesondere bei der Analyse von Peptiden ist eine genaue Bestimmung der Masse des Vorläuferions von großem Vorteil, da sich dadurch bei der anschließenden computergestützten Annotation der Fragmentspektren die Auswahl möglicher korrespondierender Peptidsequenzen minimieren lässt. Jedoch reicht die genau bestimmte Masse des Vorläuferions nicht für eine zweifelsfreie Identifikation von Peptiden. Aus diesem Grund wird die Methode der Tandemmassenspektrometrie (MS/MS, MS^n) angewandt, welche neben der Bestimmung der Vorläufermasse auch eine selektive Fragmentierung des Vorläuferions zulässt¹⁶⁷. Die gängigste Methode der Fragmentierung beruht auf der Kollision von Analytionen mit einem Inertgas (engl. *collision induced dissociation*, CID), woraufhin diese fragmentiert werden¹⁶⁸.

Die Massenspanne (engl. *mass range*) beschreibt den analysierbaren Massenbereich (m/z-Werte) des verwendeten Analysators. Sie definiert den Bereich der m/z-Werte, bei denen nah beieinanderliegende *peaks* noch voneinander unterschieden werden können. Der Bereich, in dem die Intensität des Ionensignals sich linear zur Konzentration des Analyts verhält, wird als die lineare dynamische Massenspanne bezeichnet. Das in dieser Arbeit verwendete Massenspektrometer LTQ Orbitrap XL besitzt ein relativ hohes Auflösungsvermögen von $R = 60\,000$ im Bereich 400 - 650 m/z (Injektionszeit max. 500 ms; Übersichtsscan), eine für die Peptidanalytik erstrebenswerte Massenspanne von 50 - 2000 m/z, eine Massengenauigkeit von unter 1 ppm bei interner Kalibrierung (engl. *internal calibration*) und eine Sensitivität bis in den Subfemtomol-Bereich¹⁶⁹.

2.3.1 Elektrosprayionisation (ESI)

Die Elektrosprayionisation (engl. *electrospray ionisation*, ESI) bietet eine schonende Methode der Ionisation nicht-flüchtiger biologischer Moleküle wie Peptide oder Proteine. Sie wurde durch die frühen Arbeiten von John B. Fenn und Masamichi Yamashita im Jahre 1984 etabliert¹⁷⁰, was zur Verleihung des Nobelpreis in Chemie im Jahre 2002 führte. Typischerweise werden beim ESI-Verfahren so genannte Quasimolekülonen erzeugt, die entweder positiv durch die Anlagerung von Wasserstoffkationen

$[M + H]^+$ oder negativ durch das Entfernen eines Wasserstoffkerns $[M - H]^-$ geladen sind.

Für die Ionisation durch die ESI-Methode wurden die zu analysierenden Moleküle in einem sauren Lösungsmittel gelöst und dadurch positiv geladen. Die Probenlösung wurde anschließend über eine Kapillare von der Trennsäule der HPLC zur ESI-Quelle des Massenspektrometers geleitet. Der Übergang der Probenlösung von der Flüssigkeit in die Gasphase findet am Übergang der ESI-Quelle zum Massenspektrometer statt. Die Analytlösung wird dabei durch eine Metallkapillare (PicoTip) geleitet, an deren Spitze ein elektrisches Spannungspotential im kV-Bereich angelegt ist. Durch die angelegte Spannung kommt es zur Bildung eines elektrischen Feldes zwischen der Kapillare und der *Interface*-Platte am Eingang zum Massenspektrometer, woraufhin sich die Ionen elektrophoretisch in Richtung der *Interface*-Platte bewegen. Die Ionen sammeln sich dabei an der Spitze der Kapillare, wodurch ein Überschuss gleichartig geladener Ionen, welche sich gegenseitig abstoßen, entsteht. Über die Bildung des sogenannten Taylor-Kegels (engl. *Taylor-cone*) kommt es zur Bildung eines monodispersen Aerosols (gastragende Tropfen mit schmaler Größenverteilung) oder auch Ionen, die als feines Spray die Kapillare verlassen^{170,171}. Die Bildung des Sprays wird dabei häufig durch ein neutrales Trägergas wie beispielsweise Stickstoff unterstützt. Durch einen coaxial zur Kapillare verlaufenden Stickstofffluss (engl. *nebulizer gas*) wird die Zerkleinerung der Tröpfchen zusätzlich unterstützt. Gleichzeitig minimiert ein senkrecht zur Austrittsöffnung gerichteter Strom erhitzten Stickstoffs (engl. *curtain gas*) den Eintritt neutral geladener Teilchen in das Massenspektrometer. Durch die relativ hohen Temperaturen im Quellbereich verdampft das Lösungsmittel der Tröpfchen immer weiter, wodurch sich die Ladungsdichte an der Oberfläche der Tröpfchen erhöht. Sobald innerhalb eines Tröpfchens die Abstoßungsenergie der geladenen Teilchen einen bestimmten Schwellenwert, das Rayleigh-Limit, überschreitet, wird die Tröpfchengröße durch sogenannte Coulomb-Explosionen weiter minimiert¹⁷². Der genaue Prozess des Übergangs der Ionen in die Gasphase ist bis heute noch nicht vollständig geklärt, wobei generell zwischen zwei Modelltheorien unterschieden wird. Eine graphische Darstellung der Modelle der Ionisation ist in Abbildung 13 gegeben.

Charakteristisch für das ESI-Verfahren ist unter anderem die Bildung von sogenannten Adduktionen, z.B. $[M + Na]^+$, mit Bestandteilen des Laufmittels (Eluent), des Puffers oder der Probenmatrix. Ein weiteres Merkmal des ESI-Verfahrens ist die Bildung von mehrfach geladenen Ionen $[M + nH^+]^{n+}$. Dies führt im Übersichtsspektrum zur Bildung von charakteristischen Ionensignalen mit $m/z = (M + nH^+) / n$, wobei sich die Ionen nur in der Anzahl der angelagerten Protonen n und somit in ihrem Ladungszustand unter-

scheiden. Anhand der Abstände der Isotopensignale einer definierten Masse lässt sich somit der Ladungszustand bestimmen. Im Unterschied zu der Ionenanalyse im Hochvakuum findet die Ionisation durch das ESI-Verfahren unter Atmosphärendruck statt.

Beim Modell des geladenen Rückstandes (engl. *charge residue model*, CRM) wird davon ausgegangen, dass letztlich durch das fortlaufende Verdampfen des Lösungsmittels winzige Tropfen von ungefähr 1 nm Durchmesser entstehen, die nur noch ein einziges Ion enthalten. Das Ionenemissionsmodell (engl. *ion evaporation model*, IEM) hingegen sagt aus, dass bereits aus größeren geladenen Tropfen freie Ionen aufgrund der erhöhten Ladungsdichte in die Gasphase emittiert werden.

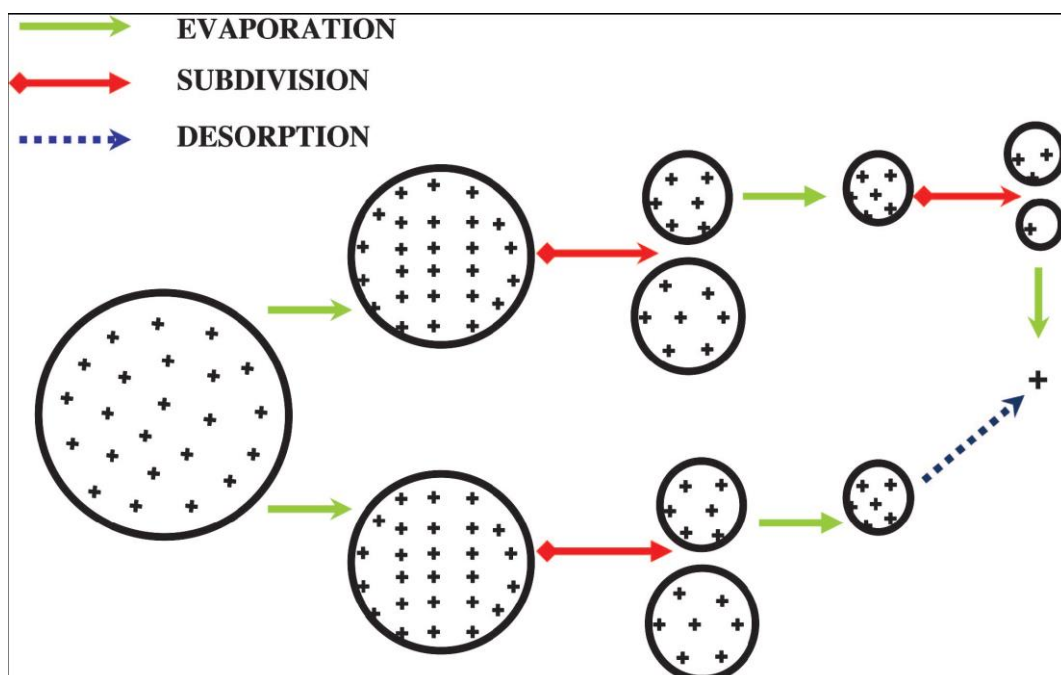


Abbildung 13: Schematische Darstellung beider Modelle der Ionenbildung bei der Elektrosprayionisation

Der obere Pfad beschreibt das Modell des geladenen Rückstandes (CRM), wohingegen der untere Teil die Entstehung der Ionen nach dem Ionenemissionsmodell (IEM) beschreibt. Abbildung entnommen aus ¹⁷³.

2.3.2 Aufbau und Funktionsweise des Massenspektrometers LTQ Orbitrap XL

Für die Massen- und Sequenzanalyse der Peptide wurde ein Massenspektrometer LTQ Orbitrap XL von Thermo Fisher Scientific verwendet. Bei der von Alexander Markov entwickelten Orbitrap handelt es sich um Hybridmassenspektrometer der neuesten Generation ¹⁷⁴. Die LTQ Orbitrap XL ist dabei aus mehreren Hauptbestandteilen aufgebaut: Der ESI-Quelle, einer linearen Ionenfalle, einer *C-Trap*, dem Orbitrapmassenanalysator und einer HCD-Kollisionszelle. Der Vorteil der Hybridmassenspektrome-

ter besteht in der Kombination einer hohen Sensitivität und Scangeschwindigkeit durch die lineare Ionenfalle gekoppelt mit einer hohen Massengenauigkeit und Massenauflösung durch den Orbitrapmassendetektor (s. Abbildung 15). Eine Übersicht über den schematischen Aufbau des Massenspektrometers LTQ Orbitrap XL und seine 5 Hauptkomponenten ist in Abbildung 14 dargestellt.

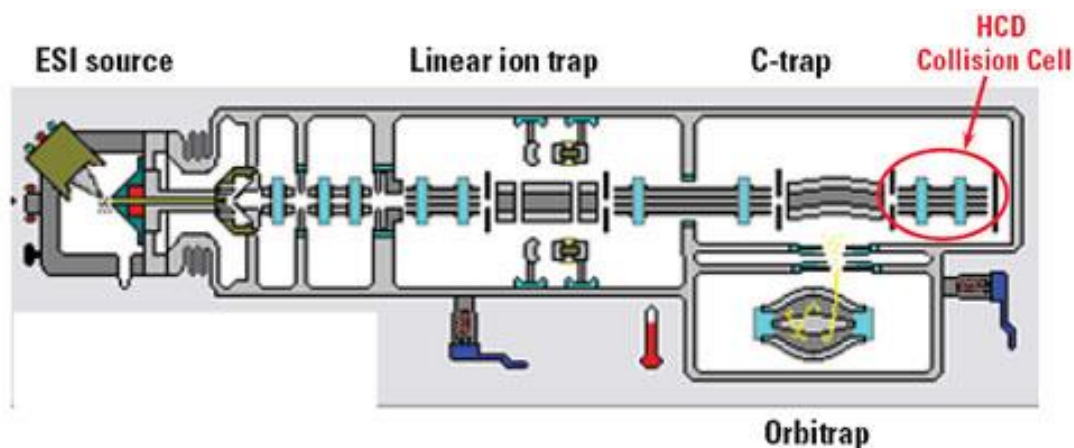


Abbildung 14: Schematischer Aufbau des Massenspektrometers LTQ Orbitrap XL

Die ESI-Ionenquelle (engl. *ESI source*) erzeugt die Ionen und leitet sie über eine lineare Ionenfalle (engl. *linear trap quadrupole*, LTQ) in Ionenpakete verpackt an die *C-Trap* weiter. Die *C-Trap* ist eine gekrümmte lineare Ionenfalle und für den Transfer der Ionenpakete in den Orbitrapmassenanalysator verantwortlich. Im Orbitrapmassenanalysator werden hochauflösende Übersichtsscans durchgeführt. Die HCD-Kollisionszelle (engl. *higher-energy collisional/c-trap dissociation collision cell*, HCD) bietet die Möglichkeiten einer zusätzlichen Methode der Fragmentierung. Abbildung entnommen aus ¹⁷⁵.

Nach der Erzeugung der Ionen durch die ESI-Quelle werden diese über zwei Hochfrequenzquadrupole (engl. *radio-frequency quadrupole*; RFQ), den Führungs-Quadrupol (engl. *guide quadrupole*) und den Transportquadrupol (engl. *transport quadrupole*) in den sogenannten Speicherquadrupol (engl. *storage quadrupole*) geleitet ¹⁷⁶. In den Hochfrequenzquadrupolen ist dabei ein Unterdruck von $p = 10^{-2}$ mbar (*guide quadrupole*) bzw. von $p = 10^{-3}$ mbar (*transport quadrupole*) angelegt.

Das Prinzip der Ionenfalle, Ionen in einem elektrostatischen Feld einzufangen und zu speichern ist bereits seit 1923 bekannt ¹⁷⁷. Die Ionen werden bei diesem Vorgang durch Anlegen einer Gleich- sowie einer überlagernden und hochfrequenten Wechselspannung von ca. 1 MHz innerhalb eines elektrischen Feldes angesammelt ¹⁷⁶. Im ersten Schritt findet durch den Quadrupol eine Fokussierung der Ionen in x-y-Ebene statt, wobei die defokussierende Kraft senkrecht in der z-Ebene ausgerichtet ist. Durch den Phasenwechsel findet die Fokussierung durch die Endkappenelektroden in der z-Ebene statt, während die defokussierende Kraft entlang der x-y-Ebene verläuft. Mittels einer entsprechend schnellen Wechselfrequenz beider Fokussierungsarten lassen sich

die Ionen in allen drei Dimensionen fokussieren und somit speichern¹⁷⁶. Über die Amplitudenerhöhung der angelegten Wechselspannung werden die Ionen unterschiedlicher Masse und Amplitudenhöhe aus der Ionenfalle radial beschleunigt oder alternativ an die *C-Trap* weitergegeben¹⁷⁸. Die Ionen werden also abhängig von ihrer Masse beim Erreichen einer definierten Amplitudenhöhe aus der Ionenfalle geschleudert und über einen Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) in Kombination mit einer vorgeschalteten Konversionsdynode detektiert. Die Isolation von Ionen mit definiertem Masse-zu-Ladungsverhältnis aus der Ionenfalle findet dabei über die Ejektion aller Ionen mit größerem bzw. kleinerem m/z -Wert statt^{176,179}. Durch das Anlegen einer Gleichstromvorspannung an der Ringelektrode am Ende des Speicherquadrupols werden die Ionen im Kollisionsgas derart abgebremst, dass sie an dieser Stelle akkumulieren können.

Von essentieller Bedeutung für die erfolgreiche Analyse MHC-gebundener Peptide ist die Wahl der Breite des isolierten Massenfensters (engl. *isolation width*). Der tatsächliche Anteil des selektierten Vorläuferions vom Gesamtionenstrom wird als Vorläuferionenfraktion (engl. *precursor ion fraction*, PIF) bezeichnet und ist stark abhängig von der Wahl des Massenfensters¹⁸⁰. Bei einem zu breiten Massenfenster werden Peptidspezies ähnlicher Masse, die zur gleichen Zeit von der HPLC eluiert werden, fälschlicherweise zusammen fragmentiert, was eine korrekte datenbankgestützte Sequenzierung erschwert¹⁸¹. Andererseits verringert ein zu klein gewähltes Massenfenster die Transmission der linearen Ionenfalle, was wiederum zu einer geringeren Anzahl an identifizierten Peptiden im Allgemeinen führt¹⁸⁰. Ein weiterer wichtiger Parameter für die Probenanalyse und Fragmentierung im Tandem-MS-Modus (MS/MS, MS²) ist der sogenannte Zielwert der Vorläuferionen (engl. *automatic gain control (AGC) target value*). Der AGC-Algorithmus führt hierzu einen kurzen, niedrigauflösenden Vorläuferionenscan durch, bei dem die Software den Ionenstrom im definierten Massenfenster bestimmt. Anhand des ermittelten Ionenstroms wird die Injektionszeit zum Erreichen des Zielwertes bestimmt, wobei die maximale Injektionszeit unter den Optionen der Scanziteinstellungen (engl. *scan time settings*) vorgegeben wird. Durch die Vorgabe der maximalen Injektionszeit wird sichergestellt, dass die gesammelten Ionen fragmentiert werden, auch wenn ihr AGC *target value* noch nicht erreicht ist. Die maximale Injektionszeit wurde dabei so gewählt, dass der Zielwert der Vorläuferionen in über 80% aller Fragmentierungen erreicht wird¹⁸¹. Eine Verringerung der Injektionszeit erhöht die Durchsatzrate des Systems, verringert aber zusätzlich auch die Sensitivität des Systems. Nach Erreichen einer definierten Menge an Ionen werden diese durch die Öffnung der Linse am Ende des Quadrupols als kleine Ionenpakete in Zeitabständen von 100 - 200 ns an die *C-Trap* weitergeleitet¹⁸². Wie schon erwähnt, handelt es sich bei

der *C-Trap* um eine c-förmige, nicht lineare Ionenfalle, deren Aufgabe es ist, Ionen zwischen den Speicherquadrupolen, dem Orbitrapanalysator und der HCD-Kollisionszelle zu transferieren. Durch das Anlegen einer definierten Spannung an der Deflektorlinse des Orbitrapanalysators werden die Ionen schließlich aus der *C-Trap* über ein Linsensystem in den Orbitrapmassenanalysator geleitet.

Der Orbitrapanalysator ist die zentrale Komponente des Systems LTQ Orbitrap XL und in Abbildung 15 dargestellt.

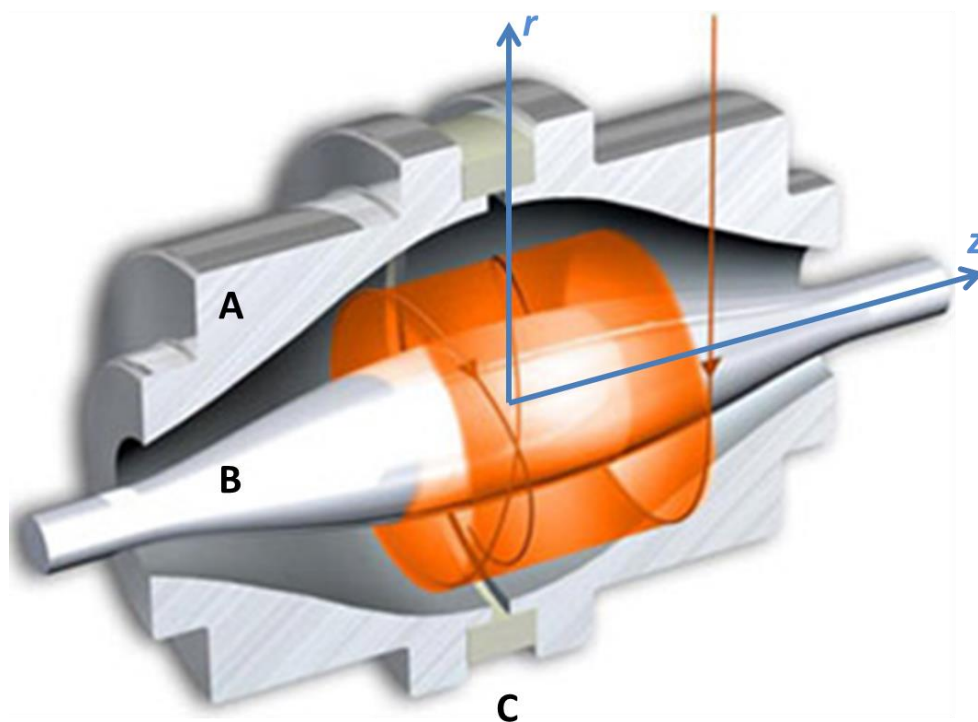


Abbildung 15: Querschnitt und Funktion eines Orbitrap-Massenanalysators

Die Orbitrap ist aus einer äußeren (A) und einer inneren spindelförmigen Elektrode (B) aufgebaut, wobei die äußere Elektrode von der inneren durch einen Keramikring (C) getrennt wird. Die Ionen werden senkrecht zur z-Achse (Pfeil orange) in die Orbitrap injiziert und durch ein elektrostatisches Feld auf einer stabilen Umlaufbahn um die zentrale Elektrode gehalten. Die Injektion an einem Punkt, versetzt zu $z = 0$, gibt den Ionen potentielle Energie in z-Richtung. Ionen unterschiedlicher Massen unterscheiden sich in der Frequenz der Oszillation in der z-Ebene, nicht aber in ihrer Amplitude. Mittels Fourier-Transformation (FT) können überlagernde Oszillationen verschiedener Ionen gleichzeitig analysiert werden. Abbildung modifiziert nach ¹⁸³.

Durch die Erzeugung eines elektrostatischen Feldes zwischen innerer und äußerer Elektrode werden die Ionen von der spindelförmig axialen Elektrode angezogen, wobei die Tangentialgeschwindigkeit der Ionen beim Eintritt in die Orbitrap dieser Anziehung entgegenwirkt ¹⁷⁶. Die Ionen fliegen also mit konstantem Abstand r um die innere Elektrode, wobei sie gleichzeitig in z-Richtung oszillieren. Die Ionen unterschiedlicher Massen unterscheiden sich daher nicht in der Amplitude, sondern nur in der Frequenz der Oszillation entlang der z-Achse. Aufgrund der harmonischen Oszillation der Ionen in

der z-Ebene lässt sich das genaue Masse-zu-Ladungsverhältnis der Ionen nach folgender Formel bestimmen ¹⁷⁴.

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

ω = Winkelgeschwindigkeit

m = Masse

z = Ladung

k = Feldkrümmung

Jedoch ist der Ionenspiegelstrom entlang der inneren Elektrode nur messbar, solange die Ionenpakete ihre räumliche Kohärenz behalten ¹⁷⁶. Durch die Trennung der äußeren Elektrode durch einen Keramikring bei $z = 0$ wird die Detektion des Spiegelstroms erst ermöglicht. Die axiale Bewegung der Ionenpakete induziert dabei den Spiegelstrom, der die Stromstärke in den äußeren Elektrodenhälften unterschiedlich stark verstärkt. Mittels der schnellen Fourier-Transformation (engl. *fast Fourier transform*; FFT) lässt sich über die Frequenz der Oszillation in einem definierten Zeitbereich das aufgenommene Signal in ein Masse-zu-Ladungsspektrum umwandeln ¹⁸⁴.

Für die Analyse HLA-gebundener Peptide mittels der LTQ Orbitrap XL stehen zwei verschiedene Messstrategien zur Verfügung. Bei der so genannten „*high-high*“-Strategie werden die Masse-zu-Ladungsverhältnisse der Vorläuferionen, aber auch die der Fragmentionen mit einer sehr hohen Auflösung und Massengenauigkeit im Orbitrapmassenanalysator gemessen. Die Fragmentierung der Vorläuferionen findet hierbei in der HCD-Zelle statt. Im Gegensatz dazu werden bei der „*high-low*“-Strategie die Fragmentionen in der LTQ erzeugt und mit niedriger Auflösung, jedoch mit höherem Durchsatz gemessen ^{181,185}. Aufgrund der höheren Sensitivität sowie erhöhten Ausbeute bei der Analyse von HLA-gebundenen Peptiden wurde ausschließlich die „*high-low*“-Strategie angewandt. Im ersten Schritt wurden die Vorläuferionen, die zuvor für 500 ms in der *C-Trap* gesammelt wurden, im MS-Modus (MS^1) für 1 s im Orbitrapanalysator gemessen. Anschließend entscheidet die Steuerungssoftware, abhängig von den benutzerdefinierten Kriterien, welche Vorläuferionen für die Fragmentierung mit nachfolgendem MS/MS-Scan (MS^2) ausgewählt werden. Diese Form der Analyse wird auch als datenabhängige Akquisition (engl. *data-dependant acquisition, targeted MS*) bezeichnet. Die Software entscheidet dabei anhand der gewählten Parameter wie der minimalen Signalintensität (engl. *minimal signal threshold*), welche Vorläuferionen im

MS/MS-Modus fragmentiert werden. Niedrige Schwellenwerte sorgen dafür, dass Vorläuferionen mit geringer Intensität dennoch für die MS/MS-Analyse ausgewählt werden, wohingegen hohe Schwellenwerte nur die Fragmentierung von Vorläuferionen mit hoher Intensität zulassen. Die Wahl des Schwellenwerts hat dabei entscheidenden Einfluss auf die Qualität der Fragmentspektren¹⁸¹. So vermindert sich die Qualität der Fragmentspektren mit sinkendem Schwellenwert, jedoch wird die Sensitivität des Systems für niedrig abundante Vorläuferionen erhöht¹⁸⁶. Die gängigste Methode der Proteomik beinhaltet typischerweise die Fragmentierung der 5 bzw. 10 höchsten *peaks* (Top5 bzw. Top10) mit einem Ladungszustand ≥ 2 aus dem Übersichtsscan (MS^1)¹⁷⁸. Im Bezug auf die Analyse HLA-gebundener Peptide wurde ausschließlich die „Top5“ Methode angewandt. Hierzu wurde ein Übersichtsscan von 5×10^5 Ionen mit einer Auflösung von $R = 60\,000$ in einem Bereich von 400 - 650 m/z bei einer Injektionszeit von maximal 500 ms im Orbitrapanalysator durchgeführt. Die Massengenauigkeit lag dabei unter Verwendung der externen Kalibrierung unter 5 ppm^{176,187}.

Mit Hilfe einer internen Kalibrierung über eine definierte Masse (engl. *lock mass*) wurde die Messgenauigkeit nochmals erhöht. Dazu wurden typischerweise Substanzen verwendet, die zu jedem Zeitpunkt detektierbar waren und meist als Kontamination in Lösungsmittel oder der Raumluft vorhanden waren¹⁷⁶.

Das Massenfenster des Übersichtsscans wurde so gewählt, dass vorwiegend Ionen in einem für HLA-Klasse-I-Liganden typischen Massenbereich selektiert wurden und somit die Sequenzierung unerwünschter Artefakte oder zu großer Proteinfragmente unterbunden wurde¹⁸¹. Über den dynamischen Ausschluss (engl. *dynamic exclusion*) wurde sichergestellt, dass bereits einmal fragmentierte Vorläuferionen für einen Zeitraum von 45 s nicht wieder für einen erneuten MS/MS-Scan selektiert wurden. Der Ausschlusszeitraum orientiert sich an der durchschnittlichen *Peakbreite* und soll ein wiederholtes Fragmentieren derselben Peptidsequenz verhindern. Dadurch wurde sichergestellt, dass auch niedrig abundante Vorläuferionen für den MS/MS-Scan selektiert wurden, auch wenn zu diesem Zeitpunkt stärkere Ionensignale den Übersichtsscan dominiert haben. Anschließend wurden die 5 stärksten Ionensignale mit einem Ladungszustand ≥ 2 , einer minimalen Signalintensität von 500 bei einer Massenfensterbreite von 1,3 Th für die Fragmentierung im LTQ selektiert¹⁸¹. Die maximale Injektionszeit betrug 300 ms bei einem AGC-Zielwert von 5 000. Für die interne Kalibrierung wurde das Polysiloxan mit einem $m/z = 445,12003$ verwendet.

2.3.3 Vorbereitung der Proben für die Messung

Bevor die HLA-Liganden massenspektrometrisch analysiert werden können, müssen die Peptide im entsprechenden Lösungsmittel erst in Lösung gebracht werden. Die gefriergetrockneten Proben wurden aus dem Gefrierschrank entnommen und abhängig vom Gesamtvolumen der analysierten Probe in 20 µl bis maximal 100 µl Lösungsmittel A gelöst. Hierzu wurde die entsprechende Menge an Lösungsmittel in das Eppendorfgefäß mit der Probe pipettiert und durch mehrmaliges Vortexen gelöst, wobei die Probe während den Pausen auf Eis gehalten wurde. Anschließend wurde die Probe für 5 min bei 13 000 rpm bei einer Temperatur von 4°C zentrifugiert, bevor 5 - 6 µl des Überstandes in ein Autosamplergefäß transferiert wurden.

2.3.4 *Online*-Kopplung von Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie

Aufgrund der enormen Komplexität der Proben war es nicht möglich, alle in einer Probe vorhandenen Peptide direkt massenspektrometrisch zu analysieren. Es war deshalb notwendig, die Komplexität der Probe zu reduzieren, da das Massenspektrometer pro Zeitintervall nur eine limitierte Menge an Molekülen verarbeiten und fragmentieren kann⁸². Mittels der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) oder der Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. *ultra high performance liquid chromatography*, UHPLC) wurde die Komplexität der Probe reduziert, indem ähnliche Peptidspezies über ihre Adsorption an die Säulenmatrix und über die Zeit aufkonzentriert wurden. Für die Analyse von geringen Probenvolumina wurden miniaturisierte HPLC-Geräte, sogenannte nano-(U)HPLC-Geräte, eingesetzt. Sie besaßen sehr kleine Leer- bzw. Totvolumen, wodurch eine weitere Verdünnung des Analysats vermieden wurde. Zusätzlich ermöglicht der Einsatz von nano-(U)HPLC-Geräten die Analyse mit sehr niedrigen Flussraten von 100-300 nl/min, was wiederum die Analyse niedrig konzentrierter, aber hoch komplexer Proben erleichtert. Durch die Kopplung der µ-Kapillarsäule des (U)HPLC an einen leitfähig beschichteten Emitter im ESI-Quellbereich des Massenspektrometers war es möglich, eine kontinuierliche Aufnahme der MS- und MS/MS-Spektren der eluierenden Moleküle zu gewährleisten¹⁸¹. Die *online*- oder auch LC-MS-Kopplung (engl. *liquid chromatography-mass spectrometry*, LC-MS) ermöglicht die Detektion einer großen Anzahl verschiedener Vorläufermassen und deren Fragmentspektren, die wiederum die Basis für die computergestützte und probabilistische Annotation der zugehörigen Peptidsequenzen schafft¹⁸¹. Die *online*-Kopplung erlaubt nicht nur die Identifikation möglicher Peptidsequenzen über die Masse bzw. das entsprechende Fragmentspektrum, sondern liefert

zusätzlich auch Informationen über die Retentionszeiten der jeweiligen Vorläuferionen, die ebenfalls zu einer eindeutigen Identifikation einer Peptidsequenz beitragen können ¹⁷⁶.

Für die Analyse der HLA-gebundenen Peptide, die in dieser Arbeit untersucht wurden, wurden zwei unterschiedliche Umkehrphasen Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. *reversed phase*, RP) Geräte verwendet und *online* an das LTQ Orbitrap XL Massenspektrometer gekoppelt.

Nano-HPLC – „nanoLC-2D“ von Eksigent

Bei der „nanoLC-2D“ von Eksigent handelt es sich um ein Umkehrphasen-nano-HPLC-System. Die Auftrennung der Peptidspezies erfolgt über die Interaktion der Moleküle mit der hydrophoben stationären Phase der nano-Kapillarsäule. Diese stationäre Phase enthält RMe₂SiCl behandeltes Kieselgel, wobei R eine geradkettige Alkylgruppe, wie beispielsweise C₁₈H₃₇ (C₁₈ für die Auftrennung von Peptiden) oder C₈H₁₇ (C₈ für die Auftrennung von Proteinen) ist. Unter wässrigen Bedingungen binden Peptide an die hydrophobe Säulenmatrix, von der sie durch prozentuale Erhöhung der mobilen organischen Phase über die Zeit eluiert wurden ¹⁷⁶. Eine Übersicht über den zeitlichen Ablauf des Lösungsmittelflusses ist in Tabelle 9 gezeigt. Die mobile Phase vermittelt die Elution der Peptide über einen Gradienten mit steigender Konzentration des unpolaren und organischen Lösungsmittels, in diesem Fall Acetonitril ¹⁸¹. Die lyophilisierte Probe wurde wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben bearbeitet, bevor 5 µl innerhalb von 30 Minuten auf eine C₁₈-Vorsäule geladen wurden. Die C₁₈-Vorsäule diente der Aufkonzentrierung und Entsalzung der Probe. Der Vorsäule nachgeschaltet ist eine µ-Kapillartrennsäule, die ebenfalls mit C₁₈-Kieselgel gefüllt ist. Die Aufgabe der Trennsäule besteht in der weiteren Separation der aus der Vorsäule eluierten Peptidspezies. Der Trennsäule folgt eine metallbeschichtete µ-Kapillarnadel (PicoTip), die durch eine kontinuierliche Flussrate von 300 nl/min des Kanals 2 der Eksigent-HPLC den Elektrospray erzeugt. Die Wahl des Gradienten sowie die Sensitivität und der Durchsatz des verwendeten Massenspektrometers sind dabei von elementarer Bedeutung für die Ausbeute an identifizierten Sequenzen ¹⁸¹. Der verwendete Standardgradient der „nanoLC-2D“ wurde ursprünglich von Nina Hillen entwickelt und für die *online*-Kopplung an das Massenspektrometer LTQ Orbitrap XL weiter von Oliver Drews und Marc Günther adaptiert.

Tabelle 9: Ablauf des Lösungsmittelflusses der Eksigent-HPLC

Vorgang/ Flussrate	Zeit in min	Lösungsmittel A (2% ACN, 0,1% FA)	Lösungsmittel B (80% ACN, 0,1% FA)
Säulen waschen 500 nl/min	60	0%	100%
Äquillibrieren 500 nl/min	180	100%	0%
Laden auf Vorsäule 300 nl/min	90	100%	0%
Gradient 300 nl/min	120	100% bis 45%	0% bis 55%
Säulen waschen 500 nl/min	15	45% bis 0%	55% bis 100%

Tabelle modifiziert nach ⁸².

Um die Volumina im System so gering wie möglich zu halten, wurde nur Kanal 2 der HPLC verwendet (max. 500 nl/min). Zuerst wird das System 60 min mit 100% Lösungsmittel B gewaschen, um eventuelle Verschmutzungen vorheriger Läufe zu entfernen. Nun folgt die Äquillibrierung des Systems, wie auch der Vor- und der Trennsäule, für 180 min mit 100% Lösungsmittel A. Die Probe wurde anschließend mit 100% Lösungsmittel A aus der 10 µl-Probenschleife des Spark Micro Autosamplers gespült und auf die Vorsäule geladen. Der Gradient der Elution dauerte 120 min an. In dieser Zeit wurde die Konzentration des Lösungsmittels B kontinuierlich auf 55% erhöht, um die Peptide von den Säulen zu eluieren und schließlich über den Elektrospray in das Massenspektrometer zu führen. Als letzter Schritt wurde das System nochmals mit Lösungsmittel B gewaschen, wobei die Konzentration von 55% bis 100% über einen Zeitraum von 15 min kontinuierlich anstieg.

Nano-UHPLC – „UltiMate 3000 RSLCnano“

Die Sensitivität der massenspektrometrischen Analyse lässt sich durch eine verbesserte Auftrennung der verschiedenen Peptidspezies über entsprechende UHPLC-Geräte noch weiter verbessern. Die Verkleinerung der Porengröße erhöht die Bodenzahl N , wodurch die Auflösung R des Systems gesteigert wird ¹⁸⁸. Jedoch geht mit der Verkleinerung der Partikelgröße bzw. einer Erhöhung der Bodenzahl durch eine Verlängerung der Säule eine starke Erhöhung der Staudrücke von bis zu 1 000 bar einher ¹⁸¹. Generell werden Partikel mit einem Durchmesser $\leq 2 \mu\text{m}$ als Säulenmaterial benutzt. Da Standard-HPLC-Systeme nicht in der Lage sind, derart hohe Drücke zu produzieren, kommen sogenannte UHPLC-Geräte (engl. *ultra high performance liquid chromato-*

graphy, UHPLC) zum Einsatz. Der Begriff „UHPLC“ ist ein eingetragener Markenname der Waters Corporation, kann allerdings auch als allgemeiner Begriff für die Technik an sich verstanden werden. Der Vorteil der Kombination von UHPLC-Geräten mit modernen Hybridmassenspektrometern besteht in einer Steigerung der Sensitivität und somit der Ausbeute an identifizierten Peptidsequenzen. Aufgrund der längeren und dichter gepackten Säulen entstehen schärfere *peaks*, die in einem deutlich geringeren Zeitraum von der Säule eluieren. Zusätzlich vermindert eine höhere Auflösung die Anzahl an Peptid*peaks*, die zum gleichen Zeitpunkt von der Säule koeluiert (engl. *co-elution*) werden.

Für die Peptidanalytik wurde die UltiMate 3000 RSLCnano *UHPLC* der Firma Dionex *online* an das Massenspektrometer LTQ Orbitrap XL gekoppelt. Zu Beginn wurden 5 µl der gelösten Probe mit einer Flussrate von 4 µl/min für 5,75 min auf eine 2 cm lange Vorsäule (engl. *trap column*) mit einem Durchmesser von 75 µm geladen (75 µm x 2 cm). Die Auftrennung der Probe erfolgte bei 50°C bei einer Flussrate von 175 nl/min auf einer langen 50 µm x 50 cm oder auf einer kurzen 50 µm x 25 cm Trennsäule (engl. *separation column*). Der eingesetzte Gradient reichte von 2,4 - 32,0% Acetonitril über einen Zeitraum von 90 min für die kurze Trennsäule und 140 min für die lange Trennsäule. Die eluierten Peptidspezies wurden mittels Elektrospray ionisiert und im Massenspektrometer über eine Top5-CID-Methode analysiert. Nach Beendigung des Gradienten wurden die 25 cm-Trennsäulen mit einer Flussrate von 300 nl/min für 5 min mit 95% Lösungsmittel B gewaschen und anschließend für 20 min mit 100% Lösungsmittel A äquilibriert. Die längeren 50 cm-Trennsäulen hingegen wurden für 10 min gewaschen und für 40 min äquilibriert ¹⁸¹.

2.4 Auswertung

2.4.1 Prozessierung und Auswertung massenspektrometrischer Daten

Aufgrund der enormen Datenmenge, die bei der massenspektrometrischen Analyse von Zell- oder Gewebeproben entstehen können, ist die computergestützte Prozessierung bzw. Annotation der Fragmentspektren die bevorzugte Methode. Mittels der softwaregestützten Annotation sowie qualitativen Beurteilung der erzeugten Fragmentspektren lässt sich die Datenmenge reduzieren, indem nicht aussagekräftige Fragmentspektren bei der Auswertung vernachlässigt werden. Die Wahl der Prozessierung und der angelegten Filterkriterien ist entscheidend für die Qualität der generierten Daten. Bei der Wahl zu enger Filterkriterien wird die Datenmenge stark eingegrenzt, wobei potentiell interessante Peptide verloren gehen. Umgekehrt erhöhen nicht-strikte Prozessierungs- und Filterkriterien die Datenmenge stark, wobei die Qualität der zusätzlich gewonnenen Daten abnimmt.

Sobald eine Probe massenspektrometrisch analysiert wurde, werden die gesammelten Informationen in einem definierten Rohdatenformat (engl. *headerless RAW Waveform Data*) ausgegeben. Diese Rohdaten wurden anschließend unter Verwendung des Programmes Proteome Discoverer 1.4 an einen lokalen MASCOT-Server übermittelt, der die Annotation der Fragmentspektren durchführte. MASCOT ist eine Software zur wahrscheinlichkeitsbasierten Auswertung massenspektrometrischer Daten, die über den Abgleich mit einer Protein- bzw. Peptidatenbank identifiziert werden¹⁸⁹. Die MASCOT Software ver. 2.2.04 basiert dabei auf dem Algorithmus MOWSE (engl. *molecular weight search*), der ursprünglich als Methode für die massenspektrometrische Identifikation proteolytisch verdauter Proteine entwickelt wurde¹⁹⁰. Für die Prozessierung aller humaner Gewebe- und Zellproben wurde die Datenbank UniProtKB/Swiss-Prot mit der Taxonomie *homo sapiens* ausgewählt (*release*: November 2012). Die angelegten Filterkriterien beinhalten eine Massengenauigkeit ≤ 3 ppm für die Vorläuferionen, eine Massentoleranz von 0,5 Da für die Annotation der Fragmentationen und ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis ≥ 3 (engl. *signal-to-noise ratio*)¹⁸¹. Es wurde der Software erlaubt, Fragmentspektren zu kombinieren, falls die detektierten Vorläufermassen sich um maximal 3 ppm unterscheiden und beide Fragmentspektren innerhalb eines Zeitraumes von 90 s aufgenommen wurden. Zusätzlich wurden dynamische Modifikationen der Aminosäureseitenketten wie beispielsweise die Oxidation von Methionin zugelassen. Die Software errechnet dabei für jede Annotation eines Fragmentspektrums eine Punktezahl. Diese Ionenpunktezahl *S* (engl. *Ion Score*) berechnet sich aus der Wahrscheinlichkeit *P*, dass die Übereinstimmung eines experimentell er-

zeugten Fragmentspektrums mit einer Peptidsequenz aus der verwendeten Datenbank ein zufälliges Ereignis darstellt ¹⁸⁹.

Für die Berechnung des *Ion Scores* gilt folgende Formel:

$$S = -10 * \log P$$

Der *Ion Score* gibt beispielsweise Auskunft darüber, wie gut eine vorgeschlagene Peptidsequenz zu einem ausgewählten Fragmentspektrum passt. Ein *Ion Score* von 20 sagt aus, dass die vorgeschlagene Peptidsequenz mit einer Wahrscheinlichkeit von 1% rein zufällig das entsprechende Fragmentspektrum produziert ¹⁹¹. Die von *MASCOT* durchgeführten Berechnungen orientieren sich dabei an einem festgelegten Wahrscheinlichkeitswert von $P = 0,05$. So ist eine Peptid-zu-Spektrum-Übereinstimmung dann signifikant, wenn die Wahrscheinlichkeit einer zufälligen Übereinstimmung unter 5% liegt. Für jedes Fragmentspektrum werden in Mascot maximal 10 verschiedene Sequenzannotationen zugelassen, wobei jede Peptidsequenz, abhängig von ihrem *Ion Score*, einen Rang (engl. *rank*) von 1 bis 10 erhält.

Aufgrund der unterschiedlichen experimentellen Fragestellungen in dieser Arbeit wurden unterschiedliche Prozessierungen durchgeführt. Für die Prozessierung von HLA-Liganden wurde keine Enzymspezifität ausgewählt. Als dynamische Modifikation wurde die Oxidation von Methionin (m) zugelassen. Für die Analyse tryptischer Peptide hingegen wurde die Enzymspezifität Semitrypsin ausgewählt, wobei maximal eine überlebene Schnittstelle (engl. *missed cleavage site*) zugelassen wurde. Zusätzlich wurde neben dem oxidierten Methionin die Carbamidomethyl-Modifikation des Cysteinrestes erlaubt.

Analyse von HLA-Klasse-I-Liganden aus Prostatagewebe

- Ladungszustand	2 - 3
- <i>Ion Score</i>	≥ 15
- Rang	1
- Massenabweichung	≤ 5 ppm
- FDR-Grenze	keine oder $\leq 0,05$
- Peptidlänge	8 - 12

Analyse von HLA-Klasse-II-Liganden aus Zelllinien

- Ladungszustand 2 - 4
- *Ion Score* ≥ 20
- Rang 1
- Massenabweichung ≤ 5 ppm
- FDR-Grenze $\leq 0,01$
- Peptidlänge 8 - 25

Analyse tryptischer Peptide aus HLA-Proteinen

- Ladungszustand 2 - 4
- *Ion Score* ≥ 20
- Rang 1
- Massenabweichung ≤ 5 ppm
- FDR-Grenze $\leq 0,01$
- Peptidlänge 7 - 20

Analyse von HLA-Klasse-I/II-Liganden aus Onchozerkomen bzw. Hautgewebe

HLA-Klasse-I-Liganden

- Ladungszustand 2 - 4
- *Ion Score* ≥ 10
- Rang 1
- Massenabweichung ≤ 5 ppm
- FDR-Grenze keine
- Peptidlänge 8 - 12

HLA-Klasse-II-Liganden

- Ladungszustand 2 - 4
- *Ion Score* ≥ 10
- Rang 1
- Massenabweichung ≤ 5 ppm
- FDR-Grenze keine
- Peptidlänge 8 - 20

Im Allgemeinen wurde davon ausgegangen, dass Fragmentspektren mit einem *Ion Score* ≤ 20 eine schlechte Aussagekraft und somit Glaubwürdigkeit besitzen. Aufgrund der geringen Probenmenge und der daraus resultierenden niedrigen Sequenzausbeute wurden bei der Analyse der HLA-Klasse-I-Liganden aus Prostatagewebe die Filterkriterien angepasst, um so die Zahl der möglichen Kandidatenpeptide zu erhöhen. Für das Screening nach HLA-Liganden aus TAA der Prostata wurde deshalb die *Ion Score* auf 15 gesetzt sowie zusätzlich auf den Einsatz einer FDR-Grenze der Peptidannotation verzichtet. Neben der Bewertung einer Peptidannotation durch einen *Ion Score* ist die Bestimmung der falsch positiven bzw. falsch negativen Peptididentifikationen vor allem im Bereich der massenspektrometrischen Proteomanalyse essentiell ¹⁹². Die FDR (engl. *false discovery rate*) ist dabei ein rechenintensives, statistisches Maß für die Sicherheit einer Protein- bzw. Peptididentifikation. Generell werden in der Massenspektrometrie so genannte Köderdatenbanken für die Bestimmung der FDR verwendet ¹⁹³. Eine FDR von 0,05 bedeutet statistisch gesehen, dass 5% aller Peptide über die Köderdatenbank (engl. *decoy database*) identifiziert wurden und somit falsch positive Identifikationen darstellen. Allerdings wurde bereits gezeigt, dass der Einsatz einer strikten FDR ($q = 0,01$) bei der HLA-Ligandenanalyse die Zahl der falsch negativen Peptididentifikationen deutlich erhöht und somit die Ausbeute potentiell interessanter Peptide verringert ¹⁹⁴. Aus diesem Grund wurde bei der Prozessierung der HLA-Klasse-I-Liganden von Prostatagewebe auf die Verwendung einer FDR verzichtet, um dadurch die Anzahl an Kandidaten für die Suche nach TAA zu erhöhen. Im Gegensatz dazu führt eine Erniedrigung der FDR zu einer Reduktion der falsch positiven Identifikationen, aber auch zu einer Verringerung der Ausbeute im Allgemeinen. Da bei der Analyse der tryptischen HLA-Peptide die Proteinidentifikation im Vordergrund stand, wurde hier eine mittlere FDR = 0,05 als Filterkriterium verwendet.

Aufgrund der experimentellen Fragestellung des dritten Aspekts dieser Arbeit, der Analyse von *O. volvulus*-infizierten humanen Gewebeproben, war es notwendig, die Filterkriterien erneut anzupassen. Neben der geringen Probenmenge wurde die Auswertung durch die Tatsache erschwert, dass 3 verschiedene Organismen als Quelle der jeweiligen Peptidsequenzen in Frage kommen. Dies bedeutet für die Auswertung die Nutzung verschiedener Datenbanken, die sich allerdings nicht über die FDR vergleichen lassen.

2.4.2 Interpretation von Fragmentspektren

HLA-Klasse-I-Liganden mit einer Länge von 8 - 11 Aminosäuren sind typischerweise zweifach positiv geladen, da sich Protonen (H^+) an den basischen Stellen des Peptids

anlagern. Bei der Fragmentierung solcher Vorläuferionen entstehen zwei einfach geladene Fragmente oder ein zweifach geladenes und ein neutrales Fragment ohne Ladung. Abhängig von der Lokalisation der Ladung können verschiedene Typen von Fragmentationen unterschieden werden. Befindet sich die Ladung am N-Terminus des Peptids, so spricht man von a-, b- oder c-Ionen, abhängig von der Lokalisation des Peptidrückgratbruchs. Verbleibt die Ladung am C-Terminus, so spricht man von x-, y- und z-Ionen. Zusätzlich wird neben der Art der Fragmentationen noch die Anzahl der im Fragmentation enthaltenen Aminosäurereste angegeben, wobei bei a-, b- und z-Ionen vom N-Terminus, und bei x-, y- und z-Ionen vom C-Terminus beginnend gezählt wird¹⁹⁵. Eine Übersicht über die beschriebenen Fragmentationen einer Peptidsequenz ist in Abbildung 16 gezeigt. Aufgrund der erhöhten Basizität von Histidin (H), Lysin (K) und Arginin (R) vor allem in der Gasphase binden diese Aminosäuren vermehrt Protonen, die selbst nach der Fragmentierung an dieser Stelle verbleiben. Jedoch können die Protonen an den N-Termini durch die Fragmentierung zu jeder beliebigen Peptidbindung wandern und sich dort an den Carbonylsauerstoff anlagern. Dieser Mechanismus, der auch als Migration durch interne Solvatisierung bezeichnet wird, sorgt für eine heterogene Population von Peptiden, die sich lediglich in der Position der Protonenanlagerung und der Amidbindung unterscheiden¹⁹⁶. Dieser Mechanismus stellt sicher, dass sich bei der Fragmentierung des gleichen Vorläuferpeptids unterschiedliche Serien von Fragmentationen bilden, über die sich die Sequenz des Vorläuferpeptids ermitteln lässt^{168,176,196}.

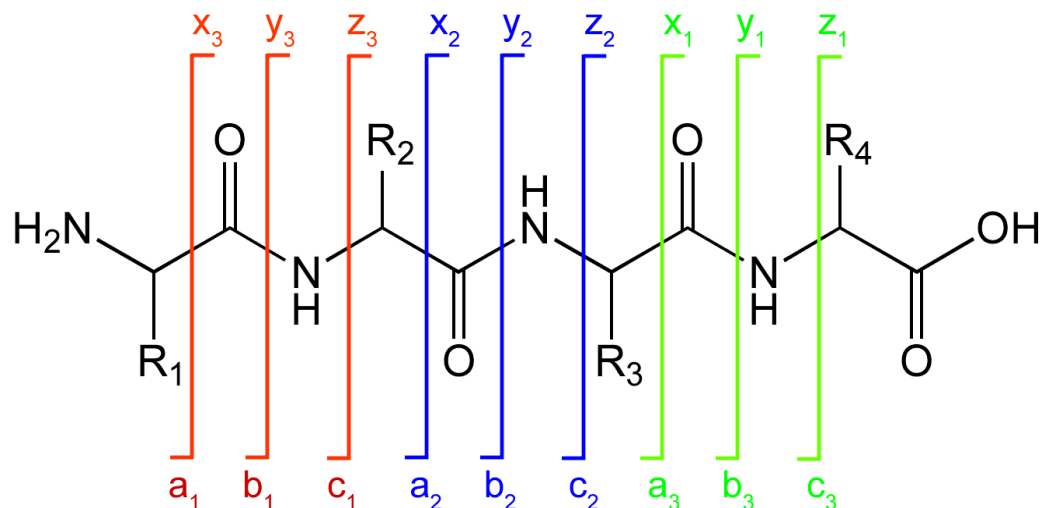


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Peptidfragmentierung und entsprechender Nomenklatur der Fragmentationen

Die Seitenketten der Aminosäuren sind mit R1 – R4 benannt. Abbildung entnommen aus¹⁹⁷.

Die durch Elektrosprayionisation erzeugten Vorläuferionen können theoretisch an jeder Stelle des Peptidrückgrats brechen, allerdings kommen bei der CID-

Fragmentierungstechnik vor allem b-, y- und seltener a-Ionenserien, vor. A-Ionenserien entstehen durch den neutralen Verlust einer CO-Gruppe aus den b-Ionen, was einer Massendifferenz von 28 Da entspricht ($\Delta m = 28$ Da). Weitere typische Abbrüche sind der Verlust von Wasser ($\Delta m = 18$ Da) aus a-, b- und y-Fragmenten, die die Seitenketten der Aminosäuren Serin (S), Asparaginsäure (D), Glutaminsäure (E) und Threonin (T) enthalten¹⁷⁶. Zu beobachten sind auch der Verlust von Ammoniak ($\Delta m = 17$ Da) aus den Aminosäuren Asparagin (N), Glutamin (Q), Lysin (K) und Arginin (R). Zusätzlich können durch den Bruch zweier Peptidbindungen auch interne Fragmentationen entstehen. Erfahrungsgemäß neigen gewisse Aminosäuren zu einer stärkeren Fragmentierung als andere. Typisch sind vor allem N-terminale Brüche vor Aminosäuren wie Prolin (P), Aspartat (D) und weniger stark Glutamat (E)¹⁸¹. Die Präferenz für eine bevorzugte Fragmentierung an diesen Positionen liefert im Fragmentspektrum vorwiegend charakteristische y-Ionenserien, wobei sich die Intensität der anderen Fragmentationen stark absenkt. Dabei dient das Auftreten typisch hoher y- bzw. korrespondierender b-Ionenserien, die durch die bevorzugte Fragmentierung an genannten Aminosäuren entstehen, als ein Kriterium für die erfolgreiche manuelle Evaluation der Fragmentspektren. Eine Übersicht über die Massen der proteinogenen Aminosäuren sowie häufige Ionen ist in Tabelle 10 abgebildet. Unter Verwendung einer speziellen Software, dem Protein Prospector v 5.6.0, war es möglich, die zu überprüfenden Peptidsequenzen theoretisch zu fragmentieren und mit dem entsprechenden Fragmentspektrum zu vergleichen¹⁹⁸. Im Allgemeinen wird bei der manuellen Interpretation von Fragmentspektren eine durchgängige y- oder b-Ionenserie gefordert, wobei sich die Signalintensität der Fragmentationen über die entsprechende Aminosäureabfolge erklären lassen sollte. Eventuell nicht erklärbare Störpeaks wurden über eine Auflistung ubiquitär vorkommender, massenspektrometrischer Kontaminanten identifiziert und nicht für die Bewertung des Fragmentspektrums in Betracht gezogen¹⁹⁹. Letztendlich wurden alle relevanten Sequenzen der HLA-Klasse-I-Ligandenanalyse durch synthetische Peptide gleicher Sequenz massenspektrometrisch verifiziert, um die fehlerfreie Identifikation der entsprechenden Peptidsequenz zu garantieren. Hierzu wurden die entsprechenden Peptidsequenzen von Stefan Stevanović und seiner „Peptid Crew“ (Patricia Hrstić, Nicole Zuschke und Katharina Graf) synthetisiert, bevor 1 - 20 synthetische Peptide als Gemisch (1 pmol/Peptid) mittels LC-MS/MS analysiert wurden.

Die resultierenden Fragmentspektren wurden mit den Fragmentspektren der natürlichen Peptidsequenzen verglichen und bei einer Übereinstimmung von mehr als 90% aller Signale als einwandfrei identifiziert angesehen.

Tabelle 10: Die 20 proteinogenen Aminosäuren und ihre Massen

Aminosäure	Kode	Immoniumion	MW ohne H₂O	y1-Ion
G	Gly	30	57	76
A	Ala	44	71	90
S	Ser	60	87	106
P	Pro	70	97	116
V	Val	72	99	118
T	Thr	74	101	120
C	Cys	76	103	122
L	Leu	86	113	132
I	Ile	86	113	132
N	Asn	70	114	133
D	Asp	71	115	134
Q	Gln	101	128	147
K	Lys	101/129	128/170	147/189
E	Glu	102	129	148
M	Met	104	131	150
H	His	110	137	156
F	Phe	120	147	166
R	Arg	70/129	156	175
Y	Tyr	136	163	182
W	Trp	159	186	205

Dargestellt ist der Ein- und Dreibuchstabencode sowie die Masse des Immoniumions für jede proteinogene Aminosäure. Zusätzlich ist das Molekulargewicht (MW) ohne Wasser sowie die Masse für das y1-Ion jeder Aminosäure gezeigt.

2.4.3 Strategien für die Identifikation tumorassoziierter HLA-Klasse-I-Liganden aus Prostatagewebe

Für die Identifikation von tumor- oder prostataassoziierten HLA-Liganden wurden verschiedene Strategien verfolgt. Nachdem die erzeugten Rohdaten prozessiert und die entsprechenden Filterkriterien (siehe 2.4.1) angelegt wurden, wurde mit der eigentlichen Suche nach potentiell tumorassozierten HLA-Liganden begonnen. Unter Verwendung eines Programmes für den Sequenzabgleich (*engl. basic local alignment search tool*, BLAST) lassen sich Peptide abhängig von ihrer Aminosäureabfolge einem Quellprotein zuordnen. Eine zuverlässige Bestimmung der Quellproteine ist essentiell, da die datenbankgestützte Literatur- sowie Expressionsanalyse auf definierte Proteinamen angewiesen ist. Um die einwandfreie Prozessierung und Annotation der Quellproteine zu garantieren, wurde die Quellproteinassoziation aller relevanten Peptidsequenzen über die BLAST-Funktion gegen den humanen Teil der Datenbank UniProt überprüft. Für die Identifikation tumorassoziierter Peptide bzw. deren Quellproteine stehen grundsätzlich zwei unterschiedliche Strategien zur Verfügung. Die umfassende

Methode (*engl. comprehensive approach*) beruht auf der Gegenüberstellung und dem Vergleich der HLA-Liganden bzw. der Quellproteine zwischen einer malignen und einer benignen Gewebeprobe desselben Individuums. Aufgrund der unterschiedlichen Proteinexpression in Krebszellen ermöglicht der Vergleich der Quellproteine zwischen maligner und benigner Probe die Identifikation von Proteinen, die vorwiegend auf Tumorgewebe, nicht aber auf dem Normalgewebe des gleichen Organs präsentiert werden. Bei der Untersuchung ist darauf zu achten, dass sowohl das benigne Normalgewebe als auch das erhaltene Tumorgewebe nicht nur aus demselben Individuum, sondern auch aus dem gleichen Organ- bzw. Gewebetyp stammen. Zusätzlich muss sichergestellt werden, dass äquivalente Mengen an Tumor- und Normalgewebe für die Vergleichsanalyse eingesetzt werden. HLA-Liganden, die über den *comprehensive approach* als tumorassoziiert identifiziert werden, eignen sich aufgrund ihrer bevorzugten tumorassoziierten Präsentation als Ziele in der Krebsimmuntherapie. Neben tumorassoziierten Quellproteinen lassen sich über den *comprehensive approach* aber auch die HLA-Liganden von Normal- und Tumorgewebe gegenüberstellen. Krebszellen unterscheiden sich aufgrund ihres Stoffwechsels und ihrer Proteinexpression von gesunden Körperzellen. Dies lässt den Schluss zu, dass sich die Prozessierung und Präsentation der HLA-Liganden auf Krebs- und normalen Körperzellen ebenfalls unterscheidet. Über den *comprehensive approach* lassen sich also auch HLA-Liganden identifizieren, die sich nur in ihrer Sequenz, nicht aber in ihrem Quellprotein zwischen Tumor- und Normalgewebe unterscheiden.

Die klassische Methode (*engl. classical approach*) basiert auf der Literatur- und Expressionsdatenbank gestützten Suche nach Quellproteinen mit bekannter Tumorassoziation oder entsprechender Überexpression im Tumor. Es wurde dabei davon ausgegangen, dass ein ideales tumorassoziiertes Antigen mindestens eine der folgenden Eigenschaften aufweisen sollte:

- tumorspezifische Antigene (*engl. tumor-specific antigens*)
 - d.h. das Protein wird ausschließlich im Tumorgewebe exprimiert und weist keine bzw. nur eine geringe Expression in anderen Gewebe- oder Zelltypen auf.

- überexprimierte Antigene (*engl. overexpressed antigens*)
 - d.h. das Protein tritt in einer höheren Konzentration im Tumor als im korrespondierenden Normalgewebe auf, wobei diese Überexpression vom Immunsystem erkannt wird

- funktionelle Antigene (engl. *functional antigens*)
 - o d.h. das Antigen ist wegen seiner Funktion essentiell für die Entstehung, das Fortschreiten oder die Metastasierung der Tumorerkrankung

Die Literaturrecherche erfolgt in der biomedizinischen Publikationsdatenbank „*PubMed*“ des Nationalen Zentrums für biotechnologische Informationen (engl. *National Center for Biotechnology Information*, NCBI). Über die Literaturrecherche in *PubMed* wurden tumorspezifische, überexprimierte und vor allem funktionelle Antigene identifiziert. Durch die Analyse der Genexpression ausgewählter Quellproteine wurden vor allem Prostata-spezifische, aber auch überexprimierte tumorassoziierte Antigene identifiziert. Für die Analyse der Genexpression in verschiedenen humanen Geweben wurden die Expressionsdatenbank „*GeoProfiles*“ des NCBI genutzt. Zusätzlich wurden im „Humanen Protein Atlas“ (HPA) die Proteinlevel der identifizierten Quellproteine in autologen benignen und malignen Gewebeproben sowie auch in verschiedenen Organen analysiert und verglichen. Aufgrund der Diversität der Datensätze und der zugrundeliegenden Messmethoden ist ein Vergleich der Expressionsdaten nur innerhalb eines Datensatzes möglich. Im Unterschied zu der Datenbank *GeoProfiles*, die Auskunft über die mRNA-Expression eines Proteins liefert, stammen die Daten des HPA aus der Antikörper-basierten histologischen Färbung eines Gewebes, wobei die Intensität der Färbung und die Zahl der gefärbten Gewebeproben angegeben wird. Bei der Proteinexpressionsanalyse im HPA wurde darauf geachtet, nur Datensätze desselben Antikörpers miteinander zu vergleichen.

Da im Rahmen dieser Arbeit keine Prostatagewebepaare sondern lediglich Einzelgewebeproben aus Tumor-, Normal- oder Hyperplasiegewebe für die HLA-Ligandenanalyse zu Verfügung standen, wurden alle relevanten Antigene ausschließlich über den *classical approach* identifiziert und die relevanten Publikationen angegeben.

2.4.4 Zuordnung der HLA-Motive

Aufgrund der experimentellen Vorgehensweise sollten alle erhaltenen Peptidsequenzen ein definiertes HLA-Klasse-I-Motiv aufweisen. Wie bereits erwähnt, zeichnen sich MHC-Moleküle durch einen enorm hohen Polymorphismus aus, der sich vor allem in der Peptidbindungsfurche widerspiegelt. Die Bestimmung der HLA-Restriktion stellt sicher, dass es sich bei den identifizierten Peptiden tatsächlich um HLA-Liganden handelt. Zudem entscheidet die HLA-Restriktion der identifizierten Peptide darüber, welche

Individuen überhaupt im Stande sind, das entsprechende Peptid auf der Oberfläche ihrer Zellen zu präsentieren.

Generell gibt es verschiedene Methoden die HLA-Restriktion eines Peptids bzw. die bevorzugten Peptidmotive eines HLA-Moleküles experimentell zu bestimmen. Eine Möglichkeit ist die Kristallisation von MHC:Peptid-Komplexen, über die sich die Interaktion der Aminosäurereste des Peptids mit der Bindungsfurche des MHC-Moleküls analysieren lässt⁸. Eine weitere Möglichkeit bietet die Elution von Liganden aus HLA-Molekülen mit nachfolgender massenspektrometrischer Sequenzierung, wobei jeweils nur ein HLA-Molekül untersucht werden kann¹⁹¹. Ein weiteres Verfahren ist der so genannte Bindungsassay, über die sich die Affinität einer bestimmten Peptidsequenz zu einem HLA-Molekül über die Verdrängung einer kompetitierenden Peptidsequenz bestimmen lässt^{200,201}. Die älteste Methode zur Bestimmung der HLA-Expression in einem Gewebe ist die serologische HLA-Typisierung (engl. *HLA typing*) mittels eines komplementvermittelten Zytotoxizitätstests²⁰². Allerdings wird heutzutage auf den Einsatz molekularbiologischer Methoden für die Bestimmung des HLA-Typs gesetzt. Bei dieser Technik wird die DNA der zu untersuchenden Gewebeprobe direkt mit Primerspezifischen Sonden hybridisiert oder mittels PCR (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) vervielfacht, bevor eine Bestimmung der HLA-Allele über eine direkte Sequenzierung der entsprechenden Gene stattfindet²⁰³.

Die in dieser Arbeit verwendete Bestimmung der HLA-Restriktion von eluierten Peptiden basiert auf der computergestützten Epitopvorhersage (engl. *epitope prediction*), die ebenfalls auf experimentell gewonnenen Daten basiert. Es wurden zwei verschiedene Programme für die Analyse der HLA-Restriktion der sequenzierten Peptide verwendet. SYFPEITHI ist eine auf Publikationen basierende Datenbank, bestehend aus HLA-Liganden, wobei für jeden Liganden die entsprechende HLA-Assoziation festgehalten wurde. SYFPEITHI enthält neben einer Vielzahl an MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Liganden auch bereits bekannte T-Zell-Epitope¹². Das zweite verwendete Programm für die Epitopvorhersage ist NetMHC ver. 3.4. NetMHC überprüft die Bindeaffinität eines Peptids zu einer Vielzahl von HLA-Allotypen, wobei die Verwendung eines künstlichen neuronalen Netzwerks (engl. *artificial neuronal network*, ANN) sowohl sensitive, aber auch quantitative Vorhersagen zulässt²⁰⁴. Da die erhaltenen Prostatagewebe keine HLA-Typisierung aufwiesen und die Patienten im Nachhinein nicht für eine Blutabnahme zur Bestimmung der HLA-Typen zur Verfügung standen, wurde eine weitere Methode der HLA-Typisierung in Kooperation mit Lea Prokop entwickelt. Die Methode umfasst die vergleichende Analyse der HLA-Liganden über die Epitopvorhersage in SYFPEITHI und NetMHC für jede Gewebeprobe. Die Ergebnisse

der Epitopvorhersage wurden anschließend über die Identifikation HLA-spezifischer Peptide aus dem Verdau der HLA-Proteine jeder Gewebeprobe bestätigt.

3 Ergebnisse

3.1 Identifikation tumorassoziierter HLA-Klasse-I-Liganden für die Immuntherapie des Prostatakarzinoms

3.1.1 Auswahl der Prostata-Gewebeproben

Da im Rahmen dieser Arbeit potentielle tumorassoziierte HLA-Klasse-I-Liganden für die Immuntherapie des Prostatakarzinoms identifiziert werden sollen, beginnt die Analyse mit der Auswahl der entsprechenden Gewebeproben. Die Prostata ist, wie bereits erwähnt, kein lebenswichtiges Organ, weshalb die Therapie des Prostatakarzinoms im Normalfall die Entfernung der kompletten Prostata vorsieht. Durch diesen Umstand sind vor allem gewebespezifische Antigene der Prostata, auch Differenzierungsantigene genannt, von besonderem Interesse für die Krebsforschung. Bis zum heutigen Tag stammt die Mehrzahl der in der Prostatakrebsdiagnostik und -therapie verwendeten Antigene aus Differenzierungsantigenen wie beispielsweise dem Prostata-spezifischen Antigen PSA, dem Prostata-spezifische Membranantigen PSMA oder der sauren Prostata-spezifischen Phosphatase PAP^{205–207}. Aus diesem Grund ist sowohl die Analyse von gutartig wucherndem Prostatagewebe als auch von Prostatanormalgewebe neben der Analyse des Gewebes aus Prostatakarzinom sinnvoll. Bei den menschlichen Gewebeproben, die für die Analyse aufbereitet wurden, handelt es sich nach Angaben der Klinik für Urologie Tübingen sowohl um Prostatakarzinomgewebe (PrCa: n = 10) mit dem umgebenden Normalgewebe, normales Prostatagewebe ohne Auffälligkeiten (normal: n = 7) als auch um gutartig wucherndes Prostatagewebe (BPH: n = 4). Neben der oberflächlichen Begutachtung der Gewebeprobe unmittelbar nach der Operation wurde die Einteilung der Prostatagewebe histologisch durch einen Pathologen bestätigt. Alle Patienten wurden über die Zielsetzung der Studie aufgeklärt und stimmten der Weitergabe der Proben an die Abteilung Immunologie freiwillig zu. Die Studie wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Tübingen genehmigt (27/2009BO2) und entsprechend der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Die Gewebeproben wurden von der Klinik bis zum Institut in Flüssigstickstoff transportiert und bis zu ihrer Präparation bei -80°C gelagert. Aufgrund der geringen Probenmenge der erhaltenen Prostatagewebe (~ 1,3 g pro Gewebe) wurde die HLA-Affinitätschromatographie für die Analyse geringer Probenmengen bereits optimiert⁸². Die erhaltenen Daten basieren auf der Analyse von 21 humanen Prostatagewebeproben.

3.1.2 Anzahl identifizierter Peptide auf Prostatagewebe

Wie in 2.4.1 beschrieben, wurden für die Prozessierung der HLA-Klasse-I-Liganden auf Prostatagewebe definierte Filterkriterien verwendet. Aufgrund der geringen Probenmenge und der daraus resultierenden geringen Ausbeute an qualitativ hochwertigen Fragmentspektren wurden bei der HLA-Klasse-I-Ligandenanalyse von Prostatagewebe unterschiedliche Grenzwerte der FDR gewählt. Wie bereits erwähnt, schränkt die Wahl einer zu engen FDR von 0,01 - 0,05 die erhaltene Datenmenge massiv ein, wodurch potentiell interessante Peptidsequenzen verloren gehen. Umgekehrt ist die

auch ein Maß für die Glaubwürdigkeit einer Peptidannotation zu einem gegebenen Fragmentspektrum, was wiederum gegen die Erniedrigung des FDR-Schwellenwertes spricht. Aus diesem Grund wurden für die Prozessierung der HLA-Liganden von Prostatagewebe zwei unterschiedliche FDR-Grenzwerte ausgewählt. Für das Screening nach potentiell relevanten Tumor- oder Prostata-spezifischen HLA-Liganden wurde auf den Einsatz eines FDR-Grenzwertes komplett verzichtet. Dies führt zu einer drastischen Erhöhung der Peptidausbeute pro bearbeiteter Gewebeprobe, wobei die Qualität der zusätzlich gewonnenen Daten abnahm. Der Verzicht auf einen festgelegten FDR-Grenzwert erschwert die massenspektrometrische Bewertung und somit Glaubwürdigkeit der gewonnenen Daten, weshalb die finale Überprüfung aller relevanter Peptidsequenzen über synthetische Peptide der gleichen Sequenz erfolgte.

Um Aussagen über die Gesamtheit der auf Prostatagewebe identifizierten Peptidsequenzen zu treffen, ist der Einsatz eines festgelegten FDR-Grenzwertes unverzichtbar. In der Proteomanalyse werden typischerweise strikte FDR-Grenzwerte von 0,01 gewählt, um die Aussagekraft der gewonnenen Daten zu verstärken. Die Verwendung einer strikten FDR in der Proteomik beruht nicht zuletzt auf der erhöhten Probenkonzentration und der damit verbundenen verbesserten Qualität der Daten, sondern auch auf einer Eingrenzung der Datenbanksuche über die Schnittspezifität des verwendeten proteolytischen Enzyms. Aus diesen Gründen wurde bei einer zweiten Prozessierung der HLA-Liganden eine mittlere FDR von 0,05 gewählt. Ein FDR-Grenzwert von 0,05 bedeutet, dass alle gegebenen Peptidsequenzen mit einer Wahrscheinlichkeit von maximal 5% in der Köder-Datenbank identifiziert wurden und somit falsch positive Peptididentifikationen darstellen.

In Tabelle 11 ist eine Übersicht über die bearbeiteten Gewebeprouben sowie die Ausbeute an Sequenzen abhängig von der verwendeten FDR-Grenze abgebildet. Die Anzahl der identifizierten Peptidsequenzen wurde bei einem FDR-Grenzwert von 0,05 bzw. ohne festgelegten FDR-Grenzwert bestimmt und für jede Gewebeproube ermittelt.

Über den Gewinn an neuen zusätzlichen Peptidsequenzen wurde der „Sequenzgewinnfaktor“ errechnet. Er gibt an, um welchen Faktor sich die Peptidausbeute bei einer Vernachlässigung der FDR im Unterschied zu einer mittleren FDR von 0,05 erhöht. Durchschnittlich ließ sich die Peptidausbeute bei einer Vernachlässigung einer FDR um den Faktor 7,7 ($SD = 4,9$) steigern. Insgesamt wurden HLA-Liganden aus 27,29 g Prostatagewebe massenspektrometrisch untersucht, wobei das durchschnittliche Gewicht einer Probe bei 1,3 g lag. Unter Benutzung einer mittleren FDR-Grenze von 5% konnten insgesamt 7 498 Peptidsequenzen von 21 Proben identifiziert werden, wobei insgesamt 5 531 einzigartige Peptidsequenzen identifiziert wurden. Die Peptidausbeute konnte durch die Vernachlässigung der FDR auf 38 697 Sequenzen gesteigert werden, von denen allerdings nur 33 019 Peptide einzigartige Sequenzen darstellen. Die Anzahl an einzigartigen Peptidsequenzen wurde über die Vernachlässigung der FDR um den Faktor 7 gesteigert. Des Weiteren wurde die Peptidausbeute pro Gramm an eingesetztem Gewebe berechnet und abhängig von der Wahl des FDR-Grenzwertes miteinander verglichen. So wurden durchschnittlich 391 Peptide pro Gramm Gewebe ($FDR = 0,05$) identifiziert, wohingegen eine Vernachlässigung des FDR-Grenzwertes diese Ausbeute auf durchschnittlich 2 273 Peptidsequenzen pro Gramm Gewebe gesteigert wurde.

Tabelle 11: Anzahl sequenzierter Peptide pro Gewebeprobe

Gewebe Kode	Histologie	Masse in (g)	mittlere FDR \leq 5%		keine FDR		Gewinn
			Anzahl Peptide	Anzahl Peptide/ Gramm Gewebe	Anzahl Peptide	Anzahl Peptide/ Gramm Gewebe	Sequenz- gewinn- faktor
Pro006	PrCa	1,00	29	29	525	525	18,1
Pro106	PrCa	2,01	1104	549	4160	2070	3,8
Pro181	PrCa	0,50	17	34	347	694	20,4
Pro301	PrCa	0,13	36	277	209	1608	5,8
Pro314	PrCa	0,28	20	71	162	579	8,1
Pro344	PrCa	0,38	3	8	46	121	15,3
Pro353	PrCa	0,56	7	13	65	116	9,3
Pro366	PrCa	0,88	84	95	863	981	10,3
Pro383	PrCa	1,70	69	41	485	285	7,0
Pro386	PrCa	1,50	7	5	46	5	6,6
Pro373	BPH	0,50	571	1142	5510	11020	9,6
Pro411	BPH	1,50	779	519	5514	3676	7,1
Pro418	BPH	1,46	541	371	4061	2782	7,5
Pro407	BPH	0,60	1562	2603	7879	13132	5,0
Pro089	normal	3,00	85	28	363	121	4,3
Pro368	normal	2,19	310	142	1636	747	5,3
Pro381	normal	1,60	1904	1190	5418	3386	2,8
Pro392	normal	0,40	66	165	327	818	5,0
Pro012	normal	2,60	105	40	476	183	4,5
Pro092	normal	1,50	116	77	420	280	3,6
Pro306	normal	3,00	83	28	185	62	2,2
Durchschnitt		1,30	395	391	2037	2273	7,7
Summe		27,29	7498	-	38697	-	-

Abgebildet sind der Prostatagewebekode, die Histologie sowie das Gewicht der analysierten Gewebe. Zusätzlich ist die Anzahl der einzigartigen Peptidsequenzen pro analysiertem Gewebe bzw. die durchschnittliche Ausbeute pro eingesetztem Gramm Gewebe bei einem FDR-Grenzwert von 5% bzw. ohne FDR-Grenzwert angegeben. Der Sequenzgewinnfaktor gibt an, um welchen Faktor sich die Ausbeute bei einer Vernachlässigung der FDR erhöht.

3.1.3 Ausbeute und Sequenzgewinn bei Vernachlässigung der FDR

Durch die Vernachlässigung eines definierten FDR-Grenzwertes bei der Prozessierung der von Prostatagewebe eluierten HLA-Liganden konnte die Ausbeute an Peptidsequenzen deutlich gesteigert werden. Die durchschnittliche Anzahl an identifizierten Peptidsequenzen für 21 Prostatagewebe lag bei 395 Sequenzen bei einer FDR = 5% bzw. bei 2 037 Sequenzen, falls kein FDR-Grenzwert gewählt wurde. Dies entspricht einer Steigerung der Zahl an Peptidsequenzen um durchschnittlich etwa um das Vierfache.

Aufgrund der Heterogenität sowie der unterschiedlichen Volumina und Massen der analysierten Prostatagewebe sind die Aussagen über den durchschnittlichen Sequenzgewinn bei einer Vernachlässigung der FDR von geringer Aussagekraft. Die Anzahl an

Peptidsequenzen pro eingesetztem Gramm an Prostatagewebe hingegen besitzt theoretisch eine höhere Aussagekraft, obwohl Faktoren wie die Heterogenität der Proben oder die Varianz der HPLC-MS-Analyse nicht miteinberechnet werden können. So beträgt die durchschnittliche Anzahl an identifizierten Peptidsequenzen bei $FDR \leq 5\%$ pro eingesetztem Gramm Gewebe durchschnittlich 391 Peptidsequenzen. Die Anzahl konnte durch eine Vernachlässigung der FDR um 481,3% auf 2 273 Sequenzen gesteigert werden (s. Abbildung 17). Allerdings zeigen die neu gewonnenen Peptidsequenzen qualitativ schlechtere Annotationen und somit Bewertungen der zugehörigen Fragmentspektren, weshalb eine finale Bestätigung einer gegebenen Sequenz immer über die entsprechenden synthetischen Peptide erfolgte. Interessanterweise ist die durchschnittliche Sequenzausbeute pro Gewebe vergleichbar mit der Ausbeute pro Gramm eingesetztem Gewebe, was sich durch die durchschnittliche Masse der Proben von 1,3 g erklären lässt.

Sequenzausbeute - 5% FDR vs. keine FDR

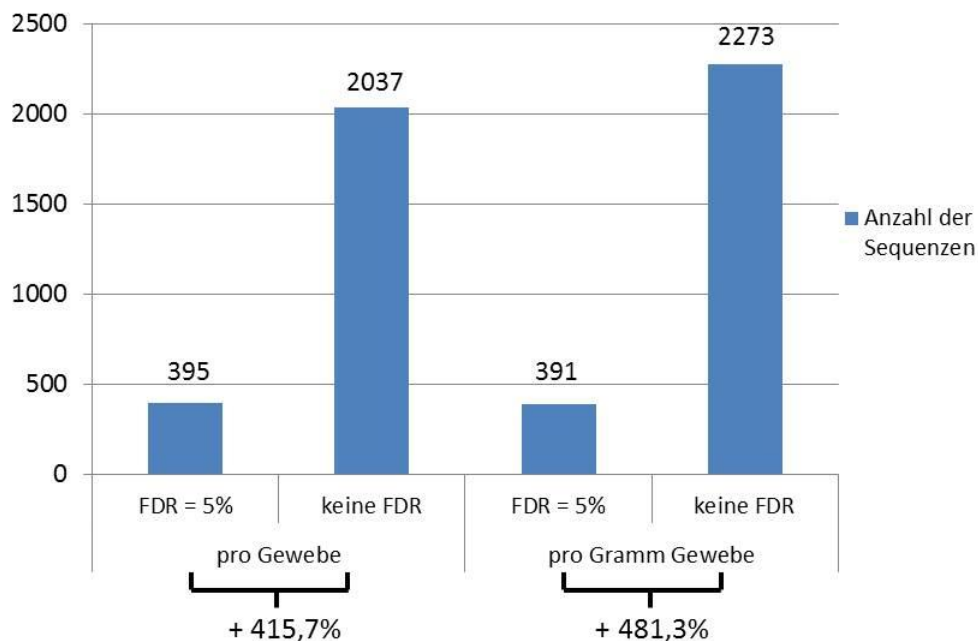


Abbildung 17: Durchschnittliche Ausbeute an Peptidsequenzen von Prostatagewebe

Graphische Darstellung der Sequenzausbeute pro Gewebe und pro Gramm an eingesetztem Gewebe ($n = 21$) für eine $FDR = 5\%$ bzw. für keine FDR. Der Sequenzgewinn wurde für einen FDR-Grenzwert von 5% bzw. für keine FDR-Grenze berechnet.

3.1.4 Sequenzausbeute pro Gramm eingesetztem Gewebe

Generell wurde davon ausgegangen, dass sich die Zahl der eluierten HLA-Liganden mit steigender Menge an eingesetztem Material erhöht. Grundsätzlich stimmt dies vor

allem für die Analyse von Zelllinien, nicht unbedingt für die Analyse solider Gewebeproben. Unterschiedliche Gewebe verschiedener Spender lassen sich nur bedingt miteinander vergleichen. Eine bekannte Ursache für die beobachtete hohe Varianz in der Sequenzausbeute pro Gramm Prostatagewebe wäre die hohe Heterogenität der Gewebeproben, die nicht zuletzt auf individuellen Unterschieden der Spender und Proben beruht. Dies bedeutet, dass sich die Gewebe nicht nur histologisch (PrCa, BPH, normal), sondern auch in ihrer Zelldichte und dem Anteil nicht-zellulären Gewebes voneinander unterscheiden. Je größer beispielsweise der Anteil extrazellulärer Matrixproteine in der Probe ist, umso weniger Zellen und somit HLA-Liganden pro eingesetztem Gramm an Gewebe werden sequenziert. Die Sequenzausbeute ist nicht nur von der Zahl der eingesetzten Zellen abhängig, vielmehr ist die Stärke der HLA-Expression für die Ausbeute an HLA-Liganden verantwortlich. Eine bekannte Erklärung für eine fehlende Korrelation zwischen eingesetzter Menge an Gewebe und der Sequenzausbeute könnte in der Massenspektrometrie selbst begründet sein. So wurde bereits gezeigt, dass gewisse HLA-Allotypen bevorzugt Peptide binden, die sich aufgrund ihrer Aminosäuren schlechter im Massenspektrometer fragmentieren lassen als Liganden anderer HLA-Moleküle ²⁰⁸. Dieser Umstand führt zu einer systematischen Messabweichung (engl. *bias*), da die Liganden des entsprechenden HLA-Moleküls zwar vorhanden sind, aber aufgrund ihrer Sequenz eine unzureichende Fragmentierung und somit generell schlechtere Annotation liefern. Letztlich ist die Ausbeute an Peptiden von jedem Experiment abhängig, da selbst bei genauer Einhaltung des Protokolls Abweichungen entstehen, die sich im Nachhinein nicht reproduzieren lassen.

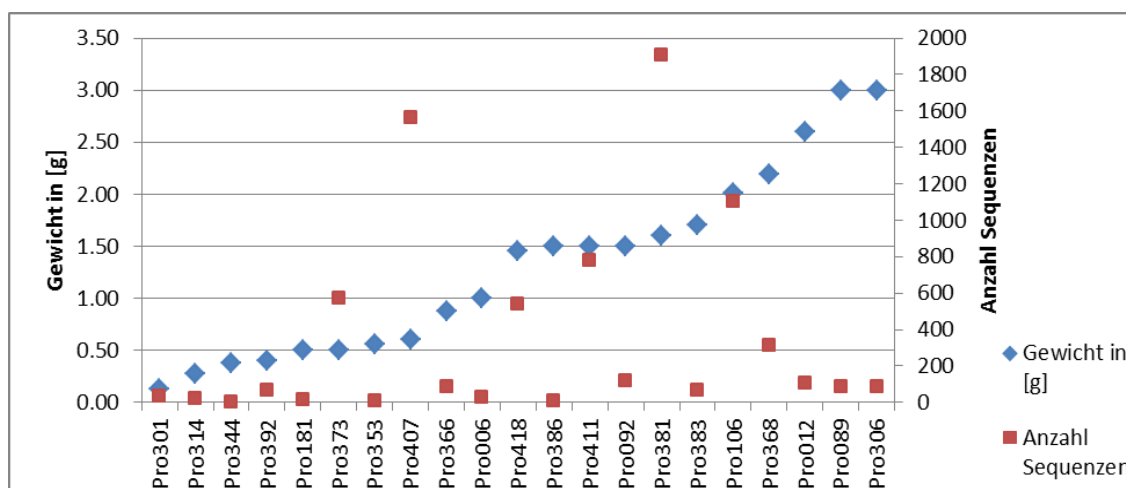


Abbildung 18: Gewebemasse und Sequenzausbeute pro Gewebe bei einer FDR \leq 5%

Graphische Darstellung der Masse der eingesetzten Prostatagewebe im Vergleich zu den erhaltenen Peptidsequenzen bei einer FDR = 5%.

Wie in Abbildung 18 und 19 dargestellt, ließ sich keine klare Korrelation zwischen eingesetzter Gewebemasse und der Anzahl an identifizierten Peptidsequenzen bei einer

FDR = 5% erkennen. Auffällig ist vor allem die Sequenzausbeute der Proben Pro407 und Pro381, da diese Gewebe eine besonders hohe Anzahl an Peptididentifikationen bei einem relativ niedrigen Probengewicht aufwiesen. Allerdings zeigen auch Proben mit einer relativ großen Masse (> 2 g) eine geringere Peptidausbeute als erwartet (s. Abbildung 19).

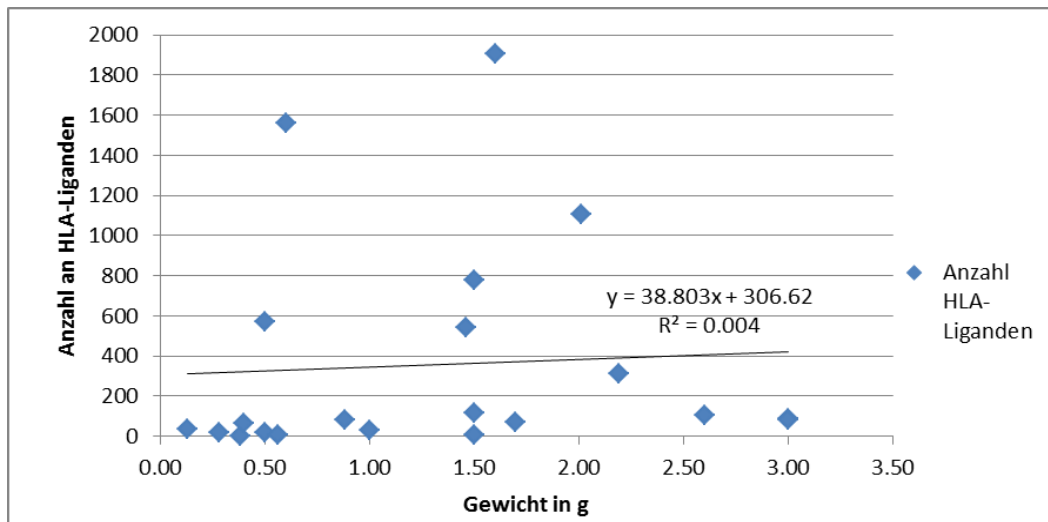


Abbildung 19: Anzahl der vorgeschlagenen HLA-Liganden in Abhängigkeit von der eingesetzten Gewebemenge

Abgebildet ist die Korrelation zwischen eingesetztem Gewebe und erhaltener Anzahl an HLA-Liganden für eine FDR \leq 5%. Erst ab einem Probengewicht von 0,5 g liefert die HLA-Ligandenanalyse eine ausreichende Menge an Peptidsequenzen (>500). Allerdings zeigen einige Proben mit einer relativ großen Masse > 2 g eine geringere Peptidausbeute als erwartet.

3.1.5 Identifikation tumorassoziierter Antigene über den *classical approach*

Da keine autologen Gewebepärchen für die HLA-Ligandenanalyse von der Klinik für Urologie bereitgestellt werden konnten, erfolgte die Suche nach HLA-Liganden aus relevanten Prostata- bzw. tumorspezifischen Antigenen ausschließlich über den in 2.4.3 beschriebenen *classical approach*. Hierzu wurden die massenspektrometrischen Rohdaten wie in 2.4.1 beschrieben gegen den humanen Teil der Datenbank UniProtKB prozessiert und mit den entsprechenden Filterparametern für die Analyse von HLA-Klasse-I-Liganden gefiltert. Über die Vernachlässigung der FDR wurde die Anzahl an Peptidsequenzen drastisch erhöht, wobei die Qualität der Annotationen der zusätzlich gewonnenen Sequenzen abnahm. Allgemein gesehen führte eine Lockerung der Filterkriterien zu einer Vergrößerung der Datenmenge und somit eine Vergrößerung des Suchraumes, was wiederum die Anzahl interessanter Peptidsequenzen aus potentiell relevanten Quellproteinen erhöht. Sobald allen Peptidsequenzen über die Mascot-

Suche oder über den Abgleich mit dem Programm BLAST mindestens ein Quellprotein zugeordnet wurde, wurde mit der Literaturrecherche über PubMed begonnen. Über die Literaturrecherche wurde geprüft, ob die identifizierten Quellproteine bereits mit Prostatakrebs oder anderen Krebsarten in Verbindung stehen. Desweiteren wurde geklärt, ob die relevanten Antigene über ihre Funktion die Entstehung oder das Fortschreiten der malignen Erkrankungen im Allgemeinen begünstigen. Zusätzlich wurde nach Publikationen gesucht, die die Expression der Quellproteine in der Prostata und anderen Geweben beschreiben oder das entsprechende Quellprotein als molekulares Ziel in der Krebstherapie untersuchen. Die Vorgehensweise beim *classical approach* wird anhand des Antigens KLK3, auch Prostata-spezifisches Antigen (PSA) genannt, beispielhaft erklärt. Die Serinprotease KLK3 wurde 1979 erstmals isoliert und aufgereinigt und zählt aufgrund der Prostata-spezifischen Expression mittlerweile zu einem der wichtigsten Marker in der Urologie^{209,210}. KLK3 ist ein Differenzierungsantigen der Prostata, dessen Expression über Androgene reguliert wird⁶⁹. Die Expression von KLK3 ist beschränkt auf die Prostata und ist in Prostatakrebs und anderen Krankheiten der Prostata wie BPH oder Prostatitis erhöht²¹¹. Diverse klinische Studien zeigten bereits die Induktion PSA-spezifischer T-Zellen über die Gabe von HLA-Liganden aus PSA oder über die Impfung mit einem Vakzinia-Vektor, der für PSA kodiert^{212,213}. PSA ist ein typisches Differenzierungsantigen der Prostata, das sich aufgrund seiner prostata-spezifischen Expression (s. Abbildung 20) sowie der erhöhten Expression im Falle des Prostatakrebs als Zielstruktur für die Immuntherapie des Prostatakarzinoms eignet.

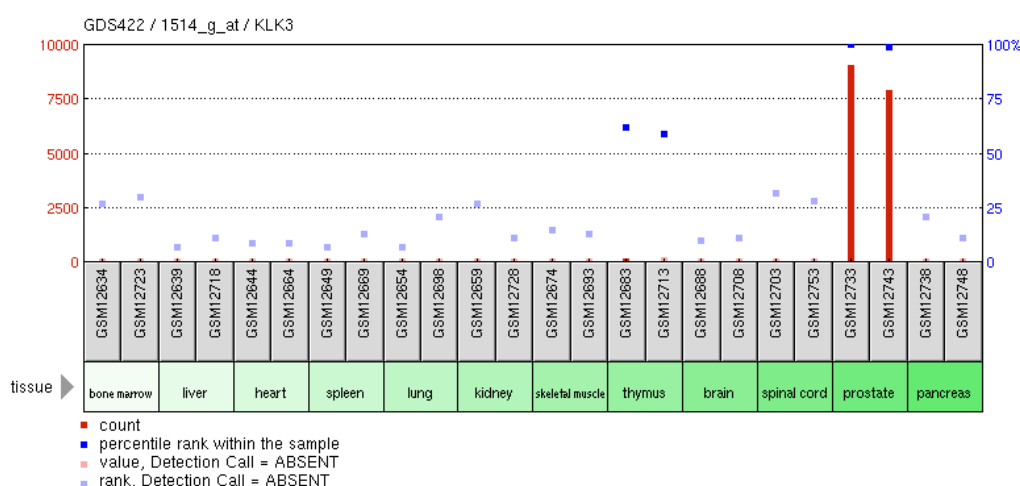


Abbildung 20: Vergleichende Darstellung des mRNA-Levels von KLK3 in diversen normalen humanen Gewebeproben

Dargestellt ist das Expressionsprofil von KLK3 in verschiedenen humanen Gewebeproben. In rot dargestellt ist die relative Stärke der Expression in den jeweiligen Proben, wobei die blauen Punkte den Perzentil-Rang der Expression des entsprechenden Gens innerhalb derselben Probe beschreiben.

Die Untersuchung des GEO dataset GDS422 unter Verwendung des Affimetrix Chip [HG_U95Av2] zeigte eine Expression von KLK3 in zwei Prostatageweben im 100. Perzentil²¹⁴. Dies bedeutet, dass die Expressionsstärke von KLK3 in der Prostata höher liegt als die Expressionsstärke aller anderen Gene. Allerdings bedeutet eine verstärkte Expression auf mRNA-Ebene nicht unbedingt eine höhere Konzentration der entsprechenden HLA-Liganden auf der Zelloberfläche, da eine zweifelsfreie Korrelation zwischen der Konzentration der mRNA und der Anzahl an HLA-Liganden aus dem korrespondierenden Protein nicht zweifelsfrei belegt werden konnte²¹⁵.

Eine Übersicht über alle relevanten Quellproteine sowie die Literaturnachweise sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Alle gezeigten Antigene besitzen mindestens einen Literaturnachweis, der das Antigen entweder als Prostata-spezifisch, als überexprimiert in Prostatakrebs, von seiner Funktion relevant für (Prostata-)Krebs oder als Zielstruktur in der Krebstherapie beschreibt. Eine Ausnahme stellt das Antigen SMARCA2 dar, da die zugrunde liegende Peptidsequenz sowohl aus dem Protein SMARCA2, aber auch aus dem Protein SMARCA4 stammen kann. Mittels des *classical approach* wurden insgesamt 28 Antigene ausgewählt und als potentielle Zielstrukturen für die Therapie des Prostatakarzinoms über die Literaturrecherche in Pubmed verifiziert. Jedoch können über den *classical approach* nur Antigene identifiziert werden, die bereits in vorhandenen Publikationen beschrieben sind. Somit ist die Identifikation neuer bzw. unbekannter tumorassoziierter Antigene über diese Methode nicht möglich. Neben der Identifikation genereller tumorassoziierter Antigene wie HDAC1-3, CTNNB1 oder WT1 wurden des Weiteren auch bereits bekannte Prostata-spezifische Proteine, wie PAP, KLK3, FOHL1 oder TRPM8 über den *classical approach* identifiziert. Diese Tatsache ist als *proof of principle* zu werten, da gezeigt wurde, dass die Identifikation TAA über den *classical approach* mit entsprechend angelegten Kriterien funktional ist.

Tabelle 12: Übersicht über die nach dem *classical approach* identifizierten Antigene für die Immuntherapie des Prostatakarzinoms

Gen Symbol	Quellprotein	Anzahl Peptide	Referenzen			
			Prostata-spezifisch	Hohe expression in (Prostata) Krebs	Funktion in (Prostata) Krebs	Ziel in der Krebstherapie
ACPP	Prostatic acid phosphatase	4	207	216		217
BCAS2	Pre-mRNA-splicing factor SPF27	1			218	219
CEACAM6	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6	1		220-223	224-226	227
CTNNB1	Catenin beta-1	3			228-230	231
EP300	Histone acetyltransferase p300	1		232,233	234	235
ETS2	v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2	1		236	237	238
FOLH1	Prostate-specific membrane antigen	2	239	206,240	241-243	244
HDAC1	Histone deacetylase 1	5		245	246	246
HDAC2	Histone deacetylase 2	5		245	246	
HDAC3	Histone deacetylase 3	1		245	246	
HDGF	Hepatoma-derived growth factor	2		247-250	251-254	255
HIF1a	Hypoxia-inducible factor 1-alpha	3		256	257-260	261
IGF1	Insulin-like growth factor I	3		262	263	264-266
KLK2	Kallikrein-2	6	267	268	269	269
KLK3	Prostate-specific antigen	5	210	69,211		212,213
KLK4	Kallikrein-4	3	270,271	272-274	275	
MCL1	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1	2		276-278		279
MYLK	Myosin light chain kinase, smooth muscle	12		280,281	280,281	
NKX3.1	Homeobox protein Nkx-3.1	3	282,283		284,285	
PGM3	Phosphoacetylglucosamine mutase	1			286	286
PRUNE2	Protein prune homolog 2	1		287,288	287	102
SCD	Acyl-CoA desaturase	1		289		289,290
SMARCA2	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 2	1			291	
SMARCA4	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4	1		291	291,292	
TF7L2	Transcription factor 7-like 2	1			293	
TRPM8	Transient receptor potential cation channel subfamily M member 8	1		294	295	296,297
WT1	Wilms tumor protein	1		298	299,300	301

Abgebildet sind alle über den *classical approach* selektierten Antigene sowie die relevanten Referenzen.

3.1.6 Analyse der Immunhistologie der selektierten tumorassoziierten Antigene über den Humanen Protein Atlas (HPA)

Der Humane Protein Atlas (HPA) ist eine öffentliche Datenbank für die Analyse der Expressionsstärke von Proteinen innerhalb verschiedener humaner Gewebe, einschließlich Krebs. Der HPA basiert dabei auf einer Vielzahl pathologisch überprüfter histologischer Gewebefärbungen, wobei die Stärke der Expression vereinheitlicht angegeben wird. Der Vorteil des HPA besteht in der vergleichenden und einheitlichen Analyse verschiedener humaner Gewebe einschließlich autologer Krebsgewebe, wobei die Stärke der Expression auf mRNA- und auf Proteinebene verglichen wird. Da, wie bereits in 3.1.5 erwähnt, keine klare Korrelation zwischen der Höhe der mRNA und Stärke der HLA-Präsentation des jeweiligen Proteins besteht, sind Informationen über das mRNA-Level für die Validierung potentieller tumorassoziiertes Antigene von geringer Aussagekraft. Dagegen liefert die Analyse der Proteinexpression über einen entsprechend spezifischen Antikörper zwar Argumente für die Präsenz eines Proteins, nicht aber für die erhöhte Präsentation auf der Zelle, da die Präsentation ebenfalls stark abhängig vom Umsatz bzw. der Halbwertszeit des Proteins bleibt. Ein Vorteil des HPA besteht in der internen Validierung der verwendeten Antikörper in Kategorien unterstützend (engl. *supportive*) oder in unsicher (engl. *uncertain*), was die Aussagekraft der histologischen Gewebefärbungen ebenfalls erhöht.

Bei der Expressionsanalyse im HPA wird sowohl die Stärke der Antikörperfärbung als auch die Detektion der entsprechenden mRNA des jeweiligen Antigens angegeben (s. Tabelle 13). Die Färbung der Prostatakrebsgewebe ist in Prozent angegeben, wobei das Gewebe bei einer positiven Färbung mindestens eine mittlere Färbeintensität aufweist. Die Histologie der normalen Prostatagewebe wurde abhängig von der Stärke der Färbung in vier Kategorien eingeteilt: starke Färbung (*high*), mittlere Färbung (*medium*), geringe Färbung (*low*) und nicht detektierte Färbung (n.d.). Desweiteren wurde die Färbung normaler Zelltypen untersucht und in Prozent angegeben. Die Gewebespezifität der Antigene wurde über die RNA-Gewebekategorie bestimmt. Die RNA-Gewebekategorie gibt an, abhängig vom RNA-Level des gewünschten Proteins in 27 humanen Gewebeproben, in welchen Gewebetypen die RNA detektiert wurde. Zusätzlich gibt die RNA-Gewebekategorie darüber Auskunft, ob sich ein Protein in der Expression auf bestimmte Gewebetypen reduzieren lässt, bzw. mit einem bestimmten Gewebetyp häufiger assoziiert ist. Betrachtet man beispielsweise das Protein KLK3, so ist zu erkennen, dass 5% aller untersuchten Krebsgewebe eine mittlere bis starke Färbung durch den entsprechenden Antikörper HPA000764 aufweisen. Der verwendete Antikörper gilt als unterstützend (engl. *supportive*), was die Aussagekraft und Glaubwürdigkeit der Gewebefärbungen zusätzlich erhöht. Eine Färbung von 100% für KLK3

bei Prostatakrebs bedeutet, dass alle analysierten Prostatakrebsgewebe ($n = 10$) durch die Behandlung mit dem entsprechenden KLK3-spezifischen Antikörper mittelmäßig bis stark angefärbt wurden. Die Antikörperfärbungen der normalen Prostatagewebe zeigen ebenfalls eine starke Färbung für KLK3. Auf RNA-Ebene wurde KLK3 nur in einer der insgesamt 82 verschiedenen normalen Zelltypen detektiert. Bezogen auf die RNA-Gewebekategorie bedeutet dies eine hohe gewebespezifische Anreicherung des Proteins KLK3 in der Prostata. Somit ist gezeigt, dass KLK3 ein Prostata-spezifisches Protein darstellt, das ausschließlich im Gewebe der Prostata exprimiert wird, wobei die Expression im Falle des Prostatakarzinoms erhöht ist. Diese Ergebnisse waren zu erwarten, da es sich bei KLK3 um eines der bekanntesten Differenzierungsantigene der Prostata handelt.

Tabelle 13: Analyse der Expression aller relevanten Antigene auf Protein- und RNA-Ebene

Gen-symbol	UniprotKb ID	Antikörper	Antikörper Validation	Antikörperfärbung					RNA-Expression
				Krebs	Prostata-krebs	normale Prostata	normale Zelltypen	normale Zelltypen %	RNA Gewebe Kategorie (27)
ACPP	P15309	HPA004335	supportive	7%	100,0%	high	1/82	1,2%	Highly tissue enriched (prostate)
BCAS2	O75934	HPA054916	n.d.	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Expressed in all
CEACAM6	P40199	CAB008370	uncertain	14%	8,3%	n.d.	7/81	8,6%	Group enriched (bone marrow, colon, esophagus, gallbladder, lung)
CTNNA1	P35222	HPA029160	supportive	91%	100,0%	high	50/83	60,2%	Expressed in all
EP300	Q09472	HPA003128	supportive	48%	33,3%	100%	58/80	72,5%	Expressed in all
ETS2	P15036	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Expressed in all
FOLH1	Q04609	HPA010593	supportive	8%	83,3%	high	2/80	2,5%	Mixed
HDAC1	Q13547	HPA029693	supportive	84%	55,6%	high	75/80	93,8%	Expressed in all
HDAC2	Q92769	CAB005054	supportive	98%	100,0%	high	78/81	96,3%	Expressed in all
HDAC3	O15379	CAB005583	supportive	59%	16,7%	medium	29/77	37,7%	Expressed in all
HDGF	P51858	CAB026035	supportive	99%	100,0%	High	75/77	97,4%	Expressed in all
HIF1a	Q16665	CAB017442	uncertain	66%	0,0%	n.d.	28/78	35,9%	Expressed in all
IGF1	P05019	HPA048946	uncertain	14%	n.d.	n.d.	10/77	13,0%	Mixed
KLK2	P20151	HPA000764	supportive	5%	100,0%	high	2/80	2,5%	Highly tissue enriched (prostate)
KLK3	P07288	HPA000764	supportive	5%	100,0%	high	1/82	1,2%	Highly tissue enriched (prostate)
KLK4	Q9Y5K2	HPA051839	uncertain	2%	8,3%	high	1/79	1,3%	Highly tissue enriched (prostate)
MCL1	Q07820	HPA031125	uncertain	90%	100,0%	medium	60/82	73,2%	Expressed in all
MYLK	Q15746	HPA031677	supportive	1%	8,3%	medium	7/82	8,5%	Expressed in all
NKX3.1	Q99801	HPA025693	supportive	44%	50,0%	medium	40/80	50,0%	Moderately tissue enriched
PAWR	Q96IZ0	HPA012640	uncertain	100%	100,0%	high	69/81	85,2%	Expressed in all
PGM3	O95394	HPA029760	uncertain	33%	90,0%	high	8/82	9,8%	Expressed in all
PRUNE2	Q8WUY3	HPA031079	uncertain	91%	50,0%	medium	72/81	88,9%	Expressed in all
SCD	O00767	HPA012107	uncertain	94%	58,3%	medium	64/81	79,0%	Expressed in all
SMARCA2	P51531	HPA029981	supportive	97%	100,0%	low	58/81	71,60%	Expressed in all
SMARCA4	P51532	CAB004208	supportive	100%	100,0%	high	75/79	94,9%	Expressed in all
TF7L2	Q9NQB0	34-3800	supportive	100%	90,9%	high	78/79	98,7%	Mixed
TRPM8	Q7Z2W7	HPA024117	uncertain	44%	11,1%	low	9/79	11,4%	Group enriched (liver, prostate)
WT1	P19544	CAB000327	uncertain	23%	0,0%	n.d.	10/76	13,0%	Mixed

3.1.7 Identifizierte HLA-Klasse-I-Liganden aus tumorassoziierten Antigenen

Über den *classical approach* für die Identifikation tumorassoziiierter Antigene wurden insgesamt 28 Proteine ausgewählt, die sich aufgrund einer Prostata-spezifischen Expression, einer erhöhten Expression in Prostatakrebs oder über ihre Funktion als Zielstrukturen für die Immuntherapie des Prostatakarzinoms eignen. Über die HLA-Ligandenanalyse wurden letztlich 64 Peptidsequenzen aus den 28 über den *classical approach* identifizierten Antigenen für die weitere Analyse selektiert. Alle relevanten Peptidsequenzen sowie der Gewebersprung sind in Tabelle 14 dargestellt. Aufgrund der Sequenzhomologie innerhalb verwandter Proteinfamilien war eine eindeutige Bestimmung der Quellproteine nicht für alle Peptide möglich. Insgesamt 6 Peptidsequenzen wurden mindestens zwei verschiedenen Quellproteinen zugewiesen, wobei einem Peptid sogar 3 verschiedene Quellproteine zugewiesen wurden. Das Auftreten homologer Sequenzen ist vor allem im Kontext der peptidbasierten Immuntherapie kritisch zu betrachten, da eine gewünschte Immunreaktion zwar gegen ein Peptid, letztlich aber gegen das Antigen selbst gerichtet ist. Ist eine Peptidsequenz konserviert in verschiedenen Proteinen, so kann jedes dieser Proteine als eine Quelle für die entsprechende Sequenz dienen. Homologe Peptidsequenzen aus verschiedenen Proteinen sind demnach nicht spezifisch für ein Antigen, sondern für mehrere Antigene, wobei sich die Spezifität sowie die Höhe der Expression der Antigene voneinander unterscheiden. Aus diesem Grund wurde darauf geachtet, dass Peptidsequenzen mit mehrfacher Quellproteinannotation nur dann für die weitere Analyse selektiert wurden, falls beide bzw. alle annotierten Quellproteine eine ähnliche Expression aufweisen und zusätzlich aus der gleichen Proteinfamilie stammen. Die Peptidsequenzen RMLPHAPGV, YTTDRVMTV, EYSKQMQRV und TDRVMTVSF stammen aus den Proteinen HDAC1 und HDAC2, wobei die letzte Sequenz zudem noch in HDAC3 kodiert ist. Jedoch zeigen Proteine der HDAC-Klasse-I-Familie ein ähnliches Expressionsmuster sowie eine enge funktionale Verknüpfung mit verschiedenen Krebsarten, inklusive Prostatakrebs. Ähnlich verhält es sich mit der Peptidsequenz GGVLVHPQW, die sowohl aus dem Protein KLK2, aber auch aus dem Prostata-spezifischen Antigen KLK3 stammen kann. KLK2 zeigt ähnlich zu KLK3 eine beschränkte Expression in dem Gewebe der Prostata, sowie eine erhöhte Expression im Fall von Prostatakrebs. Zusätzlich katalysiert KLK2 die Umwandlung des Vorläufer-PSA-Proteins zu seiner enzymatisch aktiven Form³⁰². Somit eignen sich im Kontext der Immuntherapie sowohl KLK2 als auch KLK3 aufgrund der engen funktionalen Verknüpfung sowie ähnlicher Expression als Quelle für die Peptidsequenz GGVLVHPQW. Anders verhält es sich bei der Peptidsequenz KELPEYYEL aus den Quellproteinen SMARCA2 und SMARCA4. Beide Proteine stammen aus der gleichen

Proteinfamilie, besitzen jedoch gegensätzliche Funktionen im Kontext von Krebs³⁰³. Die Verwendung dieser Peptidsequenz in der Immuntherapie bleibt abhängig von der individuellen Genetik des Tumors und somit kritisch für die allgemeine Immuntherapie des Prostatakarzinoms.

Tabelle 14: Übersicht über die identifizierten HLA-Klasse-I-Liganden von Prostatagewebe

Gensymbol	Quellprotein	Sequenz	Gewebequelle
ACPP	Prostatic acid phosphatase	HDTTVSGL	106
		AHDTTVSGL	373, 407
		QHEPYPLML	373, 407
		LSGLHGQDL	381
BCAS2	Pre-mRNA-splicing factor SPF27	VYNENLVHMI	368, 411
CEACAM6	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6	VPWKEVLL	368
CTNNB1	Catenin beta-1	AQNAVRLHY	92, 106, 381, 407, 418
		LQKMVALL	106
		IEALVRTV	366
EP300	Histone acetyltransferase p300	RPKLSSPAL	368
ETS2	v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2	VMSQALKATF	368, 411
FOLH1	Prostate-specific membrane antigen	KYADKIYSI	368, 381
		YFAPGVKSY	314
HDAC1	Histone deacetylase 1	EYLEKIKQR	383
HDAC1; HDAC2	Histone deacetylase 1; 2	RMLPHAPGV	92, 368, 373, 407
		YTTDRVMTV	407, 411
		EYSKQMQRF	368, 381, 411
HDAC2		GEDPDKRISI	366
HDAC1; HDAC2; HDAC3	Histone deacetylase 1; 2; 3	TDRVMTVSF	314
HDGF	Hepatoma-derived growth factor	APGIRDHESL	368, 407, 411
		GEEKEAATL	418
HIF1a	Hypoxia-inducible factor 1-alpha	YISDNVNKY	106, 373
		APIQGSRNLL	368
		KESEVFYEL	106, 181, 418
IGF1	Insulin-like growth factor I	KISSLPTQLFK	106
		SSLPTQLFK	12, 106, 392
		ISSLPTQLFK	106
KLK2	Kallikrein-2	EPAKITDVVK	411
		SQPWQVAVY	381
		AVYTKVVHY	407
		GQRVPVSHSF	407
		QRVPVSHSF	92, 407
KLK2; KLK3	Kallikrein-2; 3	GGVLVHPQW	12

Tabelle 14: Fortsetzung 1

Gensymbol	Quellprotein	Sequenz	Gewebequelle
KLK3	Prostate-specific antigen	GQVFQVSHSF	106, 381,407
		QVFQVSHSF	381, 407
		EEFLTPKKL	301
		IRNKSVILL	12
KLK4	Kallikrein-4	HPEYNRPLL	12, 368, 381
		SESDTIRSI	366, 368, 411
		SGVLVHPQW	12
MCL1	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1	RPPPIGAEV	368
		VQRNHETAF	106, 373, 381
MYLK	Myosin light chain kinase, smooth muscle	RIIDEDFEL	407
		KVWAGKFFK	106, 306
		GTQPWFISK	12, 89, 392, 418
		GTAPAFKQK	106
		EVINYEPIGY	6, 373, 381
		EVVEGSAARF	407
		RPKSSLPPVL	368, 381
		SPQQVDFRSVL	368, 381
		EKANIVMVL	407
		FEEKANIVM	418
NKX3.1	Homeobox protein Nkx-3.1	FSHTQVIEL	106, 368, 407
		AAFSHTQVI	373
		AETEPERHL	368
		DADGHFHLI	301
PRUNE2	Protein prune homolog 2	GQVEIVTKV	89
SCD	Acyl-CoA desaturase	ITAPPSRVL	106, 368, 373, 381, 407, 418
SMARCA2; SMARCA4	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 2; 4	KELPEYYEL	368
TF7L2	Transcription factor 7-like 2	DVQAGSLQSR	383
TRPM8	Transient receptor potential cation channel subfamily M member 8	IMLQRMLI	381
WT1	Wilms tumor protein	RVPGVAPTL	366

Abgebildet sind alle über den *classical approach* selektierten Peptidsequenzen mit zugehörigem Quellprotein. Neben der entsprechenden Sequenz wurde zusätzlich die Gewebequelle angegeben.

Pro Antigen wurde mindestens eine Peptidsequenz aus den entsprechend prozessierten Peptiddaten ausgewählt, wobei auch mehr als 10 Peptidsequenzen pro Antigen ausgewählt wurden (MYLK). Werden Peptide gleicher Sequenz auf verschiedenen Gewebeproben identifiziert, so spricht dies im Allgemeinen für die Relevanz der entsprechenden Peptidsequenz auf diesem Gewebe. Ein Beispiel hierfür wäre die Peptidsequenz ITAPPSRVL aus dem Protein SCD oder die Sequenz AQNAVRLHY aus dem Antigen CTNNB1, die insgesamt auf 6 bzw. 5 verschiedenen Prostatageweben identifiziert wurden. Wurden andererseits verschiedene Peptidsequenzen aus demselben Protein identifiziert, spricht dies neben der Präsenz des jeweiligen Antigens auch für eine Relevanz dieses Proteins in den untersuchten Gewebeproben, in diesem Fall das Prostatakarzinom. Zu den am häufigsten auf Prostatagewebe detektierten Antigenen gehört MYLK, dessen Peptidsequenzen auf mehr als 13 verschiedenen Gewebeproben identifiziert wurden.

3.1.8 Bestätigung der Peptidsequenzen über synthetische Peptide

Wie in Abschnitt 2.4.1 bereits erwähnt, wurde die Prozessierung der HLA-Klasse-I-Liganden von Prostatagewebe angepasst, um die Zahl an erhaltenen Peptidsequenzen für das Screening nach HLA-Liganden aus TAA der Prostata zu erhöhen. Die zusätzlich gewonnenen Peptidsequenzen zeichnen sich jedoch durch qualitativ schlechtere Fragmentspektren und damit verbundene Sequenzannotation aus, wodurch eine manuelle Interpretation und Validierung der zugehörigen Peptidsequenzen erschwert wurde.

Aufgrund der Zielsetzung dieser Arbeit und der damit verbundenen Herstellung einer Multipeptidvakzine für die Therapie des Prostatakarzinoms ist die Bestätigung der Primärsequenz der selektierten HLA-Liganden von enormer Bedeutung. Da die Identifikation der HLA-Liganden ausschließlich massenspektrometrisch über die entsprechenden Fragmentspektren erfolgte, wurde die Validierung der Peptidsequenzen ebenfalls massenspektrometrisch über die Fragmentierung der entsprechenden synthetischen Peptide durchgeführt. Dadurch wurde sichergestellt, dass die selektierten Peptidsequenzen tatsächlich das entsprechende Fragmentspektrum produzieren und die jeweiligen Fragmentationen nicht rein zufällig oder durch das Einwirken von Messartefakten entstanden sind. Hierzu wurden synthetische Peptide der entsprechenden Sequenzen von der Peptid-Crew synthetisiert und mit der gleichen Methode massenspektrometrisch untersucht wie auch schon die natürlich identifizierten Sequenzen. Durch die Überlagerung von synthetischem und natürlichem Fragmentspektrum wurde gezeigt, dass es sich bei den selektierten Peptiden tatsächlich um die vermuteten Peptidsequenzen handelte. Ein Beispiel für die Validierung der Liganden über synthetische Peptide gleicher Sequenz ist in Abbildung 21 dargestellt.

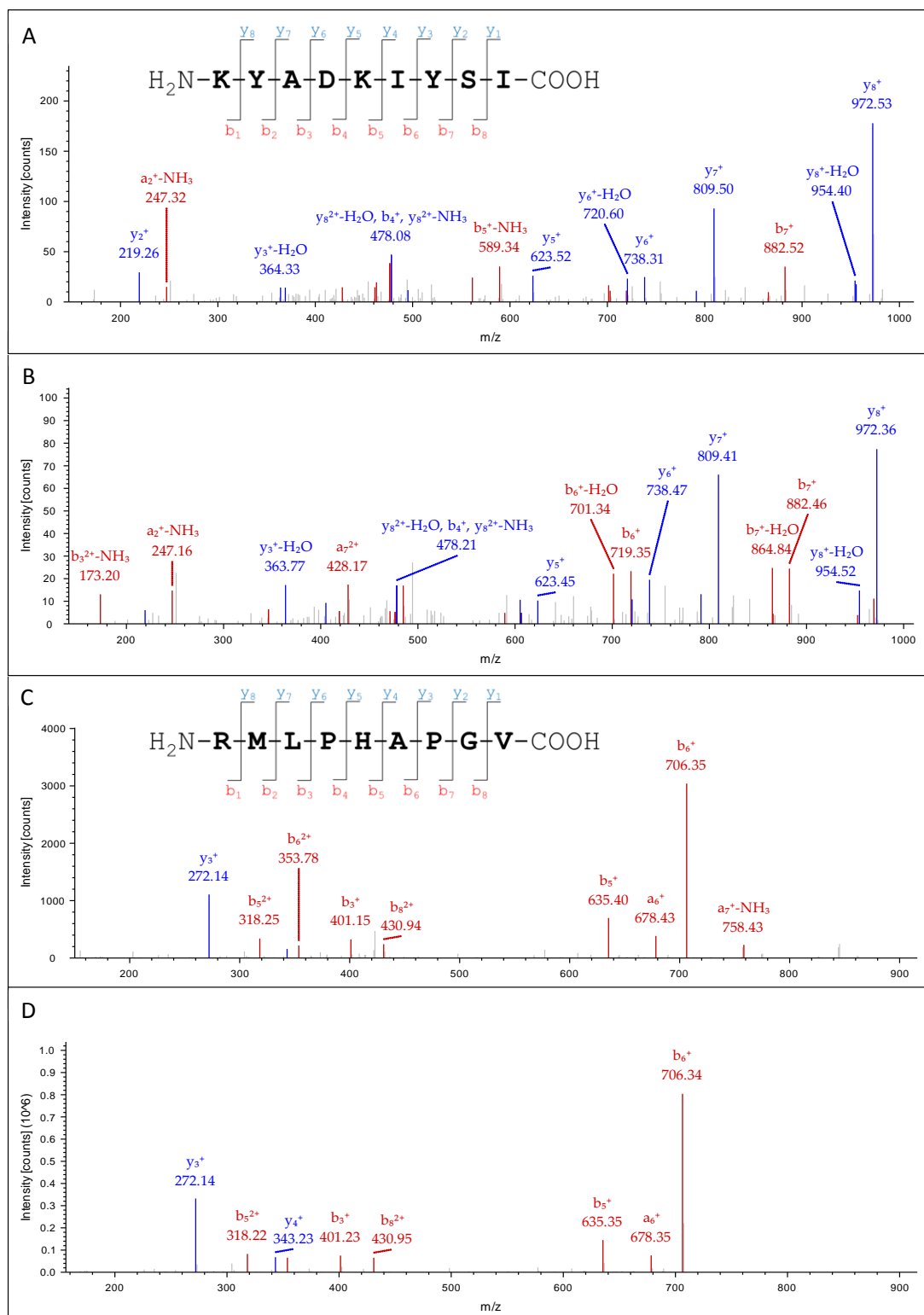


Abbildung 21: Validierung der Fragmentspektren über synthetische Peptide gleicher Sequenz

Abgebildet ist das Fragmentspektrum des natürlichen Peptids KYADKIYSI aus FOLH1 (A) mit entsprechendem synthetischem Peptid (B) sowie das natürliche Fragmentspektrum des Peptids RMLPHAGV aus HDAC1/HDAC2 (C) mit entsprechendem synthetischen Peptid (D).

Die natürlichen Peptidsequenzen sind in A und C dargestellt, wobei die korrespondierenden Fragmentspektren der synthetischen Sequenzen jeweils darunter in B und D dargestellt sind. War das synthetische Fragmentspektrum identisch zu dem Spektrum des natürlichen HLA-Liganden, so wurde die Sequenz und somit das Peptid als einwandfrei identifiziert angesehen.

Die Mehrheit der selektierten Peptidsequenzen wurde auf verschiedenen Geweben identifiziert. Es war daher notwendig, jedes Fragmentspektrum der entsprechenden Peptidsequenz über den Vergleich mit dem synthetischen Fragmentspektrum zu bestätigen, um so die einwandfreie Identifikation des natürlichen HLA-Liganden auf der jeweiligen Gewebeprobe zu verifizieren.

Aufgrund der Identifikation von Peptiden gleicher Sequenz auf verschiedenen Gewebeproben sowie der großen Anzahl an überprüften synthetischen Peptiden wurde darauf verzichtet, alle Fragmentspektren der natürlichen Peptidkandidaten mit den korrespondierenden synthetischen Fragmentspektren abzubilden. Stattdessen wurden in Tabelle 15 alle relevanten Peptididentifikationen der jeweiligen Gewebeproben sowie die Verifikation über das entsprechende synthetische Peptid aufgelistet.

Insgesamt wurden weit mehr als 100 synthetische Peptide hergestellt und mit dem Fragmentspektrum der natürlichen Peptidsequenz verglichen. Allerdings werden im weiteren Verlauf nur Peptidsequenzen behandelt, deren Quellproteine auch über den *classical approach* als tumorassoziiert identifiziert wurden.

Tabelle 15: Identifizierte HLA-Klasse-I-Liganden mit synthetischer Peptidverifikation

Gensymbol	UniProtKB ID	Konfidenz	Sequenz	<i>Ion Score</i>	Gewebe	SynPep bestätigt
ACPP	P15309	Low	HDTTVSGL	24	106	x
	P15309	Low	AHDTTVSGL	35	407	x
	P15309	High	AHDTTVSGL	37	373	x
	P15309	High	QHEPYPLmL	43	407	x
	P15309	High	QHEPYPLmL	27	373	x
	P15309	Low	LSGLHGQDL	45	381	x
BCAS2	O75934	High	VYNENLVHMI	20	411	x
	O75934	High	VYNENLVHmI	41	368	x
CEACAM6	P40199	Low	VPWKEVLL	20	368	x
CTNNB1	P35222	High	AQNAVRLHY	44	418	x
	P35222	High	AQNAVRLHY	62	381	x
	P35222	High	AQNAVRLHY	56	407	x
	P35222	High	AQNAVRLHY	27	92	x
	P35222	High	AQNAVRLHY	51	106	x
	P35222	Low	IEALVRTV	28	366	x
	P35222	Medium	LQKMVALL	34	106	x
EP300	Q09472	Low	RPKLSSPAL	24	368	x
ETS2	P15036	Low	VMSQALKATF	48	368	x
	P15036	High	VMSQALKATF	43	411	x
FOLH1	Q04609	High	KYADKIYSI	26	381	x
	Q04609	Low	KYADKIYSI	25	368	x
	Q04609	Low	YFAPGVKSY	17	314	x
HDAC1	Q13547	High	EYLEKIKQR	25	383	x
HDAC1, 2	Q13547; Q92769	Medium	RMLPHAPGV	40	407	x
	Q13547; Q92769	Low	RmLPHAPGV	33	368	x
	Q13547; Q92769	Low	RMLPHAPGV	18	92	x
	Q13547; Q92769	Low	RmLPHAPGV	19	373	x
	Q13547; Q92769	High	YTTDRVMTV	50	407	x
	Q13547; Q92769	High	YTTDRVMTV	28	411	x
	Q13547; Q92769	High	EYSKQMQRF	48	381	x
	Q13547; Q92769	High	EYSKQMQRF	50	411	x
HDAC1, 2, 3	Q13547; Q92769; O15379	Low	TDRVMTVSF	18	314	x
	Q92769	High	GEDPDKRISI	30	366	x
HDGF	P51858	High	APGIRDHESL	40	407	x
	P51858	High	APGIRDHESL	39	411	x
	P51858	Low	APGIRDHESL	26	368	x
	P51858	Medium	GEEKEAATL	41	418	x
HIF1a	Q16665	High	YISDNVNKY	40	106	x
	Q16665	High	YISDNVNKY	22	373	x
	Q16665	Low	APIQGSRNLL	29	368	x
	Q16665	Low	KESEVFYEL	21	418	x
	Q16665	Low	KESEVFYEL	20	181	x
	Q16665	Low	KESEVFYEL	23	106	x
IGF1	P05019	High	KISSLPTQLFK	43	106	x
	P05019	High	SSLPTQLFK	39	12	x
	P05019	High	SSLPTQLFK	55	106	x
	P05019	Low	SSLPTQLFK	47	392	x
	P05019	Low	ISSLPTQLFK	24	106	x

Tabelle 15: Fortsetzung 1

Gensymbol	UniProtKB ID	Konfidenz	Sequenz	Ion Score	Gewebe	SynPep bestätigt
KLK2	P20151	Medium	EPAKITDVVK	24	411	x
	P20151	Low	SQPWQVAVY	31	381	x
	P20151	Medium	AVYTKVVHY	25	407	x
	P20151	Low	QRVPVSHSF	20	92	x
	P20151	Low	QRVPVSHSF	21	407	x
	P20151	High	GQRVPVSHSF	51	407	x
KLK2, KLK3	P20151; P07288	Low	GGVLVHPQW	29	12	x
KLK3	P07288	High	GQVFQVSHSF	52	381	x
	P07288	High	GQVFQVSHSF	63	407	x
	P07288	High	GQVFQVSHSF	29	106	x
	P07288	High	QVFQVSHSF	32	381	x
	P07288	High	QVFQVSHSF	32	407	x
	P07288	Low	EEFLTPKKL	25	301	x
	P07288	Low	IRNKSVILL	16	12	x
KLK4	Q9Y5K2	Medium	HPEYNRPLL	23	381	x
	Q9Y5K2	Low	HPEYNRPLL	19	368	x
	Q9Y5K2	Medium	HPEYNRPLL	20	12	x
	Q9Y5K2	High	SESDTIRSI	45	411	x
	Q9Y5K2	Low	SESDTIRSI	18	368	x
	Q9Y5K2	Low	SGVLVHPQW	29	12	x
MCL1	Q07820	Low	RPPPIGAEV	24	368	x
	Q07820	High	VQRNHETAF	39	381	x
	Q07820	Low	VQRNHETAF	23	106	x
	Q07820	High	VQRNHETAF	34	373	x
MYLK	Q15746	Low	RIIDEDFEL	32	407	x
	Q15746	High	KVWAGKFFK	47	106	x
	Q15746	High	GTQPWFISK	59	418	x
	Q15746	Low	GTQPWFISK	19	89	x
	Q15746	Low	GTQPWFISK	30	12	x
	Q15746	High	GTQPWFISK	38	392	x
	Q15746	Medium	GTAPAFKQK	39	106	x
	Q15746	High	EVINYEPIGY	32	6	x
	Q15746	High	EVINYEPIGY	45	381	x
	Q15746	Medium	EVINYEPIGY	29	373	x
	Q15746	High	EVVEGSAARF	55	407	x
	Q15746	High	RPKSSLPPVL	33	381	x
	Q15746	Low	RPKSSLPPVL	21	368	x
	Q15746	High	SPQQVDFRSVL	37	381	x
	Q15746	Medium	SPQQVDFRSVL	36	368	x
	Q15746	High	EKANIVMVL	40	407	x
	Q15746	Medium	FEEKANIVM	37	418	x
Q15746	Low	SENGSKLTI	16	411	x	
Q15746	High	DAFEKANI	26	411	x	

Tabelle 15: Fortsetzung 2

Gensymbol	UniProtKB ID	Konfidenz	Sequenz	<i>Ion Score</i>	Gewebe	SynPep bestätigt
NKX3.1	Q99801	Medium	FSHTQVIEL	27	407	x
	Q99801	Medium	FSHTQVIEL	23	368	x
	Q99801	High	FSHTQVIEL	25	106	x
	Q99801	Low	AAFSHTQVI	17	373	x
	Q99801	Low	AETEPERHL	21	368	x
PGM3	O95394	Low	DADGFHFLI	19	301	x
PRUNE2	Q8WUY3	High	GQVEIVTKV	41	89	x
SCD	O00767	Low	ITAPPSRVL	23	418	x
	O00767	Medium	ITAPPSRVL	33	381	x
	O00767	High	ITAPPSRVL	45	407	x
	O00767	Low	ITAPPSRVL	22	368	x
	O00767	Low	ITAPPSRVL	24	106	x
	O00767	Low	ITAPPSRVL	30	373	x
SMARCA2, SMARCA4	P51531; P51532	Medium	KELPEYYEL	38	368	x
TCF7L2	Q9NQB0	Low	DVQAGSLQSR	49	383	x
TRPM8	Q7Z2W7	Low	IMLQRMLI	31	381	x
WT1	P19544	Low	RVPGVAPTL	26	366	x

Abgebildet sind das Gensymbol und die entsprechende UniProtKB ID des Quellproteins sowie die Konfidenz der jeweiligen Peptididentifikation. Neben der Peptidsequenz wurde der *Ion Score* der Peptidannotation und die jeweilige Gewebequelle angegeben. Zusätzlich wurde angegeben, ob die Sequenzbestätigung über das synthetische Peptid erfolgreich war. m = oxidiertes Methionin.

In Tabelle 15 ist neben der Konfidenz der Peptididentifikationen auch der *Ion Score* aller selektierten Sequenzen aufgeführt. Der *Ion Score* wie auch die FDR-basierte Bewertung der Peptid-zu-Spektrum Annotationen liefern Informationen über die Glaubwürdigkeit einer Peptidannotation zu einem Fragmentspektrum. Allerdings wurden, wie in 2.4.1 beschrieben, die Kriterien für die Peptididentifikation gelockert, um die Datenmenge für das Screening nach Peptiden aus relevanten Antigenen zu erhöhen. Bei einem in der Proteomik üblichen Grenzwert der FDR von 5% und einem *Ion Score*-Grenzwert von 20 wäre der Großteil der gezeigten Sequenzen nicht identifiziert worden. Durch eine Lockerung der FDR wurden insgesamt 46 zusätzliche relevante Peptidsequenzen identifiziert und über den Vergleich mit synthetischen Peptiden bestätigt (Konfidenz = *low*). Durch die Erniedrigung des *Ion Score*-Grenzwertes auf 15 wurden zusätzlich 11 Peptidsequenzen identifiziert und ebenfalls über synthetische Peptide gleicher Sequenz bestätigt.

3.1.9 Bestimmung der HLA-Expression verschiedener Prostatagewebe

Aufgrund der geringen Probenmenge sowie technischen Schwierigkeiten war eine HLA-Typisierung der erhaltenen Prostatagewebe bis auf Pro006 nicht möglich. Weiterhin konnten weder die Patienten für eine nachträgliche HLA-Typisierung noch die in der Klinik gelagerten Paraffin-Gewebeblöcke für die Typisierung genutzt werden. Jedoch spielt die

HLA-Expression der jeweiligen Gewebeprobe eine elementare Rolle für die einwandfreie Identifikation der HLA-Liganden, da jeder HLA-Ligand sequenzabhängig über seine Ankeramino-säuren nur an ein einzelnes oder an wenige HLA-Moleküle binden kann.

Aus diesem Grund wurde eine neue Strategie entwickelt, die es erlaubt, die HLA-Restriktion bereits analysierter Gewebeproben aufzuklären. Hierzu wurden verschiedene massenspektrometrische aber auch Datenbank-basierte Methoden angewandt. Im ersten Schritt wurde versucht, die häufigsten HLA-Restriktionen aller Peptidsequenzen einer Gewebeprobe über eine spezielle Software vorrauszusagen. Aufgrund des experimentellen Aufbaus der HLA-Affinitätschromatographie sollten ausschließlich Peptide aufgereinigt werden, die ihrerseits an HLA-Klasse-I-Moleküle binden. Unter Verwendung von Epitop-Vorhersageprogrammen war es möglich, die häufigsten HLA-Restriktionen innerhalb einer Gewebeprobe zu ermitteln. Dabei wurde davon ausgegangen, dass pro Gewebe maximal zwei verschiedene HLA-A- bzw. HLA-B-Allotypen exprimiert wurden. Allerdings ist diese Form der Analyse stark abhängig von den verwendeten Datenbanken bzw. von den in jeder Datenbank vorhandenen HLA-Allelen. Die öffentlich erreichbaren Datenbanken SYFPEITHI und NetMHC unterscheiden sich nicht nur in der zugrundeliegenden Berechnung der Affinität einer gegebenen Sequenz zu einem HLA-Allel, sondern auch in der Abdeckung der HLA-Allele, die jeder der Datenbanken zu Verfügung stehen. Es wurden beide Programme für die Aufklärung der Restriktion der eluierten Peptide genutzt, um so die maximale Anzahl an verfügbaren HLA-Allelen abzudecken.

Die Epitopvorhersage mit SYFPEITHI basiert auf experimentell gewonnenen HLA:Peptid Daten, die in Matrizen für jedes der entsprechenden HLA-Allele übersetzt wurden. Die Bewertung erfolgt hierbei für jedes Peptid:HLA-Paar einzeln und abhängig von der Länge der eingesetzten Sequenz. Allerdings bewertet SYFPEITHI unterschiedliche Allotypen mit verschiedenen maximal erreichbaren Punktzahlen, weshalb die Grenze für ein tatsächlich bindendes Peptid zu einem HLA-Molekül prozentual über die Maximalpunktzahl berechnet wurde. Um sicherzustellen, dass ein Peptid tatsächlich ein gegebenes HLA-Molekül bindet, wurde der Grenzwert auf 60% des maximal erreichbaren Punktwertes für jede HLA-Matrize festgelegt. Im Gegensatz hierzu beruht die Bewertung eines HLA:Peptid-Paares durch NetMHC zwar ebenfalls auf experimentell gewonnen Daten, jedoch bewertet das Programm die Interaktion von Peptiden mit HLA-Molekülen über die Affinität bzw. den IC50-Wert. Die halbmaximale inhibitorische Konzentration (engl. *half maximal inhibitory concentration*, IC50) wird dabei in nM angegeben und sagt aus, bei welcher Konzentration ein bestimmtes Peptid zu 50% an ein definiertes HLA-Molekül bindet. Liegt die Konzentration zwischen 50 nM und 500 nM, so bezeichnet man die Sequenz als schwachen Binder, liegt sie darüber, wird die Sequenz als Nichtbinder, liegt sie darunter, wird die Sequenz als starker Binder angesehen.

Für die Analyse der HLA-Liganden in NetMHC wurden nur starke und schwache Binder bis zu einem IC50 von maximal 500 nM in Betracht gezogen. Um die Untersuchung der HLA-Restriktion über SYFPEITHI und NetMHC zu erleichtern, wurde in Kooperation mit Linus Backert das Programm „Ligandomat“ erstellt, das eine vergleichende Analyse der HLA-Restriktion in beiden Programmen erlaubt. Jede Peptidsequenz einer Gewebeprobe wurde dabei gegen jeden vorhandenen HLA-A- und HLA-B-Allotypen in der jeweiligen Datenbank prozessiert, wobei jeder Peptidsequenz nur der beste HLA-Allotyp mit der höchsten Punktzahl bzw. mit der höchsten Affinität zugewiesen wurde. Anhand der Verteilung der häufigsten HLA-Allele ließen sich auf diese Weise Aussagen über die wahrscheinlichste HLA-A- und HLA-B-Expression innerhalb eines Gewebes treffen. Die Auswertung der Prostatagewebe über den Ligandomat wird beispielhaft in Abbildung 22 für das Gewebe Pro006 gezeigt, da diese Probe als einziges Gewebe HLA-typisiert vorlag. Es ist zu erkennen, dass in SYFPEITHI (blau) HLA-A*26 die höchste Abdeckung innerhalb der Gewebeprobe besitzt, gefolgt von HLA-A*02, HLA-B*15 und HLA-B*13. Werden die Ergebnisse in SYFPEITHI alleine betrachtet, so wäre die Expression von HLA-A*02, -A*26, -B*13 und HLA-B*15 der Probe Pro006 wahrscheinlich. In NetMHC allerdings wäre dagegen nur die Expression von HLA-A*02 bzw. die Expression von HLA-A*26 aufgrund der Häufigkeit der assoziierten Peptidsequenzen wahrscheinlich. Die Datenbank NetMHC Ver. 3.4 besitzt keine Informationen zu HLA-B*13, weshalb eine Identifikation HLA-B*13-restringierter Peptidsequenzen über NetMHC nicht möglich war. Ähnlich verhält es sich mit HLA-A*26, das in SYFPEITHI nur über HLA-A*26:01, bzw. in NetMHC nur durch HLA-A*26:02 vertreten ist. Dennoch zeigt die Analyse der Peptidsequenzen über den Ligandomat einen klaren Trend in der HLA-Restriktion, weshalb diese Methode zumindest die vermeintlich am wahrscheinlichsten exprimierten HLA-A- und HLA-B-Allele einer Gewebeprobe ermitteln kann. Die HLA-Typisierung der Probe Pro006 über den Ligandomat lautet demnach HLA-A*02, HLA-A*26, HLA-B*13 und HLA-B*15, wobei die Evidenz für die HLA-B Allele am geringsten ist. Diese Ergebnisse decken sich mit der HLA-Typisierung der Probe Pro006.

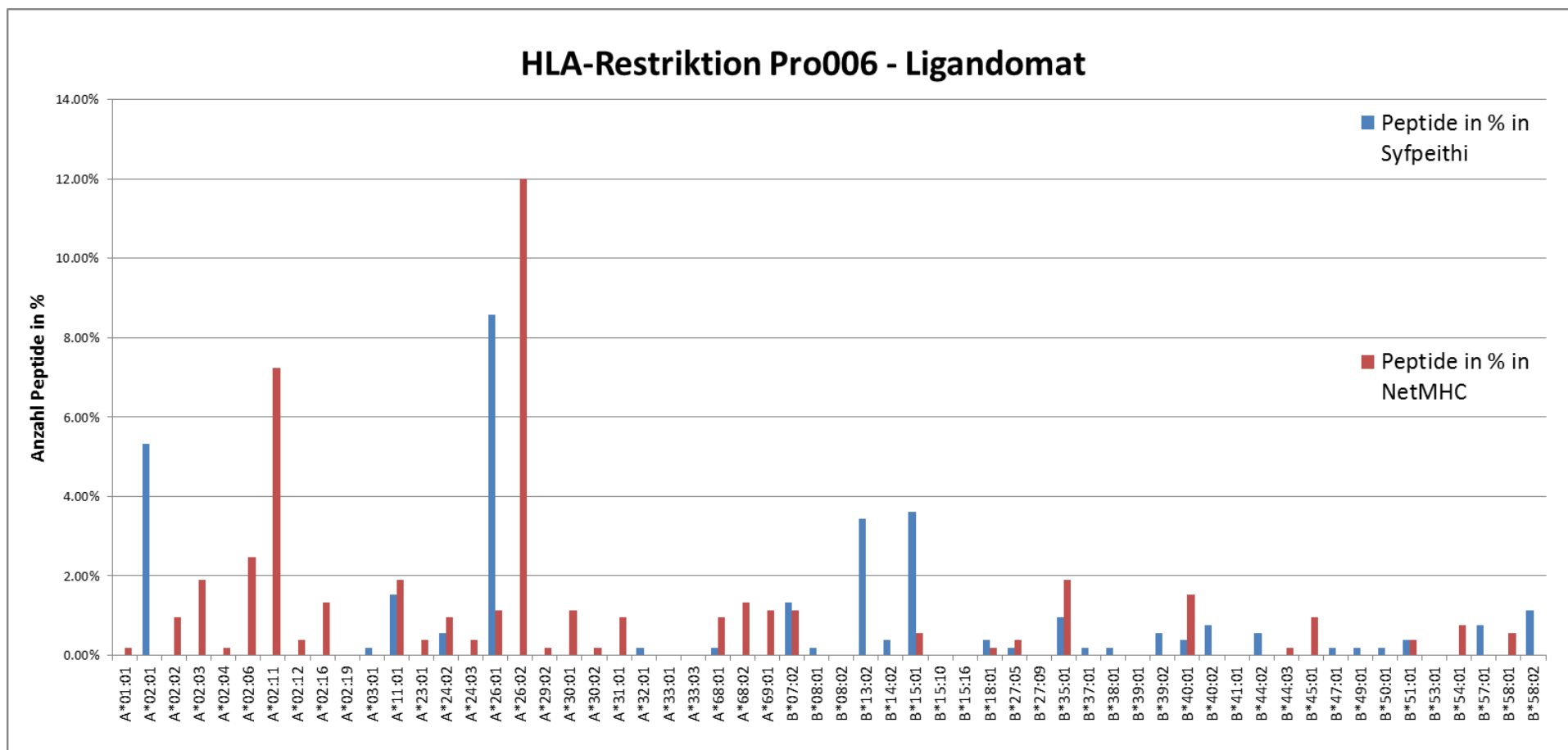


Abbildung 22: Verteilung der HLA-Restriktion der Peptidsequenzen aus Pro006

Abgebildet sind die berechneten HLA-Restriktionen der Peptide innerhalb der Prostatagewebeprobe Pro006 in Prozent, wobei für jede Peptidsequenz nur das HLA-Molekül mit der höchsten SYFPEITHI Punktzahl bzw. mit der höchsten Affinität in NetMHC gewertet wurde. Von insgesamt 525 Peptidsequenzen (keine FDR) der Probe Pro006 wurden in SYFPEITHI 171 Peptide und in NetMHC 241 Peptide klar einem HLA-Allotyp zugewiesen, falls in SYFPEITHI ein Grenzwert von 60% der Maximalpunktzahl bzw. in NetMHC ein maximaler IC50 von 500 nM als Grenzwert gesetzt wurde.

Im nächsten Schritt wurde versucht, die durch den Ligandomat generierten Ergebnisse auf experimenteller Basis zu überprüfen und dadurch zu bestätigen. Als Probenmaterial dienten die Rückstände der HLA-Proteine auf der Membran der Ultrafiltrationseinheiten. Für die Bestimmung der HLA-Expression der analysierten Gewebe wurden die im „Zentrikon“ zurückgehaltenen HLA-Moleküle aus dem Schritt der HLA-Affinitätschromatographie zuerst mit dem Enzym Trypsin verdaut und anschließend massenspektrometrisch analysiert. Diese *bottom-up*- oder auch *shotgun*-Methode ist ein in der Proteomik übliches Verfahren für die massenspektrometrische Identifikation von Proteinen, wobei in diesem Zusammenhang die Filterkriterien für eine erfolgreiche Identifikation strenger gewählt wurden als für das Screening nach relevanten HLA-Liganden aus TAA. Ziel war es, Peptidsequenzen aus HLA-Molekülen zu identifizieren, die ihrerseits nur in einem bis maximal 20 verschiedenen HLA-Molekülen homolog sind. Über die Kombination verschiedener Peptidsequenzen aus HLA-Klasse-I-Molekülen war es möglich, die wahrscheinlichsten HLA-A- und HLA-B-Allotypen jeder Gewebeprobe über das Ausschlussverfahren zu ermitteln. Jedoch war es für die meisten Gewebeproben mit dieser Methode nicht möglich, die Auswahl auf maximal zwei Allele pro Genort zu beschränken, da durch die große Homologie der HLA-Moleküle zueinander meist nur eine Kombination aus verschiedenen Allelen für jeden Genort identifiziert wurde. Ein weiteres Problem in diesem Zusammenhang ist das Auftreten einer homozygoten Allelexpression, die mit dieser Methode nicht zweifelsfrei belegt werden kann. Zusätzlich bedarf diese Methode einer ausreichenden Menge an Ausgangsmaterial, was jedoch aufgrund der geringen Massen der Prostatagewebe nicht für alle Proben gegeben war.

Über die Kombination beider Verfahren wurde geprüft, ob die vorhergesagte HLA-Restriktion der eluierten HLA-Liganden mit den HLA-Molekülen, die über die *bottom-up*-Proteomik identifiziert wurden, übereinstimmen. Lässt sich die Mehrzahl der Peptidsequenzen einer Gewebeprobe definierten HLA-Allotypen zuweisen und wurden diese ebenfalls allein oder über die Kombination verschiedener Allotypen über die *shotgun*-Methode identifiziert, so wurde die relevante HLA-Expression in dieser Gewebeprobe als bestätigt betrachtet. Allerdings war eine Bestätigung der tryptischen Peptidsequenzen über synthetische Peptide aufgrund längerer Sequenzen und damit verbundener Mehrfachladung nicht möglich, weshalb ausschließlich Peptidsequenzen mit einer $FDR \leq 5\%$ und einem *Ion Score* ≥ 20 für die Analyse in Betracht gezogen wurden. Mittels der HLA-Typisierung über die HLA-Liganden wurden jeder Gewebeprobe mindestens zwei HLA-Allele bzw. Allelkombinationen zugewiesen. Die HLA-Typisierung über die *bottom-up*- bzw. *shotgun*-Methode lieferte Informationen über die HLA-Expression von 11 der 21 analysierten Gewebeproben, wobei die Analyse der restlichen 10 Gewebeproben keine rele-

vanten Peptidsequenzen aus HLA-Molekülen lieferte. Die Ergebnisse aus dem Verdau der HLA-Moleküle sind in Tabelle 16 dargestellt. Die Vorgehensweise wird beispielhaft anhand der Probe Pro366 erleutert. Über die *shotgun*-Methode wurden insgesamt 7 Peptidsequenzen aus HLA-A- und 3 Sequenzen aus HLA-B-Molekülen identifiziert (s. Tabelle 17). Nur 3 der Sequenzen wurden einem einzigen Protein zugeordnet, dem HLA-A*03, welches somit als bestätigt angesehen wurde. Die Sequenzen APWIEQEGPEYWDEETGK, FGCDVGS DGR und AYLEGTCVDGLR stammen aus den HLA-A*23 und -A*24, weshalb eine Unterscheidung beider Moleküle über diese Sequenzen nicht möglich war. Allerdings lässt sich über die Kombination mit einem weiteren Peptid, der Sequenz SWTAADMAAQITQR, das HLA-A*23 über das Ausschlussverfahren bestätigen, da die Sequenz zwar in HLA-A*23 homolog ist, nicht aber in HLA-A*24. Unter den Sequenzen aus HLA-B war das Peptid GHDQYAYDGK die einzige Sequenz, die nur in einem HLA-B-Allel kodiert war, dem HLA-B*07. Die zwei Sequenzen GYNQLAYDGK und YFHTAMSR stammen aus den Proteinen HLA-B*45, -B*49, -B*50 bzw. aus HLA-B*41, -B*45, -B*49 und -B*50. Somit wäre der gemeinsame Ursprung der Peptide nur auf HLA-B*45, -B*49 oder HLA-B*50 zurückzuführen, da das zweite HLA-B-Allel bereits als HLA-B*07 identifiziert wurde. Vergleicht man nun die Ergebnisse der *bottom-up*-Proteomik mit den Daten der HLA-Liganden Analyse, so lässt sich die wahrscheinlichste HLA-Expression der Gewebeprobe bestimmen. Die HLA-Ligandenanalyse identifizierte die Paare HLA-A*23/HLA-A*24 bzw. HLA-A*03/HLA-A*11 als die am wahrscheinlichsten exprimierten HLA-A-Allele innerhalb von Probe Pro366. Aufgrund der ähnlichen Motive dieser Moleküle war eine weitere Unterscheidung mit Hilfe der HLA-Liganden nicht möglich. Als die häufigsten HLA-B-Restriktionen innerhalb von Pro366 wurden HLA-B*07 und HLA-B*49 identifiziert. Folglich lautet die HLA-Typisierung von Pro366 unter Berücksichtigung beider Methoden HLA-A*03, HLA-A*23, HLA-B*07 und HLA-B*49.

Tabelle 16: Übersicht der HLA-Typisierung der Prostatagewebe

Gewebe	HLA-Allele definiert über Liganden	HLA-Allele definiert über <i>bottom-up</i> -Proteomik	Finale HLA-Typisierung
Pro106	A*03, B*37, B*15	A*03, B*37, (B*15\B*35\B*46\B*53\B*57\B*58)	A*03, B*37, B*15
Pro301	A*02, B*44, B*51	A*02, B*44, (B*08\B*51\B*78)	A*02, B*44, B*51
Pro366	(A*03\A*11), (A*23\A*24), B*07, B*49	A*03, A*23, B*07, (B*45\B*49\B*50)	A*03, A*23, B*07, B*49
Pro314	(A*03\A*11), B*07, B*47	A*03, B*07, B*47	A*03, B*07, B*47
Pro407	A*02, A*68, B*39, B*15	A*68, (A*02\A*69), (B*38\B*39\B*67), (B*13\B*15\B*35\B*44\B*47\B*51\B*52\ B*53\ B*59)	A*02, A*68, B*39, B*15
Pro373	A*02, A*26, B*15, (B*38\B*39)	A*02, B*15, (A*26\A*43), (B*38\B*39\B*67)	A*02, A*26, B*15, (B*38\B*39)
Pro411	A*24, A*68, B*44, B*51	A*24, A*68, B*44, (B*51\B*08)	A*24, A*68, B*44, B*51
Pro418	B*40, B*08	A*30, A*32, B*08, (B*40\B*41)	A*30, A*32, B*40, B*08
Pro089	A*03, B*13, B*39	A*03, A*30, B*13, (B*08\B*14\B*39\B*78)	A*03, A*30, B*13, B*39
Pro368	A*02, A*24, B*07, B*40	A*02, A*24, B*07, (B*40\B*41)	A*02, A*24, B*07, B*40
Pro381	A*24, A*26, B*07, B*15	A*24, B*07, (A*26\A*43), (B*13\B*15\B*44\B*47\B*52)	A*24, A*26, B*07, B*15
Pro353	A*02, B*07, B*18	A*30, B*18, B*07, (A*02\A*69)	A*02, A*30, B*07, B*18
Pro006	A*02, A*26, B*13, B*15	n.d.	A*02, A*26, B*13, B*15
Pro092	A*01, A*02, B*27, B*35	n.d.	A*01, A*02, B*27, B*35
Pro306	(A*03\A*11), (A*23\A*24), B*07	n.d.	(A*03\A*11), (A*23\A*24), B*07
Pro392	A*11, A*68, B*35, B*51	n.d.	A*11, A*68, B*35, B*51
Pro012*	A*01, A*11, B*07, B*57	n.d.	A*01, A*11, B*07, B*57
Pro383	A*11, A*68	n.d.	A*11, A*68
Pro344	A*01, A*26, B*49	n.d.	A*01, A*26, B*49
Pro181	A*01, A*26, B*15, B*37	n.d.	A*01, A*26, B*15, B*37
Pro386	A*02, B*07, B*35	n.d.	A*02, B*07, B*35

Abgebildet sind alle bearbeiteten Prostatagewebe sowie die vermutete HLA-Typisierung über die HLA-Liganden bzw. über die verdauten HLA-Moleküle. Konnte innerhalb eines Gewebes nicht zwischen zwei oder mehreren HLA-Allelen unterschieden werden, so wurden die HLA-Allele in Klammern zusammengefasst. n.d. = nicht detektiert.

Tabelle 17: Nach der *shotgun*-Methode identifizierte tryptische Peptide aus HLA-A und HLA-B

Gewebe	HLA-Allele identifiziert über tryptische Peptide	Sequenz	UniprotKB ID
Pro368	HLA-A*24	WEAAHVAEQQR	P05534
		KWEAAHVAEQQR	P05534
	HLA-A*02	APWIEQEGPEYWDGETRK	P01892
		MYGCDVGSDWR	P01892;P10316
	HLA-B*07	GHDQYAYDGK	P01889
		GHDQYAYDGKDYIALNEDLR	P01889
	HLA-B*40, -B*41	VDDTLFVR	P03989;Q04826;P30479;P30481;P30483;P30485;P30487;P30488
FSDATSPR		P30461;Q04826;P30479;P30481;P30483;P30485;P30487;P30488	
GHNQYAYDGK		P30460;Q04826;P30479;P30480;P30486;P18464;P30490;P30498;Q31610	
Pro089	HLA-A*03	AYLDGTCVEWLR	P04439
		LDGTCVEWLR	P04439
		KWEAAHEAEQLR	P04439
		WEAAHEAEQLR	P04439
		YLDGTCVEWLR	P04439
		DGTCVEWLR	P04439
	HLA-A*30	SVSRPGSGEPR	P16188
		STSVSRPGSGEPR	P16188
	HLA-B*13	DYIALNEDLSSWTAADTAAQITQLK	P30461
		SWTAADTAAQITQLK	P30461
HLA-B*08, -B*14, -B*39, -B*78	TNTQTDRESLR	P30460;P30462;P30475;P30498	
Pro106	HLA-A*03	AYLDGTCVEWLR	P04439
		KWEAAHEAEQLR	P04439
		WEAAHEAEQLR	P04439
	HLA-B*37	MSGCDVGPDGR	P18463
	HLA-B*15, -B*35, -B*46, -B*53, -B*57, -B*58	GHDQSAYDGK	P30464;P30466;P30685;P30484;P30491;P18465;P10319
		YFYTAMSR	P30461;P30464;P30685;P30481;P30484;P30485;P18464;P30490;P30491;P30492;P30493;P30495;P18465;P10319;Q29940;P30498;Q29718
		YFYTAMSRPGR	P30461;P30464;P30685;P30481;P30484;P30485;P18464;P30490;P30491;P30492;P30493;P30495;P18465;P10319;Q29940;P30498;Q29718

Tabelle 17: Fortsetzung 1

Gewebe	HLA-Allele identifiziert über tryptische Peptide	Sequenz	UniprotKB ID
Pro366	HLA-A*03	AYLDGTCVEWLR	P04439
		KWEAAHEAEQLR	P04439
		WEAAHEAEQLR	P04439
	HLA-A*23	APWIEQEGPEYWDEETGK	P30447;P05534
		FGCDVGS DGR	P30447;P05534
		AYLEGTCVDGLR	P30447;P05534
		SWTAADMAAQITQR	P30447;P18462;P30450;P30512;P16188;P16189;P10314;P16190;P30453;P30456;P30457;P30459
	HLA-B*07	GHDQYAYDGK	P01889
	HLA-B*45, -B*49, -B*50	GYNQLAYDGK	P30483;P30487;P30488
		YFHTAMSR	P30479;P30483;P30487;P30488
Pro301	HLA-A*02	MYGCDVGS DWR	P01892;P10316
		SWTAADMAAQTTK	P01892;P01891;P10316
		APWIEQEGPEYWDGETR	P01892;P18465;P10319
	HLA-B*44	THVTHHPISDHEVTLR	P30481
		AYLEGLCVESLR	P30481;P30483
	HLA-B*08, -B*35, -B*51, -B*78	NTQIFK	P30460;P30685;P18464;P30491;Q29940;P30498
		GHNQYAYDGK	P30460;Q04826;P30479;P30480;P30486;P18464;P30490;P30498;Q31610
Pro314	HLA-A*03	GHDQYAYDGKDYIALNEDLR	P01889
	HLA-B*07	AYLDGTCVEWLR	P04439
	HLA-B*47	MFGCDVGP DGR	P30485
Pro407	HLA-A*02, -A*69	MYGCDVGS DWR	P01892;P10316
		WEAAHVAEQLR	P01892;P10316
		HKWEAAHVAEQLR	P01892;P10316
	HLA-A*68	WVAVVPSGQEQR	P01891
		QDAYDGKDYIALK	P01891
		WEAAHVAEQWR	P01891
	HLA-B*38, -B*39, -B*67	GHNQFAYDGK	Q95365;P30475;Q29836
		TYLEGTCVEWLR	Q95365;P30475;Q29836
	HLA-B*13, -B*15, -B*35, -B*44, -B*47, -B*51, -B*52, -B*53, -B*59	YFYTAMSR	P30461;P30464;P30685;P30481;P30484;P30485;P18464;P30490;P30491;P30492;P30493;P30495;P18465;P10319;Q29940;P30498;Q29718
		TNTQTYR	P30461;P30464;P30466;P30685;P18463;Q95365;Q04826;P30479;P30481;P30483;P30485;P30486;P30487;P30488;P18464;P30490;P30491;Q29940

Tabelle 17: Fortsetzung 2

Gewebe	HLA-Allele identifiziert über tryptische Peptide	Sequenz	UniprotKB ID
Pro373	HLA-A*02	APWIEQEGPEYWDGETRK	P01892
		MYGCDVGS DWR	P01892;P10316
	HLA-A*26, -A*43	KWETAHEAEQWR	P18462;P30450;P30453;P30456;P30457
		WETAHEAEQWR	P18462;P30450;P30453;P30456;P30457
		AYLEGR	P13746;P18462;P30450;P30456;P30457
	HLA-B*38, -B*39, -B*67	ANLGTLR	P30443;P30450;P30512;P30455;P30456;Q09160
		TYLEGT CVEWLR	Q95365;P30475;Q29836
		GHNQFAYDGK	Q95365;P30475;Q29836
	HLA-B*15	GHDQSAYDGK	P30464;P30466;P30685;P30484;P30491;P18465;P10319
		APWIEQEGPEYWDRETQISK	P30461;P30464;P18463;Q04826;P30479;P30481;P30483;P30485;P30486;P30487;P30488;P30490
		YFYTAMSR	P30461;P30464;P30685;P30481;P30484;P30485;P18464;P30490;P30491;P30492;P30493;P30495;P18465;P10319;Q29940;P30498;Q29718
		YFYTAMSRPGR	P30461;P30464;P30685;P30481;P30484;P30485;P18464;P30490;P30491;P30492;P30493;P30495;P18465;P10319;Q29940;P30498;Q29718
TNTQTYR		P30461;P30464;P30466;P30685;P18463;Q95365;Q04826;P30479;P30481;P30483;P30485;P30486;P30487;P30488;P18464;P30490;P30491;Q29940	
Pro411	HLA-A*24	WEAAHVAEQQR	P05534
		KWEAAHVAEQQR	P05534
	HLA-A*68	WVAVVPSGQEQR	P01891
		QDAYDGKDYIALK	P01891
	HLA-B*44	THVTHHPISDHEVTLR	P30481
		AYLEGLCVESLR	P30481;P30483
	HLA-B*08, -B*51	NTQIFK	P30460;P30685;P18464;P30491;Q29940;P30498
GHNQYAYDGK		P30460;Q04826;P30479;P30480;P30486;P18464;P30490;P30498;Q31610	

Tabelle 17: Fortsetzung 3

Gewebe	HLA-Allele identifiziert über tryptische Peptide	Sequenz	UniprotKB ID
Pro418	HLA-A*30	YFSTSVSRPGSGEPR	P16188
		APWIEQERPEYWDQETR	P16188;P16189
	HLA-A*32	AHSQTDRESL	P18462;P10314
		AHSQTDRESLR	P18462;P10314
	HLA-B*08	APWIEQEGPEYWDQETR	P30443;P04439;P13746;P10314;P30455;P30459
		YFDTAMSR	P30460
	HLA-B*40, -B*41	YFDTAMSRPGR	P30460
		GHNQYAYDGKDYIALNEDLR	P30460;Q04826;P30479;P30480;P30486;Q31610
		FITVGYYDDTLFVR	P03989;Q04826;P30479;P30481;P30483;P30485;P30487;P30488
		FSDATSPR	P30461;Q04826;P30479;P30481;P30483;P30485;P30487;P30488
GHNQYAYDGK		P30460;Q04826;P30479;P30480;P30486;P18464;P30490;P30498;Q31610	
Pro381	HLA-A*24	KWEAAHVAEQQR	P05534
		WEAAHVAEQQR	P05534
		WEPSSQPTVPIVGIAG	P05534
	HLA-A*26	KWETAHEAEQWR	P18462;P30450;P30453;P30456;P30457
		ANLGLTR	P30443;P30450;P30512;P30455;P30456;Q09160
	HLA-B*07	GHDQYAYDGKDYIALNEDLR	P01889
		GHDQYAYDGK	P01889
	HLA-B*13, -B*15, -B*44, -B*47, -B*52	APWIEQEGPEYWDRETQISK	P30461;P30464;P18463;Q04826;P30479;P30481;P30483;P30485;P30486;P30487;P30488;P30490
		YFYTAMSR	P30461;P30464;P30685;P30481;P30484;P30485;P18464;P30490;P30491;P30492;P30493;P30495;P18465;P10319;Q29940;P30498;Q29718
	Pro353	HLA-A*30	YFSTSVSRPGSGEPR
HLA-A*02, -A*69		SWTAADMAAQTTK	P01892;P01891;P10316
		TAADMAAQTTK	P01892;P01891;P10316
		GYHQYAYDGK	P01892;P30447;P05534;P10316
HLA-B*18		FISVGYVDGTQFVR	P30466
HLA-B*07		YLENGKDK	P01889;P30486;Q31610
		AQAQTDRESLR	P01889;P30480;P30492;P30493;P30495;Q29836;Q31610;Q29718

In dieser Tabelle sind die Ergebnisse der über die *shotgun*-Methode identifizierten HLA-Allele der entsprechend bearbeiteten Gewebeproben zusammengefasst. Für jede Gewebeprobe sind Sequenzen aufgeführt, die allein oder über Kombination die Präsenz eines HLA-Alleles oder einer Allelkombination bestätigen.

3.1.10 Bestimmung der HLA-Restriktion relevanter HLA-Liganden aus TAA der Prostata

Die HLA-Restriktion der selektierten HLA-Liganden ist entscheidend für die spätere Anwendung als Tumorstoffimpfung. Jeder HLA-Ligand bindet, wie bereits beschrieben, ausschließlich an HLA-Moleküle, die ihrerseits die entsprechenden Bindungstaschen für die jeweiligen Ankeraminoaciden besitzen. Dies bedeutet, dass im Zusammenhang der Peptidstoffimpfung mit HLA-Liganden ausschließlich Peptidsequenzen verwendet werden können, deren HLA-Motive bekannt und in den entsprechenden Patienten vorhanden sind, da jeder Mensch unterschiedliche HLA-Allele exprimiert. Alternativ können auch autologe Sequenzen, die von dem jeweiligen Patienten eluiert wurden, ohne Wissen über die jeweilige HLA-Restriktion der einzelnen Sequenzen eingesetzt werden, da angenommen wird, dass die entsprechenden Sequenzen wieder auf HLA-Molekülen des gleichen Patienten gebunden werden. Zusätzlich sollte die entsprechende Sequenz im Stande sein, eine gezielte und spezifische Immunantwort auszulösen. Die Immunogenität von Peptiden ist dabei ebenfalls eine Voraussetzung für die spätere Anwendung als Impfung. Jedoch wird zur Überprüfung der Immunogenität neben der entsprechenden Peptidsequenz auch das jeweilige HLA-Molekül benötigt, da nur das Peptid in Kombination mit passendem HLA-Molekül im Stande ist eine entsprechende T-Zellantwort auszulösen. Aus diesem Grund war es notwendig, die HLA-Restriktion der selektierten HLA-Liganden über die Epitopvorhersage in NetMHC und SYFPEITHI zu bestätigen, bevor mit der Überprüfung der Immunogenität begonnen werden konnte. Hierbei wurde versucht, die HLA-Restriktion der ausgewählten HLA-Liganden aus TAA der Prostata in Übereinstimmung mit der vermuteten HLA-Expression der Gewebeproben zu bestimmen und über Epitopvorhersage zu bestätigen. Die Peptidsequenzen wurden unter Nutzung der Epitopvorhersagefunktion von SYFPEITHI und NetMHC prozessiert, wobei die Auswahl der HLA-Allele über die entsprechenden Gewebeproben vorgegeben wurde (s. Tabelle 18). Die Ergebnisse der Epitopvorhersage der jeweiligen Peptid:HLA-Paare wurde in SYFPEITHI in absoluten Zahlen angegeben, wobei davon ausgegangen wird, dass ab einem Punktwert von ≥ 19 eine Peptidbindung an ein gegebenes HLA-Molekül bestätigt ist. In NetMHC wurde für jede Kandidatensequenz der IC50-Wert für die Affinität an das jeweilige HLA-Molekül angegeben, wobei die Grenze für echte Binder auf einen IC50 von maximal 500 nM festgelegt wurde. Dabei wurden einigen Peptiden mehrere HLA-Allotypen zugewiesen, da die entsprechenden Sequenzen auf verschiedenen Geweben mit unterschiedlicher HLA-Restriktion identifiziert wurden. Ein Beispiel hierfür ist die Sequenz SSLPTQLFK aus dem Protein IGF1, die auf den Prostatageweben Pro012, Pro106 und Pro392 identifiziert wurden. Die Sequenz zeigt eine hohe Affinität zu HLA-A*11, das ebenfalls von den Proben Pro012 und Pro392, nicht aber von Pro106 exprimiert wurde. Für die Probe Pro106 hingegen gibt es nur Evidenz für HLA-A*03, das jedoch aufgrund hoher Sequenzhomologie zu HLA-A*11 auch Peptidsequenzen mit ähnlichen Ankeraminoaciden bindet. Die HLA-Restriktion der Sequenz wurde über NetMHC und SYFPEITHI bestätigt, da die Sequenz für beide HLA-Moleküle in beiden Datenbanken eine ausreichend hohe Punktzahl bzw. IC50-Wert erreichte. Es wurde davon ausgegangen, dass eine Sequenz tatsächlich an das ihm zugewiesene HLA-Molekül bindet, falls die Bewer-

tung in einer der Datenbanken für das Allel innerhalb des festgelegten Grenzwertes lag. Insgesamt 17 der 63 Sequenzen konnten in SYFPEITHI keinem HLA-Allotyp innerhalb des festgelegten Grenzwertes zugewiesen werden. In NetMHC konnten 15 Sequenzen keinem HLA-Molekül innerhalb des definierten Grenzwertes zugewiesen werden. Die Mehrheit der identifizierten Sequenzen ließ sich zumindest in einem der Programme klar ein HLA-Allel zuweisen. Nur 5 der 63 ausgewählten Peptide ließen sich weder in SYFPEITHI noch in NetMHC innerhalb des zulässigen Grenzwertes klar einem HLA-Molekül zuweisen.

Tabelle 18: HLA-Restriktion der HLA-Liganden in SYFPEITHI und NetMHC

Gensymbol	Sequenz	HLA-Motiv	SYFPEITHI Score	NetMHC 3.4 IC50 in nM	Gewebe
ACPP	HDTTVSGL	B*37	26	n.a.	106
	AHDTTVSGL	B*38, B*39	25; 25	n.a.; 52	373, 407
	QHEPYPLML	B*38, B*39	25; 26	52; 21	373, 407
	LSGLHGQDL	n.a. HLA* <i>C</i>	n.a.	n.a.	381
BCAS2	VYNENLVHml	A*24	25	56	368, 411
CEACAM6	VPWKEVLL	B*07	n.a.	[798]	368
CTNNB1	AQNAVRLHY	B*15, n.a.	23	20	92, 106, 381, 407, 418
	LQKMVALL	B*37	n.a.	n.a.	106
	IEALVRTV	n.a. HLA* <i>C</i>	n.a.	n.a.	366
EP300	RPKLSSPAL	B*07	23	10	368
ETS2	VMSQALKATF	A*24	n.a.	159	368, 411
FOLH1	KYADKIYSI	A*24	24	34	368, 381
	YFAPGVKSY	n.a. HLA* <i>C</i>	n.a.	n.a.	314
HDAC1	EYLEKIKQR	A*68	19	n.a.	383
HDAC1, HDAC2	RMLPHAPGV	A*02	24	6	92, 368, 373, 407
	YTTDRVMTV	A*02, A*68	22; n.a.	18; 9	407, 411
	EYSKQMQR	A*24	21	212	368, 381, 411
HDAC2	GEDPDKRISI	B*49	22	n.a.	366
HDAC1; HDAC2; HDAC3	TDRVMTVSF	B*47	n.a.	n.a.	314
HDGF	APGIRDHESL	B*07, n.a.	23	105	368, 407, 411
	GEEKEAATL	B*40	25	6	418
HIF1a	YISDNVNKY	A*26, B*15	21; 19	28; 247	106, 373
	APIQGSRNLL	B*07	23	52	368
	KESEVFYEL	B*37, B*40	22; 24	n.a.; 6	106, 181, 418
IGF1	KISSLPTQLFK	A*03	24*	388	106
	SSLPTQLFK	A*11, A*03	19; 29	12; 59	12, 106, 392
	ISSLPTQLFK	A*03	16	26	106
KLK2	EPAKITDVVK	A*68	n.a.	363	411
	SQPWQVAVY	B*15	22	59	381
	AVYTKVVHY	B*15	20	62	407
	GQRVPVSHSF	B*15	21	19	407
	QRVPVSHSF	B*27, B*39	25; 13	3; 112	92, 407
KLK2; KLK3	GGVLVHPQW	B*57	n.a.	199	12

Tabelle 18: Fortsetzung 1

Gensymbol	Sequenz	HLA-Motiv	SYFPEITHI Score	NetMHC 3.4 IC50 in nM	Gewebe
KLK3	QQVFQVSHSF	B*15	20	23	106, 381, 407
	QVFQVSHSF	B*15	n.a.	26	381, 407
	EEFLTPKKL	B*44	29	189	301
	IRNKSVILL	n.a. HLA* <i>C</i>	n.a.	n.a.	12
KLK4	HPEYNRPLL	B*07	22	30	12, 368, 381
	SESDTIRSI	B*49, B*40, B*44	22; n.a.; 25	n.a.; 140; 34	366, 368, 411
	SGVLVHPQW	B*57	n.a.	151	12
MCL1	RPPPIGAEV	B*07	20	30	368
	VQRNHETAF	B*15	22	26	106, 373, 381
MYLK	RIIDDEFEL	A*02	23	25	407
	KVWAGFFFK	A*03, A*11	27; 21	29; 14	106, 306
	GTQPWFISK	A*03, A*11,	n.a.; 29	102; 11	12, 89, 392, 418
	GTAPAFKQK	A*03	n.a.	409	106
	EVINYEPIGY	A*26	35	3	6, 373, 381
	EVVEGSAARF	A*68	n.a.	372	407
	RPKSSLPPVL	B*07	23	16	368, 381
	SPQQVDFRSVL	B*07	22*	17	368, 381
	EKANIVMVL	B*39	21	50	407
	FEEKANIVM	B*40	n.a.	9	418
	SENGSKLTI	B*49, B*44	23; 22	n.a.; 155	366, 411
	DAFEEKANI	B*51	27	n.a.	411
	NKX3.1	AETEPERHL	B*40	23	180
AAFSTQVI		B*15, HLA* <i>C</i>	n.a.	18	373
FSHTQVIEL		A*02, A*68, B*39	n.a.; n.a.; n.a.	360; 271; 294	106, 368, 407
PGM3	DADGHFHLI	B*51	26	n.a.	301
PRUNE2	GQVEIVTKV	B*13	26	n.a.	89
SCD	ITAPPSRVL	A*02, n.a.	21	n.a.	106, 368, 373, 381, 407, 418
SMARCA2; SMARCA4	KELPEYYEL	B*40	24	28	368
TF7L2	DVQAGSLQSR	A*68	22	119	383
TRPM8	IMLQRMLI	B*15	n.a.	146	381
WT1	RVPGVAPTL	A*03	24	n.a.	366

In dieser Tabelle sind alle relevanten Peptidsequenzen sowie die vermutete HLA-Restriktion aufgeführt. Die HLA-Restriktion wurde über SYFPEITHI und NetMHC bestätigt und in absoluten Zahlen bzw. als IC50-Wert für jede Sequenz angegeben. Lag der entsprechende Punktwert unter dem festgelegten Grenzwert oder war das entsprechende HLA-Molekül nicht in der Datenbank verfügbar, so wurde die Sequenz in der jeweiligen Datenbank mit n.a. (engl. *not assigned*) gekennzeichnet.

3.1.11 Charakterisierung neuer T-Zellepitope für die Behandlung des Prostatakarzinoms

Bis zum heutigen Zeitpunkt sind nur wenige natürliche HLA-Liganden beschrieben worden, die sich für eine peptidbasierte Therapie des Prostatakarzinoms eignen. Unter den wenigen Epitopen, die bereits für das Prostatakarzinom beschrieben wurden, stammen

die meisten Peptide aus dem Protein PSA und binden an das Molekül HLA-A*02. Die Identifikation von Epitopen mit Restriktion auf HLA-A*02 hat dabei den entscheidenden Vorteil, dass HLA-A*02 von fast 50% aller Menschen exprimiert wird. Die Entdeckung neuer immunogener Peptidsequenzen auf verbreiteten HLA-Allotypen ist von weitreichender Bedeutung, da sich damit zumindest theoretisch eine größere Anzahl an Patienten behandeln lässt. Es ist daher nicht überraschend, dass sich Immunologen vor allem auf HLA-Moleküle konzentrieren, die ihrerseits eine hohe Abdeckung in der Population besitzen. Andererseits sind auch Epitope auf seltenen HLA-Allotypen von hohem klinischem Interesse, da nicht alle Patienten die häufigen HLA-Allele exprimieren. Die Kombination verschiedener HLA-Restriktionen ermöglicht die Behandlung eines breiteren Patientenkollektivs, da über die Kombination verschiedener HLA-Restriktionen die mögliche Populationsabdeckung erhöht wird. Zusätzlich wird durch die Vakzinierung mit Peptiden aus verschiedenen Proteinen verhindert, dass der Tumor über die Herabregulation eines bestimmten Proteins der Erkennung durch das Immunsystem entgeht (engl. *tumor escape*).

Ziel dieser Arbeit war es, HLA-Liganden aus TAA der Prostata zu identifizieren und zu charakterisieren, ohne dabei eine Vorselektion der Kandidaten über ihre HLA-Restriktion zu treffen. Im Zusammenhang des vom DKTK geförderten Projekts „MultiPro“ wurden die identifizierten Peptidsequenzen zusätzlich auf ihre Immunogenität getestet. Hierzu wurden die Peptidsequenzen in die entsprechenden HLA-Monomere rückgefaltet und biotinyliert, bevor die Monomer:Peptid-Komplexe über Streptavidin an die aAPCs wie in 2.2.8 beschrieben gekoppelt wurden. Die *in vitro*-Stimulation wurde wie in 2.2.9 beschrieben durchgeführt und nach der Tetramerfärbung durchflusszytometrisch analysiert. Die verwendete *Gating*-Strategie ist in Abbildung 23 dargestellt.

Im Rahmen des Projekts MultiPro wurden die identifizierten HLA-Liganden an verschiedenen Standorten (Tübingen, Dresden, München, Heidelberg) von verschiedenen Arbeitsgruppen auf ihre Immunogenität getestet. In Tübingen wurden die *in vitro*-Stimulationen von Lea Prokop, Stefanie Souczek und dem Autor dieser Arbeit mit Hilfe von Janet Peper durchgeführt. Eine Übersicht über die an anderen Standorten getesteten Peptide sowie die Ergebnisse der Stimulationsexperimente sind in Tabelle 19 zusammengefasst. Die Auswertung der *in vitro*-Stimulation wurde exemplarisch an zwei Beispielen verdeutlicht und in den Abbildungen 24 und 25 dargestellt.

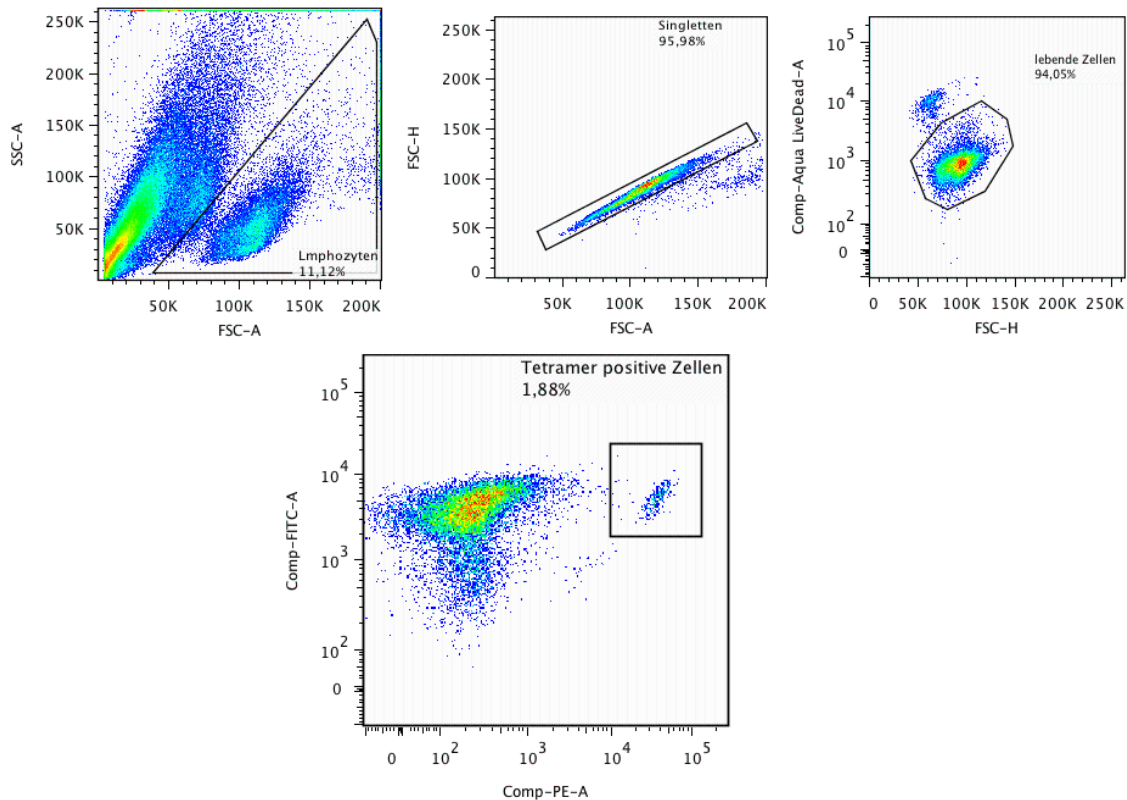


Abbildung 23: Gating-Strategie bei der Charakterisierung von CD8 T-Zell Epitopen.

Im ersten Schritt wurden die Lymphozyten selektiert und in FSC-A gegen FSC-H aufgetragen, um so die Einzelzellen zu erhalten. Über die Auftragung der Einzelzellen in dem Kanal für FSC-H gegen Aqua-LiveDead wurden die lebenden Zellen eingegrenzt. Über die Gegenüberstellung der Farbstoffe für den anti-CD8 Antikörper bzw. das Tetramer wurden schließlich die Tetramer-positiven von den Tetramer-negativen CD8⁺ T-Zellen unterschieden.

Wie in Abbildung 24 und 25 dargestellt, sind die Peptidsequenzen HPEYNRPLL und APGIRDHESL in der Lage, eine peptidspezifische T-Zellantwort zu induzieren. Die Peptide stammen aus über den *classical approach* identifizierten TAA der Prostata und sind aufgrund der gezeigten Immunogenität interessante Kandidaten für den Einsatz in der peptidbasierten Immunotherapie des Prostatakarzinoms. Die Peptidsequenzen HPEYNRPLL und APGIRDHESL wurden im Rahmen des Projekts MultiPro zusätzlich an anderen Standorten auf ihre Immunogenität getestet. Die Sequenz HPEYNRPLL zeigte eine positive Reaktion mit Zellen aus 2 von 7 getesteten gesunden Blutspendern (J65, J67). Die Sequenz APGIRDHESL wurde mit Zellen aus 1 von 7 gesunden Blutspendern (J65) positiv getestet. Die Ergebnisse aller Immunogenitätsassays wurden in Tabelle 19 zusammengefasst. Insgesamt wurden 33 Peptide an 4 verschiedenen Standorten auf ihre Immunogenität getestet. In Tübingen wurden davon 16 Peptide in 89 Stimulationen insgesamt 37-mal positiv getestet.

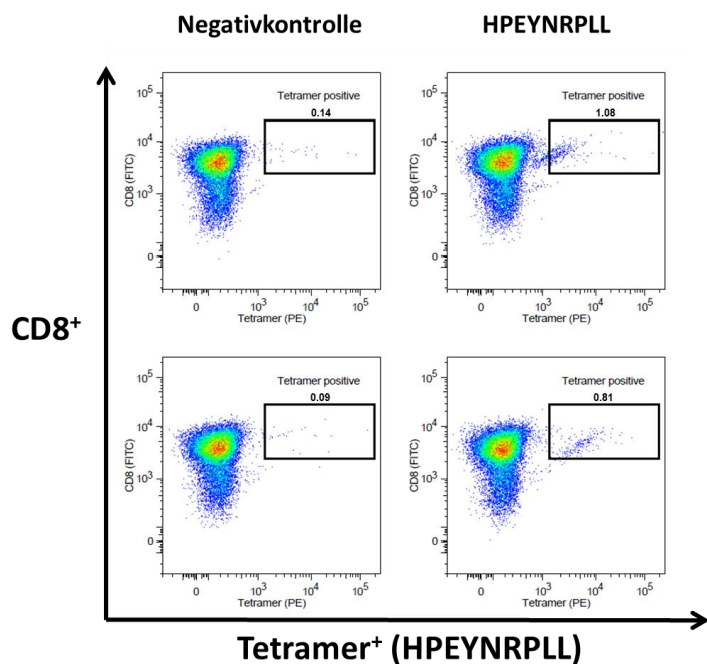


Abbildung 24: Analyse des KLK4-abgeleiteten HLA-B*07-Liganden HPEYNRPLL:

Das HLA-B*07-restringierte Peptid HPEYNRPLL aus dem prostataassoziierten Tumorantigen KLK4 induzierte in 2 von 7 getesteten gesunden Blutspendern eine spezifische CD8⁺ T-Zellantwort. Die Negativkontrolle zeigt in beiden Fällen Tetramer-positive Populationen, die allerdings wesentlich kleiner ausfallen als bei der Stimulation mit dem HPEYNRPLL-tragenden Tetramer.

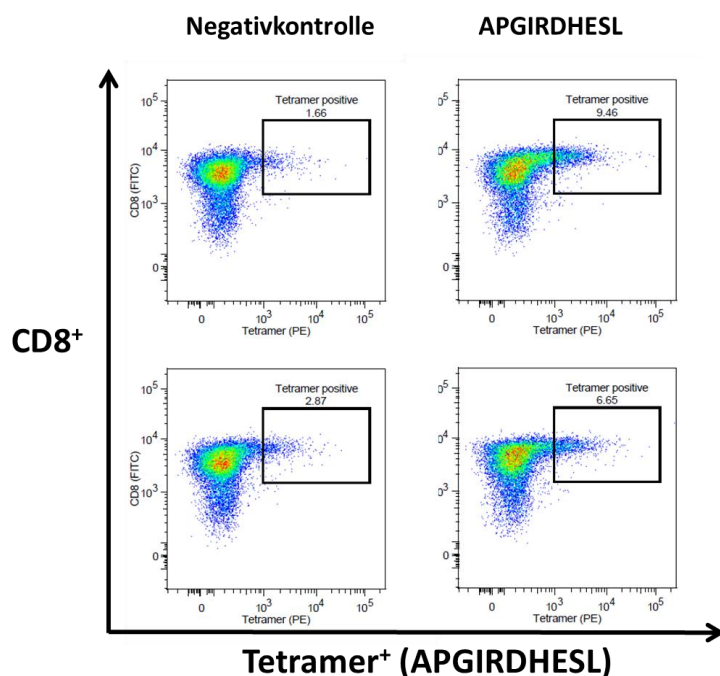


Abbildung 25: Analyse des HDGF-abgeleiteten HLA-B*07-Liganden APGIRDHESL:

Das Peptid APGIRDHESL induzierte in 1 von 7 getesteten Blutspendern eine spezifische CD8⁺ T-Zellantwort. Die Negativkontrolle zeigt in beiden Fällen Tetramer-positive Populationen, die aber wesentlich kleinere Populationen darstellen als die aus der Stimulation mit dem APGIRDHESL-tragenden Tetramer.

Tabelle 19: Charakterisierung neuer T-Zellepitope von TAA der Prostata im Rahmen der MultiPro-Kooperation

HLA	Gensymbol	Sequenz	positiv getestete Spender / Spender getestet					Summe
			TÜ	Heidelberg Beckhove	München Subklewe	München Krackhardt	Dresden Schmitz	
A*02	HDAC1; HDAC2	RmLPHAPGV	17/27		1/2	0/4	2/3	20/36
A*02	HDAC1; HDAC2	YTTDRVMTV	1/7					1/7
A*03	IGF1	KISSLPTQLFK		3/5		0/4		3/9
A*11	IGF1	SSLPTQLFK	0/8					0/8
A*11	MYLK	GTQPWFISK	5/5					5/5
A*24	FOLH1	KYADKIYSI	0/7		0/2			0/9
A*24	HDAC1	EYSKQMQRF	3/6	3/5	0/2			6/13
A*24	BCAS	VYNENLVHMI		4/5	0/2			4/7
B*07	MYLK	SPQQVDFRSVL				0/6	1/3	1/9
B*07	NKX3.1	FSHTQVIEL				0/6	0/3	0/9
B*07	MYLK	RPKSSLPPVL				0/6	1/3	1/9
B*07	HDGF	APGIRDHESL	1/7			1/6	1/3	3/16
B*07	NEFH	GYIDKVRQL				0/6	1/3	1/9
B*07	MCL1	RPPPIGAEV				0/5	0/3	0/8
B*07	KLK4	HPEYNRPLL	2/7			1/5	2/3	5/14
B*07	WT1	RVPGVAPT				0/6	0/3	0/9
B*07	EP300	RPKLSSPAL	2/6					2/6
B*15	CTNNB1	AQNAVRLHY					1/3	1/3
B*15	HIF1A	YISDNVNKY					0/3	0/3
B*15	KLK2	GQRVPVSHSF	1/1				2/3	3/4
B*15	KLK2	SQPWQVAVY	0/1				1/3	1/4
B*15	KLK2	AVYTKVVHY	1/1				0/1	1/2
B*15	MCL1	VQRNHETAF					1/1	1/1
B*15	KLK3	GQVFQVSHSF	1/1				1/1	2/2
B*40	HDGF	GEEKEAATL	1/2					1/2
B*40	SMARCA2; SMARCA4	KELPEYYEL	2/2					2/2
B*40	NKX3.1	AETEPERHL	0/1					0/1
B*44	KLK3	EEFLTPKKL				0/3	1/4	1/4
B*44	MYLK	SENGSKLTI				0/3	0/1	0/1
B*51	PGM3	DADGHFHLI				0/2	1/4	1/6
B*51	MYLK	DAFEEKANI				0/2	0/2	0/4
HLA-C, n.a.	ACPP	LSGLHGQDL				0/3	1/1	1/4
HLA-C, n.a.	FOLH1	YFAPGVKSY			0/2			0/2
Summe			37/89	10/15	1/10	2/67	17/54	67/228

Abgebildet ist die HLA-Restriktion und die synthetische Peptidnummer sowie das Quellprotein aller getesteten Peptidsequenzen. Die Ergebnisse der Stimulationsexperimente sind in positive Experimente im Vergleich zu allen Experimenten der jeweiligen Peptidsequenz aufgeführt. Es wurde das HLA-Molekül angegeben, in welches die Sequenzen für die *in vitro*-Stimulationen zurückgefaltet wurden.

3.2 Charakterisierung HLA-DR15-assoziiierter HLA-Klasse-II-Liganden

Der Haplotyp HLA-DR15 stellt den größten Teil des genetischen Risikos dar, an Multipler Sklerose zu erkranken. Die Multiple Sklerose ist eine prototypische CD4⁺ T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung¹²³. Die unterliegenden Mechanismen der Krankheit sind bis heute nicht geklärt, es wird aber davon ausgegangen, dass wahrscheinlich Selbst-Peptide, die auf dem krankheitsassoziierten Haplotyp HLA-DR15 präsentiert werden, eine entscheidende Rolle spielen. Es wurde vermutet, dass die Kombination des HLA-DR15 mit gebundenem Selbst-Peptid im Stande ist, das vorhandene T-Zell-Repertoire während der zentralen Toleranz im Thymus sowie die in der Peripherie über die autologe Proliferation zu steuern und zu beeinflussen.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die Identifikation von HLA-DR15-gebundenen Selbst-Peptiden, um damit die Grundlage für Experimente zur autologen Proliferation von T-Zellen in MS-Patienten zu schaffen. In Kooperation mit Prof. Roland Martin und Malte Mohme der Universität Hamburg wurden Liganden des HLA-DR15 zuerst identifiziert, bevor mit Experimenten zur autologen Proliferation von T-Zellen begonnen wurde. Dabei war es die Aufgabe des Autors dieser Arbeit die HLA-DR15-assoziierten Peptidliganden mittels HLA-Affinitätschromatographie zu isolieren und massenspektrometrisch zu sequenzieren.

Um zu gewährleisten, dass die identifizierten Liganden ausschließlich mit dem HLA-DR15-Haplotyp assoziieren und keinem anderen HLA-Klasse-II-Molekül, wurden BLS-Zellen mit den entsprechenden HLA-DR15-Allelen DR2a bzw. DR2b transfiziert. Für die Isolation der DR2a- bzw. DR2b-Moleküle wurden zunächst ein anti-DRB5*01:01 (H0596) bzw. ein anti-DRB1*15:01 (H0427A) IgM-Antikörper an die Säulenmatrix gekoppelt. Es wurden jeweils 3 ml Zellpellet der mit HLA-DRB1*15:01 (DR2b) bzw. der mit HLA-DRB5*01:01 (DR2a) transfizierten BLS-Zellen, wie in 2.1.16 beschrieben behandelt und für die HLA-Affinitätschromatographie eingesetzt. Darauf folgte eine zweite Affinitätschromatographie mit dem pan-HLA-DR-spezifischen Antikörper L243 für die mit DR2a bzw. DR2b transfizierten Zellen. Aufgrund der niedrigen Präzipitationseffizienz der verwendeten DR2a- bzw. DR2b-spezifischen IgM-Antikörper war es notwendig, nach der ersten HLA-Präzipitation eine zweite sequentielle HLA-Präzipitation durchzuführen, um so die Ausbeute an Liganden aus HLA-DR15 zu erhöhen. Da die transfizierten BLS-Zellen ausschließlich ein HLA-Klasse-II-Molekül exprimieren, wurde davon ausgegangen, dass die identifizierten Liganden tatsächlich aus dem entsprechenden HLA-Molekül stammen. Eine Übersicht über die eluierten Liganden der mit DR2a bzw. DR2b transfizierten Zelllinien ist in Tabelle 20 bzw. in Tabelle 21 gezeigt.

Tabelle 20: HLA-Klasse-II-Liganden aus DR2a-transfizierten BLS-Zellen

BLS-DR2a-Zellen / HLA-DR2a-spezifischer AK (H0596)				
Sequenz	Gene ID	Protein	Multiple Proteine	Ion Score
GYLPNQLFRTF	1653	DDX1		36
WISKQEYDESGPSIVHRKCF	60	ACTB	yes	21
IIDPGDSDIIRSMPEQTGEK	6156	RPL30		21
AIIDPGDSDIIRSMPEQTGEK	6156	RPL30		20
VTYVPVTTFKNLQTVNVNVDEN	6160	RPL31		47
QVTQPTVGMNFKTPRGPV	6218	RPS17		40
EVSVNQSLQLPLNVKVD	738196	KRT2		60
BLS-DR2a-Zellen / pan-HLA-Klasse-II-spezifischer AK (L243)				
Sequenz	Gene ID	Protein	Multiple Proteine	Ion Score
FQTLVMLETVPRSGEV	100290966	HLA-DRB1	yes	47
	3127	HLA-DRB5		
	3125	HLA-DRB3		
	3126	HLA-DRB4		
FQTLVMLETVPRSGEVY	100290966	HLA-DRB1	yes	45
	3127	HLA-DRB5		
	3125	HLA-DRB3		
	3126	HLA-DRB4		
DGKDYIALNEDLRSW	3107	HLA-C	yes	39
DGKDYLALNEDLRSW	3135	HLA-G	yes	39
DVGEYRAVTELGRPD	3123	HLA-DRB1	yes	34
	3126	HLA-DRB4		
	3127	HLA-DRB5		
	100509246	LOC100509246		
TQSYSLQLSNLKMED	114836	SLAMF6		65
TQSYSLQLSNLKMEDT	114836	SLAMF6		42
FTQSYSLQLSNLKMEDTG	114836	SLAMF6		41
IHSLPPEGKLGIMEL	1351	COX8A		23
GIPEEELLRQQQELFAK	1810	DR1		22
LPVPAFNVINGGSHAG	2023	ENO1	yes	78
FELFPSLSHLLVD	23549	DNPEP		20
DAPMFVMGVNHEKYDN	2597	GAPDH		38
DAPMFVMGVNHEKYDN	2597	GAPDH		56
DAPMFVMGVNHEKYDNSL	2597	GAPDH		36
ISWYDNEFGYSNRVVDL	2597	GAPDH		40
DAPMFVMGVNHEKYDNSLK	2597	GAPDH		33
FPTIYFSPANKKLN	2923	PDIA3		23
GFPTIYFSPANKKLNPK	2923	PDIA3		28
FPTIYFSPANKKLNPK	2923	PDIA3		31
ATRLKGIVPLAKVD	2923	PDIA3		30
AHSEFLKAASNLRDNYR	2923	PDIA3		39
INKYVTILHLPKKGDD	3001	GZMA		26

Tabelle 20: Fortsetzung

Sequenz	Gene ID	Protein	Multiple Proteine	Ion Score
GPPVSELITKAVAASKERSG	3008	HIST1H1E		30
YDMNAANVGWNNSTFA	4282	MIF		52
YDMNAANVGWNNSTFA	4282	MIF		46
IVNTNVPRASVPDGFSEL	4282	MIF		39
DVSPSPDKIQEVYIP	5337	PLD1		25
SYLDPPDLPSNSNDDLLSL	57178	ZMIZ1		20
LSYLDPPDLPSNSNDDLLSL	57178	ZMIZ1		40
VDIFQVVKALRKA	5788	PTPRC		32
VVDIFQVVKALRKARPG	5788	PTPRC		21
QVTQPTVGMNFKTPRGPV	6218	RPS17		46
YVQSMDDAAFNKI	644820	EEF1B4	yes	34
FEDYVQSMDDAAFNKI	1933	EEF1B2	yes	66
PAEDWAGLDEDEDAHVVEDN	7979	SHFM1		68
WQVKSGTIFDNF	811	CALR		44
MIDVTKSYQKFLPLTQV	84516	DCTN5		23
TPVYLGATAGMRL	953	ENTPD1		78
LMQALPMGALPQ	972	CD74		30
KPPKPVSKMRMATPLLMQA	972	CD74	yes	27
TPLLMQALPMGALP	972	CD74	yes	22
ATPLLMQALPMGALP	972	CD74	yes	22
ATPLLMQALPMGALP	972	CD74	yes	28
ATPLLMQALPMGALP	972	CD74	yes	29
TPLLMQALPMGALPQ	972	CD74	yes	40
TPLLMQALPMGALPQ	972	CD74	yes	23
LPKPPKPVSKMRMATPLLMQAL	972	CD74	yes	24
ATPLLMQALPMGALPQ	972	CD74	yes	33
MATPLLMQALPMGALP	972	CD74	yes	43
ATPLLMQALPMGALPQ	972	CD74	yes	28
MATPLLMQALPMGALP	972	CD74	yes	61
MATPLLMQALPMGALP	972	CD74	yes	35
MATPLLMQALPMGALP	972	CD74	yes	38
MATPLLMQALPMGALP	972	CD74	yes	41
MATPLLMQALPmGALP	972	CD74	yes	50
MATPLLMQALPMGALPQ	972	CD74	yes	54
ATPLLMQALPMGALPQGP	972	CD74	yes	41
MATPLLMQALPMGALPQ	972	CD74	yes	51
MATPLLMQALPMGALPQ	972	CD74	yes	47
MATPLLMQALPMGALPQ	972	CD74	yes	49
ATPLLMQALPMGALPQGP	972	CD74	yes	36
KPPKPVSKMRMATPLLMQA	972	CD74	yes	45
LPKPPKPVSKMRMATPLLMQ	972	CD74		26
KPGQAPRLLIYGASSRATG	3514	IGKC		45

Tabelle 21: HLA-Klasse-II-Liganden aus DR2b-transfizierten BLS-Zellen

BLS-DR2b-Zellen / HLA-DR2b-spezifischer AK (H0427A)				
Sequenz	Gene ID	Protein	Multiple Proteine	Ion Score
DVELDDLKDEL	10130	PDIA6		40
IDLSDVELDDLKDEL	10130	PDIA6		71
IGLAKDDQLKVHGF	10209	EIF1		42
VEIGLAKDDQLKVHGF	10209	EIF1		31
AAMLDTVVFK	10213	PSMD14		46
LGISNLSQVRASN	10592	SMC2		31
FYVGEIIGKRGIIIGYDV	10632	ATP5L		27
FGSAFATPFLVVRHQLLKT	1350	COX7C		43
ATPFLVVRHQLLKT	1350	COX7C		27
FGSAFATPFLVVRHQLLKT	1350	COX7C		21
YFGSAFATPFLVVRHQLLKT	1350	COX7C		26
IHSLPPEGKLGIMEL	1351	COX8A		48
IHSLPPEGKLGIMEL	1351	COX8A		27
IHSLPPEGKLGIMEL	1351	COX8A		32
AVMGFSGFGSTKKSYS	153527	ZMAT2		21
GYLPNQLFRTF	1653	DDX1		37
LHLGYLPNQLFRTF	1653	DDX1		35
LHLGYLPNQL	1653	DDX1		31
FSNKITPIQSKEAY	205	AK4	yes	25
PSLSHLLVD	23549	DNPEP		29
ISWYDNEFGYSNRVVDL	2597	GAPDH		42
VGAHAGEYGAEALERM	3039	HBA1		34
GKVGGAHAGEYGAEALERM	3039	HBA1	yes	29
FRDGDILGKYVD	3336	HSPE1		29
IVNTNVPRASVPDGFSEL	4282	MIF		45
NAANVGWNNSTFA	4282	MIF		45
MVGPIEEAVAKADKLAEEHSS	506	ATP5B		26
VPPVQVSPLIKLGRYSAL	521	ATP5I		42
KFEDPKFEVIEKPQA	522	ATP5J		43
PTFKFEDPKFEVIEKPQA	522	ATP5J		21
DIAVDGEPLGRVSFEL	5478	PPIA		66
FVILRKNPNYDL	5708	PSMD2		24
LVSNLNPERVTPQSLFIL	5725	PTBP1		21
ISKQEYDESGPSIVHRKCF	60	ACTB	yes	67
WISKQEYDESGPSIVHRKCF	60	ACTB	yes	67
AIDPGDSDIIRSMPEQTGEK	6156	RPL30		45
IIDPGDSDIIRSMPEQTGEK	6156	RPL30		27
YVPVTTFKNLQTVNVNVDEN	6160	RPL31		56
VTYVPVTTFKNLQTVNVNVDEN	6160	RPL31		42
MRYVASYLALGGN	6181	RPLP2		26
FSLPIKESEIIDF	6187	RPS2	yes	38

Tabelle 21: Fortsetzung

Sequenz	Gene ID	Protein	Multiple Proteine	Ion Score
QVTQPTVGMNFKTPRGPV	6218	RPS17		67
YIRGVEEEEEDGEMRE	6636	SNRPF		37
GDVKPVVSSSTPLVDFL	6881	TAF10		37
FYGQTLGQAQAHSQEQ	8939	FUBP3		37
IRPEIHENYRING	9550	ATP6V1G1		22
FVCDIRPEIHENYRING	9550	ATP6V1G1		33
BLS-DR2b-Zellen / pan-HLA-Klasse-II-spezifischer AK (L243)				
Sequenz	Gene ID	Protein	Multiple Proteine	Ion Score
LEEFGRFASF	3122	HLA-DRA		49
LEEFGRFASFEAQGA	3122	HLA-DRA		46
LEEFGRFASFEAQGAL	3122	HLA-DRA		40
FGRFASFEAQG	3122	HLA-DRA		33
FGRFASFEAQGAL	3122	HLA-DRA		47
LEEFGRFASFEAQG	3122	HLA-DRA		44
ATPFLVVRHQLLKT	1350	COX7C		22
IHSLPEGKLGIMEL	1351	COX8A		20
GYLPNQLFRTF	1653	DDX1		46
QADLSSFKSQELNER	2208	FCER2		87
LQADLSSFKSQELNERN	2208	FCER2		55
QADLSSFKSQELNERN	2208	FCER2		34
QADLSSFKSQELNER	2208	FCER2		29
LSSFKSQELNER	2208	FCER2		26
ATRLKGIVPLAKVD	2923	PDIA3		32
GFPTIYFSPANKKLNPK	2923	PDIA3		27
SLDDLQPWHSFGADS	351	APP		47
LDDLQPWHSFGADS	351	APP		45
SLDDLQPWHSFGADSVPA	351	APP		32
DVSPSPDKIQEVYIP	5337	PLD1		26
AIIDPGDSDIIRSMPEQTGEK	6156	RPL30		25
VTYVPVTTFKNLQTVNVN DEN	6160	RPL31		47
QVTQPTVGMNFKTPRGPV	6218	RPS17		51
YVQSMDVAAFNKI	644820	EEF1B4		75
WISKQEYDESGPSIVHRKCF	71	ACTG1	yes	49
ISKQEYDESGPSIVHRKCF	71	ACTG1	yes	41
QQMWISKQEYDESGPSIVHRKCF	71	ACTG1	yes	22
WQVKSGTIFDNF	811	CALR		31
KPPKPVSKMRMATPLLMQA	972	CD74	yes	28
MATPLLMQALPMGALP	972	CD74	yes	26
ATPLLMQALPMGALPQGP	972	CD74	yes	23
KPPKPVSKMRMATPLLMQA	972	CD74	yes	22
KPPKPVSKMRMATPLLMQAL	972	CD74	yes	20
MATPLLMQALPMGALPQ	972	CD74	yes	37

Abgebildet sind alle relevanten Peptidsequenzen, wobei Liganden aus HLA-Klasse-II-Molekülen in fetter Schrift hervorgehoben wurden. Über die Spalte „Multiple Proteine“ wurde zusätzlich angegeben, ob die relevante Sequenz homolog in verschiedenen Proteinen ist. Peptide gleicher Sequenz unterscheiden sich in der Lokalisation des oxidierten Methionins.

Es wurden 154 Peptidsequenzen aus DR2a- und DR2b-Molekülen eluiert und sequenziert, falls für die Peptididentifikation ein FDR-Grenzwert von 0,01 festgelegt wurde. Insgesamt 9 der Peptide stammen aus der DR α -Kette (DRA1*01:01), der β -Kette von DR2b (DRB1*15:01) oder DR2a (DRB5*01:01). Demzufolge bilden Peptide, die selbst aus einem HLA-Klasse-II-Protein stammen, einen Teil der von HLA-DR15 gebundenen Liganden. Diese Ergebnisse decken sich mit früheren Beobachtungen, in welchen HLA-Klasse-II-abgeleitete Peptide von DR2a- und DR2b-Molekülen präsentiert werden^{60,304}. Zusätzlich wurden insgesamt 31 Peptidsequenzen aus dem Protein CD74 identifiziert. CD74, auch invariante Kette (Ii) genannt, ist dabei eine wichtige Komponente für die Bildung und den Transport der HLA-Klasse-II-Proteine an die Zelloberfläche³⁰⁵. Eine Überprüfung der erhaltenen Sequenzen über synthetische Peptide war aufgrund der Peptidlänge der HLA-Klasse-II-Liganden nicht möglich. Stattdessen wurden die Filterkriterien für die Identifikation der Liganden so strikt gewählt (FDR \leq 1%; *Ion Score* \geq 20), dass eine Fehlannotation eines gegebenen Fragmentspektrums unwahrscheinlich wurde. Wie bereits erwähnt, besitzen die DR2a- bzw. DR2b-spezifischen IgM-Antikörper H0596 und H0427A eine niedrige Effizienz sowohl bei der Kopplung an die CNBr-aktivierte Sepharose als auch bei der Präzipitation der MHC:Peptid-Komplexe. Dies ist besonders bei dem DR2a-spezifischen Antikörper H0596 zu beobachten, da die Präzipitation im Vergleich deutlich weniger Sequenzen lieferte als die zweite HLA-Affinitätschromatographie mit dem pan-HLA-DR-spezifischen Antikörper L243.

3.2.1 Funktion des HLA-DR15-Haplotyps in der autologen Proliferation bei MS

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob die von HLA-DR15 präsentierten Selbst-Peptide eine inhibitorische oder stimulatorische Wirkung im Kontext der autologen Proliferation auf CD4⁺ T-Zellen zeigen. Es wurden insgesamt 24 Ansätze mit jeweils 5 Peptidsequenzen in 20 MS-Patienten sowie in 15 gesunden Spendern getestet. Alle relevanten Experimente sowie die Auswertung wurde von Malte Mohme und Kollegen durchgeführt. Aus diesem Grund wurde auf die Darstellung der Ergebnisse der Proliferationsexperimente in dieser Arbeit verzichtet. Alle Ergebnisse der Proliferationsexperimente sowie die theoretischen Hintergründe sind in der im Juni 2013 im Journal Brain veröffentlichten Publikation „HLA-DR15-derived self-peptides are involved in increased autologous T cell proliferation in multiple sclerosis“ nachzulesen¹²³.

3.3 HLA-Ligandenanalyse von mit *O. volvulus* infizierten Knoten und Hautgewebe

Alle Onchozerkome und Hautgewebeproben aus Tabelle 8 wurden wie in 2.2.15 beschrieben homogenisiert und für die HLA-Affinitätschromatographie eingesetzt. Der Hauptfokus wurde auf die Identifikation von HLA-Klasse-II-Liganden aus *O. volvulus* bzw. *Wolbachia* gelegt, wobei zusätzlich auch HLA-Klasse-I-Liganden untersucht wurden. Im Zusammenhang der parasitären Filariosen sind besonders HLA-Klasse-II-assoziierte Liganden von hohem wissenschaftlichem Interesse. Die Interaktion der HLA-Klasse-II:Peptid-Komplexe mit den entsprechenden Rezeptoren der CD4⁺ T-Helfer-Zellen induziert die für Parasiten typische Th2-Antwort. IL-4 stimuliert dabei die Th2-Polarisation der CD4⁺ T-Zellen, die ihrerseits über die Effektorzytokine IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 und IL-13 sowohl eosinophile, basophile Granulozyten, Mastzellen, aber auch B-Zellen aktivieren. Jedoch können über die Kreuzpräsentation auch Peptide aus extrazellulären Antigenen auf HLA-Klasse-I präsentiert werden, weshalb neben der HLA-Klasse-II-Ligandenanalyse auch die HLA-Klasse-I:Peptid-Komplexe für die Ligandenanalyse aufgereinigt wurden. Aufgrund des hohen Bindegewebeanteils der Hautgewebeproben und vor allem der Onchozerkome wurden maximal 10 - 20% pro eingesetzte Gewebeprobe massenspektrometrisch sequenziert.

3.3.1 Identifikation von HLA-Liganden aus *O. volvulus* und *Wolbachia* innerhalb humaner Gewebeproben

Die massenspektrometrische Identifikation von Peptiden und Proteinen ist stark abhängig von der Wahl der Datenbank sowie der angelegten Filterkriterien. Dabei bestimmt der Ursprung der Gewebeprobe die Wahl der entsprechenden Datenbank. Ist eine Gewebeprobe menschlichen Ursprungs, so müssen die Rohdaten der massenspektrometrischen Sequenzierung folglich gegen eine Datenbank prozessiert werden, die ausschließlich humane Proteinsequenzen enthält. Sind in einer Gewebeprobe mehrere unterschiedliche Organismen enthalten, vergrößert dies den möglichen Suchraum für die Peptidannotation, da verschiedene Datenbanken unterschiedlicher Taxonomien verwendet werden müssen. Zusätzlich steigt dadurch die Wahrscheinlichkeit einer falsch positiven Sequenzannotation, da durch einen größeren Suchraum auch die Chance erhöht wird, dass eine Sequenz rein zufällig zu einem gegebenen Fragmentspektrum passt. Dem Problem einer falsch positiven Sequenzannotation kann über die Verwendung der FDR-Grenze begegnet werden, jedoch lassen sich darüber nur Peptidannotationen vergleichen, die innerhalb derselben Datenbank identifiziert wurden. Die im Rahmen des Projekts EPIAF bearbeiteten Gewebeproben stammen ursprünglich aus dem Menschen, enthalten jedoch neben dem

Parasiten *O. volvulus* auch Proteine seines Endosymbionten *Wolbachia*. Aufgrund technischer Schwierigkeiten war es nicht möglich, die Datenbanken der verschiedenen Organismen *Homo sapiens*, *O. volvulus* und *Wolbachia* aus UniProtKB zu vereinen. Aus diesem Grund wurden alle Rohdaten der massenspektrometrischen Sequenzierung unabhängig voneinander gegen die jeweiligen Datenbanken der entsprechenden Taxonomie prozessiert. Sofern die entsprechenden Sequenzen nicht homolog in zwei oder mehr der relevanten Organismen waren, wurde davon ausgegangen, dass jede Peptidannotation eines Fragmentspektrums nur einem einzigen Organismus zugewiesen werden kann. Eine Peptidannotation in der *O. volvulus*- bzw. in der *Wolbachia*-Datenbank wurde weiter untersucht, falls die Fragmentannotation der entsprechenden *m/z* der humanen Prozessierung schlechter ausfiel. Die Auswertestrategie wird beispielhaft an einer Peptidsequenz verdeutlicht und in Tabelle 22 gezeigt.

Tabelle 22: Vergleichende Analyse der Peptidannotation innerhalb verschiedener Datenbanken

Sequenz	<i>m/z</i>	<i>Ion Score</i>	RT	Datenbank	Gewebe	Antikörper
EEASKRAATLAQEL	506.2702	13	51.37	<i>H. sapiens</i>	N32#2	L243
LRELTTEEQREL	506.2702	26	51.37	<i>O. volvulus</i>	N32#2	L243
n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	<i>Wolbachia</i>	N32#2	L243

Abgebildet ist die Peptidannotation der *m/z* = 506.2702 in UniProtKB für die Organismen *H. sapiens*, *O. volvulus* und *Wolbachia*. Neben der Sequenzannotation in der entsprechenden Datenbank wurde zusätzlich der *Ion Score*, die Retentionszeit, der Gewebsursprung sowie der verwendete Antikörper der HLA-Affinitätschromatographie angegeben.

Die Peptidsequenz LRELTTEEQREL mit *m/z* = 506.2702 wurde über die Prozessierung gegen die Taxonomie *O. volvulus* der Proteindatenbank UniProtKB bei einer Retentionszeit von 51.37 min identifiziert. Über die Prozessierung der Rohdaten in der *Wolbachia*-Proteindatenbank wurde für die entsprechende *m/z* jedoch keine Peptidsequenzen identifiziert. Dagegen wurden über die Prozessierung der Daten über die humane Proteindatenbank die Sequenz EEASKRAATLAQEL der *m/z* = 506.2702 zugewiesen. Die Peptidannotation der humanen Prozessierung wurde allerdings schlechter bewertet als die Annotation über die *O. volvulus*-Datenbank. Die Bewertung der verschiedenen Peptidannotationen des gleichen Fragmentspektrums wurde manuell überprüft und bestätigt. Folglich wurde davon ausgegangen, dass das Fragmentspektrum der *m/z* = 506.2702 mit hoher Wahrscheinlichkeit auf der Peptidsequenz LRELTTEEQREL aus dem Organismus *O. volvulus* basiert. Schließlich wurde die Sequenz LRELTTEEQREL synthetisch hergestellt um das Fragmentspektrum mit der natürlichen Sequenz zu vergleichen. Eine Übersicht über die

relevanten Fragmentspektren mit den zugehörigen Peptidannotationen ist in Abbildung 26 dargestellt.

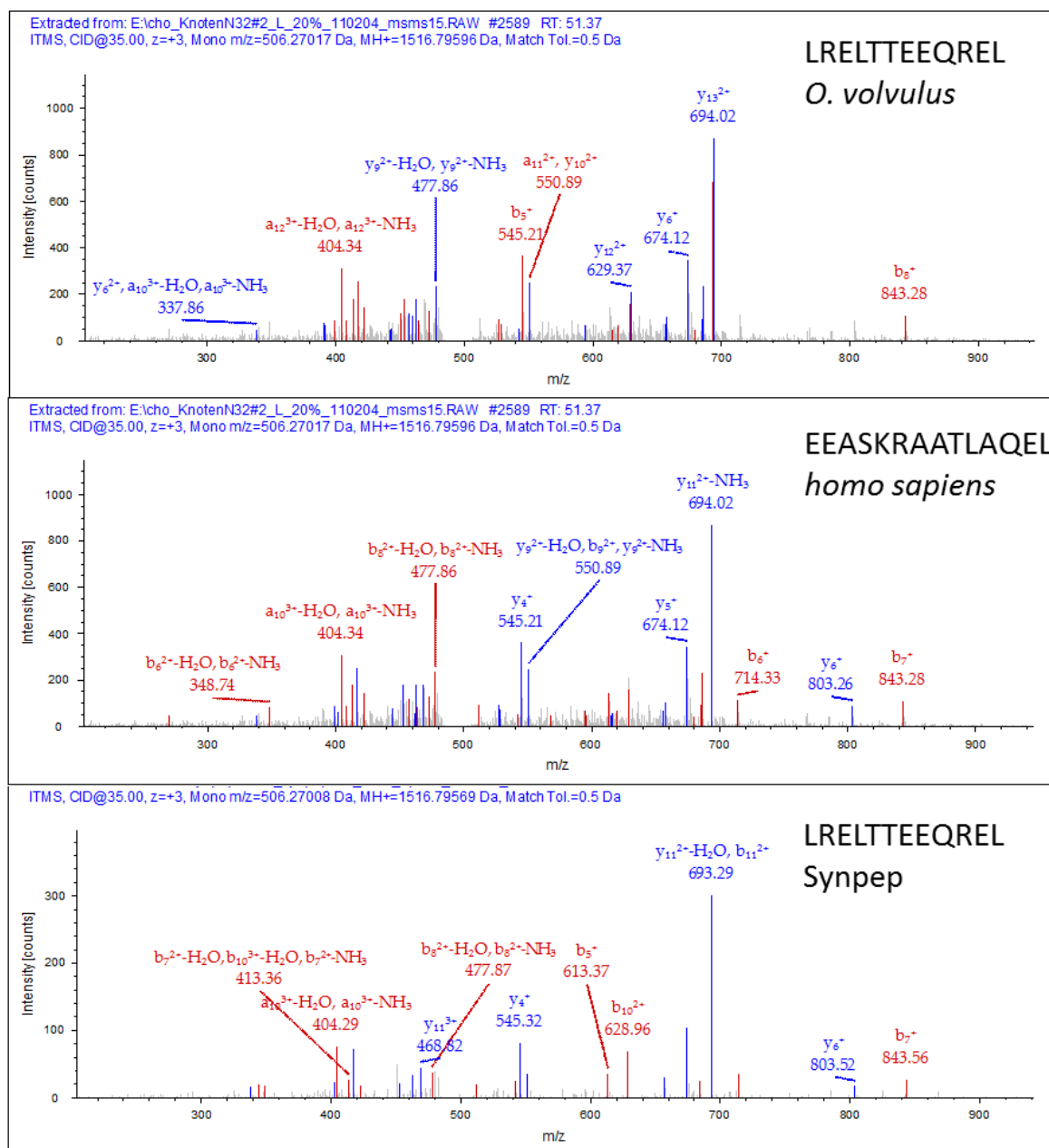


Abbildung 26: Vergleichende Peptidannotation derselben m/z in *O. volvulus* und *H. sapiens*

Abgebildet ist die Peptidannotation der m/z = 506.2702 in der *O. volvulus*-Datenbank (oben), in der *Homo sapiens*-Datenbank (mitte) sowie die Peptidannotation der synthetischen Sequenz LREL TTEE QREL in der *O. volvulus*-Datenbank.

3.3.2 HLA-Liganden aus *O. volvulus* und *Wolbachia*

Im Rahmen des Projekts EPIAF wurden insgesamt 8 der mit *O. volvulus* infizierten Gewebeproben homogenisiert und die HLA:Peptid-Komplexe wie in 2.2.16 beschrieben aufgereinigt. Neben den HLA-Klasse-II:Peptid-Komplexen wurden zusätzlich auch HLA-Klasse-I:Peptid-Komplexe aufgereinigt und die Liganden massenspektrometrisch sequenziert. Alle relevanten Sequenzen sowie die Protein- bzw. Organismenzugehörigkeit sind in Tabelle 23 dargestellt. Alle Sequenzen wurden massenspektrometrisch über ihre entsprechenden synthetischen Sequenzen verifiziert. Nur 2 der 4 analysierten Onchozerkome lieferten glaubwürdige Peptidsequenzen aus *O. volvulus* bzw. des Endosymbionten *Wolbachia*. Die Analyse der 4 mit Mikrofilarien durchsetzten Hautproben erbrachte hingegen keine auswertbaren Ergebnisse. Es wurden insgesamt 9 Peptidsequenzen aus parasitären bzw. bakteriellen Antigenen identifiziert. Aufgrund der Sequenzhomologie war die eindeutige Bestimmung der Quellproteine nicht für alle Sequenzen möglich. Ein Beispiel hierfür wäre die Sequenz IKQNNKELIYNVEA, die sowohl aus dem Endosymbionten als auch dem Wurm selbst stammen kann. Die Sequenz wurde über die HLA-Klasse-I-Affinitätschromatographie auf dem Onchozerkom N32#1 identifiziert, jedoch ist die besagte Sequenz mit ihren 14 Aminosäuren zu lang für einen typischen HLA-Klasse-I-Liganden. Die HLA-Assoziation der Sequenz IKQNNKELIYNVEA bleibt somit fraglich. Ähnlich verhält es sich mit der Sequenz LGGRFGLLGTDWEEAKIMA, die ebenfalls zu lang ist, um in die Bindungsfurche eines HLA-Klasse-I-Moleküls zu passen. Die Sequenzen RVEILGTKEV und TVGISKMSI besitzen hingegen die richtige Anzahl an Aminosäuren, um theoretisch von HLA-Klasse-I-Molekülen gebunden zu werden. Eine Bestimmung der HLA-Restriktion der eluierten Peptidsequenzen war aufgrund fehlender HLA-Typisierung der Spender bzw. der erhaltenen Gewebeproben nicht möglich.

Tabelle 23: Identifizierte HLA-Liganden aus *O. volvulus* und *Wolbachia*

Sequenz	UniProtKB	Protein	Taxonomie	Gewebe	AK
MRVEILGTKEV	P22085	Onchocystatin	<i>O. volvulus</i>	N32#2	W6/32
RVEILGTKEV	P22085	Onchocystatin	<i>O. volvulus</i>	N32#2	W6/32
LGGRFGLLGTDWEEAKIMA	P46434	Glutathione S-transferase	<i>O. volvulus</i>	N32#1	W6/32
FLRELTTEEQR	P21250	Immunodominant antigen Ov33-3	<i>O. volvulus</i>	N32#2	W6/32
	Q25621	MRNA insert in clone OC 3.6 containing the 3' end of an ORF	<i>O. volvulus</i>		
LRELTTEEQREL	P21250	Immunodominant antigen Ov33-3	<i>O. volvulus</i>	N32#2	L243
	Q25621	MRNA insert in clone OC 3.6 containing the 3' end of an ORF	<i>O. volvulus</i>		
TTAVVNGDFKEI	O44366	Thioredoxin peroxidase	<i>O. volvulus</i>	N32#2	L243
FTAGDEMISKYISG	Q9U9R9	Fructose-bisphosphate aldolase	<i>O. volvulus</i>	N32#1	W6/32
IKQNNKELIYNVEA	Q6KEZ5	60 kDa chaperonin	<i>O. volvulus</i>	N32#1	W6/32
	P91886	Heat shock protein 60	<i>Wolbachia</i>		W6/32
TVGISKMSI	B7TW37	NADH dehydrogenase subunit D	<i>Wolbachia</i>	N32#1	W6/32

Abgebildet sind alle über synthetische Peptide verifizierten Sequenzen mit Quellprotein sowie dem Quellorganismus. Neben der Gewebequelle wurde der verwendete Antikörper der HLA-Affinitätschromatographie angegeben.

4 Diskussion

4.1 Identifikation tumorassoziierter HLA-Klasse-I-Liganden für die Immuntherapie des Prostatakarzinoms

Der Hauptfokus dieser Arbeit bestand in der Identifikation und der Validierung von HLA-Klasse-I-Liganden aus tumorassozierten Antigenen für die Therapie des Prostatakarzinoms. Im Unterschied zu vielen Ansätzen auf dem Gebiet der Ligandenanalyse oder der Suche nach immunogenen Epitopen für die peptidbasierte Immuntherapie lag das Hauptaugenmerk nicht nur auf Liganden häufig exprimierter HLA-Allele (Bsp. HLA-A*02). Vielmehr war es das Ziel, HLA-Klasse-I-Liganden aus Prostata-spezifischen bzw. Prostatakrebs-assoziierten Proteinen zu identifizieren, ohne dabei eine Vorauswahl über die HLA-Restriktion der entsprechenden Sequenzen zu treffen. Im ersten Schritt wurden die Quellproteine aller identifizierter Peptidsequenzen über den *classical approach* bewertet. Auf diese Weise wurden insgesamt 28 Proteine selektiert, die bereits in der Literatur als Prostata-spezifisch, überexprimiert in (Prostata-) Krebs, von ihrer Funktion relevant für die Krebsentstehung bzw. das Fortschreiten der Krankheit oder als Zielstruktur in der Krebstherapie beschrieben wurden.

4.1.1 HLA-Klasse-I-Liganden für die Immuntherapie des Prostatakarzinoms

Die Auswahl an Antigenen umfasst neben ubiquitär exprimierten tumorassozierten Antigenen wie HDAC1-3, CTNNB1 oder WT1 auch bereits bekannte Prostata-spezifische Antigene wie PSA, KLK2, KLK4, PSMA und PAP. Diese Daten zeigen, dass die HLA-Ligandenanalyse von nicht malignem Prostatagewebe im Stande ist, Peptide aus Differenzierungsantigenen zu identifizieren, die ihrerseits als Zielstrukturen in der Immunotherapie verwendet werden können. Allerdings können über den *classical approach* ausschließlich Antigene identifiziert werden, die ihrerseits bereits in der Literatur beschrieben wurden. Desweiteren wird die Identifikation von TAA über den *classical approach* durch die Tatsache erschwert, dass weniger bekannte Antigene oft in verschiedenen Publikationen mit gegensätzlichen Aussagen beschrieben sind. Ein Beispiel hierfür wäre das Homeobox Protein NKX3.1, das aufgrund seiner Prostata-spezifischen Expression als potentiell Ziel in der Prostatakrebsimmuntherapie ausgewählt wurde²⁸². Allerdings ist bereits bekannt, dass Expression von NKX3.1 im Falle von Prostatakrebs erniedrigt ist, weshalb das Protein generell als Tumorsuppressor angesehen wird^{306,307}. Diese Herabregulation wird allerdings nicht auf der mRNA-Ebene, sondern vielmehr posttranslational

über die verstärkte Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau gesteuert^{284,285}. Die Tatsache, dass NKX3.1 Prostata-spezifisch exprimiert wird und das Protein, nicht aber die mRNA, im Falle von Prostatakrebs verstärkt abgebaut wird, macht NKX3.1 zu einem attraktiven Ziel in der Immuntherapie des Prostatakarzinoms. Dieses Beispiel verdeutlicht, dass die Identifikation von Antigenen nach dem *classical approach*, abhängig von der verfügbaren Literatur, kritisch betrachtet werden muss. Der Einsatz von Peptiden in der Immuntherapie ist dabei allerdings an einige Voraussetzungen gekoppelt. So muss die entsprechende Sequenz neben ihrer Immunogenität eine gewisse Spezifität für den entsprechenden Krebs aufweisen. Differenzierungsantigene der Prostata stellen in diesem Kontext besonders geeignete Kandidaten dar, da sie ihre Expression auf die Zellen der Prostata beschränken.

Die Sequenzen aller relevanten HLA-Liganden wurden über das entsprechende synthetische Peptid verifiziert. Die Validierung aller Peptidsequenzen über synthetische Peptide war notwendig, da die Qualität der Fragmentspektren aufgrund der geringen Masse der eingesetzten Proben gering ausfiel. Zusätzlich ermöglicht die Validierung der Kandidatenpeptide über die entsprechende synthetische Sequenz eine Erniedrigung der Filterkriterien für die Peptididentifikation bzw. das Screening nach geeigneten Sequenzen. Durch die Vernachlässigung der FDR sowie den Einsatz eines niedrigeren *Ion Score*-Grenzwertes wurde die Sequenzausbeute drastisch gesteigert, so dass durchschnittlich fast fünfmal so viele Sequenzen für die Literatursuche über den *classical approach* zur Verfügung standen. Die Herabsetzung der Filterkriterien ermöglichte die Identifikation von HLA-Liganden aus relevanten TAA, die über den Einsatz strengerer, in der Proteomik üblicher, Filterkriterien nicht detektierbar wären.

Neben der Überprüfung der Primärsequenz spielt die HLA-Restriktion der ausgewählten Peptide eine elementare Rolle für ihren Einsatz in der Immuntherapie. Da ausschließlich eine der analysierten Gewebeproben HLA-typisiert vorlag, wurde eine Strategie entwickelt, die es erlaubt, die wahrscheinlichste HLA-Restriktion einer bereits über die HLA-Affinitätschromatographie analysierten Gewebeprobe aufzuklären. Dies war notwendig, da nur eines der Gewebe HLA-typisiert vorlag. Über die Epitopvorhersage in SYFPEITHI und NetMHC (Ligandomat) wurde zuerst die häufigste HLA-Restriktion innerhalb einer Gewebeprobe über die eluierten Peptidsequenzen bestimmt. Aufgrund des experimentellen Aufbaus wurde davon ausgegangen, dass alle Peptidsequenzen der Länge von 8-11 Aminosäuren aus HLA-Klasse-I-Molekülen eluiert wurden. Im nächsten Schritt wurden die HLA-Proteine aus dem Schritt der HLA-Affinitätschromatographie jeder Gewebeprobe enzymatisch verdaut und massenspektrometrisch analysiert. Über die Identifikation von Peptidsequenzen aus HLA-Klasse-I-Proteinen, die selbst nur in einem oder wenigen HLA-

Proteinen kodiert sind, ließen sich über Kombination und Ausschlussverfahren die wahrscheinlichste HLA-A- und -B-Expression der Gewebeprobe zumindest teilweise bestimmen. Hierfür wurde angenommen, dass pro Gewebe maximal zwei HLA-A-, bzw. HLA-B-Allele exprimiert werden. Jedoch lieferten nur 12 der 21 analysierten Gewebeproben Sequenzen aus HLA-Proteinen, die für die Aufklärung der HLA-Restriktion nützlich waren. Eine Erklärung für das Fehlen relevanter Sequenzen aus HLA-Proteinen wäre die generell niedrige Sequenzausbeute der HLA-Ligandenanalyse der entsprechenden Gewebeproben. Die Sequenzausbeute der relevanten 9 Gewebeproben fiel verhältnismäßig geringer aus, verglichen mit allen anderen Gewebeproben. Wurden von einer Gewebeprobe unterdurchschnittlich wenig HLA-Liganden identifiziert, so ist es wahrscheinlich, dass die HLA-Proteinkonzentration des Retentats der HLA-Affinitätschromatographie ebenfalls gering ausfiel. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die häufigste HLA-Klasse-I-Restriktion eines beliebigen Gewebes über die eluierten HLA-Liganden bzw. durch Epitopvorhersage bestimmen lässt. Die Vorhersage lässt sich dabei zusätzlich experimentell über den Verdau von HLA-Molekülen bestätigen, wobei abhängig von den exprimierten HLA-Allelen teilweise nur Allelkombinationen identifiziert werden konnten. Ein Problem stellt die homozygote Allelexpression dar, die über diese Methode nicht zweifelsfrei belegt werden kann. Zusätzlich zeigen diese Daten, dass schon die Verwendung eines Enzymes in der HLA-*shotgun*-Analytik ausreichend ist, um einzigartige Sequenzen aus der sehr homologen Klasse der HLA-Klasse-I-Proteine zu identifizieren.

Als nächstes wurde überprüft, ob die HLA-Liganden aus TAA der Prostata in ihrem HLA-Motiv zu den zugewiesenen HLA-Restriktionen der Gewebequellen passen. Die Epitopvorhersage bestätigte die HLA-Restriktion der HLA-Liganden in Übereinstimmung mit der Gewebeprobe innerhalb der festgelegten Grenzwerte in SYFPEITHI oder NetMHC. Es wurde gezeigt, dass alle HLA-Liganden ein Peptidmotiv entsprechend der HLA-Restriktion der Gewebeprobe besitzen. Einige HLA-Liganden wurden auf mehreren Gewebeproben identifiziert, weshalb die HLA-Restriktion der jeweiligen Sequenz verschiedene HLA-Allele umfasst. Da alle Sequenzen ausschließlich auf ihre HLA-A- und HLA-B-Restriktion überprüft wurden, war nicht auszuschließen, dass die Sequenzen womöglich von HLA-C-Molekülen gebunden und präsentiert wurden. Aufgrund der geringen Abdeckung des HLA-C-Lokus in den Programmen für die Epitopvorhersage war eine Überprüfung der HLA-C-Restriktion in Epitopvorhersage Programmen nicht möglich. Die über Epitopvorhersage ermittelte HLA-Restriktion der eluierten Peptidliganden basiert zwar auf experimentell gewonnenen Daten, jedoch bleibt jede HLA:Peptid-Assoziation letztlich nur eine Vorhersage. Die HLA-Restriktion einer gegebenen Sequenz lässt sich nur dann bestätigen, wenn die Sequenz in das entsprechende HLA-Monomer zurückgefaltet wurde. Im Rahmen der vom DKTK geförderten MultiPro Kooperation wurden die

bestätigten HLA-Liganden aus TAA der Prostata deshalb über die *in vitro*-Stimulation naiver CD8⁺ T-Zellen auf ihre Immunogenität getestet. Gleichzeitig wurde über die Rückfaltung in die entsprechenden Monomere die zugewiesene HLA-Restriktion der Kandidatensequenzen verifiziert. Über alle Standorte verteilt wurden insgesamt 33 der identifizierten HLA-Liganden in 228 Experimenten auf ihre Immunogenität geprüft. Am Standort Tübingen wurden 16 der 33 Peptide in 89 Experimenten getestet. Davon zeigten die Peptide in 37 Experimenten tetramerpositive bzw. antigenspezifische CD8⁺ T-Zell Populationen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die auf Prostatagewebe identifizierten natürlichen HLA-Liganden im Stande sind, eine spezifische CD8⁺ T-Zell-Antwort zu induzieren.

4.1.2 Peptidcocktail für die Immuntherapie des Prostatakarzinoms

Das erklärte Ziel des MultiPro-Kooperationsprojekts war die Herstellung eines Multipeptidcocktails zur Behandlung von Patienten mit Prostatakarzinom. Neben dem Einsatz verschiedener HLA-Liganden aus TAA der Prostata sollte der Peptidcocktail zusätzlich HLA-Liganden verschiedenster HLA-Restriktionen beinhalten, um über die Gabe eines Cocktails möglichst viele Menschen innerhalb der Population abdecken zu können. Der Grundgedanke dieser Strategie basiert auf Überlegungen zum gegenwärtigen Arzneimittelgesetz. Im Normalfall werden bei der peptidbasierten Immuntherapie mit HLA-Klasse-I-Liganden ausschließlich Sequenzen verabreicht, die in ihrem HLA-Motiv zu der HLA-Expression des entsprechenden Patienten passen. Dies hat zur Folge, dass alle Peptide individuell auf den jeweiligen Patienten bzw. entsprechend seiner HLA-Expression angepasst werden müssen. Folglich muss jeder Peptidcocktail für die Therapie individuell auf jeden Patienten einzeln zugeschnitten und unter GMP-Bedingungen (engl. *good manufacturing practice*) konform dem Arzneimittelgesetz hergestellt werden. Die GMP-Produktion von Peptidmischungen in Übereinstimmung mit dem Arzneimittelgesetz ist allerdings mit enormem Zeitaufwand und sehr hohen Kosten verbunden, wobei lediglich eine kleine Gruppe von Patienten innerhalb der Population vom jeweiligen Cocktail profitiert. Die Produktion individueller Peptidcocktails bleibt die Methode der Wahl, da sichergestellt wird, dass alle im Cocktail enthaltenen Peptide auf HLA-Molekülen des Patienten gebunden werden. Umgekehrt konnte bis heute nicht gezeigt werden, dass Peptide, die aufgrund ihrer HLA-Restriktion nicht von den HLA-Molekülen eines Patienten gebunden werden, unerwünschte Nebenwirkungen auslösen. Die Kombination von Peptiden verschiedenster HLA-Restriktion erlaubt theoretisch eine höhere Abdeckung innerhalb der Population. Der klare Vorteil dieser nicht-individualisierten Strategie liegt neben der breiten Anwendung vor allem in der Produktion und Evaluation eines einzelnen Peptidcocktails, der in der Mehrheit der Population eingesetzt werden kann. Sobald dieser Peptidcocktail mit HLA-

Liganden verschiedenster HLA-Restriktionen entwickelt wurde, lassen sich die einzelnen Komponenten theoretisch wieder zu einem individualisierten Peptidcocktail formulieren.

Auf der Basis der in dieser Arbeit identifizierten immunogenen HLA-Liganden lässt sich ein Peptidcocktail formulieren, der aufgrund der HLA-Restriktion der enthaltenen Peptide theoretisch in 99,99% der deutschen Population zumindest ein Peptid der passenden HLA-Restriktion aufweist. Allerdings würde das nur gelten, falls die Immunogenität, also die Erkennungsrate von jedem Peptid, bei 100% liegt, was im Normalfall nicht gegeben ist. Um die kumulative Populationsabdeckung zu errechnen wurden die entsprechenden Allelhäufigkeiten innerhalb einer deutschen Population (n = 11407; Stand 1. August 2014) bestimmt, in die jeweiligen Phänotyphäufigkeit übersetzt und in Tabelle 24 dargestellt. Für die Bestimmung der kumulativen Populationsabdeckung wurden ausschließlich Peptide aus Tabelle 19 in Betracht gezogen, die mindestens in einem Spender eine positive Reaktion zeigten. Die Kombination der HLA-Allele HLA-A*02, -A*03, -A*11, -A*24, -B*07, -B*15, -B*40 und -B*44 erlaubt theoretisch eine Populationsabdeckung innerhalb der deutschen Bevölkerung von mehr als 99,99%. Abhängig von der Allelkombination lassen sich verschiedene Populationsabdeckungen mit unterschiedlicher Anzahl an Peptiden erreichen. Werden zuerst die HLA-Allele mit der häufigsten Allel- bzw. Phenotypfrequenz verrechnet, erhält man die höchste Populationsabdeckung bei der geringsten Zahl an eingesetzten Sequenzen (s. Tabelle 24). Über die Kombination der Allele HLA-A*02, -A*03, -B*07, -B*44 werden bereits über 90% der Population abgedeckt. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass schon die Kombination von 5 Peptiden theoretisch ausreicht, um in über 95% der Population mindestens ein Peptid auf dem passenden HLA-Molekül zu präsentieren.

Tabelle 24: Berechnungen zur kumulativen Allelhäufigkeit

Allel	Allelfrequenz	Phänotypfrequenz	Kumulative Allelfrequenz	Allelkombination
A*02	0,2921	49,89%	49,89%	A*02
A*03	0,1550	28,60%	69,43%	A*02+A*03
B*07	0,1310	24,48%	82,20%	A*02+A*03+B*07
B*44	0,1276	23,89%	91,34%	A*02+A*03+B*07+B*44
A*24	0,0950	18,10%	96,03%	A*02+A*03+B*07+B*44+A*24
B*15	0,0796	15,29%	98,57%	A*02+A*03+B*07+B*44+A*24+B*15
B*40	0,0656	12,69%	99,71%	A*02+A*03+B*07+B*44+A*24+B*15+B*40
B*51	0,0619	12,00%	>99,99%	A*02+A*03+B*07+B*44+A*24+B*15+B*40+B*51
A*11	0,0513	10,00%	>99,99%	A*02+A*03+B*07+B*44+A*24+B*15+B*40+B*51+A*11

Abgebildet sind die HLA-Allele aller Peptidsequenzen, deren Immunogenität in mindestens einem Spender positiv getestet wurde. Die Phenotypfrequenz wurde aus <http://www.allelefreqencies.net> entnommen (n = 11 0407; Germany) und die Allelfrequenz sowie die kumulative Allelfrequenz der Allelkombination berechnet³⁰⁸.

4.2 HLA-DR15-Ligandenanalyse im Kontext der Multiplen Sklerose

4.2.1 HLA-Klasse-II-Liganden in Präsentation auf HLA-DR15

Trotz großer Fortschritte auf dem Gebiet der Immunologie in den letzten Jahren und Jahrzehnten ist der gegenwärtige Wissenstand über HLA-Klasse-II-Moleküle und ihr Beitrag zu Autoimmunerkrankungen relativ gering^{123,309}. Obwohl seit längerem bekannt ist, dass HLA-DR15 ein Hauptrisikofaktor für die Entstehung der Multiplen Sklerose ist, bleibt dennoch ungewiss, wie HLA-DR15 das autoreaktive T-Zellrepertoire beeinflusst und dadurch die Autoimmunität im ZNS auslöst. In diesem Kontext wurde von Mohme *et al.* die Hypothese aufgestellt, dass Peptide aus HLA-DR15 in Eigenpräsentation von selbigem HLA-Molekül gebunden und präsentiert werden. Dabei wird angenommen, dass die präsentierten Selbst-Peptide mikrobielle oder virale Peptide imitieren und dadurch als Zielstruktur der Autoimmunitätsreaktion dienen. Die Hypothese basiert dabei auf der Tatsache, dass neben IL-7 vor allem die Interaktion des CD4⁺ T-Zellrezeptors mit HLA-Klasse-II-Molekülen die T-Zellen in der Peripherie am Leben hält. Dabei gewinnt die autologe homeöostatische Proliferation mit zunehmendem Alter an Bedeutung, da die Zahl der neugewonnen T-Zellen im Thymus sinkt und über die homöostatische Proliferation ausgeglichen werden muss³¹⁰. Patienten mit MS zeigen eine frühere Involution des Thymus sowie eine Reduktion in der CD4⁺ T-Zellproduktion³¹¹. Die homöostatische Proliferation reguliert dabei das Überleben der naiven T-Zellen in der Peripherie über die Avidität bzw. Affinität des T-Zellrezeptors³¹². Diese Ergebnisse zeigen, dass die autologe bzw. homöostatische Proliferation das T-Zell-Repertoire in der Peripherie über einen Mechanismus von Selektion und bevorzugter Aktivierung dahingehend beeinflusst, dass vor allem T-Zellen mit hoher Affinität für die HLA:Peptid-Komplexe zur Proliferation angeregt werden. Während der T-Zellaktivierung berührt der T-Zellrezeptor sowohl die α -Helices des MHC-Moleküls als auch das gebundene Peptid, wobei 60% der Interaktion zwischen MHC und TCR stattfindet³¹³. Daraus folgt, je höher der Beitrag des HLA zur Gesamtavidität, desto mehr Peptide können vom TCR erkannt werden. Zudem ist bereits bekannt, dass vor allem HLA-Klasse-II-Moleküle Peptide präsentieren, die selbst im jeweiligen HLA-Molekül kodiert sind⁶⁰. Um die potentielle Rolle des Risikoallels HLA-DR15 in der Multiplen Sklerose zu untersuchen, wurden BLS-Zellen mit HLA-DRB1*15:01 (DR2b) oder HLA-DRB5*01:01 (DR2a) transifiziert und die HLA-Liganden über die HLA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Mehrheit der identifizierten Sequenzen stammt aus Proteinen für die Antigenprozessierung bzw. Antigenpräsentation¹²³. Es wurden 55 einzigartige Peptidsequenzen aus DR2a- bzw. 68 Peptidsequenzen aus DR2b-Molekülen eluiert und sequenziert, wobei 9 Sequenzen aus dem relevanten DR2a- bzw. DR2b-Antigen identifiziert wurden. Zusätzlich

wurden insgesamt 9 einzigartige Peptidsequenzen aus dem Antigen CD74, auch invariante Kette (Ii) genannt, identifiziert. Aufgrund der Länge der eluierten Sequenzen war eine Überprüfung der Fragmentspektrenannotation über synthetische Peptide nicht möglich. Die Filterkriterien der massenspektrometrischen Prozessierung wurden über den Einsatz eines strikten FDR-Grenzwertes so gewählt, dass die Wahrscheinlichkeit einer falsch positiven Peptididentifikation bei $\leq 1\%$ lag. Um das stimulatorische bzw. inhibitorische Potential der Peptide aus HLA-DR15 weiter zu charakterisieren, wurden diverse Peptide aus HLA-DR15 für Stimulationsversuche in 35 gesunden wie erkrankten Spendern getestet. Neben 24 Peptidgemischen aus HLA-DR15-Peptiden wurden zusätzlich zwei der eluierten Sequenzen selektiert und für die Stimulationsversuche eingesetzt. Da die eluierten Sequenzen mit hoher Wahrscheinlichkeit auch *in vivo* präsentiert werden, wurden diese ebenfalls getestet. Die Peptidsequenz SDVGEFRAVTELGRP aus HLA-DRB1*15:01 (DR2a) sowie die Sequenz EEFGRFASFQAQAL aus HLA-DRA (DR2b) zeigten einen starken stimulatorischen Effekt auf die Proliferation von PBMCs. In dieser Arbeit wurden die entsprechenden homologen Sequenzen DVGEYRAVTELGRPD aus DR2a bzw. die Sequenz LEEFGRFASFQAQAL aus DR2a identifiziert.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass einige Peptide aus dem HLA-DR15 Haplotyp die Fähigkeit besitzen, eine PBMC-Population zur Proliferation anzuregen, wohingegen andere Peptide die Aktivierung bzw. die Proliferation inhibieren. Dies deutet darauf hin, dass Peptide des HLA-DR15-Haplotyps in Kombination mit den strukturellen Eigenschaften der zwei HLA-DR-Moleküle die autologe Proliferation verstärken. Dennoch bleibt aufzuklären, ob die aktivierten T-Zellen, die über die autologe Proliferation expandiert wurden, tatsächlich über die Kreuzreaktion mit Myelin- oder Autoantigenen des ZNS interagieren³¹⁴. Weiterhin bleibt offen, ob die autologe Proliferation eine bevorzugte Differenzierung der T-Zellen in einen proinflammatorischen Phänotyp begünstigt und diese T-Zellen letztlich über Fremdanigene aktiviert werden können. Aufgrund der vorliegenden Daten wird von Mohme *et al.* folgendes Modell zur Entstehung der Multiplen Sklerose vorgeschlagen:

Die beiden HLA-DR-Allele des Haplotyps HLA-DR15 und ein bis zum jetzigen Zeitpunkt unbekanntes Selbst-Peptid verändern das bestehende T-Zellrepertoire über die Mechanismen der zentralen Toleranz dahingehend, dass vorwiegend Autoantigene des ZNS erkannt werden. Positiv selektierte T-Zellen werden über die periphere homöostatische Proliferation am Leben gehalten oder expandiert, was wiederum die Interaktion mit den Molekülen des Haplotyps HLA-DR15 miteinbezieht. Dabei spielen Peptide aus dem Haplotyp HLA-DR15, die auf selbigem Molekül präsentiert werden, eine entscheidende Rolle. Die genetisch vorbestimmte, erniedrigte Aktivierungsgrenze des T-Zellrepertoires in Kombination mit bestimmten Umweltfaktoren induziert schließlich die volle Aktivierung

und Expansion der autoreaktiven T-Zellen, deren proinflammatorische Differenzierung schließlich zur Bildung der Multiplen Sklerose führt.

4.3 HLA-Liganden im Kontext der parasitären Onchozerkose

4.3.1 HLA-Klasse-I- und -Klasse-II-Liganden aus *O. volvulus* und *Wolbachia*

Onchocerca volvulus ist der Erreger der Onchozerkose, die in ungefähr 10% aller Fälle zur Erblindung, der sogenannten Flussblindheit, führt. Aufgrund fehlender Vakzine bzw. Medikamente lassen sich Patienten in endemischen Gebieten kaum vor den Folgen der Krankheit bewahren. Obwohl mit Ivermectin ein Breit-Spektrum-Antiparasitikum existiert, das die Ausbreitung der Filarien über den Zwischenwirt verringert, bleibt die Onchozerkose aufgrund der langen Lebensdauer der adulten Würmer in weiten Teilen Afrikas ein ernst zu nehmendes Problem. Ivermectin wirkt ausschließlich mikrofilarizid, was bedeutet, dass es zwar die Mikrofilarien in der Haut der Betroffenen, nicht aber die verkapselten adulten Tiere unschädlich machen kann. Somit wird durch Ivermectin ausschließlich die Transmission der Krankheit unterbunden, indem die Verbreitung der Mikrofilarien vom Menschen auf die Kriebelmücke und die damit verbundene Neuinfektion verhindert wird. Die adulten Würmer verbleiben ohne morphologische Veränderungen im Menschen und produzieren weiterhin Mikrofilarien.

Das Auftreten neuer Resistenzen gegenüber Ivermectin zeigt die dringende Notwendigkeit, die Entwicklung neuer Vakzine und Chemotherapeutika voranzutreiben³¹⁵. Wie bereits erwähnt, lösen Infektionen mit parasitären Helminthen bevorzugt eine starke Th2-Immunantwort aus, wobei die Typ2-polarisierten CD4⁺ T-Helferzellen wiederum über die B-Lymphozytenaktivierung die antiparasitäre Immunantwort in Gang setzen.

In Rahmen dieser Arbeit wurde überprüft, ob sich aus mit *O. volvulus* infizierten humanen Gewebeproben HLA-Liganden isolieren lassen, die entweder aus dem Parasit selbst oder aus dem Endosymbionten *Wolbachia* stammen. Aus diesem Grund wurden im Rahmen des von der EU geförderten Projekts EPIAF Onchozerkome und mit Mikrofilarien durchsetzte Gewebeproben in Togo von Dr. Soboslay und Kollegen mit der Einwilligung der Patienten gesammelt und für die HLA-Ligandenanalyse nach Tübingen transportiert. Insgesamt 8 Gewebeproben schwarzafrikanischer Onchozerkosepatienten (4 Onchozerkome, 4 Hautproben) wurden homogenisiert, die HLA:Peptid-Komplexe über die Affinitätschromatographie aufgereinigt und die HLA-Liganden massenspektrometrisch sequenziert. Nur 2 der 8 analysierten Gewebeproben lieferten Kandidatensequenzen, die sich über die entsprechende synthetische Sequenz verifizieren ließen. Die Analyse der mit Mikrofilarien

durchsetzten Hautgewebe erbrachte keine relevanten Sequenzen aus *O. volvulus* bzw. *Wolbachia*. Eine mögliche Erklärung für die niedrige Sequenzausbeute aus parasitären oder bakteriellen Proteinen ist die Zusammensetzung der Gewebeproben an sich. Aufgrund des hohen Bindegewebsanteils der Hautproben und besonders der Onchozerkome waren die Ergebnisse der humanen Prozessierung verglichen mit den Daten humaner Gewebeproben im Kontext des Prostatakarzinoms von schlechterer Qualität. Die Daten der humanen Prozessierung zeigten zum einen generell weniger Sequenzen der richtigen Länge zum anderen eine Überrepräsentation von Sequenzen aus extrazellulären Proteinen. Aufgrund der Länge der Sequenzen in den entsprechenden HLA-Klasse-I- bzw. HLA-Klasse-II-Aufreinigungen bleibt die HLA-Assoziation der identifizierten Peptide fraglich. Die Tatsache, dass selbst die Mehrzahl der identifizierten Sequenzen aus *O. volvulus* bzw. *Wolbachia* nicht die typische Länge eines HLA-Klasse-I- bzw. Klasse-II-Liganden besitzen, erhöht die Fragwürdigkeit der HLA-Assoziation weiter. So zeigten nur insgesamt 4 der identifizierten Sequenzen die richtige Länge für die Assoziation mit einem HLA-Klasse-I-Molekül (RVEILGTKEV, TVGISKMSI) bzw. mit einem HLA-Klasse-II-Molekül (TTAVVNGDFKEI, LRELTTEEQREL). Die HLA-Restriktion der gezeigten Sequenzen ließ sich aufgrund der fehlenden HLA-Typisierung der Gewebespender nicht überprüfen. Die Analyse der im Retentat enthaltenen HLA-Moleküle nach der in 2.2.17 beschriebenen Methode war aufgrund des geringen Probenvolumens und dem hohen Anteil an Bindegewebe nicht möglich. Aufgrund der synthetischen Peptidverifikation bleibt dennoch festzuhalten, dass die gezeigten Sequenzen tatsächlich in der jeweiligen Gewebeprobe enthalten waren.

5 Zusammenfassung

Auf der Oberfläche aller kernhaltigen Zellen befinden sich spezielle membranständige Proteinkomplexe, die sogenannten Haupthistokompatibilitätskomplexe (engl. Major Histocompatibility Complex, MHC). Die Funktion der MHC-Moleküle besteht in der Präsentation aller in einer Zelle exprimierten Proteine (Proteom) in Form von kurzen Peptiden, den MHC-Liganden, auf der Zelloberfläche. MHC-Liganden sind von zentraler Bedeutung in der Immunologie, da sie sowohl bei der Erkennung und Bekämpfung von Krankheiten, als Zielstruktur in der Krebsimmuntherapie aber auch bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle spielen.

Ziel dieser Arbeit war die Identifikation und Validation von MHC-Liganden im Kontext der Prostatakrebsimmuntherapie, der Autoimmunität bei der Multiplen Sklerose sowie die Identifikation parasitärer und bakterieller MHC-Liganden aus Gewebe mit Onchozerkose. Insgesamt wurden 21 Prostatagewebe, 2 MHC-Klasse-II-transfizierte Zelllinien sowie 8 Gewebeproben aus Patienten mit Onchozerkose bearbeitet und die MHC-Liganden massenspektrometrisch analysiert. Aufgrund der unterschiedlichen Fragestellungen war es notwendig, die Parameter für die Identifikation und Bewertung der MHC-Liganden anzupassen, um so die Anzahl möglicher Kandidatenpeptide zu erhöhen oder die Zahl falsch positiver Peptididentifikationen zu erniedrigen. Aus über 38 000 identifizierten Sequenzen auf Prostatagewebe wurden 63 Peptidsequenzen aus 28 tumorassoziierten Antigenen (TAA) der Prostata selektiert und *in vitro* auf Immunogenität getestet. Neben ubiquitär exprimierten TAA wurden zusätzlich auch Liganden aus Differenzierungsantigenen der Prostata, wie PSA, PAP und PSMA identifiziert. Alle MHC-Klasse-I-Liganden wurden über synthetische Peptide der entsprechenden Sequenz verifiziert sowie die HLA-Restriktion über Epitopvorhersage bestätigt. Zusätzlich wurde eine Methode entwickelt, die es erlaubt, die wahrscheinlichste HLA-Restriktion einer bereits analysierten Gewebeprobe aufzuklären. Im Rahmen des Multiplen Sklerose-Projekts wurden HLA-Klasse-II-Liganden aus dem relevanten HLA-DR15 in Präsentation auf selbigem Molekül erfolgreich identifiziert. Über die MHC-Ligandenanalyse der humanen Gewebeproben mit Onchozerkose wurden insgesamt 9 Peptide aus *Onchocerca volvulus* oder *Wolbachia* eindeutig identifiziert und ihre Sequenz über synthetische Peptide bestätigt.

6 Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
Δm	Massendifferenz
aAPC	<i>Artificial antigen presenting cell</i>
AcN	Acetonitril
ACPP	<i>Acidic prostate phosphatase, siehe PAP</i>
ADT	<i>androgen deprivation therapy</i>
AFS	Anteriore fibromuskuläres Stroma
AGC	<i>Automatic gain control</i>
ANN	<i>artificial neuronal network</i>
APC	<i>Antigen presenting cell</i>
APC8015	Sipuleucel-T
B7.1	Kostimulatorisches Oberflächenmolekül CD80
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BLS	<i>Bare lymphocyte syndrome</i>
bp	Basenpaar
BPH	<i>Benign prostate hyperplasia</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i> <i>3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate</i>
CHAPS	
CID	<i>Collision induced dissociation</i>
CLIP	<i>Class II invariant chain-associated peptide</i>
CNS	<i>Central nervous system, siehe ZNS</i>
CRM	<i>charge residue model</i>
CTL	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte</i>
C-Trap	C-förmige Ionenfalle
Cx	Cystektomie
CZ	Innenzone der Prostata
Da	Dalton
DC	<i>Dendritic cell</i>
DER	<i>Digital rectal examination</i>
DKTK	Deutsches Konsortium für translationale Krebsforschung
DMF	Dimethylformamid
DRiPs	<i>Defective ribosomal products</i>
DTT	Dithiothreitol
e	elementare Ladungseinheit
EBV	Epstein-Barr-Virus
ED	Encephalomyelitis disseminata, siehe MS
EDTA	<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>
EPIAF	<i>Enhanced Protective Immunity Against Filariasis</i>
ER	Endoplasmatic reticulum
ERAAP	<i>ER aminopeptidase associated with antigen processing</i>
ESI	<i>Electrospray ionisation</i>
FA	<i>Formic acid</i>

FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FDR	<i>False discovery rate</i>
FFT	<i>Fast fourier transform</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
FT	<i>Fourier-Transformation</i>
FWHM	<i>Full width at half maximum</i>
GEO	<i>Gene expression omnibus</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
H&E staining	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HCD	<i>Higher energy collisionally activated dissociation</i>
HCl	Salzsäure
HD	<i>High density</i>
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HPA	<i>Human protein atlas</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IC50	Mittlere inhibitorische Konzentration
IEM	Ionenemissionsmodell
IFN γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
IS	<i>Immune system</i>
IT	<i>Ion Trap</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
k	Feldkrümmung
LC-MS	<i>Liquid chromatography mass spectrometry</i>
LD	<i>Low density</i>
Loc us	Genort
LPS	Lipopolysaccharide
LTQ	<i>Linear trap quadrupole</i>
M	Metastasen
m/z	Masse-zu-Ladungs Verhältnis
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i>
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionisation</i>
MASCOT	Suchmaschine für MS/MS Daten
mCRPC	<i>Metastatic castration-resistant prostate cancer</i>
MF	Mikrofilarie
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MIIC	<i>MHC class II containing compartment</i>
Milli-Q	<i>ultrapure water (Millipore Corporation)</i>
MOWSE	<i>Molecular weight search</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Massenspektrometer
MS/MS	Fragmentierungsmodus
MSn	Fragmentierungsmodus mit n Fragmentierungen
N	<i>Nodes</i>
n.a.	<i>Not assigned</i>

n.d.	<i>Not detected</i>
NCBI	<i>National center for biotechnology information</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa of activated B-cells</i>
NK	Natürliche Killerzelle
ORF	<i>Open reading frame</i>
PAMPS	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PAP	<i>Prostatic acid phosphatase, siehe ACPP</i>
PBL	Periphere Blut Lymphozyten
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
Pca	Prostatakarzinom
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEG	<i>Polyethylen glycol</i>
PIF	<i>Precursor ion fraction</i>
PLC	<i>Peptide-loading complex</i>
PMA	phorpol 12-myristate 13-acetat
PPA	Palpatio per anum
ppm	<i>Parts per million</i>
PPMS	<i>Primary progressive multiple skerosis</i>
PRMS	<i>Progressive-relapsing multiple sklerosis</i>
PRR	<i>Pattern-recognition receptor</i>
PSA	Prostata-spezifisches Antigen KLK3
Px	Prostatektomie
PZ	Peripheren Drüsenabschnitte der Prostata
RF	<i>Radio frequency</i>
RFQ	<i>Radio-frequency quadrupole</i>
RP	<i>reversed Phase</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RRMS	<i>Relapsing-remitting multiple skerosis</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
SPMS	<i>Secondary-progressive multiple skerosis</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
T	Tumor
TAA	<i>Tumor-associated antigen</i>
TAP	<i>Transporter associated with antigen processing</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i>
TFA	Trifluoressigsäure
TGF β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TH	T-Helferzelle
Th	Thomson
TH17	Typ17-T-Helferzelle
TIC	<i>Total ion count</i>
TNM	TNM-Klassifikation
TOF	<i>Time-of-flight</i>
Treg	Regulatorische T-Zelle
TRiC	<i>TCP-1 Ring Complex</i>
TURP	Transurethrale Resektion der Prostata

TVP	Transurethrale Vaporisation der Prostata
TZ	Periurethrale Mantelzone
uHPLC	<i>ultra high performance liquid chromatography</i>
Urethra	Harnröhre
w/v	<i>weight per volume</i>
y	atomare Masseneinheit
z	Ladung
ZNS	Zentrales Nervensystem, siehe CNS
ω	Winkelgeschwindigkeit

7 Danksagung

Ich danke ...

... Prof. Dr. Stefan Stevanović für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, sein jederzeit offenes Ohr für Fragen und seine konstruktive Kritik.

... Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee für die Aufnahme in sein Institut, sein Interesse und seine Fragen zu meinen Ergebnissen sowie die stets hilfreichen Ratschläge und Anmerkungen.

... Prof. Dr. med. Arnulf Stenzl und Dipl. Biol. Jörg Hennenlotter des Universitätsklinikums Tübingen für die Bereitstellung der Prostatagewebebeobachten.

... Prof. Dr. Peter Soboslay für die Bereitstellung der mit *O. volvulus* infizierten Gewebeproben sowie für die Zusammenarbeit im Rahmen des Projekts EPIAF.

... Prof. Dr. Roland Martin und Malte Mohme für die Bereitstellung der BLS-Zellen und die Kooperation im Rahmen des MS-Projekts.

... Daniel Kowalewski, Heiko Schuster, Theo Sturm, Nico Trautwein und Armin Rabsteyn für die Verwaltung und Instandhaltung des LC-MS Systems.

... ganz besonders Lea Prokop, Stefanie Souczek, Janet Peper und Maren Lübke für die Hilfe im Rahmen des Projekts MultiPro.

... ganz besonders Patricia, Nicole, Beate, Claudia und Franziska dafür, dass sie die Abteilung durch ihre Arbeit am Laufen halten und immer ein offenes Ohr für Fragen hatten.

... ganz besonders meiner Familie, meinen Freunden und allen „Elchen“.

8 Literaturverzeichnis

1. Matzinger, P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 991–1045 (1994).
2. Rock, F. L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A. & Bazan, J. F. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 588–93 (1998).
3. Fearon, D. T. & Locksley, R. M. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* **272**, 50–3 (1996).
4. Traherne, J. A. Human MHC architecture and evolution: implications for disease association studies. *Int. J. Immunogenet.* **35**, 179–92 (2008).
5. Gorer, P. A. The significance of studies with transplanted tumours. *Br. J. Cancer* **2**, 103–7 (1948).
6. Madrigal, P. J. A. Anthony Nolan Research Institute. *HLA Nomencl.* (2014). at <<http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>>
7. Colten, H. R. Expression of the MHC class III genes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **306**, 355–66 (1984).
8. Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L. & Wiley, D. C. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* **329**, 506–12 (1987).
9. Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L. & Wiley, D. C. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* **329**, 512–8 (1987).
10. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 848 (Garland Science, New York, 2004).
11. Falk, K., Rötzschke, O., Stevanović, S., Jung, G. & Rammensee, H. G. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* **351**, 290–6 (1991).
12. Rammensee, H., Bachmann, J., Emmerich, N. P., Bachor, O. A. & Stevanović, S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* **50**, 213–9 (1999).
13. Vyas, J. M., Van der Veen, A. G. & Ploegh, H. L. The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 607–18 (2008).
14. Kurts, C., Robinson, B. W. S. & Knolle, P. A. Cross-priming in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 403–14 (2010).
15. Crotzer, V. L. & Blum, J. S. Autophagy and adaptive immunity. *Immunology* **131**, 9–17 (2010).
16. Groothuis, T. A. M., 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).

17. 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**, 377–84 (1998).
18. Qian, S.-B., Bennink, J. R. & Yewdell, J. W. Quantitating defective ribosome products. *Methods Mol. Biol.* **301**, 271–81 (2005).
19. Reits, E. A., Vos, J. C., Grommé, M. & Neefjes, J. The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature* **404**, 774–8 (2000).
20. Li, M., Wang, I. X., Li, Y., Bruzel, A., Richards, A. L., Toung, J. M. & Cheung, V. G. Widespread RNA and DNA sequence differences in the human transcriptome. *Science* **333**, 53–8 (2011).
21. Yewdell, J. W. & Hickman, H. D. New lane in the information highway: alternative reading frame peptides elicit T cells with potent antiretrovirus activity. *J. Exp. Med.* **204**, 2501–4 (2007).
22. Berglund, P., Finzi, D., Bennink, J. R. & Yewdell, J. W. Viral alteration of cellular translational machinery increases defective ribosomal products. *J. Virol.* **81**, 7220–9 (2007).
23. Netzer, N. *et al.* Innate immune and chemically triggered oxidative stress modifies translational fidelity. *Nature* **462**, 522–6 (2009).
24. Neefjes, J., Jongstra, M. L. M., Paul, P. & Bakke, O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 823–36 (2011).
25. Schubert, U., Antón, L. C., Gibbs, J., Norbury, C. C., Yewdell, J. W. & Bennink, J. R. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* **404**, 770–4 (2000).
26. Yewdell, J. W., Reits, E. & Neefjes, J. Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 952–61 (2003).
27. Finley, D. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 477–513 (2009).
28. 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**, 161–76 (1998).
29. 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**, 2357–66 (2001).
30. Goldberg, A. L., Cascio, P., Saric, T. & Rock, K. L. The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Mol. Immunol.* **39**, 147–64 (2002).
31. 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**, 1982–9 (1998).

32. Stoltze, L., Dick, T. P., Deeg, M., Pömmnerl, B., Rammensee, H. G. & Schild, H. Generation of the vesicular stomatitis virus nucleoprotein cytotoxic T lymphocyte epitope requires proteasome-dependent and -independent proteolytic activities. *Eur. J. Immunol.* **28**, 4029–36 (1998).
33. Seifert, U. *et al.* An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope. *Nat. Immunol.* **4**, 375–9 (2003).
34. Stoltze, L., Schirle, M., Schwarz, G., Schröter, C., Thompson, M. W., Hersh, L. B., Kalbacher, H., Stevanovic, S., Rammensee, H. G. & Schild, H. Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nat. Immunol.* **1**, 413–8 (2000).
35. 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**, 565–76 (2003).
36. Schmitt, L. & Tampé, R. Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**, 754–60 (2002).
37. Arora, S., Lapinski, P. E. & Raghavan, M. Use of chimeric proteins to investigate the role of transporter associated with antigen processing (TAP) structural domains in peptide binding and translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 7241–6 (2001).
38. Higgins, C. F. & Linton, K. J. The ATP switch model for ABC transporters. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 918–26 (2004).
39. Parcej, D. & Tampé, R. ABC proteins in antigen translocation and viral inhibition. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 572–80 (2010).
40. Herget, M., Baldauf, C., Schölz, C., Parcej, D., Wiesmüller, K.-H., Tampé, R., Abele, R. & Bordignon, E. Conformation of peptides bound to the transporter associated with antigen processing (TAP). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 1349–54 (2011).
41. Koopmann, J. O., Post, M., Neefjes, J. J., Hämmerling, G. J. & Momburg, F. Translocation of long peptides by transporters associated with antigen processing (TAP). *Eur. J. Immunol.* **26**, 1720–8 (1996).
42. Momburg, F., Roelse, J., Howard, J. C., Butcher, G. W., Hämmerling, G. J. & Neefjes, J. J. Selectivity of MHC-encoded peptide transporters from human, mouse and rat. *Nature* **367**, 648–51 (1994).
43. Momburg, F. & Hämmerling, G. J. Generation and TAP-mediated transport of peptides for major histocompatibility complex class I molecules. *Adv. Immunol.* **68**, 191–256 (1998).
44. Schumacher, T. N., Kantesaria, D. V, Heemels, M. T., Ashton-Rickardt, P. G., Shepherd, J. C., Fruh, K., Yang, Y., Peterson, P. A., Tonegawa, S. & Ploegh, H. L. Peptide length and sequence specificity of the mouse TAP1/TAP2 translocator. *J. Exp. Med.* **179**, 533–40 (1994).
45. Serwold, T., Gonzalez, F., Kim, J., Jacob, R. & Shastri, N. ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* **419**, 480–3 (2002).
46. Chang, S.-C., Momburg, F., Bhutani, N. & Goldberg, A. L. The ER aminopeptidase, ERAP1, trims precursors to lengths of MHC class I peptides by a “molecular ruler” mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 17107–12 (2005).

47. Shin, E.-C., Seifert, U., Urban, S., Truong, K.-T., Feinstone, S. M., Rice, C. M., Kloetzel, P.-M. & Rehermann, B. Proteasome activator and antigen-processing aminopeptidases are regulated by virus-induced type I interferon in the hepatitis C virus-infected liver. *J. Interferon Cytokine Res.* **27**, 985–90 (2007).
48. Roelse, J., Grommé, M., Momburg, F., Hämmerling, G. & Neefjes, J. Trimming of TAP-translocated peptides in the endoplasmic reticulum and in the cytosol during recycling. *J. Exp. Med.* **180**, 1591–7 (1994).
49. Diedrich, G., Bangia, N., Pan, M. & Cresswell, P. A role for calnexin in the assembly of the MHC class I loading complex in the endoplasmic reticulum. *J. Immunol.* **166**, 1703–9 (2001).
50. Hughes, E. A. & Cresswell, P. The thiol oxidoreductase ERp57 is a component of the MHC class I peptide-loading complex. *Curr. Biol.* **8**, 709–12 (1998).
51. Momburg, F. & Tan, P. Tapasin—the keystone of the loading complex optimizing peptide binding by MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Mol. Immunol.* **39**, 217–33 (2002).
52. Hulpke, S. & Tampé, R. The MHC I loading complex: a multitasking machinery in adaptive immunity. *Trends Biochem. Sci.* **38**, 412–20 (2013).
53. Leone, P., Shin, E.-C., Perosa, F., Vacca, A., Dammacco, F. & Racanelli, V. MHC class I antigen processing and presenting machinery: organization, function, and defects in tumor cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **105**, 1172–87 (2013).
54. Chapman, H. A. Endosomal proteases in antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* **18**, 78–84 (2006).
55. Pieters, J. MHC class II compartments: specialized organelles of the endocytic pathway in antigen presenting cells. *Biol. Chem.* **378**, 751–8 (1997).
56. Denzin, L. K., Hammond, C. & Cresswell, P. HLA-DM interactions with intermediates in HLA-DR maturation and a role for HLA-DM in stabilizing empty HLA-DR molecules. *J. Exp. Med.* **184**, 2153–65 (1996).
57. Trombetta, E. S. & Mellman, I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 975–1028 (2005).
58. Chicz, R. M., Urban, R. G., Gorga, J. C., Vignali, D. A., Lane, W. S. & Strominger, J. L. Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J. Exp. Med.* **178**, 27–47 (1993).
59. Nimmerjahn, F., Milosevic, S., Behrends, U., Jaffee, E. M., Pardoll, D. M., Bornkamm, G. W. & Mautner, J. Major histocompatibility complex class II-restricted presentation of a cytosolic antigen by autophagy. *Eur. J. Immunol.* **33**, 1250–9 (2003).
60. Dengjel, J., Schoor, O., Fischer, R., Reich, M., Kraus, M., Müller, M., Kreymborg, K., Altenberend, F., Brandenburg, J., Kalbacher, H., Brock, R., Driessen, C., Rammensee, H.-G. & Stevanovic, S. Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 7922–7 (2005).
61. Lin, N.-Y. *et al.* Autophagy regulates TNF α -mediated joint destruction in experimental arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **72**, 761–8 (2013).
62. Schiebler, T. *Anatomie*. 900 (Springer Verlag, Berlin, 2004).

63. McNeal, J. E. Normal histology of the prostate. *Am. J. Surg. Pathol.* **12**, 619–33 (1988).
64. Siegel, R., Naishadham, D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2012. *CA. Cancer J. Clin.* **62**, 10–29 (2012).
65. Korytko, T. P., Lowe, G. J., Jimenez, R. E., Pohar, K. S. & Martin, D. D. Prostate-specific antigen response after definitive radiotherapy for Skene's gland adenocarcinoma resembling prostate adenocarcinoma. *Urol. Oncol.* **30**, 602–6 (2012).
66. Husmann, G. & Kaatsch, P. *Krebs in Deutschland 2005/2006*. 121 (Robert Koch-Institut, Berlin, 2010).
67. Dodson, M. K., Cliby, W. A., Keeney, G. L., Peterson, M. F. & Podratz, K. C. Skene's gland adenocarcinoma with increased serum level of prostate-specific antigen. *Gynecol. Oncol.* **55**, 304–7 (1994).
68. Kaatsch, P., Spix, C., Katalinic, A. & Hentschel, S. *Krebs in Deutschland 2007/2008*. 136 (Robert Koch-Institut, Berlin, 2012).
69. Catalona, W. J., Richie, J. P., Ahmann, F. R., Hudson, M. A., Scardino, P. T., Flanigan, R. C., deKernion, J. B., Ratliff, T. L., Kavoussi, L. R. & Dalkin, B. L. Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. *J. Urol.* **151**, 1283–1290 (1994).
70. Kaatsch, P., Spix, C., Katalinic, A. & Hentschel, S. *Krebs in Deutschland 2009/2010*. 150 (Robert Koch-Institut, Berlin, 2013).
71. Wilt, T. J. & Ahmed, H. U. Prostate cancer screening and the management of clinically localized disease. *BMJ* **346**, f325 (2013).
72. Dingler, F. *Identifikation und Charakterisierung prostataspezifischer Liganden auf MHC I*. 88 (Diplomarbeit, Universität Tübingen, 2011).
73. Humphrey, P. A. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Mod. Pathol.* **17**, 292–306 (2004).
74. Brookman-May, S., May, M., Wieland, W.-F., Lebentrau, S., Gunia, S., Koch, S., Gilfrich, C., Roigas, J., Hoschke, B. & Burger, M. Should we abstain from Gleason score 2-4 in the diagnosis of prostate cancer? Results of a German multicentre study. *World J. Urol.* **30**, 97–103 (2012).
75. Denoix, P. Enquete permanent dans les centres anticancereaux. *Bull. Inst. Nat. Hyg.* **1**, 70–5 (1946).
76. InvictaHOG. Gleason Scale. (2006). at <<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/bc/Gleasonscore.jpg>>
77. Huggins, C. & Hodges, C. V. Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *CA. Cancer J. Clin.* **22**, 232–40 (2002).
78. Madersbacher, U. & Tunn, U. Update zur intermittierenden Hormontherapie beim Prostatakarzinom. *J. für Urol. und Urogynäkologie* **3**, 7 (2007).

79. Tannock, I. F., de Wit, R., Berry, W. R., Horti, J., Pluzanska, A., Chi, K. N., Oudard, S., Théodore, C., James, N. D., Turesson, I., Rosenthal, M. A. & Eisenberger, M. A. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* **351**, 1502–12 (2004).
80. Definition Immuntherapie. at <http://dictionary.reference.com/browse/immunotherapies?qsrc=2446>
81. Rotrosen, D., Matthews, J. B. & Bluestone, J. A. The immune tolerance network: a new paradigm for developing tolerance-inducing therapies. *J. Allergy Clin. Immunol.* **110**, 17–23 (2002).
82. Hotz, C. *Massenspektrometrische Analyse der HLA-Klasse-I Liganden auf Prostatakarzinom*. 91 (Diplomarbeit, Universität Tübingen, 2010).
83. Drake, C. G. Prostate cancer as a model for tumour immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 580–93 (2010).
84. Sun, J. *et al.* Cumulative effect of five genetic variants on prostate cancer risk in multiple study populations. *Prostate* **68**, 1257–62 (2008).
85. Kolonel, L. N., Altshuler, D. & Henderson, B. E. The multiethnic cohort study: exploring genes, lifestyle and cancer risk. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 519–27 (2004).
86. De Marzo, A. M., Platz, E. A., Sutcliffe, S., Xu, J., Grönberg, H., Drake, C. G., Nakai, Y., Isaacs, W. B. & Nelson, W. G. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 256–69 (2007).
87. De Visser, K. E., Eichten, A. & Coussens, L. M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 24–37 (2006).
88. Pound, C. R., Partin, A. W., Eisenberger, M. A., Chan, D. W., Pearson, J. D. & Walsh, P. C. Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. *JAMA* **281**, 1591–7 (1999).
89. Drake, C. G., Jaffee, E. & Pardoll, D. M. Mechanisms of immune evasion by tumors. *Adv. Immunol.* **90**, 51–81 (2006).
90. Petrylak, D. P., Tangen, C. M., Hussain, M. H. A., Lara, P. N., Jones, J. A., Taplin, M. E., Burch, P. A., Berry, D., Moinpour, C., Kohli, M., Benson, M. C., Small, E. J., Raghavan, D. & Crawford, E. D. Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* **351**, 1513–20 (2004).
91. Sfanos, K. S., Bruno, T. C., Maris, C. H., Xu, L., Thoburn, C. J., DeMarzo, A. M., Meeker, A. K., Isaacs, W. B. & Drake, C. G. Phenotypic analysis of prostate-infiltrating lymphocytes reveals TH17 and Treg skewing. *Clin. Cancer Res.* **14**, 3254–61 (2008).
92. Miller, A. M., Lundberg, K., Ozenci, V., Banham, A. H., Hellström, M., Egevad, L. & Pisa, P. CD4+CD25high T cells are enriched in the tumor and peripheral blood of prostate cancer patients. *J. Immunol.* **177**, 7398–405 (2006).
93. Fox, S. B., Launchbury, R., Bates, G. J., Han, C., Shaida, N., Malone, P. R., Harris, A. L. & Banham, A. H. The number of regulatory T cells in prostate cancer is associated with the androgen receptor and hypoxia-inducible factor (HIF)-2alpha but not HIF-1alpha. *Prostate* **67**, 623–9 (2007).

94. Kuniwa, Y., Miyahara, Y., Wang, H. Y., Peng, W., Peng, G., Wheeler, T. M., Thompson, T. C., Old, L. J. & Wang, R.-F. CD8+ Foxp3+ regulatory T cells mediate immunosuppression in prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **13**, 6947–58 (2007).
95. Bronte, V., Kasic, T., Gri, G., Gallana, K., Borsellino, G., Marigo, I., Battistini, L., Iafrate, M., Prayer-Galetti, T., Pagano, F. & Viola, A. Boosting antitumor responses of T lymphocytes infiltrating human prostate cancers. *J. Exp. Med.* **201**, 1257–68 (2005).
96. Mihalyo, M. A., Hagymasi, A. T., Slaiby, A. M., Nevius, E. E. & Adler, A. J. Dendritic cells program non-immunogenic prostate-specific T cell responses beginning at early stages of prostate tumorigenesis. *Prostate* **67**, 536–46 (2007).
97. Gilboa, E. DC-based cancer vaccines. *J. Clin. Invest.* **117**, 1195–203 (2007).
98. Higano, C. S., Schellhammer, P. F., Small, E. J., Burch, P. A., Nemunaitis, J., Yuh, L., Provost, N. & Frohlich, M. W. Integrated data from 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trials of active cellular immunotherapy with sipuleucel-T in advanced prostate cancer. *Cancer* **115**, 3670–9 (2009).
99. Graddis, T. J., McMahan, C. J., Tamman, J., Page, K. J. & Trager, J. B. Prostatic acid phosphatase expression in human tissues. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **4**, 295–306 (2011).
100. Rammensee, H.-G., Weinschenk, T., Gouttefangeas, C. & Stevanović, S. Towards patient-specific tumor antigen selection for vaccination. *Immunol. Rev.* **188**, 164–76 (2002).
101. Walter, S., Weinschenk, T., Reinhardt, C. & Singh-Jasuja, H. Single-dose cyclophosphamide synergizes with immune responses to the renal cell cancer vaccine IMA901. *Oncoimmunology* **2**, (2013).
102. Walter, S. *et al.* Multi-peptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival. *Nat. Med.* **18**, 1254–1261 (2012).
103. Sospedra, M. & Martin, R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 683–747 (2005).
104. Lublin, F. D. & Reingold, S. C. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* **46**, 907–11 (1996).
105. Compston, A. & Coles, A. Multiple sclerosis. *Lancet* **372**, 1502–17 (2008).
106. Holland, N. J., Schneider, D. M., Rapp, R. & Kalb, R. C. Meeting the needs of people with primary progressive multiple sclerosis, their families, and the health-care community. *Int. J. MS Care* **13**, 65–74 (2011).
107. Kuhlmann, T., Lingfeld, G., Bitsch, A., Schuchardt, J. & Brück, W. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain* **125**, 2202–12 (2002).
108. Nakahara, J., Maeda, M., Aiso, S. & Suzuki, N. Current concepts in multiple sclerosis: autoimmunity versus oligodendroglialopathy. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **42**, 26–34 (2012).
109. Compston, A. & Coles, A. Multiple sclerosis. *Lancet* **359**, 1221–31 (2002).

110. Sawcer, S. *et al.* Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* **476**, 214–9 (2011).
111. Dyment, D. A., Ebers, G. C. & Sadovnick, A. D. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* **3**, 104–10 (2004).
112. Baranzini, S. E. Revealing the genetic basis of multiple sclerosis: are we there yet? *Curr. Opin. Genet. Dev.* **21**, 317–24 (2011).
113. Haines, J. L., Terwedow, H. A., Burgess, K., Pericak-Vance, M. A., Rimmler, J. B., Martin, E. R., Oksenberg, J. R., Lincoln, R., Zhang, D. Y., Banatao, D. R., Gatto, N., Goodkin, D. E. & Hauser, S. L. Linkage of the MHC to familial multiple sclerosis suggests genetic heterogeneity. The Multiple Sclerosis Genetics Group. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 1229–34 (1998).
114. Hillert, J. & Olerup, O. HLA and MS. *Neurology* **43**, 2426–7 (1993).
115. Kakalacheva, K., Münz, C. & Lünemann, J. D. Viral triggers of multiple sclerosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1812**, 132–40 (2011).
116. Gregory, S. G. *et al.* Interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nat. Genet.* **39**, 1083–91 (2007).
117. Lundmark, F., Duvefelt, K., Jacobaeus, E., Kockum, I., Wallström, E., Khademi, M., Oturai, A., Ryder, L. P., Saarela, J., Harbo, H. F., Celius, E. G., Salter, H., Olsson, T. & Hillert, J. Variation in interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) influences risk of multiple sclerosis. *Nat. Genet.* **39**, 1108–13 (2007).
118. Sawcer, S. The complex genetics of multiple sclerosis: pitfalls and prospects. *Brain* **131**, 3118–31 (2008).
119. Jersild, C., Fog, T., Hansen, G. S., Thomsen, M., Svejgaard, A. & Dupont, B. Histocompatibility determinants in multiple sclerosis, with special reference to clinical course. *Lancet* **2**, 1221–5 (1973).
120. Oksenberg, J. R., Baranzini, S. E., Sawcer, S. & Hauser, S. L. The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 516–26 (2008).
121. Hensiek, A. E., Sawcer, S. J., Feakes, R., Deans, J., Mander, A., Akesson, E., Roxburgh, R., Coraddu, F., Smith, S. & Compston, D. A. S. HLA-DR 15 is associated with female sex and younger age at diagnosis in multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **72**, 184–7 (2002).
122. Reich, D. E., Cargill, M., Bolk, S., Ireland, J., Sabeti, P. C., Richter, D. J., Lavery, T., Kouyoumjian, R., Farhadian, S. F., Ward, R. & Lander, E. S. Linkage disequilibrium in the human genome. *Nature* **411**, 199–204 (2001).
123. Mohme, M., Hotz, C., Stevanovic, S., Binder, T., Lee, J.-H., Okoniewski, M., Eiermann, T., Sospedra, M., Rammensee, H.-G. & Martin, R. HLA-DR15-derived self-peptides are involved in increased autologous T cell proliferation in multiple sclerosis. *Brain* **136**, 1783–98 (2013).
124. Ashton-Rickardt, P. G., Bandeira, A., Delaney, J. R., Van Kaer, L., Pircher, H. P., Zinkernagel, R. M. & Tonegawa, S. Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus. *Cell* **76**, 651–63 (1994).

125. Jamieson, B. D., Douek, D. C., Killian, S., Hultin, L. E., Scripture-Adams, D. D., Giorgi, J. V., Marelli, D., Koup, R. A. & Zack, J. A. Generation of functional thymocytes in the human adult. *Immunity* **10**, 569–75 (1999).
126. Sprent, J. & Surh, C. D. Normal T cell homeostasis: the conversion of naive cells into memory-phenotype cells. *Nat. Immunol.* **12**, 478–84 (2011).
127. 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).
128. 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).
129. Prat, E., Tomaru, U., Sabater, L., Park, D. M., Granger, R., Kruse, N., Ohayon, J. M., Bettinotti, M. P. & Martin, R. HLA-DRB5*0101 and -DRB1*1501 expression in the multiple sclerosis-associated HLA-DR15 haplotype. *J. Neuroimmunol.* **167**, 108–19 (2005).
130. Haegert, D. G. Multiple sclerosis: a disorder of altered T-cell homeostasis. *Mult. Scler. Int.* **2011**, 461304 (2011).
131. Kluxen, G. & Hörauf, A. Okuläre Onchozerkose: Wolbachien haben eine Schlüsselrolle. *Der Ophthalmol.* **104**, 860–865 (2007).
132. Basáñez, M.-G., Pion, S. D. S., Churcher, T. S., Breitling, L. P., Little, M. P. & Boussinesq, M. River blindness: a success story under threat? *PLoS Med.* **3**, e371 (2006).
133. Udall, D. N. Recent updates on onchocerciasis: diagnosis and treatment. *Clin. Infect. Dis.* **44**, 53–60 (2007).
134. Omura, S. & Crump, A. The life and times of ivermectin - a success story. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 984–9 (2004).
135. Crump, A., Morel, C. M. & Omura, S. The onchocerciasis chronicle: from the beginning to the end? *Trends Parasitol.* **28**, 280–8 (2012).
136. Centers for disease control and prevention - Onchocerciasis. (2013). at <aus <http://www.cdc.gov/dpdx/onchocerciasis/index.html>>
137. Fenwick, A. The global burden of neglected tropical diseases. *Public Health* **126**, 233–6 (2012).
138. Rodríguez-Pérez, M. A., Unnasch, T. R., Domínguez-Vázquez, A., Morales-Castro, A. L., Peña-Flores, G. P., Orozco-Algarra, M. E., Arredondo-Jiménez, J. I., Richards, F., Vásquez-Rodríguez, M. A. & Rendón, V. G. Interruption of transmission of *Onchocerca volvulus* in the Oaxaca focus, Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **83**, 21–7 (2010).
139. Murdoch, M. E. Onchodermatitis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **23**, 124–31 (2010).
140. Richard-Lenoble, D., Chandenier, J. & Gaxotte, P. Ivermectin and filariasis. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **17**, 199–203 (2003).
141. Brattig, N. W. Pathogenesis and host responses in human onchocerciasis: impact of *Onchocerca filariae* and *Wolbachia endobacteria*. *Microbes Infect.* **6**, 113–28 (2004).

142. Allen, J. E., Adjei, O., Bain, O., Hoerauf, A., Hoffmann, W. H., Makepeace, B. L., Schulz-Key, H., Tanya, V. N., Trees, A. J., Wanji, S. & Taylor, D. W. Of mice, cattle, and humans: the immunology and treatment of river blindness. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2**, e217 (2008).
143. Oliphant, C. J., Barlow, J. L. & McKenzie, A. N. J. Insights into the initiation of type 2 immune responses. *Immunology* **134**, 378–85 (2011).
144. Little, M. P., Breitling, L. P., Basáñez, M.-G., Alley, E. S. & Boatin, B. A. Association between microfilarial load and excess mortality in onchocerciasis: an epidemiological study. *Lancet* **363**, 1514–21 (2004).
145. Cooper, P. J., Mancero, T., Espinel, M., Sandoval, C., Lovato, R., Guderian, R. H. & Nutman, T. B. Early human infection with *Onchocerca volvulus* is associated with an enhanced parasite-specific cellular immune response. *J. Infect. Dis.* **183**, 1662–8 (2001).
146. Tamarozzi, F., Halliday, A., Gentil, K., Hoerauf, A., Pearlman, E. & Taylor, M. J. Onchocerciasis: the role of *Wolbachia* bacterial endosymbionts in parasite biology, disease pathogenesis, and treatment. *Clin. Microbiol. Rev.* **24**, 459–68 (2011).
147. Pearlman, E. & Hall, L. R. Immune mechanisms in *Onchocerca volvulus*-mediated corneal disease (river blindness). *Parasite Immunol.* **22**, 625–31 (2000).
148. Gillette-Ferguson, I., Hise, A. G., McGarry, H. F., Turner, J., Esposito, A., Sun, Y., Diaconu, E., Taylor, M. J. & Pearlman, E. *Wolbachia*-induced neutrophil activation in a mouse model of ocular onchocerciasis (river blindness). *Infect. Immun.* **72**, 5687–92 (2004).
149. Hall, L. R., Diaconu, E., Patel, R. & Pearlman, E. CXC chemokine receptor 2 but not C-C chemokine receptor 1 expression is essential for neutrophil recruitment to the cornea in helminth-mediated keratitis (river blindness). *J. Immunol.* **166**, 4035–41 (2001).
150. Barnstable, C. J., Jones, E. A. & Crumpton, M. J. Isolation, structure and genetics of HLA-A, -B, -C and -DRw (Ia) antigens. *Br. Med. Bull.* **34**, 241–6 (1978).
151. Warnke, R., Miller, R., Grogan, T., Pederson, M., Dilley, J. & Levy, R. Immunologic phenotype in 30 patients with diffuse large-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **303**, 293–300 (1980).
152. Stein, J. P., Hautmann, R. E., Penson, D. & Skinner, D. G. Prostate-sparing cystectomy: a review of the oncologic and functional outcomes. Contraindicated in patients with bladder cancer. *Urol. Oncol.* **27**, 466–72
153. Ulmer, A. J., Scholz, W., Ernst, M., Brandt, E. & Flad, H. D. Isolation and subfractionation of human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by density gradient centrifugation on Percoll. *Immunobiology* **166**, 238–50 (1984).
154. Prokop, L. Strukturelle und funktionelle Bedeutung der HLA-Klasse-I-Moleküle für virus- oder tumorassoziierte T-Zellepitop. 125 (2012).
155. Turtle, C. J. & Riddell, S. R. Artificial antigen-presenting cells for use in adoptive immunotherapy. *Cancer J.* **16**, 374–81
156. Rudolf, D., Silberzahn, T., Walter, S., Maurer, D., Engelhard, J., Wernet, D., Bühring, H.-J., Jung, G., Kwon, B. S., Rammensee, H.-G. & Stevanović, S. Potent costimulation of human CD8 T cells by anti-4-1BB and anti-CD28 on synthetic artificial antigen presenting cells. *Cancer Immunol. Immunother.* **57**, 175–83 (2008).

157. Walter, S., Herrgen, L., Schoor, O., Jung, G., Wernet, D., Bühring, H.-J., Rammensee, H.-G. & Stevanović, S. Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres. *J. Immunol.* **171**, 4974–8 (2003).
158. Oelke, M. & Schneck, J. P. HLA-Ig-based artificial antigen-presenting cells: setting the terms of engagement. *Clin. Immunol.* **110**, 243–51 (2004).
159. Kubin, M., Kamoun, M. & Trinchieri, G. Interleukin 12 synergizes with B7/CD28 interaction in inducing efficient proliferation and cytokine production of human T cells. *J. Exp. Med.* **180**, 211–22 (1994).
160. Morgan, D. A., Ruscetti, F. W. & Gallo, R. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* **193**, 1007–8 (1976).
161. Altman, J. D., Moss, P. A. H., Goulder, P. J. R., Barouch, D. H., McHeyzer-Williams, M. G., Bell, J. I., McMichael, A. J. & Davis, M. M. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science*. 1996. 274: 94-96. *J. Immunol.* **187**, 7–9 (2011).
162. Corr, M., Slanetz, A. E., Boyd, L. F., Jelonek, M. T., Khilko, S., Al-Ramadi, B. K., Kim, Y. S., Maher, S. E., Bothwell, A. L. & Margulies, D. H. T cell receptor-MHC class I peptide interactions: affinity, kinetics, and specificity. *Science* **265**, 946–9 (1994).
163. Fulwyler, M. J. Status quo in flow-through cytometry. *J. Histochem. Cytochem.* **22**, 605–6 (1974).
164. Cytometry Core, Medical Centre, N. L. Office of Collaborative Science (OCS). at <http://ocs.med.nyu.edu/system/files/Calibur_config_0.pdf>
165. Rawlings, N. D. & Barrett, A. J. Families of serine peptidases. *Methods Enzymol.* **244**, 19–61 (1994).
166. Darbre, A. & Waterfield, M. D. *Practical protein chemistry - A Handbook*. 620 (Wiley, Chichester, 1986).
167. McLafferty, F. W. Tandem mass spectrometry. *Science* **214**, 280–7 (1981).
168. Biemann, K. Sequencing of peptides by tandem mass spectrometry and high-energy collision-induced dissociation. *Methods Enzymol.* **193**, 455–79 (1990).
169. LTQ Orbitrap Specifications. at <<http://planetorbitrap.com/ltq-orbitrap-xl#tab:specifications>>
170. Whitehouse, C. M., Dreyer, R. N., Yamashita, M. & Fenn, J. B. Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Anal. Chem.* **57**, 675–9 (1985).
171. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. & Whitehouse, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**, 64–71 (1989).
172. Rayleigh, Lord. On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity. *Philos. Mag. Ser. 5* **14**, 184–186 (1882).
173. Nguyen, S. & Fenn, J. B. Gas-phase ions of solute species from charged droplets of solutions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 1111–7 (2007).

174. Makarov, A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Anal. Chem.* **72**, 1156–62 (2000).
175. Aufbau LTQ Orbitrap. at <<http://www.antpedia.com/news/43/n-29243.html>>
176. Drews, O. *Optimierung massenspektrometrischer Methoden zur Identifizierung von HLA-Liganden und ihre Anwendung in der klinischen Forschung.* 224 (Dissertation, Universität Tübingen, 2011).
177. 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).
178. Olsen, J. V *et al.* A dual pressure linear ion trap Orbitrap instrument with very high sequencing speed. *Mol. Cell. Proteomics* **8**, 2759–69 (2009).
179. Douglas, D. J., Frank, A. J. & Mao, D. Linear ion traps in mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **24**, 1–29 (2005).
180. Michalski, A., Cox, J. & Mann, M. More than 100,000 detectable peptide species elute in single shotgun proteomics runs but the majority is inaccessible to data-dependent LC-MS/MS. *J. Proteome Res.* **10**, 1785–93 (2011).
181. Kowalewski, D. J. *Massenspektrometrische Analyse von Nierenzellkarzinomen zur Entwicklung neuer Tumorstoffe.* 85 (Diplomarbeit, Universität Tübingen, 2011).
182. Hu, Q., Noll, R. J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M. & Graham Cooks, R. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J. Mass Spectrom.* **40**, 430–43 (2005).
183. Scigelova, M. & Makarov, A. Orbitrap mass analyzer--overview and applications in proteomics. *Proteomics* **6 Suppl 2**, 16–21 (2006).
184. 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**, 1839–44 (1996).
185. Choudhary, C. & Mann, M. Decoding signalling networks by mass spectrometry-based proteomics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 427–39 (2010).
186. Wong, C. C. L., Cociorva, D., Venable, J. D., Xu, T. & Yates, J. R. Comparison of different signal thresholds on data dependent sampling in Orbitrap and LTQ mass spectrometry for the identification of peptides and proteins in complex mixtures. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **20**, 1405–14 (2009).
187. Makarov, A., Denisov, E., Kholomeev, A., Balschun, W., Lange, O., Strupat, K. & Horning, S. Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. *Anal. Chem.* **78**, 2113–20 (2006).
188. Lottspeich, F. & Engels, J. W. *Bioanalytik.* 812 (Springer, Weinheim, 2006).
189. 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**, 3551–67 (1999).
190. Pappin, D. J., Hojrup, P. & Bleasby, A. J. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr. Biol.* **3**, 327–32 (1993).
191. Di Marco, M. *Peptidmotive von HLA-B*58:01, HLA-B*58:02 und A*32:01 und Unterschiede im HLA-Ligandom von HLA B*58:01 und HLA-B*58:02.* 122 (Diplomarbeit, Universität Tübingen, 2014).

192. Elias, J. E. & Gygi, S. P. Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nat. Methods* **4**, 207–14 (2007).
193. Keller, A., Nesvizhskii, A. I., Kolker, E. & Aebersold, R. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal. Chem.* **74**, 5383–92 (2002).
194. Hassan, C., Kester, M. G. D., de Ru, A. H., Hombrink, P., Drijfhout, J. W., Nijveen, H., Leunissen, J. A. M., Heemskerk, M. H. M., Falkenburg, J. H. F. & van Veelen, P. A. The human leukocyte antigen-presented ligandome of B lymphocytes. *Mol. Cell. Proteomics* **12**, 1829–43 (2013).
195. Roepstorff, P. & Fohlman, J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.* **11**, 601 (1984).
196. Wysocki, V. H., Tsaprailis, G., Smith, L. L. & Breci, L. A. Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation. *J. Mass Spectrom.* **35**, 1399–406 (2000).
197. Peptidfragmentation. at
<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/fb/Peptide_fragmentation.gif>
198. Cappadona, S., Baker, P. R., Cutillas, P. R., Heck, A. J. R. & van Breukelen, B. Current challenges in software solutions for mass spectrometry-based quantitative proteomics. *Amino Acids* **43**, 1087–108 (2012).
199. Keller, B. O., Sui, J., Young, A. B. & Whittall, R. M. Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **627**, 71–81 (2008).
200. Kessler, J. H., Benckhuijsen, W. E., Mutis, T., Melief, C. J. M., van der Burg, S. H. & Drijfhout, J. W. Competition-based cellular peptide binding assay for HLA class I. *Curr. Protoc. Immunol.* **Chapter 18**, Unit 18.12 (2004).
201. Hoof, I., Peters, B., Sidney, J., Pedersen, L. E., Sette, A., Lund, O., Buus, S. & Nielsen, M. NetMHCpan, a method for MHC class I binding prediction beyond humans. *Immunogenetics* **61**, 1–13 (2009).
202. Hurley, K., Tang, T., Jennifer, N. & RJ, H. *HLA typing by molecular methods. Man. Lab. Clin. Immunol.* **5th Editio**, 1098–1111 (American Society for Microbiology, 1997).
203. Auffray, C. & Strominger, J. L. Molecular genetics of the human major histocompatibility complex. *Adv. Hum. Genet.* **15**, 197–247 (1986).
204. Nielsen, M., Lundegaard, C., Wording, P., Lauemøller, S. L., Lamberth, K., Buus, S., Brunak, S. & Lund, O. Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations. *Protein Sci.* **12**, 1007–17 (2003).
205. Lundwall, A. & Lilja, H. Molecular cloning of human prostate specific antigen cDNA. *FEBS Lett.* **214**, 317–22 (1987).
206. Kawakami, M. & Nakayama, J. Enhanced expression of prostate-specific membrane antigen gene in prostate cancer as revealed by in situ hybridization. *Cancer Res.* **57**, 2321–4 (1997).
207. Solin, T., Kontturi, M., Pohlmann, R. & Vihko, P. Gene expression and prostate specificity of human prostatic acid phosphatase (PAP): evaluation by RNA blot analyses. *Biochim. Biophys. Acta* **1048**, 72–7 (1990).

208. Mommen, G. P. M., Frese, C. K., Meiring, H. D., van Gaans-van den Brink, J., de Jong, A. P. J. M., van Els, C. a C. M. & Heck, A. J. R. Expanding the detectable HLA peptide repertoire using electron-transfer/higher-energy collision dissociation (EThcD). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1–6 (2014).
209. Wang, M. C., Valenzuela, L. A., Murphy, G. P. & Chu, T. M. Purification of a human prostate specific antigen. *Invest. Urol.* **17**, 159–63 (1979).
210. Schedlich, L. J., Bennetts, B. H. & Morris, B. J. Primary structure of a human glandular kallikrein gene. *DNA* **6**, 429–37 (1987).
211. Velonas, V. M., Woo, H. H., Remedios, C. G. Dos & Assinder, S. J. Current status of biomarkers for prostate cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 11034–60 (2013).
212. Feyerabend, S., Stevanovic, S., Gouttefangeas, C., Wernet, D., Hennenlotter, J., Bedke, J., Dietz, K., Pascolo, S., Kuczyk, M., Rammensee, H.-G. & Stenzl, A. Novel multi-peptide vaccination in Hla-A2+ hormone sensitive patients with biochemical relapse of prostate cancer. *Prostate* **69**, 917–27 (2009).
213. Sanda, M. G., Smith, D. C., Charles, L. G., Hwang, C., Pienta, K. J., Schlom, J., Milenic, D., Panicali, D. & Montie, J. E. Recombinant vaccinia-PSA (PROSTVAC) can induce a prostate-specific immune response in androgen-modulated human prostate cancer. *Urology* **53**, 260–6 (1999).
214. Yanai, I., Benjamin, H., Shmoish, M., Chalifa-Caspi, V., Shklar, M., Ophir, R., Bar-Even, A., Horn-Saban, S., Safran, M., Domany, E., Lancet, D. & Shmueli, O. Genome-wide midrange transcription profiles reveal expression level relationships in human tissue specification. *Bioinformatics* **21**, 650–9 (2005).
215. Weinzierl, A. O., Lemmel, C., Schoor, O., Müller, M., Krüger, T., Wernet, D., Hennenlotter, J., Stenzl, A., Klingel, K., Rammensee, H.-G. & Stevanovic, S. Distorted relation between mRNA copy number and corresponding major histocompatibility complex ligand density on the cell surface. *Mol. Cell. Proteomics* **6**, 102–13 (2007).
216. Cunha, A. C., Weigle, B., Kiessling, A., Bachmann, M. & Rieber, E. P. Tissue-specificity of prostate specific antigens: comparative analysis of transcript levels in prostate and non-prostatic tissues. *Cancer Lett.* **236**, 229–38 (2006).
217. Gupta, S., Carballido, E. & Fishman, M. Sipuleucel-T for therapy of asymptomatic or minimally symptomatic, castrate-refractory prostate cancer: an update and perspective among other treatments. *Onco. Targets. Ther.* **4**, 79–96 (2011).
218. Alimirah, F., Panchanathan, R., Chen, J., Zhang, X., Ho, S.-M. & Choubey, D. Expression of androgen receptor is negatively regulated by p53. *Neoplasia* **9**, 1152–9 (2007).
219. Kuo, P.-C., Tsao, Y.-P., Chang, H.-W., Chen, P.-H., Huang, C.-W., Lin, S.-T., Weng, Y.-T., Tsai, T.-C., Shieh, S.-Y. & Chen, S.-L. Breast cancer amplified sequence 2, a novel negative regulator of the p53 tumor suppressor. *Cancer Res.* **69**, 8877–85 (2009).
220. Zhang, Y., Zang, M., Li, J., Ji, J., Zhang, J., Liu, X., Qu, Y., Su, L., Li, C., Yu, Y., Zhu, Z., Liu, B. & Yan, M. CEACAM6 promotes tumor migration, invasion, and metastasis in gastric cancer. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **46**, 283–90 (2014).

221. Schölzel, S., Zimmermann, W., Schwarzkopf, G., Grunert, F., Rogaczewski, B. & Thompson, J. Carcinoembryonic antigen family members CEACAM6 and CEACAM7 are differentially expressed in normal tissues and oppositely deregulated in hyperplastic colorectal polyps and early adenomas. *Am. J. Pathol.* **156**, 595–605 (2000).
222. Czepczyńska-Krężel, H. & Krop-Wątopek, A. [Human carcinoembryonic antigen family proteins, structure and function]. *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)* **66**, 521–33 (2012).
223. Kim, K. S. *et al.* Overexpression and clinical significance of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 in colorectal cancer. *Clin. Chim. Acta.* **415**, 12–9 (2013).
224. Ruebner, B., Saroufeem, R., Minutes, B., Tesluk, H. & Lawson, M. CEA family gene expression and Ki67 staining in hyperplastic polyps versus in tubular adenomas. *Am. J. Pathol.* **157**, 1051–2 (2000).
225. Kuroki, M., Matsushita, H., Matsumoto, H., Hirose, Y., Senba, T. & Yamamoto, T. Nonspecific cross-reacting antigen-50/90 (NCA-50/90) as a new tumor marker. *Anticancer Res.* **19**, 5599–606 (1999).
226. Jantscheff, P., Terracciano, L., Lowy, A., Glatz-Krieger, K., Grunert, F., Micheel, B., Brümmer, J., Laffer, U., Metzger, U., Herrmann, R. & Rochlitz, C. Expression of CEACAM6 in resectable colorectal cancer: a factor of independent prognostic significance. *J. Clin. Oncol.* **21**, 3638–46 (2003).
227. Blumenthal, R. D., Hansen, H. J. & Goldenberg, D. M. Inhibition of adhesion, invasion, and metastasis by antibodies targeting CEACAM6 (NCA-90) and CEACAM5 (Carcinoembryonic Antigen). *Cancer Res.* **65**, 8809–17 (2005).
228. Verras, M., Brown, J., Li, X., Nusse, R. & Sun, Z. Wnt3a growth factor induces androgen receptor-mediated transcription and enhances cell growth in human prostate cancer cells. *Cancer Res.* **64**, 8860–6 (2004).
229. Pearson, H. B., Phesse, T. J. & Clarke, A. R. K-ras and Wnt signaling synergize to accelerate prostate tumorigenesis in the mouse. *Cancer Res.* **69**, 94–101 (2009).
230. Francis, J. C., Thomsen, M. K., Taketo, M. M. & Swain, A. β -catenin is required for prostate development and cooperates with Pten loss to drive invasive carcinoma. *PLoS Genet.* **9**, e1003180 (2013).
231. Hirata, H., Hinoda, Y., Ueno, K., Shahryari, V., Tabatabai, Z. L. & Dahiya, R. MicroRNA-1826 targets VEGFC, beta-catenin (CTNNB1) and MEK1 (MAP2K1) in human bladder cancer. *Carcinogenesis* **33**, 41–8 (2012).
232. Fu, M., Wang, C., Reutens, A. T., Wang, J., Angeletti, R. H., Siconolfi-Baez, L., Ogryzko, V., Avantaggiati, M. L. & Pestell, R. G. p300 and p300/cAMP-response element-binding protein-associated factor acetylate the androgen receptor at sites governing hormone-dependent transactivation. *J. Biol. Chem.* **275**, 20853–60 (2000).
233. Heemers, H. V., Sebo, T. J., Debes, J. D., Regan, K. M., Raclaw, K. A., Murphy, L. M., Hobisch, A., Culig, Z. & Tindall, D. J. Androgen deprivation increases p300 expression in prostate cancer cells. *Cancer Res.* **67**, 3422–30 (2007).
234. Debes, J. D., Sebo, T. J., Lohse, C. M., Murphy, L. M., Haugen, D. A. L. & Tindall, D. J. p300 in prostate cancer proliferation and progression. *Cancer Res.* **63**, 7638–40 (2003).

235. Santer, F. R., Höschle, P. P. S., Oh, S. J., Erb, H. H. H., Bouchal, J., Cavarretta, I. T., Parson, W., Meyers, D. J., Cole, P. A. & Culig, Z. Inhibition of the acetyltransferases p300 and CBP reveals a targetable function for p300 in the survival and invasion pathways of prostate cancer cell lines. *Mol. Cancer Ther.* **10**, 1644–55 (2011).
236. Liu, A. Y., Corey, E., Vessella, R. L., Lange, P. H., True, L. D., Huang, G. M., Nelson, P. S. & Hood, L. Identification of differentially expressed prostate genes: increased expression of transcription factor ETS-2 in prostate cancer. *Prostate* **30**, 145–53 (1997).
237. Sementchenko, V. I., Schweinfest, C. W., Papas, T. S. & Watson, D. K. ETS2 function is required to maintain the transformed state of human prostate cancer cells. *Oncogene* **17**, 2883–8 (1998).
238. Carbone, G. M., Napoli, S., Valentini, A., Cavalli, F., Watson, D. K. & Catapano, C. V. Triplex DNA-mediated downregulation of Ets2 expression results in growth inhibition and apoptosis in human prostate cancer cells. *Nucleic Acids Res.* **32**, 4358–67 (2004).
239. Bostwick, D. G., Pacelli, A., Blute, M., Roche, P. & Murphy, G. P. Prostate specific membrane antigen expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: a study of 184 cases. *Cancer* **82**, 2256–61 (1998).
240. Su, S. L., Huang, I. P., Fair, W. R., Powell, C. T. & Heston, W. D. Alternatively spliced variants of prostate-specific membrane antigen RNA: ratio of expression as a potential measurement of progression. *Cancer Res.* **55**, 1441–3 (1995).
241. Silver, D. A., Pellicer, I., Fair, W. R., Heston, W. D. & Cordon-Cardo, C. Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues. *Clin. Cancer Res.* **3**, 81–5 (1997).
242. Baccala, A., Sercia, L., Li, J., Heston, W. & Zhou, M. Expression of prostate-specific membrane antigen in tumor-associated neovasculature of renal neoplasms. *Urology* **70**, 385–90 (2007).
243. Chang, S. S., O’Keefe, D. S., Bacich, D. J., Reuter, V. E., Heston, W. D. & Gaudin, P. B. Prostate-specific membrane antigen is produced in tumor-associated neovasculature. *Clin. Cancer Res.* **5**, 2674–81 (1999).
244. Elsässer-Beile, U., Bühler, P. & Wolf, P. Targeted therapies for prostate cancer against the prostate specific membrane antigen. *Curr. Drug Targets* **10**, 118–25 (2009).
245. Nakagawa, M., Oda, Y., Eguchi, T., Aishima, S.-I., Yao, T., Hosoi, F., Basaki, Y., Ono, M., Kuwano, M., Tanaka, M. & Tsuneyoshi, M. Expression profile of class I histone deacetylases in human cancer tissues. *Oncol. Rep.* **18**, 769–74 (2007).
246. Banwell, C. M., Singh, R., Stewart, P. M., Uskokovic, M. R. & Campbell, M. J. Antiproliferative signalling by 1,25(OH)₂D₃ in prostate and breast cancer is suppressed by a mechanism involving histone deacetylation. *Recent Results Cancer Res.* **164**, 83–98 (2003).
247. Li, S.-Z., Zhao, Y.-B., Cao, W.-D., Qu, Y., Luo, P., Zhen, H.-N., Chen, X.-Y., Yan, Z.-F. & Fei, Z. The expression of hepatoma-derived growth factor in primary central nervous system lymphoma and its correlation with angiogenesis, proliferation and clinical outcome. *Med. Oncol.* **30**, 622 (2013).

248. Shih, T.-C., Tien, Y.-J., Wen, C.-J., Yeh, T.-S., Yu, M.-C., Huang, C.-H., Lee, Y.-S., Yen, T.-C. & Hsieh, S.-Y. MicroRNA-214 downregulation contributes to tumor angiogenesis by inducing secretion of the hepatoma-derived growth factor in human hepatoma. *J. Hepatol.* **57**, 584–91 (2012).
249. Thirant, C., Galan-Moya, E.-M., Dubois, L. G., Pinte, S., Chafey, P., Broussard, C., Varlet, P., Devaux, B., Soncin, F., Gavard, J., Junier, M.-P. & Chneiweiss, H. Differential proteomic analysis of human glioblastoma and neural stem cells reveals HDGF as a novel angiogenic secreted factor. *Stem Cells* **30**, 845–53 (2012).
250. Li, M. *et al.* Downregulated expression of hepatoma-derived growth factor (HDGF) reduces gallbladder cancer cell proliferation and invasion. *Med. Oncol.* **30**, 587 (2013).
251. Bernard, K., Litman, E., Fitzpatrick, J. L., Shellman, Y. G., Argast, G., Polvinen, K., Everett, A. D., Fukasawa, K., Norris, D. A., Ahn, N. G. & Resing, K. A. Functional proteomic analysis of melanoma progression. *Cancer Res.* **63**, 6716–25 (2003).
252. Lepourcelet, M., Tou, L., Cai, L., Sawada, J., Lazar, A. J. F., Glickman, J. N., Williamson, J. A., Everett, A. D., Redston, M., Fox, E. A., Nakatani, Y. & Shivdasani, R. A. Insights into developmental mechanisms and cancers in the mammalian intestine derived from serial analysis of gene expression and study of the hepatoma-derived growth factor (HDGF). *Development* **132**, 415–27 (2005).
253. Hu, T.-H., Huang, C.-C., Liu, L.-F., Lin, P.-R., Liu, S.-Y., Chang, H.-W., Changchien, C.-S., Lee, C.-M., Chuang, J.-H. & Tai, M. H. Expression of hepatoma-derived growth factor in hepatocellular carcinoma. *Cancer* **98**, 1444–56 (2003).
254. Okuda, Y., Nakamura, H., Yoshida, K., Enomoto, H., Uyama, H., Hirotani, T., Funamoto, M., Ito, H., Everett, A. D., Hada, T. & Kawase, I. Hepatoma-derived growth factor induces tumorigenesis in vivo through both direct angiogenic activity and induction of vascular endothelial growth factor. *Cancer Sci.* **94**, 1034–41 (2003).
255. Guo, Z., He, Y., Wang, S., Zhang, A., Zhao, P., Gao, C. & Cao, B. Various effects of hepatoma-derived growth factor on cell growth, migration and invasion of breast cancer and prostate cancer cells. *Oncol. Rep.* **26**, 511–7 (2011).
256. Zhong, H., Semenza, G. L., Simons, J. W. & De Marzo, A. M. Up-regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is an early event in prostate carcinogenesis. *Cancer Detect. Prev.* **28**, 88–93 (2004).
257. Zhong, H., De Marzo, A. M., Laughner, E., Lim, M., Hilton, D. A., Zagzag, D., Buechler, P., Isaacs, W. B., Semenza, G. L. & Simons, J. W. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res.* **59**, 5830–5 (1999).
258. Talks, K. L., Turley, H., Gatter, K. C., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J. & Harris, A. L. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am. J. Pathol.* **157**, 411–21 (2000).
259. Kimbro, K. S. & Simons, J. W. Hypoxia-inducible factor-1 in human breast and prostate cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **13**, 739–49 (2006).
260. Marignol, L., Coffey, M., Lawler, M. & Hollywood, D. Hypoxia in prostate cancer: a powerful shield against tumour destruction? *Cancer Treat. Rev.* **34**, 313–27 (2008).

261. Ranasinghe, W. K. B., Sengupta, S., Williams, S., Chang, M., Shulkes, A., Bolton, D. M., Baldwin, G. & Patel, O. The effects of nonspecific HIF1 α inhibitors on development of castrate resistance and metastases in prostate cancer. *Cancer Med.* **3**, 245–51 (2014).
262. Rabiau, N., Déchelotte, P., Adjakly, M., Kemeny, J.-L., Guy, L., Boiteux, J.-P., Kwiatkowski, F., Bignon, Y.-J. & Bernard-Gallon, D. BRCA1, BRCA2, AR and IGF-I expression in prostate cancer: correlation between RT-qPCR and immunohistochemical detection. *Oncol. Rep.* **26**, 695–702 (2011).
263. Takahara, K., Tearle, H., Ghaffari, M., Gleave, M. E., Pollak, M. & Cox, M. E. Human prostate cancer xenografts in lit/lit mice exhibit reduced growth and androgen-independent progression. *Prostate* **71**, 525–37 (2011).
264. Chan, J. M., Stampfer, M. J., Giovannucci, E., Gann, P. H., Ma, J., Wilkinson, P., Hennekens, C. H. & Pollak, M. Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. *Science* **279**, 563–6 (1998).
265. Pollak, M. Insulin-like growth factor physiology and cancer risk. *Eur. J. Cancer* **36**, 1224–8 (2000).
266. Harman, S. M., Metter, E. J., Blackman, M. R., Landis, P. K. & Carter, H. B. Serum levels of insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II, IGF-binding protein-3, and prostate-specific antigen as predictors of clinical prostate cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**, 4258–65 (2000).
267. Rittenhouse, H. G., Finlay, J. A., Mikolajczyk, S. D. & Partin, A. W. Human Kallikrein 2 (hK2) and prostate-specific antigen (PSA): two closely related, but distinct, kallikreins in the prostate. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **35**, 275–368 (1998).
268. Väänänen, R.-M., Lilja, H., Cronin, A., Kauko, L., Rissanen, M., Kauko, O., Kekki, H., Vidbäck, S., Nurmi, M., Alanen, K. & Pettersson, K. Association of transcript levels of 10 established or candidate-biomarker gene targets with cancerous versus non-cancerous prostate tissue from radical prostatectomy specimens. *Clin. Biochem.* **46**, 670–4 (2013).
269. Shang, Z., Niu, Y., Cai, Q., Chen, J., Tian, J., Yeh, S., Lai, K.-P. & Chang, C. Human kallikrein 2 (KLK2) promotes prostate cancer cell growth via function as a modulator to promote the ARA70-enhanced androgen receptor transactivation. *Tumour Biol.* (2013).
270. Nelson, P. S., Gan, L., Ferguson, C., Moss, P., Gelinas, R., Hood, L. & Wang, K. Molecular cloning and characterization of prostase, an androgen-regulated serine protease with prostate-restricted expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 3114–9 (1999).
271. Yousef, G. M., Obiezu, C. V., Luo, L. Y., Black, M. H. & Diamandis, E. P. Prostase/KLK-L1 is a new member of the human kallikrein gene family, is expressed in prostate and breast tissues, and is hormonally regulated. *Cancer Res.* **59**, 4252–6 (1999).
272. Avgeris, M., Stravodimos, K. & Scorilas, A. Kallikrein-related peptidase 4 gene (KLK4) in prostate tumors: quantitative expression analysis and evaluation of its clinical significance. *Prostate* **71**, 1780–9 (2011).

273. Obiezu, C. V., Soosaipillai, A., Jung, K., Stephan, C., Scorilas, A., Howarth, D. H. C. & Diamandis, E. P. Detection of human kallikrein 4 in healthy and cancerous prostatic tissues by immunofluorometry and immunohistochemistry. *Clin. Chem.* **48**, 1232–40 (2002).
274. Xi, Z., Klock, T. I., Korkmaz, K., Kurys, P., Elbi, C., Risberg, B., Danielsen, H., Loda, M. & Saatcioglu, F. Kallikrein 4 is a predominantly nuclear protein and is overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res.* **64**, 2365–70 (2004).
275. Veveris-Lowe, T. L., Lawrence, M. G., Collard, R. L., Bui, L., Herington, A. C., Nicol, D. L. & Clements, J. A. Kallikrein 4 (hK4) and prostate-specific antigen (PSA) are associated with the loss of E-cadherin and an epithelial-mesenchymal transition (EMT)-like effect in prostate cancer cells. *Endocr. Relat. Cancer* **12**, 631–43 (2005).
276. Krajewska, M., Krajewski, S., Epstein, J. I., Shabaik, A., Sauvageot, J., Song, K., Kitada, S. & Reed, J. C. Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-X, and mcl-1 expression in prostate cancers. *Am. J. Pathol.* **148**, 1567–76 (1996).
277. Maeta, Y., Tsujitani, S., Matsumoto, S., Yamaguchi, K., Tatebe, S., Kondo, A., Ikeguchi, M. & Kaibara, N. Expression of Mcl-1 and p53 proteins predicts the survival of patients with T3 gastric carcinoma. *Gastric Cancer* **7**, 78–84 (2004).
278. Kitada, S., Andersen, J., Akar, S., Zapata, J. M., Takayama, S., Krajewski, S., Wang, H. G., Zhang, X., Bullrich, F., Croce, C. M., Rai, K., Hines, J. & Reed, J. C. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood* **91**, 3379–89 (1998).
279. Akgul, C. Mcl-1 is a potential therapeutic target in multiple types of cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 1326–36 (2009).
280. Fujita, A., Gomes, L. R., Sato, J. R., Yamaguchi, R., Thomaz, C. E., Sogayar, M. C. & Miyano, S. Multivariate gene expression analysis reveals functional connectivity changes between normal/tumoral prostates. *BMC Syst. Biol.* **2**, 106 (2008).
281. Wang, X.-Y., Hao, J.-W., Zhou, R.-J., Zhang, X.-S., Yan, T.-Z., Ding, D.-G. & Shan, L. Meta-analysis of gene expression data identifies causal genes for prostate cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **14**, 457–61 (2013).
282. Chen, H., Nandi, A. K., Li, X. & Bieberich, C. J. NKX-3.1 interacts with prostate-derived Ets factor and regulates the activity of the PSA promoter. *Cancer Res.* **62**, 338–40 (2002).
283. He, W. W., Sciavolino, P. J., Wing, J., Augustus, M., Hudson, P., Meissner, P. S., Curtis, R. T., Shell, B. K., Bostwick, D. G., Tindall, D. J., Gelmann, E. P., Abate-Shen, C. & Carter, K. C. A novel human prostate-specific, androgen-regulated homeobox gene (NKX3.1) that maps to 8p21, a region frequently deleted in prostate cancer. *Genomics* **43**, 69–77 (1997).
284. Asatiani, E., Huang, W.-X., Wang, A., Rodriguez Ortner, E., Cavalli, L. R., Haddad, B. R. & Gelmann, E. P. Deletion, methylation, and expression of the NKX3.1 suppressor gene in primary human prostate cancer. *Cancer Res.* **65**, 1164–73 (2005).
285. Bowen, C., Ju, J.-H., Lee, J.-H., Paull, T. T. & Gelmann, E. P. Functional activation of ATM by the prostate cancer suppressor NKX3.1. *Cell Rep.* **4**, 516–29 (2013).

286. Lee, C.-H., Jeong, S.-J., Yun, S.-M., Kim, J.-H., Lee, H.-J., Ahn, K. S., Won, S.-H., Kim, H. S., Lee, H.-J., Ahn, K.-S., Zhu, S., Chen, C.-Y. & Kim, S.-H. Down-regulation of phosphoglucomutase 3 mediates sulforaphane-induced cell death in LNCaP prostate cancer cells. *Proteome Sci.* **8**, 67 (2010).
287. Lavin, M. F., Clarke, R. & Gardiner, R. A. Differential expression of PCA3 and BMCC1 in prostate cancer. *Prostate* **69**, 1713–4; author reply 1715 (2009).
288. Weinschenk, T., Gouttefangeas, C., Schirle, M., Obermayr, F., Walter, S., Schoor, O., Kurek, R., Loeser, W., Bichler, K.-H., Wernet, D., Stevanović, S. & Rammensee, H.-G. Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. *Cancer Res.* **62**, 5818–27 (2002).
289. Fritz, V., Benfodda, Z., Rodier, G., Henriquet, C., Iborra, F., Avancès, C., Allory, Y., de la Taille, A., Culine, S., Blancou, H., Cristol, J. P., Michel, F., Sardet, C. & Fajas, L. Abrogation of de novo lipogenesis by stearyl-CoA desaturase 1 inhibition interferes with oncogenic signaling and blocks prostate cancer progression in mice. *Mol. Cancer Ther.* **9**, 1740–54 (2010).
290. Scaglia, N., Chisholm, J. W. & Igal, R. A. Inhibition of stearylCoA desaturase-1 inactivates acetyl-CoA carboxylase and impairs proliferation in cancer cells: role of AMPK. *PLoS One* **4**, e6812 (2009).
291. Liu, X., Sun, A., Wang, C. & Chen, L. [Expression of BRG1 and BRM proteins in prostatic cancer]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* **39**, 591–4 (2010).
292. Dai, Y., Ngo, D., Jacob, J., Forman, L. W. & Faller, D. V. Prohibitin and the SWI/SNF ATPase subunit BRG1 are required for effective androgen antagonist-mediated transcriptional repression of androgen receptor-regulated genes. *Carcinogenesis* **29**, 1725–33 (2008).
293. Agalliu, I., Suuriniemi, M., Prokunina-Olsson, L., Johanneson, B., Collins, F. S., Stanford, J. L. & Ostrander, E. A. Evaluation of a variant in the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene and prostate cancer risk in a population-based study. *Prostate* **68**, 740–7 (2008).
294. Tsavaler, L., Shapero, M. H., Morkowski, S. & Laus, R. Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins. *Cancer Res.* **61**, 3760–9 (2001).
295. Zhang, L. & Barritt, G. J. Evidence that TRPM8 is an androgen-dependent Ca²⁺ channel required for the survival of prostate cancer cells. *Cancer Res.* **64**, 8365–73 (2004).
296. Kiessling, A., Füssel, S., Schmitz, M., Stevanovic, S., Meye, A., Weigle, B., Klenk, U., Wirth, M. P. & Rieber, E. P. Identification of an HLA-A*0201-restricted T-cell epitope derived from the prostate cancer-associated protein trp-p8. *Prostate* **56**, 270–9 (2003).
297. Fuessel, S., Sickert, D., Meye, A., Klenk, U., Schmidt, U., Schmitz, M., Rost, A.-K., Weigle, B., Kiessling, A. & Wirth, M. P. Multiple tumor marker analyses (PSA, hK2, PSCA, trp-p8) in primary prostate cancers using quantitative RT-PCR. *Int. J. Oncol.* **23**, 221–8 (2003).
298. Gregg, J. L., Brown, K. E., Mintz, E. M., Piontkivska, H. & Fraizer, G. C. Analysis of gene expression in prostate cancer epithelial and interstitial stromal cells using laser capture microdissection. *BMC Cancer* **10**, 165 (2010).

299. Brett, A., Pandey, S. & Fraizer, G. The Wilms' tumor gene (WT1) regulates E-cadherin expression and migration of prostate cancer cells. *Mol. Cancer* **12**, 3 (2013).
300. Devilard, E., Bladou, F., Ramuz, O., Karsenty, G., Dalès, J.-P., Gravis, G., Nguyen, C., Bertucci, F., Xerri, L. & Birnbaum, D. FGFR1 and WT1 are markers of human prostate cancer progression. *BMC Cancer* **6**, 272 (2006).
301. Babiarova, K., Kutinova, L., Zurkova, K., Krystofova, J., Brabcova, E., Hainz, P., Musil, J. & Nemeckova, S. Immunization with WT1-derived peptides by tattooing inhibits the growth of TRAMP-C2 prostate tumor in mice. *J. Immunother.* **35**, 478–87 (2012).
302. Lövgren, J., Rajakoski, K., Karp, M., Lundwall, Å & Lilja, H. Activation of the zymogen form of prostate-specific antigen by human glandular kallikrein 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **238**, 549–55 (1997).
303. Hoffman, G. R. *et al.* Functional epigenetics approach identifies BRM/SMARCA2 as a critical synthetic lethal target in BRG1-deficient cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 3128–33 (2014).
304. Vogt, A. B., Kropshofer, H., Kalbacher, H., Kalbus, M., Rammensee, H. G., Coligan, J. E. & Martin, R. Ligand motifs of HLA-DRB5*0101 and DRB1*1501 molecules delineated from self-peptides. *J. Immunol.* **153**, 1665–73 (1994).
305. Cresswell, P. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 259–93 (1994).
306. Bieberich, C. J., Fujita, K., He, W. W. & Jay, G. Prostate-specific and androgen-dependent expression of a novel homeobox gene. *J. Biol. Chem.* **271**, 31779–82 (1996).
307. Kim, M. J., Bhatia-Gaur, R., Banach-Petrosky, W. A., Desai, N., Wang, Y., Hayward, S. W., Cunha, G. R., Cardiff, R. D., Shen, M. M. & Abate-Shen, C. Nkx3.1 mutant mice recapitulate early stages of prostate carcinogenesis. *Cancer Res.* **62**, 2999–3004 (2002).
308. Schipper, R. F., van Els, C. A., D'Amaro, J. & Oudshoorn, M. Minimal phenotype panels. A method for achieving maximum population coverage with a minimum of HLA antigens. *Hum. Immunol.* **51**, 95–8 (1996).
309. McFarland, H. F. & Martin, R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat. Immunol.* **8**, 913–9 (2007).
310. Naylor, K., Li, G., Vallejo, A. N., Lee, W.-W., Koetz, K., Bryl, E., Witkowski, J., Fulbright, J., Weyand, C. M. & Goronzy, J. J. The influence of age on T cell generation and TCR diversity. *J. Immunol.* **174**, 7446–52 (2005).
311. Duszczyszyn, D. A., Williams, J. L., Mason, H., Lapierre, Y., Antel, J. & Haegert, D. G. Thymic involution and proliferative T-cell responses in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **221**, 73–80 (2010).
312. Kieper, W. C., Burghardt, J. T. & Surh, C. D. A role for TCR affinity in regulating naive T cell homeostasis. *J. Immunol.* **172**, 40–4 (2004).
313. Sundberg, E. J., Deng, L. & Mariuzza, R. A. TCR recognition of peptide/MHC class II complexes and superantigens. *Semin. Immunol.* **19**, 262–71 (2007).

314. Cai, G. & Hafler, D. A. Multispecific responses by T cells expanded by endogenous self-peptide/MHC complexes. *Eur. J. Immunol.* **37**, 602–12 (2007).
315. Ardelli, B. F. & Prichard, R. K. Identification of variant ABC-transporter genes among *Onchocerca volvulus* collected from ivermectin-treated and untreated patients in Ghana, West Africa. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **98**, 371–84 (2004).