

**Das HLA-Molekül -
strukturelle und funktionelle Analyse
einer Schlüsselfigur des Immunsystems**

**The HLA molecule -
structural and functional analysis
of a key player in the immune system**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Lea Prokop

aus Stuttgart

Tübingen, 2015

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:	27.11.2015
Dekan:	Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Stefan Stevanović
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
1.1 Humane Leukozyten-Antigene.....	1
1.1.1 Genetische Organisation und Nomenklatur des HLA-Komplexes	1
1.1.2 HLA-Proteinstruktur	4
1.2 Das HLA-Molekül auf der Zelle	6
1.2.1 Antigenprozessierung.....	6
1.2.2 Die T-Zelle.....	8
1.2.3 Aktivierung naiver T-Zellen und das immunologische Gedächtnis	9
1.2.4 Kostimulatorische Faktoren und Zytokine	10
1.2.5 Signaltransduktion.....	11
1.3 Das HLA-Molekül im Patienten	12
1.3.1 HLA-assoziierte Krankheiten	12
1.3.2 Immuntherapie - therapeutische Tumorstoffe	13
1.3.3 Stimulation Tumorstoff-spezifischer T-Zellen <i>in vitro</i>	15
1.4 HLA-Typisierung.....	15
1.5 Proteomik und Ligandomik	16
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	19
2 Material und Methoden	20
2.1 Material.....	20
2.1.1 Verbrauchsmaterialien.....	20
2.1.2 Geräte	21
2.1.3 Software	22
2.1.4 Chemikalien und Kits.....	22
2.1.5 Puffer und Medien	24

2.1.6	Zytokine und Enzyme	27
2.1.7	Peptide	27
2.1.7.1	T-Zellstimulationen	27
2.1.7.2	Isotopenmarkierte Peptide	30
2.1.8	HLA-Monomere	31
2.1.9	HLA-Tetramere.....	31
2.1.10	Antikörper.....	31
2.1.11	Zellen aus Vollblutspendern	32
2.1.12	Gewebe- und Zellproben der HLA-Aufreinigung	33
2.2	Methoden	34
2.2.1	Methoden zur Zellgewinnung.....	34
2.2.1.1	Isolierung von PBMCs aus einer Vollblutspende.....	35
2.2.1.2	Isolierung von PBMCs aus einem <i>Buffy Coat</i>	36
2.2.1.3	Bestimmung der Lebendzellzahl	36
2.2.1.4	Einfrieren von PBMCs.....	36
2.2.1.5	Auftauen von PBMCs.....	37
2.2.2	Künstliche Antigen-präsentierende Zellen (<i>artificial antigen presenting cells</i> , aAPC)	37
2.2.2.1	Produktion von HLA-Ketten	38
2.2.2.2	Rückfaltung von Peptid:MHC Klasse I-Komplexen.....	39
2.2.2.3	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	40
2.2.2.4	Biotinylierung von Antikörpern	40
2.2.2.5	Synthese der aAPC	41
2.2.2.6	Magnetisch aktivierte Zellsortierung.....	41
2.2.2.7	MACS von CD8-positiven T-Zellen	42
2.2.2.8	T-Zellstimulation (<i>in vitro priming</i>) mit aAPCs	43
2.2.3	Analyse von Antigen-spezifischen CD8-positiven T-Zellen	44
2.2.3.1	Die Durchflusszytometrie	44
2.2.3.2	Tetramerisierung von HLA-Monomeren	45
2.2.3.3	HLA-Tetramerfärbung.....	45
2.2.3.4	Intrazelluläre Zytokinfärbung.....	46
2.2.3.5	Oberflächenfärbung mit unkonjugierten Antikörpern	47

2.2.3.6	Überprüfung von biotinylierten Antikörpern	48
2.2.4	Enzymatischer Verdau von Proteinen.....	49
2.2.4.1	Proteinverdau im Gel mittels Trypsin	49
2.2.4.2	Tryptischer Verdau von Proteinen in Lösung	50
2.2.4.3	Chymotryptischer Verdau von Proteinen in Lösung	50
2.2.4.4	Enzymatischer Verdau von HLA-Molekülen in Lösung.....	51
2.2.4.5	Isolation von HLA-Molekülen aus Zell- oder Gewebeproben für den enzymatischen Verdau	51
2.2.5	Analyse massenspektrometrischer Daten.....	52
2.2.5.1	Probenvorbereitung für die massenspektrometrische Analyse.....	54
2.2.5.2	Analyse der Peptide im Massenspektrometer	54
2.2.6	Auswertung massenspektrometrischer Daten	54
2.2.6.1	Peptid-Identifizierung mit MASCOT	55
2.2.6.2	Filterkriterien für die Peptid-Identifizierung	55
2.2.6.3	Identifikation von Proteinen über enzymatische Peptide	56
2.2.6.4	Identifikation von HLA-Allotypen über enzymatische Peptide.....	56
2.2.6.5	HLA-Annotation mittels Peptidmotiven von Gewebe- und Zellproben	57
2.2.6.6	Identifikation von HLA-Allotypen über präsentierte HLA-Peptide....	58
2.2.6.7	Quantifizierung über isotopenmarkierte Peptide.....	59
3	Ergebnisse	60
3.1	Analyse von T-Zellstimulationen <i>in vitro</i>	60
3.1.1	Analyse von aAPC-Stimulationen mittels durchflusszytometrischer Analyse	60
3.1.1.1	Definition positiver T-Zellstimulationen.....	62
3.1.1.2	Kontrolle der HLA-Tetramere	63
3.1.1.3	MACS-Protokolloptimierung.....	63
3.1.1.4	Bindung und Biotinylierung von Antikörpern.....	64
3.1.2	Das MultiPro-Projekt	65
3.1.3	Optimierung.....	67
3.1.3.1	Kostimulatorischer Antikörper α OX40	68

3.1.3.2	Interleukine	72
3.1.3.3	Intrazelluläre Zytokinfärbung.....	75
3.2	Analyse enzymatisch verdauter Proteine	81
3.2.1	Verdau im Gel	81
3.2.2	Verdau in Lösung	82
3.3	HLA-Typisierung von Zell-oder Tumorgewebe	84
3.3.1	HLA-Verdau <i>in silico</i>	85
3.3.1.1	HLA-A.....	85
3.3.1.2	HLA-B.....	90
3.3.1.3	HLA-C.....	91
3.3.2	HLA-Monomere	93
3.3.2.1	HLA-A*02:01.....	94
3.3.2.2	HLA-B*07:02.....	97
3.3.3	Homozygote Zelllinien	100
3.3.3.1	Identifikation von HLA-Allotypen über enzymatische Peptide.....	101
3.3.3.2	Anwendungsspezifische Datenbank	107
3.3.3.3	HLA-Annotation mittels Peptidmotiv - Ligandomat-Analyse	108
3.3.3.4	HLA-präsentierte HLA-Peptide.....	110
3.3.3.5	Typisierung der Zelllinie JY	111
3.3.4	Komplexe Gewebeproben	112
3.3.4.1	Identifikation von HLA-Allotypen über enzymatische Peptide.....	113
3.3.4.2	Anwendungsspezifische Datenbank	120
3.3.4.3	HLA-Annotation mittels Peptidmotiv - Ligandomat-Analyse	121
3.3.4.4	HLA-präsentierte HLA-Peptide.....	121
3.3.4.5	Typisierung der Kolorektal-Karzinomproben	122
3.3.5	Enzymatische <i>unique</i> HLA-Peptide	123
3.3.5.1	HLA Klasse I.....	124
3.3.5.2	Nicht klassische HLA-Allele	127
3.3.5.3	HLA Klasse II.....	129
3.3.6	Quantifizierung	131

4.1 Künstliche T-Zellstimulation: Analyse und Optimierung.....	138
4.1.1 MultiPro-Projekt.....	138
4.1.2 Optimierung.....	140
4.2 Analyse enzymatisch verdauter Proteine	143
4.2.1 Alternative Strategie der HLA-Typisierung.....	143
Zusammenfassung der Arbeit	148
Summary	149
Publikationen	150
Danksagung	151
Abkürzungsverzeichnis	153
Anhang	155
MultiPro-Projekt.....	155
HLA-Typisierung von Zell- oder Tumorgewebe.....	156
HLA-Verdau <i>in silico</i>	156
HLA-Annotation mittels Peptidmotiv - Ligandomat-Analyse	160
Anwendungsspezifische Datenbank	163
Isotopenmarkierte Peptide	167
Literaturverzeichnis	172

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Chromosom 6 mit Detailansicht auf die Region 6p21.31	2
Abbildung 1.2: HLA-Variabilität: Polymorphismus und Polygenie	3
Abbildung 1.3: HLA-Nomenklatur am Beispiel HLA-B*44 und Anzahl der HLA Klasse I-Allele	4
Abbildung 1.4: Schematische und detaillierte Struktur des HLA Klasse I-Moleküls sowie Peptidbindungsfurche	5
Abbildung 1.5: Positionen der höchsten Aminosäurevielfalt in HLA Klasse I sowie II.....	6
Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der Antigenprozessierung von HLA Klasse I- und II- Molekülen	8
Abbildung 1.7: Schematischer Überblick über die Aktivierung naiver T-Zellen.....	9
Abbildung 1.8: Schematische Darstellung des $\alpha\beta$ -T-Zellrezeptor-Komplexes.....	11
Abbildung 1.9: Die drei "E"s der Überwachung des Immunsystems bei Tumoren.....	13
Abbildung 1.10: Schematische Darstellung der Proteinidentifizierung über die <i>bottom-up</i> Proteomik.....	17
Abbildung 1.11: Überblick über eine direkte Möglichkeit der quantitativen Proteomik.....	18
Abbildung 2.1: Arbeitsschritte einer PBMC-Isolierung aus Vollblut	35
Abbildung 2.2: Darstellung eines Zählfeldes einer Neubauer-Zählkammer mit Formel für die Berechnung der Gesamtzellzahl	36
Abbildung 2.3: Schematische Darstellung einer künstlichen Antigen-präsentierenden Zelle.	37
Abbildung 2.4: Schematische Darstellung magnetisch aktivierter Zellsortierung.....	42
Abbildung 2.5: Stimulationsprotokoll einer T-Zellstimulation <i>in vitro</i> mittels aAPCs.....	43
Abbildung 2.6: Schematische Darstellung über das Prinzip eines FACS-Gerätes	44
Abbildung 2.7: Schematische Darstellung eines HLA-Tetramers.....	45
Abbildung 2.8: HLA-Isolation aus Tumor- oder Normalgewebe	51
Abbildung 2.9: Schematische Darstellung des Massenspektrometers LTQ Orbitrap mit einem Querschnitt durch den Orbitrap-Massenanalysator	53
Abbildung 2.10: Prinzip der Umwandlung von Spektren zu Aminosäuresequenzen	55
Abbildung 3.1: Überprüfung von unspezifischen Bindungen von HLA-Tetrameren.....	61
Abbildung 3.2: Auswertestrategie für die Analyse von Antigen-spezifischen CD8-positiven T- Zellen.....	61
Abbildung 3.3: Positive T-Zellstimulationen	62
Abbildung 3.4: Ausschluss unspezifischer HLA-Tetramerbindungen	63
Abbildung 3.5: Optimierung des MACS-Protokolls.....	64
Abbildung 3.6: Biotinylierungs- und Bindungsnachweis des CD28- und OX40-Antikörpers ..	65

Abbildung 3.7: Stimulationen verschiedener Spenderzellen mit dem Peptid HPEYNRPLL...	67
Abbildung 3.8: Verwendung der CD28- und OX40-Antikörper in unterschiedlichen Kombinationen	70
Abbildung 3.9: Anzahl lebender Zellen des Spenders J159 unter Verwendung des CD28- und OX40-Antikörpers.....	71
Abbildung 3.10: 4 Stimulationen mit unterschiedlichen Interleukinen.....	74
Abbildung 3.11: HLA-Tetramerfärbung der Spenderzellen J216 nach unterschiedlicher Interleukin-Behandlung	76
Abbildung 3.12: ICS mit dem Peptid ELAGIGILTV (Experiment J216).....	78
Abbildung 3.13: Funktionalität der positiven T-Zellen aus ICS (Experimente J216, J220 und J222).....	80
Abbildung 3.14: Peptidanalyse von mit MMP-8 prozessiertem Laminin-10	82
Abbildung 3.15: Tryptischer und chymotryptischer Verdau <i>in silico</i> eines HLA-A*02:01- Moleküls.....	86
Abbildung 3.16: Vergleich des tryptischen und chymotryptischen Verdaus <i>in silico</i> des HLA- A*02:01-Moleküls (unterschiedliche MC-Parameter und Proteinabdeckung).....	87
Abbildung 3.17: Tryptischer und chymotryptischer Verdau <i>in silico</i> eines HLA-B*07:02- Moleküls.....	90
Abbildung 3.18: Vergleich des tryptischen und chymotryptischen Verdaus <i>in silico</i> des HLA- B*07:02-Moleküls (unterschiedliche MC-Parameter und Proteinabdeckung).....	91
Abbildung 3.19: Tryptischer und chymotryptischer Verdau <i>in silico</i> eines HLA-C*07:02- Moleküls.....	92
Abbildung 3.20: Vergleich des tryptischen und chymotryptischen Verdaus <i>in silico</i> des HLA- C*07:02-Moleküls (unterschiedliche MC-Parameter und Proteinabdeckung)	93
Abbildung 3.21: Veränderte Sequenz eines HLA-A*02:01-Monomers	94
Abbildung 3.22: Vergleich der Daten <i>in silico</i> von HLA-A*02:01 mit experimentellen mit unterschiedlichen Schnittstellen	95
Abbildung 3.23: Vergleich der zwei gemessenen Verdaus ohne enzymatische Schnittstellen	95
Abbildung 3.24: Fragment-Ausbeute des tryptischen und chymotryptischen Verdaus von HLA-A*02:01 mit unterschiedlichen Schnittstellen.....	96
Abbildung 3.25: Vergleich der Daten <i>in silico</i> von HLA-B*07:02 mit experimentellen mit unterschiedlichen Schnittstellen	98
Abbildung 3.26: Vergleich der zwei gemessenen Verdaus ohne enzymatische Schnittstellen	98
Abbildung 3.27: Fragment-Ausbeute des tryptischen und chymotryptischen Verdaus von HLA-B*07:02 mit unterschiedlichen Schnittstellen.....	99

Abbildung 3.28: <i>Screenshot</i> der Proteinliste aus dem <i>Proteome Discoverer</i> von JY1 Trypsin (2 MC).....	105
Abbildung 3.29: <i>Screenshot</i> der Proteinliste aus dem <i>Proteome Discoverer</i> von JY1 Chymotrypsin (2 MC)	106
Abbildung 3.30: Proteinübersicht des enzymatischen JY1-Verdaus prozessiert mittels anwendungsspezifischer Datenbank.....	107
Abbildung 3.31: Proteinübersicht des enzymatischen JY2-Verdaus prozessiert mittels anwendungsspezifischer Datenbank.....	108
Abbildung 3.32: Verteilung der HLA-Restriktion der Peptidsequenzen aus JY1	109
Abbildung 3.33: Verteilung der HLA-A-Restriktion der Peptidsequenzen aus JY1	109
Abbildung 3.34: Verteilung der HLA-B-Restriktion der Peptidsequenzen aus JY1	110
Abbildung 3.35: <i>Screenshot</i> der Proteinliste aus dem <i>Proteome Discoverer</i> von benignem KC93-Retentat verdaut mit Trypsin (2 MC)	118
Abbildung 3.36: <i>Screenshot</i> der Proteinliste aus dem <i>Proteome Discoverer</i> von benignem KC93-Retentat verdaut mit Chymotrypsin (2 MC)	119
Abbildung 3.37: <i>Screenshot</i> der Proteinliste aus dem <i>Proteome Discoverer</i> von benignem KC93-Retentat verdaut mit Trypsin	120
Abbildung 3.38: <i>Screenshot</i> der Proteinliste aus dem <i>Proteome Discoverer</i> von benignem KC93-Retentat verdaut mit Chymotrypsin	121
Abbildung 3.39: Spektrum der natürlichen und synthetischen Peptidsequenz DGEDQTQDTELVETR	133
Abbildung 0.1: Verteilung der HLA-Restriktion der Peptidsequenzen aus KC58 Normalgewebe.....	161
Abbildung 0.2: Verteilung der HLA-Restriktion der Peptidsequenzen aus KC58 Tumorgewebe	162
Abbildung 0.3: Verteilung der HLA-Restriktion der Peptidsequenzen aus KC92 Normalgewebe.....	162
Abbildung 0.4: Verteilung der HLA-Restriktion der Peptidsequenzen aus KC92 Tumorgewebe	162
Abbildung 0.5: Verteilung der HLA-Restriktion der Peptidsequenzen aus KC93 Normalgewebe.....	163
Abbildung 0.6: Verteilung der HLA-Restriktion der Peptidsequenzen aus KC93 Tumorgewebe	163
Abbildung 0.7: <i>Screenshot</i> der Proteinliste mit anwendungsspezifischer Datenbank aus dem <i>Proteome Discoverer</i> von benignem KC92-Retentat verdaut mit Trypsin	164
Abbildung 0.8: <i>Screenshot</i> der Proteinliste mit anwendungsspezifischer Datenbank aus dem <i>Proteome Discoverer</i> von benignem KC92-Retentat verdaut mit Chymotrypsin	164

Abbildung 0.9: <i>Screenshot</i> der Proteinliste mit anwendungsspezifischer Datenbank aus dem <i>Proteome Discoverer</i> von tumorösen KC92-Retentat verdaut mit Trypsin.....	164
Abbildung 0.10: <i>Screenshot</i> der Proteinliste mit anwendungsspezifischer Datenbank aus dem <i>Proteome Discoverer</i> von tumorösen KC92-Retentat verdaut mit Chymotrypsin	164
Abbildung 0.11: <i>Screenshot</i> der Proteinliste mit anwendungsspezifischer Datenbank aus dem <i>Proteome Discoverer</i> von tumorösen KC93-Retentat verdaut mit Trypsin	165
Abbildung 0.12: <i>Screenshot</i> der Proteinliste mit anwendungsspezifischer Datenbank aus dem <i>Proteome Discoverer</i> von tumorösen KC93-Retentat verdaut mit Chymotrypsin	165
Abbildung 0.13: <i>Screenshot</i> der Proteinliste mit anwendungsspezifischer Datenbank aus dem <i>Proteome Discoverer</i> von tumorösen KC58-Retentat verdaut mit Trypsin	165
Abbildung 0.14: <i>Screenshot</i> der Proteinliste mit anwendungsspezifischer Datenbank aus dem <i>Proteome Discoverer</i> von tumorösen KC58-Retentat verdaut mit Trypsin	166
Abbildung 0.15: <i>Screenshot</i> der Proteinliste mit anwendungsspezifischer Datenbank aus dem <i>Proteome Discoverer</i> von benignem KC58-Retentat verdaut mit Trypsin	166
Abbildung 0.16: <i>Screenshot</i> der Proteinliste mit anwendungsspezifischer Datenbank aus dem <i>Proteome Discoverer</i> von benignem KC58-Retentat verdaut mit Chymotrypsin	166
Abbildung 0.17: Spektrum der natürlichen und synthetischen Peptidsequenz APWIEQEGPEYWDGETRK	167
Abbildung 0.18: Spektrum der natürlichen und synthetischen Peptidsequenz FDSDAASQR	167
Abbildung 0.19: Spektrum der natürlichen und synthetischen Peptidsequenz FISVGYVDGTQFVR	167
Abbildung 0.20: Spektrum der natürlichen und synthetischen Peptidsequenz GHDQYAYDGK	168
Abbildung 0.21: Spektrum der natürlichen und synthetischen Peptidsequenz KWEAVHAAEQR	168
Abbildung 0.22: Spektrum der natürlichen und synthetischen Peptidsequenz SWTAADMAAQTTK	168
Abbildung 0.23: Spektrum der natürlichen und synthetischen Peptidsequenz THVTHHPISDHEVTLR	169
Abbildung 0.24: Spektrum der natürlichen und synthetischen Peptidsequenz WEAAHAAEQQR	169
Abbildung 0.25: Spektrum der natürlichen und synthetischen Peptidsequenz WEAAHEAEQLR	169

Abbildung 0.26: Spektrum der natürlichen und synthetischen Peptidsequenz YFDTAMSR	170
Abbildung 0.27: Spektrum der natürlichen und synthetischen Peptidsequenz WEAAHVAEQQR	170
Abbildung 0.28: Spektrum der natürlichen und synthetischen Peptidsequenz WEAAHVAEQWR.....	171
Abbildung 0.29: Spektrum der natürlichen und synthetischen Peptidsequenz YFSTSVSRPGSGEPR	171

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Kontroll-Peptide	28
Tabelle 2.2: Peptide aus dem MultiPro-Projekt	29
Tabelle 2.3: Peptide aus dem RCC-Projekt	29
Tabelle 2.4: Peptide aus dem OvCa-Projekt	30
Tabelle 2.5: Isotopenmarkierte synthetisch hergestellte Peptide	30
Tabelle 2.6: Antikörper für die Oberflächen- sowie Intrazellulär-Färbung	31
Tabelle 2.7: Antikörper für die HLA-Aufreinigung	31
Tabelle 2.8: Bei der aAPC-Synthese eingesetzte Antikörper	32
Tabelle 2.9: Vollblut-Spender	33
Tabelle 2.10: Kolorektal-Karzinomproben	34
Tabelle 2.11: JY-Pellets	34
Tabelle 2.12: Arbeitsschritte einer HLA-Tetramerfärbung	46
Tabelle 2.13: Arbeitsschritte einer intrazellulären Zytokinfärbung	47
Tabelle 2.14: Arbeitsschritte für die Oberflächenfärbung unkonjugierter Antikörper	48
Tabelle 2.15: Arbeitsschritte für die Überprüfung biotinylierter Antikörper	49
Tabelle 2.16: Einteilung der HLA-Peptide	57
Tabelle 2.17: Filterkriterien für HLA Klasse I-Liganden	58
Tabelle 2.18: Filterkriterien für Klasse II-Liganden	59
Tabelle 3.1: Getestete Peptide aus dem MultiPro-Projekt	66
Tabelle 3.2: Optimierungskriterien nach einer aAPC-Stimulation mit α OX40	69
Tabelle 3.3: Getestete Peptide aus dem MultiPro-Projekt (Antikörper-Optimierung)	71
Tabelle 3.4: Getestete Peptide aus dem RCC-Projekt (Antikörper-Optimierung)	72
Tabelle 3.5: Getestete Peptide aus dem OvCa-Projekt (Antikörper-Optimierung)	72
Tabelle 3.6: Spenderzellen und Ergebnisse der Interleukin-Optimierung	73
Tabelle 3.7: Getestete Peptide aus dem MultiPro-Projekt (Interleukin-Optimierung)	74
Tabelle 3.8: Getestete Peptide aus dem RCC-Projekt (Interleukin-Optimierung)	75
Tabelle 3.9: Getestete Peptide aus dem OvCa-Projekt (Interleukin-Optimierung)	75
Tabelle 3.10: Vergleich zwischen 1. und 2. HLA-Tetramerfärbung in Experiment J216	76
Tabelle 3.11: Charakterisierung der T-Zellen nach ICS in verschiedenen Experimenten	79
Tabelle 3.12: Für die Analyse ausgewählte tryptische Peptide der humanen Laminin- α 5-Kette	81
Tabelle 3.13: Mittels MS/MS identifizierte tryptische Peptide der positiven Kontrolle 293- BAFF	83

Tabelle 3.14: Mittels MS/MS identifizierte in drei Replikaten gemessene tryptische Peptide von aufgereinigtem und eingeeignetem Zellkulturüberstand von polyklonalen NK-Zellen	84
Tabelle 3.15: Parameter für den Verdau <i>in silico</i>	85
Tabelle 3.16: Theoretische Proteinabdeckung von HLA-A*02:01 durch unterschiedlich verpasste Schnittstellen	86
Tabelle 3.17: Tryptischer Verdau <i>in silico</i> des HLA-A*02:01 im Vergleich mit 0 MC und 1 MC	88
Tabelle 3.18: Chymotryptischer Verdau <i>in silico</i> des HLA-A*02:01 im Vergleich mit 0 MC und 1 MC	89
Tabelle 3.19: Theoretische Proteinabdeckung von HLA-B*07:02 durch unterschiedlich verpasste Schnittstellen	90
Tabelle 3.20: Theoretische Proteinabdeckung von HLA-C*07:02 durch unterschiedlich verpasste Schnittstellen	92
Tabelle 3.21: Vergleich der beiden tryptischen HLA-A*02:01-Monomerverdaus durch unterschiedliche Kriterien und MCs	97
Tabelle 3.22: Vergleich der beiden chymotryptischen HLA-A*02:01-Monomerverdaus durch unterschiedliche Kriterien und MCs	97
Tabelle 3.23: Vergleich der beiden tryptischen HLA-B*07:02-Monomerverdaus durch unterschiedliche Kriterien und MCs	100
Tabelle 3.24: Vergleich der beiden chymotryptischen HLA-B*07:02-Monomerverdaus durch unterschiedliche Kriterien und MCs	100
Tabelle 3.25: Proteinkonzentration und Retentatvolumen der zwei JY-Proben	101
Tabelle 3.26: Tryptischer Verdau mit unterschiedlichen MC-Parametern von JY1 und JY2	101
Tabelle 3.27: Durch MS/MS identifizierte <i>unique</i> Peptide nach tryptischem Verdau	102
Tabelle 3.28: Chymotryptischer Verdau mit unterschiedlichen MC-Parametern von JY1 und JY2	103
Tabelle 3.29: Durch MS/MS identifizierte <i>unique</i> Peptide nach chymotryptischem Verdau	104
Tabelle 3.30: HLA Klasse II-präsentierte <i>unique</i> HLA-Peptide in zwei HLA-Isolationen aus JY	111
Tabelle 3.31: Alternative Typisierung der JY-Proben	111
Tabelle 3.32: Volumen und Proteinkonzentration der Kolonkarzinom-Retentate	112
Tabelle 3.33: Auswertung der enzymatischen Verdau von KC58-Retentat	114
Tabelle 3.34: Auswertung der enzymatischen Verdau von KC92-Retentat	115
Tabelle 3.35: Auswertung der enzymatischen Verdau von KC93-Retentat	117
Tabelle 3.36: HLA Klasse I-präsentierte HLA-Liganden	122
Tabelle 3.37: Alternative Typisierung der Kolorektal-Karzinomproben	122

Tabelle 3.38: HLA-A-Moleküle abgedeckt durch <i>unique</i> Peptide	125
Tabelle 3.39: HLA-B-Moleküle abgedeckt durch <i>unique</i> Peptide	126
Tabelle 3.40: HLA-C-Moleküle abgedeckt durch <i>unique</i> Peptide	127
Tabelle 3.41: Nicht klassische HLA-Moleküle abgedeckt durch <i>unique</i> Peptide.....	128
Tabelle 3.42: HLA-DRB1-Ketten abgedeckt durch <i>unique</i> Peptide	130
Tabelle 3.43: Weitere HLA-DR β -Ketten abgedeckt durch Peptide.....	131
Tabelle 3.44: Synthetische isotope-markierte Peptide	132
Tabelle 3.45: Vergleich der isotope-markierten Peptide mit einem Messeinsatz von 1 pmol und 5 pmol	133
Tabelle 3.46: Vergleich der synthetischen isotope-markierten Peptide in einem Verdau von KC58.....	134
Tabelle 3.47: Vergleich der synthetischen isotope-markierten Peptide in einem Verdau von KC92.....	135
Tabelle 3.48: Vergleich der synthetischen isotope-markierten Peptide in einem Verdau von KC93.....	136
Tabelle 0.1: Getestete Peptide des MultiPro-Projektes in allen Kooperations-Zentren.....	155
Tabelle 0.2: Vakzinierungscocktail MultiPro-Projekt	156
Tabelle 0.3: Kontrollpeptide MultiPro-Projekt.....	156
Tabelle 0.4: Tryptischer <i>in silico</i> -Verdau von HLA-B*07:02 im Vergleich mit 0 MC und 1 MC	157
Tabelle 0.5: Chymotryptischer <i>in silico</i> -Verdau von HLA-B*07:02 im Vergleich mit 0 MC und 1 MC	158
Tabelle 0.6: Tryptischer <i>in silico</i> -Verdau von HLA-C*07:02 im Vergleich mit 0 MC und 1 MC	159
Tabelle 0.7: Chymotryptischer <i>in silico</i> -Verdau von HLA-C*07:02 im Vergleich mit 0 MC und 1 MC	160
Tabelle 0.8: Gruppieren HLA-Allotypen	161

1 Einleitung

Die Entdeckung der Bedeutung des HLA-Moleküls für das Immunsystem war nicht nur eine wissenschaftliche Errungenschaft, sondern öffnete die Tür zu einem komplett neuen Ansatz in der Immuntherapie. Als Schlüssel-molekül des menschlichen Immunsystems eignet es sich als spezifischer und personalisierter Therapieansatz gegen komplexe Krankheiten wie Krebs.

1.1 Humane Leukozyten-Antigene

Das Immunsystem ist der Schutz unseres Körpersystem gegen Schädigungen von außerhalb wie innerhalb. Im Laufe der Evolution wurden Strategien entwickelt um diesen schädlichen Einflüssen entgegen zu wirken. Der Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) spielt besonders in Wirbeltieren eine zentrale Rolle bei der Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen. Die Bezeichnung MHC hat ihren Ursprung in den 1930ern, in denen Bover beobachtete, dass bei einigen Mäusen Hautzelltransplante abgestoßen werden und bei anderen nicht. Zudem konnte er zeigen, dass wenn sogenannte Kompatibilitätsgene übereinstimmen das Transplantat nicht abgestoßen, sondern angenommen wird. In den 50ern und 60ern wurde dann gezeigt, dass dies genauso für den Menschen gilt, wobei die Beschreibung Daussets 1958 von HLA-A2 als „MAC“ oft als die Entdeckung des HLA-Systems bezeichnet wird (Dausset, 1958). Abgesehen von der Gewebe- oder Transplantationskompatibilität bekam das humane Leukozyten-Antigen (*human leukocyte antigen*, HLA) eine zentrale Rolle in der klinischen Immunologie. Das Protein stellt ein wichtiges Bindeglied zwischen den körpereigenen Zellen und der so genannten adaptiven Immunabwehr dar. Das Molekül verschafft Immunzellen einen Einblick in die Produktionsmaschinerie der Zellen und kann so Veränderungen, seien sie Ursprung eines Krankheitserregers oder maligne Umstellung der normalen Zelleigenschaften, erkennen. Dies macht dieses Protein nicht nur zu einer zentralen Schlüsselfigur des Immunsystems, sondern bietet sich für die Forschung und den Einsatz in der Immuntherapie an.

1.1.1 Genetische Organisation und Nomenklatur des HLA-Komplexes

Auf dem kurzer Arm des Chromosoms 6 in der Region p21.1-21.3 sind drei HLA-Klassen kodiert (siehe Abbildung 1.1). Die Gene der Klasse III-Region kodieren für Proteine, die eine Rolle in der unspezifischen Immunabwehr spielen, wie das Komplementsystem (C4A, C4B,

C2 und Bf) und Zytokine (Tumornekrosefaktor- α (TNF) und - β (LTA und LTB)). In der Klasse II-Region liegen die Gene für die Proteinketten der HLA Klasse II-Moleküle DR, DP, DQ sowie der Moleküle DM und DO. Auf die Funktion dieser Moleküle wird in Kapitel 1.2.1 eingegangen. In Abbildung 1.1 nicht abgebildet sind weitere hier kodierte Bestandteile der Antigenpräsentation wie Tapasin, TAP und Proteine des Proteasoms (LMP-Gene). HLA Klasse II-Expression findet ausschließlich auf Zellen des Immunsystems statt. Die Klasse I-Region kodiert für die antigenpräsentierenden HLA Klasse I α -Ketten A, B und C. Das heterodimere HLA Klasse I-Molekül wird mit dem auf Chromosom 15 kodierten β_2 -Mikroglobulin gebildet. Zusätzlich sind in der Klasse I-Region die sogenannten „nicht klassischen HLA-Moleküle“ E, F und G kodiert (Janeway, 2005). Diese Proteine haben tragende Funktionen in der NK-Zellerkennung und Aktivierung (HLA-E), Toleranz in der Schwangerschaft (HLA-G) und weitere immunsuppressive Eigenschaften (HLA-F) (Xu et al., 2015).

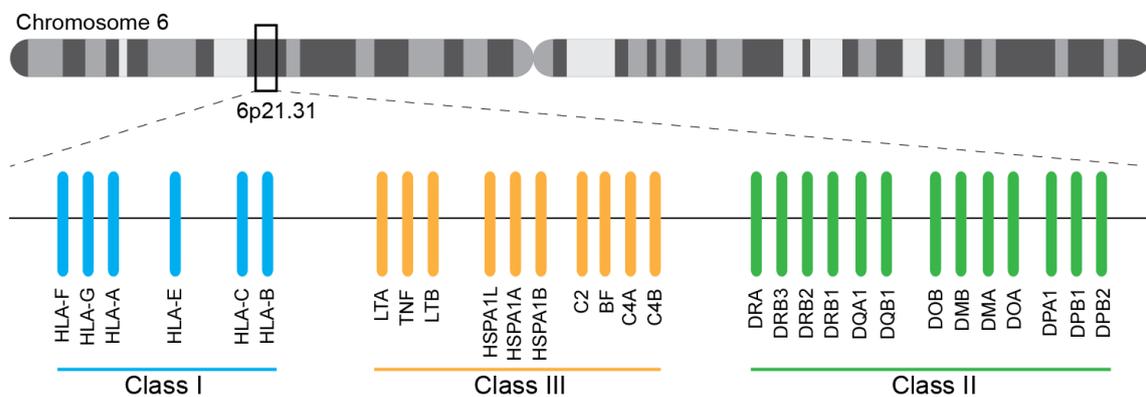


Abbildung 1.1: Chromosom 6 mit Detailansicht auf die Region 6p21.31

Das oberhalb liegende Chromosom 6 (in grau) ist in einem detaillierten Ausschnitt der Region 6p21.31 darunter gezeigt. Zu sehen sind die drei MHC-Regionen des Menschen. In Blau (links) sind die HLA Klasse I kodierenden Gene abgebildet, in der Mitte in Gelb Klasse III und rechts in Grün die Klasse II-Gene. (<http://www.sciscogenetics.com/wp-content/uploads/2013/05/MHC.png>, Stand 10.07.2015)

Die Expression von HLA Klasse I-Molekülen findet auf nahezu allen kernhaltigen Zellen und Thrombozyten statt. Sie dienen der Präsentation von Proteinfragmenten, die in einer Zelle exprimiert und wieder abgebaut wurden. Somit reflektiert das präsentierte Peptid auf dem HLA-Molekül das Innenleben der Zelle und kann von Zellen des Immunsystems als Kontrolle verwendet werden. In Kapitel 1.2.1 wird ausführlicher auf die Antigenpräsentation der klassischen Klasse I-Moleküle eingegangen. Die Moleküle der Klasse I-Region gehören zu den variabelsten des Menschen. Dies liegt an zwei entscheidenden Faktoren (siehe Abbildung 1.2), der Polygenie (Beteiligung mehrerer Gene an der Ausbildung eines Phänotyps) und dem Polymorphismus (Auftreten einer Genvariation, sogenannte Allel, in einer Population). Da die Antigenpräsentation der Peptide abhängig ist von der Aminosäuresequenz der exprimierten HLA-Allotypen, hat sich im Laufe der Evolution besonders der Bereich der peptidbindenden Region hochpolymorph entwickelt. Diese

Variation der HLA-Molekülvarianten (Allotypen) ermöglicht eine vielfältige Präsentation und Abwehr eines breiten Spektrums an Erregern. Da die Vererbung und Expression der HLA-Gene kodominant erfolgt, ist eine große Vielzahl an Genvarianten (Allele) in der menschlichen Bevölkerung vorhanden. Für Klasse I mit drei Genen für die α -Kette auf Chromosom 6 bedeutet dies, dass bis zu 6 verschiedene Moleküle in einem Individuum kodiert sein können (Stephens et al., 1999).

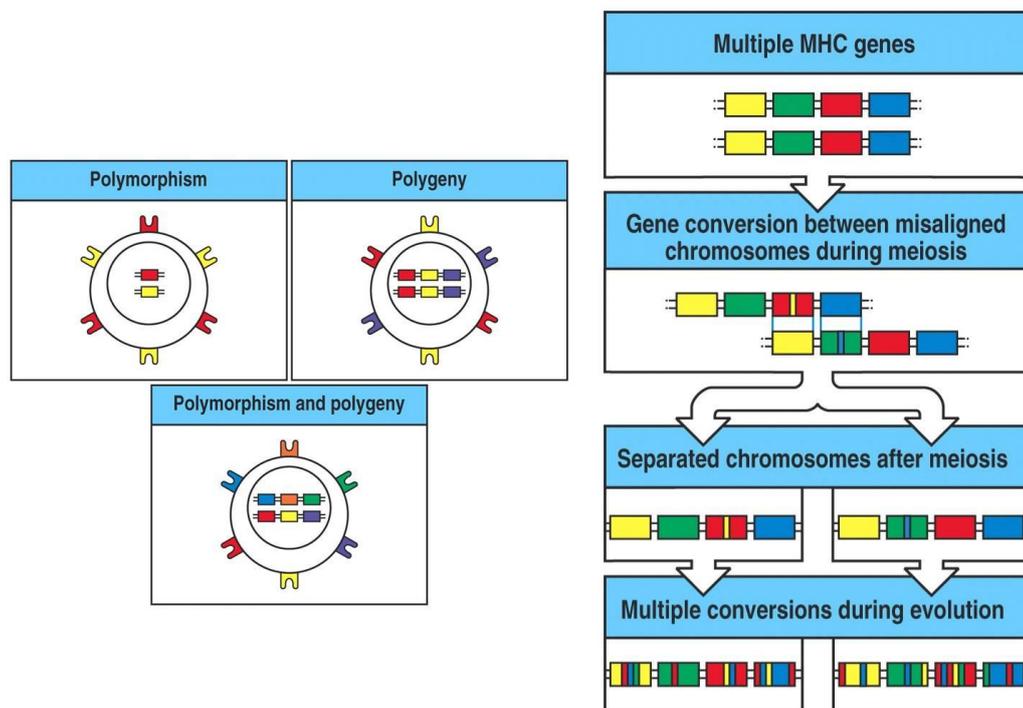


Abbildung 1.2: HLA-Variabilität: Polymorphismus und Polygenie

Links sind die zwei Faktoren Polymorphismus und Polygenie gezeigt und die Auswirkung deren Kombination. Rechts ist der Evolutionsmechanismus der Genkonversion abgebildet, (Janeway, 2005).

Eine große Schwierigkeit bei einer hohen Anzahl von Allelen ist eine geeignete Nomenklatur zu finden. Die erste standardisierte Nomenklatur wurde 1968 von dem WHO Nomenklatur-Komitee in einem Bulletin festgelegt. Im Anschluss gab es viele Aktualisierungen (Marsh et al., 2010), wobei in Abbildung 1.3 die aktuelle Version aufgeführt ist (http://hla.alleles.org/nomenclature/nomenc_reports.html, Stand 22.07.2015). Für diese Arbeit relevant sind die HLA-Hauptantigene oder HLA-Haupttypen (die ersten zwei Zahlen nach dem Asterisk) und der HLA-Subtyp der durch die zwei folgenden Zahlen nach dem Haupttyp definiert ist.

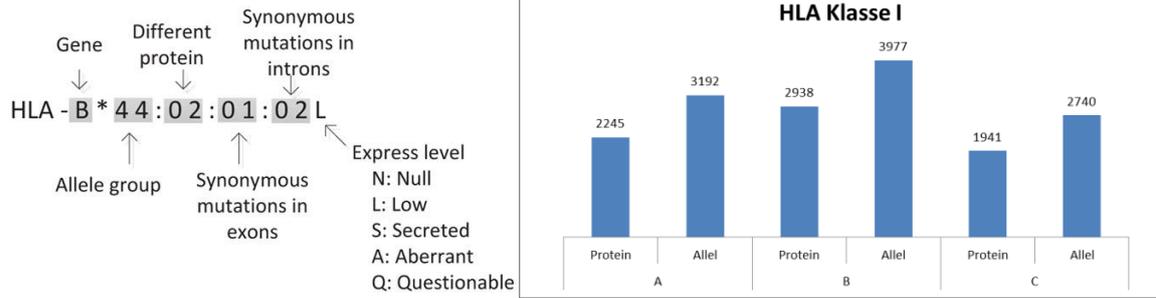


Abbildung 1.3: HLA-Nomenklatur am Beispiel HLA-B*44 und Anzahl der HLA Klasse I-Allele

Abgebildet ist HLA-B*44:02 mit einer vollständigen Entschlüsselung der Nomenklatur (Xie et al., 2010). Buchstaben in der Nomenklatur sind folgendermaßen definiert: N = Allele die nicht als exprimiert nachgewiesen wurden. Alternative Expression ist durch folgende Buchstaben definiert: L = eine geringe Zelloberflächenexpression im Vergleich zu einer Normalen; S = nicht auf der Zelloberfläche exprimiert, aber als solubles Molekül nachgewiesen; C = ist im Zytoplasma nachgewiesen, aber erscheint nicht auf der Zelloberfläche; A = abweichende Expression mit berechtigten Einwänden, ob überhaupt eine Expression stattfindet; Q = die Expression des Allels ist fragwürdig, Mutation in diesem Allel wurde vorerst mit einer normalen Expression deklariert. Rechts daneben ist die Anzahl aller beschriebenen HLA Klasse I-Allele und die Anzahl der daraus resultierenden Proteine (<http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>, Stand Juli 2015).

1.1.2 HLA-Proteinstruktur

HLA Klasse I-Moleküle falten sich aus zwei Ketten mit einem Peptid (siehe 1.2.1) zusammen. Die leichte Kette β_2 -Mikroglobulin (ca. 12 kDa), welche auf Chromosom 15 codiert ist, bindet nichtkovalent an die größere α -Kette (ca. 43 kDa) (Madden, 1995). Die α -Kette (ca. 365 AS lang) ist in drei extrazelluläre Domänen unterteilt, von denen α_1 und α_2 die Bindungsfurche für das Peptid bilden, während nach der α_3 -Domäne das Molekül über einen transmembranen Bereich in der Membran verankert ist (Bjorkman et al., 1987). Das aus 8 bis 10 Aminosäuren bestehende Peptid liegt in der Peptidbindungsfurche bestehend aus 8 antiparallelen β -Faltblättern und zwei zusätzlichen α -Helices, welche die Ränder bilden (Madden et al., 1993).

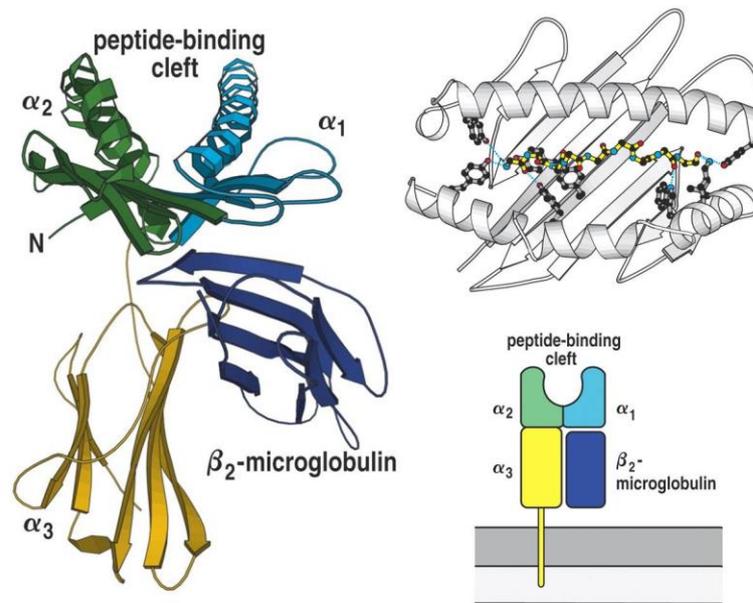


Abbildung 1.4: Schematische und detaillierte Struktur des HLA Klasse I-Moleküls sowie Peptidbindungsfurche

Links: Bändermodell eines MHC Klasse I-Moleküls ohne Transmembrandomäne und gebundenes Peptid. Rechts oben: Bindungsfurche eines MHC Klasse I-Moleküls mit einem gebundenen Peptid. Konservierte Seitenkettengruppen der Bindungsfurche fixieren den Amino- und Carboxyterminus des Peptids. Rechts unten: schematische Darstellung eines MHC Klasse I-Moleküls. Alle Domänen der α-Kette sowie das β₂-Mikroglobulin sind abgebildet (Janeway, 2005).

Die Affinität der Bindung zwischen Peptid und MHC-Molekül hängt von der Aminosäuresequenz des Peptids ab, da die Peptidseitenketten mit hochpolymorphen Aminosäuren in den Bindungstaschen der Bindungsfurche wechselwirken. Darum werden Peptide mit gewissen Aminosäuren an bestimmten Positionen von unterschiedlichen MHC-Molekülen mit ihren Ankerpositionen begünstigt (Falk et al., 1991; Rammensee et al., 1995; Rammensee et al., 1999). Die Mehrheit der Polymorphismen finden sich in den Klasse I-Allelen in Exon 2 und 3, die für die α₁ und α₂-Domäne codieren (siehe Abbildung 1.5). Sie bilden die Peptidbinderegion und sorgen so für eine Aminosäuresequenz-abhängige Peptidbindung.

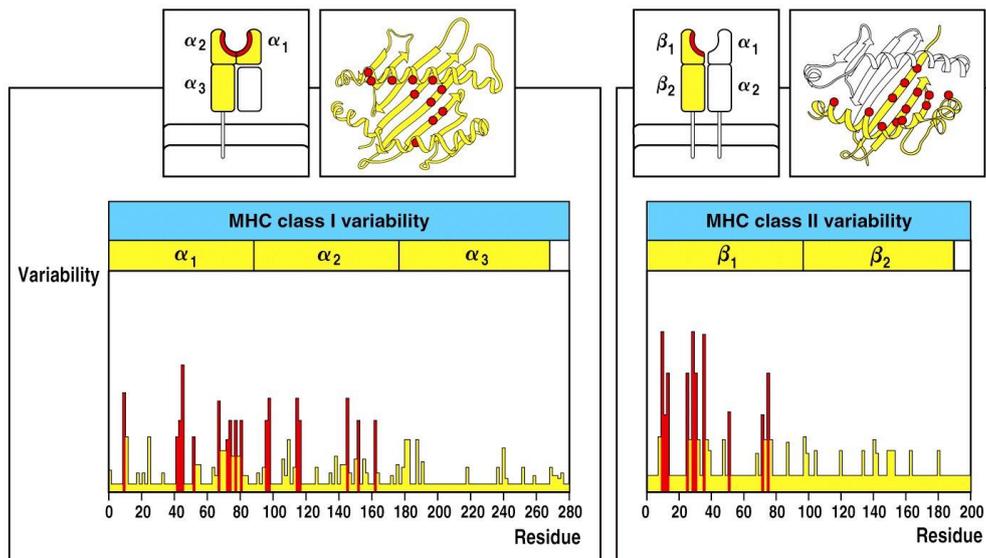


Abbildung 1.5: Positionen der höchsten Aminosäurevielfalt in HLA Klasse I sowie II

In Rot sind die Positionen der hochpolymorphen Aminosäuren der Klasse I α -Kette und Klasse II β_1 -Kette gezeigt. Diese Vielfalt befindet sich in den antigenbindenden Region der HLA-Moleküle (Janeway, 2005).

HLA Klasse II wird aus einer α - und β -Kette gebildet (der 34 kDa großen α - und 29 kDa großen β -Kette) und ist mit beiden in der Plasmamembran verankert. Dadurch, dass die Peptidbindungsfurche weiter geöffnet ist, können Peptide aus der Furche herausragen und somit länger in ihrer Sequenz sein (12-20 AS).

1.2 Das HLA-Molekül auf der Zelle

Die klassischen MHC-Moleküle werden auf unterschiedlichen Zellen zu unterschiedlichen Zwecken exprimiert. Während MHC Klasse I-Moleküle auf fast allen kernhaltigen Zellen des Körpers vorkommen und ihr gebundenes Peptid von zytotoxischen CD8-positiven T-Zellen erkannt wird (Davis et al., 1998), befinden sich MHC Klasse II-Moleküle hauptsächlich auf den antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems (*antigen presenting cells*, APCs) und präsentieren dort CD4-positiven T-Zellen ihre Antigene (Banchereau et al., 1998). Anhand dieser HLA-Restriktion und unterschiedlicher Aufgaben ist nicht nur der Ursprung der Peptide anders, die auf dem HLA-Molekül an der Zelloberfläche präsentiert werden, sondern es liegt zudem eine unterschiedliche Antigenprozessierung vor.

1.2.1 Antigenprozessierung

MHC Klasse I-Moleküle präsentieren allgemein alle Proteine, die im Zytosol abgebaut werden können, unabhängig davon ob es zelleigene oder durch eine Infektion bakteriellen oder viralen Ursprung erzeugte sind. Dazu müssen die Antigene in der Zelle prozessiert, an

MHC-Moleküle gebunden und stabil an die Zelloberfläche transportiert und dort präsentiert werden (Germain et al., 1993; Jensen, 1999).

Das Repertoire an präsentierten Peptiden entsteht hauptsächlich durch den proteosomalen Abbau aller ubiquitinierten Zellproteine. Die Fragmente der abgebauten Proteine werden über den TAP-Transporter (*transporter associated with antigen processing*) in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) transportiert (Neefjes et al., 1993; Groettrup et al., 1996) und können dort durch weitere Aminopeptidasen (z.B. ERAAP, *ER aminopeptidase associated with antigen processing*) N-terminal verkürzt werden. Dort binden die Peptide mit Hilfe des Peptid-Beladungskomplexes (*peptide loading complex*, PLC) an die bereits an β_2 -Mikroglobulin assoziierte α -Kette. Die beladenen MHC-Moleküle werden in Vesikeln vom ER über den Golgi-Apparat an die Plasmamembran transportiert (Benham et al., 1995). Die Effizienz dieser Antigenprozessiermaschine ist limitiert durch die Länge der durch das Proteasom entstandenen Moleküle (die meisten sind zu kurz) und den weiteren Abbau im Zytosol. Nur 1% der entstandenen Peptide wird in das ER transportiert und davon nur 3% gebunden (Stevanović and Schild, 1999; Yewdell, 2001). Exogene Antigene können durch die sogenannte Kreuzpräsentation auf HLA Klasse I präsentiert werden (Ackerman et al., 2004; Guermonprez et al., 2005). Auf der Zelle werden 100.000 bis 750.000 HLA:Peptid-Komplexe präsentiert, die Anzahl der identischen HLA:Peptid-Komplexe kann dabei von einer bis 10.000 Kopien reichen (Stevanović and Schild, 1999). Die Prozessierung der Peptide für die HLA Klasse II-Moleküle unterscheidet sich von der für HLA Klasse I. Durch endozytische Aufnahme werden die Peptide durch Proteolyse und Beladung im endosomalen Kompartiment (*MHC class II compartment*, MIIC) prozessiert (Neefjes et al., 2011). Proteasen (z.B. Cathepsine) schneiden die aufgenommenen Proteine zu Peptiden. Über den Golgi-Apparat wird der HLA Klasse II-Molekülkomplex, stabilisiert durch die invariante Kette (*invariant chain*, Ii), in das MIIC gebracht. Dort bauen die Proteasen die invariante Kette bis auf das kleine CLIP-Fragment (*class II-associated invariant chain peptide*) ab, welches die Peptidbindungsfurche blockiert. HLA-DM hilft dabei, das CLIP-Fragment durch ein passendes Peptid zu ersetzen (Lazarski et al., 2006; Yaneva et al., 2010). Zytosolische Peptide können in manchen Fällen durch Autophagie in endosomale Kompartimente gelangen und somit auf HLA Klasse II präsentiert werden (Dengjel et al., 2005) um dann von CD4⁺ Zellen erkannt zu werden.

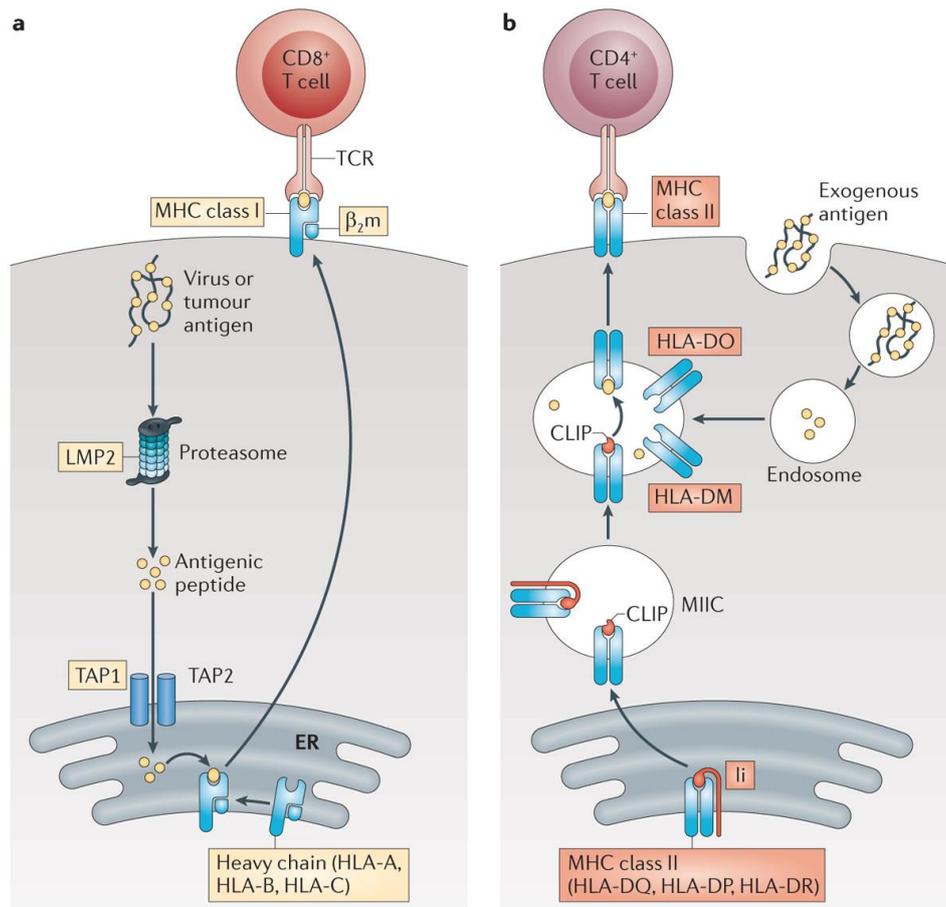


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der Antigenprozessierung von HLA Klasse I- und II-Molekülen

In der linken Abbildung ist die Antigenprozessierung von HLA Klasse I-Peptiden zu sehen. Die HLA Klasse I-Peptide entstehen durch den proteosomalen Abbau von intrazellulären Proteinen, die über den TAP-Transporter in das ER gelangen. Das neu synthetisierte HLA Klasse I-Molekül wird bis zu der stabilisierenden Peptidbindung von Chaperonen unterstützt. Über den Golgi-Apparat gelangt der HLA:Peptid-Komplex an die Zelloberfläche und wird dort von CD8-positiven T-Zellen erkannt. In der rechten Abbildung ist die Antigenprozessierung von HLA Klasse II-Peptiden zu sehen. Das HLA Klasse II-Molekül wird mit der invarianten Kette über den Golgi-Apparat in das endosomale Kompartiment transportiert. Die aufgenommenen Proteine werden durch verschiedene Proteasen zu Peptiden verarbeitet und ersetzen dann das verbliebene CLIP-Fragment. Der HLA:Peptid-Komplex wird an die Plasmamembran transportiert und wird dort den CD4⁺ T-Zellen präsentiert (Kobayashi et al., 2012).

1.2.2 Die T-Zelle

Gemeinsam mit den B-Zellen und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) entspringen T-Zellen einer lymphatischen Vorläuferzelle und werden als Lymphozyten bezeichnet. Mit den antikörperproduzierenden B-Zellen, welche für die humorale Immunabwehr verantwortlich sind, bilden T-Zellen das adaptive Immunsystem. T-Lymphozyten lassen sich anhand ihrer Oberflächenantigene, Funktionen und Eigenschaften sowie ihres T-Zellrezeptors in verschiedene Untergruppen einteilen. Der heterodimere T-Zellrezeptor kann aus unterschiedlichen Ketten zusammengesetzt sein und teilt die T-Zellen somit in zwei Populationen. Die geringere Anzahl an T-Zellen im Organismus exprimiert einen T-Zellrezeptor, der aus einer γ - und einer δ -Kette zusammengesetzt ist. Vor allem der überwiegende Aufenthalt im peripheren Gewebe unterscheidet sie von den anderen T-Zellen

(Hayday et al., 2000). Die Mehrheit der T-Zellen besitzt einen einzigen hochspezifischen T-Zellrezeptor (*T-cell receptor*, TCR), der aus zwei Ketten zusammengesetzt ist, der auf Chromosom 14 kodierten α -Kette (50 kDa) sowie der auf Chromosom 7 kodierten β -Kette (39 kDa) (Garboczi et al., 1996). Jede Kette besteht aus einer konstanten und variablen Region, die mit ihren hochvariablen Domänen aus dem breiten Spektrum an Peptiden genau eines nur dann erkennt, wenn dieses auf einem bestimmten HLA-Molekül präsentiert wird (HLA-Restriktion). Durch Genumlagerung dieser Segmente (somatische Rekombination) sowie ein zufälliges Einfügen oder Entfernen einzelner Nukleotide (junktionale Diversität) kann eine theoretische Diversität von 10^{18} in der variablen Region erreicht werden (Janeway, 2005). Aufgrund dieser Diversität ist der T-Zellrezeptor während der T-Zellentwicklung im Thymus zwei strengen Kontrollen unterworfen, die dafür sorgen, dass nur ca. 2% aller T-Zellen als naive Zellen in das Blut entlassen werden (Shortman et al., 1990). Zum einem muss der Rezeptor das körpereigene HLA-Molekül mit einem gebundenen Peptid erkennen (positive Selektion) (Jameson et al., 1995), ansonsten wird die Zelle in den programmierten Zelltod (Apoptose) geschickt. Das zweite Selektionskriterium basiert auf der Erkennung des TCR von Selbstpeptiden, die durch MHC-Moleküle präsentiert werden, bei der die Bindung den Zelltod induziert (negative Selektion). Dieser Mechanismus ist essentiell um autoreaktive T-Zellen zu eliminieren (Anderson et al., 2005).

1.2.3 Aktivierung naiver T-Zellen und das immunologische Gedächtnis

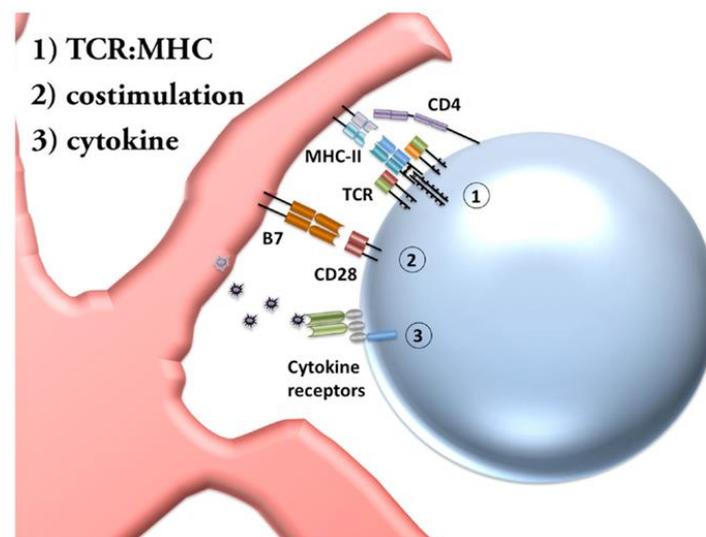


Abbildung 1.7: Schematischer Überblick über die Aktivierung naiver T-Zellen

Der Kontakt zwischen dem TCR und dem Antigen, welches auf einem MHC-Molekül präsentiert wird ist Signal 1. Wenn eine Bindung des CD28-Moleküls mit dem Liganden CD80/CD86 (alte Bezeichnung: B7) zustande kommt (Signal 2) proliferiert die Zelle durch den endokrinen Einfluss von IL-2. Das von den APC produzierte Zytokinmilieu lässt die T-Zelle zu einer aktivierten Effektorzelle heranreifen (Signal 3) (O'Donnell et al., 2014).

Naive T-Zellen zirkulieren und patrouillieren stetig durch das lymphatische System, bis sie meist im Lymphknoten auf ihr Antigen in Form eines HLA:Peptid-Komplexes treffen.

Antigenpräsentierende Zellen präsentieren den Peptid:HLA-Molekül-Komplex und aktivieren die naive T-Zelle spezifisch (siehe Abbildung 1.7). Das erste Signal das für eine Aktivierung benötigt wird, ist der Kontakt zwischen dem spezifischen TCR und dem HLA:Peptid-Komplex (Gutcher et al., 2007). Des Weiteren benötigt die T-Zelle die Interaktion des Rezeptors CD28 mit den kostimulatorischen Molekülen CD80 oder CD86 der APC (Signal 2) (Lenschow et al., 1996). Ein Fehlen dieses kostimulatorischen Signals induziert bei der T-Zelle Anergie oder Apoptose, was einen weiteren Schutzmechanismus vor autoreaktiven T-Zellen neben der negativen Selektion im Thymus darstellt (Guerder et al., 1994). Nach den ersten beiden Signalen expandiert die T-Zelle durch den autokrinen Einfluss des Wachstumsfaktors IL-2 klonal und kann unter der Einwirkung weiterer Zytokine zur Effektorzelle differenzieren (Signal 3) (Mempel et al., 2004; Janeway, 2005). Unterschiedliche Zytokine induzieren die Entwicklung zu unterschiedlichen T-Zellsubtypen (zell-basierte TH₁- oder humoral-basierte TH₂-Immunantwort). Für eine ausreichende Stimulation zu einer CD8⁺ T-Zelle wird das von den APCs sezernierte IL-12 benötigt (Curtsinger et al., 2003) oder CD4-Helferzellen gleichen eine unzureichende Kostimulation der APCs durch Bindung weiterer Liganden aus (Andreasen et al., 2000). Nach Expansion und Differenzierung (ca. 5 Tage) kann die jeweilige Effektorfunktion der T-Zellen nach weiterem Antigenkontakt ohne kostimulatorische Signale ihre Effektorfunktion ausführen (Rogers et al., 2000; Veiga-Fernandes et al., 2000). Nach Ende der Infektion durchlaufen die meisten antigenspezifischen T-Zellen die Apoptose. Einige wenige Zellen (ca. 5% der klonalen Effektorzellen) überleben jedoch und bilden als T-Gedächtniszellen das immunologische Gedächtnis. Sie können im Falle einer erneuten Konfrontation mit dem Antigen ohne zusätzliche Kostimulation direkt ihre Effektorfunktion ausüben.

1.2.4 Kostimulatorische Faktoren und Zytokine

Kostimulatorische Faktoren für eine erfolgreiche und effektive T-Zellproliferation sind zahlreich und vielfältig. Sie können in Form von Zytokinen oder Interleukinen von Zellen wie APCs oder Stromazellen abgegeben werden um die Entwicklung zu einer effektiven CTL zu fördern. Ein Beispiel hierfür ist das Zytokin IL-15, welches stimulatorische Wirkung auf CD8-Gedächtniszellen (Zhang et al., 1998) hat und allgemein anti-apoptotisch auf Zellen wirkt (Bulfone-Paus et al., 1997). Es ist funktionell wie strukturell verwandt mit IL-2 (Tagaya et al., 1996). IL-7 vermittelt auch ein anti-apoptotisches und Proliferation förderndes Signal. Es ist absolut notwendig für die humane T-Zellentwicklung zeigt, das sich in der Abwesenheit durch Ausbildung einer SCID (*severe combined immunodeficiency*, schwerer kombinierter Immundefekt) (Mackall et al., 2011). Im Gegensatz zu IL-2 unterstützt IL-21 nicht die Expansion von regulatorischen T-Zellen, welche eine optimale Antitumor-Effektorfunktion verhindern würden (Zeng et al., 2005).

Eine andere Möglichkeit sind kostimulatorische Moleküle, die durch Rezeptor-Ligand-Interaktion ihre Wirkung entfalten. Die Liste von Liganden ist hierbei lang (Chen et al., 2013). Relevant für diese Arbeit ist OX40, das synergistisch mit dem TCR-CD3 Signalweg wirkt und Zytokinproduktion, Zellzyklusprogression und Überleben unterstützt (Redmond et al., 2009).

1.2.5 Signaltransduktion

Da weder α - noch β -Ketten über eine für die Signalübertragung erforderliche Domäne verfügen ist der TCR mit Corezeptoren assoziiert (siehe Abbildung 1.8). Deren signalgebende intrazelluläre Domänen (*immunoreceptor tyrosine based activation motif*, ITAM) werden nach Kontakt mit dem HLA-Liganden phosphoryliert und können somit durch eine Signalkaskade zur Aktivierung der T-Zelle führen. Weitere signalverstärkende Korezeptoren sind die bereits erwähnten Moleküle CD4 und CD8, die an konservierte Regionen des HLA-Moleküls binden. Der Korezeptor CD4 von Helferzellen bindet an das MHC Klasse II-Molekül, während CD8 die Strukturen des MHC Klasse I-Moleküls erkennt (Janeway, 2005).

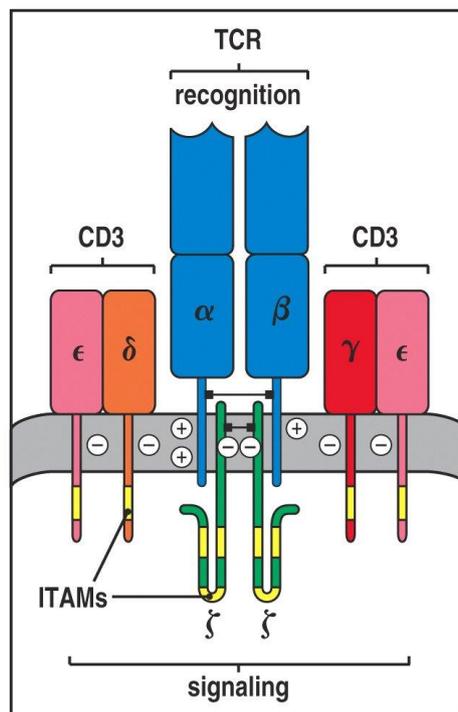


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung des α : β -T-Zellrezeptor-Komplexes

Das α : β -Heterodimer bildet zusammen mit dem CD3-Komplex (bestehend aus zwei ϵ -, einer δ -, und einer γ -Kette) und einem Homodimer aus zwei ζ -Ketten den α : β -T-Zellrezeptor-Komplex. Die Signaltransduktion ins Zellinnere erfolgt durch Phosphorylierung der ITAMs nach Erkennung und Bindung des HLA-Liganden (Janeway, 2005).

1.3 Das HLA-Molekül im Patienten

Das HLA-Molekül ist eine spezifische Verbindung zwischen den körpereigenen Zellen und dem Immunsystem und steuert die T-Zell-Effektorfunktion durch die Präsentation von Proteinstücken. Wie jedes hochspezialisierte System hat auch diese Abhängigkeit zwei Seiten. Zum einen kann man sich in der Immuntherapie diese Individualität für Behandlungsmöglichkeiten zu Nutze machen, gerade in Hinblick auf die personalisierte Medizin (Rammensee and Singh-Jasuja, 2013). Die Kehrseite, dass manche HLA-Allotypen spezielle Peptidsequenzen bevorzugt präsentieren, kann zu HLA-assoziierten Erkrankungen führen, die sich in den meisten Fällen als Autoimmunerkrankungen äußern, in denen das Immunsystem körpereigene Strukturen angreift (Gough et al., 2007).

1.3.1 HLA-assoziierte Krankheiten

Die Spezifität und Vielfältigkeit der HLA-Allele kann in manchen Fällen ein Segen sowie ein Fluch sein. Ein gutes Beispiel hierfür ist HLA-B*27. Es ist nachgewiesen, dass viele rheumatische Erkrankungen, wie Morbus Bechterew, mit dem Subtyp HLA-B*27:05 assoziiert sind. HLA-B*27:09 unterscheidet sich in nur einer einzigen Aminosäure in Position 116 (Histamin statt Aspartat) und hat keinerlei Assoziation mit dieser Erkrankung. Über den Grund warum dieses Allel mit der Krankheit assoziiert ist, gibt es verschiedene Hypothesen. Es wird vermutet, dass eine veränderte Konformation des körpereigenen Peptids in der HLA-B*27:05-Bindungsfurche vorliegt. Eine weitere Beobachtung von T-Zellen, die aus Patienten mit reaktiver Arthritis isoliert wurden, zeigte eine Reaktion auf ein Peptid, welches von *Chlamydia trachomatis* stammt. Natürlich kann das Krankheits-assoziierte Gen in einem genetischen Kopplungsungleichgewicht mit dem Allel HLA-B*27 stehen (Hulsmeyer et al., 2004). Andererseits ist HLA-B*27 in der Bevölkerung weit verbreitet, dass es auch positive selektive Eigenschaften haben muss, wie zum Beispiel den positiven Einfluss bei der Präsentation von bestimmten viralen Antigenen (z.B. Influenza-A-Virus) (Bowness et al., 1994). Als Beispiel für eine HLA-assoziierte Erkrankung der Klasse II-Region gilt Diabetes Typ I (Noble et al., 2011). Das mehrfache Auftreten in Familien und die Assoziation mit anderen Autoimmunkrankheiten gaben einen Hinweis darauf, dass eine erbliche Komponente vorhanden sein muss. Studien haben gezeigt, dass die HLA-Allele DQB1*03:02 und DQB1*02:01 die wichtigsten Prädispositionsfaktoren sind, wohingegen dem Allel DQB1*06:02 ein protektiver Einfluss zugeschrieben wird: Patienten, die dieses HLA-Allel tragen, entwickeln trotz nachweislich positiver Inselzell-Autoantikörper signifikant seltener einen Diabetes Typ I. Das Allel ist wiederum ein Beispiel, wie komplex die individuelle und spezifische Präsentation ist, da 98% aller Narkolepsie-Patienten dieses Allel tragen (Mignot et al., 2001).

1.3.2 Immuntherapie - therapeutische Tumorstoffe

Paul Ehrlich stellte 1909 die Hypothese auf, dass das Immunsystem ständig transformierte maligne Zellen im Körper eliminiert und dass die Tumorzinzidenz in Abwesenheit des Immunsystems um ein sehr vieles höher wäre (Ehrlich, 1909). Diese Immunüberwachung (*immunosurveillance*) durch das angeborene sowie adoptive Immunsystem kann nicht nur die Tumorentwicklung verhindern, sondern auch Tumorstwachstum und Evolution zu einem noch aggressiveren Tumor führen (Dunn et al., 2004). Dieser dynamische Prozess wird in drei Phasen eingeteilt, die sogenannten drei „E“s. Die Elimination beschreibt den Prozess der Immunüberwachung, bei dem transformierte Zellen erkannt und bekämpft werden. Das Equilibrium beschreibt die Situation, dass manche maligne Zellen den Prozess der Elimination überleben und auf Veränderungen selektioniert werden, die das Immunsystem nicht erkennen oder zerstören kann. In der dritten Phase *escape* entziehen sich die gebildeten Varianten erfolgreich der immunologischen Kontrolle und können so klinisch relevante Veränderungen hervorrufen.

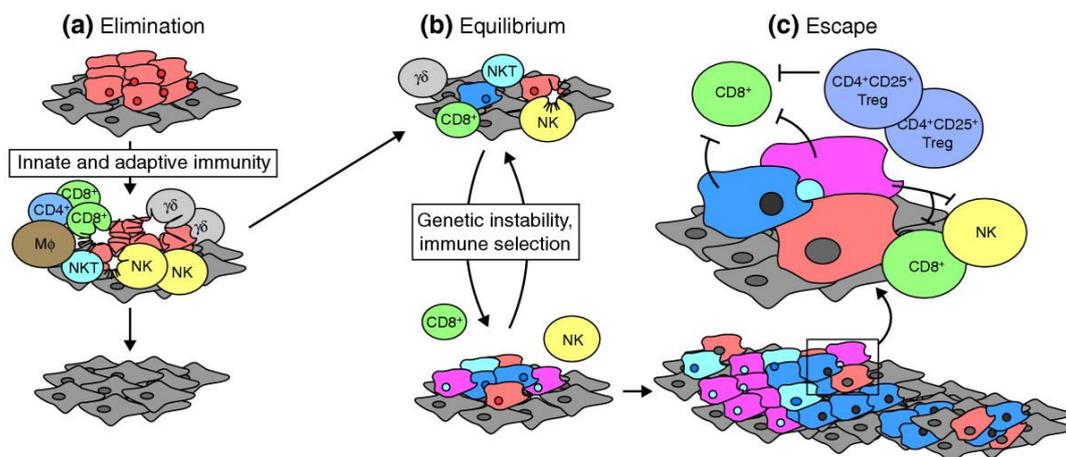


Abbildung 1.9: Die drei „E“s der Überwachung des Immunsystems bei Tumoren

In der ersten Phase (mit (a) *Elimination* gekennzeichnet) werden transformierte Zellen von dem Immunsystem erkannt und bekämpft. In der zweiten Phase (gekennzeichnet mit (b) *Equilibrium*) verändern sich manche maligne Zellen und entgehen so dem Prozess der Elimination. In der dritten Phase (gekennzeichnet mit (c) *Escape*) entziehen sich die gebildeten Varianten erfolgreich der immunologischen Kontrolle (Dunn, Old et al., 2004).

Die Behandlungen von Tumoren sind vielfältig und zahlreich. Die Idee das Immunsystem des Individuums zu verwenden, um die versäumte Erkennung und Bekämpfung des Tumors zu reaktivieren, bietet viele verschiedene Ansätze. Auf beiden Feldern, der aktiven und passiven Immuntherapie, sind in den letzten Jahren enorme Erfolge erzielt worden. Im Folgenden wird auf die Aspekte der aktiven Immuntherapie eingegangen, die sich zunutze macht, dass CD8- und CD4-positive T-Zellen in der Lage sind, tumorassoziierte Antigene (TAA) zu erkennen und somit eine spezifische Immunantwort gegen den Tumor auszulösen (Rosenberg, 2001; Boon et al., 2006). Solche Antigene können durch die veränderte

Expression oder Mutation von zellzyklusassoziierten Genen entstehen (z.B. Tumorsuppressorgene, proto-Onkogene und Transkriptionsregulatoren) (Croce, 2008). Diese Veränderung von zelleigenen Proteinen beeinflusst auch die auf den MHC-Molekülen präsentierten Peptide, welche von CD8⁺ und CD4⁺ Zellen erkannt werden und somit zu einer Unterscheidung von Tumorzellen zu Normalgewebe führen. Eine Möglichkeit sich dieses spezifische System zunutze zu machen ist der adoptive T-Zelltransfer. Hierbei werden Zellen aus dem Patienten isoliert (PBMC oder tumorinfiltrierende Lymphozyten, TILs), auf ihre tumoraktive Effektorfunktion selektiert (Zytokinproduktion in Anwesenheit von TAAs, z.B. IFN- γ), unspezifisch *ex vivo* expandiert mittels Interleukinen oder Antikörpern (IL-2 oder Antikörper gegen CD3) und in den Patienten reinjiziert (Dudley et al., 2003). Eine andere Möglichkeit der aktiven Immunisierung ist die Peptid-basierte Vakzinierung von natürlichen TAA-HLA-Liganden um spezifische T-Zellen zu induzieren. Das Vakzin wird intradermal oder subkutan injiziert und bindet dort an die HLA-Moleküle von in der Haut residierenden DCs. Diese migrieren dann zu den Lymphknoten und können in aktiviertem Zustand die spezifische T-Zelle aktivieren. Dies kann dann CD8⁺- und CD4⁺- T-Zellantworten auslösen und in Kombination mit den richtigen Immunmodulatoren eine starke Antwort (Slingluff et al., 2007; Walter et al., 2012) mit hohen Frequenzen (Speiser et al., 2005) auslösen. Die Limitation dieser Strategie ist tumorassoziierte T-Zellepitope zu finden, die nicht nur immunogen sind, sondern bestenfalls nur auf Tumorzellen präsentiert werden (Van Poppel et al., 2009). Zudem sollte das Peptidvakzin auf natürlich präsentierten HLA-Liganden basieren, da die Vergangenheit gezeigt hat, dass nur vorhergesagte Epitope nicht gut funktionieren (Disis et al., 2002). Wichtig ist außerdem, dass der Peptid-Cocktail aus mehreren Antigenen besteht, damit der Tumor nicht die Möglichkeit hat ein einziges Antigen herunter zu regulieren (Sampson et al., 2010). Ein klarer Vorteil der Vakzinierung mit Peptiden liegt in einer einfachen und schnellen Produktion, die vor allem im Gegensatz zu zellbasierten Ansätzen, in beliebig ausreichenden Mengen verfügbar und lange lagerungsfähig ist. Zudem ist sie unabhängig von der Antigenprozessierung, die in den APCs anders als im Tumor sein könnte und somit das Epitop verändern könnte (Van der Bruggen et al., 2002). Das *immunomonitoring* (Immunüberwachung) kann direkt und spezifisch anhand der einzelnen Peptide in dem Cocktail nachgewiesen werden um eine Reaktion auf das Vakzin zu dokumentieren (Walter et al., 2012). Die Spezifität dieses Ansatzes ist auch gleichzeitig ein großer Nachteil. Durch die HLA-Restriktion der Peptide sind diese nicht global einsetzbar. Ein Peptid das auf HLA-A*02 binden könnte, würde zwar 50% der Bevölkerung in Europa abdecken, aber in Japan wäre das häufigste Klasse I-Molekül mit 60% Abdeckung HLA-A*24 (Ikeda et al., 2015). Diese Limitation kann umgangen werden, indem in einem Cocktail mehrere Peptide Allel-definiert je nach Bevölkerungsgruppe verwendet werden. Ein weiterer großer Nachteil ist, dass die Vakzinierung stark von den Adjuvanzen abhängig ist, da sie

sonst nicht immunogen ist (Aucouturier et al., 2002). Diese müssen die APC optimal aktivieren, so dass die T-Zellen eine Stimulation zur Effektorzelle erlangen und keine Toleranz entwickelt wird.

1.3.3 Stimulation Tumorantigen-spezifischer T-Zellen *in vitro*

Die Überprüfung, ob virus- und tumorassoziierte Antigene geeignet für eine Peptidvakzinierung sind, erfolgt meistens *in vitro*. Es wurde beschrieben, dass die Reaktionen *in vitro* mit den Reaktionen *in vivo* (im Patienten) korrelieren (http://cancerres.aacrjournals.org/content/71/8_Supplement/753.short, Stand: 19.05.15). Für die Induktion und Generierung von spezifischen T-Zellen werden professionelle Antigen-präsentierende Zellen benötigt, wie zum Beispiel autologe dendritische Zellen (Banchereau and Steinman, 1998) oder aktivierte B-Lymphozyten (Schultze et al., 1997). Das Problem hierbei ist, dass die Generierung und Expansion der dendritischen Zellen nicht nur teuer und zeitaufwendig ist, sondern die Menge und Qualität der differenzierten DC stark variiert. Um diese Problematik zu umgehen wurden verschiedene künstliche antigenpräsentierende Systeme entwickelt, um damit die zellbasierten Methoden zu ersetzen (Goldstein et al., 1986). Eines stellt Plastikkugeln dar, die mit kostimulatorischen Antikörpern wie anti-CD28 bedeckt und mit rekombinanten HLA:Peptid-Komplexen (HLA-Monomere) gekoppelt sind (Walter et al., 2003; Oelke et al., 2004). Mit dieser Methode der künstlichen Antigen-präsentierenden Zellen (*artificial antigen presenting cell*, aAPC) hat man ein einfaches wie vergleichbares System, indem ein Austausch oder Zusatz einzelner Komponenten möglich ist ohne die sonst variierenden zellbasierten Limitationen. Alles in Allem ist die Verwendung von aAPC ein schnelles, kostengünstiges und reproduzierbares System für die Induktion von virus- und tumorspezifischen CTLs.

1.4 HLA-Typisierung

Mit dem Wissen über die Rolle der HLA-Allele bei Transplantationen, sei es Blut oder Gewebe, wurde die Identifizierung und deren Methodik von wichtiger Bedeutung und ein Bestandteil der Diagnostik (Carpenter, 1997; Dyer et al., 1997). Im Hinblick auf die personalisierte Medizin, speziell in der Peptid-basierten Immuntherapie, ist eine genaue und zuverlässige Typisierung der HLA-Allele unabdingbar. Die HLA-Typisierung gibt Auskunft, ob das verwendete Peptid auf dem HLA-Allotyp präsentiert und erkannt werden kann (Boon et al., 1995; Linehan et al., 1995) und ist so für den Erfolg der Therapie maßgebend. Die verschiedenen Möglichkeiten der HLA-Typisierung, ob serologisch oder molekularbiologisch, sollten von der Anwendung und erforderlichen Auflösung abhängen. Eine niedrige Auflösung ist definiert auf die zweite Stelle nach der HLA-Bezeichnung (siehe 1.1.1), wogegen

molekulargenetische Methoden eine hohe Auflösung ermöglichen. Die serologische HLA-Typisierung mittels des Mikrolymphozytotoxizitätstest (LCT) (Terasaki et al., 1964), ist eine schnelle und günstige Methode vor allem zur HLA-A- und HLA-B-Typisierung bzw. Vortypisierung für Patienten vor Nieren-Transplantationen und Knochenmarkspenden. Der Nachteil hierbei liegt darin, dass nur eine niedrige Auflösung und teilweise grundsätzliche Einteilung in die HLA-Hauptgruppen erfolgen kann. Typischerweise findet darum die Bestimmung des HLA-Status über eine molekulargenetische Analyse von genomischer DNA statt. Dabei werden die MHC-Genregionen auf Chromosom 6 mittels einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit spezifischen Primer-Sonden amplifiziert und anschließend analysiert (Wade, 1996). Die Methoden hierfür sind zahlreich und können in ihrer Auflösung variieren.

1.5 Proteomik und Ligandomik

Bei der Proteomik besteht die Herausforderung eine große Zahl an Molekülen schnell und effektiv zu identifizieren. Durch die Verwendung eines Massenspektrometers (MS) in Verbindung mit biochemischen Verfahren zur Probenaufarbeitung kann man diesen Ansprüchen gerecht werden (Shevchenko et al., 2006; He et al., 2011). Eine Möglichkeit dabei ist, die zu identifizierenden Proteine mittels eines enzymatischen Abbaus in Fragmente zu zerkleinern und über ein Massenspektrometer zu identifizieren. Idealerweise ergeben die über eine Datenbanksuche identifizierten Peptide bei Zusammensetzung das ursprüngliche Protein und bilden so einen spezifischen Peptidmassen-Fingerabdruck (*peptide mass fingerprint*, PMF) (Pappin et al., 1993; Marcotte, 2007). Mit dieser sogenannten *bottom-up proteomics* („von unten nach oben“-Proteomik) können unbekannte Proteine anhand dieses Peptid-Fingerabdruckes identifiziert werden (siehe Abbildung 1.10). Die Problematik dieser Identifizierung liegt in der Komplexität der Proben besonders nach einem enzymatischen Verdau, da jedes Protein durch einige Peptide präsentiert ist (Aebersold, 2009; Yates et al., 2009). Diese Methode für die Identifizierung von HLA-Allelen zu verwenden, ergibt zusätzliche Schwierigkeiten durch die Kombination aus extrem polymorphen Regionen, in der sich die Allotypen in nur wenigen Aminosäuren unterscheiden lassen, mit der Konservierung einiger Sequenzbereiche, in denen eine Unterscheidung nicht möglich ist (siehe Abbildung 1.5). Somit ist der Nachweis, dass sich ein HLA-Protein in der Lösung befindet leicht zu bewerkstelligen, die genaue Allel-Zuordnung, gerade in den Subtypen, eine enorme Herausforderung.

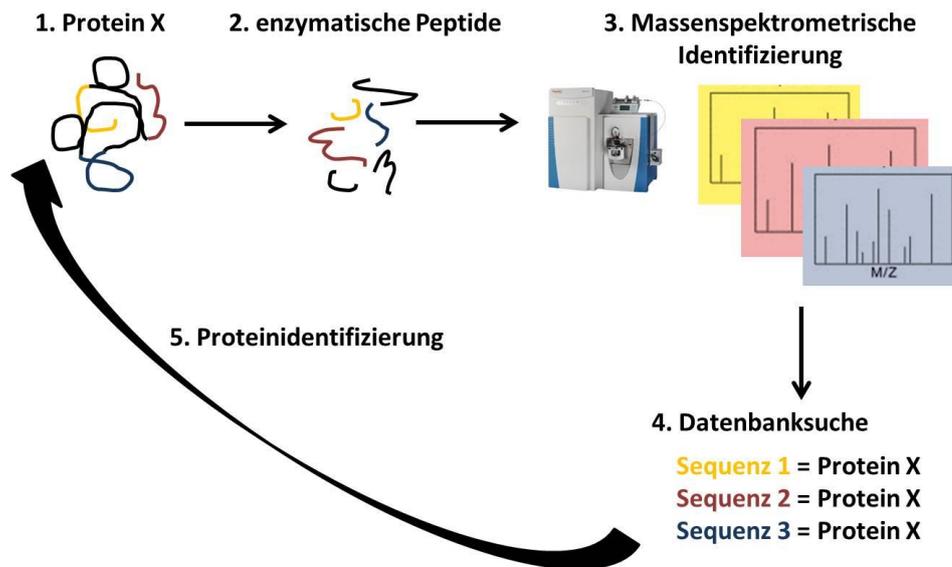


Abbildung 1.10: Schematische Darstellung der Proteinidentifizierung über die *bottom-up* Proteomik

Bei der *bottom-up* Proteomik liegt ein Protein unbekannter Identität, hier unter Nr. 1 als Protein X gekennzeichnet, vor. Im ersten Schritt wird das Protein mittels eines Enzyms in Fragmente bzw. Peptide geschnitten. Diese Peptide können dann mit Hilfe der Flüssigchromatographie aufgetrennt und massenspektrometrisch identifiziert werden. Mithilfe einer Datenbanksuche können nun die Aminosäuresequenzen der Ursprungsquelle, sprich dem unbekanntem Protein X, zugeordnet werden.

Die HLA-Ligandomik beschreibt das HLA-Peptidrepertoire, das heißt alle Peptide die auf HLA-Molekülen präsentiert werden (Klug et al., 2009). Die Untersuchung und Identifizierung dieser Peptide ist von Interesse, wenn sich durch virale oder bakterielle Infektionen sowie maligne Veränderungen eine Unterscheidung zwischen gesunden zu erkrankten Zellen ergibt. Die Bindung der Peptide ist abhängig von der Aminosäuresequenz der Allotypen und somit können die Peptidmotive die HLA-Allele widerspiegeln. Durch verschiedene Vorhersage-Programme wie SYFPEITHI (Rammensee, Bachmann et al., 1999) und NetMHC (Lundegaard et al., 2008) können die Peptidmotive den Allotypen zugeordnet werden. Die Identifizierung natürlicher präsentierter Liganden von HLA-Molekülen auf Zellen kann durch die Isolierung der HLA-Moleküle mit anschließender Elution und Sequenzierung über massenspektrometrische Analyse von statten gehen. Eine weit verbreitete Methode um nicht nur eine qualitative sondern auch eine quantitative Aussage machen zu können ist die quantitative Proteomik oder Peptidomik. In diesem Zusammenhang wäre das die Antwort auf die Frage, wie hoch die Anzahl der HLA-Moleküle ist, von denen die identifizierten HLA-Liganden stammen. Dafür können verschiedenste Techniken, direkte und indirekte, in der Massenspektrometrie verwendet werden (Bantscheff et al., 2012). Eine simple und robuste Methode stellt die metabolische Markierungsstrategie dar, die auf stabiler Isotopen-Markierung von Aminosäuren in einer Zellkultur (*stable isotope labeled amino acids in cell culture*, SILAC) basiert (Gouw et al., 2010). Da die verwendeten Proben dieser Arbeit auf menschlichem Gewebe und Zellen basieren, ist dieser Ansatz nicht umsetzbar. Jedoch kann man auf dieser Idee basierend eine weitere weit verbreitete Methode anwenden. Dabei muss

man den zu vergleichenden Analyten kennen um diesen synthetisch und Isotopen-markiert herzustellen. Dann gibt man diesen als Referenzstandard in einer bekannten Konzentration in die Probe um die Konzentration des natürlichen Analyt zu bestimmen (siehe Abbildung 1.11) (Kirkpatrick et al., 2005). Dafür werden normalerweise hoch aufgereinigte Isotopen-markierte Peptide in einem absoluten Quantifikationsgrad (AQUA™), verwendet.

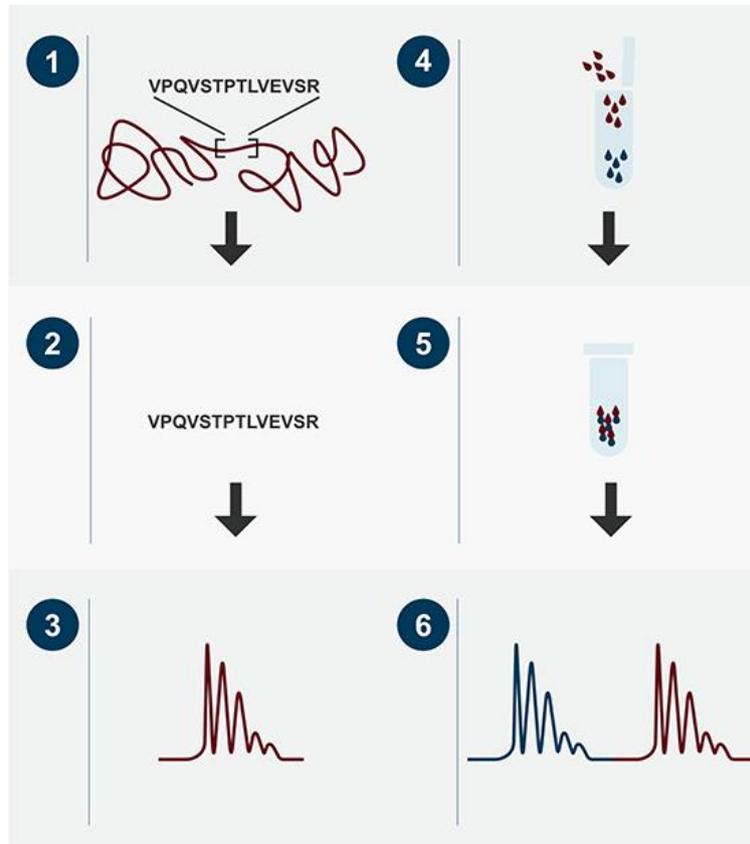


Abbildung 1.11: Überblick über eine direkte Möglichkeit der quantitativen Proteomik

Unter Nr. 1 ist das Peptid als Teil einer Proteinsequenz zu sehen. Durch enzymatischen Verdau wird es in ein Fragment oder Peptid geschnitten. Über die Massenspektrometrie wird es identifiziert und das Spektrum aufgenommen. Die bekannte Sequenz kann synthetisch hergestellt und markiert werden, z.B. mit schweren Isotopen und wird in einer bekannten Konzentration zu der Probe gemischt (Nr. 4). Diese Probe wird dann auch massenspektrometrisch analysiert und kann nun mit dem natürlichen Peptid verglichen werden (<http://www.alphalyse.com/uploads/pics/12.png>, Stand 13.07.2015).

Generell ist der Vergleich auf zwei Ebenen möglich. Bei der ersten werden die Informationen aus der MS1-Ebene gewonnen und man vergleicht die Vorläuferionen-Intensitäten (*precursor ion intensities*) der MS1-Spektren direkt miteinander (Chelius et al., 2002). Eine weitere Möglichkeit ist die des *spectral counting*, also das Zählen der *peptide spectrum matches* (PSMs, Massenspektrenübereinstimmungen der Peptide) (Liu et al., 2004). Hier wird auf der MS2-Ebene nach der Datenbanksuche analysiert, wie die Frequenz der Peptid-Identifikationen ist.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist in zwei Bereiche gegliedert, deren verbindendes Element das HLA-Molekül als Schlüsselfigur ist. Der erste Bereich fokussiert sich darauf neue Peptide für eine Immuntherapie gegen Prostatakrebs zu finden. Hierfür sollten in einem Hochdurchsatzverfahren natürlich präsentierte Liganden auf ihre mögliche Immunogenität in gesunden Spendern getestet werden. Dafür wurde ein künstliches Antigen-präsentierendes System optimiert und eingesetzt, um eine schnelle und vergleichbare Methode zur Testung von Peptiden zu verwenden. Durch Optimierung dieses Systems mittels Zugabe von kostimulatorischen Antikörpern und Zytokinen sollte eine höhere Ausbeute an immunogenen Peptiden erreicht werden.

Der zweite Schwerpunkt zielt darauf eine alternative HLA-Typisierung unabhängig von den klassischen serologischen und molekulargenetischen Methoden zu etablieren. Dafür wurde eine Strategie entwickelt um aus komplexen Protein-Proben HLA-Allotypen mittels massenspektrometrischer Analyse zu ermitteln. Dies beinhaltet die Analyse von enzymatisch verdauten HLA-Molekülen (Proteomik) sowie der präsentierten und identifizierten HLA-Peptidmotive und Eigenpräsentation der Allele (Ligandomik). Die Kombination dieser Informationen sollte zu einer genauen HLA-Typisierung führen. Auf Basis der enzymatischen Verdauung sollte eine Quantifizierung der HLA-Moleküle stattfinden um in Zukunft die Ausbeute der Methode der Liganden-Identifizierung zu bestimmen und gesundes mit malignem Gewebe zu vergleichen. Dafür sollten natürliche enzymatische Peptide isotope markiert hergestellt und für eine Quantifizierung verwendet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Amicon Ultra-15 Zentrifugationseinheit	Millipore, Billerica, USA
Einmalpipetten Falcon, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
FACS-Röhrchen, 5 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Falcon-Röhrchen, 15 ml, 50 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Kryoröhrchen, 2 ml	Greiner Bio One, Frickenhausen
MACS-Säule, MS, LS	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Nano-ESI Emitter PicoTip, 360/20 µm	New Objective, Woburn, USA
PD-10 Entsalzungs-Säule	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Pipettenspitzen, 1000 µl, 200 µl, 20 µl, 2 µl	Starlab, Ahrensburg
Pipettenspitzen mit C18-Matrix, Zip-Tip µ-C18, 10 µl	Millipore, Billerica, USA
Polypropylen-Rundboden-Röhrchen, 5 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Reaktionsgefäße, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße, lichtgeschützt	Biozym, Wien, Österreich
Reservoirs, 50 ml, 100 ml	Corning Incorporated Corning, USA
Spritzen, 1 ml, 50 ml	Corning Incorporated Corning, USA
Sterilfilter, 0,22 µm	Corning Incorporated, Corning, USA
Ultrafiltrationsmembran, 30000 NMWL, 76 mm	Millipore, Billerica, USA
Vakuumfilter Steritop, 250 ml	Millipore, Billerica, USA
Zellkulturflaschen, 75 ml, 550 ml	Greiner Bio One, Frickenhausen
96-well-Platten, 3799	Corning Incorporated, Corning, USA

2.1.2 Geräte

Analysenwaage, 1-200 mg	Sartorius, Göttingen
Autosampler Micro AS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dampfsterilisator 11-6-9 HS1-FD	Sauter, Mühldorf
Durchflusszytometer FACSCanto II	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Einfrierbehälter Nalgene	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Einkanalpipetten, 1 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl	Gilson, Middleton, USA
ELISA-Reader Spectramax 340	Molecular Devices, LLC., Sunnyvale, USA
FPLC-System AEKTA prime	Amersham Biosciences, Glattbrugg, Schweiz
Flachschüttler	IKA-Vibrax-VXR, Staufen
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank -80°C	Sanyo, Moriguchi, Japan
Lichtmikroskop, DM IL	Leica, Wetzlar
MACS-Magnet	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Massenspektrometer, LTQ Orbitrap XL	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Massenspektrometer, Q-ToF Ultima	Waters, Eschborn
Megafuge	Heraeus, Waltham, USA
Mehrkanalpipette, 200 µl	Abimed, Langenfeld
NanoDrop 1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nano uHPLC (Ultimate 3000 RSLCNano)	Dionex, Sunnyvale, USA
Neubauer-Zählkammer, Tiefe 0,1 mm	LO-Laboroptik, Bad Homburg
Peptide Synthesizer ABI 433A	Applied Biosystems, Foster City, USA
Peptide Synthesizer EPS 221	Abimed, Langenfeld
pH-Meter (765)	Knick, Berlin
Pipettierhilfe, Pipet Boy	Integra Biosciences, Zizers, Schweiz
Rührzelle Amicon, 400 ml	Millipore, Billerica, USA

Sterilbank, Technoflow	Integra Biosciences, Zizers, Schweiz
Thermoblock	Eppendorf, Hamburg
Tischkühlzentrifuge	Heraeus, Waltham, USA
Vakuumpumpe	Vacuubrand GmbH+Co, Wertheim
Vortexer (MS 1)	IKA-Works, Inc., Wilmington, USA
Wasserbad (Thermomix BM-S)	Braun Biotech, Melsungen
μ Kapillar-LC-System Ultimate	Dionex, Sunnyvale, USA
37°C Inkubator für Gewebekulturen (Labotect 3250) mit 7,5% CO ₂ -Begasung (Messer)	Labotec, Rosdorf

2.1.3 Software

ChemSketch 14.0	ACD/Labs, Toronto, Kanada
Dia 0.97.2	The Dia Developers, Uelzen
FACSDiva v. 6.1.3	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
FlowJo Version 10	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
GraphPad Prism	STATCON, Witzenhausen
MASCOT Server 2.2.04	Matrix Science, Boston, USA
Microsoft Office 2010	Microsoft Corp., Redmond, USA
Thermo Proteome Discoverer 1.4	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Unicorn 4.0	GE Healthcare, Freiburg

2.1.4 Chemikalien und Kits

Acetonitril, LC/MS Grade	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ameisensäure	Merck, Darmstadt
Ammoniumhydrogencarbonat	Fluka Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Bradford reagent, Roti Nanoquant	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
D-Biotin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DNase	Roche, Basel, Schweiz
Ethanol, vergällt	SAV Liquid Production, Flintsbach a. Inn
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FACS-Clean, FACS-Rinse, FACS-Flow	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Ficoll (Biocoll)	Millipore, Billerica, USA
<i>Flow cytometry compensation beads</i>	Invitrogen, Carlsbad, USA
Formaldehyd	Fluka Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Gentamycin	BioWhittaker, Basel, Schweiz
Glutathion, reduziert, oxidiert	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
HEPES	Roth, Karlsruhe
Humanserum, Serum verschiedener Vollblutspenden	Aus Blutspenden laborintern hergestellt
IMDM (Icove`s Modified Dulbeccos`s Medium)	Lonza, Köln
Iodacetamid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ionomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Isopropanol (2-Propanol)	Merck, Darmstadt
L-Arginin	Fluka Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Leupeptin	Roche, Basel, Schweiz
LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA

Lymphozyten-Separationsmedium (Ficoll)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
MACS "CD8 MicroBeads", human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mausserum	eBioscience, San Diego, USA
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumazid (NaN ₃)	Merck, Darmstadt
PBS, ohne Ca ²⁺ Mg ²⁺	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin (PenStrep, 100x)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Pepstatin	Roche, Basel, Schweiz
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Claudia Falkenburger, Tübingen
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
<i>Streptavidin coated microspheres</i> , 5,6 µm	Bangs Laboratories, Fishers, USA
Streptavidin-PE	Invitrogen, Carlsbad, USA
Sulfo-NHS-LC-Biotin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Trifluoressigsäure (TFA)	Applied Biosystems, Foster City, USA
Trypanblau	Merck, Darmstadt
Wasser, Ultra LC/MS J.T. Baker	Th. Greyer GmbH, Renningen
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe

2.1.5 Puffer und Medien

Auftaumedium

1% PenStrep
3 µg/ml DNase I
in IMDM

Chymotrypsin-Puffer

100 mM Tris-HCl
10 mM CaCl₂
pH 7,8
in ddH₂O

<u>Einfrriermedium</u>	10% DMSO in FCS
<u>FACS-Fix</u>	1% Formaldehyd in FACS Puffer
<u>FACS-Puffer</u>	2% FCS 2 mM EDTA 0,01% NaN ₃ in PBS
<u>Harnstoff-Puffer</u>	8 M Harnstoff 10 mM Tris 10 mM NaH ₃ PO ₄ 0,1 mM EDTA 0,1 mM DTT in ddH ₂ O
<u>Injektions-Puffer</u>	3 M Guanidin HCl 10 mM EDTA 10 mM Natriumacetat pH 4,2 (mit HCl) in ddH ₂ O
<u>Lösungsmittel A*</u>	0,1% Trifluoressigsäure in H ₂ O (MS-Reinheit)
<u>Lösungsmittel A_{Load}</u>	1% Acetonitril in H ₂ O (MS-Reinheit)
<u>Lösungsmittel B*</u>	80% Acetonitril 0,1 % Trifluoressigsäure in H ₂ O (MS-Reinheit)
<u>MACS-Puffer</u>	0,5% BSA 5 mM EDTA in PBS

<u>Trypsin-Puffer</u>	25 mM NH_4HCO_3 pH 8,1 in ddH_2O
<u>PBS-E</u>	2 mM EDTA in PBS
<u>Rückfaltung-Puffer</u>	17,42 g L-Arginin 5,95 g HEPES 2 mM EDTA pH 7,76 (mit HCl) in 250 ml ddH_2O
<u>Tetramer-Färbungspuffer (TSB)</u>	50% FCS 2 mM EDTA 0,01% NaN_3 in PBS
<u>Tetramer-Einfrierpuffer</u>	48% Glycerol 1.5% HSA 1x Proteaseinhibitor in 20 mM Tris
<u>Triton-Waschpuffer</u>	0.1% NaN_3 1 mM EDTA 1 mM DTT 0.5% Triton X 100 100 mM NaCl 50 mM Tris in ddH_2O
<u>Trypanblau</u>	0,05% Trypanblau 0,02% NaN_3 in ddH_2O
<u>T-Zellmedium</u>	10% Humanserum (spenderabhängig)

1% PenStrep
 50 μ M β -Mercaptoethanol
 in IMDM

2.1.6 Zytokine und Enzyme

BirA-Ligase	laborintern hergestellt durch Heiko Schuster
Chymotrypsin, <i>sequence grade</i>	Roche, Basel, Schweiz
Interleukin 2 (hIL-2)	R&D, Minneapolis, USA
Interleukin 7 (hIL-7)	PromoKine, Heidelberg
Interleukin 12 (hIL-12)	PromoKine, Heidelberg
Interleukin 21 (hIL-21)	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Trypsin, <i>sequence grade</i>	Promega, Mannheim

2.1.7 Peptide

Alle verwendeten Peptide wurden im institutseigenen Peptidsyntheselabor produziert. Patricia Hrstic, Nicole Zuschke, Katharina Graf und Monika Stieglbauer synthetisierten mittels Standard Fmoc-Chemie unter Verwendung des „Abimed Economy Peptide Synthesizer EPS 221“ sowie des „Peptide Synthesizer ABI 433A“ sämtliche aufgeführten Peptide (siehe Tabelle 2.1.1). Die Proteinquelle und Position der Sequenz basiert auf der Uniprot-Datenbank (<http://www.uniprot.org>, Stand 16.05.15). Manche Peptid-Sequenzen besitzen ein Homolog in einer nicht-humanen Spezies. Diese wurden gekennzeichnet. Da in der Arbeit aber nur mit rein humanem Material gearbeitet wurde, ist der Ursprung der Sequenz sicher gestellt.

2.1.7.1 T-Zellstimulationen

In folgenden Tabellen sind die für die T-Zellstimulation verwendet Peptide aufgelistet, wurden. Die Bestimmung der HLA-Restriktion erfolgte anhand einer Epitop-Vorhersage in NetMHC (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>) und SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de>) und wurde von den jeweiligen Projektbetreuern vorgenommen. Die Definition der HLA-Restriktion in den Tabellen beschreibt auf welchen HLA-Allotyp das Peptid rückgefaltet worden ist.

Tabelle 2.1 zeigt die Kontrollpeptide. Für positive Kontrollen wurden entweder virale oder aus dem MART-Protein stammende Peptide gewählt. Falls eine Negativ-Kontrolle gewählt wurde, war diese ein abundant präsentiertes Peptid aus dem humanen Protein DDX5/DDX17 oder HIV-Peptide.

Tabelle 2.1: Kontroll-Peptide

Herkunft (Position)	Sequenz	HLA-Restriktion
Adeno Hexon protein (884-893)	LTDLGQNLLY ³	A*01:01
HCMV pp65 (363-373)	YSEHPTFTSQY	A*01:01
Influenza NP (44-52)	CTELKLSDY	A*01:01
HIV-1 gag p17 (70-78)	GSEELRSLY	A*01:01
HCMV pp65 (495-503)	NLVPMVATV	A*02:01
HBV Capsid protein cAg (18-27)	FLPSDFFPSV	A*02:01
DDX5/17 (148-156 und 146-158)	YLLPAIVHI ¹	A*02:01
MART-1 (26-35)	ELAGIGILTV	A*02:01
ACSA_MYCTU (642-651)	TVFDAIRAAK ²	A*03:01
EBV EBNA-4 (399-408)	AVFDRKSDAK	A*11:01
HCMV pp65 (491-499)	ATVQGQNLK	A*11:01
CMV pp150 (794-802)	VTSTPVQGR	A*68:01
Influenza NP (91-99)	KTGGPIYRR	A*68:01
HCMV pp65 (407-416)	TPRVTGGGAM	B*07:02
Cellular tumor antigen p53 (249-257)	RPILTIITL	B*07:02
HIV-1 nef (128-137)	TPGPGVRYPL	B*07:02
EBV EBNA3 (379-387)	RPPIFIRRL	B*07:02
HCMV pp65 (215-223)	KMQVIGDQY	B*15:01

1: Homolog in den Spezies *Mus musculus*, *Pongo abelii*, *Pan troglodytes* und *Macaca fascicularis*; 2: Homolog in *Mycobacterium bovis*; 3: Homolog in 4 weiteren Spezies.

Tabelle 2.2 zeigt die Peptide für eine T-Zellstimulation im Rahmen des MultiPro-Projekts. Diese Peptide wurden bereits in der Promotionsarbeit von Christian Hotz vorgestellt (Hotz, 2014). Alle Peptide wurden auf Prostata-spezifischen Geweben gefunden (benigne Prostata, Prostatahyperplasien und Tumoren).

Tabelle 2.2: Peptide aus dem MultiPro-Projekt

Herkunft (Position)	Sequenz	HLA-Restriktion
MYH11 (134-142)	YSEKIVDMY ⁵	A*01:01
RAM (19-29)	FTENDKEYQEY ⁸	A*01:01
MYLK (718-726)	GTQPWFISK ¹	A*11:01
IGF1 (5-13)	SSLPTQLFK ²	A*11:01
MYH11 (352-362)	SVLQLGNIVFK ⁴	A*11:01
HDAC1/2 (86- 94/87-95)	EYSKQMQR ³	A*24:02
FOLH1 (606-614)	KYADKIYSI	A*24:02
KLK2 (128-137)	EPAKITDVVK	A*68:01
MYH11 (1933-1941)	ETSFVPSRR	A*68:01
KLK4 (105-113)	HPEYNRPLL	B*07:02
EP300 (15-23)	RPKLSSPAL ⁹	B*07:02
HDGF (231-240)	APGIRDHESL	B*07:02
KLK2 (87-96)	GQRVPVSHSF	B*15:01
KLK2 (35-43)	SQPWQVAVY ⁷	B*15:01
MCL1 (67-75)	VQRNHETAF ⁶	B*15:01
NKX3.1 (91-99)	AETEPERHL	B*40:02

1: Homolog in *Mus musculus*; 2: Homolog in 12 weiteren Spezies; 3: Homolog in 6 weiteren Spezies; 4: Homolog in 4 weiteren Spezies, 5: Homolog in 2 weiteren Spezies; 6: Homolog in 4 weiteren Spezies; 7: Homolog in 3 weiteren Spezies; 8: Homolog in *Pongo abelii*; 9: Homolog in *Mus musculus*

Tabelle 2.3 zeigt die Peptide für eine T-Zellstimulation aus dem RCC-Projekt. Diese Peptide wurden von Armin Rabsteyn und Daniel Kowalewski auf Nierenzellkarzinomen gefunden.

Tabelle 2.3: Peptide aus dem RCC-Projekt

Herkunft (Position)	Sequenz	HLA-Restriktion
AHNK2 3395-3403	SLDVSAPKV	A*02:01
ATX10 (443-453)	GLADASLLKKV ²	A*02:01
DEGS1 (83-91)	SMTLAIHEI ³	A*02:01
RGS5 (102-112)	KIKSPAKMAEK	A*03:01
SLN11/13 (489-497)	RTAFTLKQK	A*03:01
EHD2 (394-402)	MPLLRQEEL ⁴	B*07:02
RAD (99-107)	APGVGKSAL ⁵	B*07:02
P4HA1 (347-355)	AEIEIVKDL ¹	B*44:03

1: Homolog in 3 weiteren Spezies; 2: Homolog in 2 weiteren Spezies, 3: Homolog in 5 weiteren Spezies; 4: Homolog in 2 weiteren Spezies; 5: Homolog in 2 weiteren Spezies

Tabelle 2.4 zeigt die Peptide für eine T-Zellstimulation aus dem OvCa-Projekt. Diese Peptide wurden von Janet Peper (Peper, 2015) und Heiko Schuster (Schuster, 2015) auf Ovarialkarzinomen gefunden.

Tabelle 2.4: Peptide aus dem OvCa-Projekt

Herkunft (Position)	Sequenz	HLA-Restriktion
MUC16 (11192-11200)	KMISAIPTL	A*02:01
MUC16 (21261-21269)	GTSGTPVSK	A*11:01
KI67 (606-615)	SSKSQTEVPK	A*11:01
I2301 (297-306)	RYMPPAHRNF	A*24:02
HDAC1 (373-381)	LPHAPGVQM ¹	B*07:02
I2301 (222-230)	NPKAFFSVL	B*07:02
MUC16 (21606-21614)	SPLFQRSSL	B*07:02
MUC16 (3301-3309)	TPGGTRQSL	B*07:02
MUC16 (4900-4908)	RETSISQEI	B*18:01
MUC16 (9509-9517)	TETEAHVVF	B*18:01

1: Homolog in 6 weiteren Spezies

2.1.7.2 Isotopenmarkierte Peptide

Für die Quantifizierung von tryptischen HLA-Fragmenten wurden synthetische Peptide mit einer Isotopenaminosäure hergestellt. Dieses synthetische Peptid kann dann in der Analyse in einer bekannten Menge beigemischt und mit dem natürlichen Peptid verglichen werden. Für die Peptide wurden die isotopenmarkierten schweren Aminosäuren Valin (V+ 6 Da), Alanin (A+ 4 Da) und Leucin (L+ 6 Da) verwendet.

Tabelle 2.5: Isotopenmarkierte synthetisch hergestellte Peptide

HLA-Allotyp (Position)	Sequenz	Masse	Isotop
B*08 (31-38)	YFDTAMSR	993,42770	A
19 HLA-A ¹ (60-68)	FSDAASQR ²	999,43088	A
B*07 (136-145)	GHDQYAYDGK	1156,48360	A
A*02/A*69 (122-132)	MYGCDVGSDWR	1293,50130	V
A*11 (171-181)	WEAAHAAEQQR	1299,60080	A
A*24 (171-181)	WEAAHVAEQQR	1327,63205	A
A*01/A*36 (170-180)	KWEAVHAAEQR	1327,66844	A
A*03 (171-181)	WEAAHEAEQLR	1344,63172	L
A*02/A*68/A*69 (156-168)	SWTAADMAAQTTK	1384,63440	A
A*68 (171-181)	WEAAHVAEQWR	1385,65279	A
B*18 (46-59)	FISVGYVDGTQFVR	1592,80936	V
A*30 (31-45)	YFSTSVSRPGSGEPR	1631,77985	V
21 A/35 B/14 C (244-258)	DGEDQTQDTELVETR	1740,75449	V
B*44 (211-226)	THVTHHPISDHEVTLR	1883,94970	V
A*02 (73-90)	APWIEQEGPEYWDGETRK	2194,00190	A

1: Außer HLA-A*01 und A*36; 2: Homologe in 3 anderen Spezies

2.1.8 HLA-Monomere

Alle Peptide in den Tabellen in Kapitel 2.1.7.1 wurden auf ein im Labor hergestelltes HLA-Molekül gebunden (siehe 2.2.2.2). Die verwendeten HLA-Monomere wurden außerdem von Stefanie Souczek, Maren Lübke, Janet Peper, Heiko Schuster und Armin Rabsteyn produziert.

2.1.9 HLA-Tetramere

Alle HLA-Monomere in Kapitel 2.1.7.1 wurden an Fluorochrom-gekoppeltes Streptavidin gebunden (2.2.3.2 Tetramerisierung von HLA-Monomeren). In allen Experimenten wurde das Fluorochrom R-PE (R-Phycoerythrin) gewählt.

2.1.10 Antikörper

Tabelle 2.6 zeigt eine Auflistung über die bei der Durchflusszytometrie verwendeten Antikörper zur Oberflächen- sowie Intrazellulär-Färbung von Zellen.

Tabelle 2.6: Antikörper für die Oberflächen- sowie Intrazellulär-Färbung

Antigen	Fluoreszenz-Farbstoff	Hersteller	Klon	Spezies	Einsatz
CD8	PerCp	Becton Dickinson, USA	RPA-T8	Maus	1:85
Maus IgG	FITC	Sigma-Aldrich, USA	polyklonal	Ziege	1:100
Ox40	/	Martin Hoffmann, Tübingen	20	Maus	10 µg/ml
CD28	/	Claudia Falkenburger, Tübingen	9.3	Maus	10 µg/ml
CD107a	FITC	Becton Dickinson, USA	H4A3	Maus	1,5 µl/well
IFN γ	PE	Becton Dickinson, USA	B27	Maus	1:400
TNF α	Pacific Blue	Biolegend, USA	Mab11	Maus	1:200
PMSA	/	Fabian Vogt, Tübingen	J591	Maus	10 µg/ml

In Tabelle 2.7 sind die bei der HLA-Aufreinigung eingesetzten Antikörper gezeigt.

Tabelle 2.7: Antikörper für die HLA-Aufreinigung

Antigen	Hersteller	Klon	Spezies
HLA-A, HLA-B, HLA-C	Claudia Falkenburger, Tübingen	W6/32	Maus
HLA-A*02	Claudia Falkenburger, Tübingen	BB7.2	Maus
HLA-B, HLA-C	Claudia Falkenburger, Tübingen	B1.23.2	Maus

Bei der Synthese der künstlichen Antigen-präsentierenden Zellen wurde anti-CD28 (Jung et al., 1987) sowie ein weiterer kostimulierender Antikörper gegen OX40 verwendet (siehe Tabelle 2.8).

Tabelle 2.8: Bei der aAPC-Synthese eingesetzte Antikörper

Antigen	Hersteller	Klon	Spezies
CD28	Claudia Falkenburger, Tübingen	9.3	Maus
OX40	Martin Hoffmann, Tübingen	20	Maus

2.1.11 Zellen aus Vollblutspendern

Tabelle 2.9 zeigt die bei den verschiedenen Experimenten verwendeten Spenderzellen mit der zugehörigen HLA-Typisierung sowie dem HCMV-Status. Die Vollblutspende wurde behandelt wie in Kapitel 2.2.1.1 beschrieben.

Tabelle 2.9: Vollblut-Spender

Spendernummer	HLA-Typisierung	HCMV-Status ¹	Projektverwendung (Kapitelnummer)
J64	A*01, A*02 B*07, B*08	CP	3.1.2
J65	A*01, A*02 B*07, B*08	CP	3.1.2
J67	A*02, A*24 B*07, B*35	CP	3.1.2
J72	A*02, / B*07, B*44	CP	3.1.2
J81	A*02, A*11 B*07, B*35	CN	3.1.2, 3.1.3.1
J82	A*02, A*24 B*07, B*35	CP	3.1.2
J84	A*02, A*11 B*44, B*51	CN	3.1.2
J93	A*02, A*11 B*07, B*08	CP	3.1.2, 3.1.3.2
J94	A*02, A*11 B*35, /	CP	3.1.2
J107	A*02, A*11 B*57, B*62 ⁴	CP	3.1.2
J113	A*02, A*11 B*07	CP	3.1.2
J114	A*02, A*11 B*39	CN	3.1.2, 3.1.3.1
J119	A*02, A*11 B*07, B*49	CN	3.1.2
J124	A*02, A*11 / ⁶	CN	3.1.2
J159	A*01, A*03 B*07, B*08	CP	3.1.2, 3.1.3.1
J173	A*02, A*24 B*07, /	CP	3.1.3.1
J184	A*24, A*28 ⁴ B*60 ² , B*61 ³	CN	3.1.2, 3.1.3.1
J186	A*02, A*03 B*18, B*35	CP	3.1.3.1
J191	A*02, A*26 B*18, B*38	CP	3.1.3.1
J194	A*02, A*24 B*07, B*39	CP	3.1.3.1
J197	A*01, A*26 B*07, B*57	CN	3.1.3.1
J199	A*01, A*02 B*07, B*62	CP	3.1.3.1
J200	A*02, / B*39, B*60 ²	CP	3.1.3.1
J206	A*02, A*24 B*07, B*62 ⁴	CN	3.1.3.1, 3.1.3.2
J209	A*02, A*23 B*18, B*35	CP	3.1.3.1, 3.1.3.2
J212	A*02, / B*44, /	CP	3.1.3.2
J216	A*01, A*02 B*38, B*60 ²	CN	3.1.3.2
J220	A*03, / B*44, B*49	CN	3.1.3.2
J222	A*02, A*29 B*44, B*60 ²	CP	3.1.3.2

1: CP = HCMV-positiv, CN= HCMV-negativ; 2: B*60 = Serotyp-Splitantigen (erkennt einige B*40 Serotypen; B*40:01 mit 93% als Hauptantigen, dann absteigend B*40:03, B*40:04, B*40:02 und B*40:06); 3: B*61 = Serotyp-Splitantigen (erkennt einige B*40 Serotypen, B*40:02 mit ca. 80% dann absteigend B*40:06, B*40:03 B*40:04); 4: B*62 = Serotyp-Splitantigen (einige B*15-Allele als Hauptantigen, am besten B*15:01, B*15:04, B*15:07 und B*15:25; 5: A*28 = „Broad“-Antigen erkennt Serotypen A*68 und A*69; 6: keine Informationen

2.1.12 Gewebe- und Zellproben der HLA-Aufreinigung

Insgesamt wurden 940 biologische Proben (Stand: 19.05.15), welche HLA-Moleküle enthalten, verschiedenen Ursprungs gesammelt. Die Vielfalt reichte von laborbekannten Zelllinien über Gewebeproben von Patienten. Für sämtliche Projekte, die sich mit der Analyse menschlicher Proben aus Primärgewebe oder -zellen befassten, liegen Voten der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät vor. Die HLA-Aufreinigung der Gewebe- und

Zellproben wurde projektbezogen von den verantwortlichen Personen durchgeführt. Die im Ergebnisteil ausführlich behandelten Kolorektal-Karzinomproben stammen aus einer Kooperation mit Daniel Kowalewski und sind in folgender Tabelle mit zugehöriger HLA-Typisierung aufgelistet.

Tabelle 2.10: Kolorektal-Karzinomproben

Probe (N/T) ¹	HLA-Typisierung			Gewicht (g)
KC58 (T)	A*02:01;A*23:01	B*07:02; /	C*04:01;C*07:02	1,79
KC58 (N)	A*02:01;A*23:01	B*07:02; /	C*04:01;C*07:02	1,78
KC92 (T)	A*01:01;A*24:02	B*08:01;B*35:01	C*04:01;C*07:01	0,97
KC92 (N)	A*01:01;A*24:02	B*08:01;B*35:01	C*04:01;C*07:01	0,51
KC93 (T)	A*02:01;A*03:01	B*07:02;B*39:01	C*07:02;C*12:03	1,19
KC93 (N)	A*02:01;A*03:01	B*07:02;B*39:01	C*07:02;C*12:03	0,86

1= T steht für Tumor und N steht für das benigne Vergleichsgewebe

Eine oft analysierte Zelllinie ist die Modellzelllinie JY, eine im HLA Klasse I-Genlokus homozygote lymphoblastoide B-Zelllinie aus einem männlichen Amish (http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/ipd/imgt/hla/fetch_cell.cgi?10882, Stand 14.07.2015).

Tabelle 2.11: JY-Pellets

Probe	HLA-Typisierung			Pellet (ml)
JY1	A*02:01; /	B*07:02; /	C*07:02; /	5
JY2	A*02:01; /	B*07:02; /	C*07:02; /	5

2.2 Methoden

2.2.1 Methoden zur Zellgewinnung

Die Grundlage der meisten zellbasierten *ex vivo*-Experimente, die auf einer immunologischen Fragestellung beruhen, sind anhand der praktischen Verfügbarkeit mononukleare Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs). Durch einfache Zentrifugation von heparinisiertem Vollblut gewinnt man eine an Leukozyten reiche Schicht, genannt *Buffy coat*, die sich zwischen den schwereren Erythrozyten und dem Plasma bildet. Anhand einer Dichtegradientenzentrifugation werden die PBMCs von weiteren Blutbestandteilen wie Erythrozyten, Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten abgetrennt (Ulmer et al., 1984).

Für die zellbasierten Experimente dieser Doktorarbeit wurden PBMCs gesunder Spender aufbereitet. Hierfür benötigte Vollblutspenden oder *Buffy coats* wurden freundlicherweise von

dem Zentrum für klinische Transfusionsmedizin GmbH, HLA-Labor Universitätsklinikum Tübingen, bereitgestellt.

Alle Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Die dafür verwendeten Puffer und Lösungen, ausgenommen Einfriermedium, lagen bei RT vor.

2.2.1.1 Isolierung von PBMCs aus einer Vollblutspende

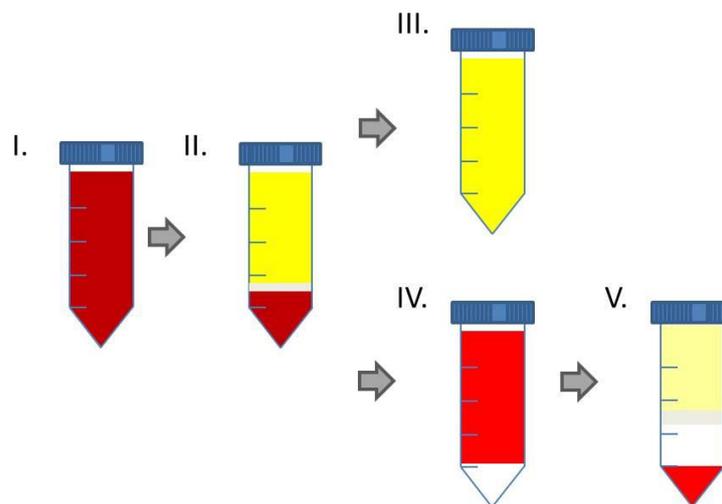


Abbildung 2.1: Arbeitsschritte einer PBMC-Isolierung aus Vollblut

Das in ein Falcon-Röhrchen überführte, hier dunkelrot dargestellte Vollblut (siehe I.), trennt sich nach Zentrifugation in drei erkennbare Phasen. Plasma wird in dieser Abbildung gelb dargestellt (Falcon II. obere Schicht und sowie Falcon III.), Separationsmedium weiß (Falcon IV. unterste Schicht, Falcon V. zweite Schicht von unten), durch Zentrifugation gebildete PBMC-Ringe in grau (Falcon II. und V.) sowie mit PBS verdünntes Blut in hellrot (Falcon IV. obere Schicht).

Als erstes wurden 500 ml Vollblut auf 50 ml-Falcon-Röhrchen verteilt (siehe Abbildung 2.1, I.) und ohne Bremse bei 2000 rpm, 25 min zentrifugiert. Die gebildete Plasmaschicht wurde in neue Röhrchen überführt (siehe Abbildung 2.1, III.), für 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert und für den späteren Gebrauch nach zweimaliger Zentrifugation (1500 rpm, 15 min) als Medienzusatz bei -20°C weggefroren. Der *Buffy Coat* wurde im Verhältnis 1:2 mit PBS verdünnt und je 30 ml auf 15 ml eines Lymphozyten-Separationsmediums (Ficoll) geschichtet (siehe Abbildung 2.1, IV.). Durch anschließende Zentrifugation (2000 rpm, 25 min) bei ausgeschalteter Bremse pelletieren Erythrozyten sowie Granulozyten, während PBMCs eine Interphase zwischen Plasma-PBS-Gemisch und der Ficollschicht bilden (siehe Abbildung 2.1, V.). Diese Interphase wurde durch drei Waschschrte mit PBS sowie schrittweises Herabsetzen der Zentrifugationsgeschwindigkeit (1500 rpm zu 1100 rpm) angereichert. Nach anschließender Zellzahlbestimmung (siehe 2.2.1.2) konnten die Zellen direkt in Kultur gegeben oder für den späteren Gebrauch mit Einfriermedium bei -80°C eingefroren werden. Für weitere Verwendung der Zellen in einer T-Zellstimulation wurden diese in 50 ml warmes T-Zellmedium mit 2,5 ng/ml IL-7 und 10 U/ml IL-2 in eine 550 ml-Zellkulturflasche überführt und über Nacht in einem 37°C warmen Brutschrank inkubiert.

In Kapitel 2.1.11 sind die bei den Experimenten untersuchten Spenderzellen mit der zugehörigen HLA-Typisierung sowie HCMV-Status aufgelistet.

2.2.1.2 Isolierung von PBMCs aus einem *Buffy Coat*

Die Isolierung von PBMCs aus einem *Buffy Coat* beginnt einen Schritt später als die Isolierung aus einer Vollblutspende (siehe 2.2.1.1). Dafür wurde in eine 75 ml-Zellkulturflasche der *Buffy Coat* vorgelegt und ca. bis zur 100 ml-Markierung mit PBS zur Verdünnung aufgefüllt. Danach wurden auf das vorgelegte Ficoll (15 ml) ca. 25 ml des Gemisches geschichtet (siehe Abbildung 2.1, IV). Die weitere Behandlung der Probe entsprach der Isolierung von PBMCs aus einer Vollblutspende (siehe 2.2.1.1).

2.2.1.3 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte mittels einer Neubauer-Zählkammer (siehe Abbildung 2.2). Dafür wurden die Proben mit einer Trypanblau-Lösung verdünnt und gefärbt. Trypanblau dringt durch defekte Zellmembranen in die Zelle ein und kann dort Proteine anfärben, so dass tote Zellen blau erscheinen (Mosiman et al., 1997). Gezählt wurden nur die lebenden Zellen in 2 Großquadraten. Die mittlere Zellzahl der Großquadrate muss mit dem Verdünnungsfaktor sowie dem Volumen des Großquadrates (1 mm Seitenlänge und 0,1 mm Tiefe entspricht 10^{-4} ml) multipliziert werden (siehe linke Abbildung 2.2)

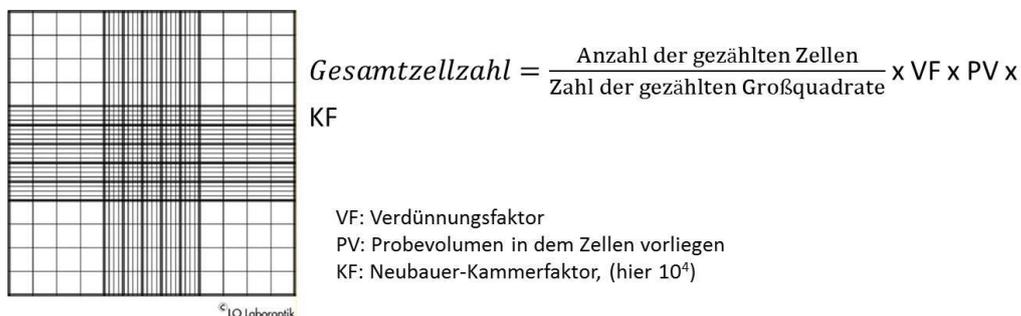


Abbildung 2.2: Darstellung eines Zählfeldes einer Neubauer-Zählkammer mit Formel für die Berechnung der Gesamtzellzahl

Links: Die in den Ecken vorhandenen weißen Quadrate stellen die gezählten Großquadrate der Neubauer-Zählkammer dar (http://zaehlkammer.de/gfx/neubauer_improved.jpg, Stand: 17.05.15). Rechts: Formel für die Berechnung der Gesamtzellzahl einer Probe.

2.2.1.4 Einfrieren von PBMCs

Die isolierten Zellen (siehe 2.2.1.1 und 2.2.1.2) wurden mit auf 4°C gekühltem Einfriermedium je nach Zellzahl auf zwei verschiedene Aliquotgrößen ($1 \cdot 10^8$ oder $2 \cdot 10^7$ Zellen) eingestellt. Um ein langsames und schonendes Herunterkühlen der Zellen auf -80°C sicherzustellen, wurden die Aliquots in eine 4°C kalte, mit Isopropanol gefüllte Einfrierbox überführt (Kase, 2007).

2.2.1.5 Auftauen von PBMCs

Zu den eingefrorenen Zellen wurde 4°C kaltes Auftaumedium pipettiert. Die darin enthaltene DNase sollte ein Verklumpen der absterbenden Zellen verhindern. Aufgetaute Zellen wurden zentrifugiert und, um das zellschädigende DMSO zu entfernen, abermals mit Auftaumedium gewaschen und zentrifugiert (1300 rpm, 8 min, RT). Anschließend wurden die Zellen gezählt (siehe 2.2.1.3) und für eine Zellfärbung (siehe 2.2.3.3) in PBS aufgenommen.

2.2.2 Künstliche Antigen-präsentierende Zellen (*artificial antigen presenting cells, aAPC*)

Das Testen von tumorassoziierten Peptiden auf ihre Immunogenität gehört zu den standardmäßig durchgeführten vorklinischen Analysen. Tiermodelle sind für diese vorklinischen Experimente aufgrund der hohen Spezies-spezifischen Interaktionen des HLA-Systems und des T-Zellrepertoires nicht sinnvoll. Darum wurde sich in dieser Arbeit ein künstliches System zunutze gemacht um *in vitro* die T-Zellstimulation von naiven Zellen zu simulieren. Diese künstlichen Antigen-präsentierenden Zellen basieren darauf im Labor erzeugte HLA:Peptid-Komplexe (HLA-Monomere) sowie kostimulatorische Antikörper zu präsentieren und somit das natürliche System der Antigenpräsentation nach zu ahmen (siehe Abbildung 2.3). Gebunden werden diese Moleküle an eine 5,6 µm große synthetische Kunststoff-Mikrosphäre (künstliche Zelle) mit daran gekoppeltem Streptavidin (aus *Streptomyces avidinii*), welches das benötigte biotinylierte HLA-Monomer und die ebenfalls biotinylierten kostimulatorischen Antikörper bindet (Rudolf et al., 2008).

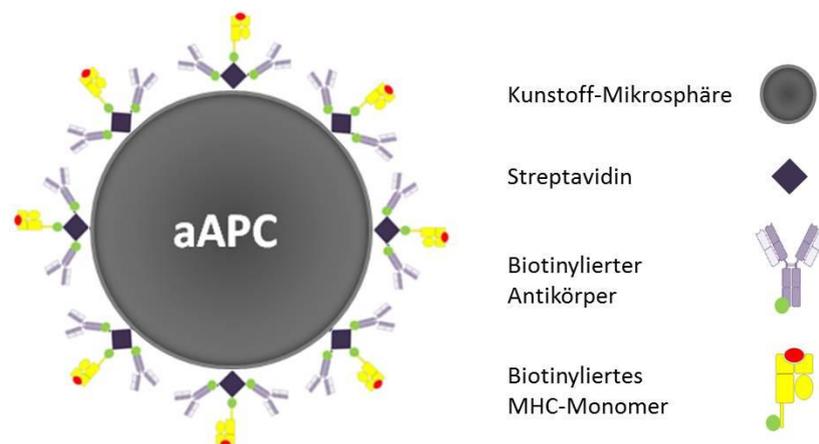


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung einer künstlichen Antigen-präsentierenden Zelle

Biotinylierte Antikörper und MHC-Moleküle welche das Peptid von Interesse präsentieren, können an die Streptavidin-gekoppelte Oberfläche einer Kunststoff-Mikrosphäre gebunden werden.

2.2.2.1 Produktion von HLA-Ketten

Für die Produktion von peptidbeladenen MHC-Molekülen mussten die für das HLA-Allel relevante α -Kette (und β_2 -Mikroglobulin) produziert werden. Hierfür wurde sich ein Klonierungssystem zunutze gemacht. Die DNA-Sequenz der HLA-Allele ist anstatt einer Transmembrandomäne am C-Terminus mit einer Erkennungssequenz für das Enzym BirA-Ligase modifiziert um in einem späteren Schritt Biotin anhängen zu können.

0.2 μ l des Vektors wurden zu 50 μ l frisch transformierter BL21 (DE3) pLysS *Escherichia coli*-Zellen gegeben, die das Plasmid pLysS tragen. Nach einer Inkubation auf Eis für 20 min wurden die Zellen für eine Permeabilisierung für 90 Sekunden bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt. Nach Herunterkühlen auf Eis wurden die Zellen mit 1 ml LB-Medium im Wasserbad bei 37°C für 30 min inkubiert. 100 μ l der Probe wurden auf LB-Agar (1 ml Ampicillin (1000x) und Chloramphenicol (1000x), Amp/Cam) ausplattiert und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden Kolonien von der Platte gepickt und in 5 ml LB-Medium (Amp/Cam) überführt und auf dem Schüttler bei 37°C und 50 rpm für 8 h inkubiert. Danach gab man die Kultur zu 100-200 ml LB-Medium (Amp/Cam) und schüttelte sie über Nacht bei 37°C und 180 rpm. Am nächsten Tag wurden 10 Erlenmeyerkolben mit jeweils einem Liter LB-Medium (Amp/Cam) mit 15 ml der Übernacht-Kultur inokuliert und im Schüttler bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Die OD bei 600 nm (Dichte der Bakterienkultur) wurde gemessen. Eine ausreichende Kulturdichte war erreicht, wenn der Wert zwischen 0.4 und 0.6 betrug. Um die rekombinante Proteinexpression zu induzieren wurden 0.5 μ l einer 1 M IPTG-Lösung (synthetischer Induktor des *Lac*-Operons) hinzugefügt und für weitere 4 Stunden inkubiert. Um die exprimierten Proteine aufzureinigen wurde die Kultur in einem SLA 3000-Rotor bei 5000 rpm für 20 min abzentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen und die Pellets in 180 ml PBS resuspendiert wurden, fror man diese in 30 ml-Aliquots bei -80°C ein. Nach Auftauen der Bakterien wurden diese mit Hilfe einer Ultraschallbehandlung (3-mal bei 2 min, „output“ 5, „duty cycle“ 50%) aufgeschlossen. Um störende DNA zu entfernen mussten 150 μ l von 10 mg/ml DNase I und 300 μ l 1 M MgCl₂ hinzugefügt und bei 37°C für 20 min inkubiert werden. Dieses Lysat wurde in einem SS43-Rotor bei 15000 rpm für 20 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet zeigt unterschiedliche Phasen auf. Die Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) bilden die weißere untere Schicht und Zellwandtrümmer die obere gräuliche Schicht. Mit Hilfe von Tritonpuffer wurden die Einschlusskörperchen von den Zellwand- und Membranrückständen in mehreren Waschschritten befreit und am Ende in 20-40 ml Harnstoff-Puffer aufgenommen. Das Lysat rotierte auf einem Rad bei 4°C über Nacht, damit nicht lösliche Elemente durch einen Zentrifugationsschritt am nächsten Tag (SS34 Rotor, 15000 rpm für 20 min) entfernt werden konnten. Die Reinheit der Proteinlösung wurde bei einer OD von 260-280 nm im Photometer gemessen. Wenn der Quotient unter 0,6 war wurde die Reinheit als ausreichend bewertet.

Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford bestimmt (siehe 2.2.2.3) und auf die Konzentration 2 mg/ml in Harnstoff-Puffer eingestellt. In Kryogefäße wurden 8 mg der Kette bei -80°C weggefroren.

2.2.2.2 Rückfaltung von Peptid:MHC Klasse I-Komplexen

Für verschiedene immunologische Fragestellungen ist es von Interesse, ob T-Zellen ein von HLA-Molekülen präsentiertes Peptid erkennen. Hierfür wurden unterschiedliche Peptide auf unterschiedlichen HLA-Allotypen gebunden um anschließend in T-Zellstimulationen *in vitro* getestet zu werden. Die HLA- α -Ketten wurden dafür mit der β_2 -Kette und dem Peptid der Wahl zu einem Peptid-präsentierenden HLA-Komplex gefaltet.

Dafür wurden ca. 7 mg synthetisches Peptid eingewogen und mit 10% DMSO und 90% ddH₂O auf eine Konzentration von 10 mg/ml eingestellt. Bei 4°C wurden zu 250 ml Rückfaltungspuffer 385 mg reduziertes und 77,5 mg oxidiertes Glutathion, 250 μ l PMSF (1000x) und das Peptid unter Rühren hinzugefügt. In einem zweiten Schritt wurden 8 mg der relevanten α -Ketten des MHC Klasse I-Moleküls aufgetaut, mit Harnstoff-Puffer auf eine Konzentration von 20 mg/ml eingestellt und zu 700 μ l Injektionspuffer pipettiert. Um eine schnelle und möglicherweise falsche Rückfaltung der α -Ketten zu verhindern wurde die Lösung mit einer 1 ml-Spritze aufgezogen und mit einer 26 G-Nadel in das stark rührende Rückfaltungspuffer-Gemisch hinzugefügt. Zu 7 mg β_2 -Kette wurden 780 μ l Injektionspuffer pipettiert und wie zuvor beschrieben dem Gemisch hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 10°C. Am nächsten Tag wurde morgens und abends die Zugabe der α -Kette wie zuvor beschrieben wiederholt. Idealerweise wurde hierbei ein 12-Stunden-Intervall eingehalten. Zur Abtrennung möglicher Aggregate wurde der Ansatz durch einen 0,22 μ m-Vakuumfilter filtriert. Um den Ansatz auf ca. 20 ml einzuengen wurde das Gemisch durch eine mit Wasser vorgespülte Rührzelle (30 kDa Filtermembran bei 60 psi) gefiltert. Durch die Ausschlussgröße von 30 kDa verbleiben die MHC-Peptid-Komplexe im Retentat während einzelne Ketten und ungebundenes Peptid den Filter passieren können. Das Retentat wurde in einem Falcon-Röhrchen bei 4°C aufgehoben. Um eine größere Ausbeute zu erhalten wurde aus dem Filtrat eine zweite Rückfaltung angesetzt unter Zugabe von 8 mg α -Kette, 7 mg β_2 -Kette sowie 250 μ l PMSF und unter Schütteln über Nacht inkubiert (siehe erste Rückfaltung). Dieser Prozess wurde am nächsten Tag wiederholt. Nach der zweiten Rückfaltung wurde der Ansatz wie oben beschrieben eingengt und die beiden Retentate wurden vereinigt. Um das Retentat auf 5 ml weiter einzuengen erfolgte eine schrittweise Zentrifugation bei 4000 rpm 4°C in einem Amicon Ultra-15 mit einem Größenausschluss von 10 kDa. Um die HLA-Monomere (peptidbeladene MHC-Komplexe) von noch vorhandenen weiteren Bestandteilen zu trennen wurde eine Größenausschluss-Chromatographie auf einer Superdex 75-Säule mit einer Flussrate von 3 ml/min und TBS als Laufpuffer durchgeführt.

Die Fraktionen, die das HLA-Monomer enthielten, wurden vereinigt und mit PMSF (1000x), Leupeptin (1000x) und Pepstatin (1000x) versetzt auf eine Endkonzentration von 1x um einen Abbau der Komplexe zu verhindern. Erneut wurde die HLA-Monomer-Lösung mittels eines Amicon Ultra-15 auf 5 ml eingengt. Um HLA-Monomere an Streptavidin binden zu können wurde mittels der BirA-Ligase Biotin an die Peptid:MHC-Komplexe gekoppelt. Hierfür wurden 400 µl 1 M MgCl₂, 25 µl 1 M Tris, 250 µl 100 mM ATP, 20 µg BirA-Ligase und 28,5 µl 100 mM D-Biotin zu der HLA-Monomer-Lösung hinzugegeben und bei 27°C über Nacht inkubiert. Nach der Zentrifugation des Biotinylierungsansatzes bei 4000 rpm, 5 min und 4°C wurde eine weitere Größenausschluss-Chromatographie wie oben beschrieben durchgeführt. Die biotinylierte HLA-Monomer-Fraktion wurde vereinigt und mit PMSF, Leupeptin und Pepstatin auf eine 1x Endkonzentration versetzt. Nach einer weiteren Einengung durch Zentrifugation auf 250-350 µl wurde die Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay bestimmt (siehe 2.2.2.3) und für den weiteren Gebrauch mit 2 mg/ml in TBS in 50 µg-Aliquots bei -80°C weggefroren. Die Qualitätskontrolle der Rückfaltung erfolgte durch eine massenspektrometrische Messung der rückgefalteten HLA-Monomere von Claudia Falkenburger. Hierbei wurde überprüft, ob das Peptid sowie die HLA-Ketten vorhanden sind. Dafür wurde die Probe nach dem in Kapitel 2.2.5.1 beschriebenen Protokoll vorbereitet.

2.2.2.3 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration beruht auf einer photometrischen Messung nach Bradford (Bradford, 1976). Dabei bindet ein Farbstoff kationische und unpolare Seitenketten von Protein-Komplexen und verschiebt so das Absorptionsmaximum von 450 nm auf 590 nm. Somit kann man das Verhältnis der OD₅₅₀/OD₄₅₀ gegen das einer bekannten Proteinkonzentration vergleichen. Um die Standardgerade einer Proteinlösung zu erstellen wurde BSA in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt: 0, 20, 40, 60, 80 und 100 µg/ml. 50 µl dieser Ansätze wurden in eine 96-well-Platte vorgelegt. Die zu messende Probe wurde in einer 1:100- und 1:200-Verdünnung in drei wells für eine Triplett-Bestimmung vorbereitet. Zu 50 µl der Probe und der Standardproben wurden 200 µl des Bradford-Farbstoffes (Nanoquant) dazu gegeben und nach 5 min an einem ELISA-Reader ausgelesen.

2.2.2.4 Biotinylierung von Antikörpern

Um kostimulatorische Antikörper in einem aAPC-Stimulationsexperiment *in vitro* zu verwenden müssen sie zuvor biotinyliert werden, um an die Streptavidin-gekoppelte Oberfläche der Mikrosphären zu binden. Dafür wird sich ein Biotin-Reagens zunutze gemacht, das mit primären Aminen (-NH₂) an Seitenketten von Lysinen reagiert. Dort bildet sich eine kovalente Bindung aus. Der Hersteller des Biotin-Reagens empfiehlt ein Verhältnis

von 1-10 mg/ml Antikörper der Wahl zu einem 20-fachen molaren Überschuss des Biotin-Reagens, um ein Verhältnis von 4-6 Biotin-Gruppen pro Antikörpermolekül sicher zu stellen.

Dafür wurde das Biotin vor dem Öffnen auf RT gebracht um danach eine 10 mM Biotin-Lösung herzustellen. Die berechnete Menge an Biotin wird zu dem in 0.5 - 2 ml PBS mit der empfohlenen Konzentration vorliegenden Antikörper hinzugegeben. Nach einer Inkubation auf Eis für 2 Stunden wurde der biotinylierte Antikörper mit einer PD-10-Entsalzungs-Säule aufgereinigt und mittels eines Photometers die Konzentration bestimmt. Für eine funktionelle Überprüfung der Biotinylierung wurden isolierte PBMC mit dem Antikörper gefärbt (siehe 2.2.3.6). Biotinylierungen wurden außerdem von Janet Peper durchgeführt.

2.2.2.5 Synthese der aAPC

Alle Zentrifugationsschritte wurden 2 min bei 4°C und 2500 U/min durchgeführt. Für Waschschritte sowie Stammlösungen wurde 4°C kalter MACS-Puffer verwendet. Die aAPCs wurden in einer 96-*well*-Platte hergestellt und gelagert.

Der biotinylierte anti-CD28 Antikörper wurde auf eine Konzentration von 600 ng/*well* (entspricht 4 pmol/*well*) eingestellt. Das biotinylierte HLA-Monomer wurde in einer Konzentration von 200 ng/*well* (entspricht 5 pmol/*well*) verwendet. Die Mikrosphären (*beads*) wurden, ausreichend für 4 Stimulationen, in einer Konzentration von 800 000 *beads/well* zweimal in 20 ml gewaschen und in 100 µl/*well* aufgenommen. Um die einzelnen Bestandteile zusammenzuführen, wurden zuerst 100 µl der *bead*-Suspension vorgelegt. Danach wurden 50 µl HLA-Monomer-Lösung dazu pipettiert, mit Folie umwickelt und für 30 min bei RT auf einem Flachsüttler bei 600 U/min inkubiert. Anschließend wurden 50 µl Antikörperlösung zugegeben und abermals für 30 min auf dem Flachbetsüttler inkubiert. Zuletzt wurden die aAPCs vier Mal gewaschen und in einem Endvolumen von 200 µl aufgenommen. Mit Alufolie verschlossen und im Kühlschrank bei 4°C gelagert sind sie bis zu einigen Monaten haltbar (Oelke and Schneck, 2004).

2.2.2.6 Magnetisch aktivierte Zellsortierung

Magnetisch aktivierte Zellsortierung (*magnetic activated cell sorting*, MACS) beruht auf dem Prinzip, dass Antikörper welche bestimmte Oberflächenmoleküle von Zellen erkennen, an magnetische Partikel gekoppelt sind und darüber eine gezielte Trennung von gewünschten Zellen aus einer gemischten Zellpopulation stattfinden kann (Miltenyi et al., 1990). Expressieren Zellen die Oberflächenantigene der verwendeten Antikörper, werden diese in einem magnetischen Feld gebunden, während Zellen ohne das Oberflächenmolekül passieren können. Die Trennung kann über eine direkte Bindung der gewünschten Zellen stattfinden oder über eine Entfernung der restlichen Zellpopulationen (indirekt). Um die markierten Zellen an ein magnetisches Feld zu binden werden MACS-Säulen mit einer

optimierten Matrix (siehe Produktbeschreibung „LS Columns“ von Miltenyi Biotec) verwendet, die in ein magnetisches Feld gebracht werden können. In dieser Arbeit wurde eine Isolierung von CD8-positiven T-Zellen über eine direkte Antikörperbindung aus einer zuvor gewonnenen PBMC-Population (siehe 2.2.1.1) durchgeführt.

2.2.2.7 MACS von CD8-positiven T-Zellen

Für die Isolierung CD8-positiver T-Zellen aus einer komplexen Zellpopulation wurden MACS-konjugierte Antikörper verwendet, die das CD8-Molekül spezifisch binden. Somit wurden alle Zellen, die das CD8-Molekül auf ihrer Oberfläche exprimieren, markiert und durch ein magnetisches Feld von den CD8-negativen Zellen getrennt (siehe Abbildung 2.4).

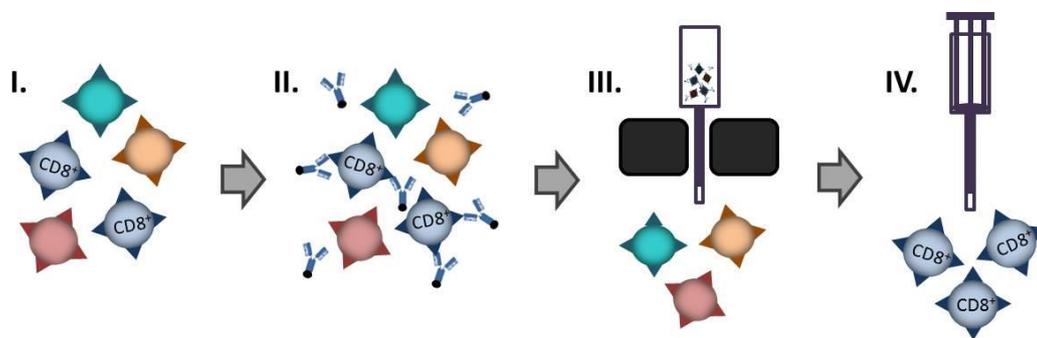


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung magnetisch aktivierter Zellsortierung

CD8-positive T-Zellen aus isolierten PBMCs (I.) werden mittels MACS-konjugierter Antikörper markiert (II.). Die magnetisch markierten Zellen werden auf eine in einem permanenten Magnetfeld sitzende MACS-Säule mit Matrix gegeben (III.). Durch Entnahme der Säule aus dem Magnetfeld und Druck durch einen Stempel eluieren die positiv selektierten Zellen (IV.). Abbildung modifiziert nach (Grutzkau et al., 2010).

Bei der Durchführung des von der Firma vorgegebenen Protokolls ist das Volumen der einzusetzenden Puffer und Reagenzien stets von der eingesetzten Zellzahl abhängig. Der folgende Ablauf bezieht sich auf eine Gesamtzellzahl von 10^7 Zellen. Später wurde dieses Protokoll modifiziert, in dem die kalkulierten Reagenzien und Puffer vor Einsatz mit dem Faktor 0.75 multipliziert wurden (siehe 3.1.1.3). Die Größe der Säule wurde anhand der Gesamtzellzahl gewählt. Die Kapazität einer MS-Säule reicht bis 10^7 markierte Zellen und die einer LS-Säule bis 10^8 . Für alle Wasch- und Spülvorgänge wurde 4°C kalter MACS-Puffer verwendet.

Zuerst wurden die Zellen gezählt und bei 1300 rpm für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in $80\ \mu\text{l}$ MACS-Puffer aufgenommen und mit $20\ \mu\text{l}$ der MACS-konjugierten Antikörperlösung für 15 min im Kühlschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen mit MACS-Puffer für einen Waschvorgang auf 50 ml aufgefüllt und abermals bei 1300 rpm für 10 min zentrifugiert. Auf das Pellet wurden je 10^8 Zellen $500\ \mu\text{l}$ MACS-Puffer gegeben und gründlich resuspendiert. Die Lösung wurde anschließend auf eine mit Puffer equilibrierte Säule, welche sich in einem permanenten magnetischen Feld befand, überführt. Um sicher zu gehen, dass alle Zellen die keinen Antikörper und somit kein CD8-Molekül auf ihrer Zelloberfläche haben, die Säule

passieren, wurde drei Mal mit 500 μ l (MS-Säule) oder 3 ml (LS-Säule) MACS-Puffer gewaschen. Um die positiv selektierten Zellen von der Säule zu eluieren, wurde diese aus dem magnetischem Feld entnommen und mittels eines Stempels und 1 ml (MS-Säule) oder 5 ml (LS-Säule) Puffer in ein neues Falcon-Röhrchen überführt. Nach einem Waschvorgang mit PBS (auf 50 ml auffüllen) und der Bestimmung der Lebendzellzahl (siehe 2.2.1.3) wurden die Zellen in 10 ml warmen T-Zellmedium mit 2,5 ng/ml IL-7 und 10 U/ml IL-2 aufgenommen. Die Zellen wurden in einer 75-ml-Zellkulturflasche über Nacht in einen Brutschrank bei 37°C gelagert.

2.2.2.8 T-Zellstimulation (*in vitro priming*) mit aAPCs

Die Zellen wurden während der gesamten Stimulation in einem Brutschrank bei 37°C und 7,5% CO₂ inkubiert. Das Gesamtvolumen in einem *well* während der Stimulation entsprach 200 μ l.

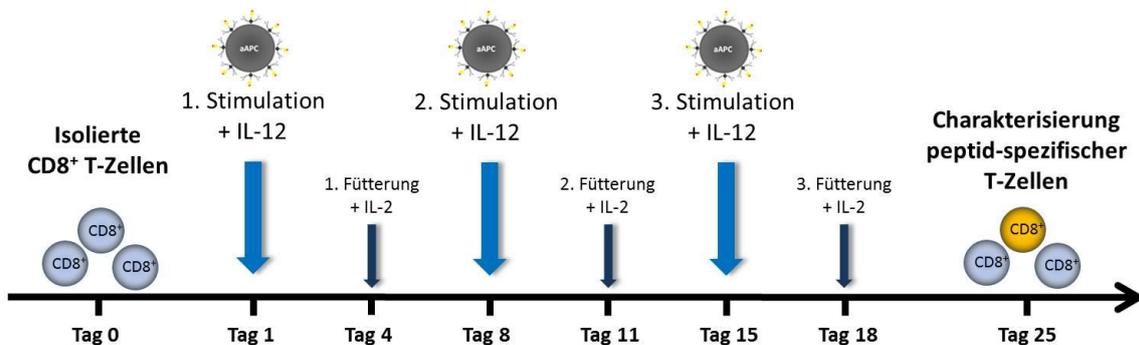


Abbildung 2.5: Stimulationsprotokoll einer T-Zellstimulation *in vitro* mittels aAPCs

Die durch MACS isolierten und ausgesäten CD8-positiven T-Zellen wurden in einem einwöchigen Rhythmus mit aAPCs stimuliert. Zwischen den Stimulationen fanden Fütterungsschritte mit frischem Medium und IL-2 statt. Eine Woche nach der letzten Fütterung können die Zellen auf Antigen-spezifische T-Zellen mittels einer FACS-Färbung getestet werden.

Nach der MACS-Isolation und der Inkubation über Nacht wurden die CD8-positiven T-Zellen in eine 96-*well*-Platte überführt. In den einzelnen *wells* lagen nach Zählung 10⁶ Zellen in 100 μ l T-Zellmedium für die erste Stimulation bereit. Hier ist anzumerken, dass wenn möglich ein Teil der Zellen für die spätere *ex vivo*-Kontrolle weggefroren werden sollte (siehe 2.2.1.4). Die synthetisierten aAPCs wurden nun zu den ausplattierten Zellen gegeben. Hierfür wurden 20.000 *beads/well* zweimal in T-Zellmedium gewaschen und anschließend in 100 μ l warmes T-Zellmedium mit 100 ng/ml Interleukin 12 (entspricht 5 ng/ml pro *well*). Die zweite und dritte Stimulation mit aAPCs wurden an Tag 8 und 15 durchgeführt. Am vierten Tag wurden 100 μ l Medium abgenommen und durch 100 μ l erwärmtes frisches T-Zellmedium ersetzt. Dieses beinhaltete 80 ng/ml Interleukin 2 (entspricht 4 ng/ml pro *well*). Die Fütterung mit Medium und IL-2 wurde an Tag 11 und 18 wiederholt. Die Analyse der Antigen-spezifischen T-Zellen wurde am Tag 25 anhand einer HLA-Tetramerfärbung durchgeführt (siehe 2.2.3.3).

2.2.3 Analyse von Antigen-spezifischen CD8-positiven T-Zellen

Nach der wochenlangen Stimulation von CD8-positiven T-Zellen folgte die Analyse um zu überprüfen ob T-Zellen in den einzelnen *wells* spezifisch das auf den HLA-Monomeren präsentierte Peptid erkennen. Diese Antigen-Spezifität könnte mit einer Immunreaktion in Patienten bei einer Peptid-basierten Immuntherapie korrelieren. Hierfür wurde sich die Durchflusszytometrie zunutze gemacht.

2.2.3.1 Die Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht darauf, dass Zellpopulationen mittels Laser und das von den Zellen emittierte Licht unterschieden werden können. Hierüber können Informationen über die Größe (in Vorwärtsrichtung gemessene Lichtstreuung, *forward scatter*, FSC) und Granularität (im rechten Winkel gemessene Seitwärts-Streuung, *side scatter*, SSC) der Zellen gewonnen werden. Zudem besteht die Möglichkeit mit Fluoreszenzgekoppelten Antikörpern ein gewünschtes Molekül, auf oder in einer Zelle, zu binden und somit durch das für die Messung verwendete FACS-Gerät (*Fluorescence activated cell sorter*, FACS) zu detektieren (Fulwyler, 1974). Das emittierte Licht korreliert mit der Menge der Fluorophore, welche an die Zelle gebunden haben und wird von einem Photomultiplier des Gerätes in ein optisches Signal umgewandelt. Somit ist eine Kennzeichnung unterschiedlicher Moleküle gleichzeitig möglich wenn verschiedene Antikörper unterschiedliche Antigene erkennen und an unterschiedliche Fluorophore gekoppelt sind.

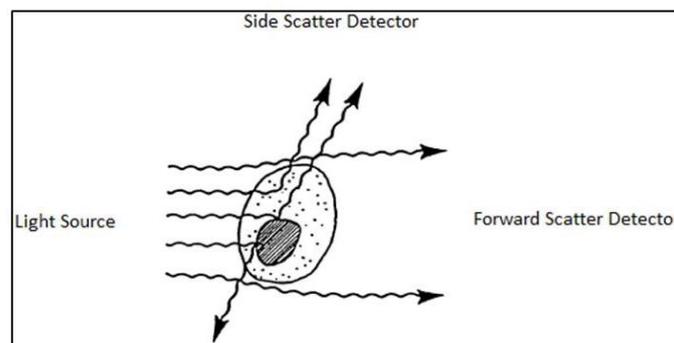


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung über das Prinzip eines FACS-Gerätes

Die Information über Zellgröße und deren Granularität gewinnt man durch den sogenannten FSC und SSC (in Vorwärtsrichtung gemessene Lichtstreuung und im rechten Winkel gemessene Seitwärts-Streuung) (<http://www.labome.com/method/Flow-Cytometry-A-Survey-and-the-Basics.html>, Stand: 15.05.15).

Alle Experimente wurden gemäß der Bedienungsanleitung an einem Zytometer FACSCanto II durchgeführt. Dieses Gerät war ausgestattet mit drei Lasern und beschränkt auf 8 Detektionskanäle. Zum Kompensieren der verschiedenen Fluoreszenzkanäle des Gerätes wurden für jedes verwendete Fluorchrom einfach gefärbte Kompensations-*beads* verwendet. Somit kann die Überlappung der Lichtspektren zwischen unterschiedlichen Fluorophoren

quantifiziert und entfernt werden. Mit der Software FACSDiva und FlowJo Version 10 wurden die Daten visualisiert und ausgewertet.

2.2.3.2 Tetramerisierung von HLA-Monomeren

Die Bindung eines Antigen-spezifischen T-Zellrezeptors an einen Peptid:MHC-Komplex ist anhand der instabilen Bindung und schnellen Dissoziation schwer nachzuweisen. Um diese Bindung dennoch zu verfolgen verbindet man mehrere HLA-Monomere miteinander. In dieser Arbeit wurde sich die Wechselwirkung zwischen Biotin und Streptavidin zunutze gemacht, um durch ein Fluorochrom-gekoppeltes Streptavidin vier biotinylierte HLA-Monomere zu tetramersieren (Altman et al., 1996). HLA-Tetramere eignen sich aufgrund ihrer langsameren Dissoziationsrate besser für eine Färbung als ein alleiniger Peptid:MHC-Komplex (Altman, Moss et al., 1996; McHeyzer-Williams et al., 1996). Die Auflistung der verwendeten HLA-Tetramere befindet sich in den Tabelle 2.1 bis 2.4.

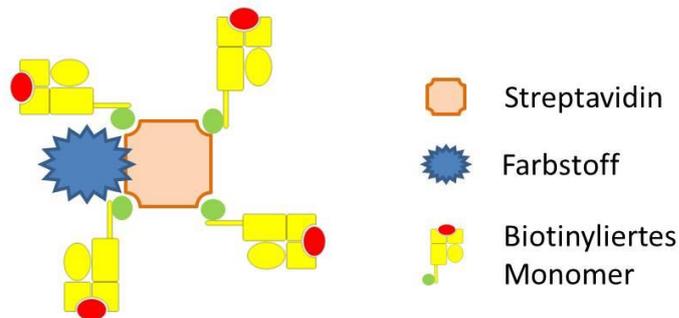


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung eines HLA-Tetramers

In dieser Abbildung gezeigt ist, dass vier biotinylierte Peptid:MHC-Komplexe (HLA-Monomer) durch ein Fluorophor-gekoppeltes Streptavidin gebunden werden (<http://jasn.asnjournals.org/content/17/10/2652/F4.small.gif>, Stand 17.05.15)

Um das Streptavidin maximal abzusättigen, wurde ein HLA-Monomer:Streptavidin-Verhältnis von 1:4 gewählt. Die kalkulierte Menge des Fluorochrom-Streptavidin-Konjugats wurde in Teilschritten (8 µg/30 min) bei 4°C hinzugegeben. Insgesamt wurden 80 µg R-Phycoerythrin (PE)-konjugiertes Streptavidin zu 50 µg aufgetautem biotinylierten HLA-Monomer gegeben. Die entstandenen HLA-Tetramere sind bei 4°C und im Dunkeln gelagert mindestens vier Wochen haltbar oder können für eine spätere Nutzung aliquotiert und mit Tetramer-Einfrierpuffer (Verhältnis Einfrierpuffer:HLA-Tetramer 1:3) eingefroren werden.

2.2.3.3 HLA-Tetramerfärbung

Durch HLA-Tetramere ist es möglich, T-Zellrezeptoren, die das präsentierte Peptid erkennen, zu binden und diese Verbindung in einer FACS-Messung sichtbar zu machen.

Alle Schritte und Inkubationszeiten der Färbung erfolgten auf Eis und wenn möglich im Dunkeln. Sämtliche Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C für 2 min bei 1800 rpm

durchgeführt. In Tabelle 2.12 ist die Reihenfolge der Färbeschritte mit ihren Inkubationszeiten sowie den verwendeten Lösungen zu finden.

Um das Kulturmedium von den Zellen zu entfernen, wurde ein Waschschrift mit PBS vor der Färbung durchgeführt. Als erstes wurde ein Lebend/Tot-Farbstoff in einem Verhältnis von 1:400 verwendet, der freie Amine von zerstörten Zellmembranen toter Zellen färbt. Anschließend erfolgten die HLA-Tetramerfärbung sowie die Oberflächenantigenfärbung gegen das CD8-Molekül. Als letztes wurden die Zellen in einer Fixierlösung aufgenommen und im Dunkeln bei 4°C zur Analyse am FACS-Gerät gelagert.

Tabelle 2.12: Arbeitsschritte einer HLA-Tetramerfärbung

Arbeitsschritt	Reagens	Konzentration/ Verdünnung	Lösung	Inkubationszeit
Lebend/Tot-Färbung	Aqua LIVE/DEAD	1:400	PBS-E	20 min
HLA- Tetramerfärbung	PE	5 µg/ml	TSB	30 min
Oberflächenantigen- Färbung CD8	PerCP	1:85	FACS-Puffer	20 min
Fixierung	Formaldehyd	1%	FACS-Fix	/

2.2.3.4 Intrazelluläre Zytokinfärbung

Für manche Fragestellungen ist es interessant, ob die T-Zellen nach einer erfolgreichen Stimulation das Antigen nicht nur erkennen, sondern ob sie fähig sind auf diese Erkennung mit Funktionalität zu reagieren. Dafür wurden in dieser Arbeit verschiedene Indikatoren festgelegt. Zytokine wie Interferon- γ (IFN- γ), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) oder das Molekül CD107a können die Funktionalität von zytotoxischen T-Zellen widerspiegeln. Um zu überprüfen ob dies der Fall ist, wurden die Zellen nach einer erfolgreichen aAPC-Stimulation gezählt und in eine neue Platte überführt. Normalerweise sollte für diesen Versuch ein Minimum von 1 - 2 $\times 10^4$ Zellen verwendet werden (Kyzirakos, 2013). Um die Ausschüttung von neu exprimierten Proteinen nach Erkennung des Antigens zu verhindern wurde zu allen Proben neben dem Peptid mit 10 µg/ml zusätzlich 10 µg/ml Brefeldin A und 0,1 µl/well Golgistop hinzugefügt (Misumi et al., 1986). CD107a wird bei der Ausschüttung zytotoxischer Granula nur kurzzeitig auf der Oberfläche der Zelle exponiert und zeitnah mittels Endozytose internalisiert (Misumi, Miki et al., 1986; Fukuda, 1991). Um dennoch diesen Marker zu detektieren wurde der Antikörper gegen CD107a direkt zur Stimulation hinzugegeben. Um neben dem zu testenden Peptid eine Positiv-Kontrolle zu haben wurden PMA und Ionomycin in einer Endkonzentration von 150 ng/ml bzw. 3 µM auf die zu testenden Zellen gegeben. Für die Negativ-Kontrolle wurde in der gleichen Menge ein irrelevantes Peptid hinzugefügt. Das Endvolumen sollte zwischen 150-200 µl T-Zellmedium liegen. Nach einer Inkubation von mindestens 6 Stunden oder über Nacht für höchstens 16 Stunden wurden die Zellen gefärbt.

Alle Schritte und Inkubationszeiten der Färbung erfolgten auf Eis und wenn möglich im Dunkeln. Sämtliche Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C für 2 min bei 1800 rpm durchgeführt. In Tabelle 2.13 ist die Reihenfolge der Färbeschritte, die immer in 50 µl Endvolumen durchgeführt wurden mit ihren Inkubationszeiten sowie den verwendeten Lösungen zu finden. Als erstes wurde eine Lebend/Tot-Färbung in PBS-E vorgenommen. Nach 20 min Inkubationszeit wurden die Zellen gewaschen und die CD8-Molekülfärbung in FACS-Puffer vorgenommen. Nach weiteren 20 Minuten Inkubationszeit wurden die Zellen mit 100 µl Cytotfix/Cytoperm permeabilisiert. Dadurch konnte nachdem die Zellen zweimal mit Permwash gewaschen wurden die intrazelluläre Färbung der Zytokine erfolgen. Die Antikörperverdünnung wurde auf die zu färbenden Zellen pipettiert und 20 min inkubiert. Danach erfolgten weitere zwei Waschschrte mit Permwash um die Zellen anschließend in der Fixierlösung aufzunehmen und durchflusszytometrisch zu analysieren. Um zu überprüfen ob die getesteten Zellen ihre Spezifität immer noch haben wurde, falls genügend Zellen vorhanden, gleichzeitig in einem zusätzlichen *well* eine HLA-Tetramerfärbung durchgeführt (siehe 2.2.3.3).

Tabelle 2.13: Arbeitsschritte einer intrazellulären Zytokinfärbung

Arbeitsschritt	Reagens	Konzentration/ Verdünnung	Lösung	Inkubationszeit
Lebend/Tot-Färbung	Aqua LIVE/DEAD	1:400	PBS-E	20 min
Oberflächenantigen- Färbung CD8	PerCP	1:85	FACS-Puffer	20 min
Cytotfix/Cytoperm	/	100 µl/ <i>well</i>	Cytoperm/Cytotfix	20 min
Zytokin-Färbung TNFα/IFNγ	Pacific Blue/ PE	1:120/1:200	Permwash	20 min
Fixierung	Formaldehyd	1%	FACS-Puffer	/

2.2.3.5 Oberflächenfärbung mit unkonjugierten Antikörpern

Da in dieser Arbeit mit unterschiedlichen kostimulatorischen Antikörpern gearbeitet wurde, sollte nachgewiesen werden, ob diese überhaupt auf den Zellen exprimiert und gebunden werden können. Hierfür wurden die verwendeten kostimulatorischen Antikörper auf Zielzellen gebunden. Der Nachweis der Bindung wurde mittels eines zweiten, an einem Farbstoff gekoppelten Antikörpers, der gegen die Herkunft (Maus) des ersten Antikörpers gerichtet ist, gefärbt (Sekundärantikörper). Um das Maß der unspezifischen Bindung (Hintergrundsignal) in Erfahrung zu bringen, wurde zusätzlich mit einem zweiten Antikörper, der normalerweise nicht auf den Zielzellen binden sollte, gefärbt (Isotyp-Kontrolle). Idealerweise sollten diese Antikörper der Art und Unterklasse der schweren und leichten Kette entsprechen.

Alle Schritte und Inkubationszeiten der Färbung erfolgten auf Eis und wenn möglich im Dunkeln. Sämtliche Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C für 2 min bei 1800 rpm durchgeführt.

Als erstes wurde eine Lebend/Tot-Färbung in PBS-E vorgenommen. Nach 20 min Inkubationszeit wurden die Zellen gewaschen und der Primärantikörper wurde in 50 µl mit einer Konzentration von 10 µg/ml in FACS-Puffer auf die Zellen gegeben. Nach weiteren 20 min und einem Waschschrift wurde der Sekundärantikörper auch in einer Konzentration von 10 µg/ml hinzugefügt und für weitere 20 min inkubiert. Um sicher zu stellen, dass alle Sekundärantikörper abgesättigt sind, bevor der nächste Färbeschritt vollzogen wird, wurde mittels zweimaligen Waschens mit 2% Mausserum alle Sekundärantikörper gebunden. Danach konnte die Färbung des Oberflächenantigens CD8 durchgeführt werden. Nach 20 min Inkubation wurden die Zellen zwei weitere Male mit FACS-Puffer gewaschen, um sie letzten Endes in der Fixierlösung aufzunehmen.

Tabelle 2.14: Arbeitsschritte für die Oberflächenfärbung unkonjugierter Antikörper

Arbeitsschritt	Farbstoff	Konzentration/ Verdünnung	Lösung	Inkubationszeit
Lebend/Tot-Färbung	Aqua LIVE/DEAD	1:400	PBS-E	20 min
Primärantikörper	/	10 µg/ml	FACS-Puffer	20 min
Sekundärantikörper	FITC	10 µg/ml	FACS-Puffer	20 min
Mausserum	/	2%	/	/
Oberflächenantigen	PerCP	1:85	FACS-Puffer	20 min
Fixierung	Formaldehyd	1%	FACS-Fix	/

2.2.3.6 Überprüfung von biotinylierten Antikörpern

Eine weitere Oberflächenfärbung von Zellen war die Überprüfung der biotinylierten Antikörper. Dabei wurden die biotinylierten Antikörper (siehe 2.2.2.4) mit aufgetauten PBMCs getestet. Die erfolgreiche Biotinylierung wurde mittels Streptavidin-PE überprüft.

Dafür wurden PBMCs wie in Kapitel 2.2.1.5 beschrieben aufgetaut und in einem ersten Schritt wurde Lebend/Tot-Farbstoff in einer Verdünnung von 1:400 eingesetzt. Im nächsten Schritt wurden die zu überprüfenden Antikörper in separaten *wells* hinzugegeben. Da der Antikörper für die CD8-Molekül-Färbung nicht biotinyliert ist kann man ihn im selbigen Schritt zusetzen. Nach dieser Färbung folgt die Zugabe von Streptavidin-PE. Als letztes wurden die Zellen in einer Fixierlösung aufgenommen und im Dunkeln bei 4°C bis zur Analyse gelagert.

Tabelle 2.15: Arbeitsschritte für die Überprüfung biotinylierter Antikörper

Arbeitsschritt	Farbstoff	Konzentration/ Verdünnung	Lösung	Inkubationszeit
Lebend/Tot-Färbung	Aqua LIVE/DEAD	1:400	PBS-E	20 min
Biotinylierter Antikörper	/	10 µg/ml	FACS-Puffer	20 min
Oberflächenantigen	PerCP	1:85	FACS-Puffer	20 min
Streptavidin	PE	1 mg/ml	FACS-Puffer	20 min
Fixierung	Formaldehyd	1%	FACS-Fix	/

2.2.4 Enzymatischer Verdau von Proteinen

Bei der Analyse von unbekanntem Proteinen ist es möglich, diese unter Verwendung von Enzymen in kleine Fragmente zu zersetzen, um sie dann in einer massenspektrometrischen Messung zu identifizieren. Mit diesem weit verbreiteten Ansatz können verschiedene Fragestellungen bearbeitet werden. Die zu analysierenden Proteine liegen hierbei in verschiedenen Formen vor. Während bei einer Einzelprotein-Untersuchung oder hoch aufgereinigten Proteinen diese meist in einem Gel separiert und aufgereinigt wurden, liegen komplexere Proteingemische meistens als Lösung vor. Ein weiterer variabler Punkt beschreibt die Verwendung verschiedener Enzyme. In dieser Arbeit wurden zwei robuste Serinproteasen gewählt. Die Erste, Trypsin, ist eine im Dünndarm vorkommende eiweißzersetzende Serinprotease (Rawlings et al., 1994). Die proteolytischen Schnittstellen liegen carboxyterminal von Lysin (K) und Arginin (R). Chymotrypsin ähnelt Trypsin als ein Verdauungsenzym und schneidet carboxyterminal hydrophobe Aminosäuren. Die proteolytische Schnittstellen liegen hierbei bei Phenylalanin (F), Tryptophan (W), Tyrosin (Y) sowie Leucin (L). Zudem ist vom Hersteller beschrieben eine Schnittaktivität in niedrigeren Raten bei Methionin (M), Alanin (A), Asparagin (N) und Glutaminsäure (E). Um für den Verdau alle enzymatischen Schnittstellen der Proteine zugänglich zu machen wurden die Disulfidbrücken der Proteine durch Reduktion der Cystein-Reste und anschließende Modifikation (freie Schwefelwasserstoff-Gruppen alkyliert) aufgelöst.

2.2.4.1 Proteinverdau im Gel mittels Trypsin

Die Vorbereitung der Proben und Durchführung der SDS-Gelelektrophorese von Kooperationspartnern durchgeführt (Hoffmann, 2010; Steinl et al., 2013). Die für die Fragestellung relevanten Proteinbanden wurden ausgeschnitten und konnten in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß bei -20°C bis -80°C aufgehoben werden. Nach dem Auftauen wurde die Bande einmal mit 50 µl Wasser gespült um eventuellen groben Schmutz zu entfernen. Nachdem das Wasser entfernt wurde, konnten die Banden mit einer Pipettenspitze in kleine Stücke zermahlen werden. Durch wiederholte Zugabe und Abnahme

von 50 µl Wasser war die Probenvorbereitung abgeschlossen. Um zu verhindern, dass kleine Gelfragmente bei der Abnahme der Flüssigkeit verloren gehen, wurden schmal zulaufende Gelbeladungsspitzen verwendet. Um die Gelstücke zu entfärben wurden sie zweimal mit 50 µl für 5 min bei RT auf einem Schüttler mit 50% Acetonitril geschüttelt. Die Lösung wurde jeweils zwischen jedem Schritt abgenommen. Das 20 min Eintrocknen der Gelstücke wurde mittels einer Vakuum-Zentrifuge vorgenommen. Dadurch nehmen die getrockneten Gelstücke die im nächsten Schritt zugegebene Lösung optimal auf. Für die Reduktion der Cysteine wurden zu 20 µl Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer 2,5 µl 45 mM DTT-Lösung gegeben und bei 55°C 20 min unter Schütteln inkubiert. Für die vollständige Modifikation wurden zusätzlich 2,5 µl einer 100 mM Iodacetamid-Lösung hinzugefügt und für weitere 20 min bei RT geschüttelt. Danach wurden die Gelstücke mit 100 µl Wasser gespült, um sie anschließend für einen weiteren Trocknungsschritt in der Vakuum-Zentrifuge zu zentrifugieren. 50 µl NH₄HCO₃-Puffer wurden mit 0,5 µg Trypsin durch den Quellungsprozess der getrockneten Gelstücke direkt in das Gel gezogen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Extraktion der entstandenen Peptide. Zunächst wurden die Gelstücke um das Trypsin zu deaktivieren mit 50 µl 50% Acetonitril für 20 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Lösung wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dann wurden die Gelstücke zweimal mit 50 µl 50% Acetonitril mit 0,1% Ameisensäure oder alternativ mit 0,1% TFA geschüttelt und die Lösung ebenfalls in das neue Reaktionsgefäß überführt. Die vereinigten Überstände wurden nun eingeeengt um für die massenspektrometrische Analyse vorbereitet zu werden (siehe 2.2.5.1).

2.2.4.2 Tryptischer Verdau von Proteinen in Lösung

Die Proben wurde mit einer Konzentration von 1 µg/µl (maximal 10 µl) zu 20 µl Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer aufgenommen. Die Cysteinreste wurden mit 2,5 µl 45 mM Dithiothreitol (DTT) reduziert und nach Inkubation bei 55°C für 20 min auf einem Schüttler mit 2,5 µl 100 mM Iodacetamid alkyliert. Nach weiteren 15 min Inkubation mit Iodacetamid bei RT wurden weitere 20 µl NH₄HCO₃-Puffer und 0,5 µg Trypsin hinzugegeben. In einem 37°C warmen Wasserbad inkubierte die Probe 4 Stunden. Um das Trypsin zu inaktivieren wurden 30 µl einer 1% Ameisensäure (*formic acid*, FA) hinzugefügt oder alternativ 0,1% Trifluoressigsäure (*trifluoroacetic acid*, TFA). Für die weitere Verarbeitung siehe 2.2.5.1.

2.2.4.3 Chymotryptischer Verdau von Proteinen in Lösung

Je nach Fragestellung wurde mit einer Konzentration von 1 µg/µl (maximal 10 µl) zu 20 µl Chymotrypsin-Puffer (100 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂ mit einem pH-Wert von 7,8) aufgenommen. Die Cysteinreste wurden mit 2,5 µl 45 mM Dithiothreitol (DTT) reduziert und nach Inkubation bei 55°C für 20 min auf einem Schüttler mit 2,5 µl 100 mM Iodacetamid alkyliert. Nach weiteren 15 min Inkubation mit dem Iodacetamid bei RT wurden weitere 20 µl

Chymotrypsin-Puffer und 0,5 µg Chymotrypsin für 4 Stunden bei 25°C inkubiert. Um das Trypsin zu inaktivieren wurden 30 µl einer 1% FA oder alternativ 0,1% TFA hinzugefügt. Für die weitere Verarbeitung siehe 2.2.5.1.

2.2.4.4 Enzymatischer Verdau von HLA-Molekülen in Lösung

Um ein standardisiertes Vorgehen zu gewährleisten, wurde die Menge der Lösung der von den Filtern heruntergewaschenen HLA-Ketten bestimmt und mittels einer photometrischen Messung die Konzentration gemessen. Extrem gelartige Proben (Ablösen von Säulenmaterial während der HLA-Isolierung) wurden durch Ultraschall gelöst. Es wurden falls nicht anders angegeben 10 µg Probe in 10 µl Volumen eingesetzt. Weiteres Vorgehen siehe 2.2.4.2 und 2.2.4.3.

2.2.4.5 Isolation von HLA-Molekülen aus Zell- oder Gewebeproben für den enzymatischen Verdau

Die Isolation von HLA-Molekülen aus Zell- oder Gewebeproben dient der Gewinnung von natürlich präsentierten HLA-Liganden. Diese können dann mittels der Massenspektrometrie identifiziert werden, um so geeignete Kandidaten für eine Peptid-basierte Immuntherapie zu finden. Bei dem Prozess HLA-Liganden aus Zell- oder Gewebeproben zu gewinnen wurden die Peptid:HLA-Komplexe mittels eines Antikörpers aufgereinigt (siehe Tabelle 2.7).

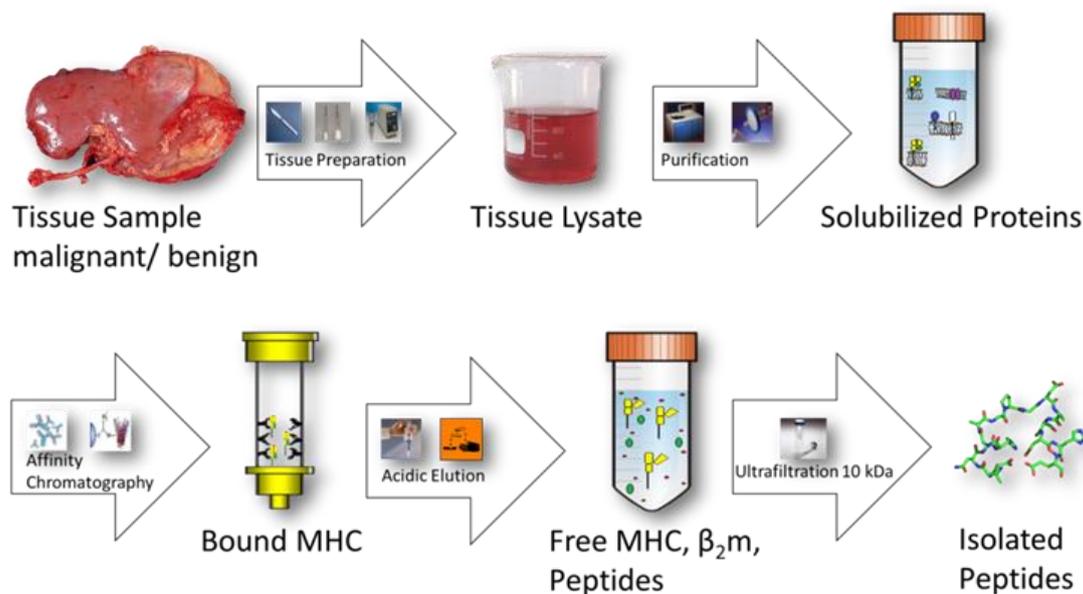


Abbildung 2.8: HLA-Isolation aus Tumor- oder Normalgewebe

Das Gewebe oder die Zellen werden lysiert um die HLA:Peptid-Komplexe mit Antikörpern an eine Säule zu binden. Im nächsten Schritt werden die Liganden mittels einer sauren Elution von den HLA-Molekülen gewaschen und mittels eines Größenausschlussfilters von α -Ketten und β_2 -Mikroglobulin getrennt. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Armin Rabsteyn zur Verfügung gestellt.

Im letzten Schritt trennt man die Liganden von dem HLA-Molekül über einen 10 kDa-Größenausschlussfilter. Die HLA-Moleküle und Antikörper verbleiben in dem Retentat und können für den späteren enzymatischen Verdau bei -80°C gelagert werden.

Die HLA-Aufreinigung der Gewebe- und Zellproben wurden innerhalb des jeweiligen Projekts von Kooperationspartnern durchgeführt. Die hier in der Arbeit ausführlich gezeigten Proben stammen aus einer Kooperation von Daniel Kowalewski.

2.2.5 Analyse massenspektrometrischer Daten

Die Massenspektrometrie ist ein Verfahren, in der das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z -Verhältnis) von zu untersuchenden Substanzen gemessen und analysiert wird (Thomson, 1913; Aston, 1933). Dafür werden die Moleküle ionisiert in eine Gasphase gebracht. In dieser Arbeit wurde sogenannte Elektrospray-Ionisation (ESI) verwendet (Whitehouse et al., 1985; Fenn et al., 1989). Da die Komplexität der Proben eine Auftrennung der verschiedenen Peptidfragmente vor der Analyse im Massenspektrometer erforderte, wurde die Ionisationsquelle an eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) gekoppelt. Die durch das saure Lösungsmittel protonierten Analytmoleküle werden bei der ESI durch die LC-Kapillare in den an ein elektrisches Feld angeschlossenen ESI-Emitter (*Pico Tip*) geleitet. Durch die Kräfte des elektrischen Feldes sowie der Oberflächenspannung der Probe werden die Analytmoleküle als kleine geladene Lösungstropfen versprüht. Eine hoch angelegte Temperatur verdampft das Lösungsmittel, was eine Erhöhung der Ladungsdichte in den Tropfen zur Folge hat. Wird hierbei eine kritische Schwelle der Ladungsdichte überschritten, zerfällt der vorhandene Tropfen in kleinere (Coulomb-Explosion). Zur Entstehung der letztendlich gemessenen einzelnen Analytionen existieren zwei Modellvorstellungen. Zum einen das Modell des geladenen Rückstandes (*charged residue model*, CRM), welches besagt, dass durch die Explosionen kleine Tropfen mit nur einem einzelnen Analytion entstehen. Durch zusätzliche Verdampfung des Lösungsmittels erhält man ein einzelnes Molekül mit Ladung (Dole et al., 1968). Zum anderen existiert das Ionenemissionsmodell (*ion evaporation model*, IEM), das von einer direkten Ionenemission aus hoch geladenen Tropfen ausgeht (Nguyen et al., 2007).

Die Analyse der Ionen fand in einem Hybridmassenspektrometer vom Typ „LTQ Orbitrap XL“ statt. Das Gerät besteht aus den Komponenten eines *linear trap quadrupole* (LTQ) sowie einem Orbitrap-Massenanalysator (siehe Abbildung 2.9)

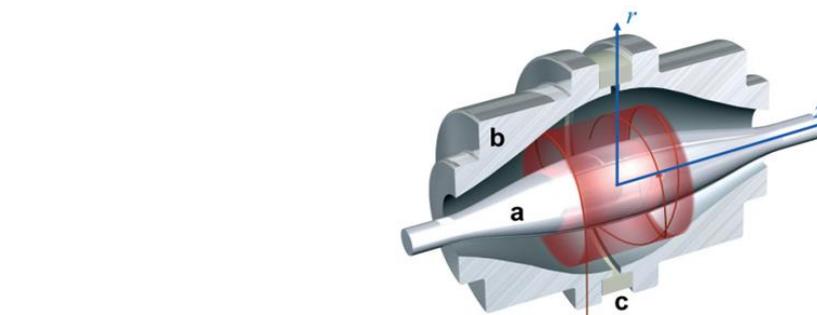
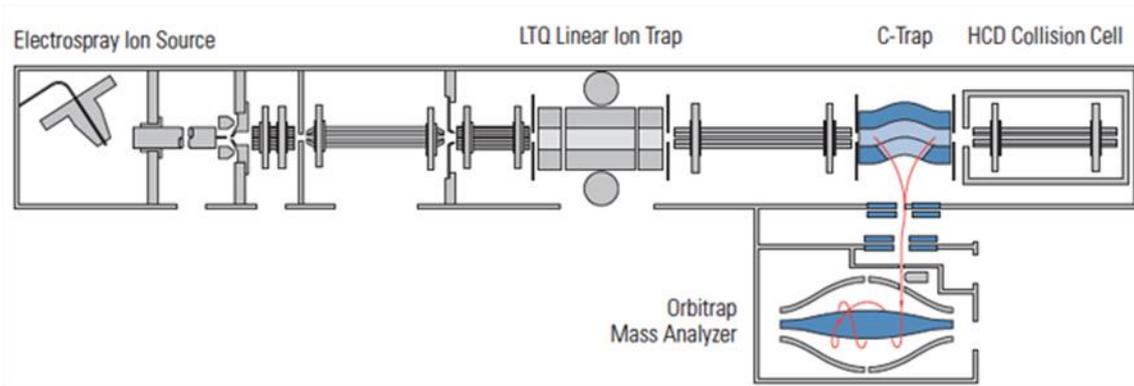


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung des Massenspektrometers LTQ Orbitrap mit einem Querschnitt durch den Orbitrap-Massenanalysator

Dargestellt in der oberen Abbildung ist die ESI-Quelle mit anschließender linearer Ionenfalle (*linear ion trap*). Im Anschluss dazu die ionensammelnde *C-trap* und die Orbitrap-Ionenfalle für die Bestimmung des m/z Verhältnisses. In der unteren Abbildung sieht man wie die injizierten Analytione in stabilen Orbits entlang der r -Achse um die zentrale Elektronenspindel (a) kreisen. Die Oszillation entlang der z -Achse ist abhängig von dem jeweiligen m/z -Verhältnis der Ionen und wird von der äußeren Elektrode gemessen (b). Diese werden durch einen isolierenden Keramikring zusammengehalten (c). Abbildungen aus (Scigelova et al., 2006).

Die lineare Ionenfalle (*linear ion trap*) sammelt die ionisierten Peptide von der ESI-Quelle, um ihn in Paketen an die *C-trap* weiter zu geben. Um das m/z -Verhältnis der unterschiedlichen Ionen zu bestimmen, werden die Analytione orthogonal in die Orbitrap injiziert. In der Orbitrap-Ionenfalle oszillieren die Ionen abhängig von ihrem m/z -Verhältnis durch elektrostatische Anziehungskraft radial um eine in der Mitte befindliche spindelförmige Elektrode (siehe Abbildung 2.9). Das m/z -Verhältnis wird anhand der harmonischen Oszillation der Ionen entlang der z -Achse des elektrischen Feldes zwischen beiden Elektroden errechnet. Signale dieser Oszillation können aufgenommen und durch einen mathematischen Algorithmus in ein Massenspektrum umgerechnet werden. Um zusätzliche Informationen für eine genaue Bestimmung der Peptidsequenz zu erhalten, wurde das Peptid mittels der Fragmentierungsstrategie der stoßinduzierten Dissoziation (*collision induced dissociation*, CID) fragmentiert (McLafferty, 1981; Biemann, 1990). Hierbei führt die Kollision der Analytione mit einem Inertgas zu einem Zerfall der Ionen zu Fragmenten mit spezifischen Massen. Die Kombination der in der Orbitrap gemessenen Peptidmassen mit der zusätzlichen Masse der Peptidfragmente erlaubt meist eine genaue Annotation der Aminosäuresequenz.

2.2.5.1 Probenvorbereitung für die massenspektrometrische Analyse

Um die Probe zu entsalzen und zu reinigen wurde sie erst mittels Vakuum-Zentrifugation eingeeengt (auf ca. 20 μ l) um dann an eine C₁₈-Matrix, welche sich in einer 10 μ l Pipettenspitze befindet (ZipTip_{C18}), gebunden zu werden. Die Probe wurde durch wiederholtes Pipettieren auf die Säule geladen und anschließend durch Waschen mit Lösungsmittel A* entsalzt. Eluiert wurde in 30 μ l Lösungsmittel B* durch mehrmaliges Pipettieren. Um die Probe in das für die MS/MS-Analyse geeignete Lösungsmittel A_{Load} aufzunehmen musste sie mittels der Vakuumzentrifuge vollständig eingeeengt werden. Normalerweise wurden, um eine dreimalige Messung von 5 μ l zu gewährleisten, 15 μ l des Lösungsmittel A_{Load} zugegeben. Die Lösung der Peptide wurde durch ein 5-minütiges Ultraschallbad sichergestellt. Proben konnten im Kühlschrank oder bei -20°C bis zur Messung aufgehoben werden.

2.2.5.2 Analyse der Peptide im Massenspektrometer

Die Analyse der Peptide im Massenspektrometer wurde anhand der von Daniel Kowalewski entwickelten „*Big5sensitivity*“-Methode gemessen (Kowalewski, 2011). In dem Orbitrap-Massendetektor wurde jede Sekunde mit einer Auflösung von 60000 ein Übersichtsspektrum der in der C-Trap über 500 ms gesammelten Ionen aufgenommen. Die fünf intensivsten Ionen aus dem Übersichtsscan wurden ausgewählt, fragmentiert und detektiert. Die Spektren wurden in einem Massenbereich von 300-1500 Da aufgenommen.

2.2.6 Auswertung massenspektrometrischer Daten

Fragmente die mittels des Massenspektrometers identifiziert wurden, müssen nun in Aminosäuresequenzen umgewandelt werden. In diesem Labor wird der MASCOT-Algorithmus verwendet der eine Software-gestützte Annotation von Fragmentspektren ermöglicht. Das Prinzip beruht auf dem Vergleich von gemessenen Peptidspektren mit den aus einer Datenbank künstlich generierten (siehe Abbildung 2.10). Die Datenbank enthält Proteinsequenzen beliebiger Anzahl und Ursprungs.

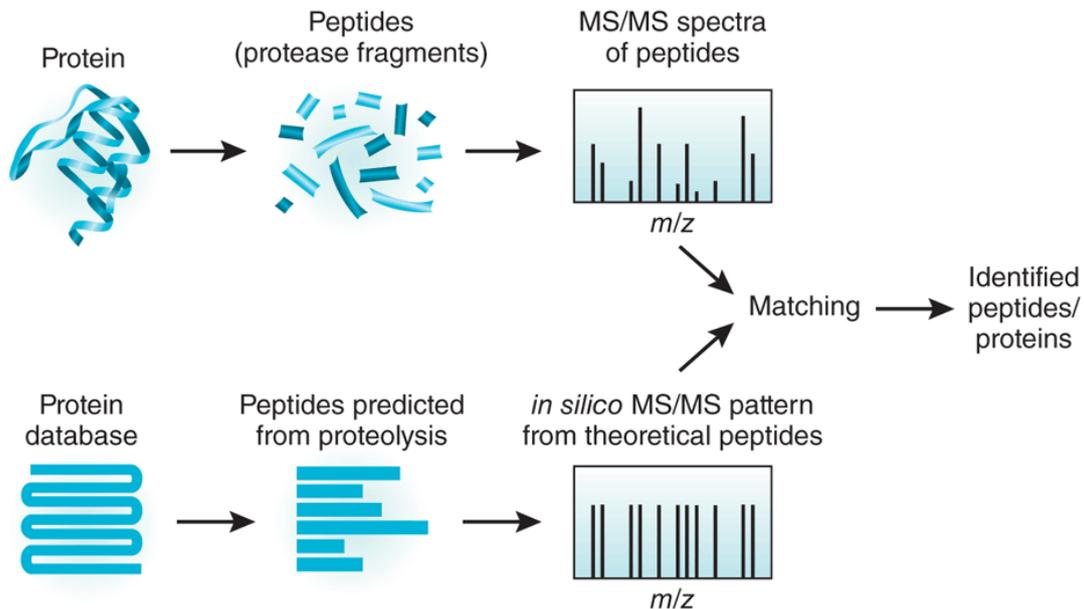


Abbildung 2.10: Prinzip der Umwandlung von Spektren zu Aminosäuresequenzen

Peptide die in diesem Fall durch enzymatische Proteolyse entstehen werden mittels eines Massenspektrometers fragmentiert und gemessen. Das entstandene Spektrum wird nun mit einem *in silico* generierten Spektrum welches aus einer Datenbank stammt verglichen (Duncan et al., 2010).

2.2.6.1 Peptid-Identifizierung mit MASCOT

Die verwendete Software *Proteome Discoverer* 1.4 übermittelte die Rohdaten des Massenspektrometers an einen lokalen MASCOT-Server (Mascot Software 2.2.04), um mit der Datenbank Uniprot/Swiss-Prot (Taxonomie *homo sapiens*) die Fragmentspektren zu annotieren.

2.2.6.2 Filterkriterien für die Peptid-Identifizierung

Angelegte Filterkriterien sollen die Qualität der generierten Daten sichern. Die angelegten Werte der Filterkriterien für MASCOT waren eine Genauigkeit von +/- 3 ppm für die Abweichung der theoretischen Masse des vorgeschlagenen Peptids zu der tatsächlich gemessenen Masse und 0,5 Da für die Annotation der Fragmentationen (Kowalewski, 2011). Zudem wurden dynamische Modifikationen zugelassen wie die Oxidation von Methionin und die Carbamidomethylierung von Cysteinen (resultiert aus dem Protokoll „Enzymatischer Verdau von Proteinen“, Kapitel 2.2.4).

Um die Qualität der Daten über verschiedene Experimente gleichzuhalten gibt es zwei weitere wichtige Filtergrößen. Der erste Wert *Ionscore* wurde in dieser Arbeit vernachlässigt, sollte aber anhand seiner häufigen Benutzung erwähnt werden. Die Software *Proteome Discoverer* errechnet für jede Annotation eines Fragmentspektrums eine Punktzahl. Dieser *Ionscore* berechnet die Wahrscheinlichkeit, dass die Übereinstimmung eines experimentell erzeugten Fragmentspektrums mit einer *in silico*-Peptidsequenz aus der Datenbank nur zufällig vorhanden ist. In anderen Worten gibt dieser Wert Auskunft darüber, wie gut eine

vorgeschlagene Peptidsequenz auf das ausgewählte experimentell entstandene Fragmentspektrum passt. Wichtiger für diese Arbeit war die in der Proteomik verwendete FDR (*false discovery rate*) (Elias et al., 2007). Hierbei wird eine Bewertung vorgenommen wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, ob eine falsch-positive Peptid-Identifikation vorliegt. Dafür wird eine *decoy database* (Köderdatenbank) benötigt, die dem Inhalt der verwendeten Datenbank für die Peptidannotation entspricht, mit dem Unterschied, dass alle Proteinsequenzen revers also rückwärts vorliegen. Dies hat zur Folge, dass keine realen Proteinsequenzen vorliegen, aber trotzdem alle Einträge der normalen Datenbank vorliegen. Wenn man also eine FDR von 1% anlegt bedeutet dies, dass 1% der Peptidspektren durch Zufall in der *decoy database* gefunden werden konnten. Im Umkehrschluss sind also 99% der Peptidannotationen korrekt. In dieser Arbeit wurden ausschließlich nur Peptide verwendet die eine FDR von $\leq 1\%$ haben. Eine Art semi-quantitative Aussage kann über die sogenannten *peptide-spectrum matches* (PSMs, Zuordnung von Spektren zu Peptidsequenzen) getroffen werden. Der Wert gibt die Anzahl der Spektren an, die zu einem annotierten Peptid passen. Umso höher die Zahl umso häufiger wurde das Peptid fragmentiert und ein Spektrum aufgenommen, was zu dem Schluss führen kann, dass das Peptid häufig in der Probe vorlag. Weitere Filterkriterien können anhand der vorliegenden Fragestellung variieren (siehe 2.2.6.3, 2.2.6.6 und 2.2.6.7).

2.2.6.3 Identifikation von Proteinen über enzymatische Peptide

Bei der Identifikation von Proteinen über enzymatische Peptide wird sich zunutze gemacht, dass die gemessene und identifizierte Aminosäureabfolge des Peptids der des Ursprungproteins entspricht. Somit kann nach der Annotation der Spektren über ein Programm ein Sequenzabgleich (*basic local alignment search tool*, BLAST) vollzogen werden. Diese Herangehensweise nennt man üblicherweise *bottom-up* Proteomik (siehe Abbildung 1.10). Falls erwünscht kann bei der Prozessierung der Daten eine enzymatische Spezifität angelegt werden. Hierbei werden bei der Suche dann nur Peptide berücksichtigt die dem ausgewählten enzymatischen Schnittmuster entsprechen. Für Trypsin waren das die Aminosäuren Lysin (K) und Arginin (R) und bei Chymotrypsin Phenylalanin (F), Tryptophan (W) und Tyrosin (Y). Bei beiden Enzymen erfolgte die Aufhebung einer Schnittstelle falls ein Prolin folgte. Eine weitere Möglichkeit ist zu entscheiden, ob so genannte *missed cleavages* (MC, verpasste enzymatische Schnittstellen) erlaubt werden. Dies gibt der Software vor, wie viele Schnittstellen von dem Enzym verpasst werden dürfen. Somit vergrößert man die Zahl der potenziell auffindbaren Peptidspezies.

2.2.6.4 Identifikation von HLA-Allotypen über enzymatische Peptide

Für die Identifikation von HLA-Allotypen über enzymatisch verdaute Peptide wurde der bereits beschriebene *bottom-up* Proteomik-Ansatz verwendet. Hierbei zu erwähnen sind die

unterschiedlichen Aussagen, die durch einzelne Peptide getroffen werden können. Die Problematik, dass das HLA-Protein einerseits hochpolymorphe Regionen im Kontrast zu hochkonservierten Regionen besitzt, macht eine Identifikation über einzelne Peptide einerseits sehr leicht und andererseits sehr schwer. Im Folgenden sind drei Beispiele aufgeführt, wie sie in der Auswertung beobachtet werden könnten. Die Proteinquelle ist über die Datenbank Uniprot/Swiss-Prot (Taxonomie *homo sapiens*) zugeteilt worden.

Tabelle 2.16: Einteilung der HLA-Peptide

Peptidsequenz	AS Position	Proteinquelle HLA-	Bezeichnung
APWIEQEGPEYWDGETRK	73-90	A*02	<i>unique</i>
MYGCDVGSDWR	122-132	A*02, A*69	<i>hint</i>
APWIEQEGPEYWDGETR	73-89	A*02, B*57, B*58	<i>hint</i>
FSDAASQR	60-68	A, 19 Allotypen	<i>shared</i>

Die Definition eines *unique* Peptids ist, dass dieses Peptid nur von einem HLA-Allotyp stammen kann. Wird dieses Fragment in einer Messung gefunden, gilt der HLA-Allotyp als identifiziert. Die *hint* Peptide geben einen Hinweis auf eine kleinere Gruppe von HLA-Molekülen. Sie unterstützen idealerweise die identifizierten *unique* Peptide. Möglich ist in manchen Fällen durch Vergleich mehrerer *hint* Peptide auf einen Allotyp zu schließen. Hierfür sind in Tabelle 2.16 zwei unterschiedliche *hint* Peptide gelistet. Vergleicht man beide miteinander, fällt auf, dass sie HLA-A*02:01 teilen. Werden beide Fragmente in einer Messung gefunden, liegt die Folgerung nahe, dass HLA-A*02:01 in der Probe enthalten sein muss. Die letzte Peptid-Kategorie *shared* hat ihren Ursprung in den konservierten Regionen der HLA-Allotypen. Sie können von vielen HLA-Molekülen stammen und lassen nur Aufschluss darüber, dass das HLA-Protein in der gemessenen Probe vorhanden sein muss.

Eine alternative Datenbanksuche wurde erstellt basierend auf HLA-Sequenzen aus dem „Anthony Nolan Research Institute“ (<http://hla.alleles.org/data/index.html>, Stand November 2014) und der Internetseite www.allelefreqencies.net. Das Kriterium für die Aufnahme von Sequenzen in die Datenbank war eine Identifikation in der hiesigen Bevölkerung. Die Datenbank wurde aus drei Datensätzen generiert und beinhaltet insgesamt Einträge von 48725 Personen die in HLA Klasse I typisiert worden sind (http://allelefreqencies.net/pop6001b.asp?pop_polyreg=HLA&pop_geog_region=Europe).

2.2.6.5 HLA-Annotation mittels Peptidmotiven von Gewebe- und Zellproben

Anhand der experimentellen Vorgehensweise sollten die Peptide die durch die HLA-Liganden-Isolierung identifiziert wurden, alle ein definiertes HLA Klasse I-Motiv aufweisen. Die Restriktion von Peptiden zu den HLA-Molekülen kann hierbei durch das spezifische Aminosäuremuster die vorliegenden HLA-Allotypen reflektieren (Di Marco, 2014). Hierfür

kann eine computergestützte Epitopvorhersage mit den experimentell gewonnenen Daten durchgeführt werden. Insgesamt wurden zwei verschiedene Vorhersage-Programme verwendet, welche mithilfe des von Linus Backert entworfenen Programms „Ligandomat“ durch eine einzige Suche analysiert werden können. Zum einen gibt es das Programm SYFPEITHI (hausinterne Version 03.02.15), welches neben einer Vielzahl von MHC Klasse I- und II-Liganden auch bereits beschriebene T-Zellepitope enthält (Rammensee, Bachmann et al., 1999). Das zweite Programm NetMHC Version 3.4 basiert auf der Bindeaffinität eines Peptids zu HLA-Allotypen (Lundegaard, Lund et al., 2008). Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen nur echte HLA Klasse I-Liganden in die Analyse aufzunehmen, wurden folgende Filterkriterien angelegt (siehe Tabelle 2.17).

Tabelle 2.17: Filterkriterien für HLA Klasse I-Liganden

Kriterium	Filter
Ladungszustand	2-3
<i>Ionscore</i>	≥ 15
Rang	1
Massenabweichung	≤ 5 ppm
FDR	0,01
Peptidlänge	8-12

Die daraus resultierende Peptidliste wird nun genutzt um den Abgleich mit den zwei verschiedenen Datenbanken durchzuführen. SYFPEITHI basiert auf experimentell gewonnenen Daten von natürlichen HLA-Liganden die von den zugehörigen HLA-Molekülen eluiert wurden. Aufgrund dieser Daten wurden Matrizen gebildet für die jeweiligen HLA-Allotypen, die eine Aussage darüber machen, welche Ankeraminosäure in welcher Position bevorzugt wird. Die Motivübereinstimmung wird durch die Matrizen mit Punkten bewertet, wobei die höchste erreichte Punktzahl (hohe Motivübereinstimmung) die Zuordnung des Peptids zu dem Allotyp bestimmt. NetMHC basiert ebenso auf experimentell gewonnenen Daten, wobei hier die Interaktion des Peptids mit den HLA-Allotypen bewertet wird. Bewertet wird, bei welcher Konzentration ein bestimmtes Peptid zu 50% an ein definiertes HLA-Molekül bindet. Dieser Wert wird in nM angegeben und starke Binder werden mit unter 50 nM definiert.

Einige Allotypen ähneln sich in ihrem Peptidmotiv stark. Darum werden sie gruppiert um ein klareres Ergebnis zu erzielen. Jedes Peptid kann nur einmal einem Alloyp oder einer Allotypgruppe zugeordnet werden.

2.2.6.6 Identifikation von HLA-Allotypen über präsentierte HLA-Peptide

Alle Proteine die in der Zelle oder endosomal abgebaut werden, haben rein theoretisch die Chance als Peptid auf ein HLA-Molekül gebunden und an der Zelloberfläche präsentiert zu

werden. Dies gilt auch für HLA-Proteine. Für die Suche wurden hierfür die Filterkriterien von Tabelle 2.17 angelegt. Zusätzlich wurden Liganden-Daten von HLA Klasse II-Analysen herangezogen, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, präsentierte HLA-Peptide zu finden. Der hierfür angelegte Filter für die Liganden-Daten ist in Tabelle 2.18 zu sehen.

Tabelle 2.18: Filterkriterien für Klasse II-Liganden

Kriterium	Filter
Ladungszustand	2-4
<i>Ionscore</i>	≥ 20
Rang	1
Massenabweichung	≤ 5 ppm
FDR	0,01
Peptidlänge	8-25

2.2.6.7 Quantifizierung über isotopenmarkierte Peptide

Die Quantifizierung über isotopenmarkierte Peptide ist eine gängige Methode in der Proteomik. Durch die gesammelte Erfahrung über mehrere Experimente hinweg konnten immer wieder Peptide entdeckt werden, die nicht nur spezifisch für einen HLA-Allotyp waren sondern auch relativ zuverlässig identifiziert wurden. Über die natürlich vorkommenden Peptide ist es möglich eine Quantifizierung über künstlich hergestellte Peptide zu treffen. Dafür werden die künstlichen Peptide in einer definierten Menge zu der Probe mit den Peptiden unbekannter Menge beigemischt um somit eine Aussage zu treffen. Um das künstliche Peptid von dem natürlichen zu unterscheiden wird in der Sequenz eine isotopenmarkierte Aminosäure eingebaut.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse von T-Zellstimulationen *in vitro*

Die T-Zellstimulation *in vitro* stellt in der Peptid-basierten Immuntherapie ein gutes Werkzeug dar, um die Immunogenität von HLA Klasse I-Peptiden an menschlichen Zellen in einem hohen Durchsatz zu testen. Die mit HLA:Peptid-Komplex beladenen künstlichen Zellen werden zusammen mit Kostimulationsfaktoren zu isolierten CD8-positiven Zellen gegeben, um eine Antigen-spezifische Antwort auszulösen. Diese wiederum lässt sich durch Färbemethoden visualisieren und analysieren. Im Folgenden werden die grundlegende durchflusszytometrische Auswertung vorgestellt sowie die Ergebnisse verschiedener Projekte, bei denen die T-Zellstimulation *in vitro* im Mittelpunkt steht.

3.1.1 Analyse von aAPC-Stimulationen mittels durchflusszytometrischer Analyse

Die Analyse von CD8-positiven T-Zellen erfolgte, wenn nicht anders erwähnt, mittels einer Oberflächenfärbung und durchflusszytometrischer Analyse. Der Nachweis von Antigen-spezifischen T-Zellen ist die Bindung des TCR an das HLA-Tetramer. Um unspezifische Bindungen und somit falsch-positive Ergebnisse auszuschließen wurden alle in der Analyse verwendeten HLA-Tetramere auch auf Spenderzellen getestet, die nicht den passenden HLA-Allotyp besitzen (siehe 3.1.1.2). Als weitere Negativ-Kontrolle dienten Zellen, die mit HLA-Monomeren stimuliert wurden, welche ein anderes Peptid gebunden hatten als das für die Analyse verwendete HLA-Tetramer. Dadurch sollte eine unspezifische Stimulation der Zellen ausgeschlossen werden. Falls genügend Zellen nach der CD8-Isolation vorhanden waren, wurde zusätzlich eine Färbung und Analyse der Zellen *ex vivo* durchgeführt. Dies sollte der Überprüfung dienen ob die positive Population durch die aAPC-Stimulation erzeugt wurde oder schon vor der Simulation vorhanden war.

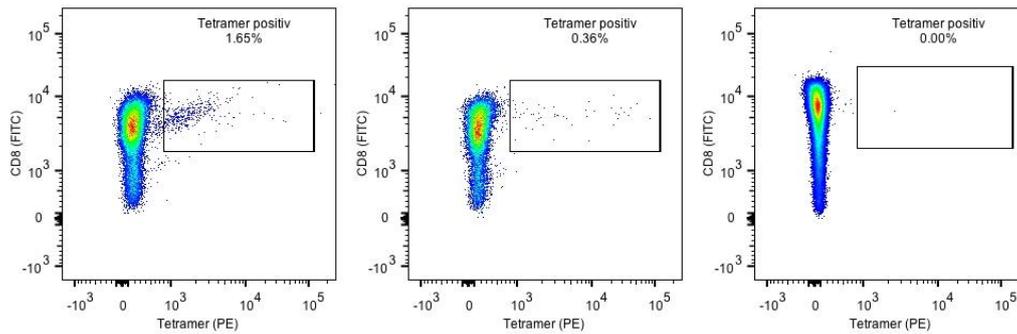


Abbildung 3.1: Überprüfung von unspezifischen Bindungen von HLA-Tetrameren

Links abgebildet ist eine Antigen-spezifische CD8-positive T-Zellpopulation, welche mit einem HLA-B*07:02-Tetramer nachgewiesen wurde. Die Abbildung in der Mitte zeigt die Färbung und Analyse mit demselben HLA-Tetramer, aber mit Zellen welche nicht mit dem HLA-B*07:02-Monomer stimuliert wurden. Die rechte Abbildung zeigt mit HLA-Tetramer gefärbte unstimulierte CD8-sortierte Zellen.

Um die Anzahl Antigen-spezifischer CD8-positiver T-Zellen bewerten zu können, wurden nur lebendige und einzelne Zellen in der Analyse betrachtet (siehe Abbildung 3.2).

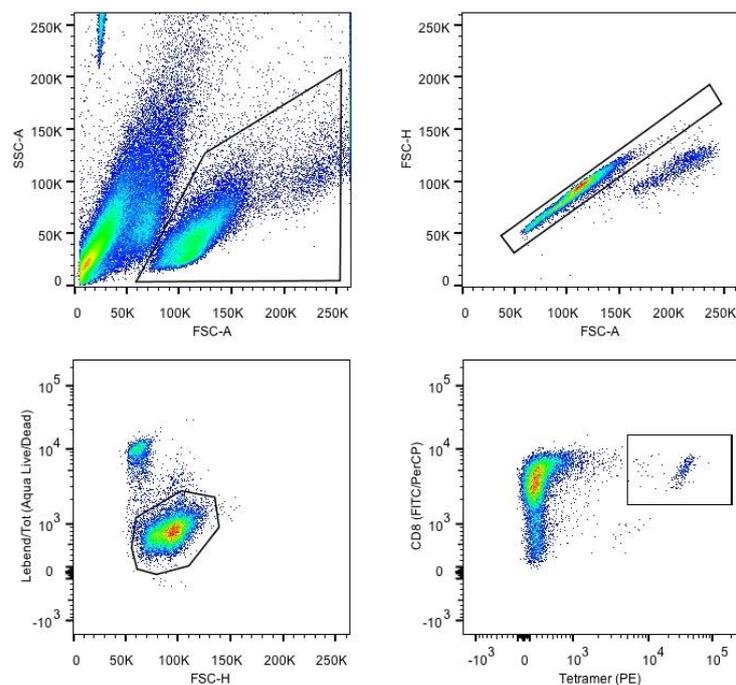


Abbildung 3.2: Auswertestrategie für die Analyse von Antigen-spezifischen CD8-positiven T-Zellen

Die Auswahl der lebenden und einzelnen Zellen erfolgt hierarchisch. Dies hat zur Folge, dass nur Zellen die sich in dem *gate* befinden, betrachtet werden. Als erstes wurden die Lymphozyten ausgewählt (oben links). Dies erfolgt durch Größe und Granularität der Zellen (Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (FSC gegen SSC)). aAPCs (links oben) und Zelltrümmer von abgestorbenen Zellen (von links unten nach rechts oben ziehend) konnten somit aus der Analyse entfernt werden. Im nächsten Schritt wurde die FCS-Fläche (FSC-A) gegen die Höhe (FCS-Höhe) aufgetragen um Dupletten zu entfernen (oben rechts). Durch den Farbstoff Aqua Live/Dead konnten die lebenden von den toten Zellen getrennt werden (unten links). Unten rechts werden die CD8-positiven Antigen-spezifischen T-Zellen durch das fluoreszenzgekoppelte HLA-Tetramer visualisiert. Diese Abbildung wurde repräsentativ für alle Analysen der T-Zellstimulationen mit den Spenderzellen J65 durchgeführt. Stimuliert und gefärbt wurden die Zellen mit einem HLA-B*07:02-Monomer mit gebundenem Peptid RPPIFIRRL.

3.1.1.1 Definition positiver T-Zellstimulationen

Bei biologischen Proben besteht oft die Schwierigkeit einer einheitlichen Analyse der Ergebnisse. Um falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse auszuschließen wurde in dieser Arbeit folgende Regel angewendet: eine T-Zellstimulation wird als positiv gewertet, wenn der Prozentwert der Antigen-spezifischen T-Zellen mindestens bei 0,10% oder doppelt so hoch im Vergleich zur Negativ-Kontrolle liegt. In Abbildung 3.3 sind von verschiedenen Spenderzellen Antigen-spezifische T-Zellpopulationen gezeigt. Die Bewertung einer positiven T-Zellstimulation wurde anhand der Negativ-Kontrolle getroffen. Die obere Abbildung zeigt eine Antigen-spezifische T-Zellpopulation, die nicht den Wert von 0,1% erreicht und somit als negativ gewertet werden muss. Die zweite Abbildung ist im Vergleich zu der negativen Kontrolle eine positive Antigen-spezifische T-Zellpopulation. Bei der untersten Abbildung ist der Wert der Negativ-Kontrolle hoch, die T-Zellstimulation kann aber anhand der größeren T-Zellpopulation als positiv gewertet werden.

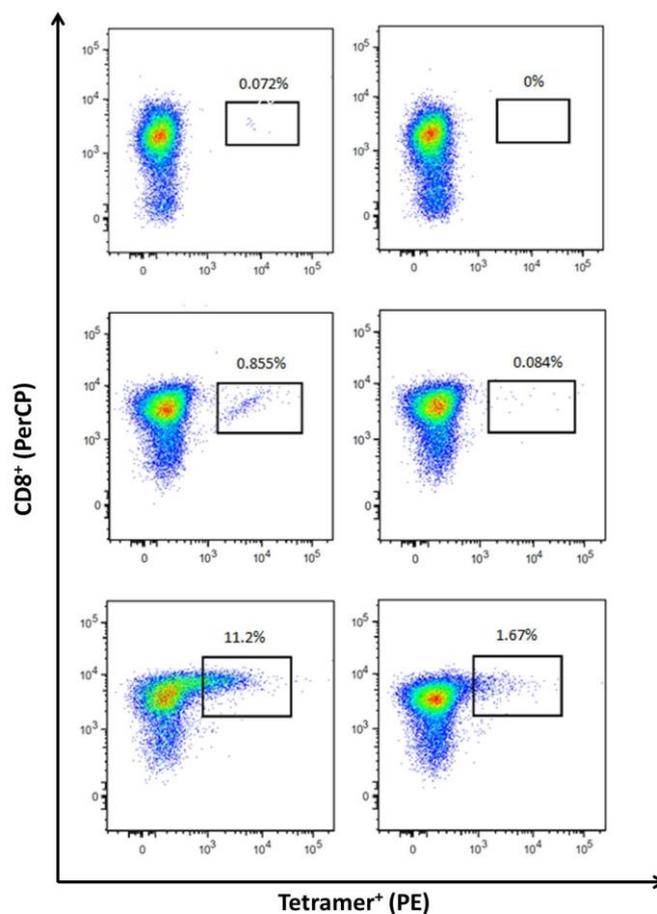


Abbildung 3.3: Positive T-Zellstimulationen

Abgebildet sind drei Beispiele aus T-Zellstimulationen (jeweils linkes Bild) mit der zugehörigen Negativ-Kontrolle (jeweils rechtes Bild). Die *gates* zeigen den prozentualen Anteil CD8- und HLA-Tetramer-positiver T-Zellen an. Die Abbildungen stammen aus Analysen von unterschiedlichen Spenderzellen.

3.1.1.2 Kontrolle der HLA-Tetramere

Um auszuschließen, dass die positiv bewerteten Zellpopulationen nicht aus einer unspezifischen Bindung resultieren, wurden eine zusätzliche Färbung mit sogenannten *mismatch*- (Nichtübereinstimmung) Spenderzellen durchgeführt. Hierbei stimmt der HLA-Allotyp der Zellen nicht mit dem gebundenen HLA-Monomer überein.

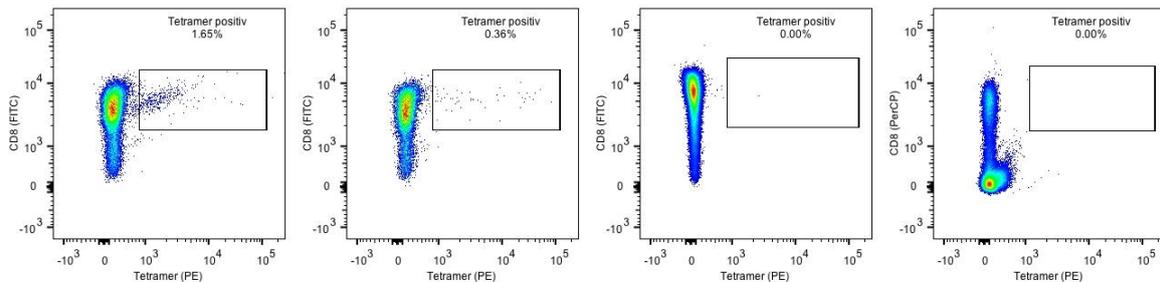


Abbildung 3.4: Ausschluss unspezifischer HLA-Tetramerbindungen

Die ersten drei Abbildungen stammen aus Abbildung 3.1. Die rechte Abbildung zeigt die Färbung des HLA-Tetramers auf Zellen eines Spenders, der in keinem HLA-Lokus HLA-B*07:02 kodiert und welche somit das B*07:02-Tetramer nicht binden dürften. Der direkte Vergleich zu Spenderzellen, die den Allotyp tragen zeigt, dass Färbung und Analyse spezifisch für Antigen-spezifische T-Zellen sind.

3.1.1.3 MACS-Protokolloptimierung

Die Zellsortierung über magnetisch gekoppelte Antikörper ist eine schnelle und effektive Methode. Das MACS-Kit wird mit firmeneigenem Protokoll geliefert. Durch den hohen Verbrauch an MACS-Kit kam die Überlegung auf, ob durch Reduzierung des Materialeinsatzes eine Ersparnis bei gleichbleibender Ausbeute und Qualität möglich wäre.

In Abbildung 3.5 ist ein Vergleich des firmenvorgegebenen Protokolls, hier als „alt“ gekennzeichnet, mit dem neuen Protokoll (Bezeichnung „neu“) zu sehen. Im neuen Protokoll wurden alle Puffer- und Kit-Einsätze mit dem Multiplikator 0.75 verrechnet. Zellen aus zwei Spendern wurden aufgeteilt und mit dem alten sowie neuen Protokoll behandelt. Wie in Abbildung 3.5 zu sehen, ist durch Reduzierung an Material kein Verlust an isolierten Zellen sichtbar (linke Abbildung). Um nicht an die Matrix gebundene CD8⁺ T-Zellen mit in die Auswertung einzubeziehen wurde der Durchfluss ebenfalls mit analysiert (rechte Abbildung). Minimale Abweichungen können durch den Einfrier- und Auftauprozess entstehen.

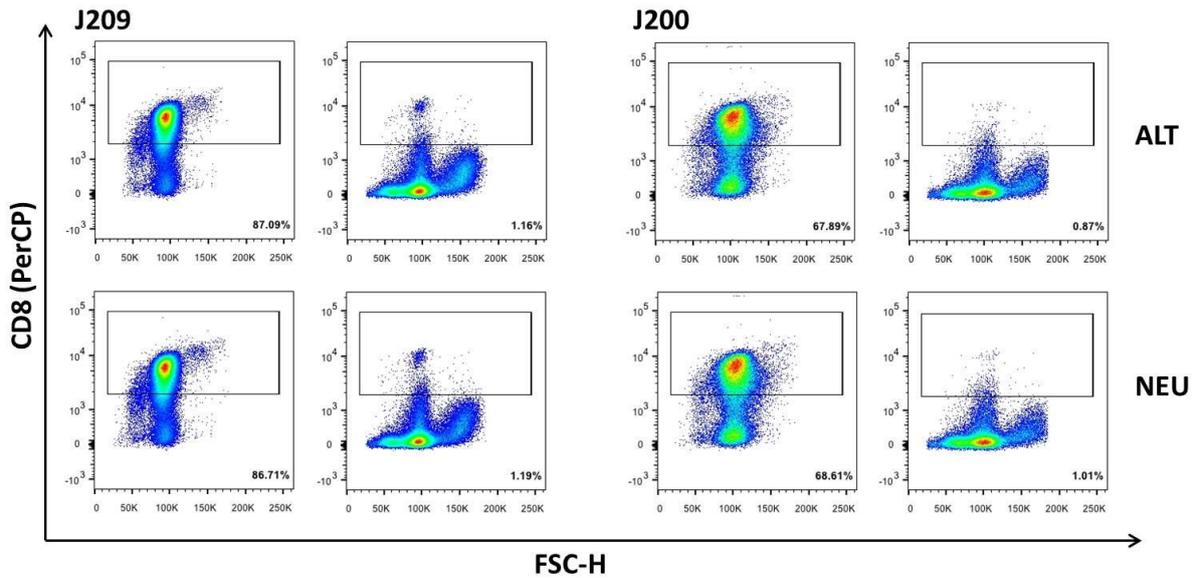


Abbildung 3.5: Optimierung des MACS-Protokolls

Abgebildet sind gefärbte Zellen von zwei Spendern (J209 und J200), die mit dem alten und dem neuen MACS-Protokoll behandelt wurden. Links ist die aufgereinigte Probe (nach MACS-Isolierung) abgebildet und rechts der Durchfluss, der keine CD8⁺ T-Zellen mehr beinhalten dürfte.

3.1.1.4 Bindung und Biotinylierung von Antikörpern

Bei der künstlichen T-Zellstimulation mit aAPCs verwendet man zusätzlich zu dem HLA:Peptid-Komplex kostimulatorische Antikörper, um eine optimale Stimulation der T-Zellen zu erhalten. Für die Bindung an die Streptavidin-gekoppelte Oberfläche der aAPC wurden die hausintern produzierten Antikörper über einen Biotinylierungs-Kit biotinyliert.

Um die Biotin-Kopplung zu überprüfen wurden die biotinylierten Antikörper mit aufgetauten Zellen getestet (siehe 2.2.3.6). Dadurch zeigte sich, ob die Antikörper in der Lage waren ihr Antigen auf den Zellen zu erkennen (Sekundärantikörperfärbung in Abbildung 3.6, links) und ob diese Antikörper biotinyliert sind (PE-gekoppeltes Streptavidin). In Abbildung 3.6 ist zu erkennen, dass die Biotinylierung von OX40- (blau) und CD28-Antikörpern (rot) erfolgreich war. Die Signale grenzen sich beide klar von der Isotyp-Kontrolle ab. Auf den Zellen kann man eine erhöhte Expression von CD28-Antigen im Vergleich zu dem OX40-Antigen feststellen. Die Bindung des OX40-Antikörpers an T-Zellen wurde bereits von Martin Hoffmann bewiesen. Bei der Färbung in verschiedenen Antikörper-Konzentrationen (0,625 µg/ml bis zu 10 µg/ml) waren keine Unterschiede erkennbar.

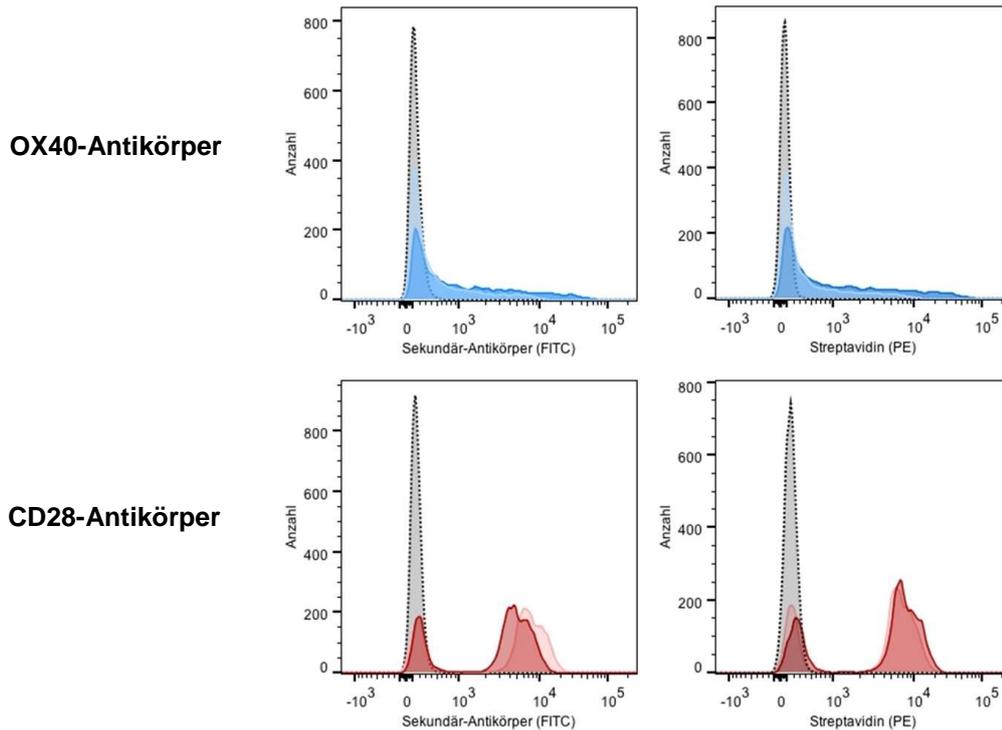


Abbildung 3.6: Biotinylierungs- und Bindungsnachweis des CD28- und OX40-Antikörpers

Abgebildet ist oben in blau die Bindung und Biotinylierung des OX40-Antikörpers sowie unten in rot die des CD28-Antikörpers. Aufgetragen sind die Färbungen gegen eine Isotyp-Kontrolle. Die Antikörper wurden in mehreren Konzentrationen gefärbt. In der helleren Farbe ist ein 0,625 µg/ml- und in dunklerer Farbe ein 10 µg/ml-Ansatz gezeigt.

3.1.2 Das MultiPro-Projekt

Um für die Peptid-basierte Immuntherapie Impfpeptide zu identifizieren wird in unserer Arbeitsgruppe Patientenmaterial malignen sowie benignen Ursprungs auf Unterschiede in der Peptidpräsentation untersucht. Dafür werden die Zellen oder das Gewebe zerkleinert, HLA-Moleküle isoliert, gebundene Liganden eluiert und mittels massenspektrometrischer Analyse identifiziert. Das Ziel des MultiPro-Projekts ist die Identifizierung von geeigneten Impfpeptiden für Prostata-Krebspatienten mit einem biochemischen Rezidiv. Dafür wurden aus Prostata-spezifischem Gewebe HLA-Liganden isoliert, identifiziert und charakterisiert. Die Isolation und Auswahl der Peptide erfolgte durch Christian Hotz (Hotz, 2014). Um identifizierte Kandidaten-Peptide in eine klinische Studie zu bringen, sollte vorab gezeigt werden, dass diese Peptide eine Immunantwort induzieren können und somit ein wertvoller Bestandteil des Impfcocktails wären.

Um einen hohen Test-Durchsatz der Peptide in kurzer Zeit zu bewerkstelligen, wurde die künstliche T-Zellstimulation verwendet. Dafür wurden die Kandidaten-Peptide auf HLA-Moleküle gebunden um sie dann mit einem kostimulatorischen Antikörper gegen CD28 an künstliche Antigen-präsentierende Zellen zu binden. Diese aAPCs werden dann verwendet um CD8-positive T-Zellen aus gesunden Spendern *in vitro* zu stimulieren. Im Idealfall kann

dann eine Antigen-spezifische Antwort über eine HLA-Tetramerfärbung nachgewiesen werden. Diese Antigen-spezifische Antwort kann einen Hinweis auf Funktionalität und Immunogenität des Peptides *in vivo* geben. Ziel ist es außerdem Peptide mit unterschiedlichem HLA-Bindemotiv zu finden um die HLA-Allotyp-Abdeckung in der Bevölkerung zu erhöhen. Zudem können mehrere Peptide aus unterschiedlichen Quellproteinen eine Evolution und Evasion des Tumors möglicherweise verhindern. Die Isolation, HLA-Zuordnung sowie Vorauswahl der Peptide wurden von Christian Hotz durchgeführt (Hotz, 2014) und werden hier nicht weiter ausgeführt.

Das MultiPro-Projekt ist ein multizentrisches Projekt in Kooperation mit der Technischen Universität Dresden, dem Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg, der LMU München sowie der Technischen Universität München. Dies hat den Vorteil, dass durch die Verteilung eine höhere Anzahl an Peptiden in kürzerer Zeit getestet werden kann. In Tabelle 3.1 befinden sich die getesteten Peptidsequenzen mit ihrer HLA-Zuordnung, Proteinherkunft sowie die Anzahl der Spenderzellen, an denen das Peptid in einer HLA-Tetramerfärbung positiv getestet wurde. Weitere Peptide die von den Kolleginnen Stefanie Souczek und Janet Peper sowie den Kooperationspartnern des MultiPro-Projekts gemessen wurden, sind im Anhang aufgelistet

Tabelle 3.1: Getestete Peptide aus dem MultiPro-Projekt

Herkunft (Position)	Sequenz	HLA-Restriktion	Positiv getestete Spender/ Spender getestet
MYH11 (134-142)	YSEKIVDMY	A*01:01	0/3
RAM (19-29)	FTENDKEYQEY	A*01:01	0/1
MYLK (718-726)	GTQPWFISK	A*11:01	1/2
IGF1 (5-13)	SSLPTQLFK	A*11:01	3/4
MYH11 (352-362)	SVLQLGNIVFK	A*11:01	1/3
HDAC1/2 (86- 94; 87-95)	EYSKQMQRF	A*24:02	0/2
FOLH1 (606-614)	KYADKIYSI	A*24:02	1/2
KLK2 (128-137)	EPAKITDVVK	A*68:01	0/1
MYH11 (1933-1941)	ETSFVPSRR	A*68:01	1/1
KLK4 (105-113)	HPEYNRPLL	B*07:02	4/5
EP300 (15-23)	RPKLSSPAL	B*07:02	0/1
HDGF (231-240)	APGIRDHESL	B*07:02	2/4
KLK2 (87-96)	GQRVPVSHSF	B*15:01	0/1
KLK2 (35-43)	SQPWQVAVY	B*15:01	0/1
MCL1 (67-75)	VQRNHETAF	B*15:01	0/1
NKX3.1 (91-99)	AETEPERHL	B*40:02	0/1

Die Auswertung der HLA-Tetramerfärbung nach einer T-Zellstimulation mit aAPCs *in vitro* ist in Abbildung 3.7 an dem Beispiel HPEYNRPLL aus dem Protein Kallikrein-4 zu sehen.

Abgebildet ist der prozentuale Anteil HLA-Tetramer- und CD8-positiver T-Zellen in unterschiedlichen Spenderzellen. Die roten Punkte stellen eine Antigen-spezifische T-Zellpopulation in einem *well* dar. Negativ bewertete *wells* werden in blau dargestellt. Diese Bewertung wurde in Bezug auf die Negativ-Kontrolle getroffen und ist anhand von zwei Experimenten (Spender J65 und J72) verdeutlicht. Hierbei gelten die in Kapitel 3.1.1.1 aufgestellten Regeln. Wenn die Negativ-Kontrolle 0,00% entspricht, dann muss eine Antigen-spezifische Population mindestens 0,1% betragen. Ist die Negativ-Kontrolle \neq 0,00% muss die Antigen-spezifische Population mindestens den doppelten Wert erreichen.

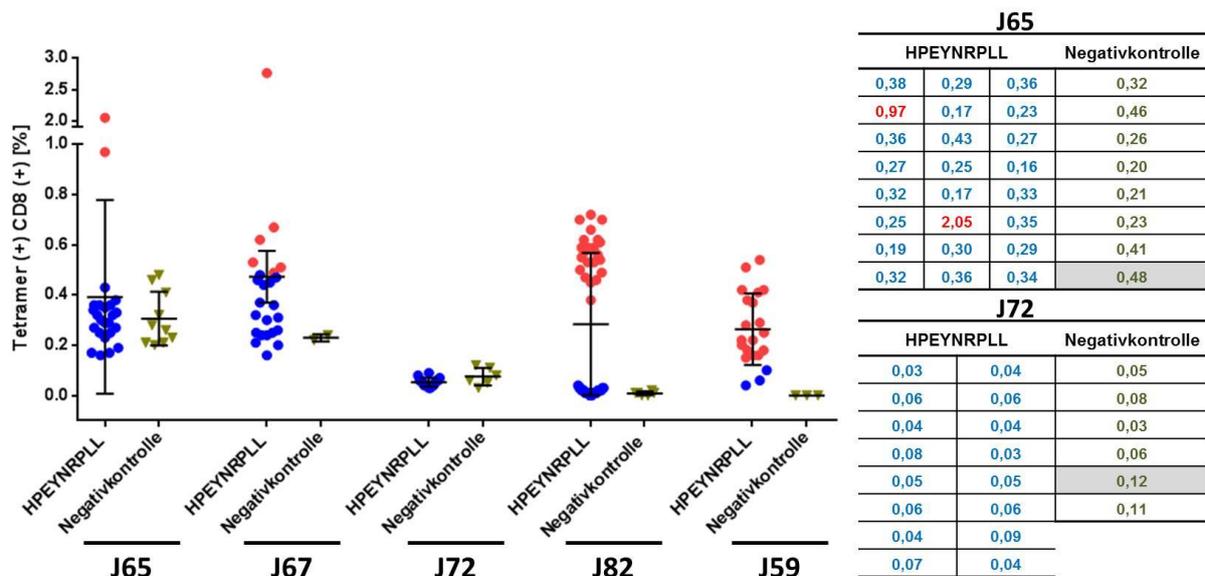


Abbildung 3.7: Stimulationen verschiedener Spenderzellen mit dem Peptid HPEYNRPLL

Links ist ein Überblick über T-Zellen, die mit dem Peptid HPEYNRPLL *in vitro* stimuliert und gefärbt wurden. Ein Punkt entspricht einem *well* im Experiment. In jedem Experiment wurde die Negativ-Kontrolle gegen die Antigen-spezifische Population aufgetragen. Rechts abgebildet sind zwei Auszüge aus Experimenten mit den Spenderzellen J65 und J72. Der in der Tabelle grau unterlegte Wert zeigt den höchsten negativen Wert an. Rote Zahlen zeigen Antigen-spezifische T-Zellpopulationen an.

Für sieben von den insgesamt 16 getesteten Peptiden konnte eine Antigen-spezifische Population nachgewiesen werden.

3.1.3 Optimierung

Etablierte Methoden in einem Labor sollten neben ihrer Funktionalität auch vergleichbar sein. Eine bestehende Methode zu optimieren heißt, den Faktor der Funktionalität zu erhöhen ohne den der Vergleichbarkeit herabzusetzen. Eine optimierte Methode muss im Vergleich mit der alten Methode in Konkurrenz treten und mit einem verbesserten Ergebnis hervorgehen.

Bei einem komplexen Thema wie der T-Zellstimulation mit künstlichen APCs sind Optimierungen immer erwünscht um das künstliche Konstrukt näher an die *in vivo*-Situation

zu bringen und dabei die Ausbeute immunogener Peptide zu erhöhen. Optimierungen können an den verschiedensten Stellen eingebracht werden.

In dieser Arbeit wurde durch zwei Faktoren versucht das künstliche System zu optimieren: die während der Stimulation hinzugegebenen kostimulatorischen Antikörper auf den aAPCs und die Zytokine. Der Erfolg einer Optimierung im Bereich der T-Zellstimulation kann an drei verschiedenen Anhaltspunkten gezeigt werden: die Anzahl der positiven *wells* pro Peptid, die Anzahl der Peptid-spezifischen T-Zellen und die Funktionalität der Antigen-spezifischen T-Zellen. Eine Verbesserung in allen Punkten stellt das zu erreichende Ziel dar.

3.1.3.1 Kostimulatorischer Antikörper α OX40

Neben dem kostimulatorischen Signal des CD28-Moleküls, welches für eine T-Zellstimulation unabdingbar ist, gibt es viele sekundäre kostimulatorische Moleküle, die einen Einfluss auf den Verlauf einer T-Zellaktivierung haben können. Darunter fällt auch das nicht konstitutiv exprimierte Molekül CD134/OX40. Dieses Molekül wird erst 24-72 Stunden nach der Aktivierung von T-Zellen auf der Oberfläche exprimiert und wirkt sich positiv auf Proliferation und Entwicklung der Population aus. Der verwendete Antikörperklon wurde von Martin Hoffmann produziert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. In dieser Kooperation wurden Antikörper von Klon 20 biotinyliert und auf den aAPCs in einem Antikörper-Verhältnis von 3:1 verwendet (α CD28: α CD134).

Kriterien der Optimierung waren die Anzahl positiver *wells* in einem Experiment (Positiv-Kontrolle eingeschlossen), der höchste Prozentwert einer HLA-Tetramer- und CD8-positiven T-Zellpopulation sowie der Durchschnitt (\bar{x}) der positiv gemessenen Frequenzen. Insgesamt wurden 14 Spendern getestet und in Tabelle 3.2 aufgelistet.

Tabelle 3.2: Optimierungskriterien nach einer aAPC-Stimulation mit α OX40

Spender	Antikörper	Anzahl positiver <i>wells</i> (Peptid-übergreifend)	Höchster Frequenzwert (HLA-Tetramer ⁺ /CD8 ⁺)	Frequenz \bar{x} (HLA-Tetramer ⁺ /CD8 ⁺)
J81	CD28	17	13,11	1,49
	CD28:OX40	22	10,32	1,95
J94	CD28	2	0,45	0,43
	CD28:OX40	2	3,33	1,87
J114	CD28	7	4,03	1,61
	CD28:OX40	5	8,09	3,99
J159	CD28	0	0	0
	CD28:OX40	12	2,73	0,46
	OX40	12	0,54	0,31
J173	CD28	11	2,78	1,39
	CD28:OX40	8	3,33	2,07
	OX40	1	1,12	1,12
J184	CD28	0	0	0
	CD28:OX40	0	0	0
	OX40	0	0	0
J186	CD28	0	0	0
	CD28:OX40	0	0	0
	OX40	0	0	0
J191	CD28	1	0,44	0,44
	CD28:OX40	0	0	0
	OX40	0	0	0
J194	CD28	0	0	0
	CD28:OX40	0	0	0
	OX40	0	0	0
J197	CD28	1	0,19	0,19
	CD28:OX40	0	0	0
	OX40	0	0	0
J199	CD28	0	0	0
	CD28:OX40	0	0	0
	OX40	0	0	0
J200	CD28	8	3,63	1,54
	CD28:OX40	6	2,33	1,50
	OX40	1	0,53	0,53
J206	CD28	3	1,26	0,86
	CD28:OX40	0	0	0
J209	CD28	0	0	0
	CD28:OX40	1	0,21	0,21

Die drei Anhaltspunkte (Anzahl positiver *wells*, höchste erreichte Frequenz und der Durchschnitt) sollten Aufschluss darüber geben, ob eine Optimierung der Methode erreicht werden konnte. Drei Spender (J184, J186 und J199) konnten in keinem der Ansätze eine

HLA-Tetramer-positive T-Zellpopulation aufweisen. Die Kombination der Antikörper CD28 und OX40 konnte nur bei Zellen von drei aus 14 Spendern eine höhere Anzahl positiver *wells* erreichen als der Standard (CD28-Antikörper alleine). Der Standard war in 5/14 Ansätzen besser als die Kombination. Bei der Anzahl der *wells* konnte keine Optimierung erreicht werden. Im Vergleich der höchsten gemessenen Frequenz HLA-Tetramer-positiver Zellen konnte die Optimierung 5x den höchsten Wert erreichen. Der Standard war in vier Experimenten höher als die Kombination, aber nur dann wenn in der Kombination keine positiven *wells* zu beobachten waren (siehe Spender J191, J197 und J206). Mit dem Durchschnitt der Frequenz verhält es sich gleich. Allgemein zeigen die Ergebnisse eine starke Heterogenität in den Experimenten. Die Standardmethode (CD28-Antikörper alleine) zeigt genauso wie die Kombination beider kostimulatorischen Antikörper einen Spender-abhängigen Vorteil. In Abbildung 3.8 ist ein Beispiel aus vier Experimenten die entweder mit dem CD28-Antikörper alleine, einer Kombination aus CD28:OX40-Antikörpern oder nur mit α OX40 stimuliert wurden. Anhand dieser Beispiele soll die Spender-abhängige Heterogenität der Ergebnisse verdeutlicht werden.

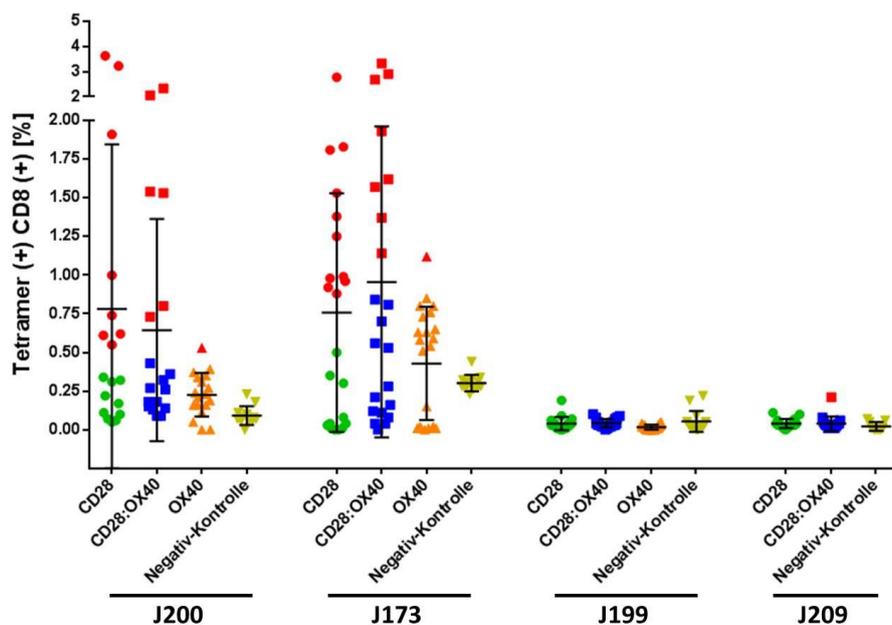


Abbildung 3.8: Verwendung der CD28- und OX40-Antikörper in unterschiedlichen Kombinationen

Abgebildet sind die prozentualen Werte von HLA-Tetramer-positiven T-Zellen nach einer aAPC-Stimulation *in vitro*. Entweder wurde die aAPCs mit CD28-Antikörper alleine, einer Kombination von CD28:OX40-Antikörpern oder, falls genügend Zellen vorhanden, mit OX40-Antikörper alleine beladen. In jedem Experiment wurde die Negativ-Kontrolle gegen die getesteten Peptide aufgetragen. Ein Punkt entspricht einem *well* im Experiment, rote Punkte zeigen Antigen-spezifische T-Zellpopulationen an.

Auffällig ist, dass wenn beide Antikörper einzeln eine positive Population erzeugen, die durchschnittliche Frequenz unter Verwendung der Antikörper-Kombination höher ist. Dies kann an dem positiven Einfluss des OX40-Signals für das Überleben von T-Zellen liegen. Unterstützt wird diese Theorie von den in Abbildung 3.9 gezeigten Daten mit Zellen aus

Spender J159. Durch starke Temperaturschwankungen des Zellkulturinkubators (bis zu 41°C) starben alle Zellen, die nur mit dem CD28-Antikörper stimuliert wurden ab. Lebendige Zellen waren nur bei Stimulationen mit dem OX40-Antikörper vorhanden. Dieses durch Zufall generierte Experiment könnte ein Hinweis darauf geben, dass bei langen Zellkulturen die Verwendung des OX40-Antikörpers einen positiven Einfluss auf die Anzahl und das Überleben von T-Zellen hat.

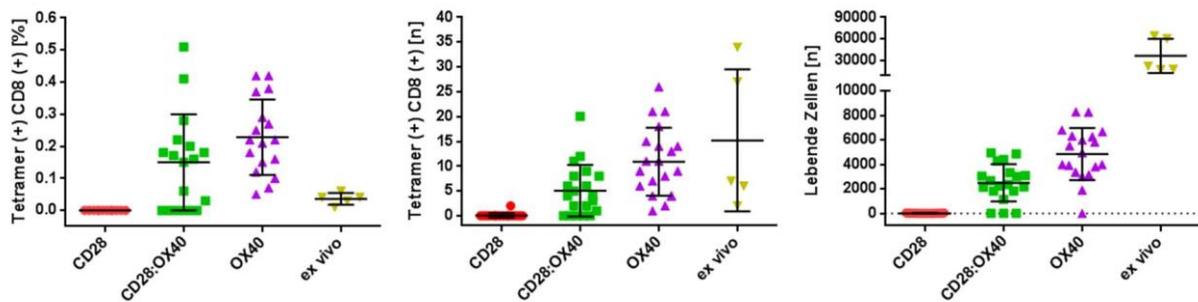


Abbildung 3.9: Anzahl lebender Zellen des Spenders J159 unter Verwendung des CD28- und OX40-Antikörpers

Die erste Abbildung von links zeigt den prozentualen Wert von HLA-Tetramer-positiven T-Zellen in den verschiedenen Ansätzen. Die mittlere Abbildung zeigt die Anzahl der Zellen die HLA-Tetramer-positiv gewertet wurden. Rechts abgebildet ist die Anzahl von lebenden Zellen in jedem *well*.

Die Optimierung wurde im Rahmen von T-Zellstimulationen *in vitro* mit Peptiden durchgeführt. Hierbei wurden Peptide aus verschiedenen Projekten verwendet (MultiPro-, OvCa- und RCC-Projekt).

Tabelle 3.3: Getestete Peptide aus dem MultiPro-Projekt (Antikörper-Optimierung)

Herkunft (Position)	Sequenz	HLA-Restriktion	Positiv getestete Spender/ Spender getestet
RAM (19-29)	FTENDKEYQEY	A*01:01	0/1
MYLK (718-726)	GTQPWFISK	A*11:01	1/1
IGF1 (5-13)	SSLPTQLFK	A*11:01	1/2
MYH11 (352-362)	SVLQLGNIVFK	A*11:01	1/2
MYH11 (1933-1941)	ETSFVPSRR	A*68:01	1/1
KLK4 (105-113)	HPEYNRPLL	B*07:02	1/1
EP300 (15-23)	RPKLSSPAL	B*07:02	0/1
NKX3.1 (91-99)	AETEPERHL	B*40:02	0/1

Es konnte mit fünf von acht Peptiden aus dem MultiPro-Projekt eine HLA-Tetramer-positiv T-Zellpopulation beobachtet werden.

Tabelle 3.4: Getestete Peptide aus dem RCC-Projekt (Antikörper-Optimierung)

Herkunft (Position)	Sequenz	HLA-Restriktion	Positiv getestete Spender/ Spender getestet
AHNK2 (3395-3403)	SLDVSAPKV	A*02:01	2/3
ATX10 (443-453)	GLADASLLKKV	A*02:01	0/1
DEGS1 (83-91)	SMTLAIHEI	A*02:01	1/3
RGS5 (102-112)	KIKSPAKMAEK	A*03:01	0/1
EHD2 (394-402)	MPLLRQEEL	B*07:02	1/3
RAD (99-107)	APGVGKSAL	B*07:02	0/1

Insgesamt konnte mit 50% der Peptide (3/6) aus dem RCC-Projekt eine HLA-Tetramer-positive T-Zellpopulation beobachtet werden.

Tabelle 3.5: Getestete Peptide aus dem OvCa-Projekt (Antikörper-Optimierung)

Herkunft (Position)	Sequenz	HLA-Restriktion	Positiv getestete Spender/ Spender getestet
MUC16 (11192-11200)	KMISAIPTL	A*02:01	0/1
MUC16 (21261-21269)	GTSGTPVSK	A*11:01	1/1
KI67 (606-615)	SSKSQTEVPK	A*11:01	0/1
I2301 (297-306)	RYMPPAHRNF	A*24:02	1/2
I2301 (222-230)	NPKAFFSVL	B*07:02	1/2
MUC16 (21606-21614)	SPLFQRSSL	B*07:02	0/1
MUC16 (3301-3309)	TPGGTRQSL	B*07:02	1/1
MUC16 (4900-4908)	RETSISQEI	B*18:01	0/1
MUC16 (9509-9517)	TETEAHVVF	B*18:01	0/1

Von 9 verschiedenen Peptiden aus dem OvCa-Projekt konnten 4 davon eine Antigen-spezifische T-Zellpopulation nach der HLA-Tetramerfärbung zeigen.

3.1.3.2 Interleukine

Eine weitere Optimierungsmöglichkeit liegt in der Zugabe verschiedener Zytokine um bei der künstlichen aAPC-Stimulation das natürliche System optimal zu simulieren. Hierfür wurden drei unterschiedliche Zytokine (IL-21, IL-7 und IL-15) bei der aAPC-Stimulation mit IL-12 zusätzlich hinzugefügt. Die Zytokine wurden wegen ihres positiven Einflusses auf Zellteilung, Wachstum und CD8⁺-Effektor-Funktion ausgewählt.

Anhand von drei Anhaltspunkten wurde die Optimierung durch den zusätzlichen Gebrauch der Zytokine gemessen: die Anzahl der positiven *wells* in einem Experiment (Positiv-Kontrolle eingeschlossen), der höchste Frequenzwert einer HLA-Tetramer- und CD8-positiven T-Zellpopulation sowie der Durchschnitt (\bar{x}) der positiv gemessenen Frequenzen. Insgesamt wurden Zellen von sieben Spendern getestet.

Tabelle 3.6: Spenderzellen und Ergebnisse der Interleukin-Optimierung

Spender	Zytokine	Anzahl positiver <i>wells</i> (Peptid-übergreifend)	Höchster Frequenzwert (HLA-Tetramer ⁺ /CD8 ⁺)	Frequenz \bar{s} (HLA-Tetramer ⁺ /CD8 ⁺)
J93	IL-12	3	1,46	1,15
	IL-12+IL-21	3	1,69	1,08
J206	IL-12	2	0,45	0,43
	IL12+IL-21	1	3,33	3,33
J209	IL-12	3	2,94	1,05
	IL-12+IL-21	4	3,52	0,98
J212	IL-12	6	3,43	1,65
	IL-12+IL-21	13	8,06	2,56
	IL-12+IL-7	9	2,57	0,97
J216	IL-12	2	1,20	0,66
	IL-12+IL-21	4	0,29	0,21
	IL-12+IL-7	1	0,21	0,21
J220	IL-12	4	3,88	1,10
	IL-12+IL-21	2	0,25	0,23
	IL-12+IL-7	0	0	0
J222	IL-12	8	1,80	0,56
	IL-12+IL-21	8	3,65	1,00
	IL-12+IL-15	4	2,11	0,86

Die drei gewählten Anhaltspunkte helfen, eine erfolgreiche Optimierung der Methode zu bewerten. Bei der Anzahl positiver *wells* zeigte das Interleukin 21 im Vergleich zum Standard eine Spender-abhängige Heterogenität der Ergebnisse. Zweimal (J93 und J222) zeigten der Standard und die IL-21-Optimierung gleiche Werte. Bei drei von sieben Spendern konnte die IL-21-Optimierung eine höhere Anzahl positiver *wells* erreichen. Der Standard konnte nur zweimal höhere Werte als die IL-21-Optimierung erzielen. Die Optimierung mit Interleukin 7 konnte einmal (J212) höhere Werte als der Standard erreichen, sich aber bei keinem der Spender gegen die IL-21-Optimierung durchsetzen. IL-15 wurde nur einmal in dem Experiment J222 als Optimierung hinzugefügt, konnte sich aber weder gegen den Standard noch gegen IL-21 behaupten. Bei 5/7 Spendern zeigte die IL-21-Optimierung den höchsten Frequenzwert innerhalb des Experiments. Die Werte der Optimierung mit IL-7 lagen immer unter denen von IL-21 und dem Standard. Die Zugabe von Interleukin 15 konnte einen höheren Wert als der Standard erzielen. In der Höhe des Frequenzdurchschnittes zeigte die IL-21-Optimierung im Vergleich zum Standard wieder eine Spender-abhängige Heterogenität. In vier von sieben Experimenten konnte der Standard die höhere Frequenz aufweisen. Die IL-7-Optimierung konnte bei Zellen aus Spender J216 den gleichen Wert wie mit IL-21 erreichen, war aber sonst immer unter dem Standardwert. Im Experiment mit J222-Zellen konnte IL-15 einen besseren Wert als der Standard erreichen, aber nicht den Wert

von IL-21 schlagen. In Abbildung 3.10 sind die HLA-Tetramer-positiven T-Zellen aus vier verschiedenen Spendern gezeigt.

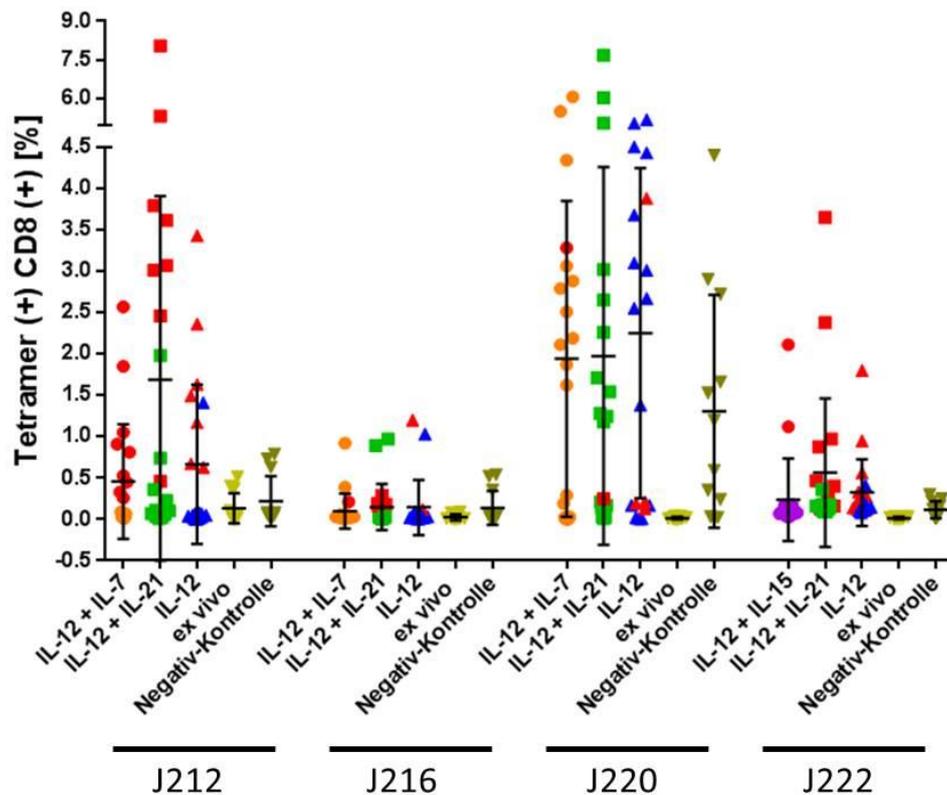


Abbildung 3.10: 4 Stimulationen mit unterschiedlichen Interleukinen

Abgebildet sind die prozentualen Werte von HLA-Tetramer-positiven T-Zellen nach einer aAPC-Stimulation *in vitro*, die mit unterschiedlichen Interleukinen behandelt wurden. Stimuliert wurde als Standard mit Interleukin 12. Bei einer Optimierung wurde zusätzlich IL-7, IL-15 oder IL-21 zugegeben. In jedem Experiment wurde die Negativ-Kontrolle gegen die getesteten Peptide aufgetragen. Ein Punkt entspricht einem *well* im Experiment, rote Punkte zeigen Antigen-spezifische T-Zellpopulationen an. Die Antigen-spezifischen T-Zellen wurden immer mit der zugehörigen Negativ-Kontrolle verglichen, deshalb können rote Punkte in den unteren Bereichen auftreten und farbige (negative *wells*) in den oberen Bereichen.

Die Optimierung wurde im Rahmen von *in vitro*-Stimulationen mit Peptiden durchgeführt. Hierbei wurden Peptide aus verschiedenen Projekten verwendet (MultiPro-, OvCa- und RCC-Projekt).

Tabelle 3.7: Getestete Peptide aus dem MultiPro-Projekt (Interleukin-Optimierung)

Herkunft (Position)	Sequenz	HLA-Restriktion	Positiv getestete Spender/ Spender getestet
MYH11 (134-142)	YSEKIVDMY	A*01:01	0/1

Da HLA-A*01-Peptid aus dem MultiPro-Projekt konnte auch nicht mittels einer Optimierung HLA-Tetramer-positiv T-Zellen generieren.

Tabelle 3.8: Getestete Peptide aus dem RCC-Projekt (Interleukin-Optimierung)

Herkunft (Position)	Sequenz	HLA-Restriktion	Positiv getestete Spender/ Spender getestet
AHNK2 (3395-3403)	SLDVSAPKV	A*02:01	0/1
ATX10 (443-453)	GLADASLLKKV	A*02:01	2/3
DEGS1 (83-91)	SMTLAIHEI	A*02:01	3/3
RGS5 (102-112)	KIKSPAKMAEK	A*03:01	0/1
SLN11/1 (489-497)	RTAFTLKQK	A*03:01	1/1
P4HA1 (347-355)	AEIEIVKDL	B*44:03	3/3

Zwei Drittel der sechs Peptide aus dem RCC-Projekt konnten eine Antigen-spezifische T-Zellpopulation induzieren.

Tabelle 3.9: Getestete Peptide aus dem OvCa-Projekt (Interleukin-Optimierung)

Herkunft (Position)	Sequenz	HLA-Restriktion	Positiv getestete Spender/ Spender getestet
I2301 (222-230)	NPKAFFSVL	B*07:02	1/1
MUC16 (21606-21614)	SPLFQRSSL	B*07:02	0/1
MUC16 (3301-3309)	TPGGTRQSL	B*07:02	1/1
MUC16 (4900-4908)	RETSISQEI	B*18:01	1/1
MUC16 (9509-9517)	TETEAHVVF	B*18:01	0/1

Bei drei von fünf Peptiden aus dem OvCa-Projekt konnte nach der *in vitro*-Stimulation eine Antigen-spezifische T-Zellpopulation beobachtet werden.

3.1.3.3 Intrazelluläre Zytokinfärbung

Eine intrazelluläre Zytokinfärbung (*intracellular staining*, ICS) gibt Aufschluss darüber, welche Zytokine nach Kontakt mit dem Antigen in einer Zelle produziert werden. Dies kann ein Indikator für die Funktionalität der Zellen sein. Das ICS bietet eine einfache und zeitsparende Möglichkeit Antigen-spezifische Zellen zu untersuchen. Die zusätzlichen Interleukine sollen die Funktionalität, das heißt die Effektorfunktion der T-Zellen verbessern. Die Zellen wurden während der 3-wöchigen aAPC-Stimulation mit unterschiedlichen Interleukinen (IL-12 alleine oder mit Zusatz von IL-7, IL-15 oder IL-21) stimuliert. Nach weiteren 2-3 Wochen wurden die Zellen gefärbt und analysiert. Im Experiment J216 (siehe Abbildung 3.11) waren genügend Zellen für eine HLA-Tetramerfärbung vorhanden. Bei beiden Peptiden (ELAGIGILTV und SMTLAIHEI) konnte im Vergleich zu der ersten HLA-Tetramerfärbung ein Anstieg der Antigen-spezifischen T-Zellpopulation beobachtet werden (siehe Tabelle 3.10). Die erste Färbung wurde eine Woche nach der letzten aAPC-Stimulation durchgeführt. Die zweite Färbung wurde zusammen mit dem ICS drei Wochen nach der ersten HLA-Tetramerfärbung durchgeführt. Mit J220 und J222 wurde aufgrund der

geringen Zellzahl keine HLA-Tetramerfärbung durchgeführt. Den höchsten Wert bei dem Peptid ELAGIGILTV konnte der Standard erreichen. Bei dem Peptid SMTLAIHEI zeigte die Kombination mit IL-21 den höchsten Wert.

Tabelle 3.10: Vergleich zwischen 1. und 2. HLA-Tetramerfärbung in Experiment J216

Spender	Sequenz	Zytokine	HLA-Tetramer ⁺ CD8 ⁺	
			1. Färbung (höchster Wert)	2. Färbung
J216	ELAGIGILTV	IL-12+IL-7	0,92	2,99
		IL-12	1,20	9,32
		IL-12+IL-21	0,97	5,05
	SMTLAIHEI	IL-12+IL-7	0,21	0,54
		IL-12	0,12	0,44
		IL-12+IL-21	0,29	2,13

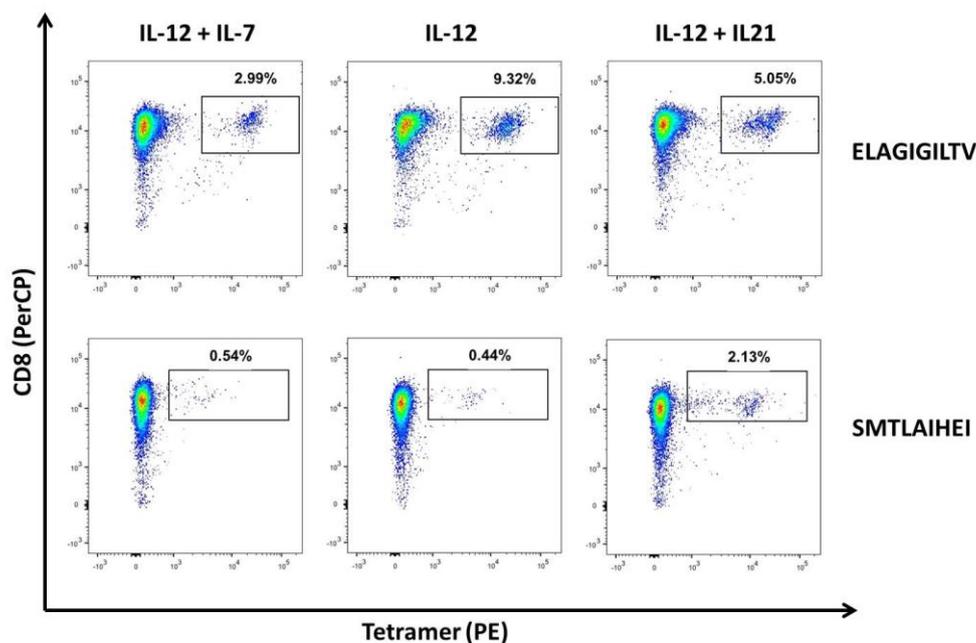
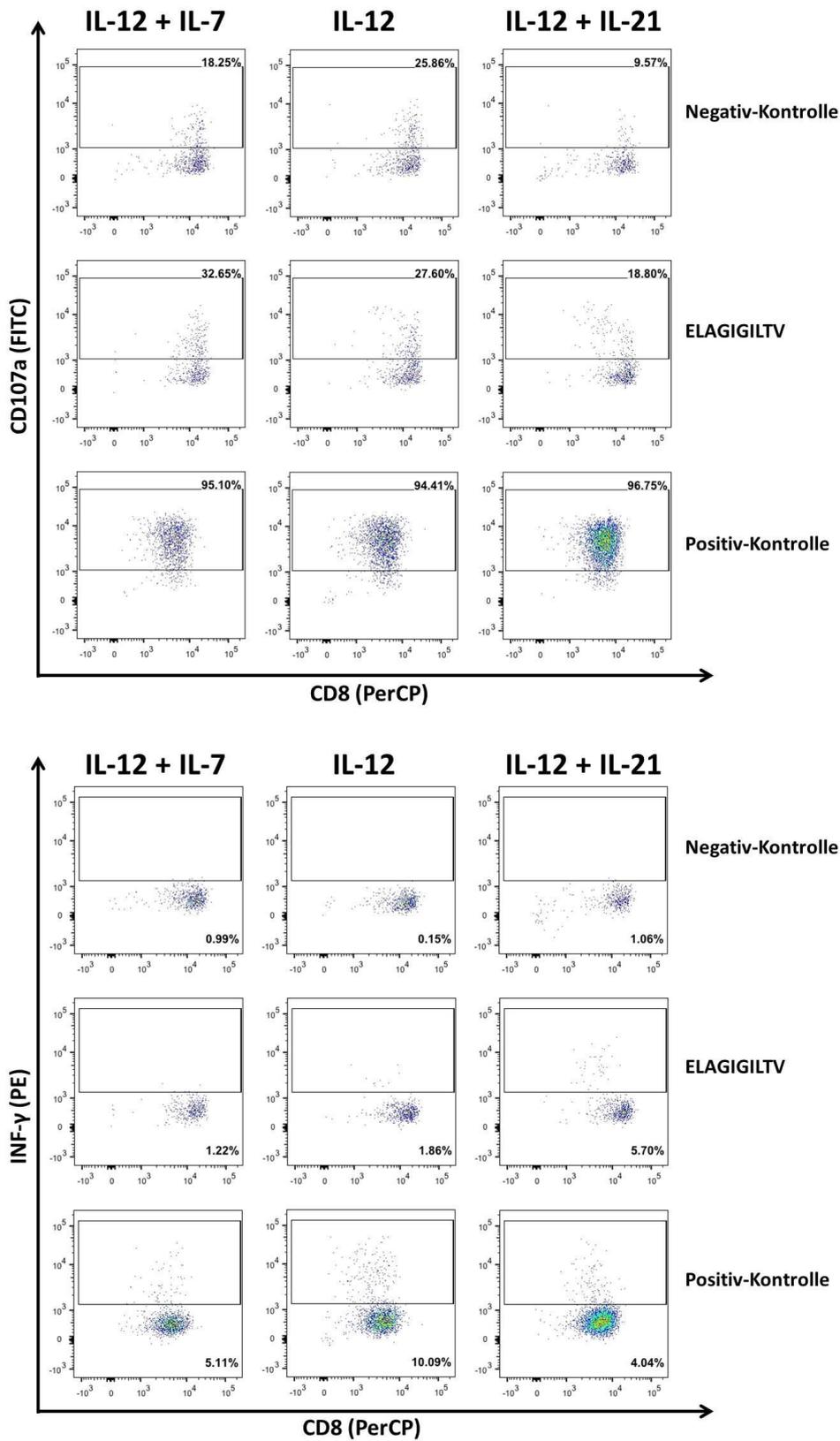


Abbildung 3.11: HLA-Tetramerfärbung der Spenderzellen J216 nach unterschiedlicher Interleukin-Behandlung

Abgebildet sind die HLA-Tetramer- und CD8-positiven T-Zellpopulationen von Spender J216. Unterteilt sind die Abbildungen durch die unterschiedlichen HLA-Monomere und unterschiedlichen Interleukine, die während der künstlichen T-Zellstimulation verwendet wurden. IL-12 alleine entspricht dem Standard und IL-7 oder IL-21 der Optimierung.

In Tabelle 3.11 sind die Ergebnisse der intrazellulären Zytokinfärbung abgebildet. Für jedes Experiment werden die getesteten Peptide und Werte unterschiedlicher T-Zellpopulationen gezeigt (HLA-Tetramerfärbung (falls vorhanden), CD107a-, IFN- γ - und TNF- α -Expression). Der Wert der doppelt positiven IFN- γ /TNF- α T-Zellen soll die Bispezifität und somit Funktionalität zeigen. Die Voraussetzung dafür, dass ein ICS ausgewertet wurde, war die Betrachtung der Positiv- und Negativ-Kontrolle (Beispiel siehe Abbildung 3.12). Die

getesteten Peptide sind in Kapitel 3.1.3.2 in Tabelle 3.8 aufgelistet und wurden darum hier nicht nochmals aufgeführt.



Fortsetzung von Abbildung 3.12 auf nächster Seite.

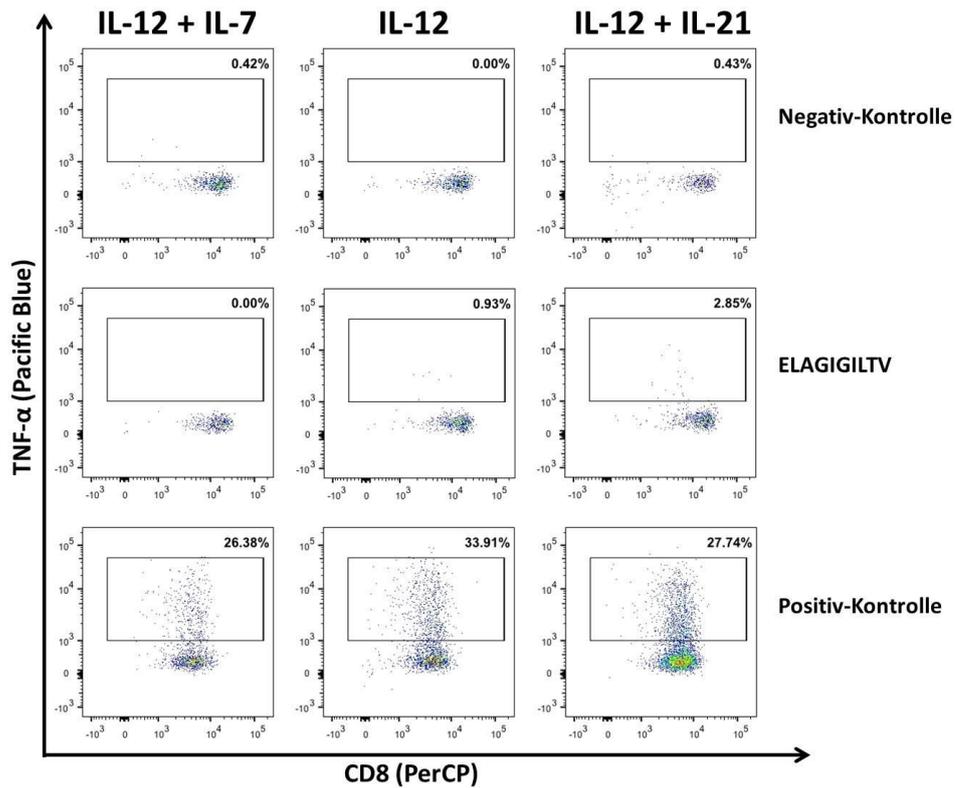


Abbildung 3.12: ICS mit dem Peptid ELAGIGILTV (Experiment J216)

Gezeigt sind die T-Zellpopulationen von Experiment J216 nach intrazellulärer Färbung. In allen Abbildungen ist die Negativ- sowie Positiv-Kontrolle im Vergleich mit dem getesteten ELAGIGILTV-Peptid zu sehen. Die Negativ-Kontrolle wurde mit einem irrelevanten Peptid durchgeführt. Für die Positiv-Kontrolle wurden PMA und Ionomycin zu den Zellen gegeben. Oberhalb der Abbildungen ist die Zugabe der Zytokine erkennbar. Abgebildet ist die Analyse der Zellen in ihrer Markerexpression von CD107a (oben), Interferon- γ und Tumornekrosefaktor- α (unten).

Tabelle 3.11: Charakterisierung der T-Zellen nach ICS in verschiedenen Experimenten

Spender	Sequenz	Zytokine	HLA-Tetramer ⁺	IFN- γ ⁺	TNF- α ⁺	CD107a ⁺	IFN- γ ⁺ /TNF- α ⁺
J216	ELAGIGILTV	IL-12	9,32	1,86	0,93	27,60	0,78
		IL-12+IL-21	5,05	5,70	2,85	18,80	2,14
		IL-12+IL-7	2,99	1,22	0,00	32,65	0,00
	SMTLAIHEI	IL-12	0,44	1,24	0,15	10,18	0,00
		IL-12+IL-21	2,13	0,29	0,05	5,00	0,05
		IL-12+IL-7	0,54	0,23	0,12	14,10	0,00
J220	AEIEIVKFDL	IL-12	/	0,00	0,07	0,00	0,00
		IL-12+IL-21	/	0,07	0,18	0,07	0,06
		IL-12+IL-7	/	0,05	0,18	0,05	0,02
	KIKSPAKMAEK	IL-12	/	0,43	0,35	0,35	0,26
		IL-12+IL-21	/	0,06	0,20	0,06	0,05
		IL-12+IL-7	/	0,03	0,10	0,03	0,02
	RTAFTLKQK	IL-12	/	0,03	0,09	0,03	0,02
		IL-12+IL-21	/	0,07	0,05	0,07	0,01
		IL-12+IL-7	/	0,01	0,03	0,01	0,00
	TVFDAIRAAK	IL-12	/	0,00	0,00	0,00	0,00
		IL-12+IL-21	/	0,31	1,11	0,31	0,29
		IL-12+IL-7	/	0,00	0,02	0,00	0,00
J222 ¹	AEIEIVKFDL	IL-12	/	5,50	29,42	69,53	3,98
		IL-12+IL-21	/	6,14	10,62	86,56	2,41
		IL-12+IL-15	/	3,30	15,24	83,63	0,96
	SMTLAIHEI	IL-12	/	14,02	31,41	64,71	7,88
		IL-12+IL-21	/	6,66	24,33	74,58	4,72
		IL-12+IL-15	/	3,41	10,23	88,18	1,14
	ELAGIGILTV	IL-12	/	8,35	12,39	86,33	6,75
		IL-12+IL-21	/	80,48	84,98	7,28	71,05
		IL-12+IL-15	/	37,18	70,95	27,22	35,31

1: durch einen Aufnahmefehler während der Messung beziehen sich die Werte nicht auf alle aufgenommenen Zellen, sondern nur auf die in dem FITC⁺gate (CD107a) analysierten Zellen. Die Werte in der Spalte CD107a⁺ beziehen sich auf die Anzahl Zellen, die IFN- γ ⁺ und TNF- α ⁺ aber CD107a⁺ sind.

Mit Zellen des Spenders J216 ist die höchste Frequenz an HLA-Tetramer-positiven T-Zellen je nach Peptid in der Optimierung mit IL-21 oder dem Standard zu beobachten. Die Optimierung mit IL-7 kann nur bei der Expression von CD107a einen höheren Wert als IL-21 und IL-12 erzielen. Besonders bei den bispezifischen T-Zellen konnte die Optimierung mit IL-21 höhere Werte als der Standard erzielen. In dem Experiment J220 war die Anzahl der zytokinproduzierenden Zellen geringer, was hauptsächlich auf die geringe Ausgangsmenge der eingesetzten Zellen zurückzuführen ist. Die Optimierung mit IL-7 konnte bei keinem der Peptide höhere Werte erreichen im Vergleich zum Standard oder der Optimierung mit IL-21. Standard und IL-21-Optimierung zeigen bei diesen Spenderzellen eine Peptid-abhängige Heterogenität der Ergebnisse. J222 kann in den Frequenzen mit den anderen Spendern

durch einen Aufnahmefehler nicht direkt verglichen werden. Jedoch zeigen sich auch hier wieder Peptid-abhängige Unterschiede. Anstatt Interleukin-7 wurde zusätzlich zu IL-12 das Interleukin-15 verwendet. Im Vergleich zum Standard und der IL-21-Optimierung konnte IL-15 nur bei der Stimulation mit dem Peptid SMTLAIHEI in der Frequenz des Markers CD107a bessere Werte erreichen.

Die Multifunktionalität von T-Zellen wird mit einer besseren Bekämpfung von Infektionen assoziiert. Diese Funktionalität ist nicht nur Peptid-abhängig, sondern variiert zudem innerhalb der Spenderzellen.

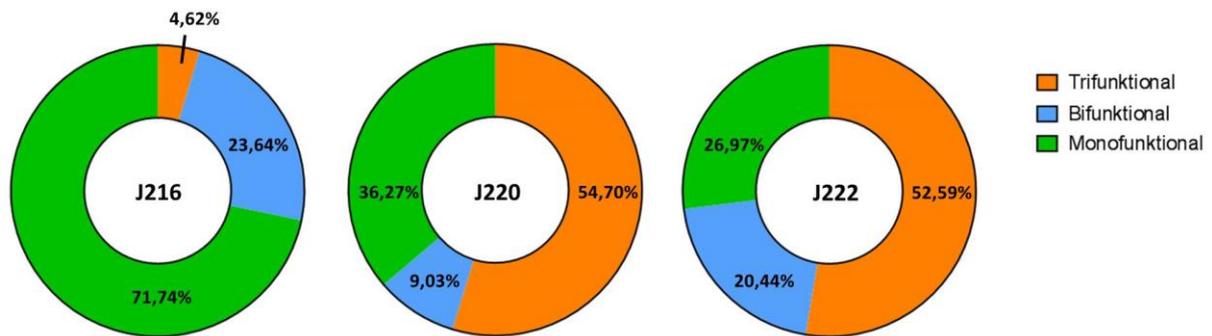


Abbildung 3.13: Funktionalität der positiven T-Zellen aus ICS (Experimente J216, J220 und J222)

Gezeigt ist die Multifunktionalität von allen Zytokin-produzierenden Zellen aus den Experimenten J216, J220 und J222. Die Werte der Mono-, Bi- und Trifunktionalität sind spenderabhängig.

3.2 Analyse enzymatisch verdauter Proteine

Mit dem Fortschritt der Technik sind auch die Möglichkeiten in der Proteinanalyse breiter und vielseitiger geworden. Der Nachweis und detaillierte Informationen über Proteine sind in vielen Feldern der Naturwissenschaft unabdingbar. Eine einfache Möglichkeit des Proteinnachweises ist die so genannte *bottom-up* Proteomik. Hierbei werden Proteine durch Enzyme in kleine Fragmente zerschnitten, die anschließend mittels einer massenspektrometrischen Analyse identifiziert werden. Die Zugehörigkeit zu dem passenden Protein wird mit einer Datenbanksuche bestimmt. Im Folgenden werden einige Beispiele für diese Analyseverfahren vorgestellt.

3.2.1 Verdau im Gel

Die Möglichkeit des Verdauens von im Gel separierten Proteinen und deren Analyse zeigte sich in einer Kooperation mit Carolin Steinl aus der Arbeitsgruppe von Gerd Klein. Die Arbeit handelte von Zytokin-induzierter Stammzellmobilisation durch verschiedene Proteasen, insbesondere der Gelatinasen (Matrix-Metalloproteinase 8 und 9, MMP-8 und 9) (Steinl, Essl et al., 2013). Hierfür wurde unter anderem das Laminin-10 (LM-511) als ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix (*extracellular matrix*, ECM) des humanen Knochenmarks, (Siler et al., 2000) mittels dieser MMPs prozessiert und anschließend analysiert.

Durch eine Auftrennung über SDS-Gel konnten verschiedene Banden nach verschiedenen Zeitpunkten beobachtet werden. Die unten gezeigte aus der dazugehörigen Veröffentlichung stammende Abbildung 3.14 konzentriert sich auf die Analyse der 3695 AS langen Untereinheit $\alpha 5$ (Uniprot-ID: O15230/LAMA5_HUMAN) unter Prozessierung von MMP-8. Einige Banden wurden für eine molekulare Analyse ausgeschnitten und für eine massenspektrometrische Analyse mittels Trypsin verdaut. Einzelne tryptische Peptide, welche bestimmte Domänen der Laminin- $\alpha 5$ -Kette präsentieren, wurden für den Vergleich der unterschiedlich großen und somit im SDS-Gel separierten Fragmente ausgewählt (siehe Tabelle 3.12. und Abbildung 3.14).

Tabelle 3.12: Für die Analyse ausgewählte tryptische Peptide der humanen Laminin- $\alpha 5$ -Kette

Peptidnummer	Sequenz	Position
Pep 1	TNTLLGHLMGK ¹	226-276
Pep 2	RCDTCSPGFHGYPR	1560-1573
Pep 3	GPPPELQPQPEGPPR	3228-3243
Pep 4	TPPYLQLQVTEK	3566-3577

¹= Homolog zu Q61001 - LAMA5_MOUSE

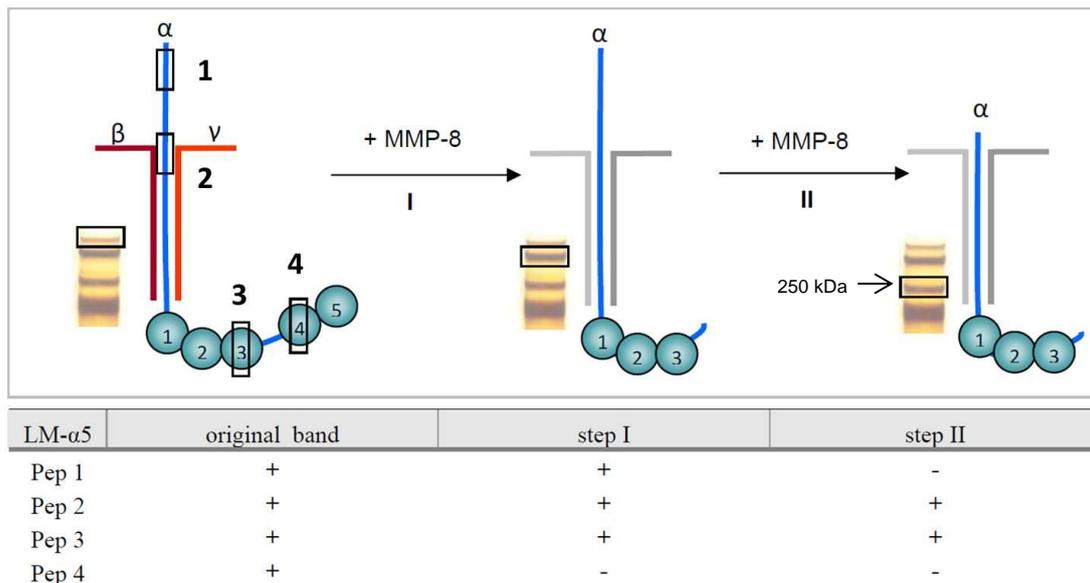


Abbildung 3.14: Peptidanalyse von mit MMP-8 prozessiertem Laminin-10

LM-511 wurde von MMP-8 prozessiert, die daraus resultierenden Produkte mittels SDS-PAGE separiert und manche Banden für den tryptischen Verdau ausgeschnitten. Verschiedene Peptide repräsentieren verschiedene Domänen. Die Präsenz oder Abwesenheit eines Peptides wird mit der zugehörigen Domäne gleichgesetzt. Nach dem ersten Degradationsschritt konnte kein Peptid 4 (Pep 4) der C-terminalen globulären Domäne (LG, *Laminin G-like*) 4 und 5 mehr nachgewiesen werden. Die Analyse der Bande bei 250 kDa zeigte das Fehlen der N-terminalen Region bei intakten LG1-3 Domänen (nachgewiesenes Peptid 2 und 3). Abbildung entnommen und modifiziert aus (Steinl, Essl et al., 2013).

Wie in Abbildung 3.14 dargestellt, ist die Präsenz oder Abwesenheit eines Peptides mit der zugehörigen Domäne gleichgesetzt. Im Gegensatz zu der kompletten Laminin-α5-Kette fehlt das Peptid 4 (Pep 4) der C-terminalen globulären Domäne (LG, *Laminin G-like*) 4 und 5 in der unteren Bande. Dies lässt darauf schließen, dass MMP-8 in der Prozessierung dieses Proteinteiles der Laminin-α5-Kette involviert ist. Einen weiteren Prozessierungsschritt der MMP-8 zeigte die Analyse der 250 kDa-Bande. Neben den intakten LG1-3 Domänen (nachgewiesen durch Peptid 2 und 3), konnte ein Fehlen der N-terminalen Region durch das nicht nachgewiesene Peptid 1 gezeigt werden.

Die durch das Peptid 3 bewiesenen intakten und für die Zelladhäsion (Aumailley et al., 2005) wichtigen LG1-3 Domänen erklären die nicht vorhandene Beeinträchtigung der Zelladhäsion von Stammzellen mit MMP-8-verdautem Laminin-10 innerhalb eines Zelladhäsions-Assays.

3.2.2 Verdau in Lösung

Bei dieser Methode werden die zu analysierenden Proteine nicht erst über ein Gel separiert. Gründe hierfür sind, dass das Protein in einer komplexen Lösung vorliegt und eine erkennbare und somit nützliche Bande nicht vorhanden ist. Ein Vorteil den Verdau direkt in Lösung durchzuführen ist, dass kein Mindesteinsatz wie bei der Gelanalyse benötigt wird. Zudem ergibt sich durch die fehlende Gelanalyse eine Zeit- und Kostenersparnis.

Die Möglichkeit Proteine in komplexen Lösungen nachzuweisen konnte in einer erfolgreichen Kooperation mit Julia Wild aus der Arbeitsgruppe von Helmut Salih gezeigt werden. Meine Kooperationspartnerin beschäftigte sich mit dem Einfluss von Belimimab, welcher den von NK-Zellen produzierten B-Zell-Aktivierungsfaktor (*B cell activating factor*, BAFF) neutralisiert und dadurch die Sensitivität von chronisch lymphoiden Leukämie-Zellen für die direkte und Rituximab-induzierte NK-Zelllyse wieder herstellt (Wild et al., 2015). Die lösliche, 152 Aminosäuren lange Form des BAFF-Proteins (Uniprot-ID: Q9Y275/TN13B_HUMAN) wird von Immunzellen der myeloiden Linie produziert. Das Protein ist ein wichtiger Faktor für Proliferation, Funktion und Überleben von peripheren B-Zellen.

Um lösliches BAFF im Überstand einer NK-Zellkultur nachzuweisen wurde dieses an immobilisierten Belimimab spezifisch gebunden, um anschließend aufgereinigt zu werden. Im nächsten Schritt wurde ein Teil dieses Produktes tryptisch verdaut und massenspektrometrisch nachgewiesen. Als Positivkontrolle wurde der Überstand einer Zellkultur von 293-BAFF-Transfektanden (Schneider et al., 1999) verwendet. Die dadurch gefundenen tryptischen Peptide sind in Tabelle 3.13 aufgelistet.

Tabelle 3.13: Mittels MS/MS identifizierte tryptische Peptide der positiven Kontrolle 293-BAFF

Position	Sequenz	# PSMs
205-214	TYAMGHLIQR	27
253-265	LEEGDELQLAIPR	25
134-160	AVQGPEETVTQDcLQLIADSETPTIQK	24
232-252	cIQNMPETLPNNScYSAGIAK	15
205-214	TYAmGHLIQR	4
217-231	VHVFGEDELSLVTLFR ¹	4
161-173	GSYTFVPWLLSFK	1
232-252	cIQNmPETLPNNScYSAGIAK	1

1= Homolog zu Uniprot-ID: Q9WU72/TN13B_MOUSE

Die Proteinabdeckung des löslichen BAFF in der Positivkontrolle betrug 65% (Gesamtlänge des Proteins 152 AS, davon konnten 99 AS abgedeckt werden). Tryptische Fragmente konnten auch in dem Überstand der NK-Zellkultur nachgewiesen werden. Da die Anzahl der Fragmente sowie die der PSMs nicht so hoch war wie im Vergleich zur Positivkontrolle, wurden drei Replikate gemessen um ein zufällige Annotation auszuschließen.

Tabelle 3.14: Mittels MS/MS identifizierte in drei Replikaten gemessene tryptische Peptide von aufgereinigtem und eingeeignetem Zellkulturüberstand von polyklonalen NK-Zellen

Replikat	Sequenz	# PSMs
1	LEEGDELQLAIPR	2
	AVQGPEETVTQDcLQLIADSETPTIQK	1
2	LEEGDELQLAIPR	3
3	LEEGDELQLAIPR	5

Die in den Replikaten gefundenen tryptischen Fragmente zeigen, dass das Protein BAFF in dem Zellüberstand vorhanden war.

3.3 HLA-Typisierung von Zell-oder Tumorgewebe

Bottom-up Proteomik als weit verbreitete Methode zur Analyse und Identifikation von unbekanntem Proteinen auf die Identifizierung von HLA-Allelen anzuwenden, zeigte sich als große Herausforderung aufgrund der hohen polymorphen und polygenen Eigenschaften dieser Genloci. Die hochpolymorphen Regionen stehen hochkonservierten gegenüber, was eine Einschränkung aussagekräftiger Peptidspezies entstehen lässt. Im Folgenden soll gezeigt werden, wie die Entwicklung einer Strategie, die auf der Kombination der Proteomik mit der Ligandomik beruht, eine alternative Typisierung von HLA-Alлотypen aus einer komplexen Proteinlösung möglich macht. Der Ursprung dieser Idee basiert auf der Tatsache, dass Tumor- und Gewebeproben untypisierten Ursprungs im Labor vorhanden waren. Da die HLA-Typisierung von Vorteil ist bei der Zuordnung der HLA-Liganden zu ihren Allotypen, wurden die während der HLA-Liganden-Isolation aufgefangenen HLA-Moleküle verwendet, um mit der *bottom-up* Proteomik eine alternative Typisierung zu verfolgen. Dies stellt eine neue und billige Methode dar, da die vorhandenen Ressourcen zu Nutzen gemacht werden und keinerlei genomische DNA erforderlich ist. Da die proteomische Analyse bei einem so hochpolymorphen System wie dem HLA oft nicht ausreicht, wurden weitere Informationen der Ligandomik kombiniert, um eine möglichst vollständige und korrekte Typisierung zu gewährleisten.

Im Folgenden ist die Möglichkeiten der *bottom-up* Proteomik anhand eines Verdaus *in silico* demonstriert und veranschaulicht. Die Umwandlung dieser theoretischen Überlegungen in die Praxis sind veranschaulicht durch den Verdau eines einzigen HLA-Moleküls (siehe 3.3.2). Danach sind die Ergebnisse einer homozygoten Zelllinie veranschaulicht, woher Informationen aus der Ligandomik einfließen. Anschließend wurden drei Kolonkarzinomproben analysiert, die jeweils als benigne und Tumorgewebe vorlagen.

3.3.1 HLA-Verdau *in silico*

Ein Verdau *in silico* beschreibt den Vorgang, den enzymatischen Verdau einer Proteinsequenz mittels eines Computerprogrammes zu imitieren und so die Information zu erhalten, welche möglichen Peptide aus dem Verdau eines bekannten Proteins resultieren. Diese grundlegenden Informationen können erste Hinweise auf die Anzahl der aus dem Verdau resultierenden Peptide liefern sowie welche Protein-Abdeckung über Peptide erreicht werden kann.

Alle folgenden Verdaus *in silico* wurden mit der Software ExPASy PeptideMass (Link: (http://web.expasy.org/peptide_mass/)) durchgeführt. Folgende Parameter wurden hierfür verwendet:

Tabelle 3.15: Parameter für den Verdau *in silico*

Filter	Wert
Verpasste Schnittstellen (MCs)	0 MC, 1 MC, 2 MC, 3 MC
Enzyme	Trypsin, Chymotrypsin
Modifikation	Iodacetamid, oxidiertes Methionin
Größe (Da)	50-3000

Da der HLA-Genlocus nicht nur polygen, sondern zudem sehr polymorph ist, wurde aus jeder HLA Klasse I-Genregion ein Allel ausgewählt um den Verdau in Vorüberlegungen exemplarisch zu veranschaulichen. Dafür ist im Folgenden eine ausführliche Analyse des HLA-A-, -B- und -C-Moleküls durchgeführt worden. Die Allel-Beispiele hierfür wurden nach ihrer hohen Frequenz in der Bevölkerung ausgewählt und weil dies der Typisierung der Modellzelllinie JY entspricht. Hierbei wurde nicht nur untersucht welche Fragmente theoretisch durch die Enzyme Trypsin und Chymotrypsin entstehen können, sondern zudem, wie viele theoretische Schnittstellen erwartet werden und wie diese eine Proteinabdeckung gewährleisten. HLA Klasse I-Proteine sind unterteilt in die Domänen α_1 (AS 25-114), α_2 (AS 115-206) und α_3 (AS 207-309). Zu erwarten wäre, dass die Peptide von Interesse, *unique* und *hint* Peptide (siehe 2.2.6.4) in Exon 2 und 3 zu finden sind, die für die α_1 - und α_2 -Domäne kodieren, da diese die meiste Variabilität aufzeigen (siehe Abbildung 1.5). Diese Region ist für die Peptidbindung essentiell und hat so die höchste Wahrscheinlichkeit dass hier eine Unterscheidung zwischen den Allotypen durchgeführt werden kann.

3.3.1.1 HLA-A

Repräsentativ für HLA-A wurde HLA-A*02:01 ausgewählt. Mit einer Allelfrequenz in der europäischen Bevölkerung von 0,25 ist es eines der häufigsten Allele (<http://www.allelefrequencies.net>). Für die folgenden Analysen *in silico* wurde die HLA-

A*02:01-Sequenz aus der Quelle <http://www.uniprot.org/> entnommen mit der ID „P01892 - 1A02_HUMAN“. Die Sequenz beträgt 365 Aminosäuren, wovon für einen tryptischen Verdau 27 Arginine (R) und 13 Lysine (K) eine Rolle spielen. Dies ergibt eine rein theoretische enzymatische Schnittmöglichkeit von 40. Für das Enzym Chymotrypsin sind 9 Phenylalanine (F), 12 Tryptophane (W) und 15 Tyrosine (Y) mögliche Schnittstellen. Dies ergibt eine rein theoretische enzymatische Schnittmöglichkeit von insgesamt 36.

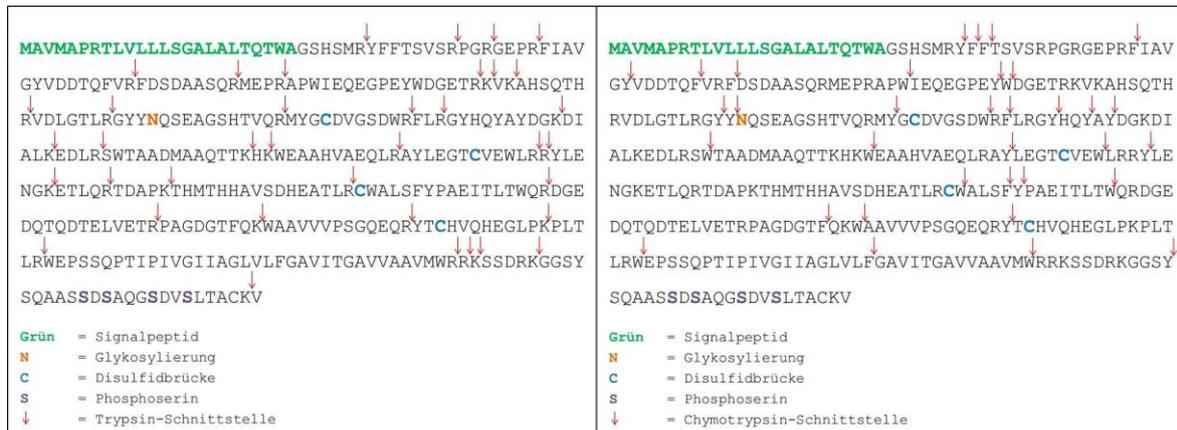


Abbildung 3.15: Tryptischer und chymotryptischer Verdau *in silico* eines HLA-A*02:01-Moleküls

Abgebildet ist links sowie rechts die Sequenz von HLA-A*02:01. Rote Pfeile markieren mögliche Schnittstellen von Trypsin (links) und Chymotrypsin (rechts). In grün ist das Signalpeptid markiert, das orangefarbene N gibt die Glykosylierung an, die blauen Cs Disulfidbrücken (zwischen den AS-Positionen 125-188 und 227-283) und das lila S Phosphoserin.

Das in grün markierte Signalpeptid ist von den Schnittstellen ausgenommen worden. Der Grund hierfür ist, dass das Signalpeptid nach der Translation das Transportziel innerhalb der Zelle angibt. Bei einem membranständigen Protein wie dem HLA-Molekül ist das Signalpeptid während des Transportes abgeschnitten worden.

Zu sehen ist in Tabelle 3.16, dass bei Trypsin die Anzahl der verpassten Schnittstellen, die zugelassen werden, von Bedeutung ist. Durch Zunahme der verpassten Schnittstellen (*missed cleavages*, MC) erhöht sich die Proteinabdeckung. Der größte Sprung ist von 0 MC zu 1 MC erkennbar. Bei Chymotrypsin ist keine Veränderung ab 1 MC zu erkennen.

Tabelle 3.16: Theoretische Proteinabdeckung von HLA-A*02:01 durch unterschiedlich verpasste Schnittstellen

Enzym → <i>Missed cleavages</i> (MC) ↓	Trypsin (Proteinabdeckung %)	Chymotrypsin (Proteinabdeckung %)
1 MC	84,4	85,2
2 MC	89,9	91,0
3 MC	90,1	91,0
4 MC	90,1	91,0

In Abbildung 3.16 sind die durch Analyse *in silico* resultierenden Peptide mit verschiedenen MC-Werten gegeneinander aufgetragen. Die größte Ausbeute ist logischerweise mit drei

verpassten Schnittstellen, da hierbei die Anzahl der möglichen Fragmente ansteigt. Die Proteinabdeckung mit einer sehr strikten Zulassung der enzymatischen Peptide ist rechts zu sehen. Die chymotryptische Abdeckung ist minimal besser bei einer MC von 0 als die tryptische.

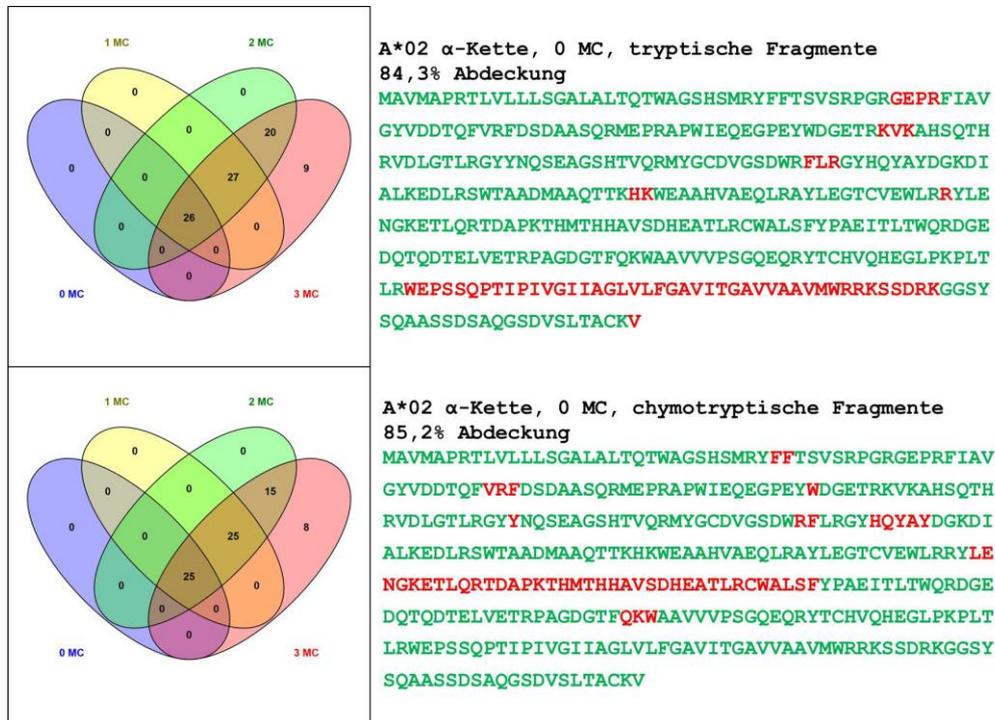


Abbildung 3.16: Vergleich des tryptischen und chymotryptischen Verdaus *in silico* des HLA-A*02:01-Moleküls (unterschiedliche MC-Parameter und Proteinabdeckung)

Links zu sehen ist der Vergleich der Fragmente mit unterschiedlichen MC-Parametern und deren Schnittmengen (erstellt mit <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>). Abgebildet rechts ist die Proteinabdeckung mit tryptischen (oben) und chymotryptischen (unten) Schnittmustern mit einer MC von 0 (erstellt mit www.expasy.org/PeptideMass).

In Tabelle 3.17 befindet sich die Auflistung und Gegenüberstellung eines tryptischen Verdaus *in silico* mit zwei verschiedenen MC-Parametern. Links ist die Peptidaufstellung ohne verpasste Schnittstellen (0 MC) und links mit einer erlaubten verpassten Schnittstelle (1 MC) Dies soll nicht nur den Zugewinn an Peptiden und somit der Proteinabdeckung verdeutlichen, sondern auch den Zugewinn an den dringend benötigten *unique* Peptiden. Die Farben der Tabellenzeilen beinhalten folgende Bedeutung:

Rot = *unique* (1 Allotyp), **Gelb** = *hint* (2-3 Allotypen), **Blau** = *shared* (4-10 Allotypen).

Tabelle 3.17: Tryptischer Verdau *in silico* des HLA-A*02:01 im Vergleich mit 0 MC und 1 MC

#MC	Peptid-Sequenz	AS-Position	#MC	Peptid-Sequenz	AS-Position
0	MAVMAPR	1-7	1	YFFTSVSRPGRGEPR	31-45
0	TLVLLLSGALALTQTWAGSHS MR	8-30	1	GEPRFIAVGYVDDTQFVR	42-59
0	YFFTSVSRPGR	31-41	1	FIAVGYVDDTQFVRFSDAASQ R	46-68
0	FIAVGYVDDTQFVR	46-59	1	FSDAASQRMEPR	60-72
0	FSDAASQR	60-68	1	MEPRAPWIEQEGPEYWDGET R	69-89
0	MEPR	69-72	1	APWIEQEGPEYWDGETRK	73-90
0	APWIEQEGPEYWDGETR	73-89	1	VKAHSQTHR	91-99
0	AHSQTHR	93-99	1	AHSQTHRVDLGLTR	93-106
0	VDLGLTR	100-106	1	VDLGLTRGYYNQSEAGSHTVQ R	100-121
0	GYYNQSEAGSHTVQR	107-121	1	GYYNQSEAGSHTVQRMYGCD VGSDWR	107-132
0	MYGCDVGSDWR	122-132	1	MYGCDVGSDWRFLR	122-135
0	GYHQYAYDGK	136-145	1	FLRGYHQYAYDGK	133-145
0	DYIALK	146-151	1	GYHQYAYDGKDYIALK	136-151
0	EDLR	152-155	1	DYIALKEDLR	146-155
0	SWTAADMAAQTTK	156-168	1	EDLRSWTAADMAAQTTK	152-168
0	WEAAHVAEQLR	171-181	1	SWTAADMAAQTTKHK	156-170
0	AYLEGTCEVWLR	182-193	1	HKWEAAHVAEQLR	169-181
0	YLENGK	195-200	1	WEAAHVAEQLRAYLEGTCEVW LR	171-193
0	ETLQR	201-205	1	AYLEGTCEVWLR	182-194
0	TDAPK	206-210	1	RYLENGK	194-200
0	THMTHHAVSDHEATLR	211-226	1	YLENGKETLQR	195-205
0	CWALSFYPAEITLWQR	227-243	1	ETLQRDAPK	201-210
0	DGEDQTQDTELVEVTRPAGDGT FQK	244-267	1	TDAPKTHMTHHAVSDHEATLR	206-226
0	WAAVVVPSGQEQR	268-280	1	KSSDR	335-339
0	YTCHVQHEGLPKPLTLR	281-297	1	SSDRK	336-340
0	GGSYSQAASSDSAQGSVDVSLT ACK	341-364	1	KGGSYSQAASSDSAQGSVDVSL TACK	340-364
			1	GGSYSQAASSDSAQGSVDVSLT ACKV	341-365

Die Anzahl der tryptischen Peptide bei einer MC von 0 lag bei 26. Durch Zulassung von nur einer verpassten Schnittstelle kann der Wert verdoppelt werden. Viel essentieller jedoch ist, dass die Anzahl von einem *unique* Fragment auf fünf mögliche steigt. Somit ist die Wahrscheinlichkeit fünfmal höher eine richtige und direkte Typisierung durchzuführen. Das Gleiche gilt für die *hint*-Fragmentanzahl. Diese wird mehr als verdoppelt und führt so zu einer deutlicheren Charakterisierung des Allotyps. Die *unique* Fragmente liegen wie beschrieben alle in der polymorphen Zone der α_1 - (AS 25-114) und α_2 - (AS 115-206) Domäne.

Tabelle 3.18: Chymotryptischer Verdau *in silico* des HLA-A*02:01 im Vergleich mit 0 MC und 1 MC

#MC	Peptid-Sequenz	AS-Position	#MC	Peptid-Sequenz	AS-Position
0	MAVMAPRTLVLVLLSGALALTQT W	1-23	1	AGSHSMRYF	24-32
0	AGSHSMRY	24-31	1	FTSVSRPGRGEPRF	33-46
0	TSVSRPGRGEPRF	34-46	1	TSVSRPGRGEPRFIAVGY	34-51
0	IAVGY	47-51	1	IAVGYVDDTQF	47-57
0	VDDTQF	52-57	1	VDDTQFVRF	52-60
0	DSDAASQRMEPRAPW	61-75	1	VRFDSDAASQRMEPRAPW	58-75
0	IEQEGPEY	76-83	1	DSDAASQRMEPRAPWIEQEGP EY	61-83
0	DGETRKYKAHSQTHRVLDLGT R	85-108	1	IEQEGPEYW	76-84
0	NQSEAGSHTVQRMY	110-123	1	WDGETRKYKAHSQTHRVLDLGT LRGY	84-108
0	GCDVGSW	124-131	1	WDGETRKYKAHSQTHRVLDLGT LRGY	84-108
0	LRGY	134-137	1	YNQSEAGSHTVQRMY	109-123
0	DGKDY	143-147	1	NQSEAGSHTVQRMYGCDVGS W	110-131
0	IALKEDLRW	148-157	1	GCDVGSWRF	124-133
0	TAADMAAQTTKHKW	158-171	1	RFLRGY	132-137
0	EAAHVAEQLRAY	172-183	1	LRGYHQY	134-140
0	LEGTCVEW	184-191	1	HQYAY	138-142
0	LRRY	192-195	1	AYDGKDY	141-147
0	YPAEITLW	233-241	1	DGKDYIALKEDLRW	143-157
0	QRDGEDQTQDTELVETRPAG DGT	242-265	1	IALKEDLRWTAADMAAQTTKH KW	148-171
0	AAVVVPSGQEQRY	269-281	1	TAADMAAQTTKHKWEAAHVAE QLRAY	158-183
0	TCHVQHEGLPKPLTLRW	282-298	1	EAAHVAEQLRAYLEGTCVEW	172-191
0	EPSSQPTIPVGIAGLVLF	299-318	1	LEGTCVEWLRRY	184-195
0	GAVITGAVVAAMW	319-332	1	ALSFYPAEITLW	229-241
0	RRKSSDRKGGSY	333-344	1	QKWAAMVVVPSGQEQRY	266-281
0	SQAASSDAQSDVSLTACKV	345-365	1	GAVITGAVVAAMWRRKSSD- RKGGSY	319-344

Die Anzahl der chymotryptischen Peptide bei einer MC von 0 lag bei 25, was fast dem Wert der tryptischen Fragmentanzahl entspricht. Durch Zulassung von nur einer verpassten Schnittstelle kann der Wert auf 50 Fragmente verdoppelt werden. Die Anzahl der *unique* Fragmente steigt von einem auf drei. Damit erreicht Chymotrypsin nicht den Wert von Trypsin. Die *hint*-Fragmentanzahl steigt bei einer Erhöhung der verpassten Schnittstellen von ursprünglichen vier auf zehn.

Durch den Verdau *in silico* von HLA-A*02:01 durch Trypsin und Chymotrypsin ist es möglich, den HLA-Allotyp Allel zu identifizieren, wobei die Zulassung von verpassten Schnittstellen die Wahrscheinlichkeit erhöht Peptide zu finden, die nur diesem Allotyp zugeordnet werden können.

3.3.1.2 HLA-B

Repräsentativ für HLA-B wurde HLA-B*07:02 ausgewählt. Die Allelfrequenz in der europäischen Bevölkerung ist eine der höchsten für die B-Allele. Für die folgenden Analysen *in silico* wurde die HLA-B*07:02-Sequenz aus der Quelle <http://www.uniprot.org/> entnommen mit der ID „P01889 - 1B07_HUMAN“. Die Sequenz besteht aus 365 Aminosäuren, wovon für einen tryptischen Verdau 30 Arginine (R) und 10 Lysine (K) eine Rolle spielen. Dies ergibt eine rein theoretische enzymatische Schnittmöglichkeit von 40. Für das Enzym Chymotrypsin sind 6 Phenylalanine (F), 10 Tryptophane (W) und 16 Tyrosine (Y) mögliche Schnittstellen. Dies ergibt eine rein theoretische enzymatische Schnittmöglichkeit von insgesamt 32.

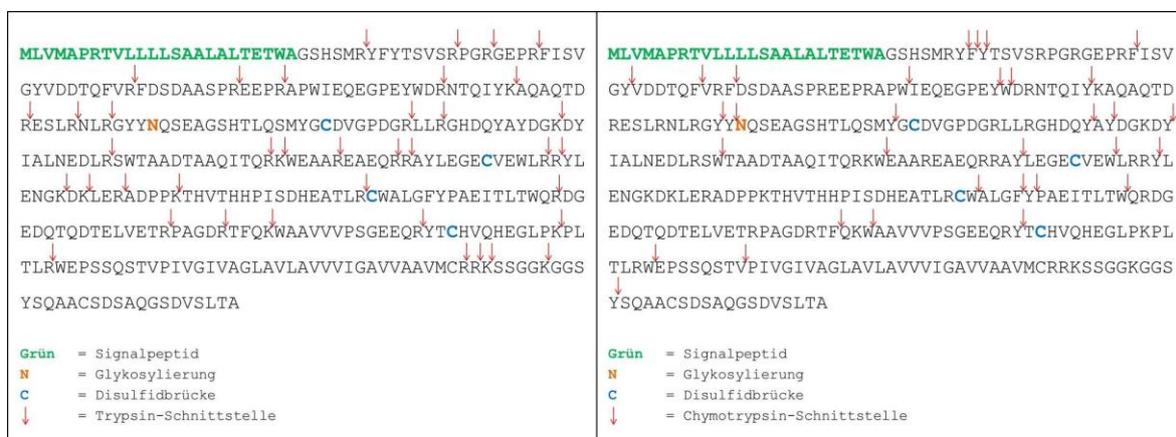


Abbildung 3.17: Tryptischer und chymotryptischer Verdau *in silico* eines HLA-B*07:02-Moleküls

Abgebildet ist links sowie rechts die Sequenz von HLA-B*07:02. Rote Pfeile markieren mögliche Schnittstellen von Trypsin (links) und Chymotrypsin (rechts). In grün ist das Signalpeptid markiert, das orangene N gibt die Glykosylierung an, die blauen Cs Disulfidbrücken (zwischen den AS-Positionen 125-188 und 227-283).

Zu sehen ist, dass bei Trypsin die Anzahl der verpassten Schnittstellen, die zugelassen werden, von Bedeutung ist (siehe Tabelle 3.19). Durch Zunahme der *missed cleavages* erhöht sich die Proteinabdeckung. Der größte Sprung ist von 0 MC zu 1 MC erkennbar. Bei Chymotrypsin ist keine Veränderung ab 1 MC zu erkennen.

Tabelle 3.19: Theoretische Proteinabdeckung von HLA-B*07:02 durch unterschiedlich verpasste Schnittstellen

Enzym → Missed cleavages (MC)↓	Trypsin (Proteinabdeckung %)	Chymotrypsin (Proteinabdeckung %)
0 MC	83,1	73,8
1 MC	89,1	78,2
2 MC	90,1	78,2
3 MC	90,1	78,2

In Abbildung 3.18 sind die durch Analyse *in silico* resultierenden Peptide mit verschiedenen MC-Werten gegeneinander aufgetragen. Die größte Ausbeute ist logischerweise mit drei

verpassten Schnittstellen, da hierbei die Anzahl der möglichen Fragmente ansteigt. Die Proteinabdeckung mit einer sehr strikten Zulassung der enzymatischen Peptide ist rechts zu sehen. Die tryptische Abdeckung bei einer MC von 0 ist um 10% besser als die der chymotryptischen.

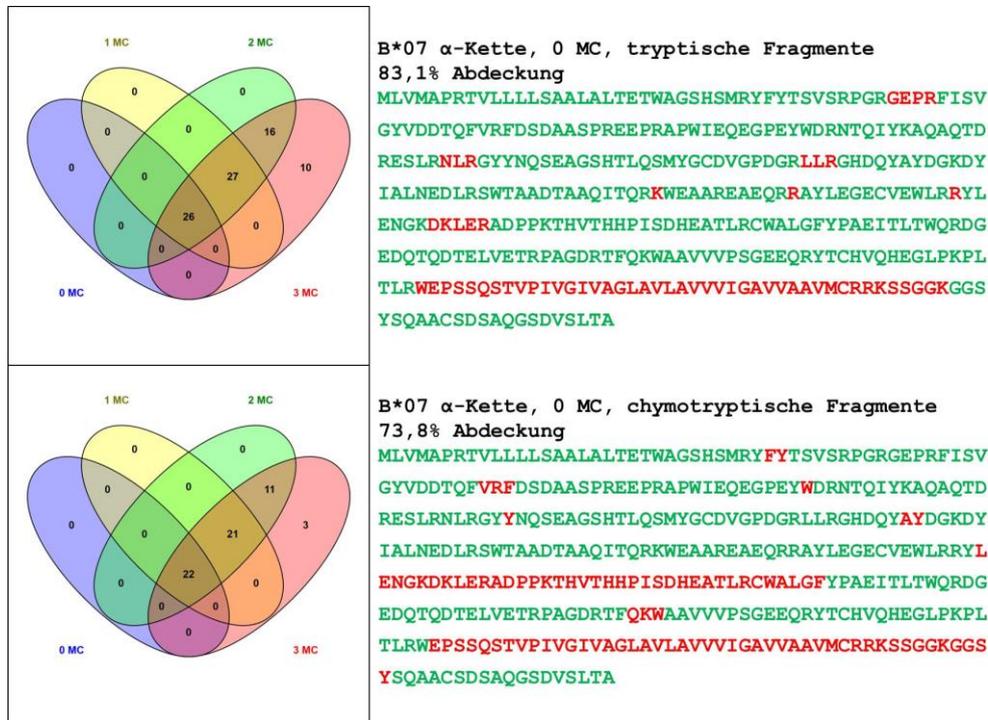


Abbildung 3.18: Vergleich des tryptischen und chymotryptischen Verdaus *in silico* des HLA-B*07:02-Moleküls (unterschiedliche MC-Parameter und Proteinabdeckung)

Links zu sehen ist der Vergleich der Fragmente mit unterschiedlichen MC-Parametern und deren Schnittmengen (erstellt mit <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>). Abgebildet rechts ist die Proteinabdeckung mit tryptischen (oben) und chymotryptischen (unten) Schnittmustern mit einer MC von 0 (erstellt mit www.expasy.org/PeptideMass).

Die Tabellen mit der Auflistung von tryptischen sowie chymotryptischen Fragmenten im Vergleich mit unterschiedlichen verpassten Schnittstellen (0 MC und 1 MC) sind im Anhang zu sehen (Tabelle 0.4 und Tabelle 0.5). Theoretisch könnte ohne tryptische Schnittstelle 1 *unique* Peptid entstehen, bei einer verpassten Schnittstelle sogar drei. Bei 1 MC kommen noch zwei *hint* Fragmente und 14 *shared* hinzu. Bei 0 MC sind es nur fünf weitere *shared* Peptide. Die Anzahl der Fragmente kann von 26 auf 53 erhöht werden. Für Chymotrypsin sieht es ähnlich aus. Hier können durch die zusätzliche Schnittstelle anstatt eines *unique* Peptids drei beobachtet werden. Für die *shared* Peptide findet eine Verdopplung von sechs auf zwölf statt. Die allgemeine Anzahl der Fragmente steigt von 23 auf 43 an.

3.3.1.3 HLA-C

Repräsentativ für HLA-C wurde HLA-C*07:02 ausgewählt. Die Allelfrequenz in der europäischen Bevölkerung ist eine der höchsten für die C-Allele. Für die folgenden Analysen *in silico* wurde die HLA-C*07:02-Sequenz aus der Quelle <http://www.uniprot.org/> entnommen

mit der ID „P10321 - 1C07_HUMAN“. Die Sequenz beträgt 365 Aminosäuren, wovon für einen tryptischen Verdau 30 Arginine (R) und 10 Lysine (K) eine Rolle spielen. Dies ergibt eine rein theoretische enzymatische Schnittmöglichkeit von 40. Für das Enzym Chymotrypsin sind 6 Phenylalanine (F), 9 Tryptophane (W) und 13 Tyrosine (Y) mögliche Schnittstellen. Dies ergibt eine rein theoretische enzymatische Schnittmöglichkeit von insgesamt 38.

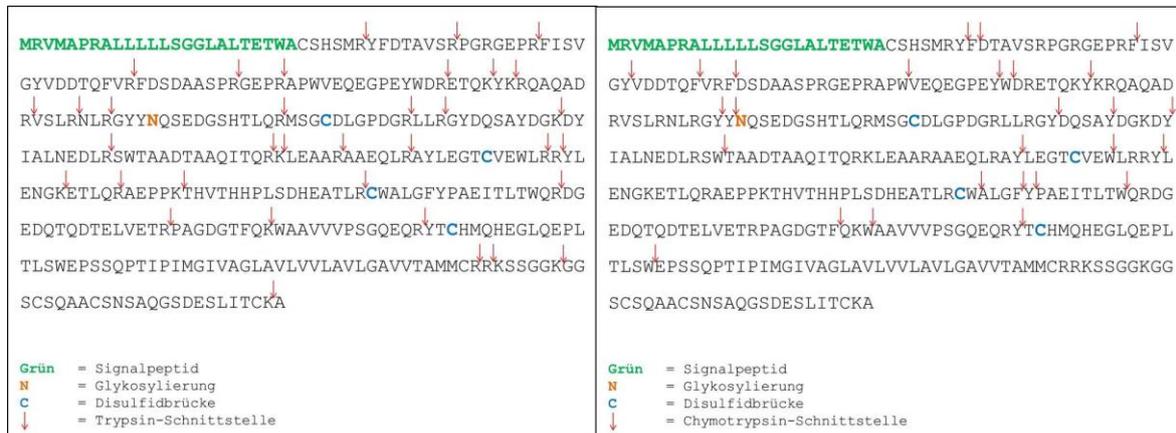


Abbildung 3.19: Tryptischer und chymotryptischer Verdau *in silico* eines HLA-C*07:02-Moleküls

Abgebildet ist links sowie rechts die Sequenz von HLA-C*07:02. Rote Pfeile markieren mögliche Schnittstellen von Trypsin (links) und Chymotrypsin (rechts). In grün ist das Signalpeptid markiert, das orangefarbene N gibt die Glykosylierung an, die blauen Cs Disulfidbrücken (zwischen den AS-Positionen 125-188 und 227-283).

Zu sehen ist, dass bei Trypsin die Anzahl der verpassten Schnittstellen, die zugelassen werden, von Bedeutung ist (siehe Tabelle 3.20). Durch Zunahme der *missed cleavages* erhöht sich die Proteinabdeckung. Der größte Sprung ist von 0 MC zu 1 MC erkennbar. Bei Chymotrypsin ist, wie zuvor bei den anderen Allotypen, keine Veränderung ab 1 MC zu erkennen.

Tabelle 3.20: Theoretische Proteinabdeckung von HLA-C*07:02 durch unterschiedlich verpasste Schnittstellen

Enzyme → Missed cleavages (MC)↓	Trypsin (Proteinabdeckung %)	Chymotrypsin (Proteinabdeckung %)
1 MC	76,2	61,2
2 MC	85,0	64,8
3 MC	85,2	64,8
4 MC	85,2	64,8

In Abbildung 3.20 sind die durch Analyse *in silico* resultierenden Peptide mit verschiedenen MC-Werten gegeneinander aufgetragen. Die größte Ausbeute ist hier wieder bei drei verpassten Schnittstellen, da hierbei die Anzahl der möglichen Fragmente ansteigt. Die Proteinabdeckung mit einer sehr strikten Zulassung der enzymatischen Peptide ist rechts zu sehen. Die tryptische Abdeckung bei einer MC von 0 ist um 15% besser als die der chymotryptischen.

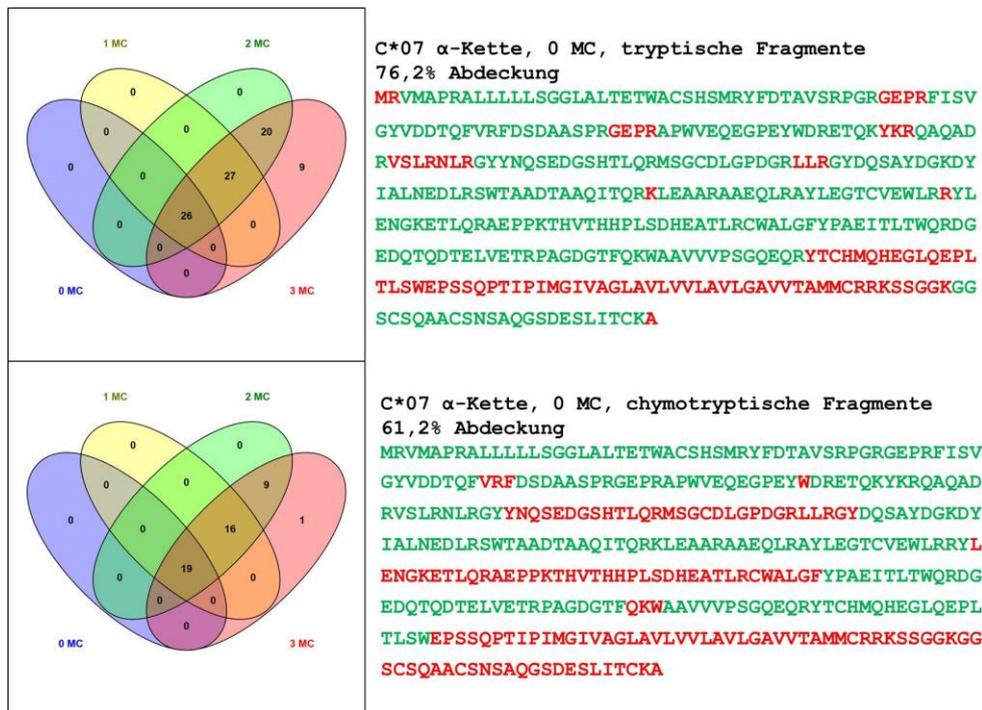


Abbildung 3.20: Vergleich des tryptischen und chymotryptischen Verdaus *in silico* des HLA-C*07:02-Moleküls (unterschiedliche MC-Parameter und Proteinabdeckung)

Links zu sehen ist der Vergleich der Fragmente mit unterschiedlichen MC-Parametern und deren Schnittmengen (erstellt mit <http://bioinfo.pn.cnb.csic.es/tools/venny/>). Abgebildet rechts ist die Proteinabdeckung mit tryptischen (oben) und chymotryptischen (unten) Schnittmustern mit einer MC von 0 (erstellt mit www.expasy.org/PeptideMass).

Die Tabellen mit der Auflistung von tryptischen sowie chymotryptischen Fragmenten im Vergleich mit unterschiedlichen verpassten Schnittstellen (0 MC und 1 MC) sind im Anhang zu sehen (siehe Tabelle 0.6 und Tabelle 0.7). Theoretisch könnten ohne verpasste tryptische Schnittstelle fünf *unique* Peptide und ohne verpasste chymotryptische Schnittstelle zwei *unique* Peptide entstehen. Bei einer verpassten Schnittstelle erhöht sich bei Trypsin die Anzahl enorm. Bei tryptischer 1 MC wären es 14 *unique*. Bei Chymotrypsin bleibt die Zahl mit zwei konstant. Hierzu kommen noch bei beiden 0 MC drei *hint* Fragmente und bei Chymotrypsin vier *shared* (bei Trypsin nur drei). Die Anzahl der Fragmente kann bei Trypsin von 0 MC zu 1 MC von 24 auf 54 erhöht werden, bei Chymotrypsin von 19 auf 34.

3.3.2 HLA-Monomere

Der einfachste Weg die *in silico*-Daten in ein Experiment zu übertragen, ist der enzymatische Verdaus von einzelnen HLA-Molekülen. Da in unserem Labor schwere Ketten einiger Allotypen vorliegen (siehe 2.2.2.2), kann man diese verwenden, um in einer definierten Konzentration die einzelnen Proteine zu verdauen. Bei den HLA-Monomeren liegt eine veränderte Sequenz vor im Vergleich zu den natürlich exprimierten HLA-Molekülen. Die Signalsequenz und die Transmembrandomäne fehlen fast vollständig, da Transport zur Verankerung in die bakterielle Zellmembran nicht erwünscht ist. Zusätzlich wurde eine

Biotinylierungs-Sequenz eingefügt, um die HLA-Monomere tetramerisieren (siehe 2.2.3.2) oder an aAPCs (siehe 2.2.2.5) binden zu können. Die Anzahl an Aminosäuren beträgt im HLA-Monomer 296 AS im Gegensatz zu 365 AS im natürlich exprimierten HLA-Allel.

Kriterium eines enzymatischen Verdau ist die Anzahl der gefundenen HLA-assoziierten Peptide insgesamt. Darüber hinaus kann man die Anzahl der Peptide ermitteln, die keinen Bezug zu dem verdauten Protein haben und somit Verunreinigungs-Peptide darstellen. Die Anzahl der *unique* Peptide sowie der *hint* Peptide ist ein weiterer wichtiger Faktor, da sie den Erfolg der Typisierung angibt. Der PSM-Mittelwert wurde aufgenommen, da er in der klassischen Proteomik gerne als ein Qualitätsmerkmal der Messung herangezogen wird und eine quantitative Aussage zulassen kann. Die Proteinabdeckung der HLA-Monomere entspricht nicht dem realen Wert, da einige Sequenzabschnitte fehlen und die Biotinylierungs-Sequenz nicht in der verwendeten Datenbank vorhanden ist. Im Folgenden sind enzymatische Verdau von HLA-Monomeren mit der Ursprungssequenz von HLA-A*02:01 und -B*07:02 gezeigt. Da in unserem Labor keine HLA-C-Monomere vorhanden sind, wurde die Analyse nicht durchgeführt.

3.3.2.1 HLA-A*02:01

Es wurden zwei verschiedene Stammlösungen des HLA-A*02:01-Monomers verwendet und zwei Verdau durchgeführt und massenspektrometrisch gemessen. In Abbildung 3.21 ist die veränderte Sequenz eines HLA-A*02:01-Monomers abgebildet.

```

MAVMAPRTLVLVLLLSGALALTQTWAGSHSMRYFFTSVSRPGRGEPFRFIAV
GYVDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKASHSQTH
RVDLGTLRGYYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGS DWRFLRGYHQYAYDGKDY
IALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRL
ENKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEITLTWQRDG
EDQTQDTELVETRPAGDGTQKWAAVVPSGQEQRYTCHVQHEGLPKPL
TLRWEPSSQPTIPIVGI IAGLVLF GAVITGAVVAAVMWRKSSDRKGGG
YSAASSDSAQGS DVS LTACKVDPGSGSLHHIFEAQIEWRHR

```

Blau: fehlt

Grün: Biotinylierungssequenz

Abbildung 3.21: Veränderte Sequenz eines HLA-A*02:01-Monomers

Die Sequenz liegt leicht abgeändert vor. Die Signalsequenz fehlt vollständig, wie auch die Transmembrandomäne. Dafür ist in Grün die zusätzlich eingefügte Biotinylierungs-Sequenz für das BirA-Enzym zu sehen.

In Abbildung 3.22 sind links die Daten eines tryptischen Verdau im Vergleich zu den Daten *in silico* zu sehen mit zwei unterschiedlichen verpassten Schnittstellen und rechts die chymotryptischen.

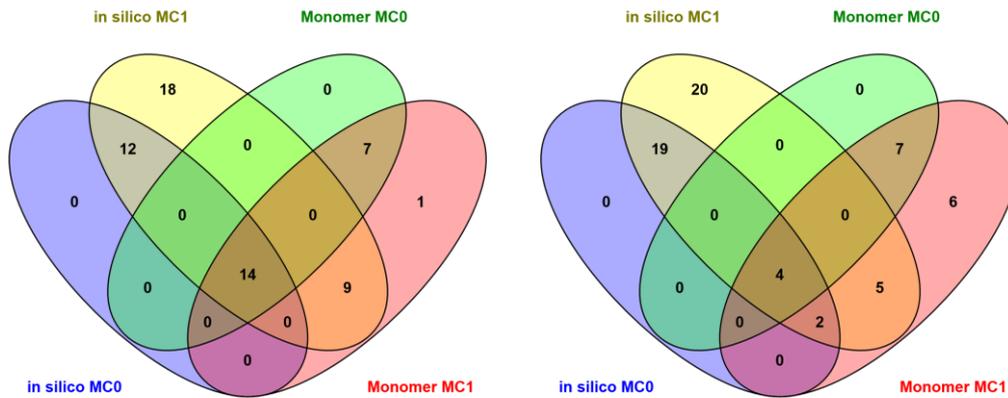


Abbildung 3.22: Vergleich der Daten *in silico* von HLA-A*02:01 mit experimentellen mit unterschiedlichen Schnittstellen

Links ist der Vergleich von tryptischen Daten *in silico* mit experimentell gewonnenen Daten zu sehen, rechts die mittels Chymotrypsin gewonnenen Fragmente. Die Abbildung wurde mithilfe des Programmes <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/> erstellt.

Diese Abdeckung zeigt eindeutig, dass viele Peptide verloren gehen oder überhaupt nicht durch den Verdau erstellt werden. Hier haben wir eine einfache Probe von nur einem Protein vorliegen. Trotzdem kann die theoretische Anzahl nicht durch die experimentelle abgedeckt werden, weder durch den tryptischen noch durch den chymotryptischen Verdau. Umso wichtiger ist es, die richtigen, also die *unique* Peptide, zu sehen.

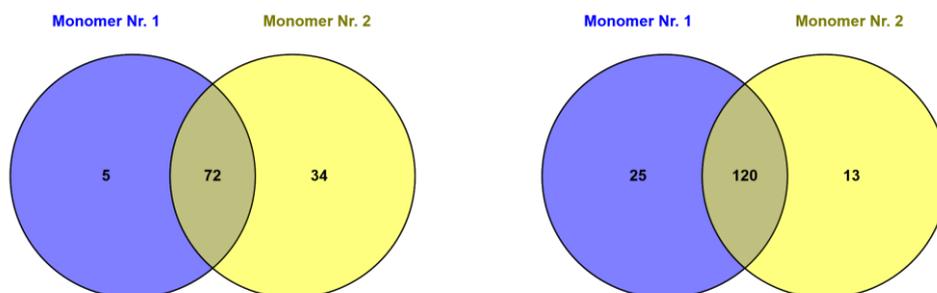


Abbildung 3.23: Vergleich der zwei gemessenen Verdaus ohne enzymatische Schnittstellen

Links zu sehen das HLA-A*02:01-Monomer zweimal verdaut mit Trypsin und rechts mit Chymotrypsin. Die Anzahl der Fragmente ist ohne enzymatische Schnittstellen angegeben. Die Abbildung wurde mithilfe des Programmes <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/> erstellt.

In Abbildung 3.23 zu sehen ist, dass bei tryptischen (links) wie chymotryptischen (rechts) Verdaus zwischen zwei Verdaus die unter den gleichen Protokollparametern durchgeführt wurden eine leichte Schwankung in der Anzahl der Fragmente zu beobachten ist.

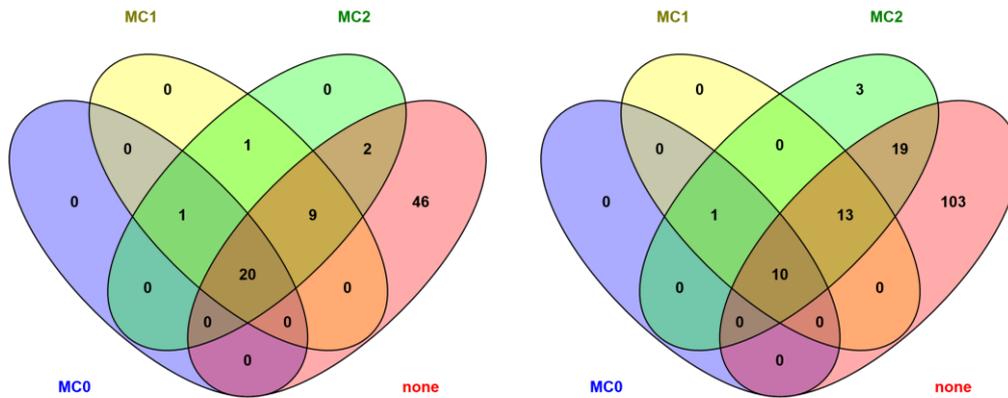


Abbildung 3.24: Fragment-Ausbeute des tryptischen und chymotryptischen Verdaus von HLA-A*02:01 mit unterschiedlichen Schnittstellen

Links ist der tryptische und rechts der chymotryptische Vergleich der Fragmente mit unterschiedlichen Werten der möglichen verpassten Schnittstellen zu sehen. *None* steht hierbei für keine enzymatischen Schnittstellen. Die Abbildung wurde mithilfe des Programmes <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/> erstellt.

In Abbildung 3.24 sind die Ergebnisse zweier HLA-A*02:01 Monomer-Verdaus zu sehen. Prägnant sind hierbei zwei Dinge. Die Ausbeute an Peptiden verdoppelt sich mindestens, wenn bei der Prozessierung keine enzymatische Schnittmuster verwendet werden (auch zu sehen in Tabelle 3.21 und Tabelle 3.22). Ein Grund für die hohe Anzahl nicht enzymatisch spezifischer Peptide könnten andere Proteasen sein, die durch die Probenverarbeitung hineingelangen oder eine ungewöhnliche Schneideaktivität der Enzyme. Die andere Auffälligkeit liegt, wie in Tabelle 3.21 und Tabelle 3.22 zu sehen, in der starken Variation der Anzahl der Fragmente zwischen den zwei Verdaus. Da der Proteineinsatz der beiden verdauten Proben identisch war und deshalb keine Konzentrationsunterschiede vorhanden sein sollten, sind die Unterschiede mit der Variabilität im Verdau, speziell des unspezifischen, und der Schwankung in Messungen die bei der Massenspektrometrie bekannt ist, zu erklären. Die Ergebnisse in den Tabellen zeigen aber auch, dass dadurch zusätzliche *unique* Peptide gewonnen werden. Bei der Prozessierung mit einem chymotryptischen Schnittmuster ist der Anstieg der *unique* Fragmente bei *none* enorm. Die Anzahl der *hint* Fragmente steigt bei beiden Verdaus stark an, dies ist wichtig für die Charakterisierung des Allotyps, vor allem wenn keine *unique* Peptide vorhanden sind. 0 MC als eine sehr strikte Prozessierung mit keiner verpassten Schnittstelle kann keine *unique* Peptide vorweisen und ist so für eine alternative Typisierung nicht geeignet. Der PSM-Wert als ein Qualitätsmerkmal ist dort durch die geringe Anzahl an Fragmenten mit 0 MC am höchsten und fällt Richtung *none* ab. Dies ist ein gutes Beispiel, wie man durch Veränderung der Prozessierungs-Parameter die Aussage der Probe verändern kann. Die Proteinabdeckung wird durch den Anstieg der Fragmente bei *none* immer höher, wobei bei Trypsin ab 1 MC keine großen Veränderungen mehr zu beobachten sind. Verunreinigungen

in Form von Peptiden die keinen HLA-assoziierten Bezug haben steigen bei *none* an und sind bei 0 MC und 1 MC am geringsten. Da der Monomerverdau eine Einzelproteinlösung war, sollten keine anderen Proteine vorhanden sein. Dabei liegt der Anteil der gezählten Peptidspektren (PSM-Wert) der mit HLA-Molekülen assoziiert ist zwischen 92% und 95% (bei einem Verdau mit Chymotrypsin zwischen 80% und 92%) und zeigt somit, dass der Hauptanteil der Probe HLA-assoziierte Peptide sind. Bei Die zusätzlich identifizierten Peptide sind durch Verunreinigungen während der Verdau erklärbar.

Tabelle 3.21: Vergleich der beiden tryptischen HLA-A*02:01-Monomerverdau durch unterschiedliche Kriterien und MCs

Verdau 1 und 2 → Kriterien ↓	<i>none</i>	0 MC	1 MC	2 MC	<i>none</i>	0 MC	1 MC	2 MC
HLA-Peptide ²	107	26	39	42	143	27	39	44
PSMs ²	1883	1397	1791	1833	1876	1290	1670	1703
Anzahl <i>unique</i> Peptide	1	0	1	1	4	0	1	2
Anzahl <i>hint/shared</i> -Peptide	29	11	16	17	42	11	15	18
Proteinabdeckung ¹ (%)	67,67	62,74	67,40	67,40	67,12	62,74	66,30	66,85
Anzahl Nicht-HLA-Peptide ³	43	19	20	22	40	32	28	30
Anzahl Nicht-HLA-PSMs ³	127	75	84	90	119	110	116	112

1= entspricht der Proteinabdeckung von HLA-A*02:01 in vollständiger Sequenz. Diese kann durch ein HLA-Monomer nicht erreicht werden; 2= Peptide/PSMs die mit dem HLA-A*02:01-Monomer assoziiert sind; 3= Anzahl aller Peptide/PSMs nach Filter, abzüglich der Peptide die aus dem HLA-Monomer stammen.

Tabelle 3.22: Vergleich der beiden chymotryptischen HLA-A*02:01-Monomerverdau durch unterschiedliche Kriterien und MCs

Verdau 1 und 2 → Kriterien ↓	<i>none</i>	0 MC	1 MC	2 MC	<i>none</i>	0 MC	1 MC	2 MC
HLA-Peptide ²	118	16	33	59	170	16	34	55
PSMs ²	622	179	241	424	574	125	273	390
Anzahl <i>unique</i> Peptide	17	0	0	1	16	0	0	1
Anzahl <i>hint/shared</i> Peptide	49	6	10	18	47	5	11	17
Proteinabdeckung ¹ (%)	73,42	27,67	41,10	60,00	72,33	31,51	47,12	66,03
Anzahl Nicht-HLA-Peptide ³	109	12	19	34	26	5	9	12
Anzahl Nicht-HLA-PSMs ³	150	30	76	88	105	14	43	51

1= entspricht der Proteinabdeckung von HLA-A*02:01 in vollständiger Sequenz. Diese kann durch ein HLA-Monomer nicht erreicht werden. 2= Peptide/PSMs die mit dem HLA-A*02:01-Monomer assoziiert sind; 3= Anzahl aller Peptide/PSMs nach Filter, abzüglich der Peptide die aus dem HLA-Monomer stammen.

3.3.2.2 HLA-B*07:02

Es wurden zwei verschiedene Stammlösungen des HLA-B*07:02-Monomers verwendet und zwei Verdau durchgeführt und massenspektrometrisch gemessen.

In Abbildung 3.25 sind links die Daten eines tryptischen Verdau im Vergleich zu den Daten *in silico* zu sehen mit zwei unterschiedlichen verpassten Schnittstellen. Auch hier ist zu

sehen, dass die theoretische Fragmentanzahl nicht durch die experimentellen vollständig abgedeckt werden kann. Bei Chymotrypsin (rechts) sind auch zusätzliche Fragmente zu beobachten.

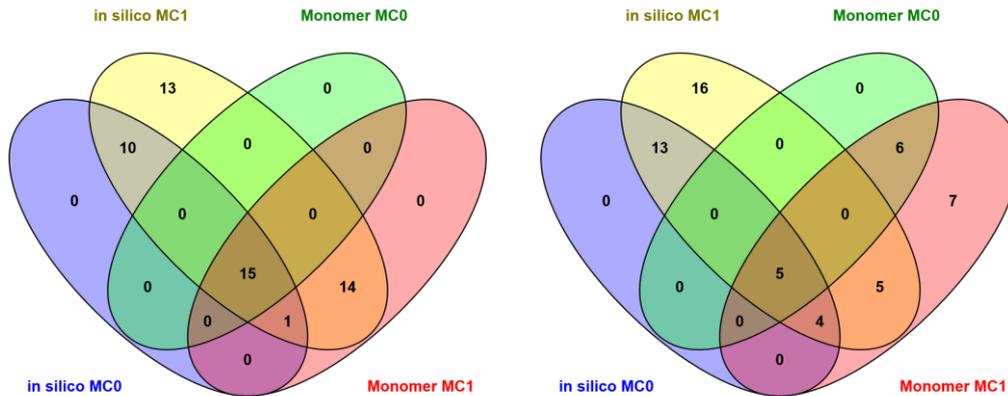


Abbildung 3.25: Vergleich der Daten *in silico* von HLA-B*07:02 mit experimentellen mit unterschiedlichen Schnittstellen

Links ist der Vergleich von tryptischen Daten *in silico* mit experimentell gewonnenen Daten zu sehen, rechts die mittels Chymotrypsin gewonnenen Fragmente. Die Abbildung wurde mithilfe des Programmes <http://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/> erstellt.

Die Vergleichbarkeit zwischen zwei Verdauungen in ihren HLA-assoziierten Peptiden ist auch bei HLA-B*07:02-Monomeren minimal unterschiedlich und lässt sich auch auf die Variabilität der Proben, des Verdauens und der massenspektrometrischen Messung zurückführen.

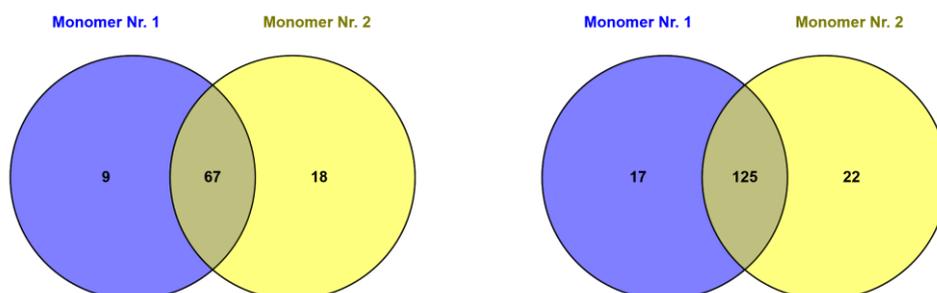


Abbildung 3.26: Vergleich der zwei gemessenen Verdauungen ohne enzymatische Schnittstellen

Links zu sehen das HLA-B*07:02-Monomer zweimal verdaut mit Trypsin und rechts mit Chymotrypsin. Die Anzahl der Fragmente ist ohne enzymatische Schnittstellen angegeben. Die Abbildung wurde mithilfe des Programmes <http://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/> erstellt.

In Abbildung 3.27 ist zu sehen, wie viele Fragmente zwischen den verschiedenen Prozessierungen geteilt werden oder sich unterscheiden. Bei Chymotrypsin (rechts) ist auch hier der Anstieg bei der Prozessierung ohne enzymatische Schnittstellen am höchsten.

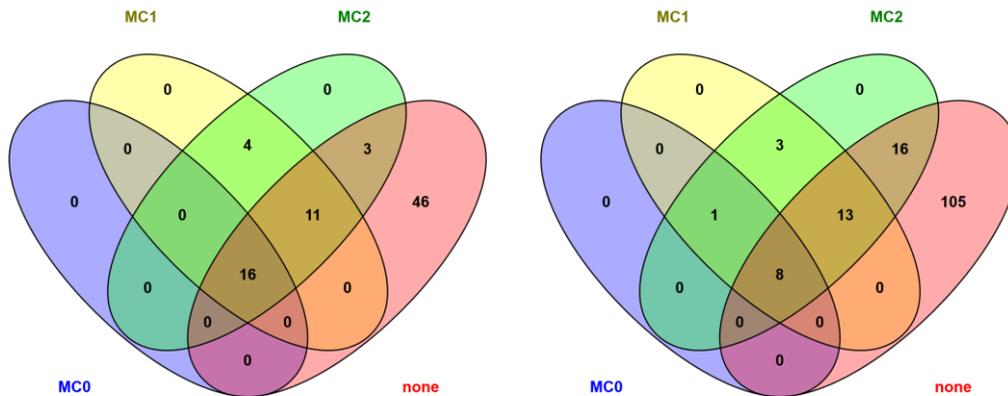


Abbildung 3.27: Fragment-Ausbeute des tryptischen und chymotryptischen Verdaus von HLA-B*07:02 mit unterschiedlichen Schnittstellen

Links ist der tryptische und rechts der chymotryptische Vergleich der Fragmente mit unterschiedlichen Werten der möglichen verpassten Schnittstellen zu sehen. *None* steht hierbei für keine enzymatischen Schnittstellen. Die Abbildung wurde mithilfe des Programmes <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/> erstellt.

Wichtig zu vermerken ist, dass durch die tryptischen Schnittstellen zwei künstliche *unique* Fragmente entstehen (siehe Tabelle 3.23). Diese sind bei dem ersten Verdaus in 1 MC und 2 in Rot vermerkt (Sequenz RAYLEGECEVWLR und RAYLEGECEVWLR). Diese beiden Peptide werden als *unique* Peptide anhand ihres Schnittstellenmusters angegeben sind aber eigentlich in acht anderen Allotypen vorhanden. Bei einer Prozessierung ohne Schnittmuster ist dieses Problem nicht vorhanden. Darum wäre es sinnvoll einen Verdaus mittels 2 MC und *none* zuprozessieren um zu vergleichen, welche Peptide rein enzymatisch sind (mit enzymatischen Schnittstellen) und welche „echte“ *unique* sind. Bei der chymotryptischen Prozessierung ohne verpasste Schnittstellen sind keine *unique* Fragmente zu beobachten. Die Anzahl der *hint/shared* Fragmente steigt hier auch in Richtung *none* bei beiden Enzymen stetig an, mit dem PSM-Wert verhält es sich umgekehrt. Die Proteinabdeckung geht bei Trypsin durch *none* nochmals stark nach oben, wobei hier bei Chymotrypsin nicht solch ein starker Unterschied zu beobachten ist. Der Anteil der HLA-assoziierten Moleküle (PSM-Wert) ist bei den tryptischen Verdaus des HLA-B*07:02-Monomers niedriger im Vergleich zu dem der HLA-A*02:01-Monomere (72% - 78,7%). Bei Chymotrypsin liegt der Anteil der HLA-assoziierten Peptide die gemessen wurden zwischen 67% und 96%. Der Wert ist abhängig von den verpassten enzymatischen Schnittstellen und den beiden Läufen.

Tabelle 3.23: Vergleich der beiden tryptischen HLA-B*07:02-Monomerverdaus durch unterschiedliche Kriterien und MCs

Verdau 1 und 2 → Kriterien ↓	none	0 MC	1 MC	2 MC	none	0 MC	1 MC	2 MC
HLA-Peptide ²	107	20	39	43	108	22	39	40
PSMs ²	1917	1519	1802	1877	2166	1585	1906	1940
Anzahl <i>unique</i> Peptide	3	1	3	4	3	1	3	3
Anzahl <i>hint/shared</i> Peptide	28	5	11	14	29	5	12	13
Proteinabdeckung (%) ¹	96,89	57,73	69,89	70,72	86,51	59,39	69,61	69,61
Anzahl Nicht-HLA-Peptide ³	117	79	105	107	89	53	70	71
Anzahl Nicht-HLA-PSMs ³	742	430	507	519	793	464	524	524

1= entspricht der Proteinabdeckung von HLA-B*07:02 in vollständiger Sequenz. Diese kann durch ein HLA-Monomer nicht erreicht werden; 2= Peptide/PSMs die mit dem HLA-B*07:02-Monomer assoziiert sind; 3= Anzahl aller Peptide/PSMs nach Filter, abzüglich der Peptide die aus dem HLA-Monomer stammen.

Tabelle 3.24: Vergleich der beiden chymotryptischen HLA-B*07:02-Monomerverdaus durch unterschiedliche Kriterien und MCs

Verdau 1 und 2 → Kriterien ↓	none	0 MC	1 MC	2 MC	none	0 MC	1 MC	2 MC
HLA-Peptide ²	176	16	37	54	172	14	31	50
PSMs ²	670	142	244	491	670	147	260	457
Anzahl <i>unique</i> Peptide	5	0	1	3	5	0	1	3
Anzahl <i>hint/shared</i> Peptide	27	2	7	10	24	1	6	11
Proteinabdeckung (%) ¹	73,76	35,91	57,73	70,44	71,27	30,39	50,28	67,13
Anzahl Nicht-HLA-Peptide ³	36	5	10	16	30	4	11	13
Anzahl Nicht-HLA-PSMs ³	188	15	117	41	175	9	14	18

1= entspricht der Proteinabdeckung von HLA-B*07:02 in vollständiger Sequenz. Diese kann durch ein HLA-Monomer nicht erreicht werden; 2= Peptide/PSMs die mit dem HLA-B*07:02-Monomer assoziiert sind; 3= Anzahl aller Peptide/PSMs nach Filter, abzüglich der Peptide die aus dem HLA-Monomer stammen.

3.3.3 Homozygote Zelllinien

Die in HLA Klasse I homozygote Zelllinie JY eignet sich hervorragend um von einzeln verdauten Proteinen näher an die Situation zu kommen, wie sie in komplexen Proben vorliegt. Der Vorteil hier liegt daran, dass die Probe zwar nach der HLA-Isolation verdaut wurde, aber durch die homozygoten HLA-A-, -B- und -C-Genloci nur jeweils ein Allel identifiziert werden muss. Hier wird die Kombination der Proteomik mit der Ligandomik durchgeführt, um eine Typisierung trotz steigender Probenkomplexität durchzuführen. Da selbst die Aufreinigung der HLA-Moleküle methodischen Schwankungen unterliegt, wurden zwei Proben für den Verdau verwendet, bei denen die HLA-Moleküle aus zwei gleich großen Zellpellets isoliert wurden. Die im Größenausschlussfilter in Lösung zurückbleibenden HLA-Moleküle (Retentat) werden in Volumen und Proteinkonzentration bestimmt. Dies soll einen identischen Konzentrationseinsatz für den Verdau garantieren.

Tabelle 3.25: Proteinkonzentration und Retentatvolumen der zwei JY-Proben

Probe	Proteinkonzentration (mg/ml)	Retentatvolumen (µl)
JY1	20,15	31
JY2	29,74	33

3.3.3.1 Identifikation von HLA-Allotypen über enzymatische Peptide

Tabelle 3.26 zeigt die Ergebnisse aus dem Verdau der zwei JY-Retentate.

Tabelle 3.26: Tryptischer Verdau mit unterschiedlichen MC-Parametern von JY1 und JY2

Parameter	JY1				JY2			
	<i>none</i>	0 MC	1 MC	2 MC	<i>none</i>	0 MC	1 MC	2 MC
HLA-Peptide ¹	245	90	153	188	272	95	158	192
PSMs ¹	1095	462	817	962	1319	542	963	1116
Anzahl <i>unique</i> Peptide ²	40	21	34	37	42	21	33	39
Anzahl <i>hint</i> Peptide ²	92	21	56	50	96	38	71	51
Proteinabdeckung								
A*02:01	72,05	49,32	74,52	75,07	76,16	50,41	75,62	76,16
B*07:02	70,99	51,93	69,61	71,27	70,99	54,97	69,61	71,27
C*07:02	57,10	49,45	58,20	59,02	49,18	47,81	56,56	56,28
Anzahl Nicht-HLA-Peptide ³	2191	1451	2257	2554	2306	1500	2346	2588
Anzahl Nicht-HLA-PSMs ³	3081	2030	3236	3681	3300	2072	3452	2933

1= Peptide/PSMs die aus einem HLA-Molekül stammen (Nicht klassische HLA-Moleküle, HLA Klasse II-Moleküle, β_2 -Mikroglobulin); 2= Anzahl bezieht sich nur auf HLA-A-, -B- und -C-Allotypen; 3= Anzahl aller Peptide/PSMs nach Filter, abzüglich der Peptide die aus einem HLA-Molekül stammen.

Der Filter ohne tryptische Schnittmuster (*none*) zeigt die höchste Anzahl an HLA-assoziierten Peptiden und doppelte so viele *unique* wie für die Prozessierung ohne verpasste Schnittstellen (0 MC). Die eingesetzte Menge für den Verdau war identisch, die leichten Schwankungen sind durch methodische (HLA-Isolation und enzymatischer Verdau) und durch messungsbedingte Schwankungen zu erklären. Die Proteinabdeckung bei 0 MC ist über alle Allotypen relativ identisch, geht aber bei Erhöhung der verpassten Schnittstellen oder *none* stark auseinander. Wichtig ist die Abdeckung der Sequenzen durch *unique* Peptide. Bei JY1 konnte nur bei 0 MC HLA-A*02:01 nicht über ein *unique* Peptid getroffen werden. Die Prozessierung zeigt die höchste Anzahl an *unique* Peptiden (für HLA-A*02:01 sind es fünf, für HLA-B*07:02 sechs Peptide und für HLA-C*07:02 zwei). Der Anteil der HLA-assoziierten Peptide (PSM-Wert) betrug bei dem Verdau des JY1-Pellets zwischen 17% und 27%. Bei dem Verdau des JY2-Pellets liegt der Anteil mit 26% - 36% höher.

Tabelle 3.27: Durch MS/MS identifizierte *unique* Peptide nach tryptischem Verdau

HLA-A*02:01 (nachgewiesen)	HLA-B*07:02 (nachgewiesen)	HLA-C*07:02 (nachgewiesen)
AHSQTHRVDLGLTR JY1: <i>none</i> , 2 MC, 1 MC JY2: <i>none</i> , 2 MC, 1 MC	GHDQYAYDGK JY1: <i>none</i> , 2 MC, 1 MC, 0 MC JY2: <i>none</i> , 2 MC, 1 MC, 0 MC	MSGCDLGPDGR JY1: <i>none</i> , 2 MC, 1 MC, 0 MC JY2: <i>none</i> , 2 MC, 1 MC, 0 MC
VKAHSQTHRVDLGLTR JY1: <i>none</i> , 2 MC JY2: <i>none</i> , 2 MC	LLRGHDQYAYDGK JY1: <i>none</i> , 2 MC, 1 MC JY2: <i>none</i> , 2 MC, 1 MC	AAEQLR JY1: 2 MC, 1 MC, 0 MC JY2: <i>none</i> , 2 MC, 1 MC
KVKAHSQTHRVDLGLTR JY1: <i>none</i> JY2: <i>none</i>	RRAYLEGECVEWLR JY1: <i>none</i> JY2: <i>none</i>	RYLENGKETLQRAEPPKTHVTHHPLSDHEA TLR JY: / JY2: <i>none</i>
APWIEQEGPEYWDGETRK JY1: <i>none</i> , 2 MC, 1 MC JY2: <i>none</i> , 2 MC, 1 MC	GHDQYAYDGKDIALNEDLR JY1: <i>none</i> , 2 MC, 1 MC JY2: <i>none</i> , 2 MC, 1 MC	
APWIEQEGPEYWDGETRK K JY1: <i>none</i> , 2 MC JY2: <i>none</i> , 2 MC	LLRGHDQYAYDGKDIALNEDLR JY1: <i>none</i> , 2 MC JY2: <i>none</i> , 2 MC	
MEPRAPWIEQEGPEYWDGE TR JY1: / JY2: <i>none</i> , 2 MC, 1 MC	LLRGHDQYAYDGKDIALNEDLRSWTAADTAAQITQR JY1: / JY2: <i>none</i>	
	LLRGHDQYAYDGKDIALNEDLRSWTAADTAAQITQRK JY1: <i>none</i> JY2: /	
	LLRGHDQYAYDGKDIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKWE AAR JY1: / JY2: <i>none</i>	

Anmerkung: Auf Modifikationen wurde keine Rücksicht genommen.

Die restlichen *unique* Peptide betreffen die nicht klassischen HLA-Moleküle und HLA Klasse II. Bei JY2 ist eine ähnliche Situation wie bei JY1 zu beobachten. Die höchste Anzahl der *unique* Peptide, die alle Allotypen abdecken, ist bei *none* zu finden. HLA-A*02:01 konnte wieder durch 0 MC nicht identifiziert werden. Der PSM-Mittelwert sinkt durch die Anzahl der Fragmente bei *none* ab. Die Anzahl der Nicht-HLA-Peptide zeigt einen extremen Anstieg von 0 MC zu 1 MC. Dies zeigt, dass durch das strikte tryptische Schnittmuster weniger Peptide insgesamt gesehen werden, aber dadurch auch weniger Verunreinigungen. Dass 0 MC dennoch kein optimaler Prozessierungs-Parameter ist, kann in Tabelle 3.28 gezeigt werden. Bei JY1 konnte 0 MC weder HLA-A*02:01 noch HLA-B*07:02 identifizieren. Im Vergleich zu *none* haben wir zehn Peptide für HLA-A*02:01, sechs für HLA-B*07:02 und neun für HLA-C*07:02. Bei JY2 konnte etwa die gleiche Situation beobachtet werden mit weniger *unique* Peptiden für die einzelnen Allotypen, denn mit 1 MC konnte HLA-A*02:01 nicht identifiziert werden.

Tabelle 3.28: Chymotryptischer Verdau mit unterschiedlichen MC-Parametern von JY1 und JY2

Parameter	JY1				JY2			
	<i>none</i>	0 MC	1 MC	2 MC	<i>none</i>	0 MC	1 MC	2 MC
HLA-Peptide ¹	217	21	55	90	218	20	58	88
PSMs ¹	1391	174	547	827	932	226	438	594
Anzahl <i>unique</i> -Peptide ²	50	6	15	25	45	5	15	26
Anzahl <i>hint</i> -Peptide ²	101	12	15	25	100	10	33	26
Proteinabdeckung								
A*02:01	75,34	26,03	45,48	57,53	74,79	26,03	47,67	50,41
B*07:02	72,65	27,90	51,93	68,51	73,20	27,90	54,14	69,89
C*07:02	64,75	19,40	36,07	53,01	66,67	21,04	41,80	50,00
Anzahl Nicht-HLA-Peptide ³	1090	247	520	729	1219	220	544	745
Anzahl Nicht-HLA-PSMs ³	1232	436	660	910	1625	248	685	952

1= Peptide/PSMs die aus einem HLA-Molekül stammen (Nicht klassische HLA-Moleküle, HLA Klasse II-Moleküle, β_2 -Mikroglobulin); 2= Anzahl bezieht sich nur auf HLA-A-, -B- und -C-Allotypen; 3= Anzahl aller Peptide/PSMs nach Filter, abzüglich der Peptide die aus einem HLA-Molekül stammen

Durch *none* konnte für alle Allotypen in beiden Proben eine Typisierung stattfinden. Dadurch dass mit 0 MC nur 1 *unique* HLA-A*02:01-Fragment (siehe 3.3.1.1) möglich wäre, ist die Wahrscheinlichkeit dieses auch zu treffen sehr gering. Die experimentell erreichte Proteinabdeckung liegt wie erwartet unter der theoretischen (Abbildung 3.16, Abbildung 3.18 und Abbildung 3.20). Mit *none* konnte die höchste Proteinabdeckung erreicht werden. Ein großes Problem der enzymespezifischen Suche ist das Aufkommen von falschen *unique* Peptiden. Das Programm interpretiert somit Peptide, die eigentlich häufig vorkommen anhand ihres Schnittmusters als *unique*. Ein Beispiel hierfür ist das Peptid FVRFSDAASPREEPRAPW aus dem Lauf JY2, welches bei 2 MC als *unique* für HLA-B*27 angegeben wird, aber bei *none* für 14 weitere Allotypen richtig zugeordnet wird. Ein weiteres Beispiel ist das für HLA-C*07:02 als *unique* bezeichnete Peptid EAARAAEQL, welches auch in HLA-C*16 vorkommt. Diese Situation tritt auch bei tryptischen Schnittmustern auf, wie im Falle des Peptids RAYLEGECVEWLR, welches mit einem tryptischen Schnittmuster als *unique* auf HLA-B*07:02 gewertet wird, dabei aber eigentlich in neun anderen Allotypen genauso vorkommt. Der Anteil der HLA-assoziierten Peptide liegt bei beiden Läufen zwischen 40% und 50% und damit um 20% höher im Vergleich zu den tryptischen Verdaus.

Tabelle 3.29: Durch MS/MS identifizierte *unique* Peptide nach chymotryptischem Verdau

HLA-A*02:01 (nachgewiesen)	HLA-B*07:02 (nachgewiesen)	HLA-C*07:02 (nachgewiesen)
DGETRQVKAH JY1: none JY2: none	RGHDQY JY1: / JY2: none, 2 MC, 1 MC	EAAARAAEQLRAY JY1: none, 2 MC, 1 MC JY2: none, 2 MC, 1 MC
SQTHRVDLGLT JY1: none JY2: none	RGHDQYAY JY1: none, 2 MC, 1 MC JY2: 2 MC, 1 MC	TAADTAAQITQRKL JY1: none, 1 MC, 0 MC JY2: none, 2 MC, 1 MC 0 MC
SQTHRVDLGLTLRGYY JY1: none JY2: /	GCDVGPDRLLRQHDQY JY1: none, 2 MC JY2: none 2 MC	TcHMQHEGLQEPL JY1: none, 2 MC, 1 MC JY2: 2 MC
IEQEGPEYWDGETRK JY1: none JY2: none	GCDVGPDRLLRQHDQYAY JY1: none JY2: none	QRMSGcDLGPDGRLL JY1: none, 2 MC JY2: 2 MC
IEQEGPEYWDGETRQV JY1: none, JY2: /	LLRGHDQYAYDGKDYIALNEDLR JY1: none JY2: /	TCHMQHEGLQEPLTL JY1: JY2: none, 2 MC
IEQEGPEYWDGETRQVK JY1: none JY2: none	RGHDQYAYDGKDYIALNEDLRSW JY1: none JY2: /	SGCDLGPDRLL JY1: none JY2: none
IEQEGPEYWDGETRQVKAH JY1: none JY2: none	GCDVGPDRLLRQHDQYAYDGKDYIALNEDLRSW JY1: none JY2: /	TAADTAAQITQRKLEAARAAEQL JY1: none, 2 MC; 1 MC JY2:/
IEQEGPEYWDGETRQVKAHSQ JY1: none JY2: none		LENGKETLQRAEPPKTHVTHHPLSDHEATL JY1: none JY2: /
IEQEGPEYWDGETRQVKAHSQTH JY1: none JY2: /		LENGKETLQRAEPPKTHVTHHPLSDHEATLRCW JY1: none JY2: /

Anmerkung: Auf Modifikationen wurde keine Rücksicht genommen.

Um zu veranschaulichen, welche weiteren Proteine nach einer HLA-Isolation mittels Antikörper aus einem Zelllysat in dem Retentat vorhanden sind, folgen zwei Bildschirmfotos (*screenshots*) aus der Analyse mit dem *Proteome Discoverer*. Das Auftauchen von weiteren HLA-Allotypen außer HLA-A*02:01, -B*07:02 und -C*07:02 liegt an der Interpretation des *Proteome Discoverer* anhand der identifizierten Peptide (siehe Abbildung 3.28). Dadurch, dass viele Peptide für weitere HLA-Allotypen sprechen, z.B. Peptide von HLA-C*07:02 passen auch zu HLA-C*12, zeigt das Programm auch diese Peptide an um kein Protein auszuschließen. Würde man alle Peptide die zu den vorhandenen HLA-Allotypen abziehen (insbesondere von HLA-C*07:02), würden keine Peptide mehr für HLA-C*12 und -C*18 übrig bleiben.

Accession	Description	Score	Coverage	# Peptides	# PSMs	Area	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
P61769	Beta-2-microglobulin OS=Homo sapiens GN=B2M PE=1 S...	6022.06	80.67 %	23	394	1.925e10	119	13.7	6.52
P01889	HLA class I histocompatibility antigen, B-7 alpha chain OS...	5117.27	71.27 %	43	249	3.797e9	362	40.4	5.85
P01892	HLA class I histocompatibility antigen, A-2 alpha chain OS...	5070.13	75.07 %	41	208	3.098e9	365	40.9	6.99
P22626	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Ho...	3847.15	81.87 %	47	145	4.569e8	353	37.4	8.95
P10321	HLA class I histocompatibility antigen, Cw-7 alpha chain O...	3210.24	60.93 %	29	109	2.750e9	366	40.6	6.04
P30508	HLA class I histocompatibility antigen, Cw-12 alpha chain...	2971.88	51.91 %	24	95	2.469e9	366	40.9	6.30
Q29865	HLA class I histocompatibility antigen, Cw-18 alpha chain...	2801.64	34.70 %	20	89	2.750e9	366	40.9	6.62
Q92945	Far upstream element-binding protein 2 OS=Homo sapien...	2670.61	60.48 %	46	120	3.023e8	711	73.1	7.30
P38646	Stress-70 protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=H...	2115.17	59.06 %	43	82	2.747e8	679	73.6	6.16
P09651	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 OS=Homo s...	1998.80	59.95 %	31	95	1.052e9	372	38.7	9.13
P20700	Lamin-B1 OS=Homo sapiens GN=LMBN1 PE=1 SV=2-[L...	1922.60	59.04 %	45	80	1.681e8	586	66.4	5.16
P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapie...	1608.77	53.40 %	36	63	3.052e8	573	61.0	5.87
P07910	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 OS=Ho...	1532.34	59.15 %	26	58	3.098e8	306	33.6	5.08
P02545	Prelamin-A/C OS=Homo sapiens GN=LMINA PE=1 SV=1-...	1528.54	47.14 %	41	63	1.432e8	664	74.1	7.02
Q14979	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like OS=Hom...	1447.34	39.76 %	27	63	1.583e8	420	46.4	9.57
P39019	40S ribosomal protein S19 OS=Homo sapiens GN=RPS19...	1443.83	84.14 %	25	84	3.935e8	145	16.1	10.32
P13747	HLA class I histocompatibility antigen, alpha chain E OS=...	1437.33	30.45 %	8	32	1.783e9	358	40.1	5.95
P35637	RNA-binding protein FUS OS=Homo sapiens GN=FUS PE=...	1256.37	24.14 %	22	57	3.123e8	526	53.4	9.36
Q99729	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B OS=Homo s...	1181.71	44.58 %	29	81	2.237e8	332	36.2	8.21
Q96AE4	Far upstream element-binding protein 1 OS=Homo sapien...	1176.31	47.36 %	32	58	1.034e8	644	67.5	7.61
P67809	Nuclease-sensitive element-binding protein 1 OS=Homo s...	1161.68	70.37 %	25	49	2.350e8	324	35.9	9.88
P61978	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Homo sa...	1073.56	53.78 %	26	46	1.314e8	463	50.9	5.54
P38159	RNA-binding motif protein, X chromosome OS=Homo sapi...	968.98	58.82 %	32	56	2.178e8	391	42.3	10.05
Q14103	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 OS=Homo s...	960.65	38.87 %	21	47	1.688e8	355	38.4	7.81
P80723	Brain acid soluble protein 1 OS=Homo sapiens GN=BASP1...	958.41	92.51 %	19	39	2.093e8	227	22.7	4.63
P06748	Nucleophosmin OS=Homo sapiens GN=NPM1 PE=1 SV=2...	933.21	73.81 %	25	68	2.178e8	294	32.6	4.78
P25705	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapi...	880.80	27.85 %	16	26	9.840e7	553	59.7	9.13
Q13435	Splicing factor 3B subunit 2 OS=Homo sapiens GN=SF3B2...	860.82	34.53 %	32	46	6.328e7	895	100.2	5.67
O75947	ATP synthase subunit d, mitochondrial OS=Homo sapiens...	836.57	84.47 %	20	46	1.578e8	161	18.5	5.30
P51991	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 OS=Homo s...	825.01	44.44 %	22	41	1.269e8	378	39.6	9.01
P18859	ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial OS=Homo...	799.00	68.52 %	13	39	3.653e8	108	12.6	9.52
P46782	40S ribosomal protein S5 OS=Homo sapiens GN=RPS5 PE...	756.64	44.61 %	11	28	5.668e7	204	22.9	9.72
P29966	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate OS=Homo s...	752.26	55.12 %	13	22	8.226e7	332	31.5	4.45
Q86V81	THO complex subunit 4 OS=Homo sapiens GN=ALYREF P...	746.61	46.69 %	13	32	2.783e8	257	26.9	11.15
P62269	40S ribosomal protein S18 OS=Homo sapiens GN=RPS18...	737.51	69.74 %	19	41	8.799e7	152	17.7	10.99
P60709	Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 S...	631.46	37.33 %	14	27	3.593e8	375	41.7	5.48
Q9Y2W1	Thyroid hormone receptor-associated protein 3 OS=Homo...	625.42	32.36 %	31	42	4.890e7	955	108.6	10.15
P62851	40S ribosomal protein S25 OS=Homo sapiens GN=RPS25...	576.35	68.80 %	18	35	2.926e8	125	13.7	10.11
Q13151	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0 OS=Homo s...	569.89	28.85 %	10	20	9.248e7	305	30.8	9.29
P68032	Actin, alpha cardiac muscle 1 OS=Homo sapiens GN=ACT...	568.00	31.03 %	13	25	3.100e8	377	42.0	5.39
Q96125	Splicing factor 45 OS=Homo sapiens GN=RBM17 PE=1 S...	533.09	32.17 %	18	26	6.225e7	401	44.9	5.97
P49006	MARCKS-related protein OS=Homo sapiens GN=MARCKSL...	530.02	86.67 %	10	22	1.511e8	195	19.5	4.67
P42167	Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/gamma O...	523.97	39.87 %	16	22	4.854e7	454	50.6	9.38

Abbildung 3.28: Screenshot der Proteinliste aus dem *Proteome Discoverer* von JY1 Trypsin (2 MC)

Die Proteine wurden nach dem höchsten *score* sortiert. Dieser Wert wird aus der Summe aller Peptide gebildet, die jeweils einen *score* besitzen. Dieser bildet sich aus einem Programm-spezifischen Bewertungssystem, indem Informationen wie Ladung des Peptides und Parameter wie der *peptide relevance factor* verrechnet werden. Die *Accession* gibt die ID des Proteins bei www.uniprot.org an und ist unter *Description* ausgeschrieben. *Coverage* gibt die Proteinabdeckung über die identifizierten Peptide an, welche unter der Kategorie *#Peptides* zu sehen ist. Unter *#PSMs* kann man die Summe aller proteinzugehörigen Peptide einsehen und unter *#AAs* die Länge des Proteins, wie es bei www.uniprot.org angegeben ist. Der *Area*-Wert wird aus der Summe der höchsten drei Peptide des Proteins gebildet. Dies dient dazu einen Eindruck der relativen Häufigkeit von Peptiden und Proteinen zu bekommen. *MW* steht für die Molmasse (*molecular weight*) des Proteins. Zuletzt ist der Wert des *Calc. pI* angegeben der den theoretischen isoelektrischen Punkt des Proteins anzeigt.

Als höchstes „Verunreinigungsprotein“ steht verständlicherweise das β_2 -Mikroglobulin, das ein Teil des HLA Klasse I-Proteinkomplexes ist, an der Spitze der Tabelle. Andere Proteine sind normale Zellbestandteile wie Laminin, Ribonucleoproteine und ATP-Synthetasen. Sie werden entweder vom Antikörper unspezifisch gebunden oder bleiben in der Sepharose durch Wechselwirkungen kleben. Mit dem blauen Pfeil ist HLA-E als nicht klassisches HLA-Molekül markiert.

Accession	Description	Score	Coverage	# Peptides	# PSMs	Area	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
P61769	Beta-2-microglobulin OS=Homo sapiens GN=B2M PE=1 S...	3644.51	72.27 %	18	302	2.892e10	119	13.7	6.52
P01889	HLA class I histocompatibility antigen, B-7 alpha chain OS...	3441.10	68.51 %	31	204	1.581e10	362	40.4	5.85
Q04826	HLA class I histocompatibility antigen, B-40 alpha chain O...	2911.84	43.09 %	20	143	1.581e10	362	40.5	6.54
P01892	HLA class I histocompatibility antigen, A-2 alpha chain OS...	2377.74	57.53 %	28	143	1.113e10	365	40.9	6.99
P10321	HLA class I histocompatibility antigen, Cw-7 alpha chain O...	1656.85	53.01 %	25	86	5.265e9	366	40.6	6.04
P22626	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Ho...	1009.99	58.92 %	19	55	1.481e9	353	37.4	8.95
P35637	RNA-binding protein FUS OS=Homo sapiens GN=FUS PE=...	994.11	41.63 %	19	30	3.065e8	526	53.4	9.36
P13747	HLA class I histocompatibility antigen, alpha chain E OS=...	845.24	25.70 %	8	29	4.629e9	358	40.1	5.95
P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapien...	465.95	38.74 %	11	22	2.741e8	573	61.0	5.87
O75947	ATP synthase subunit d, mitochondrial OS=Homo sapiens...	410.82	64.60 %	8	20	2.334e8	161	18.5	5.30
Q92804	TATA-binding protein-associated factor 2N OS=Homo sapi...	408.07	27.53 %	12	19	1.215e8	592	61.8	8.02
Q00839	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U OS=Homo sa...	369.98	16.12 %	11	19	2.264e8	825	90.5	6.00
P67809	Nuclease-sensitive element-binding protein 1 OS=Homo s...	331.01	41.67 %	9	22	2.989e8	324	35.9	9.88
P30511	HLA class I histocompatibility antigen, alpha chain F OS=...	321.42	16.76 %	6	13	4.261e8	346	39.0	5.57
Q96PK6	RNA-binding protein 14 OS=Homo sapiens GN=RBM14 PE=...	313.43	20.48 %	12	14	7.368e7	669	69.4	9.67
P51991	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 OS=Homo s...	310.11	29.89 %	11	24	5.197e8	378	39.6	9.01
Q92945	Far upstream element-binding protein 2 OS=Homo sapien...	296.00	35.30 %	12	24	2.015e8	711	73.1	7.30
P09651	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 OS=Homo s...	294.59	28.49 %	11	29	1.026e9	372	38.7	9.13
P06748	Nucleophosmin OS=Homo sapiens GN=NPM1 PE=1 SV=2...	287.49	35.71 %	7	15	1.377e8	294	32.6	4.78
P68104	Elongation factor 1-alpha 1 OS=Homo sapiens GN=EEF1A...	279.52	20.78 %	7	15	1.222e8	462	50.1	9.01
Q96AE4	Far upstream element-binding protein 1 OS=Homo sapien...	272.33	20.03 %	11	18	2.047e8	644	67.5	7.61
P38646	Stress-70 protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=H...	262.75	30.04 %	14	24	1.828e8	679	73.6	6.16
O14979	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like OS=Hom...	256.87	31.43 %	10	25	3.774e8	420	46.4	9.57
P18859	ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial OS=Homo...	249.82	55.56 %	4	15	8.086e8	108	12.6	9.52
P31943	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H OS=Homo sa...	247.62	16.48 %	7	9	6.066e7	449	49.2	6.30
Q57A7	HLA class II histocompatibility antigen, DRB1-13 beta cha...	244.00	39.85 %	10	15	2.071e8	266	30.0	6.99
Q96EP5	DAZ-associated protein 1 OS=Homo sapiens GN=DAZAP1...	231.74	26.54 %	6	17	1.788e8	407	43.4	8.56
P20700	Lamin-B1 OS=Homo sapiens GN=LMNB1 PE=1 SV=2-[L...	225.28	21.67 %	9	15	9.518e7	586	66.4	5.16
P01912	HLA class II histocompatibility antigen, DRB1-3 chain OS=...	223.52	39.85 %	10	14	1.457e8	266	30.1	8.05
P11021	78 kDa glucose-regulated protein OS=Homo sapiens GN=...	200.57	16.82 %	7	12	1.557e8	654	72.3	5.16
P02545	Prelamin-A/C OS=Homo sapiens GN=LMNA PE=1 SV=1-...	198.32	6.17 %	4	9	8.996e7	664	74.1	7.02
P39019	40S ribosomal protein S19 OS=Homo sapiens GN=RPS19...	186.90	63.45 %	8	21	2.890e8	145	16.1	10.32
P46782	40S ribosomal protein S5 OS=Homo sapiens GN=RPS5 PE=...	184.34	34.80 %	6	9	1.029e8	204	22.9	9.72
P09234	U1 small nuclear ribonucleoprotein C OS=Homo sapiens G...	183.95	10.06 %	1	5	2.317e8	159	17.4	9.67
P31994	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor II...	179.91	30.65 %	9	11	9.198e7	310	34.0	6.16
P38159	RNA-binding motif protein, X chromosome OS=Homo sapi...	177.21	32.74 %	9	16	2.828e8	391	42.3	10.05
Q9UII2	ATPase inhibitor, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=A...	166.73	20.75 %	1	5	7.148e7	106	12.2	9.35
P61978	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Homo sa...	164.68	19.01 %	7	8	9.712e7	463	50.9	5.54
P35613	Basigin OS=Homo sapiens GN=BSG PE=1 SV=2-[BASI_...	163.74	20.26 %	7	8	8.882e7	385	42.2	5.66
P09382	Galectin-1 OS=Homo sapiens GN=LGALS1 PE=1 SV=2-[L...	161.64	62.96 %	6	13	8.886e7	135	14.7	5.50
Q03252	Lamin-B2 OS=Homo sapiens GN=LMNB2 PE=1 SV=3-[L...	159.98	3.17 %	2	6	8.347e7	600	67.6	5.35
Q9BQE3	Tubulin alpha-1C chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1C P...	151.30	13.14 %	3	5	8.316e7	449	49.9	5.10
O12906	Interleukin enhancer-binding factor 3 OS=Homo sapiens	145.88	6.04 %	4	5	6.310e6	894	95.3	8.76

Abbildung 3.29: Screenshot der Proteinliste aus dem *Proteome Discoverer* von JY1 Chymotrypsin (2 MC)

Die Proteine wurden nach dem höchsten *score* sortiert. Dieser Wert wird aus der Summe aller Peptide gebildet, die jeweils einen *score* besitzen. Dieser bildet sich aus einem Programm-spezifischen Bewertungssystem, indem Informationen wie Ladung des Peptides und Parameter wie der *peptide relevance factor* verrechnet werden. Die *Accession* gibt die ID des Proteins bei www.uniprot.org an und ist unter *Description* ausgeschrieben. *Coverage* gibt die Proteinabdeckung über die identifizierten Peptide an, welche unter der Kategorie *#Peptides* zu sehen ist. Unter *#PSMs* kann man die Summe aller proteinzugehörigen Peptide einsehen und unter *#AAs* die Länge des Proteins, wie es bei www.uniprot.org angegeben ist. Der *Area*-Wert wird aus der Summe der höchsten drei Peptide des Proteins gebildet. Dies dient dazu einen Eindruck der relativen Häufigkeit von Peptiden und Proteinen zu bekommen. *MW* steht für die Molmasse (*molecular weight*) des Proteins. Zuletzt ist der Wert des *Calc. pI* angegeben der den theoretischen isoelektrischen Punkt des Proteins anzeigt.

Die Proteine sind im Grunde bei beiden Enzymen gleich, ändern sich nur teilweise in ihrer Reihenfolge in der sortierten Liste. Zu erwähnen ist, dass bei dem chymotryptischen Verdau HLA Klasse II-Moleküle neben den nicht klassischen HLA-Molekülen in der Tabelle erscheinen (markiert mit blauen Pfeil).

In den Läufen wurden keine Teile der Signalsequenz identifiziert. Da davon ausgegangen wird, dass vor allem auf der Zelle präsentierte HLA-Moleküle durch die Antikörper abgefangen werden, war dies zu erwarten. Dies wirkt sich nur auf die Proteinabdeckung aus.

3.3.3.2 Anwendungsspezifische Datenbank

Eine weitere Möglichkeit die Prozessierung der Daten zu optimieren, besteht darin die Protein-Datenbank auf die Probe abzustimmen. In diesem Fall wurde eine HLA-Allel-Datenbank auf Basis der in Europa vorkommenden Allele erstellt (siehe 2.2.6.4). Dafür wurde die Proteinliste nach der Proteinabdeckung geordnet, da dies erfahrungsgemäß die beste Proteinreihenfolge ergibt. Es wurde, da es eine homozygote Zelllinie ist, immer der bestbewertete HLA-Allotyp in den drei Klassen berücksichtigt.

Accession	Description	Score	Coverage ▾	# Peptides	# PSMs	Area	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
01662	273 bp - [C*07:17:01_pop6]sp 01662 C*07:17:01_pop6]	3223.68	80.22 %	34	117	2.750e9	273	31.4	5.55
P01892	HLA class I histocompatibility antigen, A-2 alpha chain OS...	4782.39	77.81 %	63	238	3.098e9	365	40.9	6.99
00011	365 bp - [A*02:06:01_pop8]sp 00011 A*02:06:01_pop8]	4778.39	77.81 %	64	236	3.235e9	365	40.9	6.99
P01889	HLA class I histocompatibility antigen, B-7 alpha chain OS...	5158.11	75.14 %	65	278	3.797e9	362	40.4	5.85
01050	362 bp - [B*07:15_pop6]sp 01050 B*07:15_pop6]	4987.55	74.59 %	61	268	3.797e9	362	40.4	6.00
P10316	HLA class I histocompatibility antigen, A-69 alpha chain O...	4469.06	74.25 %	58	211	3.271e9	365	41.0	6.90

Accession	Description	Score	Coverage ▾	# Peptides	# PSMs	Area	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
01662	273 bp - [C*07:17:01_pop6]sp 01662 C*07:17:01_pop6]	3936.72	90.48 %	73	217	7.618e9	273	31.4	5.55
P01892	HLA class I histocompatibility antigen, A-2 alpha chain OS...	4477.32	80.22 %	115	375	1.135e10	365	40.9	6.99
00011	365 bp - [A*02:06:01_pop8]sp 00011 A*02:06:01_pop8]	4506.57	78.08 %	116	380	1.135e10	365	40.9	6.99
P01889	HLA class I histocompatibility antigen, B-7 alpha chain OS...	5684.22	75.14 %	116	410	1.581e10	362	40.4	5.85
00435	341 bp - [C*07:03_pop5]sp 00435 C*07:03_pop5]	3857.18	68.62 %	69	209	7.618e9	341	38.0	5.72
P10321	HLA class I histocompatibility antigen, Cw-7 alpha chain O...	3573.43	67.49 %	70	193	6.139e9	366	40.6	6.04

Abbildung 3.30: Proteinübersicht des enzymatischen JY1-Verdau prozessiert mittels anwendungsspezifischer Datenbank

Oben zu sehen sind die Ergebnisse des tryptischen Verdau von JY1 und unten des chymotryptischen, welche mit der HLA-Allel-basierten Datenbank prozessiert worden sind. Die Proteine wurden nach der höchsten Proteinabdeckung (*coverage*) sortiert. In Blau markiert sind die bestbewerteten HLA-Allotypen in den drei HLA Klasse I-Proteinen. Unter *Description* steht die in der Datenbank zugewiesene Allotyp-Bezeichnung. Der *score* bildet sich aus einem Programm-spezifischen Bewertungssystem, indem Informationen wie Ladung des Peptides und Parameter wie der *peptide relevance factor* verrechnet werden. Die Anzahl der dem HLA-Allotyp zugehörigen Peptide ist unter der Kategorie *#Peptides* zu sehen. Unter *#PSMs* kann man die Summe aller proteinzugehörigen Peptide einsehen und unter *#AAs* die Länge des Proteins wie es bei www.uniprot.org angegeben ist. Der *Area*-Wert wird aus der Summe der höchsten drei Peptide des Proteins gebildet. Dies dient dazu einen Eindruck der relativen Häufigkeit von Peptiden und Proteinen zu bekommen. *MW* steht für die Molmasse (*molecular weight*) des Proteins. Zuletzt ist der Wert des *Calc. pI* angegeben, der den theoretischen isoelektrischen Punkt des Proteins anzeigt.

Accession	Description	Score	Coverage	# Peptides	# PSMs	Area	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
01662	273 bp - [C*07:17:01_pop6]sp 01662 C*07:17:01_pop6]	4712.92	80.95 %	44	183	5.291e9	273	31.4	5.55
01408	181 bp - [C*07:15_pop6]sp 01408 C*07:15_pop6]	4429.38	80.66 %	35	163	5.291e9	181	20.8	5.74
P01892	HLA class I histocompatibility antigen, A-2 alpha chain OS...	6995.22	77.81 %	69	368	5.933e9	365	40.9	6.99
00011	365 bp - [A*02:06:01_pop8]sp 00011 A*02:06:01_pop8]	6983.37	77.81 %	71	370	5.933e9	365	40.9	6.99
P01889	HLA class I histocompatibility antigen, B-7 alpha chain OS...	7547.67	77.81 %	85	420	6.783e9	362	40.4	5.85
01050	362 bp - [B*07:15_pop6]sp 01050 B*07:15_pop6]	7310.09	75.69 %	80	401	6.783e9	362	40.4	6.00

Accession	Description	Score	Coverage	# Peptides	# PSMs	Area	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
01662	273 bp - [C*07:17:01_pop6]sp 01662 C*07:17:01_pop6]	4001.19	84.87 %	84	215	1.788e10	273	31.4	5.55
P01892	HLA class I histocompatibility antigen, A-2 alpha chain OS...	4338.86	78.08 %	133	387	1.883e10	365	40.9	6.99
00011	365 bp - [A*02:06:01_pop8]sp 00011 A*02:06:01_pop8]	4368.65	78.08 %	132	391	1.883e10	365	40.9	6.99
P01889	HLA class I histocompatibility antigen, B-7 alpha chain OS...	5219.33	77.80 %	119	390	2.418e10	362	40.4	5.85
00435	341 bp - [C*07:03_pop5]sp 00435 C*07:03_pop5]	3951.13	72.73 %	76	204	1.788e10	341	38.0	5.72

Abbildung 3.31: Proteinübersicht des enzymatischen JY2-Verdaus prozessiert mittels anwendungsspezifischer Datenbank

Oben zu sehen sind die Ergebnisse des tryptischen Verdaus von JY1 und unten des chymotryptischen, welche mit der HLA-Allel-basierten Datenbank prozessiert worden sind. Die Proteine wurden nach der höchsten Proteinabdeckung (*coverage*) sortiert. In Blau markiert sind die bestbewerteten HLA-Allotypen in den drei HLA Klasse I-Proteinen. Unter *Description* steht die in der Datenbank zugewiesene Allotyp-Bezeichnung. Der *score* bildet sich aus einem Programm-spezifischen Bewertungssystem, indem Informationen wie Ladung des Peptides und Parameter wie der *peptide relevance factor* verrechnet werden. Die Anzahl der dem HLA-Allotyp zugehörigen Peptide ist unter der Kategorie *#Peptides* zu sehen. Unter *#PSMs* kann man die Summe aller proteinzugehörigen Peptide einsehen und unter *#AAs* die Länge des Proteins wie es bei www.uniprot.org angegeben ist. Der *Area*-Wert wird aus der Summe der höchsten drei Peptide des Proteins gebildet. Dies dient dazu einen Eindruck der relativen Häufigkeit von Peptiden und Proteinen zu bekommen. *MW* steht für die Molmasse (*molecular weight*) des Proteins. Zuletzt ist der Wert des *Calc. pI* angegeben, der den theoretischen isoelektrischen Punkt des Proteins anzeigt.

Die Reihenfolge der getroffenen Allotypen ist in allen vier Auswertungen gleich. Der HLA-C-Allotyp konnte nicht korrekt getroffen werden. Dies liegt vor allem an der anwendungsspezifischen Datenbank in der zu viele seltenen Subtypen (z.B. HLA-C*07:17 und HLA-C*07:15) enthalten sind und somit eine korrekte Subtyp-Zuordnung über die Proteinabdeckung nicht möglich ist.

3.3.3.3 HLA-Annotation mittels Peptidmotiv - Ligandomat-Analyse

Durch die Methodik der HLA-Isolation und Elution der natürlich präsentierten HLA-Liganden kann man davon ausgehen, dass die Peptidmotive der identifizierten Liganden zu den HLA-Molekülen der Zelle zugeordnet werden können. Diese Analyse kann durch das von Linus Backert und Christian Hotz entwickelte Programm Ligandomat durchgeführt werden. Es verbindet die Informationen zweier Epitop-Vorhersageprogramme (siehe 2.2.6.5). Eine große Limitation dieses Programmes ist das Fehlen von HLA-C-Daten. Dieses Problem wird durch Erforschung der HLA-C Liganden-Motive derzeit gelöst.

Die von Armin Rabsteyn, Daniel Kowalewski und Nico Trautwein bearbeiteten Proben wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

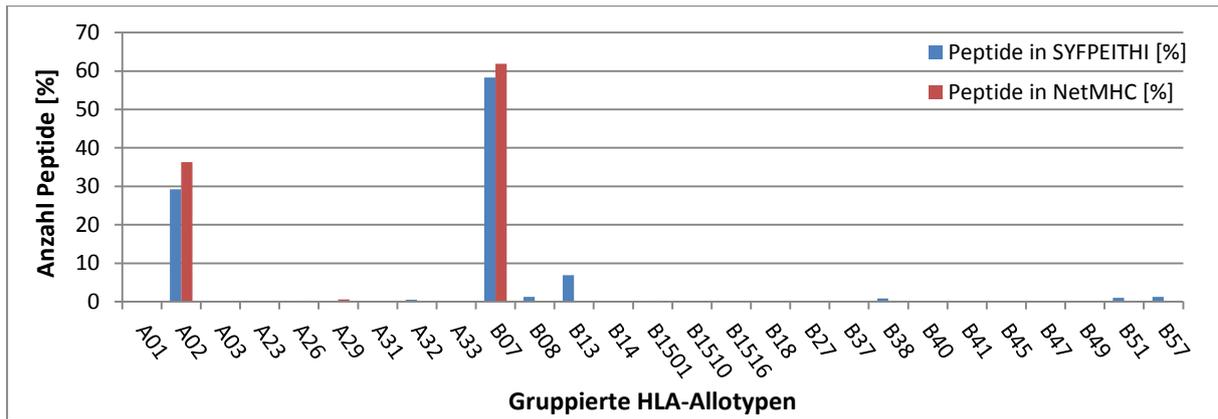


Abbildung 3.32: Verteilung der HLA-Restriktion der Peptidsequenzen aus JY1

Abgebildet sind die von den Vorhersageprogrammen berechneten HLA-Restriktionen der HLA Klasse I-Liganden. Es wurden nur Peptidsequenzen in die Auswertung mit einbezogen, die in SYFPEITHI die höchste Matrizen-Punktzahl und NetMHC die höchste Affinität haben. Die HLA-Allotypen sind anhand der Präsentation von ähnlichen Peptidmotiven gruppiert worden um ein eindeutigeres Ergebnis zu erhalten. A02 umfasst die HLA-Allotypen A*02:01, A*02:02, A*02:03, A*02:04, A*02:06, A*02:11, A*02:12, A*02:16, A*02:19, A*68:02, A*69:01 und B07 die HLA-Allotypen B*07:02, B*35:01, B*53:01, B*54:01, B*55:01, B*56:01.

Ohne die automatische Gruppierung würde, wie in Abbildung 3.33 gezeigt, eine klare Zuordnung zu HLA-A*02:01 erfolgen. SYFPEITHI, in Blau, ordnet die Peptide dem richtigen Subtyp zu.

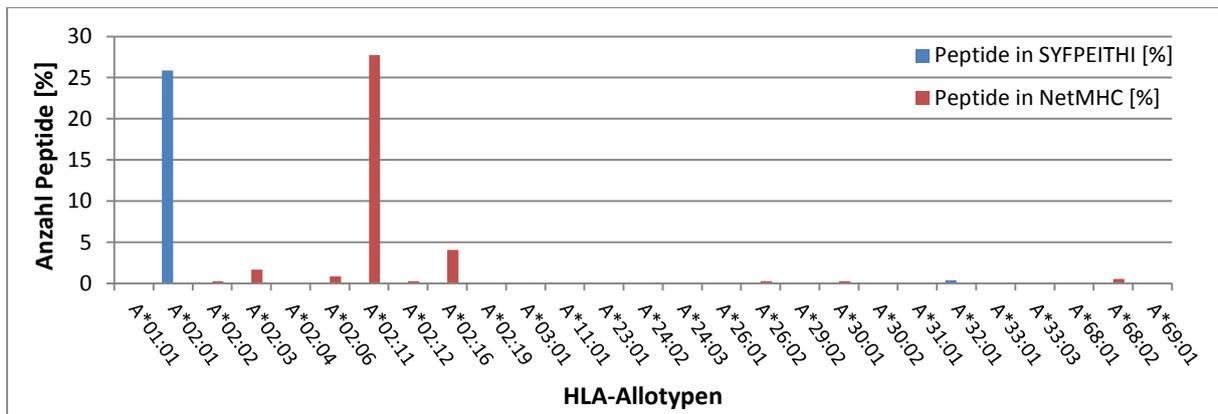


Abbildung 3.33: Verteilung der HLA-A-Restriktion der Peptidsequenzen aus JY1

Abgebildet sind die von den Vorhersageprogrammen berechneten HLA-Restriktionen der HLA Klasse I-Liganden die auf ein HLA-A-Molekül passen. Es wurden nur Peptidsequenzen in die Auswertung mit einbezogen, die in SYFPEITHI die höchste Punktzahl und NetMHC die höchste Affinität haben. Die HLA-Allotypen sind nicht anhand der Präsentation von ähnlichen Peptidmotiven gruppiert worden.

Für HLA-B ist erkennbar, dass SYFPEITHI eine hohe Punktzahl für HLA-B*35 gibt. Dies kann als Falsch-Zuordnung erklärt werden, da die Typisierung von JY bekannt ist. Da in der gruppierten Version in Abbildung 3.32 HLA-B*35 der B07-Gruppe zugeordnet worden ist, fällt die andere Verteilung durch SYFPEITHI nicht weiter auf.

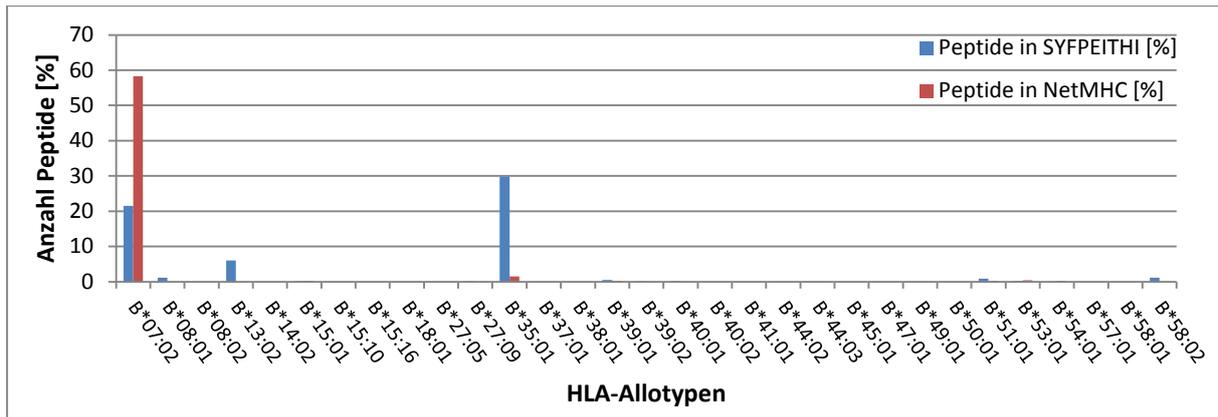


Abbildung 3.34: Verteilung der HLA-B-Restriktion der Peptidsequenzen aus JY1

Abgebildet sind die von den Vorhersageprogrammen berechneten HLA-Restriktionen der HLA Klasse I-Liganden die auf ein HLA-B-Molekül passen. Es wurden nur Peptidsequenzen in die Auswertung mit einbezogen, die in SYFPEITHI die höchste Punktzahl und NetMHC die höchste Affinität haben. Die Allotypen sind nicht anhand der Präsentation von ähnlichen Peptidmotiven gruppiert worden.

3.3.3.4 HLA-präsentierte HLA-Peptide

Bei der Analyse der HLA-Liganden des ersten JY-Pellets, die mit dem HLA Klasse I-Antikörper isoliert wurden (siehe Tabelle 2.7), konnten 13 HLA-assoziierte Peptide identifiziert werden, wobei nur zwei Liganden für die Auswertung in Bezug auf die Typisierung von HLA Klasse I essentiell waren. Beide sprechen für HLA-C*07 sowie -C*18. Dafür wurden acht *unique* Peptide, die zu HLA Klasse II und nicht klassischen HLA-Proteinen gehören, gefunden. Ganz anders sieht es in der Analyse für die HLA Klasse II-Liganden aus. Hier konnten 17 *unique* Peptide für HLA-A*02:01, zehn für HLA-B*07:02 und wieder ein Hinweis für HLA-C*07:02 und -C*18 gefunden werden. Weitere *unique* Peptide waren für HLA Klasse II und nicht klassische HLA-Moleküle vorhanden. Bei der Analyse der Klasse I-Liganden von JY2 zeigte sich das gleiche Bild. Hier waren es insgesamt nur fünf HLA-assoziierte Liganden, wobei hier wieder der Ligand für HLA-C*07/C*18 gefunden werden konnte. Im Klasse II-Lauf wurden 14 Peptide aus HLA-A*02:01, sieben aus HLA-B*07:02 und eines aus HLA-C*07:02 gefunden.

Tabelle 3.30: HLA Klasse II-präsentierte *unique* HLA-Peptide in zwei HLA-Isolationen aus JY

HLA-A*02:01	HLA-B*07:02	HLA-C*07:02
KVKAHSQTHRV	GRLLRGHDQYAYDGK	TQRKLEAARAAEQLR
KVKAHSQTHRVD	GRLLRGHDQYAYDGKD	
RKVKAHSQTHRV	GPDGRLLRGHDQYAYDG	
RKVKAHSQTHRVD	VGPDGRLLRGHDQYAYDG	
KVKAHSQTHRVDLG	GPDGRLLRGHDQYAYDGK	
ETRKVAHSQTHR	VGPDGRLLRGHDQYAYDGK	
GETRKVAHSQTHR	GPDGRLLRGHDQYAYDGKD	
TRKVKAHSQTHRVD	VGPDGRLLRGHDQYAYDGKD	
DGETRKVAHSQTHR	GPDGRLLRGHDQYAYDGKDY	
ETRKVAHSQTHRVD	VGPDGRLLRGHDQYAYDGKDY	
TRKVKAHSQTHRVDLG		
GETRKVAHSQTHRVD		
DGETRKVAHSQTHR		
ETRKVAHSQTHRVDLG		
DGETRKVAHSQTHRVD		
GETRKVAHSQTHRVDLG		
DGETRKVAHSQTHRVDLG		

3.3.3.5 Typisierung der Zelllinie JY

Kombiniert man nun alle Informationen, bekommt man am Ende eine zuverlässige sich gegenseitig bestätigende Typisierung der Zelllinie JY.

Tabelle 3.31: Alternative Typisierung der JY-Proben

Probe	Ligandomat		enzymatischer Verdau		HLA Datenbank		HLA Liganden	Genom. ¹ HLA-Typ.
	NetMHC	SYFPEITHI	Trypsin	Chymo-trypsin	Trypsin	Chymo-trypsin		
JY1	A*02:11	A*02:01	A*02	A*02	A*02:01	A*02:01	A*02, B*07, C*07/C*18	A*02:01, B*07:02, C*07:02
	B*07:02	B*07:02/B*35:01	B*07	B*07	B*07:02	B*07:02		
	-	-	C*07	C*07	C*07:17	C*07:17		
JY2	A*02:11	A*02:01	A*02	A*02	A*02:01	A*02:01	A*02 B*07 C*07	A*02:01, B*07:02, C*07:02
	B*07:02	B*07:02/B*35:01	B*07	B*07	B*07:02	B*07:02		
	-	-	C*07	C*07	C*07:17	C*07:17		

Anmerkung= in Rot hervorgehobene Allotypen entsprechen nicht der HLA-Typisierung; 1: genomische Typisierung der Zelllinie JY.

Die HLA-Typisierung über den Ligandomat war in den verfügbaren A- und B- Allotypen erfolgreich. Der Vorteil von SYFPEITHI gegenüber NetMHC besteht darin, dass der Subtyp mit HLA-A*02:01 richtig angegeben wird. Der Nachteil ist die offensichtlich falsche Zuordnung von HLA-B*07:02-Liganden zu HLA-B*35:01. Dieses Wissen kann aber zukünftig in Datensätzen verwendet werden, die HLA-A*02:01 exprimieren. Die Typisierung über den Verdau war erfolgreich. Je nach Filtereinstellungen bei der Prozessierung wurden alle Allele identifiziert. Die Analyse durch die anwendungsspezifische Datenbank erbrachte, außer in der Subtypzuordnung von HLA-C*07, genaue Typisierungen. Über HLA-Peptide die auf HLA-

Molekülen als Liganden präsentiert werden, konnte erfolgreich in JY2 eine komplette und in JY1 eine bis auf die genaue C-Allel-Zuordnung komplette Typisierung erfolgen. Hierbei war die Präsentation über HLA Klasse II dominant. Die homozygote und darum einfache Situation in JY konnte verwendet werden um die Strategie der alternativen Typisierung zu testen. In diesem Falle konnte eine erfolgreiche Typisierung in allen Loci erfolgen.

3.3.4 Komplexe Gewebeproben

Um zu zeigen, dass die Strategie der alternativen HLA-Typisierung auch auf komplexe Proben übertragbar ist, wurden Retentate von drei Kolorektal-Tumoren mit dem dazugehörigen benignen Gewebe nach der HLA-Isolation verdaut und analysiert. Die Schwierigkeit hierbei ist die Heterogenität der Probe in dem HLA-Genlocus sowie die Komplexität der Probe durch andere Proteine. Somit verdoppeln sich die Allele die identifiziert werden müssen bei gleichzeitiger erhöhter Verunreinigung, die zu weniger identifizierten HLA-Peptiden führen kann. Zudem ist die eventuelle Homozygotie in einem HLA-Lokus eine weitere Herausforderung in der Interpretation der Daten. Die Proben wurden mittels molekulargenetischer Methoden typisiert um die Strategie dieser Arbeit zu testen. Die Proben und Daten wurden freundlicherweise von Daniel Kowalewski und Florian Dengler zur Verfügung gestellt.

Laut Expressionsdatenbanken sollten HLA-Moleküle auf Darmgewebe exprimiert sein und somit eine HLA-Isolation sowie ein Verdau dieser Moleküle möglich sein (<http://www.gtexportal.org/home/gene/HLA-A>). Die im Größenausschlussfilter zurückbleibenden HLA-Moleküle (Retentat) wurden in Volumen und Proteinkonzentration bestimmt. Dies soll einen identischen Konzentrationseinsatz für den Verdau garantieren. Anschließend wurde die in Kapitel 3.3.3 vorgestellte Strategie auf die Proben angewendet. Durch die geringe Menge der Tumorprobe KC58 wurden hier nur 2,5 µg Ausgangsmenge für den Verdau eingesetzt. Das zeigt auch, dass die Gewebemenge nicht mit der Proteinausbeute korrelieren muss.

Tabelle 3.32: Volumen und Proteinkonzentration der Kolonkarzinom-Retentate

Probe (T/N) ¹	Retentat-Volumen (µl)	Proteinkonzentration (mg/ml)	Gewicht (g)
KC58 (T)	10,10	0,79	1,79
KC58 (N) ²	17,02	3,45	1,78
KC92 (T) ²	8,06	11,33	0,97
KC92 (N)	16,18	8,66	0,51
KC93 (T)	15,08	7,54	1,19
KC93 (N)	13,98	10,02	0,86

1= T steht für Tumor und N steht für das benigne Vergleichsgewebe; 2= Proben waren stark gelartig.

3.3.4.1 Identifikation von HLA-Allotypen über enzymatische Peptide

Die Retentate der Proben wurden mit den Enzymen Trypsin und Chymotrypsin verdaut und anschließend massenspektrometrisch analysiert. Da für den Verdau-Einsatz von 10 µg nicht genug Probenmaterial zur Verfügung stand, wurden 5 µg eingesetzt. Die in Tabelle 3.33 gezeigten Fragmente konnten mittels der Daten-Prozessierung mit einer FDR von 1% gefunden werden. Wenn ein Allotyp durch ein *unique* Fragment getroffen wurde, fallen die *hint* und *shared* die in diesem Allotyp vorkommen aus der Analyse heraus, selbst wenn dieses *hint* Fragment auch für andere mögliche Allotypen sprechen könnte. Die Anzahl der Nicht-HLA-Peptide beschreibt alle Peptide, die nach dem Filter mit den HLA-assoziierten Peptiden subtrahiert wurden.

Tabelle 3.33: Auswertung der enzymatischen Verdau von KC58-Retentat

Parameter	Tumor KC58			
	Trypsin		Chymotrypsin	
	<i>none</i>	2 MC	<i>none</i>	2 MC
HLA-Peptide ¹	56	28	61	45
PSMs ¹	99	74	121	127
Anzahl <i>unique</i> Peptide Allotypen	0	0	0	0
Anzahl <i>hint</i> Peptide Allotypen	3	2	2	1
	A*01/A*36 A*02/B*57/B*58 B*07/B*48/B*81	A*02/B*57/B*58 A*01/A*36	A*23/A*24 B*07/B*48/B*81	C*07/C*12
Anzahl <i>shared</i> Peptide Allotypen	6	4	7	7
	B*08/B*37/B*41/B*42			
Proteinabdeckung				
A*	A*02, A*24,	A*02, A*69	A*03, A*23	A*23, A*30
B*	B*42, B*55	B*55, B*58	B*40, B*56	B*40, B*56
C*	C*06, C*12	C*06, C*12	C*07, C*12	C*03, C*12
Anzahl Nicht-HLA-Peptide ²	301	245	548	502
Anzahl Nicht-HLA-PSMs ²	510	410	899	869

Parameter	Benigne KC58			
	Trypsin		Chymotrypsin	
	<i>none</i>	2 MC	<i>none</i>	2 MC
HLA-Peptide ¹	103	83	116	83
PSMs ¹	306	245	277	245
Anzahl <i>unique</i> Peptide Allotypen	7	11	10	6
	A*02, A*23 B*07 C*04, C*07	A*02, A*23 B*07 C*04, C*07	A*02 B*44 C*04, C*07	B*44 C*07, C*04
Anzahl <i>hint</i> Peptide Allotypen	7	10	9	5
			A*23/A*24 B*07/B*48/B*81	A*23/A*24 B*07/B*48/B*81
Anzahl <i>shared</i> Peptide Allotypen	17	17	12	10
	B*13/B*44/B*49/B*52	B*13/B*44/B*49/B*52		
Proteinabdeckung				
A*	A*02, A*23	A*02, A*23	A*02, A*23	A*23, A*33
B*	B*07, B*40	B*07, B*41	B*07, B*44	B*07, B*44
C*	C*04, C*07	C*04, C*07	C*04, C*07	C*04, C*07
Anzahl Nicht-HLA-Peptide ²	1199	1186	1594	1186
Anzahl Nicht-HLA-PSMs ²	2040	2108	2757	2108

Anmerkung= in Rot hervorgehobene Allotypen entsprechen nicht der HLA-Typisierung; 1= Peptide/PSMs die aus einem HLA-Molekül stammen (Nicht klassische HLA-Moleküle, HLA Klasse II-Moleküle, β_2 -Mikroglobulin); 2= Anzahl aller Peptide/PSMs nach Filter, abzüglich der Peptide die aus einem HLA-Molekül stammen.

Die erste Probe zeigt, wie unterschiedlich die Tumorprobe zu dem Normalgewebe sein kann. Während bei der Tumorprobe keinerlei *unique* Fragmente zu beobachten war, konnten bei benignem Gewebe mehrere identifiziert werden. Ein weiteres Problem dieser Probe war, dass HLA-B*44 und -A*01/-A*36 Peptide zugeordnet wurden, was nicht der genomischen Typisierung entsprach (siehe Tabelle 3.37 mit rot markiert). Diese Daten weisen auf eine Kontamination durch eine andere Probe hin, entweder während der HLA-Isolation oder während der Messung. Da die Kontaminante auch in den Liganden (siehe 3.3.4.3) zu sehen ist, kann eine Vertauschung bei dem enzymatischen Verdau ausgeschlossen werden. Bei der Tumorprobe sind zwar *hint* und *shared* Fragmente vorhanden, jedoch sind diese durch

Kombination nicht auf einen Allotyp zu reduzieren. Bei der Normalgewebeprobe ist ein Anstieg im PSM-Wert durch den chymotryptischen Verdau zu beobachten, wobei der Anteil HLA-assoziiertes im Vergleich zu nicht HLA-assoziierten Peptiden (Vergleich der PSM-Werte) im Normalgewebe sinkt (von durchschnittlichen 14,5% im Tumor zu 10,5% im Normalgewebe)

Tabelle 3.34: Auswertung der enzymatischen Verdau von KC92-Retentat

Parameter	Tumor KC92			
	Trypsin		Chymotrypsin	
	none	2 MC	none	2 MC
HLA-Peptide ¹	99	62	184	107
PSMs ¹	256	204	543	415
Anzahl <i>unique</i> Peptide Allotypen	1 A*01	3 A*01 B*08 C*04	21 A*01, A*24 C*04, C*07, C*15 ¹	21 A*01, A*24 C*04, C*07
Anzahl <i>hint</i> Peptide Allotypen	8 A*23/A*24 B*08/B*78	9 A*23/A*24	13 B*08/B*41/B*42	7 B*08/B*41/B*42 B*08/B*78
Anzahl <i>shared</i> Peptide Allotypen	7 B*35/B*51/B*53/B*59	9 B*35/B*51/B*53/B*59	40 B*35/B*51/B*53/B*59	21
Proteinabdeckung				
A*	A*01, A*24	A*01, A*24	A*24, A*01	A*24, A*01
B*	B*08, B*59	B*08, B*59	B*08, B*53	B*08, B*78
C*	C*14, C*12	C*12, C*14	C*07, C12	C*04, C*07
Anzahl Nicht-HLA-Peptide ³	1081	1003	2262	1553
Anzahl Nicht-HLA-PSMs ³	1715	1639	3678	2525

Parameter	Benigne KC92			
	Trypsin		Chymotrypsin	
	none	2 MC	none	2 MC
HLA-Peptide ¹	68	30	134	90
PSMs ¹	180	80	356	309
Anzahl <i>unique</i> Peptide Allotypen	3 A*01 B*08 C*04	4 A*01 B*08 C*04	17 A*01, A*24 C*04, C*07, C*15 ³	15 A*01, A*24 C*04, C*07, C*15 ³
Anzahl <i>hint</i> Peptide Allotypen	10 A*23/A*24	13 A*23/A*24	9 B*08/B*41/B*42	6 B*08/B*78
Anzahl <i>shared</i> Peptide Allotypen	6 B*35/B*51/B*53/B*59	7 B*35/B*51/B*53/B*59	29 B*08/B*37/B*41/B*42	22
Proteinabdeckung				
A*	A*01, A*24	A*23, A*01	A*01, A*24	A*23, A*24
B*	B*08, B*59	B*08, B*59	B*08, B*53	B*08, B*59
C*	C*04, C*18	C*06, C*18	C*04, C*07	C*04, C*15
Anzahl Nicht-HLA-Peptide ²	954	243	1875	1356
Anzahl Nicht-HLA-PSMs ²	1675	404	3441	2534

Anmerkung= in Rot hervorgehobene Allotypen entsprechen nicht der HLA-Typisierung; 1= Peptide/PSMs die aus einem HLA-Molekül stammen (Nicht klassische HLA-Moleküle, HLA Klasse II-Moleküle, β_2 -Mikroglobulin); 2= Anzahl aller Peptide/PSMs nach Filter, abzüglich der Peptide die aus einem HLA-Molekül stammen; 3= VEQEGPEYWDRETQNY *unique* für C*15, aber auch im Subtyp HLA-C*07:01.

Bei Chymotrypsin ist ein *unique* Peptid für HLA-C*15 (Sequenz VEQEGPEYWDRETQNY) zu beobachten. Da HLA-C*15 nicht der Probenotypisierung entsprach, wurde das Peptid mit der eigens erstellten Datenbank abgeglichen und konnte dem Subtyp HLA-C*07:01

zugeordnet werden. Es ist ein Unterschied bei der Anzahl der *unique* Fragmente bei Trypsin und Chymotrypsin erkennbar. Eine Erklärung wäre hierfür, dass Chymotrypsin trotz der gelartigen Beschaffenheit der Probe keine Einschränkungen in seiner Funktion erfährt. Eine andere Erklärung wäre, dass die Proteine in der gelartigen Matrix trotz Ultraschallbehandlung nicht gleichmäßig verteilt wurden und zufällig eine höhere Konzentration für den chymotryptischen Verdau verwendet wurde. Auch bei dieser Probe ist zu beobachten, dass in den Läufen des Tumorgewebes der Anteil der HLA-assoziierten Peptide höher ist als in den Läufen des Normalgewebes (von durchschnittlichen 14,5% zu 10,5%). Einige *unique* Fragmente fallen durch die FDR von 1% bei der Prozessierung ohne Schnittstellen bei Tumorgewebe mit tryptischen Verdau weg. Durch die Prozessierung mit Schnittstellen werden diese Fragmente im Vergleich zu der Köderdatenbank besser bewertet, da durch das spezifische Schnittmuster die Wahrscheinlichkeit einer falsch-positiven Zuordnung sinkt. Nur bei Trypsin konnte HLA-B*08 durch ein *unique* Fragment identifiziert werden. Bei Chymotrypsin wäre dies durch die Kombination der *hint* Fragmente möglich (siehe bei dem chymotryptischen Verdau des Tumors mit einer Prozessierung von 2 MC ein *hint* Peptid für HLA-B*08 und -B*78 und das andere für HLA-B*08, -B*41 und -B*42. Viele *unique* Fragmente sind auch den nicht klassischen HLA-Allelen zuzuordnen.

Tabelle 3.35: Auswertung der enzymatischen Verdaus von KC93-Retentat

Parameter	Tumor KC93			
	Trypsin		Chymotrypsin	
	none	2 MC	none	2 MC
HLA-Peptide ¹	119	60	138	84
PSMs ¹	261	175	356	308
Anzahl <i>unique</i> Peptide Allotypen	7	9	5	5
	A*02, A*03 B*07 C*07	A*02, A*03 B*07 C*07	A*02, A*03 B*07 C*07	A*03 B*07 C*07
Anzahl <i>hint</i> Peptide Allotypen	5	4	14	6
	B*38/B*39/B*67	B*14/B*39	B*38/B*39/B*67 B*14/B*39 B*08/B*14/B*39/B*78	B*38/B*39/B*67 B*14/B*39
Anzahl <i>shared</i> Peptide Allotypen	14	9	20	13
				A*02/A*23/A*24/A*68/A*69
Proteinabdeckung				
A*	A*02, A*03	A*02, A*03	A*02, A*03	A*03, A*32
B*	B*07, B*67	B*07, B*67	B*14, B*67	B*07, B*67
C*	C*07	C*07	C*07, C*14	C*12, C*15
Anzahl Nicht-HLA-Peptide ²	1059	909	1791	1379
Anzahl Nicht-HLA-PSMs ²	1630	1452	2882	2330

Parameter	Benigne KC93			
	Trypsin		Chymotrypsin	
	none	2 MC	none	2 MC
HLA-Peptide ¹	91	70	155	87
PSMs ¹	249	205	440	342
Anzahl <i>unique</i> Peptide Allotypen	6	9	10	8
	A*02, A*03 B*07	A*02, A*03 B*07	A*02, A*03 C*07	A*03 C*07
Anzahl <i>hint</i> Peptide Allotypen	4	5	14	9
	B*38/B*39/B*67	B*14/B*39 B*38/B*39/B*67	B*14/B*39 B*07/B*48/B*81	A*02/A*69 B*07/B*48/B*81 B*14/B*39 B*38/B*39/B*67
Anzahl <i>shared</i> Peptide Allotypen	11	11	20	14
	B*14/B*38/B*39/B*73			
Proteinabdeckung				
A*	A*02, A*03	A*02, A*03	A*02, A*03	A*02, A*03
B*	B*07, B*67	B*07, B*39	B*07, B*39	B*07, B*39
C*	C*06	C*06	C*06, C*12	C*07, C*12
Anzahl Nicht-HLA-Peptide ²	1109	1024	1797	1244
Anzahl Nicht-HLA-PSMs ²	1983	1855	3270	2373

1= Peptide/PSMs die aus einem HLA-Molekül stammen (Nicht klassische HLA-Moleküle, HLA Klasse II-Moleküle, β_2 -Mikroglobulin); 2= Anzahl aller Peptide/PSMs nach Filter, abzüglich der Peptide die aus einem HLA-Molekül stammen.

Wenn man die Fragmente des tryptischen Verdaus der Tumorprobe ohne oder mit zwei Schnittstellen prozessiert, kann man auf HLA-B*39 schließen. Der Vergleich zwischen Chymotrypsin und Trypsin zeigt hier, dass zwar mehr HLA-assoziierte Peptide bei Chymotrypsin gefunden werden, dass aber diese nicht unbedingt für eine Typisierung von

Vorteil sind. Der Anteil der HLA-assoziierten Peptide lag bei den Läufen des Tumor- und Normalgewebes bei ca. 11%.

Um zu veranschaulichen, welche weiteren Proteine nach einer HLA-Isolation mittels Antikörper aus einem Zelllysate in dem Retentat vorhanden sind, folgen zwei Bildschirmfotos (*screenshots*) aus der Analyse mit dem *Proteome Discoverer*, eines tryptischen bzw. chymotryptischen Verdaus.

Accession	Description	Score	Coverage	# Peptides	# PSMs	Area	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
Q9Y6R7	IgGfC-binding protein OS=Homo sapiens GN=FCGBP PE=...	3677.02	19.07 %	56	136	3.006e8	5405	571.6	5.34
P01889	HLA class I histocompatibility antigen, B-7 alpha chain OS=...	1421.14	52.76 %	25	67	1.659e8	362	40.4	5.85
P39019	40S ribosomal protein S19 OS=Homo sapiens GN=RPS19...	1391.73	91.03 %	30	77	2.898e8	145	16.1	10.32
P68871	Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens GN=HBB PE=...	1307.19	87.07 %	14	60	3.102e8	147	16.0	7.28
P23527	Histone H2B type 1-O OS=Homo sapiens GN=HIST1H2B...	1299.88	65.08 %	9	39	4.407e7	126	13.9	10.32
P30475	HLA class I histocompatibility antigen, B-39 alpha chain O...	1283.15	43.65 %	17	51	1.659e8	362	40.3	6.15
Q29963	HLA class I histocompatibility antigen, Cw-6 alpha chain O...	1243.02	36.07 %	14	40	1.563e8	366	40.9	6.00
P04439	HLA class I histocompatibility antigen, A-3 alpha chain OS...	1134.13	52.33 %	16	38	8.568e7	365	40.8	6.00
P01892	HLA class I histocompatibility antigen, A-2 alpha chain OS...	1070.86	38.63 %	14	35	7.467e7	365	40.9	6.99
P61769	Beta-2-microglobulin OS=Homo sapiens GN=B2M PE=1 S...	1004.58	80.67 %	19	90	1.175e9	119	13.7	6.52
P52272	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M OS=Homo sa...	930.62	33.97 %	26	45	1.760e7	730	77.5	8.70
P04792	Heat shock protein beta-1 OS=Homo sapiens GN=HSPB1...	842.59	85.85 %	16	47	1.478e8	205	22.8	6.40
P69905	Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens GN=HBA1 P...	829.04	75.35 %	13	53	3.936e8	142	15.2	8.68
P01591	Immunoglobulin J chain OS=Homo sapiens GN=IGJ PE=1...	775.91	73.58 %	16	42	1.119e8	159	18.1	5.24
P62273	40S ribosomal protein S29 OS=Homo sapiens GN=RPS29...	755.32	98.21 %	12	49	2.497e8	56	6.7	10.13
P01834	Ig kappa chain C region OS=Homo sapiens GN=IGKC PE...	738.23	97.17 %	13	38	7.234e7	106	11.6	5.87
O75947	ATP synthase subunit d, mitochondrial OS=Homo sapiens...	676.25	69.57 %	17	38	9.089e7	161	18.5	5.30
P02647	Apolipoprotein A-I OS=Homo sapiens GN=APOA1 PE=1 S...	648.85	52.43 %	21	43	4.496e7	267	30.8	5.76
P02042	Hemoglobin subunit delta OS=Homo sapiens GN=HBD PE...	615.90	61.90 %	9	33	2.639e8	147	16.0	8.05
P02652	Apolipoprotein A-II OS=Homo sapiens GN=APOA2 PE=1...	615.50	74.00 %	12	35	1.378e8	100	11.2	6.62
P01876	Ig alpha-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA1...	598.76	42.78 %	12	26	4.593e7	353	37.6	6.51
P14854	Cytochrome c oxidase subunit 6B1 OS=Homo sapiens GN...	561.06	61.63 %	5	14	5.059e7	86	10.2	7.05
P18859	ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial OS=Homo...	555.12	47.22 %	7	19	9.832e7	108	12.6	9.52
P01877	Ig alpha-2 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA2...	553.87	45.59 %	12	25	4.593e7	340	36.5	6.10
P62269	40S ribosomal protein S18 OS=Homo sapiens GN=RPS18...	543.56	58.55 %	14	25	2.936e7	152	17.7	10.99
P67809	Nuclease-sensitive element-binding protein 1 OS=Homo s...	531.27	28.40 %	7	14	2.611e7	324	35.9	9.88
P60709	Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 S...	458.04	29.87 %	10	18	7.512e7	375	41.7	5.48
P02768	Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2...	456.66	15.93 %	10	15	1.983e7	609	69.3	6.28
Q07654	Trefoil factor 3 OS=Homo sapiens GN=TF3 PE=1 SV=1...	449.15	53.75 %	7	40	3.002e8	80	8.6	5.92
P20674	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial OS=Hom...	426.90	32.67 %	7	19	2.978e7	150	16.8	6.79
P53999	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p...	394.17	53.54 %	15	26	1.015e8	127	14.4	9.60
P02649	Apolipoprotein E OS=Homo sapiens GN=APOE PE=1 SV=...	384.93	25.55 %	9	17	1.656e7	317	36.1	5.73
P16989	DNA-binding protein A OS=Homo sapiens GN=CSDA PE=...	338.11	12.90 %	3	7	1.612e7	372	40.1	9.77
P62249	40S ribosomal protein S16 OS=Homo sapiens GN=RPS16...	329.05	57.53 %	10	15	3.254e7	146	16.4	10.21
P62851	40S ribosomal protein S25 OS=Homo sapiens GN=RPS25...	295.86	52.00 %	10	16	2.922e7	125	13.7	10.11
P48047	ATP synthase subunit O, mitochondrial OS=Homo sapiens...	280.01	30.05 %	6	11	2.077e7	213	23.3	9.96
P25705	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapi...	278.95	6.51 %	3	5	8.254e6	553	59.7	9.13
P02656	Apolipoprotein C-III OS=Homo sapiens GN=APOC3 PE=1...	274.26	43.43 %	5	8	1.282e7	99	10.8	5.41
Q9HD89	Resistin OS=Homo sapiens GN=RETN PE=2 SV=1 - [RET...	268.57	31.48 %	3	6	2.471e7	108	11.4	6.86
P84103	Serine/arginine-rich splicing factor 3 OS=Homo sapiens G...	267.95	47.56 %	9	19	5.413e7	164	19.3	11.65
P62750	60S ribosomal protein L23a OS=Homo sapiens GN=RPL23...	267.78	23.08 %	4	9	1.851e7	156	17.7	10.45
Q09666	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK OS=...	262.99	10.44 %	14	20	8.794e6	5890	628.7	6.15
Q92945	Far upstream element-binding protein 2 OS=Homo sapien...	261.69	12.38 %	5	8	1.402e7	711	73.1	7.30

Abbildung 3.35: Screenshot der Proteinliste aus dem *Proteome Discoverer* von benignem KC93-Retentat verdaut mit Trypsin (2 MC)

Die Proteine wurden nach dem höchsten *score* sortiert. Dieser Wert wird aus der Summe aller Peptide gebildet, die jeweils einen *score* besitzen. Dieser bildet sich aus einem Programm-spezifischen Bewertungssystem, indem Informationen wie Ladung des Peptides und Parameter wie der *peptide relevance factor* verrechnet werden. Die *Accession* gibt die ID des Proteins bei www.uniprot.org an und ist unter *Description* ausgeschrieben. *Coverage* gibt die Proteinabdeckung über die identifizierten Peptide an, welche unter der Kategorie *#Peptides* zu sehen ist. Unter *#PSMs* kann man die Summe aller proteinzugehörigen Peptide einsehen und unter *#AAs* die Länge des Proteins, wie es bei www.uniprot.org angegeben ist. Der *Area*-Wert wird aus der Summe der höchsten drei Peptide des Proteins gebildet. Dies dient dazu einen Eindruck der relativen Häufigkeit von Peptiden und Proteinen zu bekommen. *MW* steht für die Molmasse (*molecular weight*) des Proteins. Zuletzt ist der Wert des *Calc. pI* angegeben, der den theoretischen isoelektrischen Punkt des Proteins anzeigt.

Verunreinigungsproteine sind hier auch Immunglobulin-Fragmente, die von den Antikörpern der HLA-Isolation stammen. Das β_2 -Mikroglobulin ist auch hier vertreten wie auch gängige Proteine der Zellbiosynthese (ribosomale Proteine und ATP-Synthetasen). Bei Chymotrypsin zeigt sich bei den Verunreinigungsproteinen das gleiche Bild wie bei einem tryptischen Verdau (siehe Abbildung 3.36). Im Gegensatz zu Trypsin sind auch die C-Allotypen oben in der Proteinliste zu finden sowie die nicht klassischen HLA-Moleküle (blauer Pfeil).

Accession	Description	Score	Coverage	# Peptides	# PSMs	Area	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
Q9Y6R7	IgGfC-binding protein OS=Homo sapiens GN=FCGBP PE=...	11687.58	65.33 %	227	659	4.675e9	5405	571.6	5.34
P01889	HLA class I histocompatibility antigen, B-7 alpha chain OS=...	2504.67	68.23 %	27	127	7.075e9	362	40.4	5.85
Q04826	HLA class I histocompatibility antigen, B-40 alpha chain OS=...	2457.56	47.24 %	21	110	7.075e9	362	40.5	6.54
P04439	HLA class I histocompatibility antigen, A-3 alpha chain OS=...	2392.73	54.25 %	24	108	6.547e9	365	40.8	6.00
P30508	HLA class I histocompatibility antigen, Cw-12 alpha chain...	2273.01	50.55 %	23	99	5.373e9	366	40.9	6.30
Q07000	HLA class I histocompatibility antigen, Bw-15 alpha chain...	2239.89	43.72 %	21	93	5.373e9	366	40.8	6.33
P30505	HLA class I histocompatibility antigen, Cw-8 alpha chain OS=...	2200.04	40.98 %	19	89	5.373e9	366	40.7	6.98
Q31612	HLA class I histocompatibility antigen, B-73 alpha chain OS=...	2176.37	39.67 %	20	91	3.188e9	363	40.4	6.24
Q31610	HLA class I histocompatibility antigen, B-81 alpha chain OS=...	2135.80	63.26 %	26	114	4.815e9	362	40.4	6.00
Q29836	HLA class I histocompatibility antigen, B-67 alpha chain OS=...	2052.00	65.47 %	30	129	7.075e9	362	40.3	6.15
P30475	HLA class I histocompatibility antigen, B-39 alpha chain OS=...	2043.71	65.47 %	29	130	7.075e9	362	40.3	6.15
P10321	HLA class I histocompatibility antigen, Cw-7 alpha chain OS=...	1885.96	47.54 %	22	80	2.690e9	366	40.6	6.04
P01876	Ig alpha-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA1...	1410.43	62.32 %	24	79	1.172e9	353	37.6	6.51
P01877	Ig alpha-2 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA2...	1363.03	59.12 %	21	73	1.214e9	340	36.5	6.10
P01892	HLA class I histocompatibility antigen, A-2 alpha chain OS=...	1286.88	57.26 %	26	87	3.758e9	365	40.9	6.99
P01834	Ig kappa chain C region OS=Homo sapiens GN=IGKC PE=...	866.63	82.08 %	10	52	1.222e9	106	11.6	5.87
P13747	HLA class I histocompatibility antigen, alpha chain E OS=...	809.71	20.11 %	6	30	3.795e9	358	40.1	5.95
P60709	Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 S...	707.95	56.53 %	18	50	7.843e8	375	41.7	5.48
P61769	Beta-2-microglobulin OS=Homo sapiens GN=B2M PE=1 S...	595.67	69.75 %	12	85	8.423e9	119	13.7	6.52
A8K714	Calcium-activated chloride channel regulator 1 OS=Homo...	592.13	29.54 %	24	38	3.476e8	914	100.2	6.37
P69905	Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens GN=HBA1 P...	587.32	67.61 %	13	36	7.834e8	142	15.2	8.68
P30511	HLA class I histocompatibility antigen, alpha chain F OS=...	561.18	16.76 %	6	23	5.558e8	346	39.0	5.57
P02768	Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2...	558.97	35.30 %	17	27	1.597e8	609	69.3	6.28
P01833	Polymeric immunoglobulin receptor OS=Homo sapiens GN=...	554.59	38.35 %	21	35	1.977e8	764	83.2	5.74
P68871	Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens GN=HBB PE=...	530.99	65.31 %	14	28	6.078e8	147	16.0	7.28
P08670	Vimentin OS=Homo sapiens GN=VIM PE=1 SV=4 - [VIME...	530.44	50.43 %	22	36	2.835e8	466	53.6	5.12
P63267	Actin, gamma-enteric smooth muscle OS=Homo sapiens...	519.71	46.54 %	16	39	6.474e8	376	41.8	5.48
P17693	HLA class I histocompatibility antigen, alpha chain G OS=...	446.53	21.89 %	7	24	3.638e9	338	38.2	5.69
P07437	Tubulin beta chain OS=Homo sapiens GN=TUBB PE=1 SV...	439.89	34.01 %	14	24	2.001e8	444	49.6	4.89
Q562R1	Beta-actin-like protein 2 OS=Homo sapiens GN=ACTBL2 P...	426.19	25.53 %	9	24	5.881e8	376	42.0	5.59
Q9BQE3	Tubulin alpha-1C chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1C P...	424.86	24.72 %	9	21	2.857e8	449	49.9	5.10
P0CG05	Ig lambda-2 chain C regions OS=Homo sapiens GN=IGLC...	423.15	83.02 %	6	20	5.533e8	106	11.3	7.24
P84103	Serine/arginine-rich splicing factor 3 OS=Homo sapiens G...	397.91	26.22 %	7	18	3.231e8	164	19.3	11.65
P46782	40S ribosomal protein S5 OS=Homo sapiens GN=RPS5 PE=...	390.89	53.43 %	8	21	1.761e8	204	22.9	9.72
P39019	40S ribosomal protein S19 OS=Homo sapiens GN=RPS19...	384.55	75.17 %	11	29	7.566e8	145	16.1	10.32
P01861	Ig gamma-4 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG...	377.86	35.17 %	12	21	1.480e8	327	35.9	7.36
P05787	Keratin, type II cytoskeletal 8 OS=Homo sapiens GN=KRT...	377.52	35.82 %	15	26	2.882e8	483	53.7	5.59
P53999	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p...	350.58	40.94 %	5	13	1.642e8	127	14.4	9.60
P23528	Cofilin-1 OS=Homo sapiens GN=CFL1 PE=1 SV=3 - [COF...	329.49	42.77 %	7	15	1.540e8	166	18.5	8.09
P68104	Elongation factor 1-alpha 1 OS=Homo sapiens GN=EEF1A...	317.19	31.82 %	12	22	2.222e8	462	50.1	9.01
P0CG04	Ig lambda-1 chain C regions OS=Homo sapiens GN=IGLC...	303.07	65.09 %	5	13	3.628e8	106	11.3	7.87
P01871	Ig mu chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHM PE=1...	286.82	26.11 %	10	21	1.496e8	452	49.3	6.77
P62277	40S ribosomal protein S13 OS=Homo sapiens GN=RPS13...	286.67	66.23 %	11	22	4.662e8	151	17.2	10.54

Abbildung 3.36: Screenshot der Proteinliste aus dem *Proteome Discoverer* von benignem KC93-Retentat verdaut mit Chymotrypsin (2 MC)

Die Proteine wurden nach dem höchsten *score* sortiert. Dieser Wert wird aus der Summe aller Peptide gebildet, die jeweils einen *score* besitzen. Dieser bildet sich aus einem Programm-spezifischen Bewertungssystem, indem Informationen wie Ladung des Peptides und Parameter wie der *peptide relevance factor* verrechnet werden. Die *Accession* gibt die ID des Proteins bei www.uniprot.org an und ist unter *Description* ausgeschrieben. *Coverage* gibt die Proteinabdeckung über die identifizierten Peptide an, welche unter der Kategorie *#Peptides* zu sehen ist. Unter *#PSMs* kann man die Summe aller proteinzugehörigen Peptide einsehen und unter *#AAs* die Länge des Proteins, wie es bei www.uniprot.org angegeben ist. Der *Area*-Wert wird aus der Summe der höchsten drei Peptide des Proteins gebildet. Dies dient dazu einen Eindruck der relativen Häufigkeit von Peptiden und Proteinen zu bekommen. *MW* steht für die Molmasse (*molecular weight*) des Proteins. Zuletzt ist der Wert des *Calc. pI* angegeben, der den theoretischen isoelektrischen Punkt des Proteins anzeigt.

3.3.4.2 Anwendungsspezifische Datenbank

Eine weitere Möglichkeit die Prozessierung der Daten zu optimieren, besteht darin die Protein-Datenbank auf die Probe abzustimmen. In diesem Fall wurde eine HLA-Allel-Datenbank auf Basis der vorkommenden Allele in Europa erstellt (siehe 2.2.6.4). Dafür wurde die Proteinliste nach der Proteinabdeckung angeordnet, da dies erfahrungsgemäß die beste Proteinreihenfolge ergibt. Es wurden immer die zwei bestbewerteten unterschiedlichen HLA-Allotypen in den drei Klassen berücksichtigt.

Durch den hohen Grad der Homologie zwischen den Allotypen ist es normal, dass gleich mehrere Subtypen gelistet sind z.B. für HLA-B*07 in Abbildung 3.37. Darum wurden auch weitere Subtypen des entsprechenden HLA-Antigens ignoriert bis zur nächsten Nennung eines HLA-Antigens.

Description	Score	Coverage ▾	# Peptides	# PSMs	Area	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
181 bp - [B*07:38_pop6 sp 01883 B*07:38_pop6]	1324.87	74.59 %	24	61	1.659e8	181	21.2	5.71
273 bp - [B*07:10_pop8 sp 00142 B*07:10_pop8]	1407.59	73.99 %	31	75	1.659e8	273	31.7	5.69
206 bp - [B*07:09_pop6 sp 00141 B*07:09_pop6]	1322.96	71.84 %	28	65	1.840e8	206	23.7	5.52
181 bp - [C*07:15_pop6 sp 01408 C*07:15_pop6]	1099.12	62.98 %	19	45	1.594e8	181	20.8	5.74
298 bp - [B*39:31_pop8 sp 01926 B*39:31_pop8]	1330.11	62.08 %	27	65	1.659e8	298	34.2	6.09
181 bp - [A*03:08_pop6 sp 01302 A*03:08_pop6]	949.03	61.33 %	14	32	8.568e7	181	21.0	5.66
HLA class I histocompatibility antigen, B-7 alpha chain OS...	1466.83	59.39 %	36	83	1.840e8	362	40.4	5.85
362 bp - [B*07:04_pop8 sp 00136 B*07:04_pop8]	1466.83	59.39 %	36	83	1.840e8	362	40.4	5.59
362 bp - [B*07:15_pop6 sp 01050 B*07:15_pop6]	1428.33	58.29 %	34	79	1.840e8	362	40.4	6.00
181 bp - [A*32:04_pop8 sp 01045 A*32:04_pop8]	948.72	57.46 %	13	31	8.568e7	181	21.1	5.92
181 bp - [A*02:27_pop6 sp 00033 A*02:27_pop6]	930.41	56.91 %	15	33	7.467e7	181	21.1	7.18
285 bp - [A*03:05:01_pop6 sp 01107 A*03:05:01_pop6]	1047.75	56.14 %	20	43	1.143e8	285	32.7	5.54
362 bp - [B*07:05:01_pop8 sp 00137 B*07:05:01_pop8]	1395.90	55.80 %	33	77	1.840e8	362	40.4	6.00
362 bp - [B*07:14_pop8 sp 01049 B*07:14_pop8]	1395.90	55.80 %	33	77	1.840e8	362	40.5	5.88
273 bp - [A*74:03_pop6 sp 00129 A*74:03_pop6]	1094.98	55.68 %	18	44	8.568e7	273	31.5	5.66
365 bp - [A*11:04_pop6 sp 00046 A*11:04_pop6]	1175.29	55.34 %	23	47	1.143e8	365	40.9	6.00
181 bp - [C*07:08_pop6 sp 00440 C*07:08_pop6]	1056.59	55.25 %	15	39	1.563e8	181	20.9	6.09
181 bp - [C*07:10_pop6 sp 00442 C*07:10_pop6]	1056.59	55.25 %	15	39	1.563e8	181	20.8	6.09
181 bp - [C*07:22_pop6 sp 01844 C*07:22_pop6]	1056.59	55.25 %	15	39	1.563e8	181	20.9	5.73
181 bp - [C*07:25_pop6 sp 01877 C*07:25_pop6]	1056.59	55.25 %	15	39	1.563e8	181	20.8	5.99
HLA class I histocompatibility antigen, B-39 alpha chain O...	1335.18	54.97 %	29	67	1.840e8	362	40.3	6.15
HLA class I histocompatibility antigen, B-67 alpha chain O...	1382.74	54.97 %	31	72	1.840e8	362	40.3	6.15
362 bp - [B*39:06:01_pop6 sp 00279 B*39:06:01_pop6]	1335.18	54.97 %	29	67	1.840e8	362	40.3	5.99
HLA class I histocompatibility antigen, A-3 alpha chain OS...	1104.72	54.52 %	23	46	1.143e8	365	40.8	6.00
273 bp - [A*02:20:01_pop6 sp 00026 A*02:20:01_pop6]	982.58	53.48 %	17	38	7.467e7	273	31.6	6.47
273 bp - [A*02:29_pop6 sp 00035 A*02:29_pop6]	982.58	53.48 %	17	38	7.467e7	273	31.6	6.47
273 bp - [B*14:03_pop6 sp 00159 B*14:03_pop6]	1219.10	53.48 %	21	57	1.659e8	273	31.7	5.82
273 bp - [B*15:35_pop6 sp 00198 B*15:35_pop6]	1292.37	53.11 %	20	50	1.185e8	273	31.6	5.81
273 bp - [B*15:39:01_pop6 sp 00202 B*15:39:01_pop6]	1292.37	53.11 %	20	50	1.185e8	273	31.5	5.97
362 bp - [B*39:05:01_pop8 sp 00278 B*39:05:01_pop8]	1323.63	53.04 %	28	66	1.840e8	362	40.4	6.30
362 bp - [B*39:10:01_pop8 sp 00284 B*39:10:01_pop8]	1344.32	53.04 %	28	67	1.840e8	362	40.4	6.15
181 bp - [A*26:09_pop6 sp 00081 A*26:09_pop6]	975.68	53.04 %	13	31	8.986e7	181	21.2	5.91
181 bp - [C*02:06_pop6 sp 01673 C*02:06_pop6]	1072.86	53.04 %	17	36	1.139e8	181	21.2	6.57
181 bp - [C*06:04_pop6 sp 00432 C*06:04_pop6]	1061.03	52.49 %	15	40	1.563e8	181	21.1	5.74

Abbildung 3.37: Screenshot der Proteinliste aus dem *Proteome Discoverer* von benignem KC93-Retentat verdaut mit Trypsin

Die Proteine wurden nach der höchsten Proteinabdeckung (*coverage*) sortiert. In Blau markiert sind die bestbewerteten HLA-Allotypen in den drei HLA Klasse I-Proteinen. Unter *Description* steht die in der Datenbank zugewiesene Allotyp-Bezeichnung. Der *score* bildet sich aus einem Programm-spezifischen Bewertungssystem, indem Informationen wie Ladung des Peptides und Parameter wie der *peptide relevance factor* verrechnet werden. Die Anzahl der dem HLA-Allotyp zugehörigen Peptide ist unter der Kategorie *#Peptides* zu sehen. Unter *#PSMs* kann man die Summe aller proteinzugehörigen Peptide einsehen und unter *#AAs* die Länge des Proteins wie es bei www.uniprot.org angegeben ist. Der *Area*-Wert wird aus der Summe der höchsten drei Peptide des Proteins gebildet. Dies dient dazu einen Eindruck der relativen Häufigkeit von Peptiden und Proteinen zu

bekommen. *MW* steht für die Molmasse (*molecular weight*) des Proteins. Zuletzt ist der Wert des *Calc. pI* angegeben, der den theoretischen isoelektrischen Punkt des Proteins anzeigt.

Description	Score	Coverage ▾	# Peptides	# PSMs	Area	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
285 bp - [A*03:05:01_pop6 sp 011107 A*03:05:01_pop6]	2962.71	84.91 %	61	194	6.547e9	285	32.7	5.54
273 bp - [C*07:17:01_pop6 sp 01662 C*07:17:01_pop6]	2720.19	80.95 %	47	146	3.188e9	273	31.4	5.55
HLA class I histocompatibility antigen, A-2 alpha chain OS...	1967.23	78.08 %	57	167	3.772e9	365	40.9	6.99
HLA class I histocompatibility antigen, B-39 alpha chain O...	2665.57	76.80 %	60	197	7.075e9	362	40.3	6.15
HLA class I histocompatibility antigen, B-67 alpha chain O...	2607.50	76.80 %	60	195	7.075e9	362	40.3	6.15
362 bp - [B*39:10:01_pop8 sp 00284 B*39:10:01_pop8]	2607.50	76.80 %	59	193	7.075e9	362	40.4	6.15
HLA class I histocompatibility antigen, B-14 alpha chain O...	2593.95	74.86 %	58	184	7.075e9	362	40.3	5.83
362 bp - [B*07:04_pop8 sp 00136 B*07:04_pop8]	3078.36	71.82 %	58	193	7.075e9	362	40.4	5.59
HLA class I histocompatibility antigen, B-42 alpha chain O...	3109.36	71.55 %	57	192	7.075e9	362	40.3	5.85
HLA class I histocompatibility antigen, A-3 alpha chain OS...	3034.72	70.96 %	63	196	6.547e9	365	40.8	6.00
HLA class I histocompatibility antigen, Cw-12 alpha chain ...	2853.17	69.95 %	48	154	5.373e9	366	40.9	6.30
HLA class I histocompatibility antigen, B-8 alpha chain OS...	3091.31	66.30 %	51	180	7.075e9	362	40.3	5.71
HLA class I histocompatibility antigen, B-54 alpha chain O...	2368.84	66.30 %	57	167	6.441e9	362	40.4	6.30

Abbildung 3.38: Screenshot der Proteinliste aus dem *Proteome Discoverer* von benignem KC93-Retentat verdaut mit Chymotrypsin

Die Proteine wurden nach der höchsten Proteinabdeckung (*coverage*) sortiert. In Blau markiert sind die bestbewerteten HLA-Allotypen in den drei HLA Klasse I-Proteinen. Unter *Description* steht die in der Datenbank zugewiesene Allotyp-Bezeichnung. Der *score* bildet sich aus einem Programm-spezifischen Bewertungssystem, indem Informationen wie Ladung des Peptides und Parameter wie der *peptide relevance factor* verrechnet werden. Die Anzahl der dem HLA-Allotyp zugehörigen Peptide ist unter der Kategorie *#Peptides* zu sehen. Unter *#PSMs* kann man die Summe aller proteinzugehörigen Peptide einsehen und unter *#AAs* die Länge des Proteins wie es bei www.uniprot.org angegeben ist. Der *Area*-Wert wird aus der Summe der höchsten drei Peptide des Proteins gebildet. Dies dient dazu einen Eindruck der relativen Häufigkeit von Peptiden und Proteinen zu bekommen. *MW* steht für die Molmasse (*molecular weight*) des Proteins. Zuletzt ist der Wert des *Calc. pI* angegeben, der den theoretischen isoelektrischen Punkt des Proteins anzeigt.

Durch die Analyse mit der anwendungsspezifischen Datenbank ergab sich, hier an dem Beispiel von KC93 gezeigt, dass in 80% der Fälle die richtigen HLA-Antigene getroffen wurden, nicht aber die Subtypen. Nur bei Chymotrypsin war dies der Fall. Zwar ist die genomische Typisierung von KC93 HLA-A*03, aber nicht der Subtyp HLA-A*03:05, richtig wäre erst der nächstgelistete Subtyp (A*03:01). Die gleiche Situation ist vorzufinden für HLA-C*07:17. HLA-A*02:01 und -B*39:01 wurden richtig getroffen. HLA-B*67:01 ist durch die Ähnlichkeit zu HLA-B*39 zu gut bewertet worden und ist deshalb oben in der Proteinliste angeordnet (Übereinstimmung 98.9% (<http://www.uniprot.org/align/>)).

3.3.4.3 HLA-Annotation mittels Peptidmotiv - Ligandomat-Analyse

Die Typisierung durch Peptidmotive von natürlichen HLA-Liganden, welche die exprimierten HLA-Allele widerspiegeln, wurde mittels Ligandomat (welcher die Informationen aus den zwei Epitop-Vorhersageprogrammen NetMHC und SYFPEITHI nutzt) durchgeführt. Die Ergebnisse der gruppierten HLA-Allele befinden sich im Anhang.

3.3.4.4 HLA-präsentierte HLA-Peptide

Wie in JY zeigten sich die meisten HLA-präsentierten HLA-Peptide durch HLA Klasse II präsentiert. Die meisten Liganden waren nicht *unique* für ein HLA-Allotyp. Da keine Isolation der Klasse II-Liganden stattgefunden hatte, konnte auf diese Informationen nicht zugegriffen

werden. Für KC93 konnten weder auf Tumor- noch Normalgewebe HLA Klasse I-Peptide als Liganden identifiziert werden.

Tabelle 3.36: HLA Klasse I-präsentierte HLA-Liganden

KC58	KC92	KC93
YDQDAYDGKD B*44 ¹	GSHSmRYFD B*08	-
RYFSTSVSW C*04	RYFSTSVSW C*04	
RVMAPRALL C*07/C*18		

1= Angegebene Allotypen entsprechen dem Quellprotein

In den HLA Klasse II-Läufen konnten entweder wie in KC58 und KC93 nur Liganden aus HLA Klasse II-Molekülen identifiziert werden oder wie in KC92 zwar ein paar HLA Klasse I-assoziierte, aber ohne Allel-spezifische Zuordnung.

3.3.4.5 Typisierung der Kolorektal-Karzinomproben

Die Kombination aller Informationen ergibt folgende alternative HLA-Typisierung.

Tabelle 3.37: Alternative Typisierung der Kolorektal-Karzinomproben

Probe (T/N) ¹	Ligandomat		Enzymatischer Verdau		HLA-Datenbank		HLA-Liganden	Genom. HLA-Typ.
	NetMHC	SYFPEITHI	Trypsin	Chymotrypsin	Trypsin	Chymotrypsin		
KC58 (T)	A*02:11	A*02:01	A*02/B*57/B*58	-	A*74:03	A*24:17	-	A*02:01
	A*24:03	A*24:02	A*01/A*36	A*23/A*24	A*23:01	A*31:08	-	A*23:01
	B*18:01	B*18:01 ²	B*07/B*81	B*07/B*48/B*81	B*42:02	B*07:10	-	B*07:02
	B*40:01	B*44:02	-	-	B*55:02	B*44:29	-	-
	-	-	-	-	C*16:01	C*15:09	-	C*04:01
KC58 (N)	A*02:11	A*02:01	A*02	A*02,	A*02:27	A*02:07	-	A*02:01
	A*24:03	A*24:02	A*23	A*23/A*24	A*31:08	A*23:01	-	A*23:01
	B*07:02	B*18:01 ²	B*07	B*07/B*48/B*81	B*07:38	B*07:14	B*44	B*07:02
	B*18:01	B*44:02	B*13/B*44/B*49/B*52	B*44	B*27:01	B*44:03	-	-
	-	-	C*04	C*04	C*06:04	C*15:09	C*04	C*04:01
KC92 (T)	A*01:01	A*01:01	A*01	A*01	A*01:06	A*01:14	-	A*01:01
	A*26:02	A*24:02	A*23/A*24	A*24	A*03:05	A*24:02	-	A*24:02
	B*07:02	B*08:01	B*08	B*08	B*08:09	B*08:01	-	B*08:01
	B*35:01	B*35:01	B*35/B*51/B*53/B*59	-	B*14:03	B*35:03	-	B*35:01
	-	-	C*04	C*04	C*06:04	C*14:04	C*04	C*04:01
KC92 (N)	A*01:01	A*01:01	A*01	A*01	A*23:01	A*23:01	-	A*01:01
	A*26:02	A*24:02	A*23/A*24	A*24	A*24:03	A*24:02	-	A*24:02
	B*07:01	B*08:01	B*08	B*08	B*08:09	B*08:01	B*08	B*08:01
	B*35:01	B*35:01	B*35/B*51/B*53/B*59	-	B*15:34	B*35:03	-	B*35:01
	-	-	C*04	C*04, C*07	C*06:06	C*14:04	C*04	C*04:01
KC93 (T)	A*02:11	A*02:01	A*02	A*02	A*32:04	A*32:04	-	A*02:01
	A*11:01	A*11:01	A*03	A*03	A*03:05	A*03:05	-	A*03:01
	B*07:02	B*07:02	B*07	B*07	B*07:10	B*07:10	-	B*07:02
	B*39:01	B*39:01 ²	B*39	B*39	B*39:31	B*39:01	-	B*39:01
	-	-	C*07	C*07	C*07:15	C*07:17	-	C*07:02
KC93 (N)	A*02:11	A:02:01	A*02	A*02	A*32:04	A*02:01	-	A*02:01
	A*11:01	A*11:01	A*03	A*03	A*03:08	A*03:05	-	A*03:01
	B*07:02	B*07:02	B*07	B*07/B*48/B*81	B*07:38	B*67:01	-	B*07:02
	B*39:01	B*13:02 ²	B*39	B*39	B*39:31	B*39:01	-	B*39:01
	-	-	C*02/C*06/C*07/ C*12/C*14	C*07	C*07:15	C*07:17	-	C*07:02
-	-	-	-	C*02:06	C*12:02	-	C*12:03	

Anmerkung= in Rot hervorgehobene Allotypen entsprechen nicht der HLA-Typisierung; 1= T steht für Tumor und N für benignes Gewebe; 2= B*35:01 wäre das zweite HLA-B Allel von KC58 und KC93 (N und T), aber die Erfahrung aus dem JY-Datensatz zeigt, dass bei B*07:02 dieser Allotyp mit auftaucht, obwohl es nicht exprimiert wird.

Die Typisierung durch die Peptidmotive mittels Ligandomat, welches die Informationen aus den zwei Epitop-Vorhersageprogrammen (NetMHC und SYFPEITHI) nutzt, zeigte Unterschiede innerhalb der Programme selbst sowie zwischen den Tumor- und Normal-Geweben. KC58 hat generell einen sehr schlechten Informationsgehalt, was zum einen an der geringeren Ausbeute bei der HLA-Isolation liegt sowie an der Kontamination. SYFPEITHI zeigte sich im Überblick zu allen Proben besser in der Zuordnung der Liganden zu den assoziierten HLA-Allotypen. Ein großes Problem stellt die Ähnlichkeit der bevorzugten Peptidmotive zum Beispiel von HLA-A*03 und A*11 dar. Hier können die Programme keine richtige Zuordnung treffen. Zudem sind bisher keine C-Allotypen aufgenommen. Die enzymatischen Verdauungen zeigten sich sehr erfolgreich. In jeder Probe konnten bis auf eines alle Allele bestimmt werden. Vor allem die Kombination aus Trypsin und Chymotrypsin erleichterte die Typisierung. Die anwendungsspezifische HLA-Datenbank war keine Bereicherung in der Zuordnung der Subtypen. Mit einer Fehlerrate von über 50% ist diese nicht verlässlich. Die HLA-Liganden-Analyse war in diesen Proben nicht sehr erfolgreich, sie kann natürlich je nach Gewebe und Zellen variieren. Dass sie trotzdem durchgeführt werden sollte, zeigt das Beispiel von KC58, da hier auch die Liganden die Kontamination bestätigen und somit eine Verwechslung im Verdau ausschließen. So kann man auch Hinweise zur Qualität der HLA-Isolation und Liganden-Analyse erhalten.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die alternative Strategie dazu geführt hat, dass bei KC58 alle Allele sowie Kontaminanten oder genomisch falsch beschriebene Allele identifiziert wurden. Durch Kombination wurden bei KC92 alle Allele typisiert wobei HLA-B*35 nur durch die Ligandomatanalyse eindeutig bestimmt werden konnte. KC93 ist in einem C-Allel durch eine Eingrenzung auf zwei Allele typisiert (HLA-C*12 oder -C*14). Die Datenbankanalyse von Chymotrypsin deutet zwar auf C*12 hin, aber durch die häufige Fehlerrate ist diese Aussage nicht stark gewichtet.

3.3.5 Enzymatische *unique* HLA-Peptide

Es wurden für viele Allotypen *unique* Peptide gefunden. Dabei spielen Längenvarianten einen Anzahl vergrößernden Faktor. Manche Allotypen konnten nicht durch Peptide abgedeckt werden. Dies kann an verschiedenen Faktoren liegen, wie zum einen an der starken Homologie zu anderen Allotypen (Beispiel HLA-B*39 zu B*67 mit 98.9%). Zum anderen sind manche Allotypen selten und wurden im Rahmen dieser Arbeit noch nie gemessen. Möglich ist auch, dass manche Subtypen anhand der fehlenden Sequenz in der Datenbank nicht annotiert werden konnten. Alles in Allem konnten *unique* Peptide für HLA Klasse I, nicht klassische HLA-Moleküle und HLA Klasse II gefunden und für eine

Typisierung verwendet werden. Auf die enzymatische Herkunft wird hierbei nicht eingegangen.

3.3.5.1 HLA Klasse I

Für HLA-A wurden insgesamt 88 *unique* Peptide gefunden (siehe Tabelle 3.38). Dabei wurden Modifikationsunterschiede ausgeschlossen.

Tabelle 3.38: HLA-A-Moleküle abgedeckt durch *unique* Peptide

HLA-Allel	Sequenz	HLA-Allel	Sequenz
A*01	LEGRCDVGL	A*24	AAHVAEQQR
	RVYLEGR		EAAHVAEQQR
YLEGRCDVGLR	EAAHVAEQQRAY		
AHSQTHRVDLGTLR	KWEAAHVAEQQR		
APWIEQEGPEYWDGETRK	RKWEAAHVAEQQR		
APWIEQEGPEYWDGETRKVK	RWEPSSQPTVPIVGIIAG		
DGETRKVKAH	TLRWEPSSQPTVPIVGIIAG		
DGETRKVKAHSQTH	WEAAHVAEQQR		
IEQEGPEYWDGETRKVKAH	A*25		DRNTRNVKAHSQTDRESL
IEQEGPEYWDGETRKVKAHSQ	A*26		DRNTRNVKAHSQTDSPANL
A*02	KVKAHSQTHRVDLGTLR	DRNTRNVKAHSQTDSPANLGLT	
	MEPRAPWIEQEGPEYWDGETR	DLQTRNVKAQSQTDRANL	
	SQTHRVDLGT	DLQTRNVKAQ	
	THRVDLGT	DLQTRNVKAQSQTDRANLGLT	
	VKAHSQTHRVDLGTLR	A*29	VKAQSQTDRANL
	WDGETRKV	VKAQSQTDRANLGLT	
	WDGETRKVKA	WDLQTRNVKAQ	
	YWDGETRK	WDLQTRNVKAQSQTDRANLGLT	
	AADMAAQITKRKWEAAHEAE	A*30	SVSRPGSGEPR
	AAHEAEQLR	FSTSVSRPGSGEPRFIAVGY	
AHEAEQL	GALALTHT		
AYLDGTCVEW	STSVSRPGSGEPR		
AYLDGTCVEWLR	STSVSRPGSGEPRF		
AYLDGTCVEWLR	STSVSRPGSGEPRFIAVGY		
DGTCVEWLR	YFSTSVSRPGSGEPR		
EAAHEAEQL	A*34	TLRWEPSSQPTIPIVGIL	
EAAHEAEQLR	RWEPSSQPTIPIVGIL		
A*03	KWEAAHEAEQLR	A*36	VYLEGTCVEWLR
	KWEAAHEAEQLRA	AAHVAEQWR	
	LDGTCVEW	DAYDGKDYIALK	
	LDGTCVEWLR	EAAHVAEQW	
	RAYLDGTCVEW	EAAHVAEQWR	
	RAYLDGTCVEWLR	GYRQDAYDGKDYIALK	
	RKWEAAHEAEQLR	GYRQDAYDGKDYIALKEDLR	
	WEAAHEAEQLR	HKWEAAHVAEQWR	
	YLDGTCVEW	QDAYDGKDYIALK	
	YLDGTCVEWLR	QDAYDGKDYIALKEDLR	
A*11	KWEAAHAAEQ	VAEQWR	
	EAAHAAEQQR	VAVVPSGQEQ	
	EAAHAAEQQRAY	VAVVPSGQEQR	
	KWEAAHAAEQQR	VAVVPSGQEQRY	
	RKWEAAHAAEQQR	WEAAHVAEQWR	
	WEAAHAAEQQR	WVAVVPSGQEQR	
A*23	VAEQLRAYLEGTCVDGLRR	A*80	AYLEGECVDGLR

Für HLA-B-Moleküle wurden 59 verschiedene *unique* Peptide identifiziert. Auch hier sind Modifikationsunterschiede ausgeschlossen.

Tabelle 3.39: HLA-B-Moleküle abgedeckt durch *unique* Peptide

HLA-Allel	Sequenz	HLA-Allel	Sequenz
B*07	EAARAAEQL	B*14	WMYGCDVGPDGR
	GHDQYAY	B*18	FISVGYYVDGTQFVR
	GHDQYAYD		DRNTQISKNTNTQTY
	GHDQYAYDGK	DRNTQISKTN	
	GHDQYAYDGKD	AQTDREDLR	
	GHDQYAYDGKDYI	B*27	QNMVYGCDVGPDGR
	GHDQYAYDGKDYIALNEDLR	NMYGCDVGPDGR	
	GRLLRGHDQYAYDGKD	B*37	SGCDVGPDGRL
	HDQYAYDGK		MSGCDVGPDGR
	LENGKETLQRAEPPKTH	ICKTNTQTY	
	LLRGHDQYAYDGK	B*38	DRNTQICKTNTQTY
	LLRGHDQYAYDGKD	IEQEGPEYWRNTQICKTNTQTY	
	LRGHDQYAYDGKD	ADPPKTHVTHHPISDHEVTLR	
	LLRGHDQYAYDGKDYIALNEDLR	GYDQDAYDGK	
	LLRGHDQYAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQ	GYDQDAYDGKDYIALNEDLSSWTAA	
	ITQR	DTAAQITQR	
	LLRGHDQYAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQ	B*44	HEVTLR
	ITQRK		PISDHEVTLR
	LLRGHDQYAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQ		THVTHHPISDHEVTLR
	ITQRKWEAAR		VTHHPISDHEVTLR
RGHDQYAY	B*46	APWIEQEGPEYWDRETQK	
RGHDQYAYDGK	B*47	MFGCDVGPDGR	
RGHDQYAYDGKD		MFGCDVGPDGRL	
SGCDLGPDGRL	B*78	GYYNQSEAGSHTWQTMVYGCDVGPDGR	
TAADTAAQITQRKL	B*82	AYLEDLCVESLR	
VGPDGRLLRGHDQYAYDGKD			
B*08	FDTAMSRPGR		
	RYFDTAMSRPG		
	YFDTAMSR		
	YFDTAMSRPGR		
B*13	DSDATSPRMAPRAPW		
	DYIALNEDLSSWTAAQTAAQITQLK		
	GHNQLAYDGKDYIALNEDLSSWTAAQTAAQITQLK		
	TAADTAAQITQL		
	TAADTAAQITQLK		
	TAADTAAQITQLKW		
VRFSDATSPRMAP			
VRFSDATSPRMAPRAPW			

Für die HLA-C Allele wurden insgesamt 39 *unique* Peptide gefunden. Wie zuvor sind keine Modifikationsunterschiede berücksichtigt worden.

Tabelle 3.40: HLA-C-Moleküle abgedeckt durch *unique* Peptide

HLA-Allel	Sequenz	HLA-Allel	Sequenz
C*01	WAAVMVPSGEEQR	C*15	DGRLLRGHDQLAYDGKDIALNE
	MCGCDLGPDRLL		GHDQLAYDGK
	CGCDLGPDR		RGHDQLAY
C*02	CWALGFYPTEITLTWQR		VEQEGPEYWDRETQNY
C*04	DSDAASPRGEPREPW	C*16	AAEQQRAYLEGTCVEW
	EPWVEQEGPEYWDR		ALNEHLRSC
	STSVSWPGRGEPRIAVGY		EAARAAEQQRAY
	YFSTSVSWPGR		HLVSDHEATL
GSHSMRYFSTSVSWPGRGEP	HLVSDHEATLR		
C*05	SWTAADK		KWEAARAA
	AAQITQRKW		THVTHHLVSDHEATLR
	SWTAADK	AYLEGECEVWLRG	
	TAADKAAQITQ	GYLENGK	
C*07	TAADKAAQITQRKW	C*17	GYLENGKETLQR
	AAEQLR		RGYLENGK
	EAARAAEQLRAY		RGYLENGKETLQR
	GGSCSQAACSNSAQGSDESLITCK		YLEGECEVWLRG
	LENGKETLQRAEPPKTHVTHHPLSDHEATL		
	LENGKETLQRAEPPKTHVTHHPLSDHEAT-LRCW		
	MSGCDLGPDR		
	QRMSGCDLGPDRLL		
	RYLENGKETLQRAEPPKTHVTHHPLSDHEATLR		
	SAQGSDESLITCK		
	SGCDLGPDRLL		
	TAADTAAQITQRKL		
	TAADTAAQITQRKLEAARAAEQL		
	TCHMQHEGLQEPL		
	YTCHMQHEGLQEPL		

3.3.5.2 Nicht klassische HLA-Allele

Insgesamt wurden 104 *unique* Peptide für die nicht klassischen HLA-Allele gefunden.

Tabelle 3.41: Nicht klassische HLA-Moleküle abgedeckt durch *unique* Peptide

HLA-Allel	Sequenz	HLA-Allel	Sequenz	
HLA-E	AAQISEQK	HLA-F	AAVVVPPGEEQRYT	
	AEWSDSAQGSESHSL		AEITLTWQRDGGEEQTQ	
	AHVAHHPISDHEATLR		AHVAHHPISDHEATLR	
	APWMEQEGSEYWDR		AKANAQTDRVAL	
	AYLEDTCVEWLHK		AVVVPPGEEQ	
	DGEEQTQDTELVETR		DGEEQTQDTELVETR	
	DNDAASPRMVPRAPW		DGEEQTQDTELVETRPAGDGTQK	
	DTAQIFR		DGKDYISLNEDLRSW	
	DYISLNEDLR		DRVALRNLL	
	DYLTLNEDLR		DTVAQITQR	
	ECLELLR		DYISLNEDLR	
	ETLLHLEPPK		EGECLELL	
	FDNDAASPR		EPWVEQEGPQY	
	FSDAAIPR		EPWVEQEGPQYWEWTTGYAK	
	GKETLLHLEPPK		EQSPQPTIP	
	GLVLLGS		FSDAAIPR	
	GYEQFAYDGK		FYEAEYAEFR	
	GYEQFAYDGKDYLTNEDLR		GYHQHAYDGK	
	GYHQHAYDGK		GYHQHAYDGKDYISLNEDLR	
	LEDTCVEW		ISLNEDLRS	
	LEKGKETLL		ISLNEDLRSW	
	LGSVVGAV		LEGECELL	
	LTLNEDLR		LQRADPPKAH	
	LTLNEDLRSW		LRFSDAAIPR	
	MVDGTLILL		QGMNGCDMGPDRLL	
HLA-E	QQDGEGHTQDTELVETRPAGDGTGTF	HLA-F	QRDGEEQTQDTELVETRPAGDGTGTF	
	RKKSSGGKGGSSKAEW		RFSDAAIPRMEP	
	SDSAQGSESHSL		RGYHQHAY	
	SKAEWSDSAQGSESHSL		RTYLEGECL	
	SNDASEAEHQ		RYFSTAVSRPG	
	SWTAADTVAQITQR		SWTAADTVAQITQR	
	SWTAVDTAAQISEQK		TAADTVAQITQ	
	TAVDTAAQISEQKSNDAEAEHQRAY		TAADTVAQITQR	
	TCHVQHEGLPEPRTL		TAADTVAQITQRFY	
	TLNEDLRSW		TCHVQHEGLPQPL	
	VLLGSVVGAV		TLQGMNGCDMGPDRLL	
	VRFDNDAAASPR		TVAQITQR	
	WKPASQPTIPIVGI		TYLEGECELELLR	
	WRKKSSGGKGG		VAHHPISDHEATL	
	YIAVEYVDDTQFLR		VEQEGPQYW	
	YTCHVQHEGLPEPRTL		VEQEGPQYWEW	
	YWDRETR		WAAVVVPPGEEQR	
	HLA-G		ALNEDLRSW	WEQSPQPTIPIVGI
			CEANVAEQR	WEWTTGYAK

Fortsetzung von Tabelle 3.30

HLA-Allel	Sequenz	HLA-Allel	Sequenz
HLA-G	DGEDQTQDVELVETRPAGDGT	HLA-F	YDGKDYIS
	FDSDSACPR		YFSTAVSR
	FIAMGYVDDTQFVR		YFSTAVSRPGR
	FYPAEII		YIAVEYVDDTQFLR
	GYEQYAYDGK		YLEGECLELLR
	LQWMIGCDLGSDGRLLRGYEQYAY		YLEGECLELLRR
	TAADTAAQISKRKCE		YTCHVQHEGLPQPL
	YFSAAVSR		YTCHVQHEGLPQPLILR

3.3.5.3 HLA Klasse II

Die DR α -Kette ist so gut wie nicht polymorph und aus diesem Grund nicht gezeigt.

61 Peptide der DR β_1 -Kette als höchst polymorphe Vertreter der DR β -Ketten sind in Tabelle 3.42 aufgelistet.

Tabelle 3.42: HLA-DRB1-Ketten abgedeckt durch *unique* Peptide

HLA-Allel	Sequenz	HLA-Allel	Sequenz
DRB1*01	AGDTRPRFLWQLK	DRB1*09	GIYNQEENVR
	CIYNQEESVR		GHSGLPPTGF
	DLLEQR	DRB1*10	GHSGLPPTGFLS
	FLWQLK		RVHNQEEYAR
	FLEQVK		VHNQEEYAR
	FYHQEEY	DRB1*11	YDSDVGEYR
	FYHQEEYVR		AVTELGRPDEEYWNSQK
	HECHFFNGTER		AVTELGRPDEEYWNSQKDFLEDR
	HQEEYVRF		AVTELGRPDEEYWNSQKDFLEDRR
	NSQKDLLEQKRAAVDTY		ELGRPDEEYW
QVEHPSLTSPITVEWR	FYNQEEYVRFSDVGEF		
RVYPEVTVYPAK	NQEEYVRFSDVGEF		
DRB1*04	SGEVYTCQVEHPSLTSPITVEWR		RAVTELGRPDEEY
	TCQVEHPSLTSPIT		RAVTELGRPDEEYW
	TCQVEHPSLTSPITVEW		RAVTELGRPDEEYWNSQKDFLEDRRAAVDTY
	TGVVSTGLIQNGDWTFTLVMLETVPR	TELGRPDEEYW	
	TVQRRVYPEVTVYPAKTQPL	AVTELGRPDAEYWNSQKDILEDER	
	VYPEVTVYPAK	DILEDER	
	YFYHQEEY	NSQKDILEDERAAVDTY	
	YFYHQEEYVR	WNSQKDILEDERAAVDTY	
	YHQEEYVR	DRB1*14	FHNQEEFVR
	FLWQ GK		YFHNQEEFVR
DRB1*07	GQVDTVCR	DRB1*15	AVTELGRPDAEYWNSQKDILEQAR
	LFYNQEEFVR		DILEQAR
	RGQVDTVCR		FYNQEEVRFSDVGEF
	VQFLER		KDILEQAR
DRB1*08	AVTELGRPSAEYWNSQK		NQEEVRFSDVGEF
	ELGRPSAEYW		NSQKDILEQARA VDTY
	PSAEYWNSQK		WNSQKDILEQARA VDTY
	RAVTELGRPSAEYW		YFYNQEEVRFSDVGEFR
SGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWSAR			

In Tabelle 3.43 sind weitere HLA-DR β -Ketten mit 31 Peptiden repräsentiert.

Tabelle 3.43: Weitere HLA-DR β -Ketten abgedeckt durch Peptide

HLA-Allel	Sequenz	HLA-Allel	Sequenz
DRB3*01	FHNQEEFLRFSDVGEY	DRB5*01	DIYNQEEDLR
	MVLSSRL		DIYNQEEDLRFSDVGEYR
	PQVTVYPAK		GHSGLHPT
	RVHPQVTVYPAK		GHSGLHPTGL
	SGEVYTCQVEHPSVTSALTVEWR		GHSGLHPTGLVS
	TCQVEHPSVTSAL		NQEEDLRFSDVGEY
	TVQRRVHPQVTVY		TQTLQHHNLLVC
	VHPQVTVYPAK		TQTLQHHNLLVCSVNGFYPGSIEVR
	YFHNQEEFLR		VTVYPAR
			YNQEEDLR
	GHSGLQPTGLL		
	GHSGLQPTGLLS		
	GSCMAALTVTLT		
	QAVTELGRPDAEYW		
	SCMAALTVTLT		
DRB4*01	SGEVYTCQVEHPSMMSPLTVQWSAR		
	TVQWSAR		
	YIYNQEEYAR		
	YNSDLGEYQAVTELGR		
	YNSDLGEYQAVTELGRPDAEYWNSQK		
	YNYGVVESFTVQR		

3.3.6 Quantifizierung

Das Prinzip der Quantifizierung durch Massenspektrometrie besteht darin, ein Peptid mit bekannter Sequenz aber unbekannter Menge mit einem synthetisch hergestellten zu vergleichen. Dafür wurden Peptide mit isopenmarkierten Aminosäuren in diesem Labor synthetisiert. Diese kann man nun in einer bekannten Konzentration zu der Probe unbekannter Menge zufügen und diese dann auf der Ebene der PSMs und Intensitäten vergleichen. Hierbei handelte es sich nicht um Peptide mit einem absoluten Quantifikationsgrad (AQUA™). In Tabelle 3.44 ist aufgelistet, welche synthetischen Peptide durch eine Messung in einer Mischung von 1 und 5 pmol gefunden wurden.

Tabelle 3.44: Synthetische isotoopenmarkierte Peptide

HLA-Allel (Position)	Sequenz	Identifiziert
B*08 (31-38)	YFDT <u>A</u> MSR	Ja
19 HLA-A (60-68)	FSDA <u>A</u> SQR	Ja
B*07 (136-145)	GHDQY <u>A</u> YDGK	Ja
A*02/A*69 (122-132)	MYGCDV <u>G</u> SDWR	nein
A*11 (171-181)	WEAAH <u>A</u> EQQR	Ja
A*24 (171-181)	WEAAH <u>V</u> AEQQR	Ja
A*01/A*36 (170-180)	KWEAVH <u>A</u> EQR	Ja
A*03 (171-181)	WEAAH <u>E</u> AEQ <u>L</u> R	Ja
A*02/A*68/A*69 (156-168)	SWTAADMA <u>A</u> QTTK	Ja
A*68 (171-181)	WEAAH <u>V</u> AEQWR	Ja
B*18 (46-59)	FISVG <u>Y</u> VDGTQ <u>F</u> V <u>R</u>	Ja
A*30 (31-45)	YFSTS <u>V</u> SRPGSGEPR	Ja
21 A/35 B/14 C (244-258)	DGEDQTQDTEL <u>V</u> ETR	Ja
B*44 (211-226)	THVTHHPISDHE <u>V</u> TLR	Ja
A*02 (73-90)	<u>A</u> PWIEQEGPEYWDGETRK	Ja

Anmerkung: unterstrichene Buchstaben stellen eine isotoopenmarkierte Aminosäure dar.

Das Peptid MYGCDVGS³⁵DR ist aufgrund des Cysteins, welches unter oxidierenden Bedingungen Disulfidbrücken ausbilden kann, schwer herzustellen und aufzureinigen. Das Peptid in geringer Ausbeute wurde unter anderem mittels Modifikation und doppelten Messeinsatzes analysiert, konnte aber durch eine massenspektrometrische Analyse nicht identifiziert werden. In Abbildung 3.39 sind zwei Spektren des tryptischen Peptids DGEDQTQDTEL³⁵ETR im Vergleich gezeigt. Das obere Spektrum repräsentiert das natürliche, das untere das synthetisch hergestellte isotoopenmarkierte Peptid. Im Anhang unter dem Kapitel isotoopenmarkierte Peptide sind alle identifizierten Spektren der isotoopenmarkierten Peptide zu sehen. Dieses Peptid wurde ausgewählt, weil es nahezu alle HLA-Allotypen der Uniprot-Datenbank abdeckt. Somit ist dieses Peptid unabhängig von *unique* Fragmenten und kann für eine allgemeine Quantifizierung herangezogen werden.

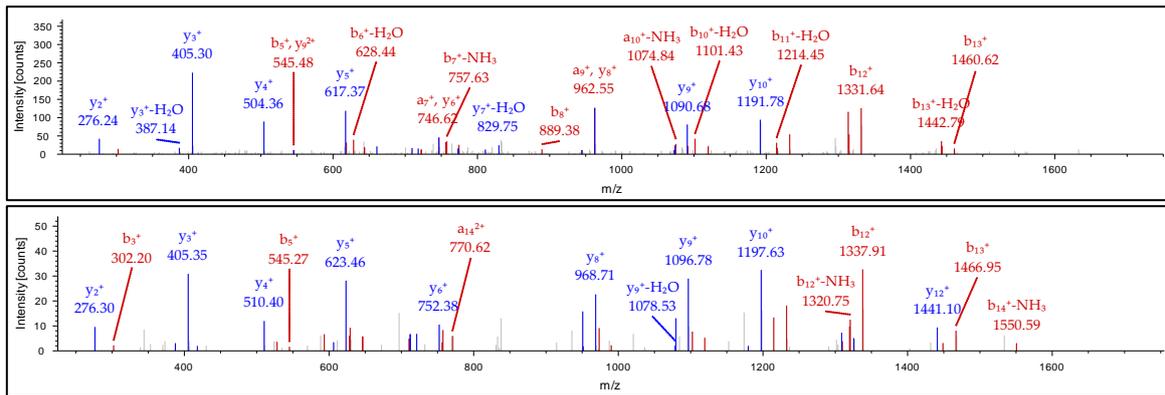


Abbildung 3.39: Spektrum der natürlichen und synthetischen Peptidsequenz DGEDQTQDTELVEPTR

Oben ist das natürliche Spektrum des tryptischen, in 21 HLA-A, 35 HLA-B und 14 HLA-C vorkommende Peptid DGEDQTQDTELVEPTR abgebildet. Der Ladungszustand ist zweifach geladen. Die protonierte monoisotopische Masse (MH^+) des Peptides entspricht oben 1735.76348 Dalton (Da) und unten 1741.77727 Da (Valin + 6 Da).

Synthetische Peptide lassen sich unterschiedlich gut ionisieren und erzeugen so trotz identischer Konzentration unterschiedliche Werte. Dies zeigt das Experiment, indem 1 pmol und 5 pmol je Peptid gemessen wurden und die Anzahl der PSM (MS2-Ebene) sowie die Fläche unter der Peptidkurve (Intensität, MS1-Ebene) nicht den gewünschten Korrelationsfaktor zeigten.

Tabelle 3.45: Vergleich der isotoptenmarkierten Peptide mit einem Messeinsatz von 1 pmol und 5 pmol

Sequence	1 pmol		5 pmol	
	# PSMs	Area	# PSMs	Area
YFD <u>T</u> A <u>M</u> SR	30	$1,13 \cdot 10^{12}$	11	$2,57 \cdot 10^{10}$
FDS <u>D</u> A <u>A</u> SQR	44	$2,25 \cdot 10^{12}$	43	$1,58 \cdot 10^{12}$
GHDQY <u>A</u> YDGK	22	$6,30 \cdot 10^{11}$	35	$4,66 \cdot 10^{11}$
WEAAH <u>A</u> AEQQR	39	$3,42 \cdot 10^{12}$	26	$9,82 \cdot 10^{11}$
WEAAH <u>V</u> AEQQR	30	$4,23 \cdot 10^{12}$	22	$1,41 \cdot 10^{12}$
KWEAVH <u>A</u> AEQR	27	$4,89 \cdot 10^{12}$	19	$6,49 \cdot 10^{11}$
WEAAH <u>E</u> AEQ <u>L</u> R	102	$1,13 \cdot 10^{13}$	51	$4,09 \cdot 10^{12}$
SWTAAD <u>M</u> A <u>A</u> QTTK	34	$1,48 \cdot 10^{12}$	1	$6,64 \cdot 10^9$
WEAAH <u>V</u> AEQ <u>W</u> R	77	$2,75 \cdot 10^{12}$	36	$2,99 \cdot 10^{11}$
FISVGYVDGTQ <u>F</u> <u>V</u> R	47	$2,24 \cdot 10^{11}$	89	$3,79 \cdot 10^{11}$
YFSTS <u>V</u> SRPGSGEPR	18	$4,08 \cdot 10^{12}$	8	$7,82 \cdot 10^9$
DGEDQTQDTEL <u>V</u> ETR	52	$1,85 \cdot 10^{12}$	45	$1,61 \cdot 10^{12}$
THVTHHPISDHE <u>V</u> TLR	72	$5,31 \cdot 10^{12}$	232	$1,06 \cdot 10^{12}$
<u>A</u> PWIEQEGPEYWDGETRK	22	$3,63 \cdot 10^{11}$	30	$3,02 \cdot 10^{11}$

Anmerkung: unterstrichene Buchstaben stellen eine isotoptenmarkierte Aminosäure dar.

Es wurde als nächster Schritt 1 pmol der synthetischen Peptidmischung in die Proben der enzymatischen Verdauung hineingemischt und nochmals massenspektrometrisch analysiert. Im Folgenden sind die Intensitäten und PSMs der natürlichen und der synthetischen Peptide im Vergleich dargestellt. Das natürliche Peptid FDSDAASQR, welches in 19 HLA-Allotypen also auch bei HLA-A*02:01 und HLA-A*23:01 vorkommt, wurde in den ursprünglichen Läufen beobachtet konnte aber nicht mehr zusammen mit dem synthetischen Peptid nachgewiesen

werden (in Tumor- und Normalgewebe). Längenvarianten waren zwar z.B. auch von dem Peptid DGEDQTQDTELVETR zu beobachten, aber nicht das Äquivalent zu dem synthetischen Peptid. Um dennoch die synthetischen mit den natürlichen Peptiden vergleichen zu können wurden die PSM- und Area-Werte der natürlichen Peptide aus den Analysen ohne Zugabe der synthetischen Peptide verwendet (dies gilt für alle Analysen).

Tabelle 3.46: Vergleich der synthetischen isotopenmarkierten Peptide in einem Verdau von KC58

Sequenz	KC58 Tumor				KC58 Benigne			
	Synpep		natürlich		Synpep		natürlich	
	#PSM	Area	#PSM	Area	#PSM	Area	#PSM	Area
YFDTAMSR	39	1,48 10 ¹²	/	/	29	1,45 10 ¹²	/	/
FSDAASQR¹	37	2,65 10¹²	3	1,91 10⁶	54	1,64 10¹²	3	2,16 10⁷
GHDQYAYDGK	24	6,73 10¹¹	/	/	17	4,35 10¹¹	/	/
WEAAHAAEQQR	44	2,87 10 ¹²	/	/	98	1,82 10 ¹²	/	/
WEAAHVAAEQQR	37	3,57 10 ¹²	/	/	59	2,47 10 ¹²	/	/
KWEAVHAAEQQR	37	4,08 10 ¹²	/	/	61	2,90 10 ¹²	/	/
WEAAHEAAEQLR	108	8,73 10 ¹²	/	/	54	6,25 10 ¹²	/	/
SWTAADMAAQTTK	38	2,07 10¹²	/	/	63	1,64 10¹²	/	/
WEAAHVAAEQWR	72	3,31 10 ¹²	/	/	46	2,06 10 ¹²	/	/
FISVGYYDGTQFVR	165	4,14 10 ¹²	/	/	94	3,11 10 ¹²	/	/
YFSTSVSRPGSGEPR	47	3,79 10 ¹²	/	/	26	2,31 10 ¹²	/	/
DGEDQTQDTELVETR	54	2,07 10¹²	/	/	28	1,32 10¹²	/	/
THVTHHPISDHEVTLR	85	5,18 10 ¹²	/	/	55	3,59 10 ¹²	/	/
APWIEQEGPEYWDGETRK	60	3,45 10¹²	/	/	24	2,87 10¹²	2	3,07 10⁷

1= hervorgehoben sind Peptide, die anhand der Typisierung nachweisbar sein müssten

Das natürliche Peptid FSDAASQR, welches in 19 HLA-Allotypen also auch bei HLA-A*02:01 und HLA-A*23:01 vorkommt, wurde in den ursprünglichen Läufen beobachtet konnte aber nicht mehr zusammen mit dem synthetischen Peptid nachgewiesen werden (in Tumor- und Normalgewebe). Längenvarianten waren zwar z.B. auch von dem Peptid DGEDQTQDTELVETR zu beobachten, aber nicht das Äquivalent zu dem synthetischen Peptid. Dies trifft auch auf das Peptid GHDQYAYDGK zu.

Im Vergleich der synthetischen Peptide in den zwei Läufen ist zu sehen, dass in der Analyse „KC58 Normalgewebe“ die Intensitäten immer unter denen der Tumor-Analyse liegen. Die PSM-Werte waren höher oder niedriger.

Wenn die Area-Werte der natürlichen Peptide mit denen der synthetischen verglichen werden wird deutlich, dass der Einsatz der synthetischen Peptide zu hoch lag (Faktor 10⁶ niedriger bei dem Peptid FSDAASQR in der Tumor-Analyse).

Tabelle 3.47: Vergleich der synthetischen isotopenmarkierten Peptide in einem Verdau von KC92

Sequenz	KC92 Tumor				KC92 Benigne			
	Synpep		natürlich		Synpep		natürlich	
	#PSM	Area	#PSM	Area	#PSM	Area	#PSM	Area
YFDTAMSR¹	30	2,43 10¹²	/	/	14	1,40 10¹²	/	/
FSDAASQR	62	2,93 10¹²	4	4,43 10⁶	37	1,37 10¹²	3	5,48 10⁷
GHDQYAYDGK	17	7,32 10 ¹¹	/	/	10	4,18 10 ¹¹	/	/
WEAAHAAEQQR	100	3,28 10 ¹²	/	/	57	1,69 10 ¹²	/	/
WEAAHVAAEQQR	59	3,99 10¹²	/	/	39	2,40 10¹²	/	/
KWEAVHAAEQR	59	4,81 10¹²	/	/	47	2,66 10¹²	/	/
WEAAHEAEQLR	61	1,10 10 ¹³	/	/	36	5,96 10 ¹²	/	/
SWTAADMAAQTTK	79	2,68 10 ¹²	/	/	46	1,69 10 ¹²	/	/
WEAAHVAAEQWR	62	3,67 10 ¹²	/	/	36	2,33 10 ¹²	/	/
FISVGYYVDGTQFVR	100	4,56 10 ¹²	/	/	40	2,62 10 ¹²	/	/
YFSTSVSRPGSGEPR	30	4,30 10 ¹²	/	/	17	2,42 10 ¹²	/	/
DGEDQTQDTELVETR	33	2,14 10¹²	/	/	19	1,36 10¹²	/	/
THVTHHPISDHEVTLR	68	5,60 10 ¹²	/	/	39	3,42 10 ¹²	/	/
APWIEQEGPEYWDGETRK	40	4,28 10 ¹²	/	/	14	2,50 10 ¹²	/	/

1= hervorgehoben sind Peptide, die anhand der Typisierung nachweisbar sein müssten

YFDTAMSR und DGEDQTQDTELVETR konnten nur als längere Varianten beobachtet werden. Das Peptid FSDAASQR konnte zwar auch nicht mehr zusammen mit dem synthetischen Peptid beobachtet werden, aber wurde in beiden Analysen (Tumor- und Normalgewebe) ohne die Zugabe der synthetischen Peptide gefunden. Auch hier liegen Area- und PSM-Wert der natürlichen Peptide weit unter denen der synthetischen Peptide.

Bei den synthetischen Peptiden ist deutlich, dass in dem „Normalgewebe“-Lauf der PSM-Wert, wie auch die Intensität geringer ist. Das natürliche Peptid KWEAVHAAEQR ist leider nur in der kürzeren Variante WEAVHAAEQR nachweisbar.

Tabelle 3.48: Vergleich der synthetischen isotopenmarkierten Peptide in einem Verdau von KC93

Sequenz	KC93 Tumor				KC93 Benigne			
	Synpep		natürlich		Synpep		natürlich	
	#PSM	Area	#PSM	Area	#PSM	Area	#PSM	Area
YFDTAMSR	23	1,50 10 ¹²	/	/	25	1,62 10 ¹²	/	/
FSDAASQR¹	53	2,15 10¹²	3	6,63 10⁷	53	2,13 10¹²	3	2,72 10⁷
GHDQYAYDGK	21	5,5210¹¹	/	/	14	5,3110¹¹	/	/
WEAAHAAEQQR	83	2,42 10 ¹²	/	/	97	2,45 10 ¹²	/	/
WEAAHVAAEQQR	52	3,07 10 ¹²	/	/	61	3,11 10 ¹²	/	/
KWEAVHAAEQQR	66	3,32 10 ¹²	/	/	67	3,66 10 ¹²	/	/
WEAAHEAEQLR	47	7,52 10¹²	1	4,15 10⁶	55	7,72 10¹²	1	2,36 10⁶
SWTAADMAAQTTK	54	1,92 10¹²	/	/	59	1,77 10¹²	/	/
WEAAHVAAEQWR	46	2,55 10 ¹²	/	/	45	2,59 10 ¹²	/	/
FISVGYYDGTQFVR	64	3,20 10 ¹²	/	/	82	3,30 10 ¹²	/	/
YFSTSVSRPGSGEPR	24	3,23 10 ¹²	/	/	27	3,08 10 ¹²	/	/
DGEDQTQDTELVETR	25	1,57 10¹²	/	/	33	1,59 10¹²	/	/
THVTHHPISDHEVTLR	67	3,95 10 ¹²	/	/	55	4,80 10 ¹²	/	/
APWIEQEGPEYWDGETRK	19	2,87 10¹²	/	/	23	3,05 10¹²	2	1,41 10⁷

1= hervorgehoben sind Peptide, die anhand der Typisierung nachweisbar sein müssten

Das Peptid APWIEQEGPEYWDGETRK ist als längere und kürzere Variante in der Tumor-Analyse vorhanden (IEQEGPEYWDGETRK, PWIEQEGPEYWDGETRK, APWIEQEGPEYWDGETRKVK, APWIEQEGPEYWDGETR). Dies trifft auch auf die Peptide GHDQYAYDGK und DGEDQTQDTELVETR bei beiden Gewebeanalysen zu.

Bei den „benignen“ Analysen waren PSM-Wert sowie Intensität bei einigen Peptiden höher als in den Tumor-Analysen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass das Hinzufügen von synthetischen isotopenmarkierten Peptiden in diesen hohen Konzentrationen dazu führt, dass die natürlichen überdeckt werden und nicht mehr nachweisbar sind. In weiteren Experimenten muss die Konzentration der isotopenmarkierten Peptide auf die erwartete Konzentration der natürlichen Peptide angepasst werden.

Folgend ist eine theoretische Überlegung der vorhandenen Menge an HLA-A*03-Molekülen in der Tumorprobe KC93 aufgeführt. Dieser theoretische Wert setzt sich aus mehreren Faktoren zusammen. Die Annahme ist, dass das Gewebestück (1,19 g) ca. 1 cm³ groß war. Wenn eine Zelle ein Würfel von ca. 10 µm³ wäre, würde 1 cm³ 10⁹ Zellen entsprechen. Für die Rechnung wird von 200000 HLA-Molekülen pro Zelle ausgegangen. Das wären für die Probe insgesamt 2x10¹⁴ HLA-Moleküle, was einem Gewicht von 15,3 µg entspricht bei einem Molekulargewicht von ca. 46 kDa. Da von 6 unterschiedlichen HLA-Allotypen ausgegangen (die gleichwertig exprimiert werden) wird, wären 2,5 µg HLA-A*03-Moleküle vorhanden. Bei

einem Einsatz von 10 µg der Probe für den Verdau wären das 0,22 µg HLA-A*03, da das Verhältnis von HLA-Molekülen zu der Proteinkonzentration insgesamt 13,5% beträgt (siehe Proteinkonzentration der Probe in Tabelle 3.32). Wenn man nun von einer theoretischen Ausbeute von 220 ng HLA-A*03-Molekülen ausgeht, wären dies selbst nach Verlust durch die Probenbehandlung genug Proteinanteil eines einzelnen Allels für einen enzymatischen Verdau. Natürlich wird der theoretische Wert in der Realität von vielen Parametern beeinflusst und kann deshalb nur als ungefähre Orientierung verwendet werden. Wichtige Parameter sind zum Beispiel die HLA-Expression auf der Zelle, die Zellzahl und die Reinheit der Probe.

.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde das HLA-Molekül in strukturellen und funktionellen Analysen verwendet. Dafür wurden Versuche auf molekularer wie zellulärer Ebene durchgeführt bei denen das HLA-Molekül eine zentrale Rolle spielt.

4.1 Künstliche T-Zellstimulation: Analyse und Optimierung

Die T-Zellstimulation *in vitro* dient der schnellen und vergleichbaren Überprüfung von natürlichen HLA-Liganden auf ihre Immunogenität. Dafür werden Peptide aus Tumorgewebe isoliert und identifiziert, künstlich synthetisiert und auf den passenden HLA-Allotyp gebunden. Nachdem das HLA-Monomer biotinyliert wurde, kann es auf eine künstliche Zelle zusammen mit kostimulierenden Antikörpern gegen CD28 gebunden werden. Mit diesen künstlichen Zellen werden naive CD8-positive T-Zellen stimuliert und aktiviert. Nach drei Stimulationsrunden werden die Antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen auf ihre Antigen-spezifität mittels HLA-Tetramerfärbung getestet.

4.1.1 MultiPro-Projekt

Das Kooperationsprojekt MultiPro umfasste die Suche und Analyse geeigneter Impfpptide für Prostatakrebspatienten mit einem biochemischen Rezidiv. Der Peptid-Cocktail sollte nicht nur auf eine HLA-Restriktion beschränkt sein, sondern die häufigsten Allele in der Bevölkerung abdecken, um so mit nur einem Peptid-Cocktail die größtmögliche Abdeckung in der Bevölkerung zu erreichen. Da bisher bei Peptidvakzinierungen kaum Nebenwirkungen dokumentiert wurden, sollten Peptide, die nicht zu der HLA-Typisierung eines Impfpatienten passen, keine negativen Auswirkungen haben. Ein großer Vorteil eines Cocktails dieser Art wäre, dass er für viele Patienten unterschiedlichster HLA-Typisierung zur Verfügung stehen würde (Rees, 2014). Zudem hat ein Cocktail mit mehreren Peptiden den Vorteil, dass viele Peptide unterschiedlichen Proteinursprungs es dem Tumor erschweren, durch Herunterregulation eines einzigen Antigens dem Immunsystem zu entkommen (Sampson et al., 2010). Ein weiterer wichtiger Punkt, warum mehrere Peptide in einem Vakzinierungscocktail sein sollten, ist, dass der klinische Nutzen wie das allgemeine Überleben steigt, wenn eine Vakzin-induzierte Antwort auf mindestens zwei Peptide nachgewiesen wird, im Vergleich zu den Patienten, die keine Antwort oder nur gegen ein Peptid eine Immunreaktion zeigen (Banchereau et al., 2001; Fay et al., 2006; Walter et al., 2012). Um eine Auswahl dieser Peptide zu treffen, ist ein Testverfahren auf die potenzielle

Immunogenität von Nöten, um sicher zu stellen, dass nur Peptide mit dem größten immunologischen Potenzial für den Cocktail verwendet werden. Das *in vitro priming* von CD8-positiven T-Zellen mit künstlichen APCs stellt eine Methode dar, mit der bei gleichbleibenden Bedingungen eine hohe Anzahl an Klasse I-Peptiden getestet werden kann. Die Identifikation und Auswahl der Peptide wurde von Christian Hotz getroffen (Hotz, 2014).

Insgesamt konnte bei sieben von 16 Peptiden eine Antigen-spezifische T-Zellpopulation beobachtet werden. Die Spender mussten mindestens ein Allel der Peptidrestriktion tragen. Sieben unterschiedliche Allotypen (HLA-A und -B) wurden getestet. Dass über 50% der Experimente keine Antigen-spezifische T-Zellpopulation aufweisen konnten, kann an unterschiedlichen Faktoren liegen. Viele der negativen Peptide wurden nur einmal getestet. Da es aber starke spenderabhängige und subtypische Unterschiede gibt, sollten mindestens fünf Versuche erbracht werden. Man könnte auch die Anzahl der *wells* die mit dem Antigen getestet werden in jedem Spender erhöhen. Somit wird die Wahrscheinlichkeit größer, dass eine spezifische naive Vorläuferzelle auf ihr passendes Antigen trifft. Dies würde aber mit einer Reduktion der Anzahl der möglichen Peptide, die man pro Spender testen kann, einhergehen. Da ein hoher Durchsatz bei diesem Projekt gefragt war, ist dies keine Alternative, vor allem wenn man bedenkt, dass mit einer Frequenz von $1/2 \cdot 10^5$ Zellen eine naive CD8-positive T-Zelle für das Antigen spezifisch ist (Blattman et al., 2002), ergibt das für einen Einsatz von $1 \cdot 10^6$ Zellen unter der Berücksichtigung, dass ein Drittel der T-Zellen CD8-positiv ist, ca. 2 spezifische T-Zellen in einem *well*. Natürlich ist es möglich, dass bei den negativ definierten Peptiden die Zahl der Gedächtniszellen unterhalb der Nachweisgrenze einer HLA-Tetramer-Analyse lag (0,1% von mindestens 150000 Zellen müssen positiv sein) oder der Hintergrund der Tetramer-Färbung zu hoch war (der positive Wert muss mindestens doppelt so hoch sein). Die Verwendung von niedrigeren Grenzen wurde für dieses Projekt nicht in Betracht gezogen. Bei diesem Projekt wurden auch von Kolleginnen, Stefanie Souczek und Janet Peper, Peptide getestet. Zudem konnten auch Peptide von Kooperationspartnern des MultiPro-Projektes getestet werden. Die Auswahl der Peptide, die Bestandteil des Cocktails sind, wurde in Diskussion aller Kooperationspartner gefällt und erfüllt die festgelegten Kriterien der Vielfältigkeit in HLA-Allelen sowie Antigenen. Der Cocktail beinhaltet derzeit 20 Peptide, die ihren Ursprung in verschiedenen Proteinen haben sowie von 11 verschiedenen HLA-Allotypen präsentiert werden.

Ein großer Nachteil der aAPC-T-Zellstimulationsmethode ist, dass bisher keine HLA Klasse II-Peptide verwendet werden können. HLA Klasse II-Ketten konnten hausintern noch nicht erfolgreich produziert werden. Hier könnten neue Stimulationsprotokolle die mit natürlichen APCs arbeiten erfolgsversprechend sein, besonders im Hinblick auf die verkürzte Stimulationszeit (Wolfl et al., 2014).

4.1.2 Optimierung

Ein künstliches System sollte so nah wie möglich an die Situation *in vivo* heranreichen ohne die Komplikationen der Komplexität und Schwierigkeiten der Vergleichbarkeit zu haben. Darum ist es von Vorteil, ein minimalistisches System wie das der aAPCs zu optimieren, um es näher an die Situation *in vivo* zu bringen ohne die Funktionalität und Vergleichbarkeit zu verlieren. Die Funktionalität in einer aAPC-T-Zellstimulation kann an verschiedenen Faktoren gemessen werden. Dabei spielen die Anzahl der positiv gemessenen Peptide, der *wells*, die Frequenz und Funktionalität der T-Zellen eine wichtige Rolle. Die Gewichtung dieser Beurteilung steht immer im Kontext zu dem was von dem durchgeführten Experiment erwartet und gewünscht ist. Natürlich wäre eine Verbesserung in allen Punkten erstrebenswert. Der Vergleich einer Optimierung ist immer der Standard, mit dem die Optimierung in Konkurrenz treten muss. Wichtig ist, nicht zu viele Faktoren auf einmal zu verändern, da sonst der Vorteil der einzelnen veränderten Faktoren nicht klar nachweisbar wird. In dieser Arbeit wurden verschiedene Optimierungen verwendet. Um allein die Aufreinigung der T-Zellen zu optimieren und in diesem Falle Materialkosten zu senken, wurde der MACS-Kit-Verbrauch bei gleichbleibender Ausbeute gesenkt. Gerade bei Hochdurchsatzexperimenten kann dies auf lange Sicht Einsparungen sichern. Des Weiteren wurde an zwei verschiedenen Ansätzen versucht das Experiment zu optimieren: mit der Verwendung eines zusätzlichen kostimulatorischen Antikörpers α OX40 und die Zugabe von verschiedenen Zytokinen (IL-7, IL-15 und IL-21) während der aAPC-Stimulation. Beide Strategien haben das Ziel, der Verwendung der künstlichen Zelle näher an das natürliche und erfolgreiche System *in vivo* zu bringen.

Die Verwendung des OX40-Antikörpers, welcher von Martin Hoffmann produziert und zur Verfügung gestellt wurde, zeigte variable Ergebnisse. Die Anzahl der positiven *wells* in den Peptiden konnte durch die zusätzliche Verwendung des Antikörpers nur Spender-abhängig erhöht werden. Wenn positive *wells* in einem Spender vorhanden waren konnte eine Erhöhung der Frequenz Antigen-spezifischer T-Zellen festgestellt werden. Dies liegt an der Erhöhung der Lebendzellzahl durch die Kostimulation des OX40-Antikörpers, wie Experiment J159 zeigt. Zellen die mit OX40-Antikörper behandelt wurden, konnten die erhöhten Temperaturen des Inkubators überleben. Dieser positive Stimulus des OX40-Antikörpers könnte für längere Zellkulturen eine Bereicherung sein (z.B. T-Zellklone für *killing assays* (Peper et al., 2014)).

Bei der Optimierung mit Zytokine konnte unter Verwendung von IL-7 kein Vorteil für die T-Zellstimulation beobachtet werden. Durch zusätzliche Verwendung von Interleukin 21 konnte bei drei von sieben Spendern eine höhere Anzahl positiver *wells* erreicht werden (bei zwei von sieben Spendern zeigten der Standard und die IL-21-Optimierung gleiche Werte und zweimal konnte der Standard höhere Werte als die IL-21-Optimierung erzielen). In 5/7

Spendern zeigte die IL-21-Optimierung den höchsten Frequenzwert innerhalb des Experiments. Interleukin 15 konnte bisher nur in einem Spender getestet werden. Dabei erreichte die IL-15-Optimierung nicht dieselbe Anzahl positiver *wells* im Vergleich zum Standard, konnte aber den höchsten Frequenzwert innerhalb des Experiments erreichen. Interessant wäre eine Kombination von IL-21 mit IL-15 in der T-Zellstimulation da den beiden Interleukinen ein synergistischer Effekt nachgewiesen wurde (Li et al., 2005; Zeng, Spolski et al., 2005). Zusätzlich zu der HLA-Tetramerfärbung wurden auch intrazelluläre Zytokinfärbungen durchgeführt um die Funktionalität der Zellen zu überprüfen. Die Optimierung mit IL-7 konnte bei keinem der Peptide höhere Werte erreichen im Vergleich zum Standard oder der Optimierung mit IL-21. Standard und IL-21-Optimierung zeigen bei Spenderzellen eine Peptid-abhängige Heterogenität der Ergebnisse. Bei den Werten für bispezifische T-Zellen konnte die Optimierung mit IL-21 höhere Werte als der Standard erzielen. Dies kann eine Rolle spielen im Hinblick darauf, dass eine höhere Frequenz von multifunktionalen Zellen mit einer besseren Immunantwort einhergeht (Forbes et al., 2008; Seder et al., 2008; Chen et al., 2014). Ein limitierender Faktor des ICS war, dass teilweise zu wenige lebende Zellen für die Analyse vorhanden waren. Eine Überlegung wäre für die Zellkultur für die Tage und Wochen nach der T-Zellstimulation den OX40-Antikörper mit einzubringen, um die Lebendzellzahl zu erhöhen. Die Kombination von neuen kostimulatorischen Antikörper und zusätzlichen Zytokinen in einer T-Zellstimulation wurde bisher nicht umgesetzt, da nicht zu viele Parameter auf einmal verändert werden sollten.

Ein weiterer Ansatzpunkt das Protokoll zu verbessern wäre die Verwendung eines zusätzlichen kostimulatorischen Antikörpers der bereits in der Vergangenheit positive Resultate erzielen konnte (Rudolf et al., 2008). Der Antikörper gegen den Rezeptor 4-1BB/CD137 könnte ein zusätzliches stimulierendes Signal für die Aktivierung der CD8-positiven T-Zellen liefern (Tan et al., 2000; Maus et al., 2002). Das Molekül wird auf aktivierten Lymphozyten exprimiert (Pollok et al., 1993) und der zugehörige Ligand auf professionellen APCs. Der Antikörper gegen 4-1BB soll in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Professor Jung produziert werden.

Im Laufe der Optimierungen wurden verschiedene Peptide aus dem Nierenzellkarzinom-Projekt (*renal cell carcinoma*, RCC) und des Ovarialkarzinom-Projekts (*ovarial carcinoma*, OvCa) verwendet. Insgesamt konnten 6/8 Peptide aus dem RCC-Projekt und 5/9 Peptide aus dem OvCa-Projekt eine HLA-Tetramer-positive T-Zellpopulation beobachtet werden.

Die Verfügbarkeit von Spenderzellen mit dem erforderlichen HLA-Status für die Experimente *in vitro* ist ein limitierender Faktor der T-Zellstimulation, besonders im Hinblick auf seltene HLA-Allele in der Bevölkerung. Um eine große Vielzahl an unterschiedlichen Spenderzellen jederzeit zur Verfügung zu haben, wäre ein wichtiger Punkt erfolgreiche T-Zellstimulationen mit eingefrorenen Zellen durchzuführen anstatt mit frischen Vollblutspenderzellen. Hierbei

könnte die Verwendung von weiteren kostimulatorischen Antikörpern und Zytokinen ein essentieller Faktor sein um die eingefrorenen Zellen optimal zu stimulieren. Die Erhöhung der ansonsten üblichen drei Stimulationsrunden könnte eine weitere Strategie darstellen, um die Antigen-spezifischen T-Zellen in ihrer Anzahl und Funktion zu erhöhen. Hierbei könnte es von Vorteil sein den OX40-Antikörper zu verwenden, um die Zellen während der längeren Kulturphase durch kostimulatorische Signale lebens- und funktionsfähig zu halten.

Allgemein ist zu sagen, dass die Spender- und Peptid-abhängige Variation von biologischen Proben es immer erschweren wird eine universelle Optimierung für die T-Zellstimulation *in vitro* zu finden. Die Auswahl an Optimierungsmöglichkeiten ist jedoch zahlreich und durch das einfach zu handhabende System der aAPCs erreichbar.

4.2 Analyse enzymatisch verdauter Proteine

Für die sogenannte *bottom-up* Proteomik werden mittels enzymatischen Verdau Proteine durch eine massenspektrometrische Analyse identifiziert. Hierbei kann je nach Fragestellung das Protokoll angepasst werden. In dieser Arbeit wird gezeigt wie Proteine, separiert aus einem Gel oder in komplexen Lösungen, als Fragmente massenspektrometrisch analysiert und identifiziert werden können. Dies zeigt, dass die Proteomik auch in der Immunologie eine wichtige Methode darstellt.

4.2.1 Alternative Strategie der HLA-Typisierung

Um zu den molekulargenetischen Methoden eine alternative HLA-Typisierungsstrategie zu etablieren, wurde eine Strategie entwickelt, die *bottom-up* Proteomik mit der Ligandomik verbindet. Für die proteomische Analyse wurden die aus Gewebeproben aufgereinigten HLA-Moleküle nach einem enzymatischen Verdau mittels einer massenspektrometrischen Analyse identifiziert. Anschließend wurden die Daten aus dem Massenspektrometer mit einer humanen Protein-Datenbank prozessiert, um dem Gewebe den zugehörigen HLA-Allotyp zuzuordnen. Bei der Ligandomik wird der Fokus auf die natürlich präsentierten HLA-Liganden gerichtet. Durch die Peptidmotiv-abhängige HLA-Präsentation spiegeln die Liganden den HLA-Allotyp der Zellen wider. Zudem werden manchmal Teile der HLA-Moleküle selbst präsentiert. All diese Informationen sollen durch Kombination zu einer erfolgreichen HLA-Typisierung führen.

Da das HLA-Protein hoch polymorph, aber in manchen Bereichen stark konserviert ist, wurden anfängliche *in silico*-Überlegungen vorgenommen um zu überprüfen welche Peptide durch einen enzymatischen Verdau zu erwarten sind. Manche dieser Peptide sind *unique* für einen gewissen HLA-Allotyp oder für eine Gruppe (*hint* und *shared*). Um diese Daten zu überprüfen wurden Einzelproteinlösungen dieser Allotypen (HLA-Monomere) verdaut und unter verschiedensten Prozessierungsmethoden analysiert. Hier zeigte sich schon eine Abweichung der theoretisch erwarteten von den experimentell nachgewiesenen Peptiden. Dies lag nicht nur an Sequenzunterschieden, bedingt durch die künstliche Herstellung der HLA-Moleküle, sondern auch daran, dass manche theoretische Fragmente nie experimentell nachgewiesen werden konnten. Eine mögliche Erklärung wäre, dass das Protein nicht vollständig zugänglich für das Enzym war, was eine Veränderung des Protokolls zu stärkeren denaturierenden Bedingungen nach sich führen müsste. Ein weiterer Erklärungsansatz wäre, dass die Peptide unterschiedlich ionisiert werden oder eine unterschiedliche Stabilität aufweisen, was zur Folge hätte, dass einige Peptide auch in Zukunft nicht mit dem Massenspektrometer nachzuweisen wären. Hinzu kommt eine Abweichung der Fragmentausbeute schon innerhalb zweier Verdau mit identischer

Proteinausgangsmenge. Dies kann auf einer falschen Proteinbestimmung der Protein-Stammlösung basieren sowie in der Methodik des Verdaus selber liegen. Die natürliche Abweichung von massenspektrometrischen Messungen muss auch mit einbezogen werden. Die Komplexität einer Probe steigt stark an, wenn eine HLA-Isolation mit Zellen oder Gewebe durchgeführt wird. Bei der Isolation werden zwar HLA-spezifische Antikörper verwendet, diese können aber ein unspezifisches Auftreten von Proteinen in dem Retentat nicht verhindern. Die alternative Typisierungsstrategie wurde in einem ersten Schritt an einer homozygoten Zelllinie getestet. In diesem Fall konnte mit der alternativen Typisierungsstrategie eine komplette Identifikation der Allotypen erreicht werden.

Bei den Gewebeproben ist rein theoretisch die Anzahl der zu identifizierenden HLA-Allotypen verdoppelt, da von einer Heterozygotie im HLA-Genlocus ausgegangen wird. Zusätzlich ist die Verunreinigung der Probe durch andere Proteine nachweislich höher. Die Verunreinigung durch andere Proteine bewegte sich zwischen 85% zu 90% (dies spiegelt auch der theoretisch berechnete Wert des HLA-Molekülanteils in 3.3.6 wider). Dabei war zwischen den tryptischen und chymotryptischen Analysen kein großer Unterschied erkennbar. Dies zeigt, dass es sich hierbei um keinen Zusammenhang auf Enzym:Protein-Ebene handelt. Unterschiede zwischen den Läufen von Tumor- und Normalgewebe ist durch unterschiedliche Konzentrationswerte der HLA-Moleküle zu erklären. Zwar wurden die Proben in ihrer Proteinkonzentration bestimmt, dieser Wert gibt aber keine Aussage über die genaue Konzentration der HLA-Moleküle. Trotz der hohen Komplexität der Probe konnten in allen Analysen Peptide aus HLA-Molekülen experimentell nachgewiesen werden.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Veränderung der Ergebnisse durch verschiedene Prozessierungsparameter. Ohne enzymatische Schnittstellen erhält man eine höhere Ausbeute an HLA-Peptiden, die für eine Typisierung durchaus von Vorteil ist. Dieser Filter erhöht aber genauso die Anzahl der Peptide, die nicht mit HLA-Molekülen assoziiert sind. Das Absinken der PSM-Mittelwerte zeigt, dass die Peptide weniger oft für ein MS2-Spektrum analysiert wurden. Der Filter mit zwei verpassten Schnittstellen könnte einen Kompromiss zwischen dem mit und dem ohne verpasste Schnittstellen darstellen. Der Vorteil bei der Prozessierung mit enzymatischen Schnittstellen liegt darin, dass durch die Falsch-Positiv-Rate enzymatische Peptide besser bewertet werden. Die enzymatischen Schnittstellen führen aber auch zu falschen *unique* Peptiden durch die falsche Zuordnung der Peptide zu ihren Proteinen. Eine Prozessierung mit beiden Filterkriterien wäre für eine Analyse optimal. Die Peptidmotiv-Analyse der natürlich präsentierten HLA-Liganden erwies sich als sehr erfolgreich. Zu beachten ist, dass bei SYFPEITHI für Liganden des HLA-B*07:02 eine Zuordnung auch auf B*35 vorhanden ist. Bei NetMHC ist eine falsche Subtyp-Zuordnung des HLA-A*02:01 vorhanden. Ein Problem der Ligandomat-Analyse sind die bisher noch nicht eingeschlossenen HLA-C-Allotypen und dass manche HLA-Allotypen ähnliche Peptidmotive bevorzugen, sogenannte Superfamilien (z.B. KC93-Analyse; HLA-A*03 wird zu HLA-A*11

geordnet) (Sidney et al., 2008). Die Analyse der HLA-präsentierten HLA-Peptide war vor allem auf Klasse II aus JY-Pellets sehr erfolgreich. In der Gewebeprobe waren sehr wenige HLA-Peptide zu beobachten. Dies kann zum einen an der Komplexität einer natürlichen Probe sowie an der Verdopplung der Allotypen liegen (Verringerung der Chance, dass HLA-Peptide auf HLA-Molekülen präsentiert werden). Zudem wird in kolorektalen Gewebezellen eine nicht so hohe HLA-Proteinexpression erwartet wie in einer JY-Zellkultur. Die anwendungsspezifische Datenbank war bei der homozygoten Zelllinie mit zwei von drei richtig identifizierten Subtypen sehr hilfreich. Bei komplexen Proben mit einer höheren Anzahl an Allotypen ist das Problem, dass sich mehrere Allotypen konservierte Sequenzabschnitte teilen. Somit sind sie sich zu ähnlich und ergeben so keine klaren Ergebnisse in den Proteinlisten. Eine Überlegung wäre die Anzahl der HLA-Subtypen in der Datenbank zu reduzieren indem man seltene Allele mit einer sehr niedrigen Frequenz ausschließt. Somit würde man die Chance erhöhen den richtigen Allotyp zu identifizieren.

Bei den exemplarisch ausgewählten Proben, die mit der alternativen Typisierungsstrategie analysiert wurden, ergaben sich einige Schwierigkeiten. Bei der Probe KC58 war die Problematik, dass eine Homozygotie im B-Lokus vorhanden ist. Leider wurde aber neben den richtig typisierten Allotypen noch zusätzlich ein Peptid aus HLA-B*44 gefunden. Diese Kontamination wurde nicht nur auf Proteom- sondern auch auf Ligandom-Ebene gefunden. Dieses Beispiel zeigt, dass die Proteomik eine wichtige Technik ist um Unklarheiten die in der Liganden-Analyse auftreten zu klären. Somit können sich beide Methoden, die Proteomik und die Ligandomik, ergänzen. Bei der Analyse von KC58 war ein starker Unterschied zwischen Tumor- und Normal-Gewebe erkennbar. Dies kann durch Herunterregulierung der HLA-Moleküle auf den Zellen oder durch einen Fehler in der Methodik erklärt werden. Letzteres würde auch die Kontaminante erklären. Bei KC92 wurden alle Allotypen identifiziert, wobei HLA-B*35 nur über Ligandomanalyse eindeutig zugeordnet wurde. KC93 wurde bis auf ein HLA-C, welches nur eingegrenzt werden konnte (HLA-C*12/C14), vollständig typisiert. Allgemein ist zu sagen, dass sich die beiden Enzyme Trypsin und Chymotrypsin sehr gut gegenseitig ergänzen, da manche Allotypen sich für einige enzymatische Schnitte besser eignen als andere (HLA-B*07 für Trypsin (siehe KC58) und HLA-C*07 für Chymotrypsin (siehe KC92)).

Die große Schwierigkeit bei der Allotyp-Zuordnung besteht darin, dass sich verschiedene HLA-Moleküle untereinander manchmal in nur einem kleinen Teil des Proteins unterscheiden. Somit stehen nicht viele Fragmente zu Verfügung für eine eindeutige HLA-Typisierung. Daraus ergeben sich Überlegungen, wie man die Anzahl der Fragmente erhöhen oder die schon vorhandenen Fragmente in der Analyse noch besser nachweisen kann. Dabei würde eine reine Erhöhung der Peptidanzahl wie bei Chymotrypsin keinen entscheidenden Vorteil bringen, da die *unique*- oder *hint*-Fragmente identifiziert werden müssen. Der konstante Probeneinsatz ist eine große Herausforderung und Problematik bei

der Verwendung von HLA-Retentaten. Im Grunde müsste in den Geweben genug Material vorhanden sein (siehe 3.3.6 sowie Rabsteyn, 2011). Da die Nachweisgrenze des Massenspektrometers im Femtomol-Bereich liegt, sollte bei einer Gewebeprobe, selbst unter Berücksichtigung von Verlusten, genug Ausgangsmaterial für einen Verdau vorliegen. Die Werte aus der photometrischen Messung sind nicht die exakten HLA-Proteinwerte wegen vieler Verunreinigungen wie Proteine (sichtbar in der Analyse mit über 90% nicht HLA-assoziierten Proteinen) und Sepharose (gelartige Konsistenz der Probe). Die genaue Kalkulation der Einsatzmenge der Gewebeproben ist deshalb so gut wie unmöglich und sollte deswegen nur als ein Anhaltspunkt gesehen werden, um einen relativ gleichen Einsatz in den Verdau zu garantieren. Wenn zu wenige HLA-Proteine in einem Verdau vorhanden sein sollten, muss der Verdau mit einer höheren Konzentration wiederholt werden.

Insgesamt wurden durch die enzymatischen Verdau für die Klasse I-Moleküle 88 *unique* HLA-A-Peptide, 59 HLA-B- und 39 HLA-C-Peptide identifiziert. Für die HLA-B-Moleküle wurden weniger *unique* Peptide gefunden, da diese untereinander in ihrer Sequenz konservierter sind (z.B. HLA-B*67 mit B*39 nahezu 99%). Für HLA-C wurden allgemein weniger Peptide beobachtet, was an einer geringeren Expression oder einer schlechteren Aufreinigung durch den W6/32-Antikörper liegen kann. Für die nicht klassischen HLA-Moleküle wurden 104 Peptide identifiziert. Insgesamt wurden 119 HLA Klasse II-Peptide für DRB- und DQ-Proteine gefunden.

Diese Peptide können auch für eine Quantifizierung der HLA-Proteine verwendet werden. Dafür werden die HLA-Fragmente synthetisch mit einer isopenmarkierten Aminosäure hergestellt. 15 Peptide wurden produziert und massenspektrometrisch analysiert. Das Peptid MYGCDVGSWDR konnte nicht durch eine massenspektrometrische Analyse gefunden werden. Bei den Probemessungen wurde sichtbar, dass die einzelnen synthetischen Peptide unterschiedlich gut identifiziert werden können (bei gleichem Einsatz an Peptiden unterschiedliche Intensitäten und PSM-Werte) und die Signalstärke nicht mit ihrer Konzentration korreliert (1 pmol zu 5 pmol teilweise eine Reduktion der PSM- und Intensitätswerte). Somit wird eine genaue Quantifizierung nicht realisierbar sein. Zudem wurden keine „AQUA-free“ Peptide verwendet, wodurch die pmol-Werte der Probeneinsätze nicht korrekt waren. In den analysierten Verdau konnten alle synthetischen, aber nicht mehr die natürlichen HLA-Peptide identifiziert werden. Dies kann an der Signal-Überlagerung durch die isopenmarkierten Peptide liegen. Einige natürliche HLA-Peptide konnten in vielen Längenvarianten nur nicht in der gesuchten gefunden werden. Die Intensitäts- und PSM-Werte der synthetischen Peptide variierten in den Läufen und im Vergleich der Tumor- und Normalgewebs-Analysen. Eine Optimierung hier wäre die Verringerung des Einsatzes an synthetischen Peptiden und die Verlängerung der Verdauzeit, so dass kürzere Varianten der Peptidsequenzen entstehen.

Die alternative Typisierungsstrategie ist theoretisch auch für HLA Klasse II möglich, wobei hierfür noch keine Ligandomat-Daten sowie anwendungsspezifische Datenbanken vorliegen. Zukünftige Investigationen wären hierbei sinnvoll gerade im Hinblick auf die wachsende anerkannte Rolle von HLA Klasse II-Molekülen bei Autoimmunkrankheiten. Das sich in der Entwicklung befindende bioinformatische Programm könnte auch hierbei eine Vereinfachung bringen. Dabei wird ein Algorithmus umgeschrieben, der ursprünglich *next generation sequencing*-Daten für eine HLA-Typisierung verwendet (Szolek et al., 2014). Die Idee dieses Algorithmus stammt von András Szolek, der auch das Umschreiben des Algorithmus für die Verwendung von MS-Daten vornimmt.

Zusammenfassung der Arbeit

Das HLA-Molekül als Schlüsselmolekül im Immunsystem spielt eine wichtige Rolle in der Unterscheidung in Selbst und Fremd sowie in der Initiierung des adaptiven Immunsystems gegen maligne Transformationen von körpereigenen Zellen. Die hohe Variabilität dieses Proteins macht es nicht nur für die Forschung und Transplantationsmedizin interessant, sondern spielt seit einiger Zeit auch in der individuellen Krebstherapie eine wichtige Rolle.

Die Auswahl der Peptide für eine Peptid-basierten Immuntherapie kann anhand ihres Potenzials zytotoxische CD8⁺ T-Zellen *in vitro* zu induzieren getroffen werden. Um die Peptide *in vitro* zu testen werden künstliche Zellen mit HLA:Peptid-Komplexen sowie kostimulatorischen Antikörpern (α CD28) beladen, um mittels zusätzlicher Zytokine (IL-2 und IL-12) Antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen zu generieren. Innerhalb dieser Analysen konnten für das MultiPro-Projekt sieben potentiell immunogene Peptide identifiziert werden. Aus diesen Peptiden wurden Kandidaten anhand ihrer unterschiedlichen HLA-Restriktion und Antigenherkunft ausgewählt, um Teil eines Peptid-Cocktails für Prostatakrebspatienten mit biochemischem Rezidiv zu werden. Um die Anzahl immunogener Peptide zu erhöhen wurden Optimierungen auf kostimulatorischer Ebene mithilfe weiterer Antikörper (OX40) und Zytokine (IL-7, IL-15, IL-21) durchgeführt. Dadurch konnte eine Erhöhung der Lebendzellzahl (OX40) oder Steigerung der intrazellulären Funktion (IL-21) erreicht werden.

Die HLA-Typisierung ist nicht nur für Gewebe-oder Zelltransplantationen wichtig, sondern auch im Zusammenhang mit der Peptid-basierten Immuntherapie, da die Allotyp-abhängige Peptidpräsentation für die meisten Tumore und somit Patienten individuell ist. Eine alternative Typisierungsstrategie wurde entwickelt um unabhängig von der molekulargenetischen Typisierung zu werden. Diese Strategie setzt sich anhand der hohen Komplexität der Proben (hoch polymorphe HLA-Genloci und Verunreinigungen) aus einer Kombination der Proteomik wie auch Ligandomik zusammen. Durch die 186 identifizierten enzymatischen HLA Klasse I-Fragmente ist es möglich eine alternative Typisierung auf Proteom-Ebene vorzunehmen. Hierüber besteht zudem die Möglichkeit eine relative Quantifizierung mit isotope-markierten Peptiden zu erhalten. Dies kann Aufschluss über Unterschiede der HLA-Moleküle auf Tumorzellen im Vergleich zu gesundem Gewebe geben, aber auch Korrelationen der HLA-Liganden-Ausbeute deutlich machen. Dafür wurden 15 isotope-markierte Peptide hergestellt, wovon 14 erfolgreich identifiziert und für einen ersten Versuch der Quantifizierung verwendet werden konnten. Um diese Strategie noch effizienter zu machen, wird in Kooperation mit der Bioinformatik ein Algorithmus entwickelt, der die Auswertung und Handhabung optimieren wird.

Summary

HLA molecules play a key role in the immune system discriminating self from nonself and induce adoptive immune responses against malignant transformation of cells of the human body. For the reason that these molecules are highly polymorphic the interest is not only based on transplantation. Additionally they play an important role in individualized cancer therapy. During this thesis structural and functional aspects of HLA molecules were on focus to raise the understanding and usage for a higher benefit.

For the development of peptide-based immunotherapies naturally presented peptides should be able to induce tumor-directed immune responses *in vivo*, especially by CD8⁺ T cells that have a key role in inducing death of tumor cells. The induction of immune responses is correlated with a benefit in overall survival of patients with cancer. Usage of artificial antigen presenting cells loaded with defined amounts of recombinant HLA:peptide molecules and costimulatory antibodies (α CD28) allows a high throughput *in vitro* priming of antigen specific T cells. This system was used to find seven new candidate peptides for a multi peptide cocktail for prostate cancer patient with biochemical relapse (MultiPro-Project). Additionally I started to optimize this artificial system with costimulatory antibodies (OX40) and other cytokines (IL-7, IL-15 and IL-21) to raise the frequency of immunogenic peptides. I could increase the number of viable cells during cell culture (OX40) and boost the cytokine production (IL-21). During these optimization steps I could further find six RCC and six OvCa candidate peptides for a cocktail.

The structure of the HLA molecule is also important for immunotherapy. The presentation of natural HLA ligands is based on the HLA type and thereby essential for peptide based immunotherapy. It is necessary to know the HLA status of the samples to choose only naturally presented peptides. We developed an alternative typing method independent of genomic data sets. For the alternative typing we used a combination of bottom-up proteomics and ligandomics. An alternative typing was possible based on 186 enzymatic peptides unique for HLA class I allotypes. Additionally a relative quantification of digested HLA molecules should be reachable through isotope labeled synthetic peptides. In cooperation with bioinformaticians a new algorithm for the evaluation of data sets will increase the efficiency of this method.

Publikationen

Wild, J., B. J. Schmiedel, A. Maurer, S. Raab, **L. Prokop**, S. Stevanovic, D. Dorfel, P. Schneider and H. R. Salih (2015). "Neutralization of (NK-cell-derived) B-cell activating factor by Belimumab restores sensitivity of chronic lymphoid leukemia cells to direct and Rituximab-induced NK lysis." Leukemia **29**(8): 1676-1683.

Steinl, C., M. Essl, T. D. Schreiber, K. Geiger, **L. Prokop**, S. Stevanović, O. Potz, H. Abele, J. T. Wessels, W. K. Aicher and G. Klein (2013). "Release of matrix metalloproteinase-8 during physiological trafficking and induced mobilization of human hematopoietic stem cells." Stem Cells Dev **22**(9): 1307-1318.

N. Mirza; **L. Prokop**; D. Kowalewski; C. Gouttefangeas; C. Faul; W. A. Bethge; W. Vogel; L. Kanz; H.-G. Rammensee; S. P. Haen. "Soluble heat shock protein 70 members in patients undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation" J Inflamm (*submitted manuscript*).

Danksagung

Ich danke...

...Stefan für schöne sowie lehrreiche Jahre in seiner Arbeitsgruppe. Gute Chefs sind schwer zu finden...

... Hans-Georg dafür, dass er Kopf und Herz dieses Institutes ist.

... Franziska, Salman, Beate und Claudia, ohne sie ist ein normaler Laborbetrieb undenkbar.

...Patricia, Nicole und Katharina für Peptide, Hilfe und Freundlichkeit wann immer man sie brauchte.

...Lynne für ihre gute Organisation und Allem was darüber hinausgeht.

...Jürgen dafür, dass er geduldig und konsequent den IRTG geleitet und organisiert hat.

...Markus für unbezahlten ärztlichen Rat und Laborone.

...Martin und Fabi für die zur Verfügung gestellten Antikörper.

...Nico für seine aufbauende Worte und Trautweinsche Einstellung zu jeder Zeit.

...Daniel für sein Genie, sehr viele Messungen und das Verständnis was Jogginghosen wirklich sind.

...Heiko für Geduld und Wissen („nicht verzagen, Heiko fragen“)

...Janet für Hilfe und Unterstützung, nicht nur im Laboralltag.

...Stefanie für die enge und mehr als gute Zusammenarbeit während des MutiPro-Projekts und anderen Späßen.

...Chris für den Zusammenhalt und die Zusammenarbeit während des MultiPro-Projekts und allen Projekten außerhalb der Arbeit.

...Monika für die gemeinsamen Jahre als Nebensitzerin. Musik, Gespräche und natürlich harte Arbeit: Merce fia de subba zeid.

...meiner langjährigen und lieb gewonnenen WG-Mitbewohner/innen Fabian, Hille, und Martin. Auf lustige und gesellige Zeiten.

...meinen Freunden Bettina, Christine, Germano, Nadja und Tobias. Ihr seid unbezahlbar und einmalig. Ohne euch wäre das Leben nur halb so schön.

...Armin für seine in sich selbst ruhende Art, Freundschaft, Geduld, seinen Beistand und seine Liebe.

...meiner Familie für ihre Unterstützung, ihr Vertrauen und ihre Liebe.

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
aAPC	<i>Artificial antigen presenting cell</i> , künstliche Antigen-präsentierende Zelle
AK	Antikörper
APC	<i>Antigen presenting cell</i> , Antigen-präsentierende Zelle
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDR	<i>Complementary determinig region</i> , komplementaritätsbestimmende Region
CID	<i>Collision induced dissociation</i>
CRM	<i>Charged residue model</i>
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt, <i>Cytotoxic T lymphocyte</i>
Da	Dalton, atomare Masseneinheit (1 Da = 1 u = 1.660 538 921 x 10 ⁻²⁷ kg)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMF	Dimethylformamid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	<i>Electrospray Ionisation</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
FSC	<i>Forward scatter</i>
HCl	Salzsäure
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
IL-12	Humanes Interleukin 12
IL-2	Humanes Interleukin 2
IL-7	Humanes Interleukin 7

HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> , humanes Leukozytenantigen
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> , hochauflösende Flüssigkeitschromatographie
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
LC-MS	<i>Liquid chromatography mass spectrometry</i>
LCL	Humane B-Zelllinie lymphoblastoiden Ursprungs
LTQ	<i>Linear trap quadrupol</i>
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i> , magnetisch aktivierte Zellsortierung
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
Min	Minute
ml	Milliliter
NK	Natürliche Killerzelle
OvCa	<i>Ovarian carcinoma</i> , Ovariales Karzinom
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i> , mononukleäre Zelle des peripheren Blutes
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PE	R-Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cyanin-Proteinkomplex
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Proteinkomplex
PSM	<i>Peptide spectrum match</i>
RCC	<i>Renal cell carcinoma</i> , Nierenzellkarzinom
rpm	<i>Revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SSC	<i>Side scatter</i>
TAP	<i>Transporter associated with antigen processing</i>
TCR	T-Zellrezeptor
TFA	Trifluoressigsäure
T _H	T-Helferzelle
T _{reg}	Regulatorische T-Zelle

Anhang

MultiPro-Projekt

Tabelle 0.1: Getestete Peptide des MultiPro-Projektes in allen Kooperations-Zentren

HLA	Gen-symbol	Sequenz	positiv getestete Spender / Spender getestet					Summe
			Tübingen/ Rammensee	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	YTDRVMTV	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	RVPGVAPTL				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 / 4
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

Tabelle 0.2: Vakzinierungscocktail MultiPro-Projekt

HLA	Sequenz	Gensymbol
A*01	YSEKIVDMY	MYH11
A*02	ALFDIESKV	FOLH1
A*02	CLAAGITYV	SLC45A3
A*02	GLMKYIGEV	TRPP8
A*02	RMLPHAPGV	HDAC
A*03	KISLPTQLFK	IGF1
A*11	GTQPWFISK	MYLK
A*24	EYSKQMQRF	HDAC1
A*24	VYNENLVHMI	BCAS
A*68	ETSFVPSRR	MYH11
B*07	APGIRDHESL	HDGF
B*07	HPEYNRPLL	KLK4
B*07	RPKLSSPAL	EP300
B*15	GQRVPVSHSF	KLK2
B*15	GQVFQVSHSF	KLK3
B*40	GEEKEAATL	HDGF
B*44	EEFLTPKKL	KLK3
B*51	VPLIQSRI	KLK2
DR	NYTLRVDCTPLMYSL	FOLH1
DR	TLGEFLKDRERAKN	BIRC5

Tabelle 0.3: Kontrollpeptide MultiPro-Projekt

HLA	Sequenz	Gensymbol
A*01	YSEHPTFTSQY	HCMV pp65
A*02	FLPSDFFPSV	HBV Capsid protein cAg
A*03	RLRAEAQVK	EBV EBNA3
B*07	TPRVTTGGAM	HCMV pp65

HLA-Typisierung von Zell- oder Tumorgewebe

HLA-Verdau *in silico*

Die Farben der Tabellenzeilen beinhalten folgende Bedeutung:

Rot = *unique* (1 Allel), **Gelb** = *hint* (2-3 Allele), **Blau** = *shared* (4-10 Allele).

Tabelle 0.4: Tryptischer *in silico*-Verdau von HLA-B*07:02 im Vergleich mit 0 MC und 1 MC

#MC	Peptid-Sequenz	AS-Position	#MC	Peptid-Sequenz	AS-Position
0	MLVMAPR	1-7	1	YFYTSVSRPGRGEPGR	31-45
0	TVLLLLSAALALTETWAGSH SMR	8-30	1	GEPRFISVGYVDDTQFVGR	42-59
0	YFYTSVSRPGR	31-41	1	FISVGYVDDTQFVGRFSDAASPR	46-68
0	FISVGYVDDTQFVGR	46-59	1	FSDAASPREEPR	60-72
0	FSDAASPR	60-68	1	EEPRAPWIEQEGPEYWDR	69-86
0	EEPR	69-72	1	APWIEQEGPEYWDRNTQIYK	73-92
0	APWIEQEGPEYWDR	73-86	1	NTQIYKAAQTDR	87-99
0	NTQIYK	87-92	1	AQAQTDRESLR	93-103
0	AQAQTDRESLR	93-99	1	ESLRNLR	100-106
0	ESLR	100-103	1	LLRGHDQYAYDGK	133-145
0	GYYNQSEAGSHTLQSMYGC VGPDR	107-132	1	GHDQYAYDGKDYIALNEDLR	136-155
0	GHDQYAYDGK	136-145	1	DYIALNEDLRSWTAADTAAQ ITQR	146-169
0	DYIALNEDLR	146-155	1	SWTAADTAAQITQRK	156-170
0	SWTAADTAAQITQR	156-169	1	KWEAAR	170-175
0	WEAAR	171-175	1	WEAAREAEQR	171-180
0	EAEQR	176-180	1	EAEQRR	176-181
0	AYLEGECEVWLR	182-193	1	RAYLEGECEVWLR	181-193
0	YLENGK	195-200	1	AYLEGECEVWLR	182-194
0	ADPPK	206-210	1	RYLENGK	194-200
0	THVTHHPISDHEATLR	211-226	1	YLENGKDK	195-202
0	CWALGFYPAEITLTWQR	227-243	1	DKLER	201-205
0	DGEDQTQDTELVEVTRPAGDR	244-263	1	LERADPPK	203-210
0	TFQK	264-267	1	ADPPKTHVTHHPISDHEATLR	206-226
0	WAAVVVPSGEEQR	268-280	1	DGEDQTQDTELVEVTRPAGDR TFQK	244-267
0	YTCHVQHEGLPKPLTLR	281-297	1	TFQKWAAVVVPSGEEQR	264-280
0	GGSYSQAACSDSAQSDVSL TA	341-362	1	KSSGGK	335-340
			1	SSGGKGGSYSQAACSDSAQ SDVSLTA	336-362

Tabelle 0.5: Chymotryptischer *in silico*-Verdau von HLA-B*07:02 im Vergleich mit 0 MC und 1 MC

#MC	Peptid-Sequenz	AS-Position	#MC	Peptid-Sequenz	AS-Position
0	MLVMAPRTVLLLLSAALALT ETW	1-23	1	AGSHSMRYF	24-32
0	AGSHSMRY	24-31	1	YTSVSRPGRGEPFR	33-46
0	TSVSRPGRGEPFR	34-46	1	TSVSRPGRGEPFRFISVGY	34-51
0	ISVGY	47-51	1	ISVGYVDDTQF	47-57
0	VDDTQF	52-57	1	VDDTQFVRF	52-60
0	DSDAASPREEPRAPW	61-75	1	VRFDSDAASPREEPRAPW	58-75
0	IEQEGPEY	76-83	1	DSDAASPREEPRAPWIEQEG PEY	61-83
0	DRNTQIY	85-91	1	IEQEGPEYW	76-84
0	KAQAQTDRESLRNLRGY	92-108	1	WDRNTQIY	84-91
0	NQSEAGSHTLQSMY	110-123	1	DRNTQIYKAQAQTDRESLRN LRGY	85-108
0	GCDVGPDRLLRGHDQY	124-140	1	KAQAQTDRESLRNLRGY	92-109
0	DGKDY	143-147	1	YNQSEAGSHTLQSMY	109-123
0	IALNEDLRSW	148-157	1	GCDVGPDRLLRGHDQYAY	124-142
0	TAADTAAQITQRKW	158-171	1	AYDGKDY	141-147
0	EAAREAEQRRAY	172-183	1	DGKDYIALNEDLRSW	143-157
0	LEGECVEW	184-191	1	IALNEDLRSWTAADTAAQIT QRKW	148-171
0	LRRY	192-195	1	TAADTAAQITQRKWEAAREA EQRRAY	158-183
0	YPAEITLW	233-241	1	EAAREAEQRRAYLEGECVEW	172-191
0	QRDGEDQTQDTELVETRPAG DRTF	242-265	1	LEGECVEWLRRY	184-195
0	AAVVVPSGEEQRY	269-281	1	ALGFYPAEITLW	229-241
0	TCHVQHEGLPKPLTLRW	282-298	1	QKWAAVVVPSGEEQRY	266-281
0	SQAACSDSAQGSVSLTA	345-362			

Tabelle 0.6: Tryptischer *in silico*-Verdau von HLA-C*07:02 im Vergleich mit 0 MC und 1 MC

#MC	Peptid-Sequenz	AS-Position	#MC	Peptid-Sequenz	AS-Position
0	VMAPR	1-7	1	MRVMAPR	1-7
0	ALLLLSGGLALTETWACSH SMR	8-30	1	VMAPRALLLLSGGLALTET WACSHSMR	8-30
0	YFDTAVSRPGR	31-41	1	YFDTAVSRPGRGEPR	31-45
0	FISVGYVDDTQFVR	46-59	1	GEPRFISVGYVDDTQFVR	42-59
0	FSDAASPR	60-68	1	FISVGYVDDTQFVRFSDAA SPR	46-68
0	APWVEQEGPEYWDR	73-86	1	FSDAASPRGEPR	60-72
0	ETQK	87-90	1	GEPRAPWVEQEGPEYWDR	69-86
0	QAQADR	94-99	1	APWVEQEGPEYWDRETQK	73-90
0	GYYNQSEDSHTLQR	107-121	1	ETQKYK	87-92
0	MSGCDLGPDGR	122-132	1	RQAQADR	93-99
0	GYDQSAYDGK	136-145	1	QAQADRVSLR	94-103
0	DYIALNEDLR	146-155	1	VSLRNLR	100-106
0	SWTAADTAAQITQR	156-169	1	NLRGYYNQSEDSHTLQR	104-121
0	LEAAR	171-175	1	GYYNQSEDSHTLQRMSGCD LGPDGR	107-132
0	AAEQLR	176-181	1	MSGCDLGPDRLLR	122-135
0	AYLEGTCVEWLR	182-193	1	LLRGYDQSAYDGK	133-145
0	YLENGK	195-200	1	GYDQSAYDGKDYIALNEDLR	136-155
0	ETLQR	201-205	1	DYIALNEDLRSWTAADTAAQ ITQR	146-169
0	AEPK	206-210	1	SWTAADTAAQITQRK	156-170
0	THVTHHPLSDHEATLR	211-226	1	KLEAAR	170-175
0	CWALGFYPAEITLWQR	227-243	1	LEAARAAEQLR	171-181
0	DGEDQTQDTELVETRPAGDG TFQK	244-267	1	AAEQLRAYLEGTCVEWLR	176-193
0	WAAVVVPSGQEQR	268-280	1	AYLEGTCVEWLRR	182-194
0	GGSCSQAACSNSAQGSDESL ITCK	342-365	1	RYLENGK	194-200
			1	YLENGKETLQR	195-205
			1	ETLQRAEPPK	201-210
			1	AEPKTHVTHHPLSDHEATLR	206-226
			1	KSSGGK	336-341
			1	SSGGKGGSCSQAACSNSAQG SDESLITCK	337-365
			1	GGSCSQAACSNSAQGSDESL ITCKA	342-366

Tabelle 0.7: Chymotryptischer *in silico*-Verdau von HLA-C*07:02 im Vergleich mit 0 MC und 1 MC

#MC	Peptid-Sequenz	AS-Position	#MC	Peptid-Sequenz	AS-Position
0	MRVMAPRALLLLSSGGLALT ETW	1-23	1	ACSHSMRYF	24-32
0	ACSHSMRY	24-31	1	FDTAVSRPGRGEPFRF	32-46
0	DTAVSRPGRGEPFRF	33-46	1	DTAVSRPGRGEPFRFISVGY	33-51
0	ISVGY	47-51	1	ISVGYVDDTQF	47-57
0	VDDTQF	52-57	1	VDDTQFVRF	52-60
0	DSDAASPRGEPRAPW	61-75	1	VRFDSDAASPRGEPRAPW	58-75
0	VEQEGPEY	76-83	1	DSDAASPRGEPRAPWVEQEG PEY	61-83
0	DRETQKY	85-91	1	VEQEGPEYW	76-84
0	KRQAQADRVSLRNLRGY	92-108	1	WDRETQKY	84-91
0	DQSAY	138-142	1	DRETQKYKRQAQADRVSLRN LRGY	85-108
0	DGKDY	143-147	1	KRQAQADRVSLRNLRGYY	92-109
0	IALNEDLRSW	148-157	1	DQSAYDGKDY	138-147
0	TAADTAAQITQRKLEAARAA EQLRAY	158-183	1	DGKDYIALNEDLRSW	143-157
0	LEGTCVEW	184-191	1	LEGTCVEWLRRY	184-195
0	LRRY	192-195	1	ALGFYPAEITLW	229-241
0	YPAEITLW	233-241	1	QKWAAVVPSGQEQR	266-281
0	QRDGEDQTQDTELVETRPAG DGTG	242-265			
0	AAVVPSGQEQR	269-281			
0	TCHMQHEGLQEPLTSW	282-298			

HLA-Annotation mittels Peptidmotiv - Ligandomat-Analyse

Folgende Abbildung zeigen die Ergebnisse der Ligandenanalyse mittels Ligandomat. Die HLA-Allotypen wurden hierbei gruppiert um die Abbildung übersichtlich zu gestalten. Die Gruppierung ist folgendermaßen definiert:

Tabelle 0.8: Gruppieren HLA-Allotypen

Allotyp-Gruppe	HLA-Allotypen
A01	A*01:01
A02	A*02:01, A*02:02, A*02:03, A*02:04, A*02:06, A*02:11, A*02:12, A*02:16, A*02:19, A*68:02, A*69:01
A*03	A*03:01, A*11:01
A*23	A*23:01, A*24:02, A*24:03
A*26	A*25:01, A*26:01, A*26:02
A*29	A*29:02, A*30:01, A*30:02
A*31	A*31:01
A*32	A*32:01
A*33	A*33:01, A*33:03, A*66, A*68:01
B07	B*07:02, B*35:01, B*53:01, B*54:01, B*55:01, B*56:01
B08	B*08:01, B*08:02
B13	B*13:02
B14	B*14:02
B1501	B*15:01
B1510	B*15:10
B1516	B*15:16
B18	B*18:01, B*4402, B*44:03
B27	B*27:05, B*27:09
B37	B*37:01
B38	B*38:01, B*39:01, B*39:02
B40	B*40:01, B*40:02
B41	B*41:01
B45	B*45:01, B*50:01
B47	B*47:01
B49	B*49:01
B51	B*51:01
B57	B*57:01, B*58:01, B*58:02

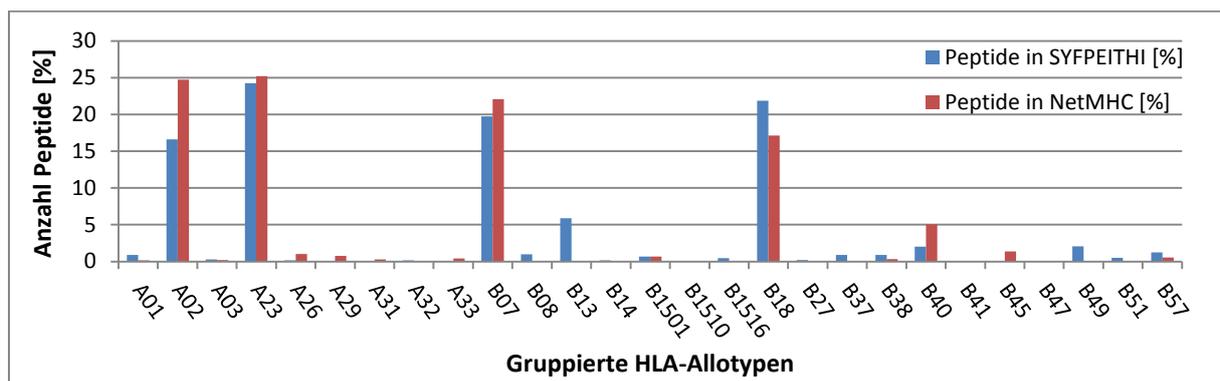


Abbildung 0.1: Verteilung der HLA-Restriktion der Peptidsequenzen aus KC58 Normalgewebe

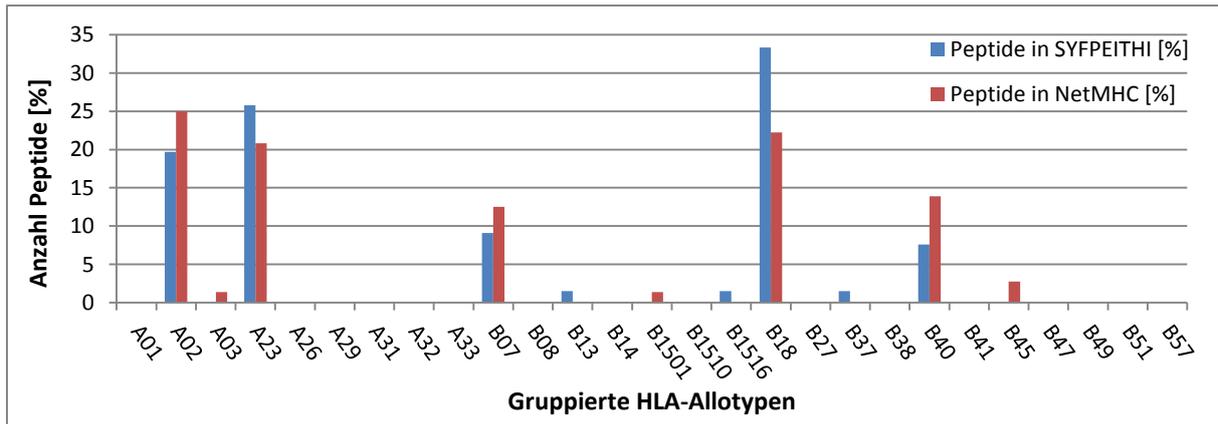


Abbildung 0.2: Verteilung der HLA-Restriktion der Peptidsequenzen aus KC58 Tumorgewebe

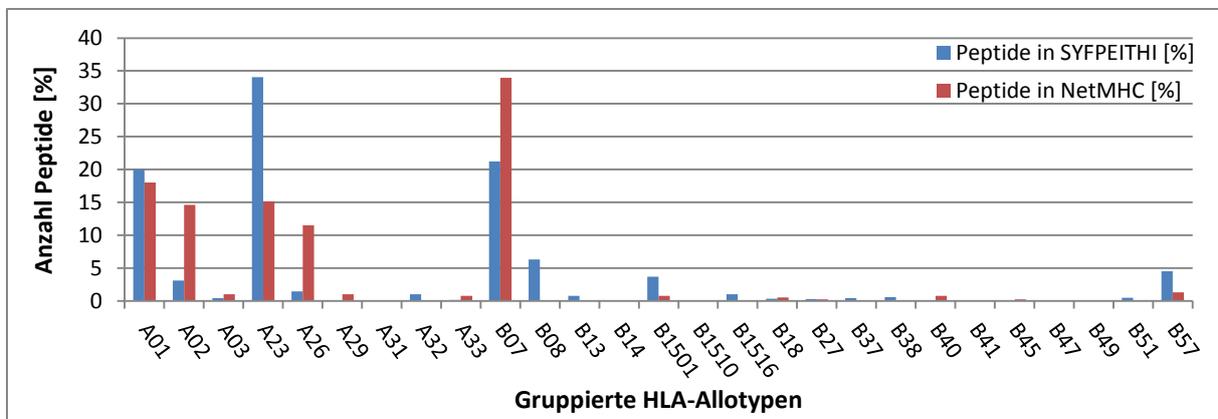


Abbildung 0.3: Verteilung der HLA-Restriktion der Peptidsequenzen aus KC92 Normalgewebe

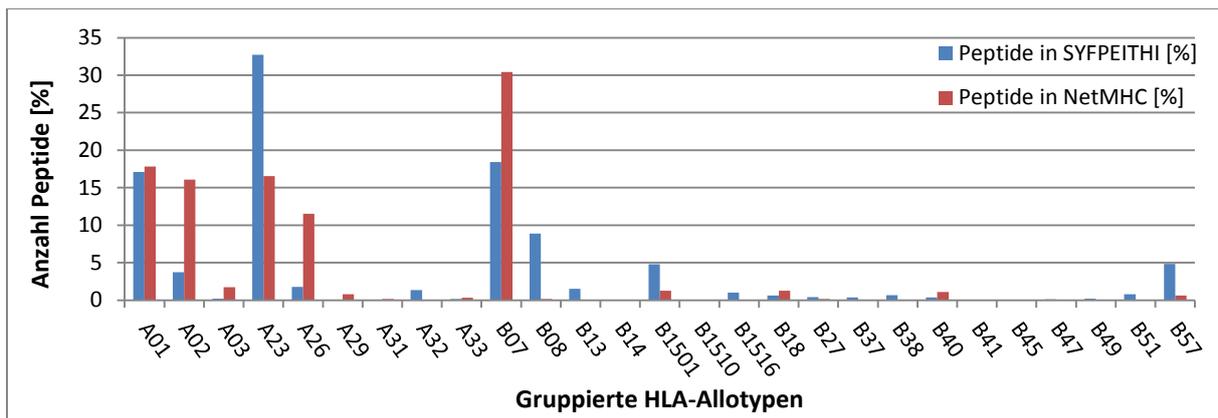


Abbildung 0.4: Verteilung der HLA-Restriktion der Peptidsequenzen aus KC92 Tumorgewebe

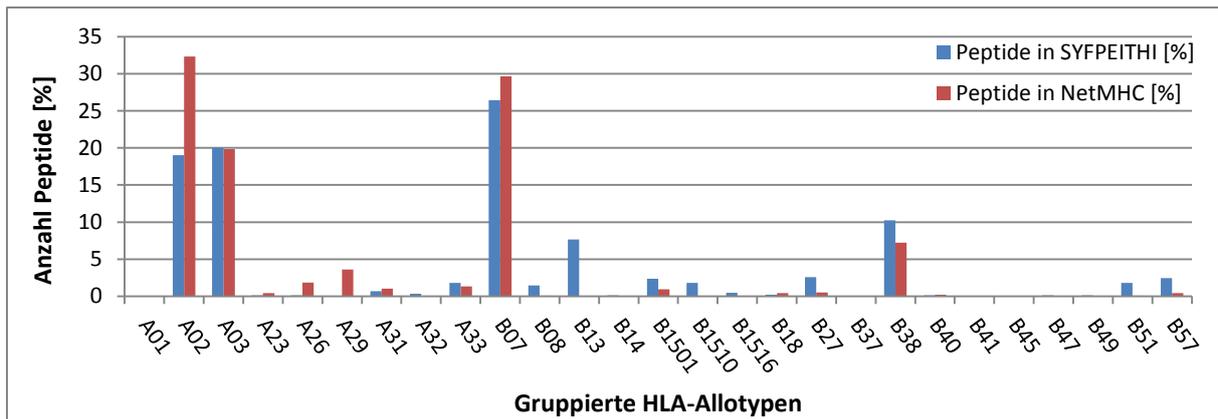


Abbildung 0.5: Verteilung der HLA-Restriktion der Peptidsequenzen aus KC93 Normalgewebe

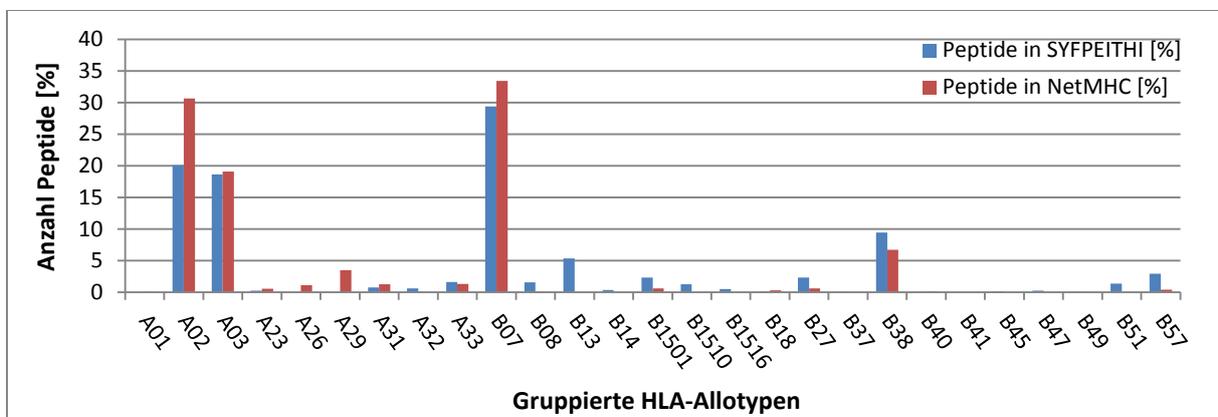


Abbildung 0.6: Verteilung der HLA-Restriktion der Peptidsequenzen aus KC93 Tumorgewebe

Anwendungsspezifische Datenbank

Für alle folgenden Abbildungen gelten folgende Informationen:

Die Proteine wurden nach dem höchsten *score* sortiert. Dieser Wert wird aus der Summe aller Peptide gebildet, die jeweils einen *score* besitzen. Dieser bildet sich aus einem Programm-spezifischen Bewertungssystem, indem Informationen wie Ladung des Peptides und Parameter wie der *peptide relevance factor* verrechnet werden. Die *Accession* gibt die ID des Proteins bei www.uniprot.org an und ist unter *Description* ausgeschrieben. *Coverage* gibt die Proteinabdeckung über die identifizierten Peptide an, welche unter der Kategorie *#Peptides* zu sehen ist. Unter *#PSMs* kann man die Summe aller proteinzugehörigen Peptide einsehen und unter *#AAs* die Länge des Proteins, wie es bei www.uniprot.org angegeben ist. Der *Area*-Wert wird aus der Summe der höchsten drei Peptide des Proteins gebildet. Dies dient dazu einen Eindruck der relativen Häufigkeit von Peptiden und Proteinen zu bekommen. *MW* steht für die Molmasse (*molecular weight*) des Proteins. Zuletzt ist der

Wert des *Calc. pI* angegeben der den theoretischen isoelektrischen Punkt des Proteins anzeigt.

Description	Score	Coverage	# Peptides	# PSMs	Area	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
273 bp - [B*08:09_pop6]sp[00976][B*08:09_pop6]	1531.97	68.13 %	29	68	3.428e8	273	31.7	5.55
273 bp - [C*14:05_pop6]sp[01469][C*14:05_pop6]	1263.29	57.88 %	22	45	3.434e8	273	31.6	5.67
273 bp - [B*15:34_pop6]sp[00197][B*15:34_pop6]	1259.29	53.85 %	19	43	3.543e8	273	31.6	5.97
HLA class II histocompatibility antigen, A-23 alpha chain O...	1001.81	52.05 %	24	46	2.426e8	365	40.7	6.34
365 bp - [A*24:03:01_pop8]sp[00053][A*24:03:01_pop8]	1051.25	50.41 %	24	47	2.584e8	365	40.8	6.34
338 bp - [C*06:06_pop6]sp[01258][C*06:06_pop6]	1262.39	50.00 %	23	48	3.318e8	338	38.4	6.15
365 bp - [A*01:02_pop8]sp[00002][A*01:02_pop8]	1206.03	49.86 %	22	47	2.499e8	365	40.7	6.39
273 bp - [A*74:03_pop6]sp[00129][A*74:03_pop6]	1141.08	46.52 %	17	39	2.674e8	273	31.5	5.66
181 bp - [B*07:38_pop6]sp[01883][B*07:38_pop6]	1182.17	46.41 %	17	42	3.428e8	181	21.2	5.71

Abbildung 0.7: Screenshot der Proteinliste mit anwendungsspezifischer Datenbank aus dem *Proteome Discoverer* von benignem KC92-Retentat verdaut mit Trypsin

Description	Score	Coverage	# Peptides	# PSMs	Area	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
273 bp - [C*07:17:01_pop6]sp[01662][C*07:17:01_pop6]	2113.16	76.56 %	42	119	1.998e9	273	31.4	5.55
273 bp - [C*14:04_pop6]sp[00465][C*14:04_pop6]	2206.15	76.56 %	43	119	4.277e9	273	31.6	5.67
HLA class II histocompatibility antigen, A-24 alpha chain O...	2234.43	73.15 %	62	176	4.741e9	365	40.7	6.34
HLA class II histocompatibility antigen, A-23 alpha chain O...	2140.68	72.33 %	58	166	4.741e9	365	40.7	6.34
365 bp - [A*01:14_pop8]sp[02152][A*01:14_pop8]	2961.94	72.05 %	65	184	4.993e9	365	40.8	6.39
365 bp - [A*01:03_pop8]sp[00003][A*01:03_pop8]	3002.54	71.23 %	66	187	4.993e9	365	40.8	6.54
HLA class II histocompatibility antigen, B-8 alpha chain OS...	2577.31	70.17 %	57	180	5.024e9	362	40.3	5.71
362 bp - [B*35:03:01_pop8]sp[00239][B*35:03:01_pop8]	2256.93	66.57 %	50	162	4.944e9	362	40.5	6.46
273 bp - [B*15:09_pop6]sp[01124][C*15:09_pop6]	2380.81	66.30 %	38	118	4.277e9	273	31.6	5.91

Abbildung 0.8: Screenshot der Proteinliste mit anwendungsspezifischer Datenbank aus dem *Proteome Discoverer* von benignem KC92-Retentat verdaut mit Chymotrypsin

Description	Score	Coverage	# Peptides	# PSMs	Area	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
273 bp - [B*08:09_pop6]sp[00976][B*08:09_pop6]	1298.45	79.85 %	36	74	1.092e8	273	31.7	5.55
181 bp - [B*08:21_pop6]sp[01772][B*08:21_pop6]	1117.35	73.48 %	26	56	1.092e8	181	21.0	5.33
181 bp - [B*08:04_pop6]sp[00149][B*08:04_pop6]	1112.60	72.93 %	24	53	1.092e8	181	20.9	5.33
181 bp - [C*06:04_pop6]sp[00432][C*06:04_pop6]	1006.80	64.64 %	17	41	1.065e8	181	21.1	5.74
181 bp - [C*07:08_pop6]sp[00440][C*07:08_pop6]	990.89	64.64 %	16	40	1.065e8	181	20.9	6.09
181 bp - [C*07:22_pop6]sp[01844][C*07:22_pop6]	1006.80	64.64 %	16	39	1.065e8	181	20.9	5.73
285 bp - [A*03:05:01_pop6]sp[01107][A*03:05:01_pop6]	1329.87	64.56 %	25	63	9.695e7	285	32.7	5.54
273 bp - [B*14:03_pop6]sp[00159][B*14:03_pop6]	1082.60	62.64 %	23	57	1.092e8	273	31.7	5.82
273 bp - [C*14:05_pop6]sp[01469][C*14:05_pop6]	1419.57	62.64 %	24	60	1.108e8	273	31.6	5.67
273 bp - [B*15:05_pop8]sp[00350][B*15:05_pop8]	1347.76	61.90 %	25	63	1.134e8	273	31.7	6.29
HLA class II histocompatibility antigen, B-8 alpha chain OS...	1298.45	61.88 %	37	75	1.092e8	362	40.3	5.71
273 bp - [B*15:34_pop6]sp[00197][B*15:34_pop6]	1414.55	61.54 %	23	63	1.134e8	273	31.6	5.97
273 bp - [B*15:35_pop6]sp[00198][B*15:35_pop6]	1387.97	61.54 %	23	62	1.134e8	273	31.6	5.81
181 bp - [C*07:12_pop6]sp[00444][C*07:12_pop6]	974.48	61.33 %	17	40	1.065e8	181	21.1	6.60
273 bp - [C*14:04_pop6]sp[00465][C*14:04_pop6]	1403.74	60.81 %	23	60	1.108e8	273	31.6	5.67
181 bp - [A*01:06_pop8]sp[01031][A*01:06_pop8]	1097.82	60.22 %	16	41	9.081e7	181	20.9	6.23

Abbildung 0.9: Screenshot der Proteinliste mit anwendungsspezifischer Datenbank aus dem *Proteome Discoverer* von tumorösen KC92-Retentat verdaut mit Trypsin

Description	Score	Coverage	# Peptides	# PSMs	Area	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
273 bp - [C*07:17:01_pop6]sp[01662][C*07:17:01_pop6]	3052.52	87.55 %	59	186	3.985e9	273	31.4	5.55
273 bp - [C*07:07_pop6]sp[00439][C*07:07_pop6]	3045.09	85.35 %	56	178	3.985e9	273	31.4	5.68
273 bp - [C*14:04_pop6]sp[00465][C*14:04_pop6]	2957.31	82.78 %	54	175	7.941e9	273	31.6	5.67
HLA class II histocompatibility antigen, B-8 alpha chain OS...	3648.35	81.77 %	74	267	8.939e9	362	40.3	5.71
HLA class II histocompatibility antigen, A-24 alpha chain O...	3054.76	79.18 %	88	259	7.938e9	365	40.7	6.34
365 bp - [A*01:14_pop8]sp[02152][A*01:14_pop8]	4280.20	78.08 %	88	274	8.939e9	365	40.8	6.39
365 bp - [A*24:03:01_pop8]sp[00053][A*24:03:01_pop8]	3028.07	78.08 %	87	257	7.938e9	365	40.8	6.34
365 bp - [A*01:03_pop8]sp[00003][A*01:03_pop8]	4315.32	77.26 %	87	274	8.939e9	365	40.8	6.54
362 bp - [B*35:03:01_pop8]sp[00239][B*35:03:01_pop8]	2849.23	75.69 %	66	223	8.289e9	362	40.5	6.46
285 bp - [A*03:05:01_pop6]sp[01107][A*03:05:01_pop6]	3546.57	75.44 %	74	249	8.939e9	285	32.7	5.54

Abbildung 0.10: Screenshot der Proteinliste mit anwendungsspezifischer Datenbank aus dem *Proteome Discoverer* von tumorösen KC92-Retentat verdaut mit Chymotrypsin

Description	Score	Coverage	# Peptides	# PSMs	Area	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
273 bp - [B*07:10_pop8]sp[00142][B*07:10_pop8]	1730.22	81.68 %	52	108	3.731e8	273	31.7	5.69
298 bp - [B*39:31_pop8]sp[01926][B*39:31_pop8]	1427.94	77.18 %	43	86	3.478e8	298	34.2	6.09
206 bp - [B*07:09_pop8]sp[00141][B*07:09_pop8]	1503.20	76.21 %	42	89	4.039e8	206	23.7	5.52
181 bp - [B*07:38_pop8]sp[01883][B*07:38_pop8]	1539.90	74.59 %	36	81	3.731e8	181	21.2	5.71
285 bp - [A*03:05:01_pop8]sp[01107][A*03:05:01_pop8]	1044.94	73.68 %	35	61	2.452e8	285	32.7	5.54
273 bp - [B*14:03_pop8]sp[00159][B*14:03_pop8]	1375.01	73.63 %	38	81	3.478e8	273	31.7	5.82
181 bp - [C*07:15_pop8]sp[01408][C*07:15_pop8]	1193.14	70.72 %	27	55	3.286e8	181	20.8	5.74
273 bp - [B*08:09_pop8]sp[00976][B*08:09_pop8]	1423.63	70.33 %	38	80	3.478e8	273	31.7	5.55
181 bp - [C*07:10_pop8]sp[00442][C*07:10_pop8]	1103.48	70.17 %	24	49	3.216e8	181	20.8	6.09
273 bp - [C*07:17:01_pop8]sp[01662][C*07:17:01_pop8]	1219.32	69.23 %	32	62	3.230e8	273	31.4	5.55
HLA class II histocompatibility antigen, B-7 alpha chain OS ...	1862.71	68.78 %	61	123	4.039e8	362	40.4	5.85
362 bp - [B*07:04_pop8]sp[00136][B*07:04_pop8]	1862.71	68.78 %	61	123	4.039e8	362	40.4	5.59
181 bp - [A*03:08_pop8]sp[01302][A*03:08_pop8]	858.32	68.51 %	20	35	1.713e8	181	21.0	5.66
181 bp - [B*08:04_pop8]sp[00149][B*08:04_pop8]	1241.74	67.40 %	25	56	3.478e8	181	20.9	5.33
181 bp - [C*07:25_pop8]sp[01877][C*07:25_pop8]	1103.59	67.40 %	23	48	3.216e8	181	20.8	5.99
362 bp - [B*07:15_pop8]sp[01050][B*07:15_pop8]	1768.16	67.13 %	57	115	4.039e8	362	40.4	6.00
273 bp - [B*15:35_pop8]sp[00198][B*15:35_pop8]	1368.76	66.67 %	36	76	2.565e8	273	31.6	5.81
273 bp - [B*15:39:01_pop8]sp[00202][B*15:39:01_pop8]	1368.76	66.67 %	36	76	2.565e8	273	31.5	5.97
362 bp - [B*07:05:01_pop8]sp[00137][B*07:05:01_pop8]	1693.63	65.75 %	57	115	4.039e8	362	40.4	6.00
362 bp - [B*07:14_pop8]sp[01049][B*07:14_pop8]	1693.63	65.75 %	57	115	4.039e8	362	40.5	5.88
181 bp - [B*27:01_pop8]sp[00220][B*27:01_pop8]	897.63	65.75 %	22	52	1.917e8	181	21.0	5.66
273 bp - [C*07:07_pop8]sp[00439][C*07:07_pop8]	1177.55	65.20 %	29	58	3.230e8	273	31.4	5.68
HLA class II histocompatibility antigen, B-39 alpha chain O ...	1428.37	64.92 %	47	94	4.039e8	362	40.3	6.15
HLA class II histocompatibility antigen, B-67 alpha chain O ...	1560.69	64.92 %	52	104	4.039e8	362	40.3	6.15
362 bp - [B*39:06:01_pop8]sp[00279][B*39:06:01_pop8]	1428.37	64.92 %	47	94	4.039e8	362	40.3	5.99
181 bp - [A*32:04_pop8]sp[01045][A*32:04_pop8]	849.12	64.64 %	19	34	1.713e8	181	21.1	5.92
273 bp - [A*74:03_pop8]sp[00129][A*74:03_pop8]	973.07	64.47 %	29	53	1.713e8	273	31.5	5.66
362 bp - [B*39:24:01_pop8]sp[01221][B*39:24:01_pop8]	1382.61	64.36 %	46	91	4.039e8	362	40.2	5.99
181 bp - [C*06:04_pop8]sp[00432][C*06:04_pop8]	1073.46	64.09 %	25	51	3.216e8	181	21.1	5.74
181 bp - [C*07:08_pop8]sp[00440][C*07:08_pop8]	1067.58	64.09 %	23	48	3.216e8	181	20.9	6.09

Abbildung 0.11: Screenshot der Proteinliste mit anwendungsspezifischer Datenbank aus dem Proteome Discoverer von tumorösen KC93-Retentat verdaut mit Trypsin

Description	Score	Coverage	# Peptides	# PSMs	Area	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
285 bp - [A*03:05:01_pop8]sp[01107][A*03:05:01_pop8]	2607.07	85.96 %	65	180	3.851e9	285	32.7	5.54
273 bp - [B*07:10_pop8]sp[00142][B*07:10_pop8]	2433.05	82.42 %	54	164	4.094e9	273	31.7	5.69
181 bp - [A*32:04_pop8]sp[01045][A*32:04_pop8]	1528.00	78.45 %	35	89	1.314e9	181	21.1	5.92
HLA class II histocompatibility antigen, B-39 alpha chain O ...	1966.76	77.62 %	62	165	4.094e9	362	40.3	6.15
HLA class II histocompatibility antigen, B-67 alpha chain O ...	1972.29	77.62 %	60	166	4.094e9	362	40.3	6.15
362 bp - [B*39:10:01_pop8]sp[00284][B*39:10:01_pop8]	1943.17	77.62 %	60	164	4.094e9	362	40.4	6.15
HLA class II histocompatibility antigen, A-2 alpha chain OS ...	1401.77	76.71 %	60	143	1.979e9	365	40.9	6.99
HLA class II histocompatibility antigen, A-3 alpha chain OS ...	2744.92	76.71 %	69	186	3.851e9	365	40.8	6.00
362 bp - [B*07:04_pop8]sp[00136][B*07:04_pop8]	2616.87	74.59 %	60	175	4.094e9	362	40.4	5.59
HLA class II histocompatibility antigen, A-69 alpha chain O ...	1410.04	74.25 %	57	139	1.979e9	365	41.0	6.90
273 bp - [C*07:17:01_pop8]sp[01662][C*07:17:01_pop8]	2263.64	73.99 %	47	124	2.017e9	273	31.4	5.55
HLA class II histocompatibility antigen, B-14 alpha chain O ...	1938.92	73.48 %	60	159	4.094e9	362	40.3	5.83
341 bp - [B*27:12_pop8]sp[00233][B*27:12_pop8]	1722.08	71.55 %	52	143	4.094e9	341	38.4	6.10
273 bp - [A*24:17_pop8]sp[00067][A*24:17_pop8]	1546.20	71.43 %	46	136	3.350e9	273	31.4	5.95
362 bp - [B*27:08_pop8]sp[00229][B*27:08_pop8]	1787.49	70.44 %	50	140	4.094e9	362	40.3	5.96
362 bp - [B*42:02_pop8]sp[00316][B*42:02_pop8]	2596.07	70.44 %	56	170	4.094e9	362	40.3	5.96
365 bp - [A*11:04_pop8]sp[00046][A*11:04_pop8]	2578.76	70.14 %	64	175	3.851e9	365	40.9	6.00
273 bp - [C*14:04_pop8]sp[00445][C*14:04_pop8]	2053.90	69.96 %	38	100	3.388e9	273	31.6	5.67
HLA class II histocompatibility antigen, A-68 alpha chain O ...	1428.30	69.59 %	55	139	1.591e9	365	40.9	6.70

Abbildung 0.12: Screenshot der Proteinliste mit anwendungsspezifischer Datenbank aus dem Proteome Discoverer von tumorösen KC93-Retentat verdaut mit Chymotrypsin

Description	Score	Coverage	# Peptides	# PSMs	Area	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
362 bp - [B*55:02:01:01_pop8]sp[00369][B*55:02:01:01_pop8]	533.43	55.25 %	26	58	9.786e6	362	40.4	6.15
362 bp - [B*42:02_pop8]sp[00316][B*42:02_pop8]	463.43	54.14 %	25	54	7.285e6	362	40.3	5.96
362 bp - [B*07:04_pop8]sp[00136][B*07:04_pop8]	436.76	52.76 %	24	52	7.285e6	362	40.4	5.59
362 bp - [B*57:03:01_pop8]sp[00383][B*57:03:01_pop8]	553.21	51.10 %	24	58	9.786e6	362	40.3	6.46
362 bp - [B*58:02_pop8]sp[00387][B*58:02_pop8]	554.68	50.85 %	23	55	9.786e6	362	40.3	6.15
362 bp - [B*15:02:01_pop8]sp[00165][B*15:02:01_pop8]	539.61	48.62 %	23	56	9.786e6	362	40.3	6.37
362 bp - [B*41:02:01_pop8]sp[00313][B*41:02:01_pop8]	408.94	48.62 %	21	46	7.285e6	362	40.4	6.39
362 bp - [B*51:08:01_pop8]sp[00353][B*51:08:01_pop8]	554.40	47.79 %	23	55	9.786e6	362	40.5	6.39
HLA class II histocompatibility antigen, A-23 alpha chain O ...	571.70	47.12 %	22	53	9.786e6	365	40.7	6.34
273 bp - [A*74:03_pop8]sp[00129][A*74:03_pop8]	536.28	46.52 %	18	49	7.700e6	273	31.5	5.66
285 bp - [A*03:05:01_pop8]sp[01107][A*03:05:01_pop8]	639.79	46.32 %	18	51	9.786e6	285	32.7	5.54
366 bp - [C*16:01:01_pop8]sp[00475][C*16:01:01_pop8]	621.77	42.90 %	19	45	9.565e6	366	40.8	6.30
181 bp - [B*15:33_pop8]sp[00196][B*15:33_pop8]	448.66	42.54 %	11	31	7.243e6	181	21.1	6.80
276 bp - [A*25:06_pop8]sp[02669][A*25:06_pop8]	500.59	41.30 %	16	45	7.700e6	276	32.2	5.80
365 bp - [A*11:04_pop8]sp[00046][A*11:04_pop8]	625.99	41.10 %	19	53	9.786e6	365	40.9	6.00
365 bp - [A*02:06:01_pop8]sp[00011][A*02:06:01_pop8]	468.24	38.08 %	18	44	7.330e6	365	40.9	6.99
HLA class II histocompatibility antigen, Cw-18 alpha chain ...	426.92	37.76 %	15	34	6.915e6	366	40.9	6.62
366 bp - [C*04:03:01_pop8]sp[00423][C*04:03:01_pop8]	611.91	37.70 %	16	41	9.565e6	366	40.9	6.68

Abbildung 0.13: Screenshot der Proteinliste mit anwendungsspezifischer Datenbank aus dem Proteome Discoverer von tumorösen KC58-Retentat verdaut mit Trypsin

Description	Score	Coverage	# Peptides	# PSMs	Area	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
273 bp - [A*24:17_pop6]sp[00067]A*24:17_pop6	719.43	69.60 %	30	68	6.874e7	273	31.4	5.95
181 bp - [A*31:08_pop6]sp[00066]A*31:08_pop6	494.79	66.30 %	21	39	3.021e7	181	21.0	5.48
HLA class II histocompatibility antigen, A-23 alpha chain O...	825.39	65.75 %	39	81	6.874e7	365	40.7	6.34
273 bp - [B*07:10_pop8]sp[00142]B*07:10_pop8	716.24	64.10 %	26	59	7.106e7	273	31.7	5.69
181 bp - [B*44:29_pop8]sp[01526]B*44:29_pop8	343.18	63.54 %	20	36	3.314e7	181	21.0	5.72
273 bp - [B*15:34_pop6]sp[00197]B*15:34_pop6	637.91	63.37 %	27	58	6.874e7	273	31.6	5.97
HLA class II histocompatibility antigen, B-15 alpha chain O...	744.47	63.07 %	42	94	6.874e7	365	40.7	6.34
273 bp - [C*15:09_pop6]sp[01124]C*15:09_pop6	725.23	54.95 %	22	40	5.874e7	273	31.6	5.91
HLA class II histocompatibility antigen, B-15 alpha chain O...	683.60	54.42 %	30	63	7.106e7	362	40.4	6.30
HLA class II histocompatibility antigen, B-52 alpha chain O...	684.91	54.42 %	29	61	7.106e7	362	40.5	6.25
HLA class II histocompatibility antigen, A-2 alpha chain OS...	477.17	54.05 %	29	62	1.788e9	365	40.9	6.99
HLA class II histocompatibility antigen, B-57 alpha chain O...	693.13	54.14 %	28	61	7.106e7	362	40.2	6.30
HLA class II histocompatibility antigen, B-42 alpha chain O...	736.05	53.87 %	28	61	7.106e7	362	40.3	5.85
HLA class II histocompatibility antigen, B-58 alpha chain O...	715.50	53.87 %	28	60	6.874e7	362	40.3	6.30
HLA class II histocompatibility antigen, A-69 alpha chain O...	469.80	53.15 %	28	60	1.788e9	365	41.0	6.90
HLA class II histocompatibility antigen, B-45 alpha chain O...	660.82	53.04 %	30	62	6.874e7	362	40.4	6.47
HLA class II histocompatibility antigen, B-49 alpha chain O...	660.82	53.04 %	30	62	6.874e7	362	40.6	6.47
HLA class II histocompatibility antigen, B-50 alpha chain O...	660.82	53.04 %	30	62	6.874e7	362	40.5	6.47
HLA class II histocompatibility antigen, B-27 alpha chain O...	674.10	52.76 %	27	62	7.106e7	362	40.4	5.82
HLA class II histocompatibility antigen, A-74 alpha chain O...	569.05	52.60 %	30	62	1.793e9	365	40.9	6.47
273 bp - [C*07:17:01_pop6]sp[01662]C*07:17:01_pop6	644.09	52.01 %	23	42	3.336e7	273	31.4	5.55
HLA class II histocompatibility antigen, B-46 alpha chain O...	565.84	51.66 %	25	55	4.927e7	362	40.3	6.00

Abbildung 0.14: Screenshot der Proteinliste mit anwendungsspezifischer Datenbank aus dem *Proteome Discoverer* von tumorösen KC58-Retentat verdaut mit Trypsin

Description	Score	Coverage	# Peptides	# PSMs	Area	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
181 bp - [B*07:38_pop6]sp[01883]B*07:38_pop6	875.77	83.43 %	26	52	7.068e7	181	21.2	5.71
273 bp - [B*07:10_pop8]sp[00142]B*07:10_pop8	987.92	72.89 %	34	66	7.478e7	273	31.7	5.69
206 bp - [B*07:09_pop6]sp[00141]B*07:09_pop6	836.11	70.87 %	27	53	7.004e7	206	23.7	5.52
181 bp - [A*02:27_pop6]sp[00033]A*02:27_pop6	862.46	65.19 %	17	36	7.320e7	181	21.1	7.18
181 bp - [C*06:04_pop6]sp[00432]C*06:04_pop6	683.09	65.19 %	15	30	5.940e7	181	21.1	5.74
181 bp - [C*07:08_pop6]sp[00440]C*07:08_pop6	712.60	65.19 %	14	29	5.940e7	181	20.9	6.09
181 bp - [C*07:10_pop6]sp[00442]C*07:10_pop6	712.22	65.19 %	14	29	5.940e7	181	20.8	6.09
181 bp - [C*07:15_pop6]sp[01408]C*07:15_pop6	718.15	65.19 %	16	33	5.940e7	181	20.8	5.74
181 bp - [C*07:25_pop6]sp[01877]C*07:25_pop6	712.22	65.19 %	14	29	5.940e7	181	20.8	5.99
181 bp - [A*31:08_pop6]sp[00066]A*31:08_pop6	735.09	64.09 %	18	31	6.845e7	181	21.0	5.48
181 bp - [A*02:35:01_pop6]sp[01035]A*02:35:01_pop6	881.29	64.09 %	17	35	7.320e7	181	21.1	6.70
273 bp - [A*02:20:01_pop6]sp[00026]A*02:20:01_pop6	909.20	63.74 %	23	46	7.526e7	273	31.6	6.47
273 bp - [A*02:29_pop6]sp[00035]A*02:29_pop6	909.20	63.74 %	23	46	7.526e7	273	31.6	6.47
181 bp - [B*27:01_pop6]sp[00220]B*27:01_pop6	625.07	62.98 %	17	33	5.410e7	181	21.0	5.66
273 bp - [C*04:04:01_pop6]sp[00424]C*04:04:01_pop6	889.76	61.17 %	28	56	7.072e7	273	31.7	6.66

Abbildung 0.15: Screenshot der Proteinliste mit anwendungsspezifischer Datenbank aus dem *Proteome Discoverer* von benignem KC58-Retentat verdaut mit Trypsin

Description	Score	Coverage	# Peptides	# PSMs	Area	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
273 bp - [C*07:17:01_pop6]sp[01662]C*07:17:01_pop6	1716.50	79.12 %	44	102	9.878e8	273	31.4	5.55
365 bp - [A*02:06:01_pop8]sp[00011]A*02:06:01_pop8	1290.73	75.34 %	55	119	1.909e9	365	40.9	6.99
362 bp - [B*44:03:01_pop8]sp[00019]B*44:03:01_pop8	1737.63	75.14 %	53	139	1.902e9	362	40.5	6.20
HLA class II histocompatibility antigen, A-23 alpha chain O...	1617.00	73.15 %	58	145	1.651e9	365	40.7	6.34
362 bp - [B*07:14_pop8]sp[01049]B*07:14_pop8	2014.79	70.72 %	53	139	1.902e9	362	40.5	5.88
285 bp - [A*03:05:01_pop6]sp[01107]A*03:05:01_pop6	1682.86	70.53 %	47	126	1.649e9	285	32.7	5.54
362 bp - [B*40:06:01:01_pop8]sp[00297]B*40:06:01:01_...	2024.82	69.34 %	54	142	1.902e9	362	40.6	6.54
362 bp - [B*42:02_pop6]sp[00316]B*42:02_pop6	1942.47	68.78 %	51	134	1.902e9	362	40.3	5.96
273 bp - [C*15:09_pop6]sp[01124]C*15:09_pop6	1727.13	66.30 %	37	91	1.504e9	273	31.6	5.91
362 bp - [B*27:07:01_pop6]sp[00228]B*27:07:01_pop6	1950.31	65.47 %	49	131	1.902e9	362	40.4	6.11

Abbildung 0.16: Screenshot der Proteinliste mit anwendungsspezifischer Datenbank aus dem *Proteome Discoverer* von benignem KC58-Retentat verdaut mit Chymotrypsin

Isotopenmarkierte Peptide

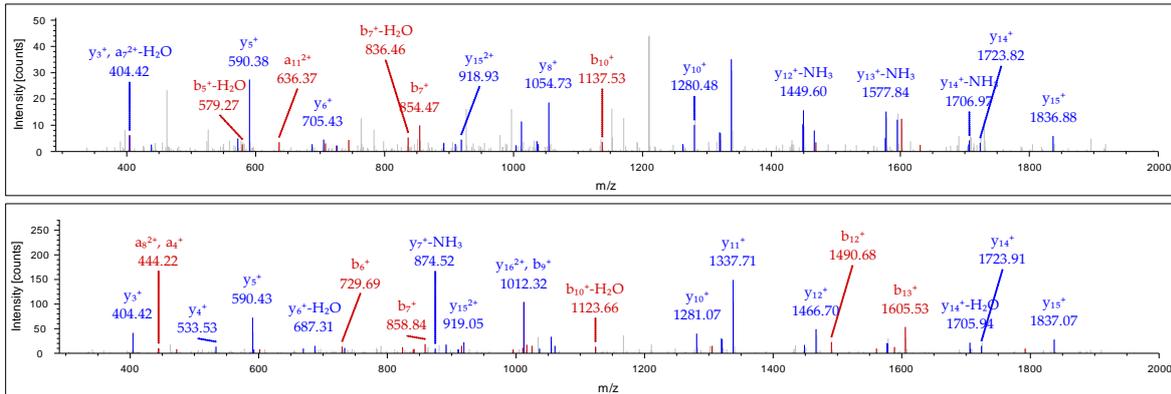


Abbildung 0.17: Spektrum der natürlichen und synthetischen Peptidsequenz APWIEQGPEYWDGETRK

Oben ist das natürliche Spektrum des tryptischen Peptid von HLA-A*02:01 stammend abgebildet. Der Ladungszustand ist zweifach geladen. Die protonierte Monoisotopische Masse (MH+) des Peptides entspricht oben 2191.01152 Dalton (Da) und unten mit dem 4 Da schwereren Alanin an Position 1 2195.01811 Da.

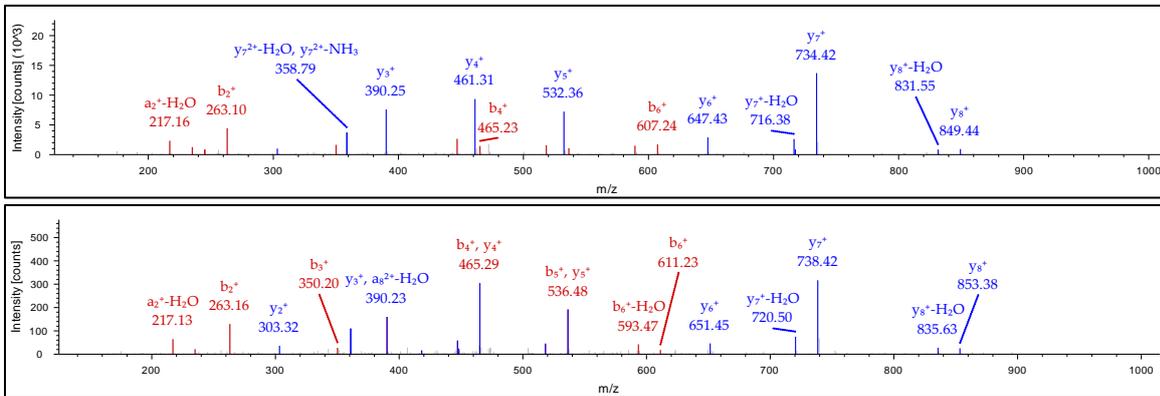


Abbildung 0.18: Spektrum der natürlichen und synthetischen Peptidsequenz FDSDAASQR

Oben ist das natürliche Spektrum des tryptischen Peptid von 19 HLA-A Allele stammend abgebildet. Der Ladungszustand ist zweifach geladen. Die protonierte Monoisotopische Masse (MH+) des Peptides entspricht oben 996.43797 Dalton (Da) und unten mit dem 4 Da schwereren Alanin an Position 6 1000.44408 Da.

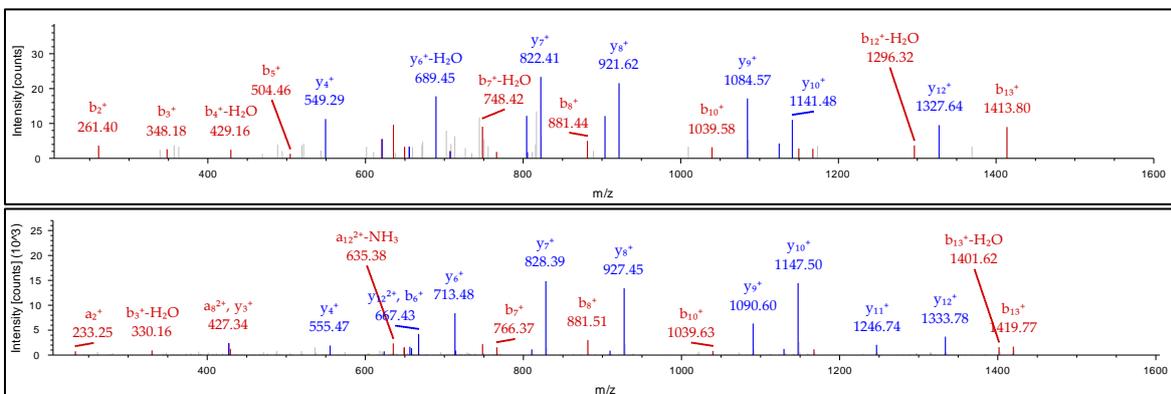


Abbildung 0.19: Spektrum der natürlichen und synthetischen Peptidsequenz FISVGYVDGTQFVR

Oben ist das natürliche Spektrum des tryptischen Peptid von HLA-B*18 stammend abgebildet. Der Ladungszustand ist zweifach geladen. Die protonierte Monoisotopische Masse (MH+) des Peptides entspricht oben 1587.81841 Dalton (Da) und unten mit dem 6 Da schwereren Valin an Position 13 1593.83000 Da

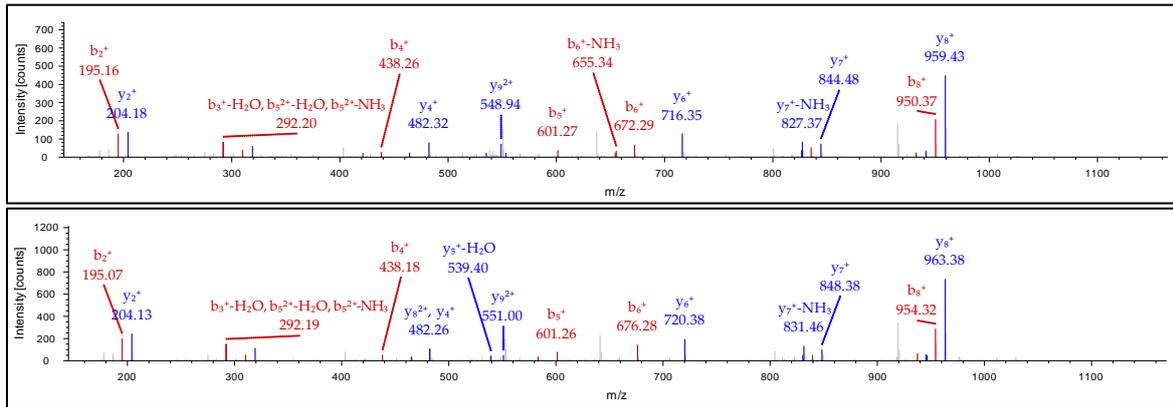


Abbildung 0.20: Spektrum der natürlichen und synthetischen Peptidsequenz GHDQYAYDGK

Oben ist das natürliche Spektrum des tryptischen Peptid von HLA-B*07 stammend abgebildet. Der Ladungszustand ist zweifach geladen. Die protonierte Monoisotopische Masse (MH⁺) des Peptides entspricht oben 1153.49089 Dalton (Da) und unten mit dem 4 Da schwereren Alanin an Position 6 1157.49700 Da.

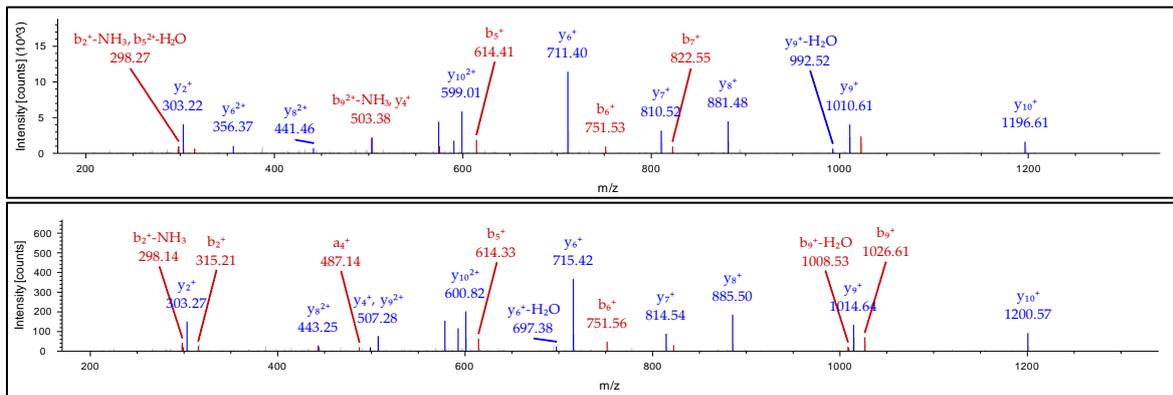


Abbildung 0.21: Spektrum der natürlichen und synthetischen Peptidsequenz KWEAVHAAEQR

Oben ist das natürliche Spektrum des tryptischen Peptid von HLA-A*01 und A*36 stammend abgebildet. Der Ladungszustand ist zweifach geladen. Die protonierte Monoisotopische Masse (MH⁺) des Peptides entspricht oben 1324.67705 Dalton (Da) und unten mit dem 4 Da schwereren Alanin an Position 8 1328.68376 Da.

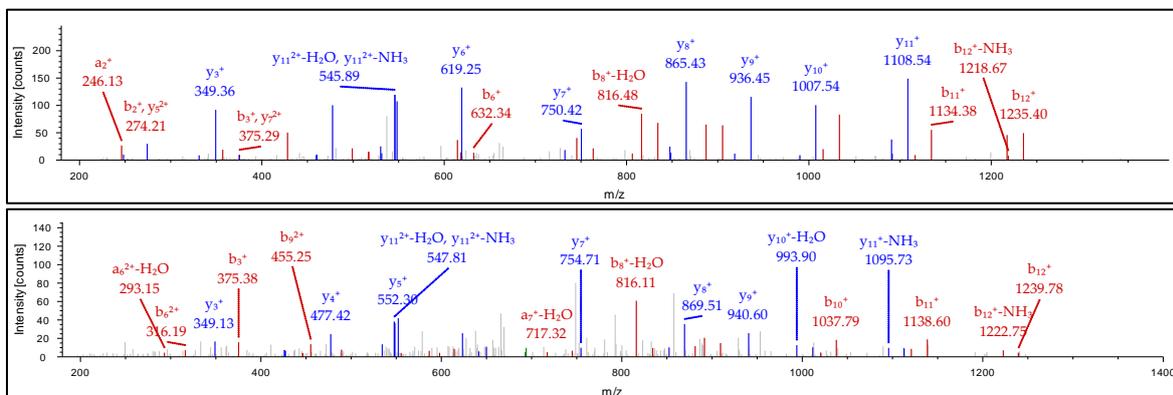


Abbildung 0.22: Spektrum der natürlichen und synthetischen Peptidsequenz SWTAADMAAQTTK

Oben ist das natürliche Spektrum des tryptischen Peptid von HLA-A*02:01, A*68:01 und A*69:01 stammend abgebildet. Der Ladungszustand ist zweifach geladen. Die protonierte Monoisotopische Masse (MH⁺) des Peptides entspricht oben 1381.64324 Dalton (Da) und unten mit dem 4 Da schwereren Alanin an Position 9 1385.64836 Da.

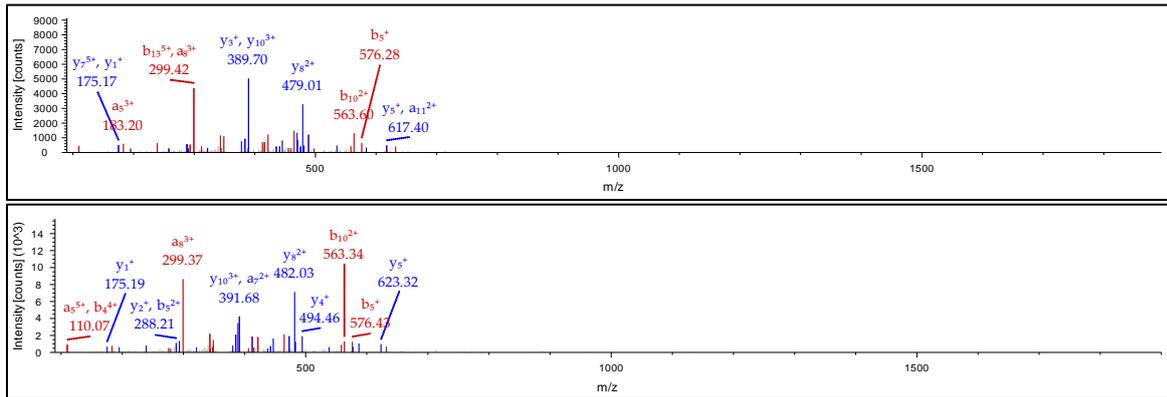


Abbildung 0.23: Spektrum der natürlichen und synthetischen Peptidsequenz THVTTHHPISDHEVTLR
Oben ist das natürliche Spektrum des tryptischen Peptid von HLA-B*44 stammend abgebildet. Der Ladungszustand ist fünffach geladen. Die protonierte Monoisotopische Masse (MH⁺) des Peptides entspricht oben 1878.96054 Dalton (Da) und unten mit dem 6 Da schwereren Valin an Position 13 1884.96988 Da

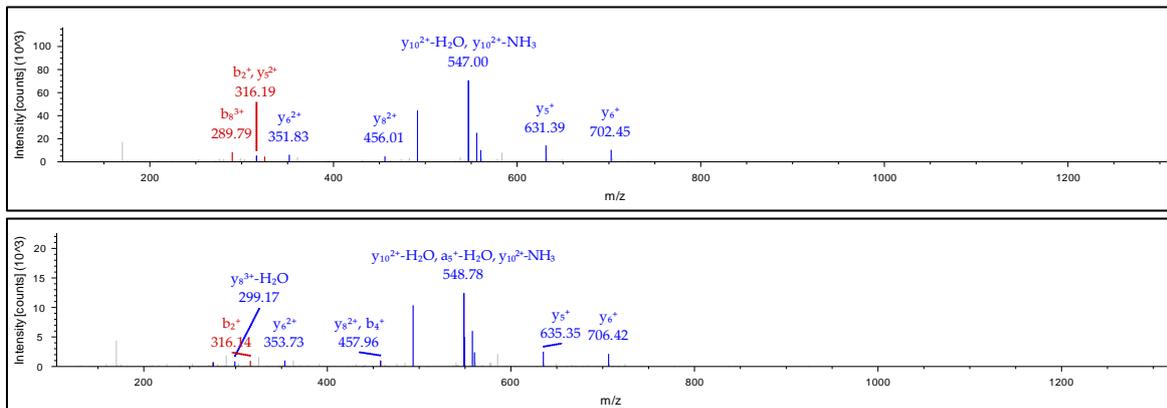


Abbildung 0.24: Spektrum der natürlichen und synthetischen Peptidsequenz WEAHAAEQQR
Oben ist das natürliche Spektrum des tryptischen Peptid von HLA-A*11 stammend abgebildet. Der Ladungszustand ist zweifach geladen. Die protonierte Monoisotopische Masse (MH⁺) des Peptides entspricht oben 1296.60898 Dalton (Da) und unten mit dem 4 Da schwereren Alanin an Position 7 1300.61432 Da.

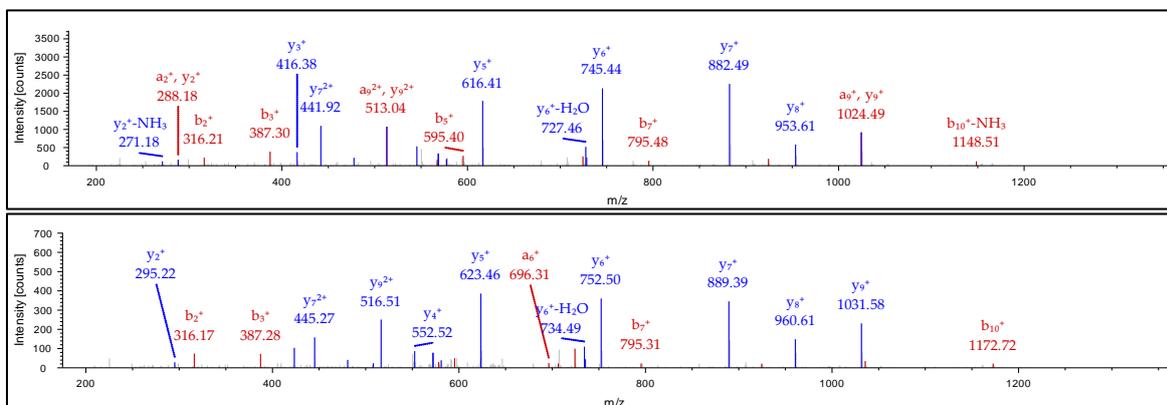


Abbildung 0.25: Spektrum der natürlichen und synthetischen Peptidsequenz WEAHAEQQLR
Oben ist das natürliche Spektrum des tryptischen Peptid von HLA-A*03 stammend abgebildet. Der Ladungszustand ist zweifach geladen. Die protonierte Monoisotopische Masse (MH⁺) des Peptides entspricht oben 1339.63848 Dalton (Da) und unten mit dem 7 Da schwereren Leucin an Position 10 1346.65381 Da.

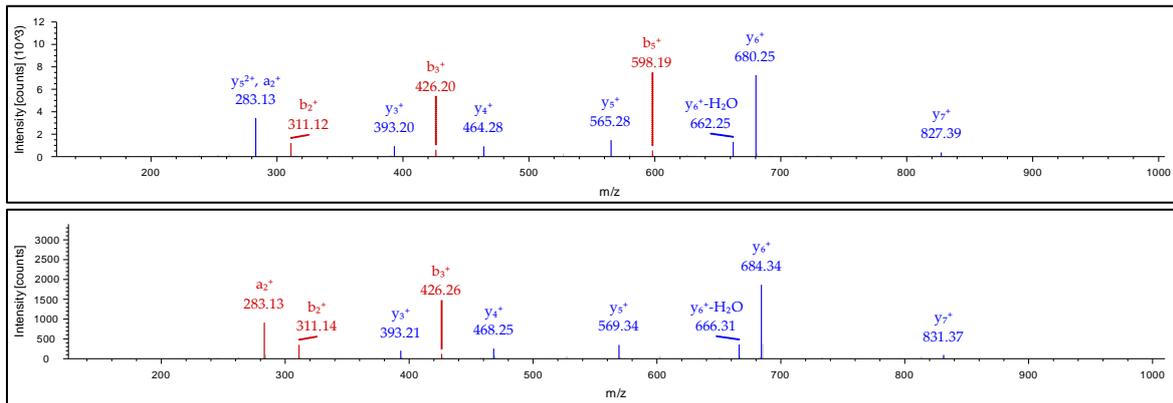


Abbildung 0.26: Spektrum der natürlichen und synthetischen Peptidsequenz YFDTAMSR

Oben ist das natürliche Spektrum des tryptischen Peptid von HLA-B*08 stammend abgebildet. Der Ladungszustand ist zweifach geladen. Die protonierte Monoisotopische Masse (MH^+) des Peptides entspricht oben 990.43529 Dalton (Da) und unten mit dem 4 Da schwereren Alanin an Position 5 994.44127 Da.

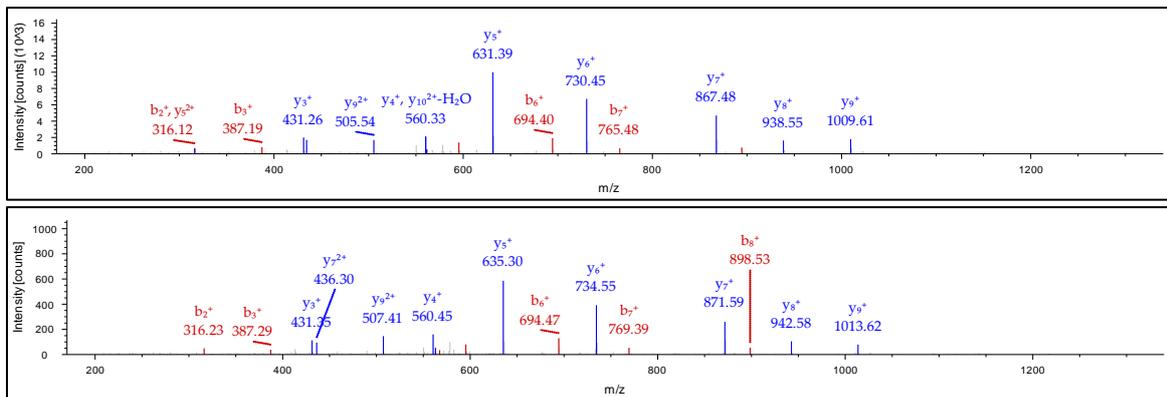


Abbildung 0.27: Spektrum der natürlichen und synthetischen Peptidsequenz WEAHVAEQQR

Oben ist das natürliche Spektrum des tryptischen Peptid von HLA-A*24 stammend abgebildet. Der Ladungszustand ist zweifach geladen. Die protonierte Monoisotopische Masse (MH^+) des Peptides entspricht oben 1324.63896 Dalton (Da) und unten mit dem 4 Da schwereren Alanin an Position 7 1328.64519 Da.

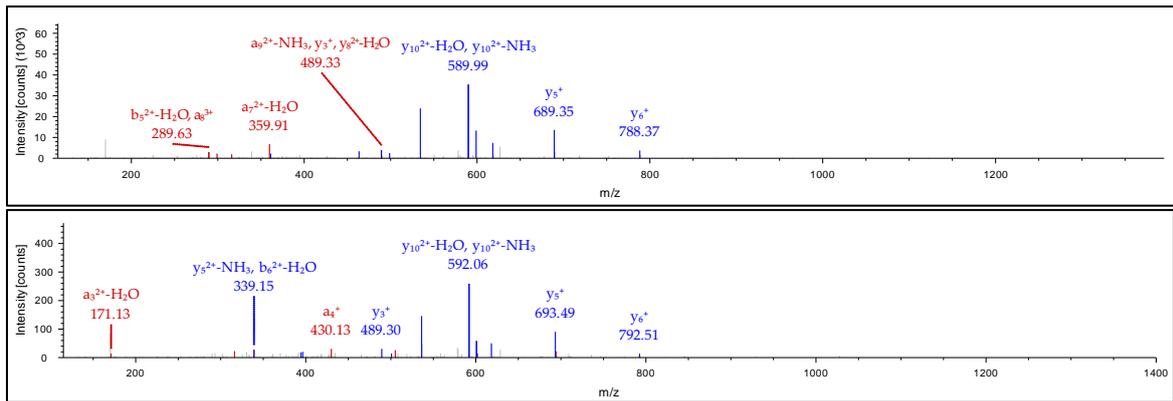


Abbildung 0.28: Spektrum der natürlichen und synthetischen Peptidsequenz WEAHVAEQWR

Oben ist das natürliche Spektrum des tryptischen Peptid von HLA-A*68 stammend abgebildet. Der Ladungszustand ist dreifach geladen. Die protonierte Monoisotopische Masse (MH^+) des Peptides entspricht oben 1382.65821 Dalton (Da) und unten mit dem 4 Da schwereren Alanin an Position 7 1386.66593 Da.

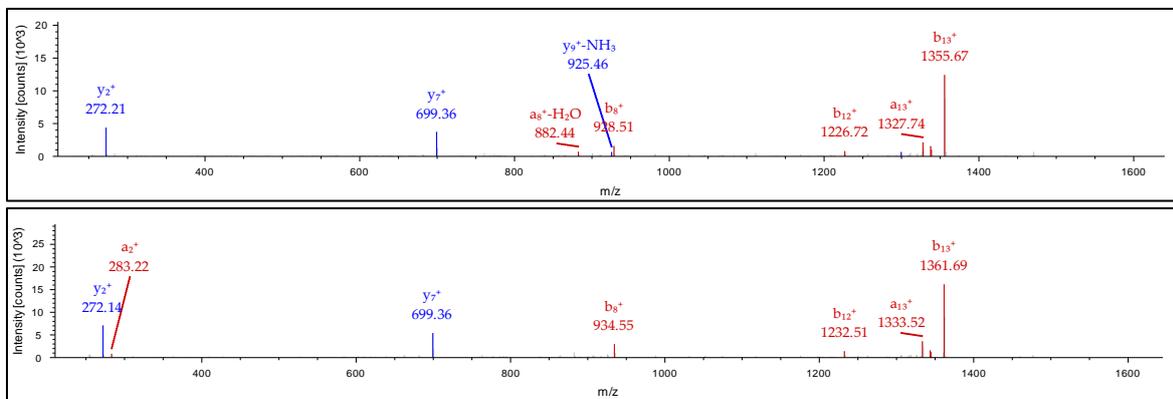


Abbildung 0.29: Spektrum der natürlichen und synthetischen Peptidsequenz YFSTSVSRPGSGEPR

Oben ist das natürliche Spektrum des tryptischen Peptid von HLA-A*30 stammend abgebildet. Der Ladungszustand ist zweifach geladen. Die protonierte Monoisotopische Masse (MH^+) des Peptides entspricht oben 1626.78948 Dalton (Da) und unten mit dem 6 Da schwereren Valin an Position 6 1632.80071 Da.

Literaturverzeichnis

- Ackerman, A. L. and P. Cresswell (2004). "Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens." Nat Immunol **5**(7): 678-684.
- Aebersold, R. (2009). "A stress test for mass spectrometry-based proteomics." Nat Methods **6**(6): 411-412.
- Altman, J. D., P. A. Moss, P. J. Goulder, D. H. Barouch, M. G. McHeyzer-Williams, J. I. Bell, A. J. McMichael and M. M. Davis (1996). "Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes." Science **274**(5284): 94-96.
- Anderson, M. S., E. S. Venanzi, Z. Chen, S. P. Berzins, C. Benoist and D. Mathis (2005). "The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance." Immunity **23**(2): 227-239.
- Andreasen, S. O., J. E. Christensen, O. Marker and A. R. Thomsen (2000). "Role of CD40 ligand and CD28 in induction and maintenance of antiviral CD8+ effector T cell responses." J Immunol **164**(7): 3689-3697.
- Aston, F. W. (1933). "The Story of Isotopes." Science **78**(2010): 5-6.
- Aucouturier, J., L. Dupuis, S. Deville, S. Ascarateil and V. Ganne (2002). "Montanide ISA 720 and 51: a new generation of water in oil emulsions as adjuvants for human vaccines." Expert Rev Vaccines **1**(1): 111-118.
- Aumailley, M., L. Bruckner-Tuderman, W. G. Carter, R. Deutzmann, D. Edgar, P. Ekblom, J. Engel, E. Engvall, E. Hohenester, J. C. Jones, H. K. Kleinman, M. P. Marinkovich, G. R. Martin, U. Mayer, G. Meneguzzi, J. H. Miner, K. Miyazaki, M. Patarroyo, M. Paulsson, V. Quaranta, J. R. Sanes, T. Sasaki, K. Sekiguchi, L. M. Sorokin, J. F. Talts, K. Tryggvason, J. Uitto, I. Virtanen, K. von der Mark, U. M. Wewer, Y. Yamada and P. D. Yurchenco (2005). "A simplified laminin nomenclature." Matrix Biol **24**(5): 326-332.
- Banchereau, J., A. K. Palucka, M. Dhodapkar, S. Burkeholder, N. Taquet, A. Rolland, S. Taquet, S. Coquery, K. M. Wittkowski, N. Bhardwaj, L. Pineiro, R. Steinman and J. Fay (2001). "Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine." Cancer Res **61**(17): 6451-6458.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature **392**(6673): 245-252.
- Bantscheff, M., S. Lemeer, M. M. Savitski and B. Kuster (2012). "Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present." Anal Bioanal Chem **404**(4): 939-965.
- Benham, A. M. and J. J. Neefjes (1995). "Antigen processing by the class I pathway." Biochem Soc Trans **23**(3): 664-669.
- Biemann, K. (1990). "Sequencing of peptides by tandem mass spectrometry and high-energy collision-induced dissociation." Methods Enzymol **193**: 455-479.

- Bjorkman, P. J., M. A. Saper, B. Samraoui, W. S. Bennett, J. L. Strominger and D. C. Wiley (1987). "Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2." Nature **329**(6139): 506-512.
- Blattman, J. N., R. Antia, D. J. Sourdive, X. Wang, S. M. Kaech, K. Murali-Krishna, J. D. Altman and R. Ahmed (2002). "Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells." J Exp Med **195**(5): 657-664.
- Boon, T., P. G. Coulie, B. J. Van den Eynde and P. Van der Bruggen (2006). "Human T cell responses against melanoma." Annu Rev Immunol **24**: 175-208.
- Boon, T., T. F. Gajewski and P. G. Coulie (1995). "From defined human tumor antigens to effective immunization?" Immunol Today **16**(7): 334-336.
- Bowness, P., R. L. Allen and A. J. McMichael (1994). "Identification of T cell receptor recognition residues for a viral peptide presented by HLA B27." Eur J Immunol **24**(10): 2357-2363.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Bulfone-Paus, S., D. Ungureanu, T. Pohl, G. Lindner, R. Paus, R. Ruckert, H. Krause and U. Kunzendorf (1997). "Interleukin-15 protects from lethal apoptosis in vivo." Nat Med **3**(10): 1124-1128.
- Carpenter, C. B. (1997). "HLA class I DNA typing in organ transplantation." Tissue Antigens **50**(4): 322-325.
- Chelius, D. and P. V. Bondarenko (2002). "Quantitative profiling of proteins in complex mixtures using liquid chromatography and mass spectrometry." J Proteome Res **1**(4): 317-323.
- Chen, L. and D. B. Flies (2013). "Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition." Nat Rev Immunol **13**(4): 227-242.
- Chen, Y., L. Ayaru, S. Mathew, E. Morris, S. P. Pereira and S. Behboudi (2014). "Expansion of anti-mesothelin specific CD4+ and CD8+ T cell responses in patients with pancreatic carcinoma." PLoS One **9**(2): e88133.
- Croce, C. M. (2008). "Oncogenes and cancer." N Engl J Med **358**(5): 502-511.
- Curtsinger, J. M., D. C. Lins and M. F. Mescher (2003). "Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function." J Exp Med **197**(9): 1141-1151.
- Dausset, J. (1958). "[Iso-leuko-antibodies]." Acta Haematol **20**(1-4): 156-166.
- Davis, M. M., J. J. Boniface, Z. Reich, D. Lyons, J. Hampl, B. Arden and Y. Chien (1998). "Ligand recognition by alpha beta T cell receptors." Annu Rev Immunol **16**: 523-544.
- Dengjel, J., O. Schoor, R. Fischer, M. Reich, M. Kraus, M. Muller, K. Kreymborg, F. Altenberend, J. Brandenburg, H. Kalbacher, R. Brock, C. Driessen, H. G. Rammensee and S. Stevanović (2005). "Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(22): 7922-7927.

- Di Marco, M. (2014). Peptidmotive von HLA-B*58:01, HLA-B*58:02 und HLA-A*32:01 und Unterschiede im HLA-Ligandom von HLA-B*58:01 und HLA-B*58:02. Diplomarbeit, Eberhard Karls Universität, Tübingen.
- Disis, M. L., T. A. Gooley, K. Rinn, D. Davis, M. Piepkorn, M. A. Cheever, K. L. Knutson and K. Schiffman (2002). "Generation of T-cell immunity to the HER-2/neu protein after active immunization with HER-2/neu peptide-based vaccines." J Clin Oncol **20**(11): 2624-2632.
- Dole, M., L. L. Mack and R. L. Hines (1968). "Molecular Beams of Macroions." J Chem Phys **49**(5): 2240-2249.
- Dudley, M. E. and S. A. Rosenberg (2003). "Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer." Nat Rev Cancer **3**(9): 666-675.
- Duncan, M. W., R. Aebersold and R. M. Caprioli (2010). "The pros and cons of peptide-centric proteomics." Nat Biotechnol **28**(7): 659-664.
- Dunn, G. P., L. J. Old and R. D. Schreiber (2004). "The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting." Immunity **21**(2): 137-148.
- Dyer, P. A. and F. H. Claas (1997). "A future for HLA matching in clinical transplantation." Eur J Immunogenet **24**(1): 17-28.
- Ehrlich, P. (1909). "Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung." Ned. Tijdschr. Geneesk. **5**: 273-290.
- Elias, J. E. and S. P. Gygi (2007). "Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry." Nat Methods **4**(3): 207-214.
- Falk, K., O. Rötzschke, S. Stevanović, G. Jung and H. G. Rammensee (1991). "Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules." Nature **351**(6324): 290-296.
- Fay, J. W., A. K. Palucka, S. Paczesny, M. Dhodapkar, D. A. Johnston, S. Burkeholder, H. Ueno and J. Banchereau (2006). "Long-term outcomes in patients with metastatic melanoma vaccinated with melanoma peptide-pulsed CD34(+) progenitor-derived dendritic cells." Cancer Immunol Immunother **55**(10): 1209-1218.
- Fenn, J. B., M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong and C. M. Whitehouse (1989). "Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules." Science **246**(4926): 64-71.
- Forbes, E. K., C. Sander, E. O. Ronan, H. McShane, A. V. Hill, P. C. Beverley and E. Z. Tchilian (2008). "Multifunctional, high-level cytokine-producing Th1 cells in the lung, but not spleen, correlate with protection against Mycobacterium tuberculosis aerosol challenge in mice." J Immunol **181**(7): 4955-4964.
- Fukuda, M. (1991). "Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking." J Biol Chem **266**(32): 21327-21330.
- Fulwyler, M. J. (1974). "Status quo in flow-through cytometry." J Histochem Cytochem **22**(7): 605-606.
- Garboczi, D. N., P. Ghosh, U. Utz, Q. R. Fan, W. E. Biddison and D. C. Wiley (1996). "Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2." Nature **384**(6605): 134-141.

- Germain, R. N. and D. H. Margulies (1993). "The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation." Annu Rev Immunol **11**: 403-450.
- Goldstein, S. A. and M. F. Mescher (1986). "Cell-sized, supported artificial membranes (pseudocytes): response of precursor cytotoxic T lymphocytes to class I MHC proteins." J Immunol **137**(11): 3383-3392.
- Gough, S. C. and M. J. Simmonds (2007). "The HLA Region and Autoimmune Disease: Associations and Mechanisms of Action." Curr Genomics **8**(7): 453-465.
- Gouw, J. W., J. Krijgsveld and A. J. Heck (2010). "Quantitative proteomics by metabolic labeling of model organisms." Mol Cell Proteomics **9**(1): 11-24.
- Groettrup, M., A. Soza, U. Kuckelkorn and P. M. Kloetzel (1996). "Peptide antigen production by the proteasome: complexity provides efficiency." Immunol Today **17**(9): 429-435.
- Grutzkau, A. and A. Radbruch (2010). "Small but mighty: how the MACS-technology based on nanosized superparamagnetic particles has helped to analyze the immune system within the last 20 years." Cytometry A **77**(7): 643-647.
- Guerder, S., J. Meyerhoff and R. Flavell (1994). "The role of the T cell costimulator B7-1 in autoimmunity and the induction and maintenance of tolerance to peripheral antigen." Immunity **1**(2): 155-166.
- Guermontprez, P. and S. Amigorena (2005). "Pathways for antigen cross presentation." Semin Immunopathol **26**(3): 257-271.
- Gutcher, I. and B. Becher (2007). "APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation." J Clin Invest **117**(5): 1119-1127.
- Hayday, A. C., S. Roberts and E. Ramsburg (2000). "gammadelta cells and the regulation of mucosal immune responses." Am J Respir Crit Care Med **162**(4 Pt 2): S161-163.
- He, Z., C. Yang and W. Yu (2011). "A partial set covering model for protein mixture identification using mass spectrometry data." IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform **8**(2): 368-380.
- Hoffmann, V. (2010). Strukturelle und funktionelle Charakterisierung von MHC Klasse I-Molekülen über Massenspektrometrische Strukturanalyse und in vitro priming von naiven virusspezifischen CD8+ T-Zellen. Diplomarbeit, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.
- Hotz, C. (2014). HLA-Ligandenanalysen im Kontext der Tumorummunologie, der Autoimmunität und der parasitären Onchozerkose. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.
- Hulsmeyer, M., M. T. Fiorillo, F. Bettosini, R. Sorrentino, W. Saenger, A. Ziegler and B. Uchanska-Ziegler (2004). "Dual, HLA-B27 subtype-dependent conformation of a self-peptide." J Exp Med **199**(2): 271-281.
- Ikeda, N., H. Kojima, M. Nishikawa, K. Hayashi, T. Futagami, T. Tsujino, Y. Kusunoki, N. Fujii, S. Sugami, Y. Miyazaki, D. Middleton, H. Tanaka and H. Saji (2015). "Determination of HLA-A, -C, -B, -DRB1 allele and haplotype frequency in Japanese population based on family study." Tissue Antigens **85**(4): 252-259.
- Jameson, S. C., K. A. Hogquist and M. J. Bevan (1995). "Positive selection of thymocytes." Annu Rev Immunol **13**: 93-126.

- Janeway, C. (2005). Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. New York and London, Taylor & Francis Group.
- Jensen, P. E. (1999). "Mechanisms of antigen presentation." Clin Chem Lab Med **37**(3): 179-186.
- Jung, G., J. A. Ledbetter and H. J. Müller-Eberhard (1987). "Induction of cytotoxicity in resting human T lymphocytes bound to tumor cells by antibody heteroconjugates." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(13): 4611-4615.
- Kase, R. (2007). Entwicklung eines ökotoxikologischen Testsystems mit der Entenmuschel (*Anodonta anatina*) zur Erfassung funktioneller Immuntoxizität. Dissertation, Koblenz-Landau.
- Kirkpatrick, D. S., S. A. Gerber and S. P. Gygi (2005). "The absolute quantification strategy: a general procedure for the quantification of proteins and post-translational modifications." Methods **35**(3): 265-273.
- Klug, F., M. Miller, H. H. Schmidt and S. Stevanović (2009). "Characterization of MHC ligands for peptide based tumor vaccination." Curr Pharm Des **15**(28): 3221-3236.
- Kobayashi, K. S. and P. J. van den Elsen (2012). "NLRC5: a key regulator of MHC class I-dependent immune responses." Nat Rev Immunol **12**(12): 813-820.
- Kowalewski, D. (2011). Massenspektrometrische Analyse von Nierenzellkarzinomen zur Entwicklung neuer Tumorstoffe. Diplomarbeit, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.
- Kyzirakos, C. (2013). Häufig erkannte EBV-spezifische CD4⁺ T-Zellepitope für eine optimierte Immuntherapie bei EBV-assoziierten Erkrankungen. Dissertation, Eberhard Karls Universität, Tübingen.
- Lazarski, C. A., F. A. Chaves and A. J. Sant (2006). "The impact of DM on MHC class II-restricted antigen presentation can be altered by manipulation of MHC-peptide kinetic stability." J Exp Med **203**(5): 1319-1328.
- Lenschow, D. J., T. L. Walunas and J. A. Bluestone (1996). "CD28/B7 system of T cell costimulation." Annu Rev Immunol **14**: 233-258.
- Li, Y., M. Bleakley and C. Yee (2005). "IL-21 influences the frequency, phenotype, and affinity of the antigen-specific CD8 T cell response." J Immunol **175**(4): 2261-2269.
- Linehan, D. C., P. S. Goedegebuure, G. E. Peoples, S. O. Rogers and T. J. Eberlein (1995). "Tumor-specific and HLA-A2-restricted cytotoxicity by tumor-associated lymphocytes in human metastatic breast cancer." J Immunol **155**(9): 4486-4491.
- Liu, H., R. G. Sadygov and J. R. Yates, 3rd (2004). "A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics." Anal Chem **76**(14): 4193-4201.
- Lundegaard, C., O. Lund and M. Nielsen (2008). "Accurate approximation method for prediction of class I MHC affinities for peptides of length 8, 10 and 11 using prediction tools trained on 9mers." Bioinformatics **24**(11): 1397-1398.
- Mackall, C. L., T. J. Fry and R. E. Gress (2011). "Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application." Nat Rev Immunol **11**(5): 330-342.

- Madden, D. R. (1995). "The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes." Annu Rev Immunol **13**: 587-622.
- Madden, D. R., D. N. Garboczi and D. C. Wiley (1993). "The antigenic identity of peptide-MHC complexes: a comparison of the conformations of five viral peptides presented by HLA-A2." Cell **75**(4): 693-708.
- Marcotte, E. M. (2007). "How do shotgun proteomics algorithms identify proteins?" Nat Biotechnol **25**(7): 755-757.
- Marsh, S. G. and W. H. O. N. C. f. F. o. t. H. System (2010). "Nomenclature for factors of the HLA system, update April 2010." Tissue Antigens **76**(6): 501-508.
- Maus, M. V., A. K. Thomas, D. G. Leonard, D. Allman, K. Addya, K. Schlienger, J. L. Riley and C. H. June (2002). "Ex vivo expansion of polyclonal and antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by artificial APCs expressing ligands for the T-cell receptor, CD28 and 4-1BB." Nat Biotechnol **20**(2): 143-148.
- McHeyzer-Williams, M. G., J. D. Altman and M. M. Davis (1996). "Enumeration and characterization of memory cells in the TH compartment." Immunol Rev **150**: 5-21.
- McLafferty, F. W. (1981). "Tandem mass spectrometry." Science **214**(4518): 280-287.
- Mempel, T. R., S. E. Henrickson and U. H. Von Andrian (2004). "T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases." Nature **427**(6970): 154-159.
- Mignot, E., L. Lin, W. Rogers, Y. Honda, X. Qiu, X. Lin, M. Okun, H. Hohjoh, T. Miki, S. Hsu, M. Leffell, F. Grumet, M. Fernandez-Vina, M. Honda and N. Risch (2001). "Complex HLA-DR and -DQ interactions confer risk of narcolepsy-cataplexy in three ethnic groups." Am J Hum Genet **68**(3): 686-699.
- Miltenyi, S., W. Muller, W. Weichel and A. Radbruch (1990). "High gradient magnetic cell separation with MACS." Cytometry **11**(2): 231-238.
- Misumi, Y., K. Miki, A. Takatsuki, G. Tamura and Y. Ikehara (1986). "Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes." J Biol Chem **261**(24): 11398-11403.
- Mosiman, V. L., B. K. Patterson, L. Canterero and C. L. Goolsby (1997). "Reducing cellular autofluorescence in flow cytometry: an in situ method." Cytometry **30**(3): 151-156.
- Neefjes, J., M. L. Jongsma, P. Paul and O. Bakke (2011). "Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation." Nat Rev Immunol **11**(12): 823-836.
- Neefjes, J. J., F. Momburg and G. J. Hämmerling (1993). "Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter." Science **261**(5122): 769-771.
- Nguyen, S. and J. B. Fenn (2007). "Gas-phase ions of solute species from charged droplets of solutions." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(4): 1111-1117.
- Noble, J. A. and A. M. Valdes (2011). "Genetics of the HLA region in the prediction of type 1 diabetes." Curr Diab Rep **11**(6): 533-542.
- O'Donnell, H. and S. J. McSorley (2014). "Salmonella as a model for non-cognate Th1 cell stimulation." Front Immunol **5**: 621.

- Oelke, M. and J. P. Schneck (2004). "HLA-Ig-based artificial antigen-presenting cells: setting the terms of engagement." Clin Immunol **110**(3): 243-251.
- Pappin, D. J., P. Hojrup and A. J. Bleasby (1993). "Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting." Curr Biol **3**(6): 327-332.
- Peper, J. (2015). Identification and characterization of naturally presented, immunogenic HLA ligands for establishing a peptide-based anti-tumor vaccination in Ovarian Cancer. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.
- Peper, J. K., H. Schuster, M. W. Löffler, B. Schmid-Horch, H. G. Rammensee and S. Stevanović (2014). "An impedance-based cytotoxicity assay for real-time and label-free assessment of T-cell-mediated killing of adherent cells." J Immunol Methods **405**: 192-198.
- Pollok, K. E., Y. J. Kim, Z. Zhou, J. Hurtado, K. K. Kim, R. T. Pickard and B. S. Kwon (1993). "Inducible T cell antigen 4-1BB. Analysis of expression and function." J Immunol **150**(3): 771-781.
- Rabsteyn, A. (2011). Massenspektrometrische Analyse der HLA-Liganden im gesunden Nierengewebe. Diplomarbeit, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.
- Rammensee, H., J. Bachmann, N. P. Emmerich, O. A. Bachor and S. Stevanović (1999). "SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs." Immunogenetics **50**(3-4): 213-219.
- Rammensee, H. G., T. Friede and S. Stevanović (1995). "MHC ligands and peptide motifs: first listing." Immunogenetics **41**(4): 178-228.
- Rammensee, H. G. and H. Singh-Jasuja (2013). "HLA ligandome tumor antigen discovery for personalized vaccine approach." Expert Rev Vaccines **12**(10): 1211-1217.
- Rawlings, N. D. and A. J. Barrett (1994). "Families of serine peptidases." Methods Enzymol **244**: 19-61.
- Redmond, W. L., C. E. Ruby and A. D. Weinberg (2009). "The role of OX40-mediated co-stimulation in T-cell activation and survival." Crit Rev Immunol **29**(3): 187-201.
- Rees, R. (2014). Tumor Immunology and Immunotherapy. United Kingdom, Oxford, Oxford University Press.
- Rogers, P. R., C. Dubey and S. L. Swain (2000). "Qualitative changes accompany memory T cell generation: faster, more effective responses at lower doses of antigen." J Immunol **164**(5): 2338-2346.
- Rosenberg, S. A. (2001). "Progress in human tumour immunology and immunotherapy." Nature **411**(6835): 380-384.
- Rudolf, D., T. Silberzahn, S. Walter, D. Maurer, J. Engelhard, D. Wernet, H. J. Bühring, G. Jung, B. S. Kwon, H. G. Rammensee and S. Stevanović (2008). "Potent costimulation of human CD8 T cells by anti-4-1BB and anti-CD28 on synthetic artificial antigen presenting cells." Cancer Immunol Immunother **57**(2): 175-183.
- Sampson, J. H., A. B. Heimberger, G. E. Archer, K. D. Aldape, A. H. Friedman, H. S. Friedman, M. R. Gilbert, J. E. Herndon, 2nd, R. E. McLendon, D. A. Mitchell, D. A. Reardon, R. Sawaya, R. J. Schmittling, W. Shi, J. J. Vredenburgh and D. D. Bigner (2010). "Immunologic escape after prolonged progression-free survival with epidermal

- growth factor receptor variant III peptide vaccination in patients with newly diagnosed glioblastoma." J Clin Oncol **28**(31): 4722-4729.
- Schneider, P., F. MacKay, V. Steiner, K. Hofmann, J. L. Bodmer, N. Holler, C. Ambrose, P. Lawton, S. Bixler, H. Acha-Orbea, D. Valmori, P. Romero, C. Werner-Favre, R. H. Zubler, J. L. Browning and J. Tschopp (1999). "BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth." J Exp Med **189**(11): 1747-1756.
- Schultze, J. L., M. J. Seamon, S. Michalak, J. G. Gribben and L. M. Nadler (1997). "Autologous tumor infiltrating T cells cytotoxic for follicular lymphoma cells can be expanded in vitro." Blood **89**(10): 3806-3816.
- Schuster, H. (2015). Applied immunopeptidomics – Identification and characterization of novel targets for the immunotherapy of ovarian cancer. Dissertation, Eberhard Karls Universität, Tübingen.
- Scigelova, M. and A. Makarov (2006). "Orbitrap mass analyzer--overview and applications in proteomics." Proteomics **6 Suppl 2**: 16-21.
- Seder, R. A., P. A. Darrah and M. Roederer (2008). "T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design." Nat Rev Immunol **8**(4): 247-258.
- Shevchenko, A., H. Tomas, J. Havlis, J. V. Olsen and M. Mann (2006). "In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes." Nat Protoc **1**(6): 2856-2860.
- Shortman, K., M. Egerton, G. J. Spangrude and R. Scollay (1990). "The generation and fate of thymocytes." Semin Immunol **2**(1): 3-12.
- Sidney, J., B. Peters, N. Frahm, C. Brander and A. Sette (2008). "HLA class I supertypes: a revised and updated classification." BMC Immunol **9**: 1.
- Siler, U., M. Seiffert, S. Puch, A. Richards, B. Torok-Storb, C. A. Muller, L. Sorokin and G. Klein (2000). "Characterization and functional analysis of laminin isoforms in human bone marrow." Blood **96**(13): 4194-4203.
- Slingluff, C. L., Jr., G. R. Petroni, K. A. Chianese-Bullock, M. E. Smolkin, S. Hibbitts, C. Murphy, N. Johansen, W. W. Grosh, G. V. Yamshchikov, P. Y. Neese, J. W. Patterson, R. Fink and P. K. Rehm (2007). "Immunologic and clinical outcomes of a randomized phase II trial of two multi-peptide vaccines for melanoma in the adjuvant setting." Clin Cancer Res **13**(21): 6386-6395.
- Speiser, D. E., D. Lienard, N. Rufer, V. Rubio-Godoy, D. Rimoldi, F. Lejeune, A. M. Krieg, J. C. Cerottini and P. Romero (2005). "Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909." J Clin Invest **115**(3): 739-746.
- Steinl, C., M. Essl, T. D. Schreiber, K. Geiger, L. Prokop, S. Stevanović, O. Potz, H. Abele, J. T. Wessels, W. K. Aicher and G. Klein (2013). "Release of matrix metalloproteinase-8 during physiological trafficking and induced mobilization of human hematopoietic stem cells." Stem Cells Dev **22**(9): 1307-1318.
- Stephens, R., R. Horton, S. Humphray, L. Rowen, J. Trowsdale and S. Beck (1999). "Gene organisation, sequence variation and isochore structure at the centromeric boundary of the human MHC." J Mol Biol **291**(4): 789-799.

- Stevanović, S. and H. Schild (1999). "Quantitative aspects of T cell activation - peptide generation and editing by MHC class I molecules." Semin Immunol **11**(6): 375-384.
- Szolek, A., B. Schubert, C. Mohr, M. Sturm, M. Feldhahn and O. Kohlbacher (2014). "OptiType: precision HLA typing from next-generation sequencing data." Bioinformatics **30**(23): 3310-3316.
- Tagaya, Y., R. N. Bamford, A. P. DeFilippis and T. A. Waldmann (1996). "IL-15: a pleiotropic cytokine with diverse receptor/signaling pathways whose expression is controlled at multiple levels." Immunity **4**(4): 329-336.
- Tan, J. T., J. Ha, H. R. Cho, C. Tucker-Burden, R. C. Hendrix, R. S. Mittler, T. C. Pearson and C. P. Larsen (2000). "Analysis of expression and function of the costimulatory molecule 4-1BB in alloimmune responses." Transplantation **70**(1): 175-183.
- Terasaki, P. I. and J. D. McClelland (1964). "Microdroplet Assay of Human Serum Cytotoxins." Nature **204**: 998-1000.
- Thomson, J. J. (1913). "On the Appearance of Helium and Neon in Vacuum Tubes." Science **37**(949): 360-364.
- Ulmer, A. J., W. Scholz, M. Ernst, E. Brandt and H. D. Flad (1984). "Isolation and subfractionation of human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by density gradient centrifugation on Percoll." Immunobiology **166**(3): 238-250.
- Van der Bruggen, P., Y. Zhang, P. Chaux, V. Stroobant, C. Panichelli, E. S. Schultz, J. Chapiro, B. J. Van den Eynde, F. Brasseur and T. Boon (2002). "Tumor-specific shared antigenic peptides recognized by human T cells." Immunol Rev **188**: 51-64.
- Van Poppel, H., S. Joniau and S. W. Van Gool (2009). "Vaccine therapy in patients with renal cell carcinoma." Eur Urol **55**(6): 1333-1342.
- Veiga-Fernandes, H., U. Walter, C. Bourgeois, A. McLean and B. Rocha (2000). "Response of naive and memory CD8⁺ T cells to antigen stimulation in vivo." Nat Immunol **1**(1): 47-53.
- Wade, J. A. (1996). "New molecular approaches to tissue typing." Transplant Proc **28**(4): 2022-2023.
- Walter, S., L. Herrgen, O. Schoor, G. Jung, D. Wernet, H. J. Buhring, H. G. Rammensee and S. Stevanović (2003). "Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres." J Immunol **171**(10): 4974-4978.
- Walter, S., T. Weinschenk, A. Stenzl, R. Zdrojowy, A. Pluzanska, C. Szczylik, M. Staehler, W. Brugger, P. Y. Dietrich, R. Mendrzyk, N. Hilf, O. Schoor, J. Fritsche, A. Mahr, D. Maurer, V. Vass, C. Trautwein, P. Lewandrowski, C. Flohr, H. Pohla, J. J. Stanczak, V. Bronte, S. Mandruzzato, T. Biedermann, G. Pawelec, E. Derhovanessian, H. Yamagishi, T. Miki, F. Hongo, N. Takaha, K. Hirakawa, H. Tanaka, S. Stevanović, J. Frisch, A. Mayer-Mokler, A. Kirner, H. G. Rammensee, C. Reinhardt and H. Singh-Jasuja (2012). "Multi-peptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival." Nat Med **18**(8): 1254-1261.
- Whitehouse, C. M., R. N. Dreyer, M. Yamashita and J. B. Fenn (1985). "Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers." Anal Chem **57**(3): 675-679.

-
- Wild, J., B. J. Schmiedel, A. Maurer, S. Raab, L. Prokop, S. Stevanović, D. Dorfel, P. Schneider and H. R. Salih (2015). "Neutralization of (NK-cell-derived) B-cell activating factor by Belimumab restores sensitivity of chronic lymphoid leukemia cells to direct and Rituximab-induced NK lysis." Leukemia **29**(8): 1676-1683.
- Wolfl, M. and P. D. Greenberg (2014). "Antigen-specific activation and cytokine-facilitated expansion of naive, human CD8+ T cells." Nat Protoc **9**(4): 950-966.
- Xie, M., J. Li and T. Jiang (2010). "Accurate HLA type inference using a weighted similarity graph." BMC Bioinformatics **11 Suppl 11**: S10.
- Xu, Y., H. Han, F. Zhang, S. Lv, Z. Li and Z. Fang (2015). "Lesion human leukocyte antigen-F expression is associated with a poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma." Oncol Lett **9**(1): 300-304.
- Yaneva, R., C. Schneeweiss, M. Zacharias and S. Springer (2010). "Peptide binding to MHC class I and II proteins: new avenues from new methods." Mol Immunol **47**(4): 649-657.
- Yates, J. R., C. I. Ruse and A. Nakorchevsky (2009). "Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications." Annu Rev Biomed Eng **11**: 49-79.
- Yewdell, J. W. (2001). "Not such a dismal science: the economics of protein synthesis, folding, degradation and antigen processing." Trends Cell Biol **11**(7): 294-297.
- Zeng, R., R. Spolski, S. E. Finkelstein, S. Oh, P. E. Kovanen, C. S. Hinrichs, C. A. Pisoni, M. F. Radonovich, J. N. Brady, N. P. Restifo, J. A. Berzofsky and W. J. Leonard (2005). "Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8+ T cell expansion and function." J Exp Med **201**(1): 139-148.
- Zhang, X., S. Sun, I. Hwang, D. F. Tough and J. Sprent (1998). "Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15." Immunity **8**(5): 591-599.