

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. med. vet. T. Göbel

angefertigt am
Interfakultären Institut für Zellbiologie
der Universität Tübingen
Abteilung Immunologie
(Prof. Dr. rer. nat. Stefan Stevanović)

Charakterisierung des HLA-Klasse-I Ligandoms in Primärtumoren beim humanen Nierenzellkarzinom

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Ursula Marianne Kohlhofer
aus Stuttgart

München 2011

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatte:	Univ.-Prof. Dr. Göbel
Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. Dr. Erhard

Tag der Promotion: 12. Februar 2011

Meiner Mutter und meiner Schwester Regine

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1 Einleitung	3
1.1 Das Nierenzellkarzinom	3
1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren	3
1.1.2 Äthiologie und Pathogenese	5
1.1.3 Einteilung der Erkrankungsstadien und Prognose	6
1.1.4 Behandlungsstrategien	8
1.2 Angeborenes unspezifisches und erworbenes adaptives Immunsystem	10
1.2.1 Zellen des Immunsystems	11
1.2.2 Aufbau des T-Zell-Rezeptors (TCR)	13
1.2.3 Der Haupthistokompatibilitätskomplex und seine Funktion	14
1.3 Transformation von Zellen und Einteilung der tumorassoziierten Antigene (TAAs)	19
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit	22
2 Material & Methoden	23
2.1 Material	23
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	23
2.1.2 Chemikalien und Antikörper	24
2.1.3 Rezepturen	25
2.2 Biochemische Methoden	26
2.2.1 Isolierung MHC-Klasse-I gebundener Peptide	26
2.2.2 Modifizierung von Peptiden	28
2.3 Analytische Methoden	29
2.3.1 Massenspektrometrische Analysen	29
2.3.2 LC-MS-Kopplung	34
2.3.3 Interpretation von MS/MS-Spektren zur Peptidanalyse	35
2.3.4 Computerunterstützte Interpretation von MS/MS-Spektren	38
2.3.5 Vergleichende Genexpressionsanalyse	39

3	Ergebnisse	40
3.1	Gewebeproben im Überblick	40
3.2	Massenspektrometrische Analyse von soliden Tumoren des Nierenzellkarzinoms	42
3.2.1	Identifizierung von HLA-Klasse-Liganden	42
3.2.2	Identifizierung von HLA-Klasse-I Liganden nach Guanidinylierung und Nikotinylierung	45
3.2.3	Identität von HLA-Klasse-I Liganden aus soliden Tumoren	48
3.2.4	Gesamtdarstellung aller identifizierten HLA-Klasse-I Liganden	61
3.3	Vergleichende Genexpressionsanalyse von Tumor und autologem Normalgewebe	62
3.3.1	Isolierung und Analyse von differentiell exprimierten Genen	62
3.3.2	Identifizierung überexprimierter Proteine	64
3.3.3	Identifizierung unterexprimierter Proteine	70
4	Diskussion	72
4.1	Überexprimierte Proteine	73
4.1.1	Proteine der Signaltransduktion	73
4.1.2	Proteine der Faltung	77
4.1.3	Autoantigene	78
4.1.4	Proteine des Blutplasmas	86
4.2	Unterexprimierte Proteine	87
4.2.1	Proteine der Signaltransduktion	87
4.3	Peptid-Paar	88
4.4	Endbeurteilung	89
	Zusammenfassung	91
	Summary	92
	Abkürzungsverzeichnis	93
	Literaturverzeichnis	96
	Danksagung	108

1 Einleitung

1.1 Das Nierenzellkarzinom

Das Nierenzellkarzinom gilt nach Prostata- und Harnblasenkrebs als dritthäufigste maligne Erkrankung des Urogenitaltraktes des Erwachsenen und betrifft rund 3% aller malignen humanen Erkrankungen. Von allen urologischen Neoplasien hat es die schlechteste Prognose (Rekha et al. 2008). Da die Erkrankung meist nur unspezifische Symptome wie Mattigkeit, Appetitlosigkeit, unspezifischer Gewichtsverlust und / oder Fieber aufweist, wird die Diagnose häufig erst in einem weit fortgeschrittenen Erkrankungsstadium gestellt. Viele Tumoren der Nieren werden heute zufällig, im Rahmen bildgebender Verfahren auf Grund anderer Erkrankungen diagnostiziert. Dennoch haben bis zu einem Drittel der Erkrankten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits Metastasen (Axwijk et al. 2010), da die klassische Symptomentrias bestehend aus Hämaturie, Flankenschmerz und tastbare abdominale Raumforderung in den meisten Fällen fehlt. Zur Diagnostik dienen neben labordiagnostischer Verfahren die bildgebenden Verfahren wie Sonographie, Computertomographie und Magnetresonanztomographie als das Mittel der Wahl.

Morphologisch liegt für gewöhnlich ein solider, in der Regel an den Nierenpolen lokalisierter Tumor mit einem Durchmesser von 3-15 cm vor. Die Schnittfläche der Tumoren reicht von hellgelb bis grauweiß, da sie häufig Nekrosen, Blutungen und Zysten aufweisen. Infolgedessen stellen sie sich als so genanntes „buntes Bild“ dar. Die Metastasierung erfolgt hämatogen in absteigender Reihenfolge in Lunge, Knochen, Leber, ZNS und Nebennieren. Die lymphogene Metastasierung erfolgt in die regionären Lymphknoten am Nierenhilus. Nach einem erfolgreich therapierten Nierenzellkarzinom können noch nach vielen Jahren Metastasen auftreten.

1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

In den letzten Jahren ist die Erkrankungsrate des Nierenzellkarzinoms beständig angestiegen (Abbildung 1). Es besteht ein erhöhtes Risiko, ab dem 50. Lebensjahr an einem Nierenzellkarzinom zu erkranken. Der Erkrankungsgipfel liegt bei 70-80 jährigen Frauen und bei 60-80 jährigen Männern. Vom Robert Koch-Institut wird die Neuerkrankungsrate in Deutschland bei Männern auf 10.750 und bei Frauen auf 6.650 geschätzt. Im Jahr 2006 betrug die Erkrankungsrate bei Männern 10.050, bei Frauen 6.440. Dies entspricht einem errechneten Anteil von 4,4 % bei Männern und von 3,3 % bei Frauen bezogen auf alle Krebserkrankungen pro Jahr (Abbildung 2). Die Sterbefälle betragen bei Männern 3,6 %, bei Frauen 2,7 % pro Jahr und sind damit relativ hoch. Die Mortalität für Europa wird derzeit auf 7,5 / 100 000 Einwohner geschätzt (RKI, 7. Ausgabe 2010).

Altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberaten in Deutschland 1980–2006, ICD-10 C64–66, C68
Fälle pro 100.000 (Europastandard)

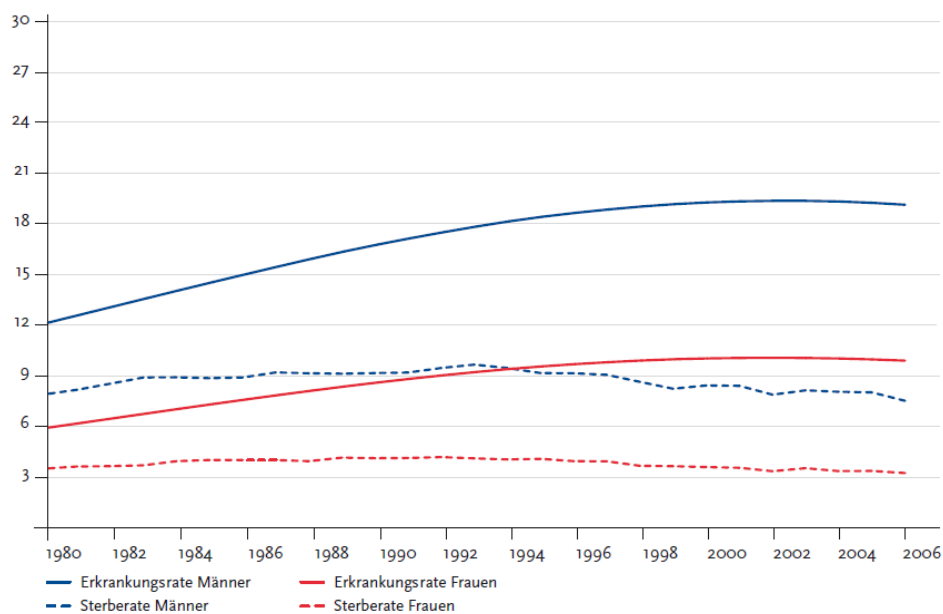


Abbildung 1: Altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberaten beim Nierenzellkarzinom in Deutschland von 1980–2006. Fälle pro 100.000 (Europastandard); Quelle: RKI, 7. Ausgabe 2010.

Altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberaten in Deutschland im internationalen Vergleich 2006, ICD-10 C64–66, C68
(außer Frankreich, Australien: 2005, Schweiz: 2003–2006, Belgien Sterberaten: 2004)
Fälle pro 100.000 (Europastandard)

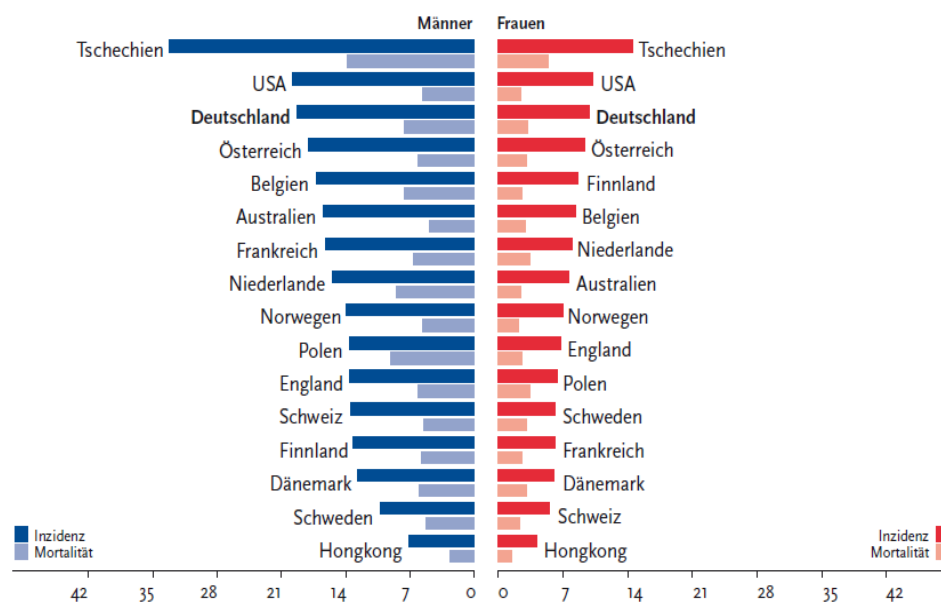


Abbildung 2: Altersstandartisierte Neuerkrankungs- und Sterberaten beim Nierenzellkarzinom in Deutschland im internationalen Vergleich für das Jahr 2006, Fälle pro 100.000 (Europastandard); Quelle: RKI, 7. Ausgabe 2010.

Das Risiko am Nierenzellkarzinom zu erkranken ist noch nicht völlig geklärt. Nikotinabusus gilt als einer der Risikofaktoren (IARC press 2007). Weiterhin scheint ein Zusammenhang zwischen Adipositas (Übergewicht) sowie Hypertension (Bluthochdruck) – durch direkten Schaden oder metabolische Störungen am Nierenkörperchen – und dem Auftreten von Nierenkrebs zu bestehen (Brennan et al. 2008). Eine chronische Niereninsuffizienz begünstigt insgesamt und unabhängig von der Ursache die Krebsentstehung.

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Im angloamerikanischen Raum wird für die Bezeichnung des Nierenzellkarzinoms der Begriff *Renal Cell Carcinoma* (RCC) verwandt. Man bezeichnet damit epitheliale Tumoren, die sich von unterschiedlichen Abschnitten des Nierentubulussystems oder des Sammelrohrsystems ableiten. Die Karzinogenese ist jedoch weitgehend unbekannt. Diese malignen Tumoren der Niere im Erwachsenenalter sind zu etwa 85 % klarzellige Nierenkarzinome (ccRCC). Sie haben ihren Ursprung im proximalen Tubulus des Nephrons. Als histologisches Charakteristikum weisen die Tubulusepithelzellen ein helles und klares Zytoplasma auf, das durch eine hohe Konzentration von Glykogen und Fetten zustande kommt (Abbildung 3).

Das papilläre Nierenzellkarzinom (pRCC) ist das zweithäufigste Karzinom des renalen Tubulusepithels. Auch dieser Typ kommt im proximalen Tubulusabschnitt, jedoch nur zu 10-15 %, vor. Weitere Klassifikationen sind das chromophobe Nierenzellkarzinom (chRCC), das Sammelrohrkarzinom (*collecting duct carcinoma*) sowie das unklassifizierte Nierenzellkarzinom (*unclassified RCC*), zu dem auch das sarkomatoide Karzinom zählt, welches sich oft aus einem ccRCC entwickelt. Alle drei letztgenannten Karzinome kommen in den distalen Abschnitten der Nephrone vor. Die Häufigkeit beträgt hier 1-5% (Störkel et al. 1997). Die Einteilung in die unterschiedlichen histologischen Typen gilt zudem als Prognoseparameter. So weisen z. B. das chromophobe und papilläre Nierenzellkarzinom eine günstigere Prognose auf als das klarzellige Nierenzellkarzinom, das sarkomatoide Nierenzellkarzinom hingegen verfügt über ein erhöhtes Progressionsrisiko (de Peralta-Venturina et al. 2001). Letzteres stellt eine extreme Form der Entdifferenzierung eines Nierenzellkarzinoms dar. Es entwickelt sich meistens aus einem klarzelligen oder papillären Nierenzellkarzinom. Beim sarkomatoiden Nierenzellkarzinom sind die Tumorzellen histomorphologisch spindelförmig oder polymorph und weisen eine extrem hohe Proliferation mit rapidem Wachstums- und Metastasierungsverhalten auf (Delahunt et al. 2007).

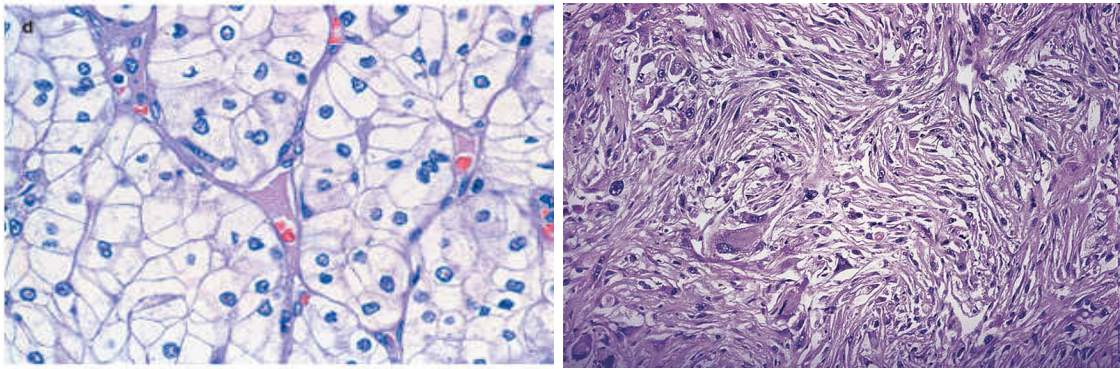


Abbildung 3: Vergleichende Darstellung eines klarzelligen (links) und eines sarkomatoiden Nierenzellkarzinoms (rechts). Links: Helles und klares Zytoplasma durch hohen Glykogen- und Lipidgehalt, dadurch entsteht ein pflanzenzellartiges Aussehen mit zartem Zytoplasmasaum. Rechts: Spindelförmige und polymorphe Tumorzellen, die morphologisch bindegewebszelligen Charakter aufweisen. Quellen: (links) Böcker et al. 4. Auflage 2008, Elsevier; (rechts) Elsevier Inc. 2006 aus www.pathconsultddx.com.

Ein familiär bedingtes Auftreten des Nierenzellkarzinoms kommt vor allem beim Von-Hippel-Lindau-Syndrom (VHL) vor. Bei der Mehrzahl der sporadischen Nierenkarzinome sind Mutationen des VHL-Gens nachweisbar. Beim Von-Hippel-Lindau-Syndrom handelt es sich um ein autosomal dominant vererbtes Neoplasie-Syndrom, welches durch eine Genmutation des kurzen Arms von Chromosom 3 hervorgerufen wird. Es verursacht benigne und maligne Tumoren verschiedenster Organe. Die Wahrscheinlichkeit, dass bei Hippel-Lindau-Patienten ein klarzelliges Nierenzellkarzinom auftritt, beträgt 25-70 % (Lonser et al. 2003).

1.1.3 Einteilung der Erkrankungsstadien und Prognose

Die Tumorausdehnung zum Zeitpunkt der Erstdiagnose beeinflusst maßgeblich die Prognose (Moch et al. 2000). Sie wird mit der Tumorgraduierung (*Grading*) und der Stadieneinteilung (*Staging*) erfasst. Die Einteilung epithelialer Neoplasien der Nieren wird gemäß der *International Union Against Cancer* (UICC) und dem *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (Störkel et al. 1997) vorgenommen.

Das *Grading* beinhaltet histologische und zytologische Parameter wie Kernatypien, Mitosezahl und Differenzierungsgrad (Ähnlichkeit zum Ursprungsgewebe). Die Differenzierungsgrade werden nach UICC/AJCC von Grad 1 bis Grad 4 folgendermaßen eingeteilt:

- G1 Gut differenziertes Nierenzellkarzinom
- G2 Mäßig differenziertes Nierenzellkarzinom
- G3 Schlecht differenziertes Nierenzellkarzinom
- G4 Undifferenziertes Nierenzellkarzinom

Neben dem histologischen Differenzierungsgrad ist das Tumorstadium, das *Staging*, einer der wichtigsten prognostischen Parameter. Es definiert die lokale Ausbreitung des Primärtumors (T), die regionäre Lymphknotenmetastasierung (N) sowie die Fernmetastasen (M) und wird als TNM-System bezeichnet. Dieses TNM-System besagt, dass die Prognose umso günstiger ausfällt, je niedriger der Tumor eingestuft wird (Moch et al. 2009).

Tabelle 1: TNM-Klassifikation der Nierenzellkarzinome nach UICC 2002

T-Primärtumor	
T1	Tumor auf die Niere begrenzt, maximal 7 cm in größter Ausdehnung
T1a	Tumor misst 4,0 cm oder weniger in größter Ausdehnung
T1b	Tumor misst zwischen 4,0 und 7,0 cm in größter Ausdehnung
T2	Tumor auf die Niere begrenzt, größer als 7 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor breitet sich in größere Venen aus und / oder infiltriert Nebenniere oder perirenales Gewebe, jedoch nicht über die Gerota-Faszie (Fascia renis)
T3a	Tumor infiltriert Nebenniere oder perirenales Gewebe, aber nicht über die Gerota-Faszie
T3b	Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in Nierenvene(n) oder Vena Cava unterhalb des Zwerchfells
T3c	Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in Vena Cava oberhalb des Zwerchfells
T4	Tumor wächst über die Gerota-Faszie hinaus
N-regionäre Lymphknoten	
Nx	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	keine regionäre Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in einem regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in mehr als einem regionären Lymphknoten
M-Fernmetastasen	
Mx	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden

Quelle: AJCC cancer staging manual. 6th ed. New York, NY: Springer, 2002.

Um die unterschiedlichen Ausprägungen aller drei Kategorien gleichzeitig berücksichtigen zu können, werden diese TNM-Klassifikationen in das UICC-Stadium I-IV zusammengefasst. Diese Einteilung beschreibt dabei die 5-Jahres-Überlebensrate. So liegen nach neuester Schätzung die 5-Jahres-Überlebensraten bei Patienten mit einem UICC-Stadium I und II jeweils bei 80 % bzw. 73 %, im Stadium III und IV bei nur noch 55 % bzw. 17 % (Nese et al. 2009).

Tabelle 2: UICC-Stadieneinteilung des Nierenzellkarzinoms nach der International Union Against Cancer (UICC)

UICC-Stadium	T-Kategorie	N-Kategorie	M-Kategorie
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
IV	T4	N0, N1	M0
	Jedes T	N2	M0
	Jedes T	Jedes M	M1

Quelle: AJCC cancer staging manual. 6 th ed. New York, NY: Springer; 2002.

1.1.4 Behandlungsstrategien

1.1.4.1 Chirurgie

Noch heute gilt die komplette Entfernung der tumortragenden Niere, die radikale Nephrektomie, als Goldstandardtherapie. Normalerweise wird bei der radikalen Nephrektomie der betroffenen Niere auch die umgebende Fettkapsel mit reseziert. Bei entsprechend kleinen oder randständigen Tumoren oder wenn nur noch eine Niere vorhanden ist, kann alternativ zur Nephrektomie eine organerhaltende Resektion durchgeführt werden. Dies stellt aber eine schwierige Herausforderung des chirurgischen Managements dar. Die erkrankungsspezifischen Überlebensraten führen zu zufriedenstellenden Ergebnissen bei gleichzeitig erhaltender Nierenfunktion (Lee DJ et al. 2010). Erst nach Zusammentragen aller präklinischen und postoperativen TNM-Klassifikationen entscheidet sich die Wahl der anschließenden weiterführenden Therapie.

1.1.4.2 Klassische Chemo- und Strahlentherapie

Die Chemotherapie repräsentiert normalerweise einen unverzichtbaren Bestandteil der Behandlung von Krebserkrankungen und ist gegenwärtig eine der wirkungsvollsten Therapieformen bei der Behandlung von Krebs. Jedoch spricht die Mehrzahl der Patienten bei der Behandlung des Nierenzellkarzinoms nur unzureichend oder gar nicht darauf an (Yagoda et al. 1995; Hartmann und Bokemeyer 1999). Einer der Hauptgründe hierfür liegt in der *Multidrug*-Resistenz (MDR), die auch als Arzneimittel-Vielfachresistenz bezeichnet wird. Die Ausprägung einer *Multidrug*-Resistenz wird durch die Expression einer Reihe von MDR-assoziierten Genen verursacht (Gottesman et al. 2002; Borst et al. 2002). Mitverantwortlich für diese Arzneimittelresistenz ist die Proteinsuperfamilie der ABC-Transporter (*ATP-binding cassette transporter*), über die eine Vielzahl an Medikamenten intra- und extrazellulär transloziert wird.

Diese ABC-Transporter zählen zur größten Genfamilie transmembraner Proteine (Dean et al. 2001) und dienen als *Multidrug*-Resistenz-assoziierte Gene. Zu diesen *Multidrug*-Resistenz-assoziierten Genen zählen auch die für die ABC-Transporter kodierenden Gene wie das *Multidrug Resistance Gene 1* (MDR1). Dieses Gen selbst kodiert für das Genprodukt Phospho-Glykoprotein (Pgp), welches Substrate aus Zellen transportiert und für die eigentliche Medikamentenresistenz von normalerweise sicher wirkenden Immunsuppressiva in der Krebstherapie verantwortlich ist (Morjani und Madoulet 2010).

Wie die Chemotherapie spielt auch die Strahlentherapie zur Behandlung von Primärtumoren nur eine untergeordnete Rolle. Aufgrund der geringen Ansprechbarkeit der Neoplasien kommt es weder bei präoperativer Strahlentherapie (Plasswilm et al. 2001) noch bei postoperativer Strahlentherapie zu einer Prognoseverbesserung von RCC-Patienten (Gez et al. 2002). Trotz dieser unbefriedigenden Erfolge wird die Strahlentherapie bei bestehenden Metastasen, zum Beispiel bei Knochen- oder Gehirnmastasen, im Rahmen eines palliativen Managements eingesetzt. Dadurch werden die Beeinträchtigungen, welche der Patient durch die Metastasen erfährt, gelindert. Angestrebt wird hierbei vor allem eine Schmerzlinderung, um die Lebensqualität der Patienten zu verbessern (DiBiase et al. 1997).

1.1.4.3 Zielgerichtete medikamentöse Therapieformen

Als weitere Therapieform wurde die Immuntherapie durch Einsatz von Interleukin-2 als Monotherapie und als Kombination mit Interferon- α und 5-Fluoruracil viele Jahre lang als mögliche Standardtherapie erachtet. Die Ergebnisse waren jedoch enttäuschend (Motzer et al. 2000; Atzpodien et al. 2004). Aufgrund der schlechten Ergebnisse dieser Therapieform und der unzureichenden Ansprechbarkeit des RCCs auf Chemotherapeutika und Strahlentherapie wird intensiv nach weiteren alternativen Behandlungsstrategien geforscht.

Dabei steht besonderes die „*targeted therapy*“ im Mittelpunkt der Forschung. Diese Wirkstoffpräparate greifen gezielt in verschiedene Signalwege des Tumorstoffwechsels ein und werden begleitend zu den konventionellen Therapiemethoden eingesetzt. Ihr Einsatz findet vor allem bei lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Nierenzellkarzinom statt. Eingesetzt werden vornehmlich Multikinaseinhibitoren und monoklonale Antikörper, die beim Nierenzellkarzinom gute Ergebnisse gezeigt haben. Trotz vielversprechender Ergebnisse kann eine komplette Remission mit diesen Substanzen nur selten erzielt werden. Bei Multikinaseinhibitoren handelt es sich um Substanzen aus der Gruppe der „*small molecules*“. Die beiden Tyrosinkinasehemmer *Sorafenib* und *Sunitinib* verfügen über die besondere Eigenschaft, dass sie gleichzeitig mehrere Tyrosinkinasen hemmen können. So können sie durch Hemmung der Wachstumsfaktoren VEGF (*vascular epithelial growth factor*) und PDGF (*platelet derived growth factor*) die Neoangiogenese und damit die Zellproliferation, welche entscheidend zum Tumorwachstum beiträgt, unterbinden.

Bei der Behandlung mit *Sunitinib* konnte eine progressionsfreie Zeit mit 11 Monaten gegenüber 5 Monaten bei der Behandlung mit IFN (Interferon) deutlich verlängert werden (Motzer et al. 2009). Darüber hinaus wurde ein signifikanter Anstieg der Lebensqualität über den Ausgangswert beobachtet (Cella et al. 2008). Unter der Therapie mit *Sorafenib* konnte bei zuvor unbehandelten Patienten oder Patienten, die nicht mehr als eine Vortherapie erhalten hatten, in einer klinischen Phase-II-Studie eine Tumorremissionsrate von 50 % erzielt werden (Amato 2007).

Die Wirkstoffe *Everolimus* und *Temsirolimus* sind ebenfalls aus der Gruppe der „small molecules“. Sie greifen in den mTOR-Signalweg ein. mTOR ist eine Serin-Threonin-Kinase, die zentralen Einfluss auf das Zellwachstum und die Angiogenese hat. Der monoklonale Antikörper *Bevacizumab* bindet an intravasal zirkulierenden VEGF und verhindert damit die Aktivierung von VEGF-abhängigen Signalwegen. Folglich werden die Neoangiogenese und damit das Tumorwachstum gehemmt. Bei der Kombination von *Bevacizumab* mit Interferon- α konnte eine höhere Remissionsrate von 31 % gegenüber 13 % durch eine Monotherapie mit Interferon- α erzielt werden (Escudier et al. 2007).

1.1.4.4 Onkologische Immuntherapie

Neben der bereits oben erwähnten Immuntherapie haben weitere Immuntherapieformen in die Behandlung des Nierenkrebses Einzug gehalten. Es handelt sich um eine große Zahl therapeutischer Maßnahmen, die allesamt in die immunologischen Wirt-Tumor-Beziehungen eingreifen, um eine spezifische Immunantwort gegen den Tumor auszulösen. Die wichtigsten innovativen Vertreter dieser Therapieformen sind Ganzzellvakzine mit Tumorzellen sowie DNA-, RNA-, Protein- und Peptidvakzine. Sie basieren auf der Identifikation tumorassoziierten Antigene. Die Impfung mit diesen Vakzinen soll zur Verstärkung der Immunantwort führen. Impfstoffe auf der Basis von Tumorantigenen sind nach derzeitigem Stand ein vielversprechender Ansatz, bei denen eine durch T-Zellen vermittelte Immunantwort ausgelöst werden soll, die Tumorzellen abtötet.

1.2 Angeborenes unspezifisches und erworbenes adaptives Immunsystem

Das Immunsystem dient dem Schutz des Körpers gegen eindringende Krankheitserreger wie Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten. Es schützt aber auch vor Fremd- und Schadstoffen, vor Toxinen und gefährlichen körpereigenen Zellen wie Tumorzellen. Das Immunsystem besteht aus zwei Komponenten, dem unspezifischen und dem spezifischen Immunsystem. Diese beiden Komponenten enthalten humorale und zelluläre Elemente.

Das unspezifische Immunsystem wird auch als angeborene Immunität bezeichnet. Es ist von Geburt an vorhanden und kann ein breites Spektrum von Krankheitserregern bekämpfen, da es nicht spezifisch gegen bestimmte molekulare Strukturen gerichtet ist. Zum unspezifischen Immunsystem zählen diejenigen Abwehrmaßnahmen des Körpers, die beim Eindringen eines Erregers als erstes und innerhalb kurzer Zeit aktiv werden. Dazu zählen unter anderem der Säureschutzmantel der Haut, die intakte Epidermis und die Schleimhaut der Hohlorgane. Zu den zellulären Elementen gehören Granulozyten, das Monozyten-Makrophagensystem und natürliche Killerzellen (NK). Das Komplementsystem wird sowohl vom unspezifischen als auch vom spezifischen Immunsystem vereinnahmt und spielt daher auch bei den humoralen Elementen des Immunsystems eine wichtige Rolle.

Das spezifische Immunsystem ist gezielt gegen bestimmte molekulare Strukturen gerichtet und wird von einem komplexen System aus Immunzellen getragen. Es wird auch als adaptives oder erworbenes Immunsystem bezeichnet. Es ist gekennzeichnet durch ein hohes Maß an Spezifität und besitzt die Eigenschaft, nach Erstkontakt mit einem Antigen ein immunologisches Gedächtnis aufzubauen. Bei einem späteren Zweitkontakt mit demselben Antigen ist das Immunsystem dann in der Lage, schneller und präziser zu reagieren. Verantwortlich dafür sind die B- und T-Lymphozyten, die auf ihren Membranoberflächen Rezeptoren tragen, welche die unterschiedlichsten Antigenstrukturen erkennen können und der Haupthistokompatibilitätskomplex. Letzterer präsentiert den Lymphozyten Antigenstrukturen, mit denen ein Teil dieser Zellen eine Bindung eingeht. Neben den hier genannten zellulären Elementen sind die B-Lymphozyten fähig, Immunglobuline zu produzieren. Sie werden daher auch zu den humoralen Elementen des spezifischen Immunsystems gezählt.

1.2.1 Zellen des Immunsystems

1.2.1.1 Natürliche Killerzellen

Die zu den Lymphozyten zählenden natürlichen Killerzellen (NK) stammen aus einer lymphatischen Vorläuferzelle ab. Bei der Differenzierung der NK im Knochenmark ist keine Aktivierung durch Fremdantigene oder *Rearrangement* (Umlagerung) der Gene für Antigenrezeptoren notwendig, weshalb diese zelluläre Komponente zum angeborenen Immunsystem zählt. Im Gegensatz zu B- und T-Lymphozyten tragen NK auf ihren Membranoberflächen ein begrenztes Repertoire antigenspezifischer Rezeptoren. Sie haben damit nur ein begrenztes Erkennungspotential für immunogene Strukturen. Ihre Rezeptoren können jedoch inhibitorisch oder aktivierend wirken. Ihre inhibitorischen Rezeptoren verhindern die Stimulation von aktivierenden Rezeptoren, wenn die inhibitorischen Rezeptoren an eigene MHC-Klasse-I-Moleküle (*major histocompatibility complex*) binden. Dies bedeutet, dass Zielzellen dann lysiert werden können, wenn auf diesen kein MHC-Klasse-I-Molekül erkannt wird – beispielsweise bei virusinfizierten oder maligne entarteten Zellen – dadurch

werden die NK aktiviert. Die Zerstörung der Zielzellen findet vornehmlich durch Ausschüttung von zytotoxischen Granula statt.

1.2.1.2 Lymphozyten

Es gibt zwei große Gruppen von Lymphozyten, die B- und die T-Lymphozyten. Beide Zelltypen entstehen aus einer lymphatischen Vorläuferzelle, die aus einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark differenziert wird. Die Reifung und Differenzierung der T-Lymphozyten von Vorläuferzellen zu funktionellen reifen T-Zellen findet im Thymus statt, die der B-Lymphozyten im Knochenmark.

B-Lymphozyten

Zur ersten großen Gruppe der Lymphozyten zählen die B-Lymphozyten. Sie haben ihre Bedeutung im Immunsystem in der Bildung von Antikörpern (AK). Nach Antigenkontakt über antigenspezifische Rezeptoren können sie sich zu Gedächtniszellen oder zu Plasmazellen differenzieren. Als Plasmazellen können sie große Mengen Antikörper produzieren und geben diese dann als zirkulierende Antikörper ins periphere Blut ab. Allerdings sind Krankheitserreger nur im Blut und in den Extrazellularräumen für diese Antikörper erreichbar. Da sich jedoch einige Krankheitserreger wie beispielsweise Viren, Parasiten oder Bakterien innerhalb von Zellen vermehren können, können sie von Antikörpern nicht aufgespürt werden. Die Zerstörung dieser Eindringlinge wird von der zweiten großen Gruppe der Lymphozyten, den T-Lymphozyten, bewältigt.

T-Lymphozyten

Die T-Zellen sind an der Aktivierung von Makrophagen sowie der Beeinflussung der humoralen Immunantwort beteiligt. Sie gehören – wie die Dendritischen Zellen (DCs) – zum zellulären adaptiven Immunsystem. Die wesentliche Funktion der T-Zellen besteht in der Erkennung spezifischer Peptide durch ihre an den Oberflächen integrierten antigenspezifischen Rezeptoren, den T-Zell-Rezeptoren (*T cell receptor*, TCR). Mit Hilfe dieser T-Zell-Rezeptoren (siehe auch unter Punkt 1.22 und 1.2.3.4) können T-Zellen fremde Antigene erkennen, die durch einen MHC-Komplex auf körpereigenen Zellen präsentiert werden. Dafür benötigt jede T-Zelle einen Rezeptor, der spezifisch ein Antigen erkennt und trotzdem bei allen T-Zellen zur gleichen Reaktion führt.

T-Zellen werden untergliedert in T-Helferzellen (T_H1 , T_H2 , T_H17), in regulatorische T-Zellen (T_{reg}) sowie in zytotoxische Killerzellen (*cytotoxic T lymphocytes*, CTLs). Die T-Helferzellen erkennen mit ihren Rezeptoren sowohl extrazelluläre als auch vaskuläre und intrazelluläre Antigene. Die Präsentation dieser Antigene geschieht durch *antigen presenting cells* (APC). Durch die Präsentation von Antigenen werden Helferzellen angeregt, andere Zellen zu aktivieren, in dem sie beispielsweise Zytokine sezernieren. So aktivieren T_H1 vor allem Makrophagen, die T_H2 dagegen vorwiegend B-Zellen und stimulieren dadurch die Produktion von Antikörpern.

CTLs dagegen können mit ihren Rezeptoren nur zytoplasmatische Antigene – beispielsweise virale oder tumorale Antigene – die mit Hilfe von MHC-I-Komplexen auf Zelloberflächen präsentiert werden, erkennen.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Peptide identifiziert, die von MHC-Klasse-I-Molekülen auf den Zelloberflächen präsentiert wurden. Aus diesem Grunde werden im Folgenden nur die Antigenpräsentation von MHC-I-Komplexen sowie die dazu notwendigen Strukturen für Zellinteraktionen dezidiert beschrieben.

1.2.2 Aufbau des T-Zell-Rezeptors (TCR)

Der TCR ist ein aus Glykoproteinen bestehendes Transmembranmolekül, das in zwei Untergruppen vorkommt. Es sind dies die $\alpha\beta$ - und die $\gamma\delta$ -T-Zellen. Die überwiegende Anzahl reifer T-Zellen im Blut exprimieren die $\alpha\beta$ -T-Zellen. Sie können ihre zugehörigen Antigene nur erkennen, wenn sie von MHC-Molekülen präsentiert werden. Im Gegensatz dazu können die in wesentlich geringeren Mengen vorkommenden $\gamma\delta$ -T-Zellen auch kleine Nichtpeptidantigene direkt erkennen. In der vorliegenden Arbeit liegt der Schwerpunkt auf den $\alpha\beta$ -T-Zellen, weshalb sich im Folgenden der Begriff T-Zellen bzw. T-Lymphozyten ausschließlich auf die $\alpha\beta$ -TCR tragenden T-Zellen bezieht. Diese T-Zell-Rezeptoren bestehen aus je 2 Polypeptidketten, der α - und der β -Kette. Das Gewicht der α -Polypeptidkette beträgt 40-60 kDa, das der β -Polypeptidkette 40-50 kDa. Die α - und β -Ketten der T-Zellen sind über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden. Jede Kette des TCR besitzt eine variable (V) und eine konstante (C) Region, eine Transmembranregion sowie einen kurzen zytosolischen Anteil und besitzt strukturelle Ähnlichkeit mit Fab-Fragmenten eines Antikörpers (Garboczi et al. 1996).

In der α -Kette wird die Verbindung zwischen der V- und C-Region durch ein J-Gen-Segment (J: *joining*) hergestellt. In der β -Kette existiert zusätzlich zwischen der V- und C-Region zum J-Gen-Segment ein D-Gen-Segment (D: *diversity*). Für die Kopplung an ein MHC-Molekül ist die variable Region des TCR verantwortlich. Analog zu den Immunglobulinen unterliegen die V x D x J-Segmente dem Rearrangement während der T-Zell-Differenzierung. Dadurch und durch das Vorhandensein der variablen Segmente des TCR auf verschiedenen Exons, die anschließend durch *Splicing* mit den konstanten Regionen der Rezeptoren gekoppelt werden, ergibt sich eine sehr hohe Variabilität von 10^{15} möglichen T-Zell-Rezeptoren (Rowen et al. 1996).

Der TCR ist mit weiteren Molekülen, den Korezeptoren, an der Zelloberfläche assoziiert. Nur in Verbindung mit einem aus fünf Untereinheiten bestehendem Komplex, dem CD3-Komplex (CD: *Cluster of Differentiation*), bilden die T-Zell-Rezeptoren eine funktionelle Grundeinheit zur Signaltransduktion. Weitere Korezeptoren wie die Moleküle CD4 und CD8, die sich auf funktionell unterschiedlichen T-Zell-Klassen befinden, dienen zur Erkennung von MHC-Klasse-I-Molekülen oder MHC-Klasse-II-Molekülen. Von diesen Rezeptoren bindet das CD8-Molekül an MHC-Klasse-I-Moleküle, das CD4-Molekül bevorzugt an MHC-Klasse-II-Moleküle (Gao et al. 1997). T-Zellen, die den Rezeptor CD8 tragen, differenzieren sich zu zytotoxischen T-Zellen. CD4 tragende T-Zellen dagegen differenzieren sich zu T_H1 -, T_H2 -, T_H17 -Zellen und regulatorischen T-Zellen.

1.2.3 Der Haupthistokompatibilitätskomplex und seine Funktion

Bereits in den zwanziger Jahren wurde anhand von Tierexperimenten an Mäusen entdeckt, dass bei genetisch nicht identischen Tieren Transplantate abgestoßen wurden. Dafür konnten die MHC-Antigene verantwortlich gemacht werden. Der Begriff MHC steht für *Major Histocompatibility Complex* und wird für jede Spezies verwandt. Erst in den fünfziger Jahren gelang es, diese MHC-Antigene auch beim Menschen nachzuweisen. Beim Menschen werden diese MHC-Antigene als HLA-Antigene (*human leukocyte antigen*) bezeichnet. Sie wurden im Jahr 1958 von J. Dausset entdeckt. Der Name *Human Leukocyte Antigen* ist darauf zurückzuführen, dass die ersten Antigene durch den Einsatz von Antikörpern entdeckt wurden, welche gegen menschliche Leukozyten gerichtet waren.

Mit Hilfe des MHC-Komplexes werden zytosolische bzw. intrazelluläre Peptide an Zelloberflächen von APCs transportiert und den TCRs präsentiert. Damit erfüllt das Immunsystem eine seiner wesentlichsten Aufgaben, zwischen krankmachenden gefährlichen und ungefährlichen Stoffen zu unterscheiden. Die klassischen HLA-Moleküle, HLA-Klasse-I und HLA-Klasse-II, werden auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 kodiert und zählen wie die B- und T-Zellen zum erworbenen adaptiven Immunsystem.

1.2.3.1 Aufbau von MHC-Molekülen

Die Gene der MHC-Klasse-I-Moleküle (im Folgenden als MHC-I-Moleküle bezeichnet) für HLA-A, HLA-B und HLA-C befinden sich, mit Ausnahme von β_2 -Mikroglobulin, auf dem kurzen Arm von Chromosom 6. Die MHC-I-Moleküle befinden sich auf nahezu allen kernhaltigen Körperzellen und werden auf den Zelloberflächen von CTLs erkannt. Ihre Benennung hat sich in der Reihenfolge ihrer geschichtlichen Entdeckungen ergeben. MHC-I-Moleküle bestehen aus zwei Polypeptidketten. Die längere etwa 45 kDa schwere α -Kette besteht aus drei Domänen: α_1 -, α_2 - und α_3 -Domäne. Die α_3 -Domäne bildet den transmembranen und einen kurzen intrazellulären Anteil. Die leichtere 12 kDa schwere Kette bildet das β_2 -Mikroglobulin (β_2m), liegt extrazellulär und ist auf Chromosom 15 kodiert. Sie geht mit der α -Kette eine nicht kovalente Bindung ein.

Die α_1 - und α_2 -Domänen falten sich zusammen zu einer Struktur aus zwei getrennten α -Helices, die auf einem Faltblatt aus je vier parallel verlaufenden β -Faltblattsträngen liegt. Die α_1 - und α_2 -Domänen bilden dabei die Wände einer Bindungsgrube, in der die antigenen Peptide gebunden werden. Der TCR erkennt nun das MHC-Molekül sowie das in der Bindungsgrube enthaltene Peptid (Bjorkman et al. 1987; Garrett et al. 1989).

MHC-II-Moleküle befinden sich auf spezialisierten antigenpräsentierenden Zellen wie B-Zellen, Dendritischen Zellen und Makrophagen und ähneln in der Gesamtstruktur den MHC-I-Molekülen, werden auf den Zelloberflächen aber von T_H -Zellen erkannt. Sie bestehen aus einer 32-34 kDa schweren α - und einer 29 kDa schweren β -Polypeptidkette.

Beide Ketten sind nicht kovalent miteinander verbunden, durchdringen die Zellmembran und bestehen aus einer α_1 - und α_2 - bzw. einer β_1 - und β_2 -Domäne. Die nicht membranständigen α_1 - und β_1 -Domänen sind hochpolymorph. Sie bestehen aus einer Bodenplatte aus β -Faltblattsträngen, an der sich seitlich α -Helices anschließen, so dass analog zum MHC-I-Molekül eine Bindungsfurche entsteht (Germain et al. 1986; Madden 1995). In dieser Bindungsfurche liegen die Peptide meist in gestreckter Form.

Aus diesen speziellen Strukturen der MHC-Moleküle ergeben sich bei verschiedenen MHC-Molekülen bevorzugte Peptidmotive (Rammensee et al. 1993). Die C- und N-Termini der Peptide werden über unveränderliche Positionen der Bindungsfurchen gehalten (Bouvier und Wiley 1994), die Seitenketten jedoch stehen in Interaktion mit Bindungstaschen innerhalb der Furche. Diese Bindungsfurchen sind hochpolymorph, werden durch mehrere spezifische Aminosäuren gebildet (Falk et al. 1991; Saper et al. 1991) und binden sogenannte Ankerreste der Peptide. Als Ankerreste werden kleine Gruppen von nahen verwandten Aminosäuren bezeichnet, die an der gleichen Position im Peptidliganden eines MHC-Moleküls auftreten. Sie bilden die Grundlage der großen Variabilität verschiedener MHC-I-Allotypen und der dazu passenden Peptidliganden (Rammensee et al. 1993). Daraus ergibt sich aus den Taschen eines jeden Moleküls und den Ankerresten seiner Liganden ein spezifisches Peptidmotiv, wodurch eine Vorhersage von MHC-I-Liganden möglich wird (Pamer et al. 1991; Rötzschke et al. 1991; Parker et al. 1994). Mit Hilfe eines Programms wie beispielsweise SYFPEITHI, welches einen Liganden anhand seiner wahrscheinlichen Bindungseigenschaften auf einem bestimmten MHC-I-Molekül beurteilt, kann die Vorhersage von präsentierten Peptiden erfolgen (Rammensee et al. 1999).

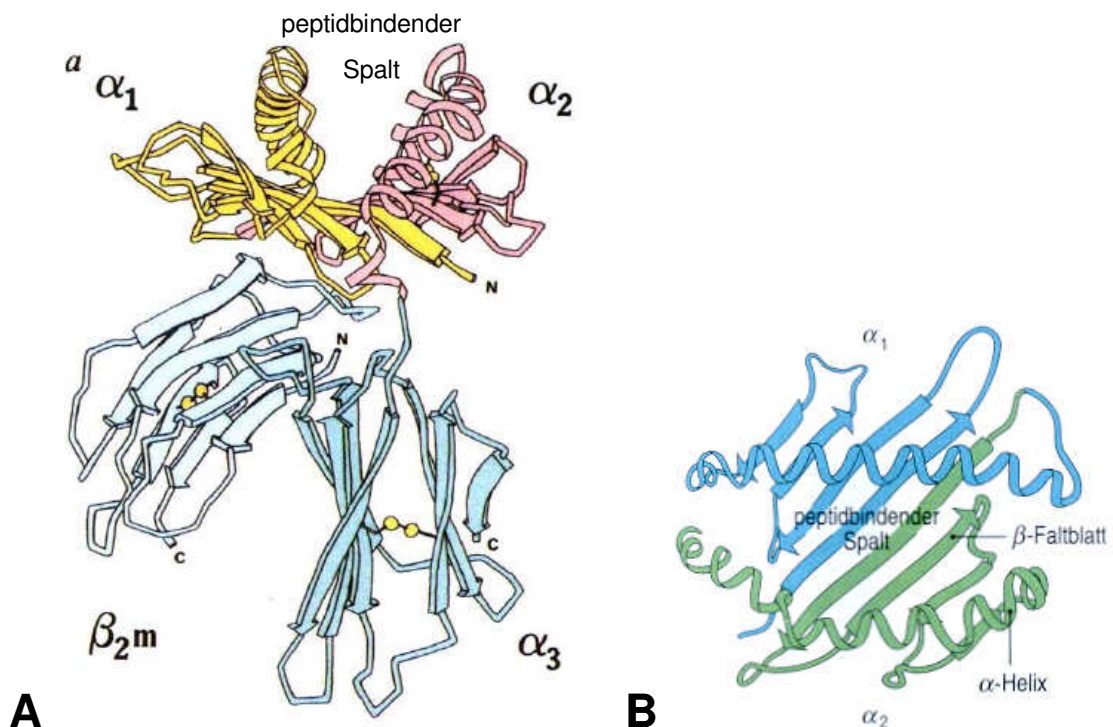


Abbildung 4: Röntgenstrukturanalyse als Banddiagramm eines MHC-Klasse-I-Moleküls; A) HLA-A*02:01-Molekül ohne gebundenes Peptid (Quelle: Bjorkman et al. 1987); B) das Aufsichtmodell zeigt die parallel verlaufenden β -Faltblattstränge sowie die Bindungsfurche, die durch die Faltung der α_1 - und α_2 -Domäne erzeugt wird (Quelle: Janeway 2009).

1.2.3.2 Diversität von MHC-Molekülen

Wie bereits oben erwähnt haben Menschen drei Genorte für die MHC-I-Moleküle. Es sind dies die Gene für die α -Kette der antigenbindenden Seite, die als HLA-A, -B und -C bezeichnet werden (Bjorkman und Parham 1990). Für die MHC-II-Moleküle kodieren die Moleküle HLA-DR, -DP und -DQ jeweils für die α - und β -Kette. Damit entsteht ein ausgeprägter Polymorphismus. Ein Mensch trägt auf jedem Chromosom 6 etwa 12 verschiedene HLA-Allele in seinen Zellen. Alle diese MHC-Moleküle können ein anderes Spektrum von Peptiden binden und so den T-Zellen präsentieren. Durch das Vorkommen von mehreren Allelen jeder MHC-Klasse und dem breiten Spektrum der Peptidspezifität ergibt sich eine außerordentliche Vielfalt von Kombinationsmöglichkeiten, die bei jedem Menschen individuell ist und damit die Immunantwort eines jeden Menschen individualtypisch macht. Durch diese reichhaltige Kombinationsmöglichkeit der HLA-Allele ergibt sich die fehlende Gewebeverträglichkeit bei Transplantationen eines Organismus in einem nicht genetisch identischen Organismus.

Die Anzahl der bekannten Allele steigt ständig. Nach neuestem Update (31. Dezember 2009) waren für das Gen HLA-A 965 Allele, für das Gen HLA-B 1 543 usw. bekannt. Der aktuelle Stand ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Gesamtanzahl bekannter HLA-Allele

MHC-Klasse-I				MHC-Klasse-II					
Locus	A	B	C	DR α	DR β	DP α	DP β	DQ α	DQ β
Anzahl der Allele	965	1543	626	3	855	28	138	35	107

Quelle: Marsh et al. 2010, Nomenclature for factors of the HLA system (www.ncbi.nlm.nih.gov).

1.2.3.3 Antigenprozessierung und Antigenpräsentation

Proteine unterliegen in Zellen einem ständigem Auf- und Abbau. Dabei werden abgebaute Proteine durch neu synthetisierte Proteine ersetzt. Peptide, die auf MHC-I-Moleküle binden, stammen von intrazellulären Proteinen (meist im Zytosol) ab. Bei diesen zytosolischen Proteinen handelt es sich im Krankheitsfall auch um virale Proteine und Tumor-assoziierte Proteine, die an MHC-I-Moleküle gebunden und an Zelloberflächen den CTLs präsentiert werden. Das Protein Ubiquitin markiert endogene Proteine die anschließend durch das Proteasom in einzelne Peptidfragmente abgebaut werden. Das Proteasom ist ein hohler, fassförmig gebauter Proteasekomplex, der aus 28 Untereinheiten besteht und in vier Ringen übereinander gestapelt ist. Die vier Ringe bestehen aus je sieben β - oder α -Einheiten.

Es gibt zwei Arten des Proteasoms: das konstitutive Proteasom, das in allen Zellen vorkommt und das Immunproteasom. Letzteres kommt nur in Zellen vor, die durch Interferone als Reaktion auf Virusinfektionen stimuliert werden. Beim Immunproteasom werden β -Untereinheiten des Proteasomenkomplexes durch proteolytisch aktive Untereinheiten wie LMP2 (*low molecular weight protein*), LMP7 und MECL1 (*multicatalytic endopeptidase complex subunit*) ersetzt. Die proteolytische Aktivität des Immunproteasoms verändert die Spezifität des Proteasoms. Es kommt zu einer verstärkten Spaltung von Polypeptiden hinter hydrophoben Resten und die Spaltung von sauren Resten wird herabgesetzt. Dadurch entstehen Peptide mit Carboxylenden, die als Verankerungsreste bei der Bindung von Peptiden an die meisten MHC-I-Moleküle und beim Transport durch TAP (*transporter associated with antigen processing*) bevorzugt werden (York et al. 1999).

Eine weitere Reaktion, die durch IFN- γ (Interferon) induziert wird, ist die Bildung des Proteinkomplexes PA28-Proteasom, welcher zur erhöhten Geschwindigkeit, mit der Peptide aus dem Proteasom entlassen werden, führt. Damit wird eine bessere CTL-Antwort hervorgerufen (Sijts et al. 2002). Meist gelangen Peptide mit einer Länge von 8-10 Aminosäuren über ATP-abhängige Proteintransporter TAP1 und TAP2 ins Endoplasmatische Retikulum (ER). TAP-Transporter bevorzugen Peptide mit hydrophoben oder basischen Aminosäurenresten am Carboxylende. Dies entspricht den Merkmalen der Peptide, die an MHC-Moleküle binden. Die TAP-Transporter sind Heterodimere, die in der Membran des ER sitzen.

Sie kodieren für zwei Proteine, die zur Familie von Transportmolekülen mit ATP-Bindungskassette (*ATP binding cassette*, ABC) gehören. Diese Proteine besitzen eine ATP-Bindungskassetten-Domäne, die ins Zytosol ragt und eine hydrophobe Transmembran-Domäne, die in das Lumen des ER ragt. Sie bilden einen Kanal, den Peptide passieren können (Lankat-Buttgereit und Tampé 1999; Abele und Tampé 2004).

Im ER falten sich die α - und die β -Ketten der MHC-Moleküle und bauen sich zusammen. Damit ist die Peptidbindungsstelle der MHC-Moleküle nie dem Zytosol ausgesetzt. Erst wenn die MHC-Moleküle zusammengebaut sind, werden die Moleküle mit Peptiden an der peptidbindenden Grube beladen, sofern die Seitenketten ihrer Aminosäuren perfekt zu den Aminosäuren der Bindungsgrube der MHC-I-Moleküle passen. Zu Beginn wird die α -Kette des MHC-Moleküls durch die Chaperone Calnexin, Calretikulin und Erp57 gebunden, die die Peptidbindung regulieren. Ein weiteres Protein, Tapasin, bildet eine Brücke von der α -Kette zu TAP. Der so gebildete stabile MHC-Peptid-Komplex wird dann durch Exozytose über den Golgi-Apparat zur Membranoberfläche transportiert. Bildet ein Peptid durch eine nicht-produktive Interaktion keinen Komplex mit einem MHC-I-Molekül, wird das Peptid entweder direkt im ER oder nach retrogradem Transport in das Zytosol in seine einzelnen Aminosäuren gespalten.

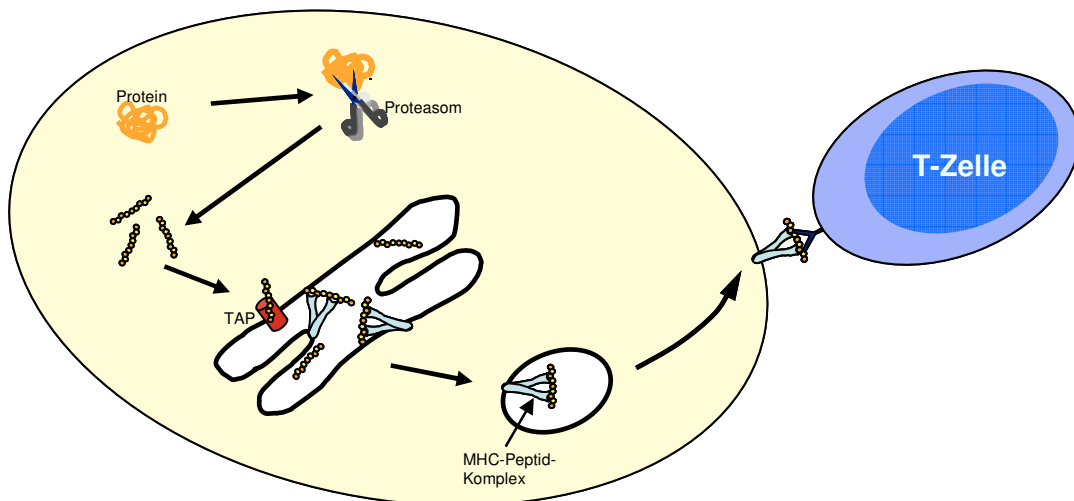


Abbildung 5: Antigenprozessierung

Grob schematisierte Antigenprozessierung: Endogene Proteine werden durch das Proteasom in Peptide gespalten und über einen TAP-Komplex ins ER transportiert. Im ER werden MHC-I-Moleküle solange zurückgehalten, bis sie durch die Bindung an ein Peptid freigesetzt werden. Hat ein Peptid an einen MHC-Komplex gebunden, verlässt der MHC-Peptid-Komplex das ER und wird durch Exozytose über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert.

Wie oben beschrieben werden normalerweise nur endogene Proteine auf MHC-I-Molekülen präsentiert. Jedoch kann die sog. Kreuzpräsentation (*crosspresentation*) auch zu einer Präsentation von exogenen Proteinen auf

MHC-I-Molekülen führen. Dieser Mechanismus ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, dass tumorinfiltrierende APCs exogene Proteine – wie beispielsweise nekrotisierende Tumorzellen – durch Endozytose aufnehmen können und deren Proteinfragmente unabhängig von Proteasom und TAP-Transportern auf MHC-I-Moleküle laden. Somit sind auch exogene Proteine an einer CTL-Antwort gegen Tumorgewebe maßgeblich beteiligt (Spiotto et al. 2002; Win et al. 2011).

1.2.3.4 T-Zell-Aktivierung durch Antigenpräsentation von MHC-Klasse-I-Molekülen

T-Zellen können infizierte Zellen erkennen, wenn ihnen von antigenpräsentierenden Zellen Peptidfragmente durch MHC-I-Moleküle von intrazellulären Krankheitserregern präsentiert werden. Die in den V-Domänen kodierten Domänen der antigenbindenden Stelle des TCR binden dabei an die α_1 - und α_2 -Domäne eines MHC-I-Moleküls. Zusätzlich steht der TCR mit seiner V_α -Domäne in Kontakt mit dem Aminoende, die V_β -Domäne mit dem Carboxylende (Kjer-Nielsen et al. 2003). Dadurch entstehen Bindungsenergien, die den TCR und den MHC-Peptid-Komplex zusammenhalten und stabilisieren. Neben dieser Bindung sind weitere stabilisierende Wechselwirkungen der T-Zelle mit dem MHC-Komplex notwendig.

Es sind dies die Kofaktoren CD4 und CD8 (s.o.), die als weitere Proteinkomplexe auf den Zelloberflächen von T-Zellen vorkommen. Bei der Antigenerkennung durch TCR binden diese Kofaktoren an unveränderlichen Stellen auf dem MHC-Teil des MHC-Peptid-Komplexes (Gao et al. 1997). Diese Bindungsstellen liegen entfernt vom Peptid. Erst durch eine weitere Bindung mit dem Kofaktor CD3 kann eine Signalübertragung im Zellinneren der T-Zellen erfolgen, wodurch diese verschiedene Substanzen – beispielsweise Zytokine, Granzyme, Perforine – in ihre Zielzellen sezernieren und dort eine zytotoxische Wirkung entfalten.

1.3 Transformation von Zellen und Einteilung der tumorassoziierten Antigene (TAAs)

Kenntnisse der Entstehungsmechanismen, des Wachstums und der biologischen Eigenschaften von Tumoren bilden die Basis für das Verständnis von Tumorerkrankungen. Die Umwandlung von einer einzigen normalen gesunden Körperzelle in Tumorzellen unterliegt vielfältigen Mechanismen und läuft in mehreren Stufen ab. So ist das in gesunden Zellen durch regulierende Signale enthaltende Gleichgewicht zwischen Proliferation, Apoptose und Differenzierung in Krebszellen aufgehoben. Insbesondere ist das Kontrollsystem in der Wachstumsphase während des Zellzyklus gestört. Die Ursache dafür liegt in einer Reihe von Mutationen verschiedener Gene, die zu einem veränderten Expressionsverhalten der Zelle führen. Folglich sind Tumorzellen dann in der Lage, unkontrolliert zu proliferieren (Shih et al. 1981; Vogelstein et al. 1988).

Die progressive Proliferation führt zunächst aus einem Zellhaufen zu einem soliden Tumor – welcher noch innerhalb anatomischer Barrieren sitzt – bis hin zu invasivem und destruierendem Wachstum sowie der Fähigkeit zur Metastasierung.

Die wichtigsten antagonistischen Systeme des Tumorwachstums werden von den Onkogenen sowie den Tumorsuppressorgenen und ihren Genprodukten reguliert. Die Gensysteme wie Transkriptionsregulatoren, DNA-Reparaturgene und Apoptosegene spielen bei der Tumorentwicklung eine weitere wichtige Rolle. Sie führen bei Tumorzellen intrazellulär gegenüber gesunden Zellen zu einem veränderten Proteinpotential. Teile dieses veränderten Proteinpotentials können dann auf Zelloberflächen als antigene Peptide von MHC-Molekülen präsentiert werden. Diese antigenen Peptide werden auch als Tumorantigene bzw. tumorassoziierte Antigene (TAA) bezeichnet und lassen sich in verschiedene Klassen unterteilen (Rosenberg 1999; Stevanović 2002; Novellino 2005). Inzwischen wurden mehr als 2.000 Tumorantigene identifiziert (Yang F und Yang XF 2005). Einige ausgesuchte Tumorantigene mit ihren zugehörigen HLA-Allelen sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Beispiele von humanen tumorassoziierten Antigenen

Antigen-Klasse	TAA	HLA-Allele
1. <i>Cancer-Testis Antigene</i>	BAGE	Cw*16
	GAGE-1, -2	Cw*06
	MAGE-1	A*01, A*03, A*24, Cw*16
	MAGE-3	A*01, A*02, A*24, B*44
	NY-ESO-1	A*02, A*31
2. <i>Melanozyten-Differenzierungsantigene</i>	gp100	A*02, A*03, A*24, A*68, B*35:01, Cw*08
	Melan A/MART-1	A*02 / B*45
	Tyrosinase	A*01, A*02, A*24, B*44
3. <i>Mutationsantigene</i>	β-catenin	A*24
	Caspase-8	B*35
	CDK-4	A*02
	MUM-1	B*44
	K-RAS	B*35
	N-RAS	A*01
4. <i>Überexprimierte Antigene</i>	Adipophilin	A*02
	HER-2/neu	A*02, A*03, A*24
	MUC-1	A*02, A*11
	PRAME	A*02, A*24
	p53	A*24, B*46
	Survivin	A*02
5. <i>Virale Antigene</i>	HPV-derived E6	A*02
	LMP1	A*02
	LMP2	A*02

Quelle: Rosenberg 1999; Jäger et al. 2003; Novellino 2005.

1. *Cancer-Testis Antigene (CT)*

Normalerweise werden *Cancer-Testis Antigene* nur in Keimzellen des Hodens, den Trophoblasten der Plazenta und den normalen Ovarialzellen exprimiert (van der Bruggen 1994; Chen YT et al. 1997). Sie können deshalb nur in diesen Geweben detektiert werden. Für gewöhnlich befinden sich CT in adultem Gewebe in ruhendem Zustand (de Smet et al. 1994), können aber bei verschiedenen Tumortypen durch Transkription reaktiviert werden (de Smet et al. 1999). In anderen Gewebearten werden sie daher nur bei fortschreitenden Tumorerkrankungen exprimiert. Das erste *Cancer-Testis Antigen*, das identifiziert wurde, war das Antigen MAGE-1 (van der Bruggen et al. 1991).

2. *Melanozyten-Differenzierungsantigene*

Die *Melanozyten-Differenzierungsantigene* sind spezifisch für die Haut und werden nur in Melanozyten und in besonderem Maße in Melanomen exprimiert. Viele dieser Melanozyten-assoziierten Proteine spielen eine Rolle in der Synthese von Melanin.

3. *Mutationsantigene*

Bei den *Mutationsantigenen* handelt es sich um mutierte Proteine, die durch Translokation oder Punktmutation hervorgerufen werden. Mutationen können in normalen gesunden Genen jeglichen Gewebes vorkommen. Bei Gen-Veränderungen, wenn zelleigene Reparatur-Mechanismen nicht greifen, können sie zur malignen Transformation einer Zelle führen und werden daher ausschließlich in Tumorgeweben exprimiert.

4. *Überexprimierte Antigene*

Überexprimierte Antigene sind in Normalgeweben schwach exprimiert, können aber in Tumorgeweben stark exprimiert sein und haben oft keine Gewebespezifität. Zu diesen Antigenen zählen beispielsweise das Tumorsuppressorprotein p53 und HER2/neu. In vielen gastrointestinalen sowie in esophagealen Tumoren ist p53 überexprimiert (Umano et al. 2001), HER2/neu (*human epidermal receptor 2 / neurological*) vor allem beim Mamma- und Ovarialkarzinom (Fisk et al. 1995).

5. *Virale Antigene*

Die *Viralen Antigene* werden durch Infektionen mit verschiedenen Viren reproduziert. Sie werden in verschiedenen Tumoren exprimiert, bei denen ein ursächlicher Zusammenhang mit Virusinfektionen stattfand. Eines der wohl bekanntesten dieser Antigene ist das HPV (Humanes Papillom-Virus), das die Schleimhaut des Genitaltraktes infizieren kann. In infizierten Zellen kann dann ein unkontrolliertes Wachstum bis hin zum Zervixkarzinom hervorgerufen werden. Da sich diese Antigene aus einer virusinfizierten Zelle entwickeln, stellen sie relevante Zielantigene dar.

Da es sich bei den *Cancer-Testis Antigenen* und den *Melanozyten-Differenzierungsantigenen* jeweils um gewebespezifische Antigene handelt, sind sie für den Einsatz als Zielantigene einer Immuntherapie von besonderem Interesse, weil die Gefahr einer Autoimmunreaktion als eher unwahrscheinlich einzustufen ist.

So sind zum Beispiel im Hodengewebe keine MHC-I-Moleküle vorhanden, weshalb diese Zellen immunprivilegiert sind. Wird nun eine Immuntherapie mit *Cancer-Testis Antigenen* durchgeführt, so werden die Zellen des Hodengewebes nicht mit angegriffen (Smith und Cerundolo 2001).

Anders dagegen verhält es sich bei Tumorantigenen, die in vielen Zellen sowohl in Tumorzellen als auch in normalem gesundem Gewebe exprimiert werden. Bei einer Immuntherapie auf Peptid-Basis kann schon eine geringe Menge eines Antigens ausreichen, um Immunreaktionen gegen Antigen-exprimierendes Normalgewebe auszulösen. Trotz dieser Tatsache wurden die beiden tumorselektiven Antigene p53 und HER2/neu, die auf vielen Zellen exprimiert werden, bereits zur aktiven Immunisierung bei Patienten eingesetzt (Disis und Cheever 1996).

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Obwohl das Nierenzellkarzinom von allen Tumorerkrankungen im Gegensatz zu anderen malignen Erkrankungen in einer geringen Prozentzahl vorkommt, beträgt die errechnete Sterberate bei Männern bis zu 3,6 %, bei Frauen bis zu 2,7 % pro Jahr und ist damit fast annähernd so hoch wie die jährliche Neuerkrankungsrate. Eine der Hauptursachen dafür ist vermutlich auf die geringe Ansprechbarkeit der klassischen Chemotherapie sowie der Strahlentherapie zurückzuführen, die nur sehr geringe Heilungserfolge aufweisen (siehe unter 1.1.4.2).

Ziel dieser Arbeit ist es, MHC-gebundene tumorassoziierte Peptide aus primären Nierenzellkarzinomen zu isolieren. Aus diesen isolierten Peptiden sollen Peptid-basierte Impfstoffe hergestellt werden, um damit eine spezifische Immunantwort betroffener Patienten auszulösen. Allerdings gibt es bis heute nur eine geringe Anzahl bekannter Peptide, die beim Nierenzellkarzinom tumorassoziiert sind und somit als Impfstoffe eingesetzt werden können. Es sollen daher neue weitere tumorassoziierte Peptide isoliert und neue Quellproteine identifiziert werden. Da jeder Mensch auf Grund des Polymorphismus ein einzigartiges und individualtypisches Repertoire an HLA-spezifischen präsentierten Peptiden aufweist, sollten Impfstoffe auf Peptid-Basis nach Möglichkeit diesen individualtypischen Eigenschaften entsprechen.

Deshalb ist es ein weiteres Ziel, die im Zuge eines chirurgischen Konzeptes erhaltenen Gewebeproben von Tumorsektaten jedes einzelnen Patienten auf seine HLA-spezifischen präsentierten Peptide zu untersuchen, um damit eine individuell auf den einzelnen Patienten zugeschnittene Tumorstoffe herzustellen. Das Immunsystem hat im Prinzip die Fähigkeit, bösartige Zellen zu erkennen und zu zerstören. Diese Fähigkeit soll gezielt angeregt werden. Gelingt es, diese Fähigkeit mit einer Impfung gezielt anzuregen und zu nutzen, kann diese Immuntherapie ein effizientes Verfahren zur Behandlung des Nierenkrebses darstellen.

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: Geräte

Produkt	Hersteller
Becherglas von Schott	Zentrallager, Universität Tübingen
Branson Sonifier 250	Branson Ultrasonics, Danbury, USA
Erlenmeyerkolben	Zentrallager, Universität Tübingen
Gefrierschrank (-20)	Liebherr, Deutschland
Gefrierschrank Thermo Forma (-80)	Klatt, Berlin
Gefriertrockner KF-2-	Saur, Reutlingen
Glaspipetten von Hirschmann (5 ml, 10 ml)	Zentrallager, Universität Tübingen
Hamilton Glasspritze (100 µl, 250 µl)	Hamilton, Reno, USA
HPLC Eksigent Nano LC-2D	Eksigent, Dublin
Kühlschrank	Liebherr, Deutschland
Lyophilisierungsanlage Vaco5	Zirbus, Bad Grund
Magnetrührer RCT basic	IKA, Staufen
Massenspektrometer Q-TOF Ultima	Waters/Micromass, Milford, USA
Massenspektrometer LTQ Orbitrap	Thermo Scientific, Deutschland
MassLynx Software V 4.0	Waters/Micromass, Milford, USA
Mixer Waring Commercial Laboratory Blender	Waring, Torrington
Photometer Ultraspec 300	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Pipettierboy	Integra Bioscience
Potter Heidolph RZR 2020 mit Glasgefäß und Teflonpistill	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Proteome Discoverer Software 1.1	Thermo Scientific, Deutschland
Quarzküvette (10 µl)	Hellma, Müllheim
Rotator mit Drehteller und Klammern	Bachhofer, Reutlingen
Rotoren für Ultrazentrifuge Optima L-80 (Ti45, Ti70)	Beckman Coulter, Krefeld
Schlauchpumpe PK-1	Amersham, Pharmacia Biotech, Freiburg
Schüttler Rotamax 120	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Tischkühlzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Tischkühlzentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau

Produkt	Hersteller
Tubes für Ultrazentrifuge Optima L-80	Beckman Coulter, Krefeld
Ultraschallbad Sonorex Super RK 514 BH	Bandelin, Berlin
Ultrazentrifuge Optima L-80	Beckman Coulter, Krefeld
Vortexer 7-2020	neoLab, Heidelberg
Vortexer Minishaker MS1	IKA, Staufen
Waage Sartorius AC 211 S	Sartorius, Göttingen
Wasserbad Thermomix BM-S	Braun, Biotech Göttingen

Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Affinitätssäulen Econo-Column	BioRad, München
Agilent Peptide Cleanup C18 Spin Tubes	Agilent, Böblingen
Amicon Filter Ultra-4, MWCO 10.000 Da (15 ml)	Millipore, Schwalbach
BD Falcon™-Röhrchen, konisch (15 ml, 55 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Einmalpipetten (5 ml, 10 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Einmalspritzen (1 ml, 10 ml, 30 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Eppendorf Tubes (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Filter (0.20 µm)	Millipore, Schwalbach
pH-Indikatorstäbchen Universalindikator pH-Fix 0-14	Merck, Darmstadt
Pipettierspitzen (20 µl - 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Sartolab-P20 Filter (0,20 µm)	Sartorius, Göttingen
Stericup Filter Unit (0,22 µm)	Millipore, Schwalbach

2.1.2 Chemikalien und Antikörper

Tabelle 7: Chemikalien (Reinheit mindestens p.a., falls nicht angegeben) & Antikörper

Reagenzien	Hersteller
Acetonitril 50% (AcN)	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Ameisensäure (FA)	Merck, Darmstadt
Antikörper L243	Falkenburger C., Universität Tübingen
Antikörper W6/32	Falkenburger C., Universität Tübingen
CHAPS	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
CNBr-activated Sepharose™ 4B	Amersham, Pharmacia Biotech, Freiburg
Glycin	Roth, Karlsruhe
¹ H ₄ - und ² D ₄ -NicNHS-Ester	Weik, S., Universität Tübingen
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Hydroxylamin	Sigma-Aldrich, Buchs, Schweiz

Reagenzien	Hersteller
LC-MS Wasser LiChrosolv	Merck, Darmstadt
O-Methyl-Isoharnstoff-Hemisulfat 94 %	ACROS Organics, Geel, Belgien
PBS Dulbecco's	Falkenburger C., Universität Tübingen
Phosphatpuffer (Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Trifluoressigsäure (TFA)	Applied Biosystems, Warrington, UK

2.1.3 Rezepturen

Lysepuffer

Zur Herstellung des doppelt konzentrierten Lysepuffers wurden 200 ml *PBS* (*phosphate buffered saline*), 2,4 g CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat) und 6 Proteinaseinhibitor-Tabletten (*Protease Inhibitor Cocktail Tablets*) verwendet.

Kopplungspuffer

Zur Herstellung des Kopplungspuffers wurden 0,5 M NaCl und 0,1 M NaHCO_3 in 1 Liter doppelt entionisiertem Wasser gelöst und mit NaOH auf einen pH-Wert von 8,3 eingestellt.

GUA-Reagenz

Zur Herstellung der 1,1 M GUA-Reagenz wurden 100 mg O-Methyl-Isoharnstoff in 102 μl doppelt entionisiertem Wasser gelöst.

Elutionslösung zur Modifizierung

50 ml Acetonitril und 1 ml 10 %-ige Ameisensäure wurden auf 100 ml LiChrosolv aufgefüllt.

Lösungsmittel für die analytische HPLC

Als Eluent A wurde eine Mischung aus 97,9 % H_2O (MS-grade, Baker), 2 % Acetonitril und 0,1 % Ameisensäure (pH = 3) verwendet, als Eluent B eine Mischung aus 19,9 % H_2O (MS-grade, Baker), 80 % Acetonitril (HPLC-grade, Lichrosolv) und 0,1 % Ameisensäure (pH = 3).

2.2 Biochemische Methoden

2.2.1 Isolierung MHC-Klasse-I gebundener Peptide

Bei dieser Methode werden aus soliden Tumoren des Nierenzellkarzinoms und, sofern vorhanden, aus korrespondierendem gesundem Nierengewebe die von den MHC-Molekülen präsentierten Peptide isoliert. Die Gewebeproben wurden nach schriftlicher Einverständniserklärung betroffener Patienten von der Klinik für Urologie der Universität Tübingen zur Verfügung gestellt. Noch intraoperativ wurden die Resektate mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei Tiefkühltemperaturen von -80°C aufbewahrt. Zusätzlich wurde den Patienten zur HLA-Typisierung Blut abgenommen. Die Isolierung MHC-Klasse-I gebundener Peptide verläuft in mehreren Schritten. Dabei werden die im Gewebe enthaltenen MHC-Peptid-Komplexe affinitätschromatographisch aufgereinigt. Die ersten beiden Schritte, die Herstellung des Gewebelysats und die Präparation der Säulen für die Affinitätschromatographie, wurden parallel durchgeführt. Um die empfindlichen Proteine gegenüber Verderb zu schützen, wurden alle Schritte zur Gewinnung des Gewebelysats bei Kühlraumtemperaturen von maximal $+4^{\circ}\text{C}$, die Präparation der Säulen dagegen bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Die sich anschließende Affinitätschromatographie sowie die einen Tag später durchgeführte Elution wurden wiederum bei Kühlraumtemperaturen von maximal $+4^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Zur Bindung der MHC-Klasse-I-Moleküle wurde der anti-HLA-A, -B und -C-spezifische anti-human IgG_{2a}-Antikörper W6/32 verwendet (Barnstable et al. 1978; Parham et al. 1979), und zur Bindung der MHC-Klasse-II-Moleküle der anti-HLA-DR-spezifische Antikörper L243 (Lampson und Levy 1980).

2.2.1.1 Herstellung des Gewebelysats

Die tiefgefrorenen Gewebeproben wurden unter Zugabe eines zuvor hergestellten doppelt konzentrierten Lysepuffers¹ im Verhältnis 1:1 zunächst grob und dann mit einem Mixer fein zerkleinert. Während dieses Prozesses tauten die Proben auf. Ein weiterer Gewebeaufschluss erfolgte mit dem „Potter“ nun unter Zugabe eines dem Tumolvolumen äquivalenten einfach konzentrierten Lysepuffers.

Die erhaltene Zellsuspension wurde eine Stunde auf dem Magnetrührer inkubiert und anschließend dreimal für je 20 Sekunden mit Ultraschall (Branson Sonifier 250) behandelt. Die Ultraschallwellen bewirken einen weiteren Aufschluss von Zellmembranen, wodurch Transmembranproteine herausgelöst werden.

¹ Im Lysepuffer enthaltenes CHAPS bewirkt als Detergenz einen ersten Aufschluss der Zellmembranen, wodurch HLA-Moleküle herausgelöst werden. Um die in den Zellen enthaltenen HLA-Komplexe nicht durch aktivierte Proteinase zu schädigen, wurden dem Lysepuffer zusätzlich Proteinaseinhibitoren zugesetzt.

Nach einer weiteren Stunde Rühren wurde das Lysat bei 4 000 rpm zentrifugiert (Tischkühlzentrifuge Megafuge 1.0 R), um Zelldetritus aus dem Lysat zu beseitigen. Zur Beseitigung aller noch schweren Zellbestandteile inklusive Zytoskelett wurde nun der Überstand bei 40 000 rpm unter Vakuumbedingungen (Ultrazentrifuge Ultima L-80) eine Stunde zentrifugiert. Schließlich wurde der Überstand mit einem ProteinfILTER der Porengröße 0,20 µm sterilfiltriert, um alle noch vorhandenen kolloidalen Zellbestandteile und Fett vollständig zu entfernen.

2.2.1.2 Herstellung der Antikörpersäulen

Pro Gewebeprobe wurden mit den o.g. Antikörpern, die als stationäre Phase dienten, je zwei Chromatographiesäulen hergestellt. Nach Abwiegen der benötigten Menge CNBr-Sepharose 4B (37,5 mg Sepharose pro 1 mg AK), wurde diese zunächst mit 1 mM HCl auf einem „Rotator“ aktiviert und gequollen. Die nach allen Zwischenschritten notwendige Inkubationszeit wurde jeweils auf einem Rotator durchgeführt. Daraufhin erfolgte eine Zentrifugation über 4 Minuten bei 300 rpm ohne Bremse mit anschließendem Verwerfen des Überstandes.

Nach 30 Minuten Inkubationszeit wurde die aktivierte CNBr-Sepharose 4B abzentrifugiert und der Überstand verworfen. 1 mg AK pro Gramm Gewebe wurde der Sepharose mittels Kopplungspuffer zugesetzt und 2 Stunden inkubiert. Durch Zugabe des Kopplungspuffers wurde der saure pH-Wert des sedimentierten Gels neutralisiert. Zur photometrischen Bestimmung wurden direkt nach Zugabe der Antikörper (t_0^2) und nach Ablauf der Inkubationszeit (t_1) je 200 µl abgenommen. Die Messung der OD³ erfolgte bei 280 nm⁴. Mit dem Quotient der OD₂₈₀ zwischen t_0 und t_1 wurde die Bindungskapazität der Antikörper an die Sepharose ermittelt und lag in der Regel zwischen 90 % und 99 %. Die restlichen freien aktivierten Bindungsstellen der CNBr-Sepharose wurden mit 0,2 M Glycin-Lösung durch eine 60-minütige Inkubation mit anschließender Zentrifugation blockiert. Schlussendlich wurde die Sepharose noch zweimal mit PBS gewaschen und die Chromatographiesäulen mit der Sepharose beschickt.

2.2.1.3 Affinitätschromatographie und Elution

Das aus den Gewebeproben gewonnene Filtrat wurde über Nacht zyklisch mit einer Flussrate von 1-2 ml/min über die Antikörpersäulen geleitet, damit möglichst alle im Filtrat enthaltenen MHC-Peptid-Komplexe an die mit Antikörper beladene Sepharose binden konnten. Am nächsten Tag wurden mit einer Säureextraktion nicht kovalent gebundene Peptide, MHC-Moleküle und zum Teil Antikörper von der Sepharose abgelöst. Dazu wurden die Antikörpersäulen 30 Minuten zunächst mit PBS bei einer Flussrate von 1-2 ml/min gewaschen.

² Zeit

³ Optische Dichte

⁴ Nanometer

Ein zweiter Waschschrift mit doppelt entionisiertem Wasser folgte bei gleicher Flussrate über 60 Minuten. Danach wurden die Säulen trockengepumpt. Nun wurde das Gelbett der Säulen mit 0,2 % TFA (Trifluoressigsäure) soweit aufgefüllt, dass die Sepharose gerade bedeckt war. Beim ersten Elutionsschritt wurden zusätzlich noch 10 µl 10 % TFA pro 10 mg AK zugesetzt und unter kräftigem Schütteln etwa 20 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurde die TFA-Lösung auf einen Proteinfiter (Amicon Ultra-4, MWCO 10.000 Da) pipettiert.

Weitere sieben- bis neunmal wurde die Sepharose mit 0,2 % TFA bedeckt, inkubiert und die Lösung abpipettiert. Anschließend wurde der Amiconfilter bei 4 000 rpm solange filtriert, bis sich das Volumen des Eluats restlos als Filtrat im Reagenzröhrchen befand. Aufgrund der Proteinfitergröße befanden sich im Filtrat nur Peptide, die ein Molekulargewicht von maximal 10 kDa aufwiesen. Die restlichen Moleküle wiesen ein Molekulargewicht von 45 kDa (MHC-I-Moleküle α -Kette), 12 kDa (MHC-I-Moleküle β -Kette), 22 kDa (Molekulargewicht der IgG-AK λ -Kette) und 55 kDa (Molekulargewicht der IgG-AK γ -Kette) auf. Anschließend wurde das Filtrat bei -80 °C eingefroren. Als letzter Schritt folgte die Lyophilisierung (Gefriertrocknung). Bei dieser Methode wird dem eingefrorenen Filtrat schonend das enthaltene Wasser entzogen.

2.2.2 Modifizierung von Peptiden

Die Modifizierung von Peptiden erlaubt eine Anlagerung von 1-(Nicotinoyloxy)succinimid (NIC-NHS) an der primären Aminogruppe von Aminosäuren. Dabei wird die Nikotinsäure über eine Amid-Bindung am N-Terminus kovalent gebunden. An den Lysinresten der Peptide wurden die ϵ -Aminogruppen mit einem Guanidin-Rest blockiert. Durch diesen Vorgang wird verhindert, dass bei der Modifizierung der α -Aminogruppen nicht gleichzeitig ϵ -Aminogruppen von Lysinresten mit Nikotinsäure reagieren können. Wird an eine Gruppe von Peptiden 1-([H4]Nicotinoyloxy)succinimid gebunden, an die andere dagegen 1-([D4]Nicotinoyloxy)succinimid, so sind die Peptide der ersten Gruppe mit dem leichten Isotop der Nikotinsäure (NIC), die der anderen mit der schweren Form der Nikotinsäure (dNIC) markiert. Zwischen NIC und dNIC besteht eine Massendifferenz von 4 Da, weshalb sich die Peptide im Massenspektrometer durch ihre Massendifferenz leicht voneinander unterscheiden lassen. Dadurch können beispielsweise Peptide von Tumorgewebe und von Normalgewebe in einem Lauf einer massenspektrometrischen Messung gemischt und trotzdem relativ zueinander quantifiziert werden.

2.2.2.1 Guanidinylierung der ϵ -Aminogruppen von Lysinen

Die lyophilisierten und tiefgefrorenen HLA-Ligand-Filtrate wurden in 500 µl doppelt entionisiertem Wasser aufgenommen und die Peptidlösungen sodann mit 10 M NaOH auf einen pH-Wert von 10,5 bis 11 eingestellt. Zu jeder Peptidlösung wurden 92 µl GUA-Reagenz (O-Methyl-Isoharnstoff) zugegeben. Die Guanidierung erfolgte

10 Minuten bei + 65°C. Die Reaktion wurde mit 10 µl konzentrierter Ameisensäure auf Eis durch eine pH-Reduzierung auf 3 bis 4 gestoppt.

2.2.2.2 Nikotinylierung der α -Aminogruppen guanidinylierter Peptide

Die guanidinylierten Peptide wurden wie nachfolgend beschrieben auf zentrifugentauglichen Säulchen nikotinyliert, die mit C18 *reversed-phase*-Säulenmaterial gefüllt waren (*Agilent Peptide Cleanup C18 Spin Tubes*). Nach allen Reaktionsschritten erfolgte eine Zentrifugation bei 2 000 rpm für je 15 sec bei RT, die mit einer Tischzentrifuge durchgeführt wurde (Biofuge Fresco, Heraeus). Anschließend wurden die C18-Säulchen zunächst je dreimal mit 200 µl 0,1 % TFA aktiviert und dann dreimal mit je 200 µl ddH₂O / 0,1 % FA (v/v) äquilibriert. Im Anschluss daran wurden die guanidinylierten Peptide in drei 200 µl-Portionen auf die Säulchen geladen. Dabei wurde jede Portion Peptide durch das C18-Säulenmaterial zentrifugiert. Danach wurden die Säulen dreimal mit 200 µl ddH₂O gewaschen und vor der eigentlichen Nikotinylierung auf abgeschnittene 1 ml-Einmalspritzen gesteckt (Becton Dickinson). Zur Nikotinylierung wurden 500 µl der jeweiligen ¹H₄- bzw. ²D₄-NicNHS-Ester-Lösung auf die Säulen aufgetragen und innerhalb von 20 Minuten jede Minute 25 µl Lösung mit dem Kolben der Spritze aus den Säulen gesaugt. Wieder wurden die Säulen dreimal mit je 200 µl ddH₂O gewaschen. Um eventuell eingegangene Verbindungen zwischen NIC-Ester und Tyrosinresten zu lösen, wurden die Säulen erneut auf 1 ml-Einmalspritzen appliziert und je 500 µl Hydroxylamin mit einer Geschwindigkeit von 50 µl/min mit Hilfe der Spritzen durch die Säulen gezogen. Nach je drei weiteren Waschschritten mit ddH₂O wurden die Peptide durch viermalige Applikation von je 50 µl Elutionslösung (50 % AcN / 1 % FA) von den Säulen eluiert und die Eluate gepoolt. Anschließend wurden die Proben für etwa 1,5 Stunden in einer SpeedVac (Vacuum Concentrator, Bachhofer) für die MS-Analysen eingeeengt.

2.3 Analytische Methoden

2.3.1 Massenspektrometrische Analysen

Die Massenspektrometrie wird heute als Methode der Wahl zur Sequenzierung von Peptiden eingesetzt. Sie ist eine Methode zur Identifizierung der molekularen Masse von chemischen Verbindungen durch Messung des Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses ionisierter Analyten. Die Bestimmung der Masse erfolgt meistens durch die Manipulation von Ionen mit elektromagnetischen Feldern in der Gasphase. Alle massenspektrometrischen Analysen laufen in drei Schritten ab. In einer Ionenquelle werden die zu messenden Proben ionisiert. Danach folgt die Auftrennung der Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) im Massenanalysator. Im letzten Schritt folgt die Detektion der Ionen in einem Detektor, der die Informationen in ein Massenspektrum umwandelt.

Um große Moleküle wie Proteine oder Peptide in die Gasphase zu überführen ohne sie zu zerstören, werden schonende Ionisierungsmethoden benötigt. Diese zerstörungsfreie Überführung in die Gasphase wird durch die *Elektrospray Ionisation* (ESI) und die *Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionisation* (MALDI) ermöglicht. Dies sind die Ionenquellen, die in der Peptid- und Proteinanalytik am häufigsten eingesetzt werden.

Die **ESI** eignet sich gut für die fragmentierungsarme Ionisierung von großen nichtflüchtigen Biomolekülen. Da diese Methode bei allen massenspektrometrischen Analysen verwendet wurde, soll sie hier näher beschrieben werden. Zur Fragmentierung wird die Lösung einer Probe durch eine sehr feine Kapillare zu einer Metallspitze geleitet, an die eine Spannung angelegt ist. Die Spannung führt zum Aufbau eines elektrischen Feldes zwischen Kapillare und Gegenelektrode. Das elektrische Feld durchdringt die Lösung, weshalb die Ionen der Lösung zur Gegenelektrode wandern.

An der Spitze der Kapillare bildet sich ein Überschuss von gleichartig geladenen Ionen, die sich gegenseitig abstoßen. Es entsteht ein Flüssigkeitsfilament, aus dem sich kleine geladene Tröpfchen im Mikrometerbereich abschnüren und als feines Aerosol aus der Kapillare austreten. Die Zugabe eines neutralen Trägergases unterstützt die Vernebelung und fördert die Verdampfung des Lösungsmittels. Dadurch verkleinert sich die Tröpfchengröße, gleichzeitig nimmt die Dichte des elektrischen Feldes auf der Tröpfchenoberfläche zu. Der Radius der Tröpfchen wird immer kleiner, bis er schließlich ein bestimmtes Limit unterschreitet. Dadurch zerfallen die einzelnen Tröpfchen durch eine Coulomb-Explosion in sehr viele, noch kleinere Tröpfchen (Kearle 2000), bis ein Tröpfchen nur noch ein Makromolekül, also ein Peptid, enthält (Schmelzeisen-Redeker et al. 1998). Durch dieses Verfahren entstehen mehrfach positiv geladene Ionen $[M + nH]^{n+}$, weshalb sich innerhalb eines Spektrums eines Analyten eine Serie von nacheinander geschalteten Signalen mit unterschiedlichen m/z-Werten ergeben. Diese Signale unterscheiden sich in der Anzahl der angelagerten Protonen n und damit in ihrer Ladung.

Im Gegensatz zur ESI werden bei der **MALDI**-Massenspektrometrie Analyten mit Photonen beschossen. Dazu werden niedermolekulare Matrix-Moleküle auf einer Metalloberfläche mit einem gepulsten UV-Laserstrahl angeregt. Durch die Laserbestrahlung kommt es zu einem Energieübertrag der angeregten niedermolekularen Matrix auf die in einem Kristall eingebauten Analyten, wodurch die Analyt-Moleküle desorbiert und ionisiert werden. Charakteristisch bei diesem Vorgang ist, dass meist einfach positiv geladene Ionen in die Gasphase überführt werden, die im elektrischen Feld extrahiert und beschleunigt werden.

Eine sehr häufige Kombination dieser Systeme ist das aus zwei Analysatoren bestehende **Q-TOF-Massenspektrometer** (Q-TOF-MS), mit dem zwei meiner Proben untersucht wurden (RCC460; RCC471). Bei diesem System ist zwischen Ionenquelle und dem Flugzeitmassenanalysator ein Quadrupol (Q) zwischengeschaltet.

Letzterer dient als Massenfiter. Er besteht aus vier Metallstäben, die parallel und in gleichem Abstand zueinander liegen, an denen Gleich (U)- und Wechselspannungen (V) angelegt sind. Durch die Spannungen wird ein elektrisches Feld erzeugt, wodurch die von der Ionenquelle eingeleiteten Ionen nach m/z ausgewählt werden können.

Zu jedem erzeugten Ion existiert ein Verhältnis von Gleich- und Wechselspannung, das dem Ion die Passage durch den Quadrupol erlaubt. Dieses Verhältnis bestimmt den Filterdurchlass bzw. das Auflösungsvermögen, da nur Ionen eines bestimmten m/z bei einem bestimmten Verhältnis von U und V die vier Pole entlang fliegen und dadurch den Filter passieren können. Die Passage der Ionen wird dadurch erreicht, dass die Polarität der Stäbe wechselt, bevor die Ionen auf den Stäben auftreffen können. Somit werden sie von den geladenen Stäben abgestoßen. Ionen mit unterschiedlichen bzw. nicht definierten m/z -Verhältnissen fliegen auf instabilen Bahnen, sie kollidieren mit den Metallstäben und werden dadurch in ihrer Passage gestoppt.

In der dahintergeschalteten feldfreien Vakuum-Flugröhre, dem TOF-MS, fliegen beschleunigte Teilchen gleicher kinetischer Energie mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten wenn sie unterschiedliche Massen aufweisen. Diese unterschiedlichen Massen werden durch Messungen der Flugzeit bestimmt. Die Bestimmung der zu analysierenden Ionen findet im Hochvakuum statt. Dieses Hochvakuum stellt ein feldfreies Vakuum dar. Dadurch fliegen die zuvor beschleunigten Ionen mit ihrer erreichten Geschwindigkeit dahin, ohne erneut beschleunigt oder abgebremst zu werden. Alle Ionen durchfliegen die gleiche Strecke des Flugrohrs und treffen auf einen Detektor. Ionen mit unterschiedlichen Massen fliegen mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten und erreichen somit den Detektor zu unterschiedlichen Zeiten. Durch die Bestimmung der Zeit, die die Ionen benötigen um die Strecke zwischen Ionenquelle und Detektor zu durchfliegen, werden ihre Massen ermittelt.

Durch Messung der Flugzeit lässt sich somit das m/z -Verhältnis aller Analyten berechnen:

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

m = Masse des Ions

v = Geschwindigkeit des Ions nach Beschleunigungsstrecke

z = Ladungszahl

e = Elementarladung

t = Gesamtflugzeit

L = Länge der feldfreien Driftstrecke des Flugrohrs

E_{kin} = kinetische Energie des Ions

Es gibt zwei verschiedene Analysenmethoden. Bei der ersten findet keine Fragmentierung statt, da der Quadrupol (MS1) und die dahinter geschaltete Kollisionszelle nicht eingeschaltet sind. Dadurch werden Ionen direkt zum sog. Pusher geleitet, der den Analyten direkt in den TOF-Analysator leitet. Bei der zweiten Methode dagegen werden Ionen fragmentiert. Der Quadrupol wird so programmiert, dass nur Ionen mit definierten m/z -Verhältnissen in die Kollisionszelle gelangen, die mit einem Kollisionsgas (gewöhnlich Helium oder Argon) gefüllt ist. Dabei wird ein Zusammenstoß der Analyt-Ionen mit dem Kollisionsgas erzwungen, infolge dessen Fragmentierungsreaktionen entstehen (*collisionally induced decay*, CID). Vor Eintritt in die Kollisionszelle werden die Ionen nochmals mit einer zusätzlichen Spannung beschleunigt, um damit den Durchtritt und dadurch die Detektierbarkeit der Fragmente zu gewährleisten. Die Gerätesteuerung, Datenaufnahme und Datenverarbeitung wurde mit dem Software-Programm MassLynx 4.0 durchgeführt.

Beim **LTQ-Orbitrap-MS** (Thermo Fisher Scientific, Bremen) handelt es sich um ein Massenspektrometer der neuen Generation, mit dem ein weiterer Teil meiner Proben untersucht wurde. Dieses Massenspektrometer ist ein Hybrid-MS bestehend aus einer linearen Ionenfalle und einem neu entwickelten Analysator, einer elektrostatischen Ionenfalle. Auch hier kommen die Ionen von einer ESI, werden aber im Gegensatz zum Q-TOF über mehrere dazwischen geschaltete Transport-Module geleitet, bevor sie in die kombinierte C-Trap / HCD *Collision Cell Combination* (*higher-energy collisional dissociation*, HCD) gelangen. Diese Kombination bewirkt eine höhere und schnellere Ausbeute fragmentierter Ionen sowie eine erhöhte Sensitivität (Perry et al. 2008). Sie hat den Vorteil, dass auch Ionen fragmentiert werden können, die nur in geringer Konzentration vorliegen. Die Ionen werden dabei von den Transport-Multipolen über die C-Trap in die HCD-Kollisionszelle geleitet. Hier werden die Ionen sehr stark beschleunigt, prallen mit den Stickstoffmolekülen zusammen und werden dabei fragmentiert. Danach werden die fragmentierten Ionen wieder in die C-Trap zurückbefördert, bevor sie wie unten beschrieben, in die Orbitrap transferiert werden.

Zu den Transport-Modulen (siehe Abbildung 6) zählt die *S-Lens*, sie wird auch als *Stacked Ring Ion Guide* bezeichnet. Sie bewirkt einen um den Faktor 5 -10 höheren Ioneneinstrom in das Massenspektrometer als herkömmliche Geräte. Nach der *S-Lens* folgt die *dual-pressure ion trap*. Sie besteht aus zwei identisch nacheinander geschalteten Quadrupol-Zellen, die durch eine Linse getrennt sind. Die erste Ionenfalle, die *high pressure cell*, arbeitet mit einem höheren Gasdruck als die zweite und erlaubt somit eine höhere Fragment-Ausbeute. In der zweiten Zelle, der *low pressure cell* findet dagegen ein langsames Scannen und Detektieren der Ionen statt.

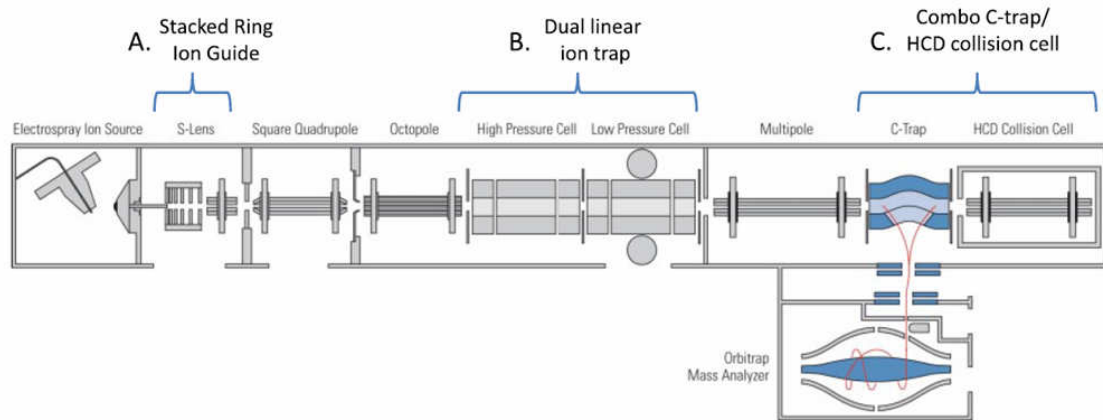


Abbildung 6: Schematische Darstellung der *LTQ-Orbitrap-MS*. Quelle: Olsen et al. 2009.

Das Prinzip des *LTQ-Orbitrap-MS* besteht darin, dass Ionen zunächst in der Quadrupol-Ionenfalle gespeichert werden, bevor sie axial über ein Radiofrequenz (RF)-Transport-Oktapole (Multipole) in eine C-förmige Ionenfalle, die C-Trap, ausgeworfen werden. Das Volumen der C-Trap ist mit Stickstoff gefüllt. Kollidieren die Ionen mit Stickstoff, erfahren sie einen Energieverlust und werden komprimiert, da an beiden Enden der C-Trap ein elektrisches Potential angelegt ist. Durch einen Gleichstromimpuls werden sie dann komprimiert in die Orbitrap radial hineingeschossen. In der Orbitrap rotieren die radial eingeschossenen Ionen durch elektrostatische Anziehung auf Kreisbahnen um eine spindelförmige Elektrode, gleichzeitig oszillieren die Ionen axial. Diese oszillierenden Ionen induzieren einen Strom, der mit Hilfe eines Verstärkers aufgezeichnet werden kann. Dabei erzeugen die Ionen einer Masse ein sinusförmiges Signal. Viele Ionen erzielen ein komplexes Signal, dessen Frequenz mit Hilfe der Fouriertransformation ermittelt werden kann.

Der m/z -Wert eines Ions lässt sich mit der Frequenz der axialen Oszillation nach folgender Gleichung ermitteln (Perry et al. 2008):

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

ω = Frequenz der Oszillation

k = instrumentenabhängige Konstante

m = Masse des Ions

z = Anzahl der Ladungen des Ions

Die Gerätesteuerung, Datenaufnahme und Datenverarbeitung bei der *LTQ-Orbitrap* wurde mit dem Software-Programm Proteome Discoverer 1.1 durchgeführt.

Abschließend wurden die fragmentierten Analyten von einem Detektorsystem detektiert, welches das Massenspektrum liefert. Häufig wird als Detektor eine *multi channel plate* (MCP) oder ein Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) eingesetzt. Beim SEV werden durch Sekundäremissionskaskaden kleinste Elektronenströme zu messbaren Größen verstärkt. Die MCP ist aus vielfach nebeneinander angeordneten Kanälen aufgebaut und ist ein flächenhafter, bildauflösender Sekundärelektronenvervielfacher. Er dient zur rauscharmen Verstärkung geringer Ströme freier Elektronen, die mit einer bestimmten Energie auf die Platte auftreffen und dort Sekundärelektronen auslösen.

2.3.2 LC-MS-Kopplung

Vor der massenspektrometrischen Sequenzierung war die chromatographische Auftrennung der Peptide notwendig. Dazu wurde eine *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) mit der Elektrospray-Einheit des Massenspektrometers gekoppelt (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry* (LC-MS)-Kopplung). Diese Methode ermöglicht die fortwährende Aufnahme von MS- und MS/MS-Spektren der von der Säule eluierenden Komponenten. Weiterhin erlaubt diese Methode die Ermittlung der Retentionszeit, über die zusammen mit der Masse eines Peptids eine Aussage über das Peptid vorgenommen werden kann. Die Flüssigchromatographie basiert auf der Verteilung und Trennung von Komponenten eines Gemisches zwischen einer festen, stationären Phase und einer flüssigen, mobilen Phase.

Bei der HPLC wird die mobile Phase mit Druck über die stationäre Phase gepumpt, die in ein Säulenrohr gefüllt ist. Dabei wird die stationäre Phase ständig von der mobilen Phase sowie dem zu trennenden Peptidgemisch durchströmt. Der Vorteil darin liegt in der optimalen Trennung auch sehr kleiner Partikel und kleiner Elutionsvolumina. Die mobile Phase ermöglicht die Wechselwirkung der Substanzmischung mit der stationären Phase. Diese Wechselwirkung bewirkt einen unterschiedlich verzögerten Transport der einzelnen Komponenten des Gemisches, welche so nach einer bestimmten Retentionszeit das Säulenmaterial in Einzelbestandteile aufgetrennt verlassen.

Bei den massenspektrometrischen Messungen wurde zur Trennung eine C18-Nano-HPLC (Eksigent, Dublin) verwendet, der eine C18-Vorsäule vorgeschaltet war. Die C18-Säule enthält kovalent gebundene Kohlenwasserstoffketten und dient so als unpolare Träger (*reversed phase*). Es kommt zu hydrophoben Wechselwirkungen zwischen der Substanzmischung und der unpolaren stationären Phase. Während der Chromatographie erfolgt die Elution mittels eines steigenden Anteils eines unpolaren Lösungsmittels (Acetonitril). Dieses Lösungsmittel konkurriert um freie Bindungsstellen mit den Peptiden, die in Gegenwart eines polaren Eluenten (0,1 % Ameisensäure) an der stationären Phase adsorbiert werden. Die Trennung erfolgt mit ansteigender

Konzentration des organischen Eluenten, weil sich die Elutionskraft durch Verringerung der Polarität der mobilen Phase erhöht.

Beim *Q-TOF* betrug die Flussrate des HPLC-Systems üblicherweise 300 nl/min. Vor der Probentrennung wurden die Kapillarsäulen 20 Minuten mit 100 % Eluent B gewaschen. Nun wurde die gefriergetrocknete Probe in 100 – 150 µl Eluent A aufgenommen und manuell in eine 200 µl-Probenschleife injiziert. Unter Äquilibrationsbedingungen wurde die Probe bei einer Flussrate von 20 µl/min innerhalb von 30 Minuten aus der Probenschleife auf die C18-Vorsäule geladen. Anschließend wurde bei einer Flussrate von 300 nl/min die Vorsäule mit der Nano-HPLC-Säule (µ-Kapillarsäule) in Reihe geschaltet, die Probe von der Vorsäule eluiert und auf der µ-Kapillarsäule durch einen linearen Gradienten aufgetrennt. Zur Reinigung der Säule von stark hydrophoben Probenresten wurde schließlich ein weiterer Waschschritt mit Eluent B durchgeführt.

Beim *LTQ-Orbitrap-MS* wurde an die HPLC ein *Spark Micro Autosampler* angeschlossen, um das Injizieren der Proben in die Probenschleife zu automatisieren. Die Flussrate der Vor- und Trennsäule betrug üblicherweise 500 nl/min. Durch diese Flussrate, im Gegensatz zur Flussrate von 300 nl/min beim *Q-TOF*, wurde die Waschzeit am Anfang eines Laufs auf 60 Minuten erhöht. Die im Anschluss stattfindende Äquilibration dauerte 180 Minuten, bevor die Flussrate des Lösungsmittels auf die für die Elution benötigten 300 nl/min reduziert wurde. Danach wurde die Probe auf die Vorsäule geladen und durch einen linearen Gradienten aufgetrennt.

2.3.3 Interpretation von MS/MS-Spektren zur Peptidanalyse

Bei der Massenspektrometrie von Proteinen mit der *Elektrospray Ionisation* als Ionisierungsmethode werden bevorzugt Protonen erzeugt, die an allen basischen Stellen der Peptide angeheftet sein können, vor allem an den α -Aminogruppen der N-terminalen Aminogruppen und den Seitenketten der basischen Aminosäuren Histidin, Lysin und Arginin. In der Gasphase ist die Basizität der Seitenketten sehr stark, weshalb an dieser Stelle anhaftende Protonen trotz Stoßaktivierung in der Kollisionszelle fixiert sind. Die Protonen an den N-terminalen Enden können jedoch zu jeder der Peptidbindungen wandern. Dies wird als Migration durch interne Solvatisierung bezeichnet. Die Protonen sind dann an den Carbonylsauerstoff angelagert. Dadurch entsteht aus einem Peptid eine heterogene Population von Ionen, die sich hinsichtlich der Position der Protonen an den Amidbindungen unterscheiden (Wysocki et al. 2000). Die Stellen an die sich Protonen anlagern lenken die Fragmentierungsreaktion, da die Spaltung der Peptide bevorzugt an diesen Stellen im Peptidrückgrat stattfindet. Infolgedessen fragmentiert jede Subpopulation von Vorläuferionen unterschiedlich, so dass eine Serie von Fragmentionen entsteht, die in ihrer Gesamtheit die Sequenz eines Peptids erkennen lässt (Hunt et al. 1986).

Die einzelnen Fragmente unterscheiden sich jeweils um die aminosäurespezifische Masse und werden im Spektrum als hintereinander geschaltete Peaks dargestellt. Aus den Massendifferenzen können daher die zugehörigen Aminosäuren und in der Folge die Aminosäuresequenz abgeleitet werden.

Im Idealfall brechen die Peptide genau an einer Peptidbindung. Die entstehenden Fragmente tragen entweder den C- oder den N-Terminus. N-terminale Fragmente sind wegen ihrer Ladung im Spektrum sichtbar und werden als a-, b- und c-Fragmente bezeichnet. Diejenigen Fragmente, die den C-Terminus beinhalten, werden als x-, y- oder z-Ion bezeichnet. In den Spektren dominieren die b- und die y-Serien. Die a-Serien entstehen durch neutralen Verlust von Kohlenmonoxid aus den b-Ionen. Dies zeigt sich in den Spektren durch einen Abstand $\Delta m = 28$ zwischen den beiden entsprechenden Signalen auf der m/z-Achse. Weitere neutrale Verluste können durch Abspaltung von Wasser entstehen ($\Delta m = 18$) aus b- und y-Fragmenten sowie aus den Seitenketten von Serin, Threonin, Aspartat und Glutamat. Der Verlust von Ammoniak ($\Delta m = 17$) kann bei den Seitenketten von Glutamin, Lysin und Arginin vorkommen. Weitere Informationen liefern die Immonium-Ionen ($\text{H}_2\text{N}=\text{CHR}^+$). Sie sind im unteren Massenbereich des Spektrums sichtbar und weisen typische Massen für bestimmte Aminosäuren auf.

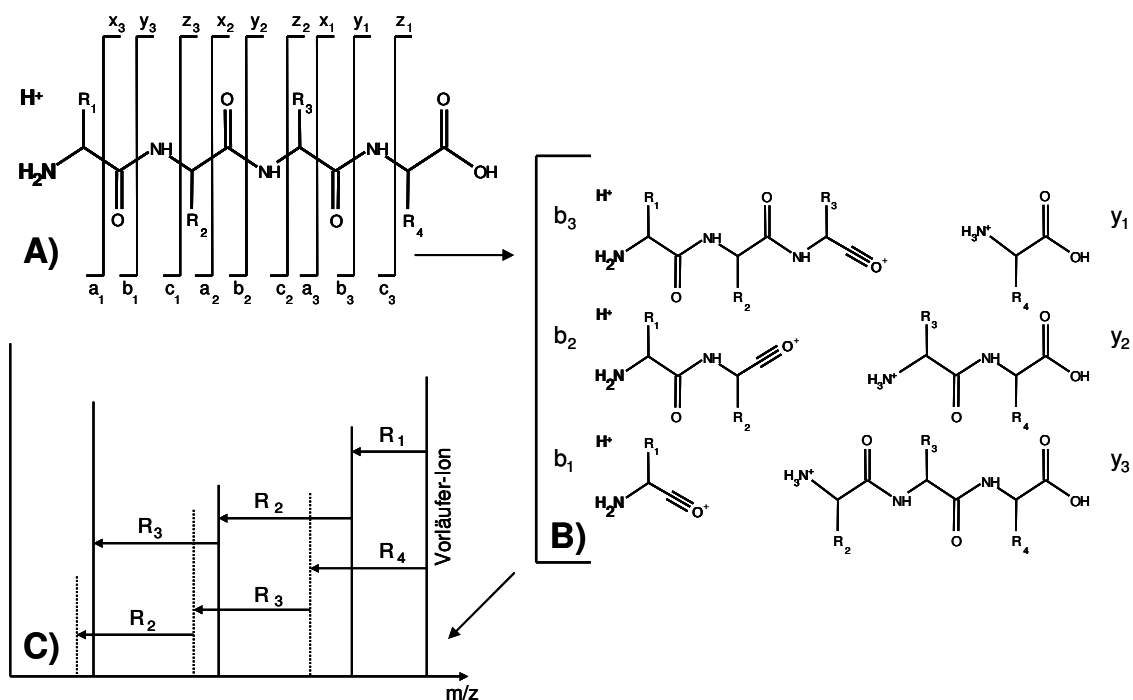


Abbildung 7: Fragmentierung von Peptiden mit Fragmentationsserien und dem zugehörigen Fragmentationsspektrum. Benachbarte Signale entstehen durch das Wegfallen der in der Primärsequenz benachbarten Aminosäure. Somit wird der Abstand zwischen benachbarten Peaks einer Fragmentserie dazu benutzt, die jeweils nächste Aminosäure über die Massendifferenz zu ermitteln. Aus dieser Massendifferenz lässt sich somit zwischen b_3 und b_2 -Ion die Masse und damit die Identität des Aminosäurenrestes R_3 ableiten, aus der Massendifferenz zwischen b_2 und b_1 -Ion die Masse von R_2 . A) Vorläufer-Ion; B) Fragment-Ionen; C) Fragmentationsspektrum.

Eine wesentliche Grundlage zur Interpretation der MS/MS-Spektren ist daher die Kenntnis der 20 proteinogenen Aminosäuren, aus denen Proteine und Peptide aufgebaut sind. Dazu wurden die genauen m/z -Werte tabelliert. Alle unterscheiden sich in ihren Massen, außer Leucin und Isoleucin (je 113). Die Massen von Lysin und Glutamin unterscheiden sich nur in ihren Nachkommastellen (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Massen der 20 proteinogenen Aminosäuren im Drei- und Einbuchstabencode sowie deren Immonium-Ionen

Aminosäure			Immonium-Ion	Molekulare Masse
Glycin	Gly	G	30.03383	57.02146
Alanin	Ala	A	44.04948	71.03711
Serin	Ser	S	60.04439	87.03203
Prolin	Pro	P	70.06513	97.05276
Valin	Val	V	72.08078	99.06841
Threonin	Thr	T	74.06004	101.04768
Cystein	Cys	C	76.02155	103.00918
Leucin	Leu	L	86.09643	113.08406
Isoleucin	Ile	I	86.09643	113.08406
Asparagin	Asn	N	87.05529	114.04293
Asparaginsäure	Asp	D	88.03930	115.02694
Glutamin	Gln	Q	101.07094	128.05858
Lysin	Lys	K	101.10732	128.09496
Glutaminsäure	Glu	E	102.05495	129.04259
Methionin	Met	M	104.05285	131.04048
Histidin	His	H	110.07127	137.05891
Phenylalanin	Phe	F	120.08078	147.06841
Arginin	Arg	R	129.11347	156.10111
Tyrosin	Tyr	Y	136.07569	163.06333
Tryptophan	Trp	W	159.09167	186.07931

Wie bereits erwähnt unterscheiden sich die einzelnen Fragmente jeweils um die aminosäurespezifische Masse und werden im Spektrum als hintereinander geschaltete Peaks dargestellt. Aus den Massendifferenzen können daher die zugehörigen Aminosäuren und in der Folge die Aminosäuresequenz abgeleitet werden. Als Beispiel ist das ermittelte Peptid *SEARELVAL* in Abbildung 8 dargestellt.

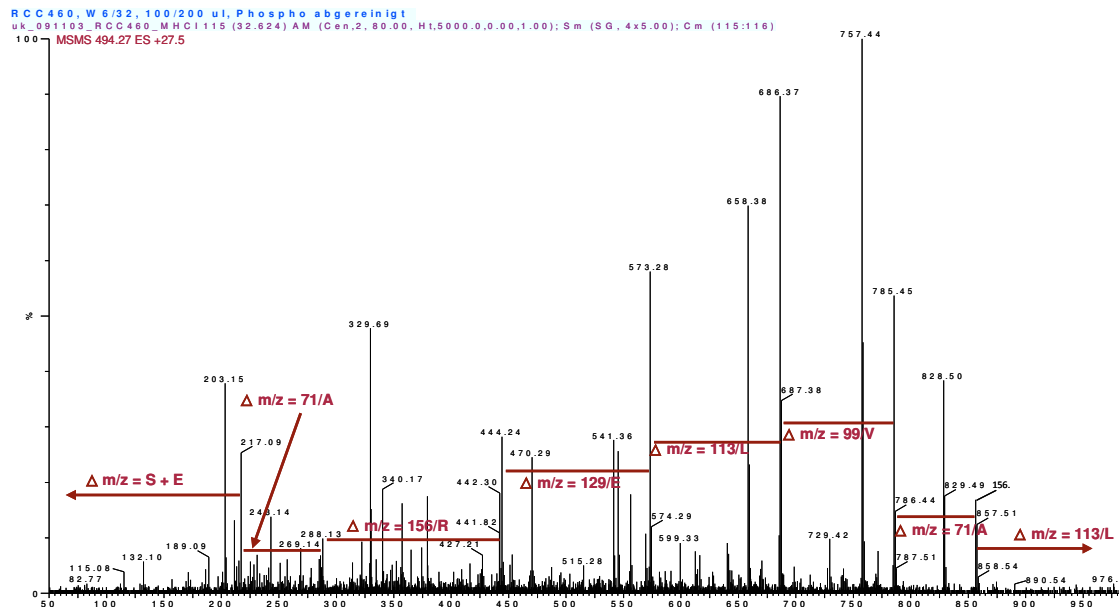


Abbildung 8: Fragmentspektrum eines analysierten Peptids der Probe RCC460 am Beispiel von *SEARELVAL*. Das Spektrum zeigt eine gute Annotation der b-Serie. Verwendetes Massenspektrometer: *Q-TOF Ultima*.

2.3.4 Computerunterstützte Interpretation von MS/MS-Spektren

Bei der Interpretation der MS/MS-Spektren können häufig nur Peptidfragmente identifiziert werden. Mit Hilfe von verschiedenen Datenbanken können diese Informationen dazu verwendet werden, die gesamte Peptidsequenz und das zugehörige Quellprotein zu ermitteln. Durch Vergleich des gemessenen Spektrums mit Spektren aus einer Datenbank mit Protein- bzw. DNA-Sequenzen wird versucht, die gesamte Sequenz zu ermitteln. Hierfür kann beispielsweise eine Datenbank des NCBI mit Hilfe des MASCOT-Programms verwendet werden (www.matrixscience.com) (Perkins et al. 1999). Beim MASCOT-Programm wird ein theoretisch berechnetes Spektrum mit dem gemessenen Spektrum verglichen. Passen beide Spektren mit der Reihenfolge ihrer Fragmentationen und mit ihrer Masse überein, kann daraus die vollständige Sequenz eines Peptids identifiziert werden.

Wurde ein Peptid ermittelt, erfolgte im Anschluss die Beurteilung der Vorhersage von Peptidmotiven (s. auch unter 1.2.3.1) mit Hilfe des Programms *SYFPEITHI* (www.syfpeithi.de) um die Ankeramino-säuren zu bestimmen.

Auf diese Weise wurde verglichen, ob die Typisierung des Patienten mit den auf die Typisierung passenden MHC-I-Molekülen des Peptids übereinstimmt. Schließlich wurden die Quellproteine der identifizierten Peptide mit Hilfe der NCBI-Datenbank (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) sowie die zugrunde liegenden Funktionen der Proteine ermittelt. Um Informationen über die Proteine und deren mögliche Assoziation mit Tumorerkrankungen zu erhalten, wurde im Anschluß eine Literaturrecherche ausgeführt.

2.3.5 Vergleichende Genexpressionsanalyse

Um zu beurteilen, ob die bei den massenspektrometrischen Analysen identifizierten HLA-Liganden tumorspezifisch exprimiert sind, wurden parallel vergleichende Untersuchungen von Proteinen auf mRNA-Ebene durchgeführt.

Zur Untersuchung der Genexpressionsanalysen wurde die *RNA-Micro-Array*-Technologie eingesetzt. Da Tumorzellen im Vergleich zu gesunden Zellen ein verändertes Genexpressionsmuster auf der Ebene der Transkription (mRNA) oder der Translation (Proteine) aufweisen, können solche differenziell exprimierten Gene mit der *Array*-Technologie auf der Stufe der mRNA in sehr großer Anzahl bestimmt werden. Dabei werden auf eine Trägersubstanz (Nylonmembran oder Glas- und Kunststoffträger) als feste Phase in regelmäßiger Anordnung Nukleinsäure-Moleküle oder Oligonukleotide (Sonden, *probes*) mit bekannter Basensequenz punktförmig (*spot*) und in hoher Dichte aufgetragen. Die *spot*-Dichte liegt zwischen mehreren zehntausend und hunderttausend *spots* pro cm², z.B. GeneChip von *Affymetrix*.

Bei der Isolation von Gewebeproben wird durch Retrotranskription die mRNA in doppelsträngige cDNA umgeschrieben und gleichzeitig radioaktiv oder mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die bekannten Nukleinsäure-Moleküle oder Oligonukleotide werden auf der festen Phase immobilisiert und mit den zu untersuchenden markierten Nukleinsäuren hybridisiert. Ein markiertes cDNA-Molekül der Probe bindet nur dann an die arraygebundene cDNA, wenn ihre Basensequenzen komplementär zueinander sind.

Die Untersuchungen und die computerunterstützte Datenanalyse mit der *Affymetrix-Software* wurden in der Medizinischen Genetik Tübingen, Institut für Humangenetik von Herrn Dr. rer. nat. Michael Bonin durchgeführt. Zur Untersuchung wurden kleine Gewebeproben von Nierenzellkarzinomen sowie korrespondierendem normalem Nierengewebe eingesetzt, welche intraoperativ gewonnen worden waren. Diese wurden in eigens dafür vorbereitete Laborgefäße eingefüllt und schockgefrosten.

3 ERGEBNISSE

In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse untersuchter Gewebeproben vorgestellt. Untersucht wurden sowohl solide Tumoren des Nierenzellkarzinoms als auch in geringem Maße korrespondierendes gesundes Nierengewebe. Tumor und Normalgewebe stammten jeweils vom selben Patienten. Parallel zu den massenspektrometrisch analysierten Gewebeproben wurden als quantitative Untersuchungsmethode vergleichende Genexpressionsanalysen durchgeführt. Alle massenspektrometrisch gewonnenen Ergebnisse beziehen sich ausschließlich auf HLA-Klasse-I-Peptide.

3.1 Gewebeproben im Überblick

In dieser Arbeit wurden solide Tumoren des Nierenzellkarzinoms von insgesamt dreizehn Patienten präpariert. Tabelle 9 zeigt die verwendeten Gewebeproben sowie deren Patientendaten. Zehn der präparierten Proben gehörten histologisch zum klarzelligen Typ. Zwei Proben entsprachen dem chromophoben, eine Probe dem sarkomatoiden Typ. Fünf der Proben waren von Frauen, acht von Männern. Bei allen Proben handelte es sich um eine weitgehend schlechte Differenzierung (G2-G3) bei bereits fortgeschrittenem Stadium (II-III/IV). Bei der Probe RCC468 fehlte das Grading, bei RCC482 die Typisierung. Tabelle 9 zeigt das Grading & Staging aller präparierten Gewebeproben.

Tabelle 9: Übersicht aller präparierten Gewebeproben und deren Einteilung nach dem TNM-System

Probe	Alter in Jahren	Geschlecht	HLA	Histologischer Typ und Grade & Stage	Stadium nach UICC
RCC389	47	f	A*03 A*30 B*07 B*49:01	ccRCC pT1a G2 4,4 cm	I
RCC410	21	f	A*24 B*38 B*55	chromophob RCC pT1a cN0 cM0 L0 V0 G2 3,5 cm	I
RCC411	47	m	A*02 A*03 B*27:02 B*40	ccRCC pT2 pN0, pM1, L0 V0 G3 18 x 12 cm	III-IV
RCC417	73	m	A*01 A*02 B*15 B*37	ccRCC pT1b cN0 cM0 G2 5 cm	I
RCC421	55	m	A*02 A*03 B*07	ccRCC pT1b cN0 cM0 G2 6,5 cm	I
RCC425	56	m	A*03 A*26 B*40 B*44	sarkomatoid z.T. (cc)RCC pT3b pN0 cM0 L0 V1 G3 16 cm	III
RCC426	72	m	A*03 A*32 B*14 B*27	ccRCC pT3a cN0 cM1 L0 V0 G3 8,5 cm	IV
RCC431	66	m	A*26 A*32 B*07 B*39	ccRCC pT2 cN0 cM0 L0 V0 G2 10 cm	II
RCC454	49	m	A*02 A*23 B*15 B*57	chromophob RCC pT2 pN0 Mx L0 V0 G2 11,5 cm	II
RCC460	87	f	A*01 A*03 B*35 B*40	ccRCC pT3b pNx Mx L0 V1 G2 6 cm	III
RCC468	42	m	A*03 A*68 B*13 B*44:02	ccRCC pT3b pN0(0/1) 7 cm	III
RCC471	43	f	A*02 A*24 B*38	ccRCC pT3b cN0 cM0 G2 6,5 cm	III
RCC482	74	f	n.b.	ccRCC pT1b cN0 cM0 L0 V0 G3 6,5 cm	I

Legende: [ccRCC] clear cell Renal Cell Carcinoma; [n.b.] nicht bekannt; [p] postoperative histopathologische Klassifikation; [c] (*clinical*) prätherapeutische Bestimmung der Klassifikation; [L] Invasion in Lymphgefäße; [V] Invasion in Venen; [G] Differenzierungsgrad.

Von den dreizehn Gewebeproben wurden zur Immunpräzipitation Tumorgewebe und, sofern vorhanden, korrespondierendes gesundes „Normal“-Nierengewebe präpariert. Zur Herstellung der Antikörpersäulen für die Affinitätschromatographie wurde für die MHC-Klasse-I-Moleküle der Antikörper W6/32 und für die MHC-Klasse-II-Moleküle der Antikörper L243 verwendet. Die Kopplungseffizienzen der Antikörper an die Sepharose betrugen im Durchschnitt rund 90 %.

Tabelle 10: Kopplungseffizienzen der Antikörper W6/32 und L243 für Tumor und korrespondierendes gesundes Nierengewebe

R C C	G e w i c h t		K o p p l u n g s e f f i z i e n z			
Proben	T in g	N in g	AK W6/32 für T in %	AK W6/32 für N in %	AK L243 für T in %	AK L243 für N in %
	3.9	3.4	98	96	98	97
410	3.3	1.3	89	98	98	94
411	10.3	2.2	91	89	84	94
417	3.9	2.0	84	90	92	86
421	10.5	2.8	85	78	88	65
425	20.6	—	99	—	96	—
426	10.5	1.0	83	67	83	83
431	9.4	3.0	92	54	88	84
454	13.0	1.0	80	88	95	92
460	4.0	—	82	—	89	—
468	15.3	—	98	—	98	—
471	10.1	—	85	—	91	—
482	3.4	—	91	—	96	—

Legende: [T] Tumorgewebe, [N] korrespondierendes gesundes Normalgewebe.

3.2 Massenspektrometrische Analyse von soliden Tumoren des Nierenzellkarzinoms

3.2.1 Identifizierung von HLA-Klasse-Liganden

Acht Gewebeproben (RCC417, -421, -425, -431, -460, -468, -471 und RCC482) der dreizehn präparierten Gewebeproben wurden der massenspektrometrischen Analyse zugeführt. Parallel dazu wurden vergleichende Genexpressionsanalysen von Tumorgewebe und korrespondierendem Normalgewebe mit der *Microarray*-Methode (exklusive RCC471) durchgeführt. Auf Grund weiterer fehlender Gewebeproben konnte bei der Probe RCC471 eine Untersuchung durch vergleichende Genexpressionsanalyse nicht veranlasst werden.

Da bei der Probe RCC421 auch eine genügende Menge von Normalgewebe vorhanden war, wurde diese einer differenziellen quantitativen Guanidinylierung und Nikotinylierung unterzogen.

Die massenspektrometrischen Analysen der Proben RCC460 und RCC471 wurden von Gabor Mester mit der *Q-TOF Ultima*, die Proben RCC421, -425, -431, -468, und RCC482 von Oliver Drews, Marc Günder und Christian Hotz mit der *LTQ-Orbitrap-MS* durchgeführt. Nach der massenspektrometrischen Analyse erfolgte die Auswertung mit Hilfe spezieller Software, wie unter 2.3.3 beschrieben.

Die Proben RCC460 und RCC471 wurden mit der Software *MassLynx 4.0* analysiert, alle weiteren mit der Software *Proteome Discoverer*. Bei der Probe RCC471 war es nicht möglich, nach Immunpräzipitation der HLA-Moleküle mit dem monoklonalen Antikörper W6/32 und chromatographischer Auftrennung der Probe massenspektrometrisch Peptide zu identifizieren.

Auf Grund der Einführung eines neuen Massenspektrometers (*LTQ-Orbitrap-MS*) und damit verbunden einer neuen Software (*Proteome Discoverer*) zur Auswertung der Peptidsequenzen war es nur bei der Probe RCC421 möglich, einen Vergleich von Tumorgewebe mit korrespondierendem gesunden Nierengewebe durchzuführen.

Bei der Auswertung der Fragmentspektren wurden die Sequenzen aller ermittelten HLA-Liganden wie unter 2.3.4 beschrieben mit Hilfe der MHC-Datenbank *SYFPEITHI* zur Bestimmung des HLA-Allotyps, mit Hilfe des *MASCOT*-Programms zur Bestimmung des theoretisch berechnetes Spektrums abgeglichen.

Das unter 2.3.3 in Abbildung 8 vorgestellte Peptid *SEARELVAL* (identifiziert mit Hilfe der Software *MassLynx*) zeigt ein neu identifiziertes Peptid, das zur Familie von Cytochrom P450 gehört. Cytochrom P450 zählt zu den Hämproteinen mit enzymatischer Aktivität. Es stammt aus der Gewebeprobe RCC460 und wurde mit der *Q-TOF-Ultima* detektiert. Auch in dieser Probe neu identifiziert war der HLA-Ligand *NPVDWKEKY* aus dem Protein *procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2* (Abbildung 9). Es handelt sich hier um ein Enzym, das wichtig für die Stabilität der Quervernetzungen von Bindegeweben ist.

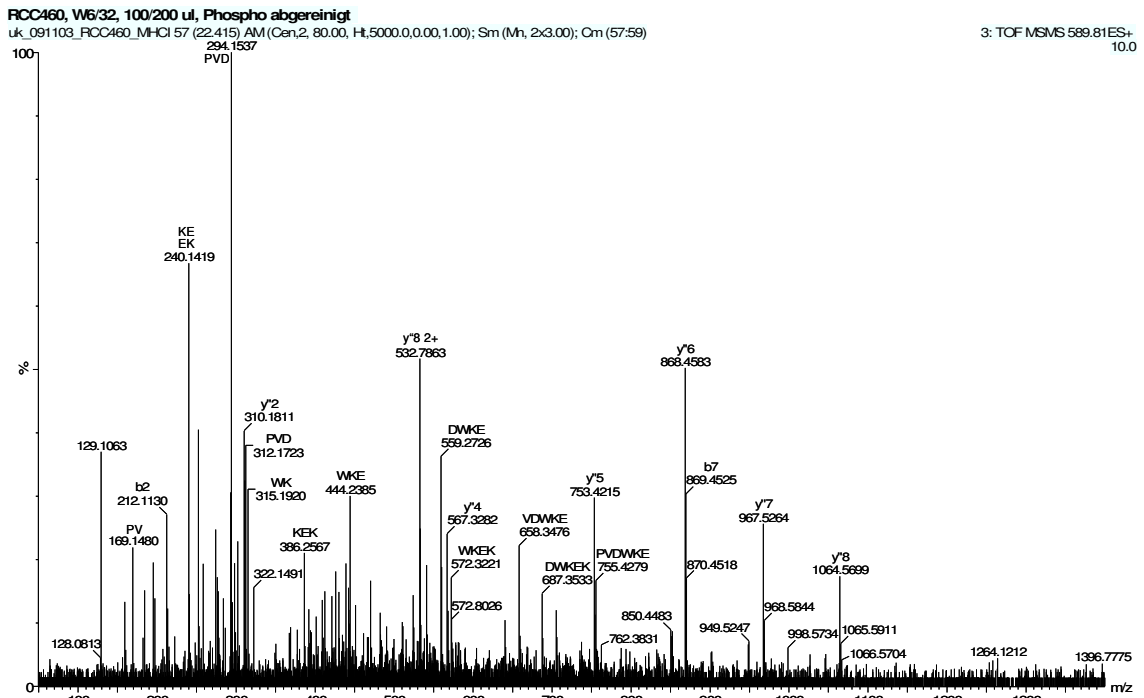


Abbildung 9: Fragmentspektrum der Sequenz *NPVDWKEKY*, hier als y-Reihe dargestellt. Die Buchstaben an den Peaks weisen auf die in den Signalen enthaltenen Aminosäuren hin und sind im Einbuchstabencode dargestellt. Verwendetes Massenspektrometer: *Q-TOF Ultima*.

Die folgenden Fragmentspektren wurden mit Hilfe der Software *Proteome Discoverer* erstellt. Beim ersten handelt es sich um Nebulin. Bei diesem bereits bekannten Protein konnte *SVYRTPVVNLK* als neue Sequenz detektiert werden. Nebulin ist ein großes Protein und zählt zum Zytoskelett. Seine Funktion besteht in der Stabilisierung der dünnen Filamente der Muskelfasern (Aktin) und erhöht die Geschwindigkeit mit der sich Myosin-Moleküle an das Aktin der dünnen Filamente bei Muskelkontraktionen anlagern (Chandra et al. 2009).

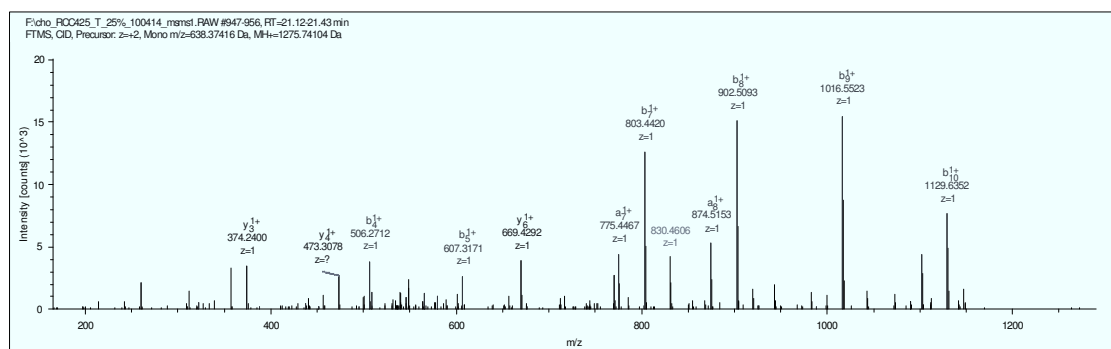


Abbildung 10: Fragmentspektrum *SVYRTPVVNLK* aus dem Protein Nebulin der Probe RCC425. Das Spektrum zeigt eine gute Annotation der b-Serie. Verwendetes Massenspektrometer: *LTQ-Orbitrap*.

Der HLA-Ligand *YSDLNTQRPYY* konnte zum bereits bekannten *protein tyrosine kinase binding protein* (TYROBP) sequenziert werden. Dieses spielt eine wichtige Rolle in der transmembranären Signaltransduktion.

Sowohl die Superoxid-Dismutase (SOD2) als auch der zugehörige HLA-Ligand *NLNVTEEKY* wurden neu identifiziert. Dies ist ein Enzym, das für die Umwandlung von Superoxid-Anionen zu Wasserstoffperoxid im Zellstoffwechsel verantwortlich ist.

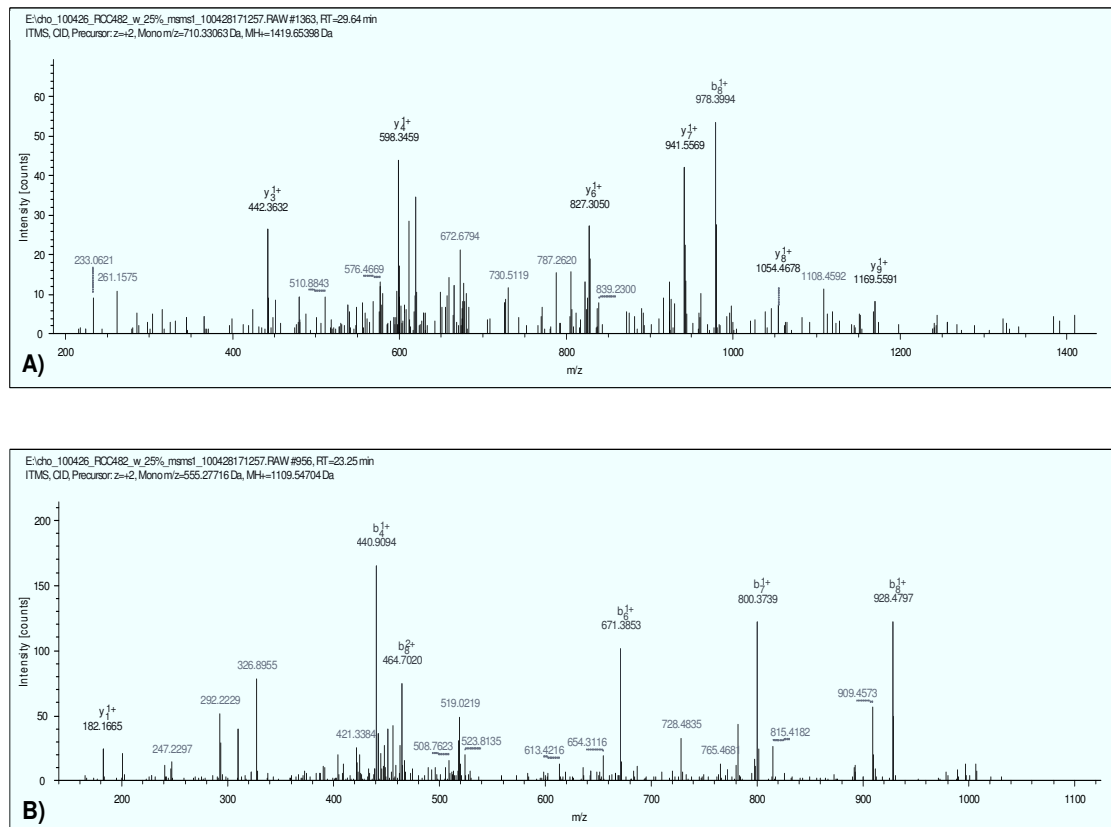


Abbildung 11: Fragmentspektren der Gewebeprobe RCC482. A) y-Serie: HLA-Ligand *YSDLNTQRPYY* aus dem Protein TYROBP. B) b-Serie: HLA-Ligand *NLNVTEEKY* des Enzyms SOD2. Verwendetes Massenspektrometer: *LTQ-Orbitrap*.

3.2.2 Identifizierung von HLA-Klasse-I Liganden nach Guanidinylierung und Nikotinylierung

Die Modifikation erlaubt durch Anlagerung von Nicotinsäure und Guanidin eine quantitative Unterscheidung in der Bestimmung gleicher Sequenzen zweier verschiedener Quellen, wie beispielsweise Tumorgewebe und Normalgewebe. Durch diese Methode wurde in einem Modifikationslauf der Probe RCC421 mit der *LTQ-Orbitrap-MS* für jede identifizierte Sequenz eines Peptids das zugehörige Pärchen gesucht. Im Peptidspektrum lassen sich dadurch zwei zugehörige gleiche Peptide anhand ihrer Masse unterscheiden. Die monoisotopische Masse der mit dNIC modifizierten Peptide war um 109 Da schwerer, die mit NIC modifizierten Peptide

um 105 Da schwerer als vergleichbare Peptide ohne Modifikation. Beide Peptide konnten daher bei der Auswertung durch die Differenz von 4 Da ihrem Ursprungsgewebe zugeordnet werden. Bei Anlagerung von Guanidin an die Aminosäure Lysin hatten alle modifizierten Peptide eine um 42 Da schwerere Masse als Peptide ohne Modifikation. In dieser Studie konnten beim Vergleich von Tumor zu Normalgewebe in der Probe RCC421 vier Probenpärchen zugeordnet werden.

Tabelle 11: Darstellung der vier detektierten Peptidpärchen der modifizierten Gewebeprobe RCC421 sowie deren monoisotopischer Massen. Die Differenz zwischen der mit dNIC modifizierten Tumorprobe und der mit NIC modifizierten Normalgewebeprobe beträgt 4 Da. Neue, bisher noch nicht an der Universität Tübingen identifizierte Peptide und Proteine sind fett markiert.

Sequenz	HLA	Gene ID	Quellprotein	Abkürzung	MH+ [Da]	MH+ [Da]
					dNIC	NIC
AVGPHLTAK	A*03	126282	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8-like 1	TNFAIP8L1	1044.58	1040.56
AVNAHSNILK	A*03	10989	<i>inner membrane protein, mitochondrial</i>	IMMT	1217.66	1213.64
DEAIRAVL	k.A.	5880	<i>ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (rho family, small GTP binding protein Rac2)</i>	RAC2	995.54	991.52
GVHGGILNK	A*03	345456	<i>profilin 3</i>	PFN3	1045.58	1041.56

Der Peptidsequenz *AVGPHLTAK* konnte das Protein *tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8-like 1* zugeordnet werden. Beide – Peptid und Protein – wurden an der Universität Tübingen neu identifiziert. Die Expression dieses Proteins wird durch den Tumornekrosefaktor (TNF) induziert. TNF regelt die Aktivität verschiedener Immunzellen durch Apoptose, Zellproliferation und Zelldifferenzierung. Die genaue Aufgabe des TNFAIP8L1 ist nicht bekannt. Die Funktion des auf der Innenseite der Mitochondrienmembran lokalisierten Proteins *inner membrane protein, mitochondrial* besteht in der Faltung der inneren Mitochondrienmembran. Das *inner membrane protein, mitochondrial* ist auf der Innenseite der Mitochondrienmembran lokalisiert und bildet die Faltung derselben. Das zugehörige Protein des HLA-Liganden *DEAIRAVL* ist an mehreren Zellfunktionen beteiligt wie beispielsweise der Kontrolle des Zellwachstums, der Umstrukturierung des Zytoskeletts und der Aktivierung von Proteinkinase. Es konnte jedoch nicht zur Typisierung annotiert werden. Das Peptid *GVHGGILNK*, zu dem das Protein *profilin 3* zugeordnet werden konnte, spielt eine Rolle bei der Struktur des Zytoskeletts. Zusammenfassend kann darauf geschlossen werden, dass von diesen vier Peptiden nur das Quellprotein des Peptids *DEAIRAVL* in der vergleichenden Genexpressionsanalyse überexprimiert war (siehe Tabelle 14).

In dieser modifizierten Probe wurden insgesamt 55 Peptide ermittelt. Von diesen Peptiden wurden 20 neue Peptide und 11 neue Quellproteine detektiert. Die Tabellen 12 und 13 zeigen weitere ermittelte modifizierte Peptide, zu denen keine Pärchen gebildet werden konnten.

Tabelle 12: Ermittelte Peptide der modifizierten Normalgewebeprobe, zu denen keine Pärchen gefunden werden konnten.

Sequenz	HLA	Gene ID	Quellprotein	
			Abkürzung	
AKLPALASVA	k.A.	151	<i>adrenergic, alpha-2B-, receptor</i>	ADRA2B
DRLLALNSL	k.A.	5591	<i>protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide</i>	PRKDC
GAFEHLPSL	A*02	7162	<i>trophoblast glycoprotein</i>	TPBG
RENLEFGKV	k.A.	2322	<i>fms-related tyrosine kinase 3</i>	FLT3
RSVEGLSR	k.A.	5744	<i>parathyroid hormone-like hormone</i>	PTH LH
TLIDLPGITRV	A*02	4599	<i>myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)</i>	MX1

Tabelle 13: Ermittelte Peptide der modifizierten Tumorgewebeprobe, zu denen keine Pärchen gefunden werden konnten.

Sequenz	HLA	Gene ID	Quellprotein	
			Abkürzung	
AAPRTVALTA	k.A.	3115	<i>major histocompatibility complex, class II, DP beta 1</i>	HLA-DPB1
ALADGVQKV	A*02	8542	<i>apolipoprotein L, 1</i>	APOL1
ALKTGIVAK	A*03	79002	<i>chromosome 19 open reading frame 43</i>	C19orf43
ALSDHHIYL	A*02	226	<i>aldolase A, fructose-bisphosphate</i>	ALDOA
APIAKVGVL	B*07	51474	<i>LIM domain and actin binding 1</i>	LIMA1
APRQPGLMA	B*07	51142	<i>oiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2</i>	CHCHD2 c
APRTVALTAL	B*07	3115	<i>major histocompatibility complex, class II, DP beta 1</i>	HLA-DPB1
ARPGPTVRT	k.A.	3805	<i>killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 4</i>	KIR2DL4
ATANQILK	A*03	10150	<i>muscleblind-like 2 (Drosophila)</i>	MBNL2
EILAKSSL	A*02	64006	<i>endogenous retroviral sequence K, 6</i>	ERV K6
EPRHGGLTL	B*07	57418	<i>WD repeat domain 18</i>	WDR18
EVLHSPAI	A*02	64781	<i>ceramide kinase</i>	CERK
GPVLGLLLFV	B*07	92736	<i>otopetrin 2</i>	OTOP2
GVANALAHK	A*03	3043	<i>hemoglobin, beta</i>	HBB
IARNLTQQL	B*07	123	<i>perilipin 2</i>	PLIN2
IVAGSLITK	A*03	55660	<i>PRP40 pre-mRNA processing factor 40 homolog A (S. cerevisiae)</i>	PRPF40A
IVAKHTSAL	A*02	83660	<i>talin 2</i>	TLN2
KLPGGSYMAK	A*03	3127	<i>major histocompatibility complex, class II, DR beta 5</i>	HLA-DRB5
KTFEGNLTTK	A*03	10594	<i>PRP8 pre-mRNA processing factor 8 homolog</i>	PRPF8
KVAGAATPK	A*03	3007	<i>histone cluster 1, H1d</i>	HIST1H1D
KVAPAPAVVK	A*03	6130	<i>ribosomal protein L7a</i>	RPL7A
KVAPAPAVVKK	A*03	6130	<i>ribosomal protein L7a</i>	RPL7A
MMSLRRLDY	A*03	23007	<i>phospholipase C, eta 1</i>	PLCH1
QLYKEQLAK	A*03	4627	<i>myosin, heavy chain 9, non-muscle</i>	MYH9
QPDQTRIVAL	B*07	2091	<i>fibrillarin</i>	FBL
QSLPTTSAA	k.A.	115701	<i>alpha-kinase 2</i>	ALPK2

Sequenz	HLA	Gene ID	Quellprotein	
			Abkürzung	
QTYVGITEK	A*03	23020	<i>small nuclear ribonucleoprotein 200kDa (U5)</i>	SNRNP200
RIQGPLQH	k.A.	EAW85283.1	<i>hCG2045458</i>	k.A.
RPSTSRSL	B*07	7431	<i>vimentin</i>	VIM
RVAPEEHPVL	Artefakt	60 71	<i>actin, beta</i> <i>actin, gamma 1</i>	ACTB ACTG1
SPRVQSTI	B*07	10517	<i>F-box and WD repeat domain containing 10</i>	FBXW10
SQEKPVPQL	k.A.	23116	<i>family with sequence similarity 179, member B</i>	FAM179B
SVNGKVL SK	A*03	23420 283820 408050	<i>NODAL modulator 1</i> <i>NODAL modulator 2</i> <i>NODAL modulator 3</i>	NOMO1 NOMO2 NOMO3
TYEAVREV	A*02	4736	<i>ribosomal protein L10a</i>	RPL10A
TPEEKSAVTAL	B*07	3043	<i>hemoglobin, beta</i>	HBB
TPSLVKSTSQL	B*07	517	<i>ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit C2 (subunit 9)</i>	ATP5G2
VAKAVTQAL	k.A.	7094	<i>talin 1</i>	TLN1
VSYSHIQSK	A*03	4134	<i>microtubule-associated protein 4</i>	MAP4
VVRHQLLKT	k.A.	1350	<i>cytochrome c oxidase subunit VIIc</i>	COX7C
VYPDGI RHI	k.A.	23450	<i>splicing factor 3b, subunit 3, 130kDa</i>	SF3B3
YAVAVVKK	A*03	4057	<i>LTF lactotransferrin</i>	LTF

3.2.3 Identität von HLA-Klasse-I Liganden aus soliden Tumoren

Die Festlegung der Identität aller neu sequenzierten HLA-Klasse-I Liganden erfolgte über eine weitere Datenbankrecherche (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Die Identität bekannter Peptide wurde aus einer hauseigenen Proteindatenbank der Universität Tübingen entnommen. Die Zuordnung aller neuen Peptide erfolgte ausschließlich über eine Sequenzähnlichkeitssuche, die BLAST-Suche (*Basic Local Alignment Search Tool*, BLAST).

Dieses Programm vergleicht Nukleotid- oder Proteinsequenzen mit Sequenzen mehrerer Datenbanken und kalkuliert die statistische Signifikanz der Treffer für die zugehörigen Gene und deren Funktionen. Dabei wird in der BLAST-Datenbank die Anzahl der Treffer mit einer entsprechenden Bewertung (Score) als e-value (*expect threshold*) belegt. Der e-value ist also ein Maß für die Signifikanz der Treffer. Je kleiner dieser Wert, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit, nicht nur eine zufällige Übereinstimmung gefunden zu haben. E-values, die bei Null oder kleiner Null liegen bedeuten, dass die Wahrscheinlichkeit gleich Null ist, dass dieser Treffer in der Datenbank zufällig auftrat. Deshalb wurden zur Bestimmung der Quellproteine nur die Proteine als wahr betrachtet, die den kleinsten e-Wert aufwiesen und in der Regel kleiner Null waren.

Die folgenden zwei Abbildungen zeigen von zwei neu sequenzierten Peptiden ihre zugehörigen Quellproteine. Das erste Quellprotein, *basic helix-loop-helix family, member e41* (BHLHE41), ist ein in dieser Arbeit neu ermitteltes Protein und wurde nur in einer Gewebeprobe ermittelt. Es enthält 480 Aminosäuren. Das sequenzierte Peptid *GQKLEPLAY* befindet sich zwischen Stellung 209 und 216 und wurde mit einem e-value von 0,23 mit Hilfe der BLAST-Datenbank des NCBI ermittelt.

10	20	30	40	50	60
MDEGIPHLQE	RQLLEHRDPT	GLDYSSLYMC	KPKRSMKRDD	TKDTYKLPHR	LIEKKRRDRI
70	80	90	100	110	120
NECIAQLKDL	LPEHLKLTTL	GHLEKAVVLE	LTLKHLKALT	ALTEQQHQKI	IALQNGERSL
130	140	150	160	170	180
KSPIQSDLDL	FHSGFQCTAK	EVLQYLSRFE	SWTPREPRCV	QLINHLHAVA	TQFLPTPQLL
190	200	210	220	230	240
TQQVPLSKGT	GAPSAAGSAA	APCLERA	GQK LEPLAY	CVFV	IQRTQPSAEL
250	260	270	280	290	300
GYGGEAEARF	DREKKGAGA	SRVTIKQEPF	GEDSPAPKRM	KLDSRGGGSG	GGPGGGAAAA
310	320	330	340	350	360
AAALLGDEFA	AAAALLRPDA	ALLSSLVAFG	GGGGAPFPQP	AAAAAPFCLP	FCFLSPSAAA
370	380	390	400	410	420
AYVQPFIDKS	GLEKYLYPAA	AAAPFLLLYP	GIPAPAAAAA	AAAAAAAAAA	AFPCLSVLS
430	440	450	460	470	480
PPPEKAGAAA	ATLLPHEVAP	LGAPHPQHPH	GRTHLPFAGP	REFGNPESSA	QEDFSQPGKE

Abbildung 12: Quellprotein BHLHE41 zum HLA-Ligand *GQKLEPLAY*.

Im Gegensatz dazu zeigt das zweite Quellprotein, *perilipin 2* (PLIN2), ein Protein, das in den untersuchten Tumorproben insgesamt viermal mit jeweils verschiedenen Peptidsequenzen identifiziert werden konnte. Drei dieser Sequenzen waren bekannt. Das Peptid mit der Sequenz *KSELLVEQY* wurde neu identifiziert und befindet sich zwischen Stellung 182 und 190, mit einem e-value der BLAST-Datenbank von 0,17.

10	20	30	40	50	60
MASVAVDPQP	SVVTRVVNLP	LVSSTYDLMS	SAYLSTKDQY	PYLKSVCEMA	ENGVKTITSV
70	80	90	100	110	120
AMTSALPIIQ	KLEPQIAVAN	TYACKGLDRI	EERLPILNQF	STQIVANAKG	AVTGAKDAVT
130	140	150	160	170	180
TTVTGAKDSV	ASTITGVMDK	TKGAVTGSVE	KTKSVVSGSI	NTVLGSRMMQ	LVSSGVENAL
190	200	210	220	230	240
TKSELLVEQY	LPLTEEELEK	EAKKVEGFDL	VQKPSYYVRL	GSLSTKLHSR	AYQQLSRVK
250	260	270	280	290	300
EAKQKSQQT	SQIHSTVHLI	EFARKNVYSA	NQKIQDAQDK	LYLSWVEWKR	SIGYDDTDES
310	320	330	340	350	360
HCAEHIESRT	LAIAARNLTQQ	IQTTCHTLLS	NIQGVQNIQ	DQAKHMGVMA	GDIYSVFENA
370	380	390	400	410	420
ASFKEVSDSL	LTSSKGQLQK	MKESLDDVMD	YLVNNTPLNW	LVGPFYPQLT	ESQNAQDQGA
430					
EMDKSSQETQ	RSEHKTH				

Abbildung 13: Quellprotein PLIN2 zum HLA Ligand *KSELLVEQY*. Die rote Umrandung zeigt das neue Peptid, die blauen Umrandungen die bekannten Peptide.

In den Körperzellen finden laufend lebhafte Auf- und Abbauvorgänge von Proteinen statt. Zu diesen Proteinen gehören viele Enzyme, die ihre grundlegende Funktion im Zellstoffwechsel und der Zellatmung haben und ubiquitär vorkommen. Infolgedessen wurden als häufig auftretende HLA-präsentierte Peptide viele Enzyme wie zum Beispiel Superoxid-Dismutase (SOD2), Cytochrom P450 (CYP1B1), Hämoxygenase (HMOX1) oder Aldolase A (ALDOA) identifiziert.

Zum Einsatz bei einer Immuntherapie finden Peptide auf Basis von Enzymen selten Verwendung, da die Gefahr einer reaktiven Autoimmunerkrankung groß ist. Weitere häufig vorkommende ubiquitäre präsentierte Peptide waren Proteine des Zytoskeletts, die den Zellen Stabilität und Elastizität verleihen. Dazu zählen die Proteine *Vimentin* (VIM), *Desmin* (DES), *Profilin* (PFN) und *Nebulin* (NEB). Auffällig war, dass einige dieser Strukturproteine eine zum Teil sehr starke Überexpression aufwiesen. Desweiteren waren Proteine, die häufig als Quelle von HLA-präsentierten Peptiden sequenziert werden konnten, HLA-Klasse-I Moleküle und Hämoglobine, die jedoch hinsichtlich einer Überexpression unauffällig waren.

Einige bereits bekannte tumorassoziierte Antigene des Nierenzellkarzinoms konnten in dieser Arbeit identifiziert werden. Besonders auffällig war das mehrfach und häufig identifizierte Protein *Perilipin* (PLIN2), auch *Adipophilin* (*adipose differentiation-related protein*, ADFP) genannt. Dieses Protein konnte in drei verschiedenen Tumorproben nachgewiesen werden. In einer Probe wurden zu diesem Protein zwei verschiedene bereits bekannten Sequenzen identifiziert, bei einer Probe konnte eine neue Sequenz ermittelt werden. In allen Proben war dieses Protein auf mRNA-Ebene überexprimiert. Ein weiteres bekanntes Protein, *Apolipoprotein L1* (APOL1), konnte hier einmal mit einer bekannten Sequenz und einer starken mRNA-Überexpression identifiziert werden.

Sequenzen von neuen, zuvor noch nicht beschriebenen Proteinen wie der *van Willebrand Faktor* (VWF), das *Prokollagen Lysin* (PLOD2), der Transkriptionsfaktor *basic helix-loop-helix family* (BHLHE41) und das *Ras suppressor protein 1* (RSU1) werden unter 3.2.2 näher beschrieben.

Tabelle 14: Gesamtdarstellung aller identifizierten HLA-Klasse-I Liganden der zu analysierenden Proben. Bei allen RCC-Proben, außer RCC421, handelte es sich ausschließlich um solide Tumoren der Niere. Bei der Probe RCC421 wurde zur Tumorseite auch Normalgewebe untersucht. Die mRNA-Expressionswerte wurden mitgeführt. In dieser Arbeit neu identifizierte Peptide und Proteine sind fett markiert. Bei gleichen Liganden mehrerer unterschiedlichen Proben wurde der HLA-Allotyp und der mRNA-Expressionswert zur zugehörigen Probe in der gleichen Zeile dargestellt. [FC] Fold-Change der mRNA-Expressionswerte, [-] keine Detektion von mRNA-Expressionswerten, [T] Tumor, [N] Normalgewebe, [k.A.] kein HLA-Allotyp zuordenbar, graue Markierung: in Diskussion herausgearbeitete Proteine.

Sequenz	HLA	Gene ID	Quellprotein		FC	RCC
				Abkürzung	mRNA	Probe
AIDQLHLEY	A*01	81	<i>actinin, alpha 4</i>	ACTN4	–	417
AAPRTVALTA	k.A.	3115	<i>major histocompatibility complex, class II, DP beta 1</i>	HLA-DPB1	+ 1,7	421 T
ADVLKVEVF	B*37	3692	<i>eukaryotic translation initiation factor 6</i>	EIF6	–	417
AEAIRAVL	k.A.	5880	<i>ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (rho family, small GTP binding protein Rac2)</i>	RAC2	+ 2,0	421 T
AEFKEAFQL	B*40	4637	<i>myosin, light polypeptide 6, alkali, smooth muscle and non-muscle</i>	MYL6	- 2,5 –	425 460
AEIRHVLVTL	B*40	4637	<i>myosin, light polypeptide 6, alkali, smooth muscle and non-muscle</i>	MYL6	- 2,5	425
AEMPLGVLQQF	B*44	10397	<i>N-myc downstream regulated 1</i>	NDRG1	–	468
AESKV FYL	B*37	7534	<i>tyrosine 3 monooxygenase/ tryptophan5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide</i>	YWHAZ	–	417
AIVDKVPSV	A*02	22820	<i>coatamer protein complex, subunit gamma</i>	COPG	–	482
AKLPALASVA	k.A.	151	<i>adrenergic, alpha-2B-, receptor</i>	ADRA2B		421 N
ALADGVQKV	A*02	8542	<i>apolipoprotein L, 1</i>	APOL1	+ 5,2	421 T
ALASHLIEA	A*02	30846	<i>EH-domain containing 2</i>	EHD2	+ 2,5	482
ALFDGDPHL	A*02	23273	<i>KIAA0367</i>	KIAA0367	–	417
ALkTGIVAK	A*03	79002	<i>chromosome 19 open reading frame 43</i>	C19orf43	–	421 T
ALQEFGPISY	A*03	3191	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L</i>	HNRNPL	–	468
ALSDHHIYL	A*02	226	<i>aldolase A, fructose-bisphosphate</i>	ALDOA	–	421 T
APIAKVGVL	B*07	51474	<i>LIM domain and actin binding 1</i>	LIMA1	–	421 T
APRQPGLMA	B*07	51142	<i>coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2</i>	CHCHD2	–	421 T
APRTVALTAL	B*07	3115	<i>major histocompatibility complex, class II, DP beta 1</i>	HLA-DPB1	+ 1,7 –	431 421 T
AQYLINARL	B*13	5093	<i>poly(rC) binding protein 1</i>	PCBP1	–	468
ARPGPTVRT	k.A.	3805	<i>killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 4</i>	KIR2DL4	–	421 T
ATANQILK	A*03	10150	<i>muscleblind-like 2 (Drosophila)</i>	MBNL2	–	421 T
ATNRITVTW	A*32	51588	<i>protein inhibitor of activated STAT, 4</i>	PIAS4	–	431
AVGPHLTAK	A*03	126282	<i>tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8-like 1</i>	TNFAIP8L1	–	421 T/N
AVIPVLANF	A*03, A*26	4594	<i>methylmalonyl Coenzyme A mutase</i>	MUT	- 2,6	425
AVNAHSNLIK	A*03	10989	<i>inner membrane protein, mitochondrial</i>	IMMT	–	421 T/N
DAVLKDPGL	A*26	26046	<i>ring finger protein 160</i>	RNF160	–	425

Sequenz	HLA	Gene ID	Quellprotein		FC	RCC
			Abkürzung		mRNA	Probe
DEAIRAVL	k.A.	5880	ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (rho family, small GTP binding protein Rac2)	RAC2	+ 2,0	421 T/N
DEDPLCMLLLI	B*40	22980	transcription factor 25 (basic helix-loop-helix)	TCF25	–	460
DEMEEKDIL	B*40	29761	ubiquitin specific peptidase 25	USP25	–	460
DEVSRIVGSVEF	B*44	6772	signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	STAT1	+ 2,0	468
DIYNFPIHAF	A*26	84549	RNA binding motif protein 13	MAK16	- 1,7	425
DLIEHFSQF	A*26	10949	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	HNRNPA0	–	425
DLIEKLLNY	A*26	5441	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide L, 7.6kDa	POLR2L	–	425
DRLLALNSL	k.A.	5591	protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide	PRKDC		421 N
DSISITSHY	A*26	11328	FK506 binding protein 9, 63 kDa	FKBP9	–	425
DTDHYFLRY	A*01	51604	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class T	PIGT	–	417 460 482
DTIEITDR	A*68	3181	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	HNRNPA2B1	–	468
DVAEGDLIEHF	A*26	10949	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	HNRNPA0	–	425
DVELDDLKGDEL	A*26	10130	protein disulfide isomerase family A, member 6	PDIA6	–	425
DVIERVIQY	A*26	25836	Nipped-B homolog (Drosophila)	NIPBL	–	425
DVIGKALQY	A*26	1806	dihydropyrimidine dehydrogenase	DPYD	+ 1,7	431
DVIGTSLSGF	A*26	81614	non imprinted in Prader-Willi/Angelman syndrome 2	NIPA2	–	425
DVISSIRNF	A*26	401505	chromosome 9 open reading frame 105 /translocase of outer mitochondrial membrane 5 homolog (yeast)	C9orf105/ TOMM5	–	431
DVVRVVGAY	A*26	84514	GH3 domain containing	GHDC	–	431
DVYPEIIER	A*68	10916	melanoma antigen family D, 2	MAGED2	–	468
EEIAFLKKL	B*40; B*44	7431	vimentin	VIM	+ 2,3 –	460 468
EEIKEILRF	B*44	6519	solute carrier family 3 (cystine, dibasic and neutral amino acid transporters, activator of cystine, dibasic and neutral amino acid transport), member 1	SLC3A1	–	468
EEVLIPDQKY	B*44	26224	F-box and leucine-rich repeat protein 3	FBXL3	–	468
EFHEAFSGQIL	A*26	3032	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase/acyl-CoA hydratase (trifunctional protein), beta subunit	HADHB	–	425
EGVRVLGPL	k.A.	1723	dihydroorotate dehydrogenase	DHODH	–	482
EIAMATVTALR	A*68	226 230	aldolase A, fructose-bisphosphate aldolase C, fructose-bisphosphate	ALDOA ALDOC	+ 1,8 + 1,7	468
EIFDGIQPKM	A*26	1434	CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast)	CSE1L	–	425
EIIGKRGIGY	A*26	10632	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit G	ATP5L	- 3,3	425
EIIKIIGKY	A*26	285527	furry homolog-like (Drosophila)	FRYL	–	425
EILAKSSL	A*02	64006	endogenous retroviral sequence K, 6	ERVK6	–	421 T

Sequenz	HLA	Gene ID	Quellprotein		FC mRNA	RCC Probe
				Abkürzung		
EITPPVVLRL	A*68	4869	nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)	NPM1	+ 1,9	468
ELIAKIPNF	A*26	6418	SET translocation (myeloid leukemia-associated)	SET	–	425
ELIKPPTILR	A*68	10947	adaptor-related protein complex 3, mu 2 subunit	AP3M2	–	468
ELVKIYYK	A*03	51110	lactamase, beta 2	LACTB2	–	425
EPRHGGLTL	B*07	57418	WD repeat domain 18	WDR18	–	421 T
ETDKNGFLQY	A*01	54981	chromosome 9 open reading frame 95	C9orf95	–	482
ETELDGLRY	A*01	23498	3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase	HAAO	–	482
ETIPLTAEKL	A*68	595	cyclin D1	CCND1	+ 2,6	468
ETVNLRLSGF	A*26	202	absent in melanoma 1	AIM1	–	425
EVAEKINAF	A*26	338	apolipoprotein B (including Ag(x) antigen)	ApoB	+ 3,3	431
EVAQFLTGR	A*68	27351	PPPDE peptidase domain containing 2	PPPDE	–	468
EVFPLAMNY	A*26	896	cyclin D3	CCND3	–	425
EVFPLKVFGY	A*26	9204	zinc finger, MYM-type 6	ZMYM6	- 2,8	425
EVGGEALGRLL	B*13	3043	hemoglobin beta	HBB	–	468
EVIASYAHL	A*26	7450	von Willebrand factor	VWF	+ 5,6	431
EVIGKITAL	A*26	9183	ZW10, kinetochore associated, homolog (Drosophila)	ZW10	–	425
EVIGLLGGRY	A*26	114803	Myb-like, SWIRM and MPN domains 1	MYSM1	–	425
EVIKEVQEF	A*26	928	CD9 molecule	CD9	- 4,3	425
EVILIDPFHK	A*68	6138	ribosomal protein L15	RPL15	–	468
EVIPYTPAM	A*26	3162	heme oxygenase (decycling) 1	HMOX1	+ 3,2	431
EVIPYTPAMQR	A*68	3162	heme oxygenase (decycling) 1	HOMX1	–	468
EVIQEIKSF	A*26	6738	TROVE domain family, member 2	TROVE2	–	425
EVISHIGKI	A*26	53407	syntaxin 18	STX18	–	431
EVISTPGVVAR	A*68	3836	karyopherin alpha 1 (importin alpha 5)	KPNA1	–	468
EVLHSPAI	A*02	64781	ceramide kinase	CERK	–	421 T
EVNDPSLTIK	A*68	4513	mitochondrially encoded cytochrome c oxidase II	MT-CO2	–	468
EVSTLVSKY	A*26	11336	exocyst complex component 3	EXOC3	–	431
EVTDVDSVVGR	A*03	81704	dedicator of cytokinesis 8	DOCK8	+ 2,1	468
EVTELLARY	A*26	5434	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide E, 25kDa	POLR2E	+ 1,8	431
EVVAGIKEY	A*26	9643	mortality factor 4 like 2	MORF4L2	–	431
EVVDFSSHY	A*26	26235	F-box and leucine-rich repeat protein 4	FBXL4	- 2,4	425
EVVDKINQV	A*26	23224	spectrin repeat containing, nuclear envelope 2	SYNE2	- 2,3	431
EVVERVLTF	A*26	26263	F-box protein 22	FBXO22	– –	425 431
EVYPFGIVGM	A*26	7812	cold shock domain containing E1, RNA-binding	CSDE1	- 1,9	425
FAYDGKDYI	A*02	k.A.	MHC class I antigen	k.A.	–	482
FGGRNPFDTF	A*26	3337	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1	DNAJB	+ 1,9 –	425 468
FGIDRPAEL	k.A.	57794	splicing factor 4	SF4	–	482

Sequenz	HLA	Gene ID	Quellprotein		FC mRNA	RCC Probe
				Abkürzung		
FLARRDLT	k.A.	84078	<i>kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 7</i>	KBTBD7	–	460
FLDASGAKLDY	A*01	9689	<i>basic leucine zipper and W2 domains 1</i>	BZW1	–	482
FLDESIRSTQY	A*01	10856	<i>RuvB-like 2 (E. coli)</i>	RUFBL2	–	482
FLDSTGSRLDY	A*01	28969	<i>basic leucine zipper and W2 domains 2</i>	BZW2	–	482
FSDIVKQGY	A*01	55715	<i>docking protein 4</i>	DOK4	+ 1,6	482
FTDVNSILRY	A*01	2058	<i>(glutamyl-prolyl-tRNA synthetase)</i>	EPRS	–	460
FTEEQAVLY	A*01	6730	<i>signal recognition particle 68kDa</i>	SRP68	–	417
FTILNPIYSITT	k.A.	3191	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L</i>	HNRNPL	–	425
FVDKNNLLY	A*01	10579	<i>transforming, acidic coiled-coil containing protein 2</i>	TACC2	–	482
FVFDLPIHR	A*68	2635	<i>guanylate binding protein 3</i>	GBP3	–	468
FVHDLVLYL	B*13	1213	<i>clathrin, heavy polypeptide (Hc)</i>	CLTC	–	468
		8218	<i>clathrin, heavy polypeptide-like 1</i>	CLTCL1		
FVILRKNPNYDL	k.A.	5708	<i>proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 2</i>	PSMD2	–	468
GAFEHLPSL	A*02	7162	trophoblast glycoprotein	TPBG		421 N
GAGAFRSAGRL	k.A.	126755	<i>leucine rich repeat containing 38</i>	LRRC38	–	460
GEHTLLVTV	B*40	389541	<i>chromosome 7 open reading frame 59</i>	C7orf59	–	460
GEITGEVRM	B*40	2316	<i>filamin A, alpha (actin binding protein 280)</i>	FLNA	–	425
GELGNGNIKL	B*40, B*44	5111	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>	PCNA	- 2,4	425
GESDDSLRL	B*40	6227	<i>ribosomal protein S21</i>	RPS21	–	425
GEVNDIKTRSW	B*44	2162	<i>coagulation factor XIII, A1 polypeptide</i>	F13A1	- 2,4	425
GFTLGNVVGMY	A*26	647087	<i>PL-5283 protein</i>	PL-5283	–	425
GLASFKSFLK	A*03	8490	<i>regulator of G-protein signalling 5</i>	RGS5	+ 2,5	468
GLATDVQTV	A*02	5691	<i>proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 3</i>	PSMB3	–	482
GLLSQTVIL	A*02	10683	<i>delta-like 3 (Drosophila)</i>	DLL3	–	482
GLNDFIQKI	B*13	6446	<i>serum/glucocorticoid regulated kinase 1</i>	SGK1	–	468
GLVAKGLLIK	A*03	55342	<i>spermatid perinuclear RNA binding protein</i>	STRBP	- 1,6	460
GPVLGLLLFV	B*07	92736	<i>otopetritin 2</i>	OTOP2	–	421 T
GQFKDIITKV	B*13	1213	<i>clathrin, heavy chain (Hc)</i>	CLTC		468
GQKLEPLAY	B*15	79365	<i>basic helix-loop-helix family, member e41</i>	BHLHE41	+ 4,5	417
GQLGITKVF	B*15	5265	<i>serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1</i>	SERPINA1	2,8	417
GQVEIVTKV	B*13	158471	<i>prune homolog 2 (Drosophila)</i>	PRUNE2	+ 2,0	468
GQVQKIVLY	B*15	1213	<i>clathrin, heavy chain (Hc)</i>	CLTC	– –	417 482
GTDELRLLY	A*01	81887	<i>LAS1-like (S. cerevisiae)</i>	LAS1L	–	460
GTDNPLSGGDQY	A*01	7520	<i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5 (double-strand-break rejoining)</i>	XRCC5	–	482
GTPGSTGKRV	A*02	22850	<i>ADNP homeobox 2</i>	ADNP2	–	417
GVANALAHK	A*03	3043	<i>hemoglobin, beta</i>	HBB	–	421 T
GVAPFTIAR	A*03	1293	<i>collagen, type VI, alpha 3</i>	COL6A3	+ 1,8	425
GVHGGILNK	A*03	345456	<i>profilin 3</i>	PFN3	–	421 T/N

Sequenz	HLA	Gene ID	Quellprotein		FC	RCC
			Abkürzung		mRNA	Probe
GVIEKLLTSY	A*26	7812	<i>cold shock domain containing E1, RNA-binding</i>	CSDE1	- 1,9	425
HPRIITEGF	B*35	908	<i>chaperonin containing TCP1, subunit 6A (zeta 1)</i>	CCT6A	–	460
HPVPQPLQSF	B*35	9935	<i>v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (avian)</i>	MAFB	–	460
IARNLTQQL	B*07	123	<i>perilipin 2</i>	PLIN2	+ 3,3	421 T
IEVDGKQVEL	B*40	387	<i>Ras homolog gene family, member A</i>	RHOA	- 3,9	425
		388	<i>Ras homolog gene family, member B</i>	RHOB	–	
		389	<i>Ras homolog gene family, member C</i>	RHOC	–	
ILNPDNSFEIL	k.A.	821	<i>calnexin</i>	CANX	–	425
	B*13				+ 2,3	468
IQHDLIFSL	B*13	3091	<i>hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)</i>	HIF1A	–	468
IQKQANISI	B*15	3908	laminin, alpha 2	LAMA2	–	417
ISKALVAY	B*15:01	6217	<i>ribosomal protein S16</i>	RPS16	–	482
ITDSAGHILY	A*01	10972	<i>transmembrane emp24-like trafficking protein 10 (yeast)</i>	TMED10	–	417 482
ITIFEKQEY	A*01	1806	<i>dihydropyrimidine dehydrogenase</i>	DPYD	–	482
ITQGTPLKY	A*01	9612	<i>nuclear receptor co-repressor 2</i>	NCOR2	–	482
IVAGSLITK	A*03	55660	<i>PRP40 pre-mRNA processing factor 40 homolog A (S. cerevisiae)</i>	PRPF40A	–	421 T
IVAKHTSAL	A*02	83660	<i>talin 2</i>	TLN2	–	421 T
KDVLSVAF	B*37	10399	<i>guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1</i>	GNB2L1	–	417
KEIFLRELI	B*40, B*44	3320 3324 3326 7184	<i>heat shock protein: 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1, class A member 2 and class B member 1; heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1</i>	HSP90AA1 HSP90AA2 HSP90AB1 HSP90B1	- 3,9 – - 2,2 + 2,0	425
KEIGELTQL	B*40, B*44	6251	Ras suppressor protein 1	RSU1	+ 2,1	425
KENPLQFKF	B*37	5962 7430	<i>radixin ezrin</i>	RDX EZR	–	417
KESEVFYEL	B*37	3091	<i>hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)</i>	HIF1A	–	417
KESTLHLVL	B*40, B*44 B*40	6233	<i>ribosomal protein S27a</i>	RPS27A	–	425 460
KIADRFLLY	A*03	8543	<i>LIM domain only 4</i>	LMO4	–	460 468
KIEAPALAF	B*15	9802	<i>DAZ associated protein 2</i>	DAZAP2	+ 1,6	417
KITDVIIGF	A*26	4627	<i>myosin, heavy chain 9, non-muscle</i>	MYH9	–	431
KIVPIAIQL	B*13	240	<i>arachidonate 5-lipoxygenase</i>	ALOX5	+ 3,9	468
KLGSVPVTV	A*02	9747	<i>family with sequence similarity 115, member A / KIAA0738 gene product</i>	FAM115A	–	482
KLLNYAPLEK	A*03	5441	<i>polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide L, 7.6kDa</i>	POLR2L	–	468
KLPGGSYMAK	A*03	3127	<i>major histocompatibility complex, class II, DR beta 5</i>	HLA-DRB5	–	421 T
KQALSGFGY	B*15:01	10016	<i>programmed cell death 6</i>	PDCD6	–	482

Sequenz	HLA	Gene ID	Quellprotein		FC mRNA	RCC Probe
				Abkürzung		
KSELLVEQY	A*01	123 10111	perilipin 2 RAD50 homolog (S. cerevisiae)	PLIN2 RAD50	+ 3,3 –	482
KTFEGNLTTK	A*03	10594	PRP8 pre-mRNA processing factor 8 homolog	PRPF8	–	421 T
KVAGAATPK	A*03	3007	histone cluster 1, H1d	HIST1H1D	–	421 T
KVAPAPAVVK	A*03	6130	ribosomal protein L7a	RPL7A	–	421 T
KVAPAPAVVKK	A*03	6130	ribosomal protein L7a	RPL7A	–	421 T
KVTGTQPI	A*02	4638	myosin light chain kinase	MYLK	–	482
KVVPENTEILKK	A*03	2108	electron-transfer-flavoprotein, alpha polypeptide	ETFA	–	425
KVYENYPTY	A*03	7913	DEK oncogene (DNA binding	DEK	–	425
LARAEALL	A*02	554	arginine vasopressin receptor 2	AVPR	–	482
LASVSTVLTSKY	k.A.	3039 3040	hemoglobin, alpha 1 hemoglobin, alpha 2	HBA1 HBA2	–	468
LDFGSLSNL	B*40 B*44	6218	ribosomal protein S17	RPS27	- 2,0 –	425 468
LEQQNKILL	B*40, B*44	7431	vimentin	VIM	+ 4,2	425
LILPGYIDF	k.A.	3615	IMP (inosine monophosphate) dehydrogenase 2	IMPDH2	–	425
LLDIRSEY	A*01	311	annexin A11	ANXA11	–	482
LLDPSQKNLY	A*01	7568 7637 7678 7695 90589 93474 199692	zinc finger protein 20 zinc finger protein 84 zinc finger protein 124 zinc finger protein 136 zinc finger protein 625 zinc finger protein 670 zinc finger protein 627	ZNF20 ZNF84 ZNF124 ZNF136 ZNF625 ZNF670 ZNF627	–	482
LLDQGQLNKY	A*01	1213	clathrin heavy chain	CLTC	–	460 482
LLQEKGLVF	B*15:01	79991	oligonucleotide/oligosaccharide- binding fold containing 1	OBFC1	–	482
LPSPVTAQKY	B*35	1938	eukaryotic translation elongation factor 2	EEF2	–	460
LQAKQAAGII	B*15:01	23013	spen homolog, transcriptional regulator (Drosophila)	SPEN	–	482
LQEFGPISY	B*13	3191	heterogeneous nuclear ribonucle- oprotein L	HNRNPL	–	468
LQKNVPILY	B*15:01	1495	catenin (cadherin-associated protein), alpha 1, 102kDa	CTNNA1	–	482
LQNADPLKV	B*13	972	CD74 molecule, major histocom- patibility complex, class II invariant chain	CD74	+ 2,4	468
LSDLGRLSY	A*01	7994	MYST histone acetyltransferase (monocytic leukemia) 3	MYST3	–	482
LSERYAELY	A*01	389792	immediate early response 5-like	IER5L	–	482
LTDDDLLRY	A*01	2632	(glucan (1,4-alpha-), branching enzyme 1)	GBE1	–	460
LTDITKGVQY	A*01	1938	eukaryotic translation elongation factor 2	EEF2	–	460
LTDITKGVQY	A*01	1938	eukaryotic translation elongation factor 2	EEF2	–	482
LVVYPWTQR	Artefakt	3043	hemoglobin beta	HBB	+ 2,3	425
LVVYPWTQRF	Artefakt	3043	hemoglobin beta	HBB	– –	460 468
MAGDIYSVFR	A*68	123	perilipin 2	PLIN2	+ 2,6	468
MMSLRRLDY	A*03	23007	phospholipase C, eta 1	PLCH1	–	421 T

Sequenz	HLA	Gene ID	Quellprotein		FC mRNA	RCC Probe
			Abkürzung			
MPSASMTRL	B*35	10397 65009	<i>N-myc downstream regulated 1 NDRG family member 4</i>	NDRG1 NDRG4	+ 1,5 –	460
MPVGPDAIRY	k.A.	7917	<i>HLA-B associated transcript 3</i>	BAT3	–	425 460
MRFLAATFL	k.A.	10577	<i>Niemann-Pick disease, type C2</i>	NPC2	–	468
MRYVASVLL	k.A.	6181	<i>ribosomal protein, large, P2</i>	RPLP2	–	468
MTSALPIIQK	A*68	124	<i>perilipin 2</i>	PLIN2	+ 2,6	468
MVKDVIGSY	A*26	4692	<i>necdin homolog (mouse)</i>	NDN	+ 2,3	431
NEFPEPIKL	B*40	7879	<i>RAB7A, member RAS oncogene family</i>	RAB7A	–	425
NETIKISY	B*40	653	<i>bone morphogenetic protein 5</i>	BMP5	–	460
NLNVTEEKY	B*15:01	6648	<i>superoxide dismutase 2, mito- chondrial</i>	SOD2	+ 3,2	482
NPVDWKEYY	B*35	5352	<i>procollagen-lysine, 2- oxoglutarate 5-dioxygenase 2</i>	PLOD2	+ 2,5	460
NTDSPLRY	A*01	3921	<i>ribosomal protein SA</i>	RPSA	–	482
NVIRDAVTY	A*03	8294	<i>histone1, H4i</i>	HIST1H4i	–	460
NYIDKVRFL	B*13	7431	<i>Vimentin</i>	VIM	–	468
PISATPPAL	A*02	54455	<i>F-box protein 42</i>	FBXO42	–	482
PSLRILAIGTR	A*68	3993	<i>lethal giant larvae homolog 2 (Drosophila)</i>	LLGL2	–	468
PTDPKVVVY	A*01	202	<i>absent in melanoma 1</i>	AIM1	–	482
QDVARVLGF	B*37	9240	<i>paraneoplastic antigen MA1</i>	PNMA1	–	417
QLYKEQLAK	A*03	4627	<i>myosin, heavy chain 9, non-muscle</i>	MYH9	–	421 T
QPDQTRIVAL	B*07	2091	<i>fibrillarin</i>	FBL	–	421 T
QSLPTTSAA	k.A.	115701	<i>alpha-kinase 2</i>	ALPK2	+ 1,8	421 T
QTYVGITEK	A*03	23020	<i>small nuclear ribonucleoprotein 200kDa (U5)</i>	SNRNP200	–	421 T
QVDPLSALKY	A*01	4289	<i>muskelin 1, intracellular mediator containing kelch motifs</i>	MKLN1	–	460
REFIAPVTL	B*40	5352	<i>procollagen-lysine, 2- oxoglutarate 5-dioxygenase 2</i>	PLOD2	+ 2,6	425
REKMTQIMF	B*40	58 60 72	<i>actin, alpha 1, skeletal muscle actin, beta actin, gamma 2, smooth muscle, enteric</i>	ACTA1 ACTB ACTG2	– - 2,0 - 1,7	460
RENLEFGKV	k.A.	2322	<i>fms-related tyrosine kinase 3</i>	FLT3		421 N
REYQDLLNVKM	B*40	1674 7431	<i>desmin vimentin</i>	DES VIM	- 2,6 – + 4,2 - 2,3	425 460 425 460
RIQGPLQH	k.A.	EAW 85283.1	<i>hCG2045458</i>	k.A.	–	421 T
RLAPLIQVI	B*13	3092	<i>huntingtin interacting protein 1</i>	HIP1	–	468
RLFEHPLYR	A*03	56975	<i>family with sequence similarity 20, member C</i>	FAM20C	–	425
RLFPVPGSGLV	B*13	3920	<i>lysosomal-associated membrane protein 2</i>	LAMP2	–	468
RLIGQIVSSI	B*13	7278 7846	<i>tubulin, alpha 3c tubulin, alpha 1a</i>	TUBA3C TUBA1A	–	468
RPAPVEVTY	B*35	7803	<i>protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1</i>	PTP4A1	- 2,5	460
RPFERTITM	B*35	6386	<i>syndecan binding protein (synte- nin)</i>	SDCBP	–	460
RPSTSRSL	B*07	7431	<i>vimentin</i>	VIM	+ 1,9	421 T
RQNGDDPLLTY	B*15:01	4000	<i>lamin A/C</i>	LMNA	–	482

Sequenz	HLA	Gene ID	Quellprotein		FC mRNA	RCC Probe
				Abkürzung		
RSVEGLSR	k.A.	5744	parathyroid hormone-like hormone	PTHLH	–	421 N
RVAPEEHPVL	Artefakt	60 71	actin, beta actin, gamma 1	ACTB ACTG1	–	421 T
RVQEAVESMVK	A*03	84908	family with sequence similarity 136, member A	FAM136A	–	460
SDALKVTF	B*37	8933	family with sequence similarity 127,member A	FAM127A	–	417
SDIVAHLL	B*37	338	apolipoprotein B (including Ag(x) antigen)	APOB	+ 4,3	417
SDPVTKDPPA	k.A.	85446	zinc finger homeobox 2	ZFHX2	–	425
SDVLELTDDNF	B*44	2923	protein disulfide isomerase family A, member 3	PDIA3	–	468
SEARELVAL	B*40	1545	cytochrome P450, family 1, sub-family B, polypeptide 1	CYP1B1	- 3,3	460
SEVMGEPHL	B*40, B*44	52371	proteasome maturation protein	POMP	–	425
SEVQDRVML	B*40	51646	yippee-like 5 (Drosophila)	YPEL5	- 1,9	425
SHLPVIHEL	B*39	11067	chromosome 10 open reading frame 10	C10orf10	+ 3,4	431
SIDRTVMYY	A*01	6519	solute carrier family 3 (cystine, dibasic and neutral amino acid transporters, activator of cystine, dibasic and neutral amino acid transport), member 1	SLC3A1	–	417
SLADIMAKR	A*68	2152	ribosomal protein L24	RPL24	–	468
SLFVSNHAY	B*15:01	226	aldolase A, fructose-bisphosphate	ALDOA	–	482
SPRVQSTI	B*07	10517	F-box and WD repeat domain containing 10	FBXW10	–	421 T
SQALAIRSY	B*15:01	23787	mitochondrial carrier homolog 1 (C. elegans)	MTCH1	–	482
SQANIAQVL	B*39 B*15:01	162	adaptor-related protein complex 1, beta 1 subunit	AP1B1	–	431 482
SQEKPVPQL	k.A.	23116	family with sequence similarity 179, member B	FAM179B	–	421 T
SQIFISRTY	B*15:01	2665	GDP dissociation inhibitor 2	GDI2	–	482
SQINRAYQF	B*15:01	9694	tetratricopeptide repeat domain 35	TTC35	–	482
SQKKIINEA	B*15	202333	cardiomyopathy associated 5	CMYA5	- 2,2	417
SQWDSVLHI	B*13	389524	GTF2I repeat domain containing 2B	GTF2IRD2B	–	468
SQYPNQPTRF	B*15:01	7026	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2	NR2F2	–	482
SSVDQPLKI	B*13	832	capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta	CAPZB	–	468
STDHIPILY	A*01	2673	glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 1	GFPT1	–	460
STDKFKTDFY	A*01	10980	COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 6 (Arabidopsis)	COPS6	–	460
STDPSVLGKY	A*01	3280	hairy and enhancer of split 1, (Drosophila)	HES1	–	417
SVAGLTAAAYR	A*68	126328	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 11, 14.7kDa	NDUFA11	–	468
SVDPHGFISY	A*01	92609	translocase of inner mitochondrial membrane 50 homolog (S. cerevisiae)	TIMM50	–	482
SVIDIINKY	A*26	23228	phospholipase C-like 2	PLCL2	- 2,7	425
SVIEQILHY	A*26	9690	ubiquitin protein ligase	UBE3C	- 1,7	425

Sequenz	HLA	Gene ID	Quellprotein		FC	RCC
			Abkürzung		mRNA	Probe
SVNGkVLSK	A*03	23420 283820 408050	NODAL modulator 1 NODAL modulator 2 NODAL modulator 3	NOMO1 NOMO2 NOMO3	–	421 T
SVYRTPVVNLK	A*03	4703	<i>nebulin</i>	NEB	+ 7,5	425
TDGKVQFQ	B*37	6152	<i>ribosomal protein L24</i>	RPL24	–	417
TDNQKRLFF	B*37	7145	<i>tensin 1</i>	TNS1	–	417
TEISSAEKVAL	B*40, B*44	4134	microtubule-associated protein 4	MAP4	+ 2,2	425
TEITDDLHFY	B*44	27044	<i>staphylococcal nuclease and tudor domain containing 1</i>	SND1	–	468
TEVGKIAL	B*40 B*44	1968	<i>eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3 gamma, 52kDa</i>	EIF2S3	–	425
TLFPVRLLV	B*13	79888	lysophosphatidylcholine acyltransferase 1	LPCAT1	+ 1,9	468
TLIDLPGITRV	A*02	4599	<i>myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)</i>	MX1	–	421 N
TYEAVREV	A*02	4736	<i>ribosomal protein L10a</i>	RPL10A	–	421 T 482
TPEEKSAVTAL	B*07	3043	<i>hemoglobin, beta</i>	HBB	–	421 T
TPSLVKSTSQL	B*07	517	<i>ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit C2 (subunit 9)</i>	ATP5G2	–	421 T
TQKPLPVSL	B*15:01	55627	<i>sphingomyelin phosphodiesterase 4, neutral membrane (neutral sphingomyelinase-3)</i>	SMPD4	–	482
TQMPDPKTF	B*15	51123	<i>zinc finger protein 706</i>	ZNF706	–	417
TQRPVDIVF	B*15:01	1292 3687	<i>collagen, type VI, alpha 2 integrin, alpha X (complement component 3 receptor 4 subunit)</i>	COL6A2 ITGAX	+ 2,1 + 2,0	482
TQVVGILKI	B*13	830	<i>capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 2</i>	CAPZA2	–	468
TTEVHPELY	A*01	51614	<i>ERGIC and golgi 3</i>	ERGIC3	–	482
TVAQITQRF	B*15:01	3134	<i>major histocompatibility complex, class I, F</i>	HLA-F	–	482
TVAVPLVGK	A*03	79139	<i>DerL1-like domain family, member 1</i>	DERL1	–	425
TVGLIRNL	B*13	1499	<i>catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa</i>	CTNNB1	–	468
VAKAVTQAL	k.A.	7094	<i>talin 1</i>	TLN1	–	421 T
VAKLLAQSY	B*15:01	51421	angiomotin like 2	AMOTL2	–	482
VEFSSGLKGMSL	B*44	498	<i>ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit 1, cardiac muscle</i>	ATP5A1	–	468
VEKEFEPLL	B*40	7184	<i>heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1</i>	HSP90B1	+ 1,9	460
VESLIQKF	B*37	115548	<i>FCH domain only 2</i>	FCHO2	–	417
VESLLQKF	B*37	56339	<i>methyltransferase like 3</i>	METTL3	–	417
VLDEAFQRY	A*01	3073	hexosaminidase A (alpha polypeptide)	HEXA	–	482
VLEKNLIKV	B*13	64766	S100P binding protein	S100BPB	–	468
VLIDYQRNV	A*02	7514	<i>exportin 1 (CRM1 homolog, yeast)</i>	XPO1	–	482
VLRFPPASY	B*15:01	54956	<i>poly (ADP-ribose) polymerase family, member 16</i>	PARP16	–	482
VLYDRVLKY	A*03	6730	<i>signal recognition particle 68kDa</i>	SRP68	–	425 468

Sequenz	HLA	Gene ID	Quellprotein		FC mRNA	RCC Probe
				Abkürzung		
VMAPRTVLL	B*07	3106	major histocompatibility complex, class I, B	HLA-B	- 2,1	431
		4276	MHC class I polypeptide-related sequence A	MICA	–	
VQGIFVEKY	B*15:01	5906	RAP1A, member of RAS onco-gene family	RAP1A	–	482
		5908	RAP1B, member of RAS onco-gene family	RAP1B	–	
VSDKTLSFY	A*01	10061	ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 2	ABCF2	–	482
VSDLLHQY	A*01	5696	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type,8 (large multi-functional peptidase 7)	PSMB8	+ 1,7	482
VSYSHIQSK	A*03	4134	microtubule-associated protein 4	MAP4	–	421 T
VTELVISY	A*01	57674	ring finger protein 213	RNF213	+ 1,7 + 2,1 –	417 460 482
VTIPPKSSL	A*02	718	complement component 3	C3	+ 5,5	482
VTVPPGPSL	A*26	5710	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 4	PSMD4	–	425
VVRHQLLKT	k.A.	1350	cytochrome c oxidase subunit VIIc	COX7C	–	421 T
VVYPWTQRF	Artefakt k.A.	3043	hemoglobin beta	HBB	–	460
VYPDGIRHI	k.A.	23450	splicing factor 3b, subunit 3, 130 kDa	SF3B3	–	421 T
WAGLALLSI	A*02	55013	coiled-coil domain containing 109B	CCDC109B	–	417
WQVKSGTIFDNF	k.A.	811	calreticulin	CALR	–	468
WSVDPLDR	k.A.	2934	gelsolin (amyloidosis, Finnish type)	GSN	- 2,6	425
YAVAVVKK	A*03	4057	LTF lactotransferrin	LTF	–	421 T
YAYDGKDYIA	Fragment	k.A.	MHC class I antigen	k.A.	–	482
YAYDGKDIAL	k.A.	3105	major histocompatibility complex, class I, A	HLA-A	–	425
		3106	major histocompatibility complex, class I, B	HLA-B	- 1,6	
		3107	major histocompatibility complex, class I, C	HLA-C	–	
	A*02	3105	major histocompatibility complex, class I, A	HLA-A	–	482
		3106	major histocompatibility complex, class I, B	HLA-B	–	
		3107	major histocompatibility complex, class I, C	HLA-C	–	
YIDEQFERY	A*01	4735	septin 2	SEPT2	– –	460 482
YLLPAIVHI	B*13	1655	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5	DDX5	+ 1,5	468
YLNEKAVSY	B*15:01	8301	phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein	PICALM	–	482
YQDPDATSLKY	k.A.	9557	chromodomain helicase DNA binding protein 1-like	CHD1L	–	482
YRDIPELQGF	k.A.	65985	acetoacetyl-CoA synthetase	AACS	–	468
YSDKYGLGY	A*01	5347	polo-like kinase 1 (Drosophila)	PLK1	–	482
YSDLNTQRPY	A*01	7305	TYRO protein tyrosine kinase binding protein	TYROBP	+ 3,9	482
YSDLNTQRPHY	A*01	7305	TYRO protein tyrosine kinase binding protein	TYROBP	+ 3,9	482

Sequenz	HLA	Gene ID	Quellprotein		FC mRNA	RCC Probe
				Abkürzung		
YSIITPNILRL	k.A.	718	<i>complement component 3</i>	C3	– + 4,6	425 468
YTADGKEVLEY	A*01	51399	<i>trafficking protein particle complex 4</i>	TRAPPC4	–	482
YTDPEVFKY	A*01	5740	<i>prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase</i>	PTGIS	–	460
YVDDTQFVRF	k.A.	k.A.	<i>MHC class I antigen</i>	k.A.	–	468
YVDPQFLTY	A*01	9867	<i>praja 2, RING-H2 motif containing</i>	PJA2	–	482

3.2.4 Gesamtdarstellung aller identifizierten HLA-Klasse-I Liganden

In den massenspektrometrisch untersuchten Proben konnten insgesamt 318 Peptide identifiziert werden. Von diesen Peptiden wurden 147 neue Peptide und 65 neue Quellproteine identifiziert. Abbildung 14 zeigt alle detektierten Peptide, alle neuen Peptide und alle neuen Quellproteine der einzelnen Gewebeproben. Da einige Peptide in mehreren Tumoren detektiert werden konnten, reduzierte sich die Gesamtanzahl von eigentlich 346 HLA-Liganden auf 318 HLA-Liganden aller ermittelten Peptide.

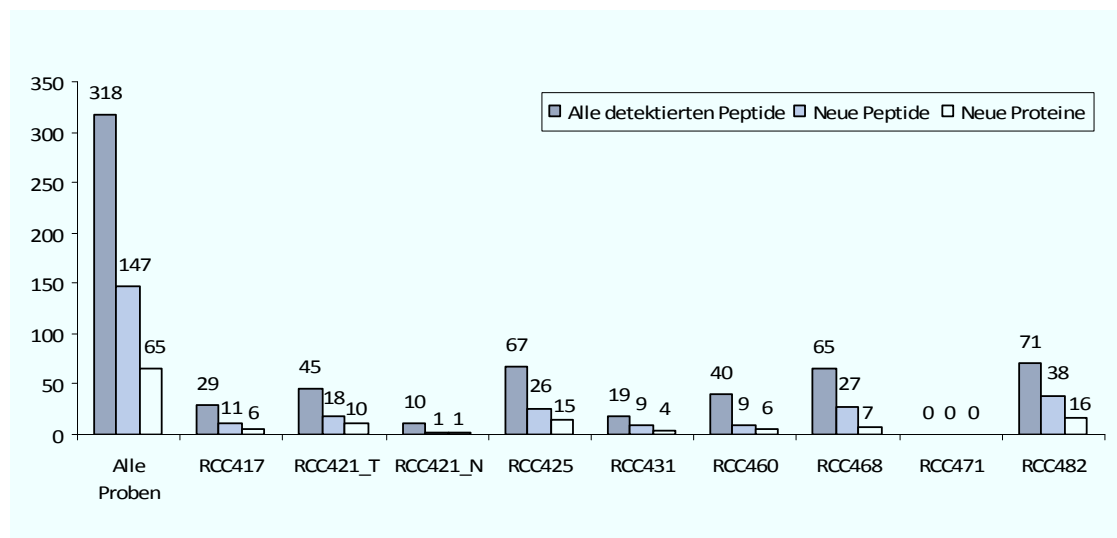


Abbildung 14: Gesamtausbeute der HLA-Liganden aller Gewebeproben. Die Ordinate zeigt die Anzahl der sequenzierten HLA-Liganden.

3.3 Vergleichende Genexpressionsanalyse von Tumor und autologem Normalgewebe

3.3.1 Isolierung und Analyse von differentiell exprimierten Genen

Als quantitative Untersuchung zur HLA-Ligandenanalyse mittels Massenspektrometrie wurden vergleichende Genexpressionsanalysen von Tumor und autologem Normalgewebe mittels *Affymetrix Micro-Array*-Technologie veranlasst. Das Genexpressionsprofil wurde für sieben Nierenzellkarzinome der Patienten RCC417, RCC421, RCC425, RCC431, RCC460, RCC468 und RCC482 untersucht. In die Analyse wurden alle Gene mit einbezogen, die sowohl im Tumor als auch im Normalgewebe vorhanden waren.

Um eine Aussage über das Expressionsverhalten der Peptide auf Proteinebene zu treffen wurden zunächst alle Signalintensitäten logarithmiert. Die Berechnung erfolgte für jede Gewebeprobe von Tumor- und Normalgewebe getrennt. Mit diesen logarithmierten Werten wurde der *Fold-Change* (FC) – der Faktor der differentiellen Expression – ermittelt und die Werte von Tumor und Normalgewebe ins Verhältnis gesetzt.

Bei Genexpressionsanalysen werden bei einer Probe pro Messung bis zu mehrere tausend Signalintensitäten, also Messwerte, erfasst. In diesen Messwerten sind neben aussagekräftigen Werten von mRNA auch diejenigen von nur bruchstückhaft vorhandener mRNA, Wiederholungen oder auch zufälligen mRNA-Veränderungen enthalten, die falsch positive Resultate liefern können. Um falsch positive Resultate zu vermeiden wurden daher nun für die ins Verhältnis gesetzten Logarithmus-Werte ein *Cut-Off*-Wert (Toleranzwert) von $\pm 1,5$ festgelegt. Damit die Streubreite aller Signalintensitäten relativ gering gehalten wurde, wurden die errechneten Werte durch die Gauß-Verteilung normalisiert.

Diese Vorgehensweise wurde bei allen ins Verhältnis gesetzten Probenpärchen durchgeführt. Mit dem zweiseitigen Referenzbereich wurde das Konfidenzintervall bestimmt und lag bei allen Proben bei 95 %. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert von $< 0,05$ betrachtet. Expressionswerte die außerhalb des Konfidenzintervalls im positiven Bereich lagen wurden als Überexpression, Werte im negativen Bereich als Unterexpression betrachtet. Der Korrelationskoeffizient R^2 , der als Grad des linearen Zusammenhangs dient, wurde auf einen Wert nahe + 1 bestimmt.

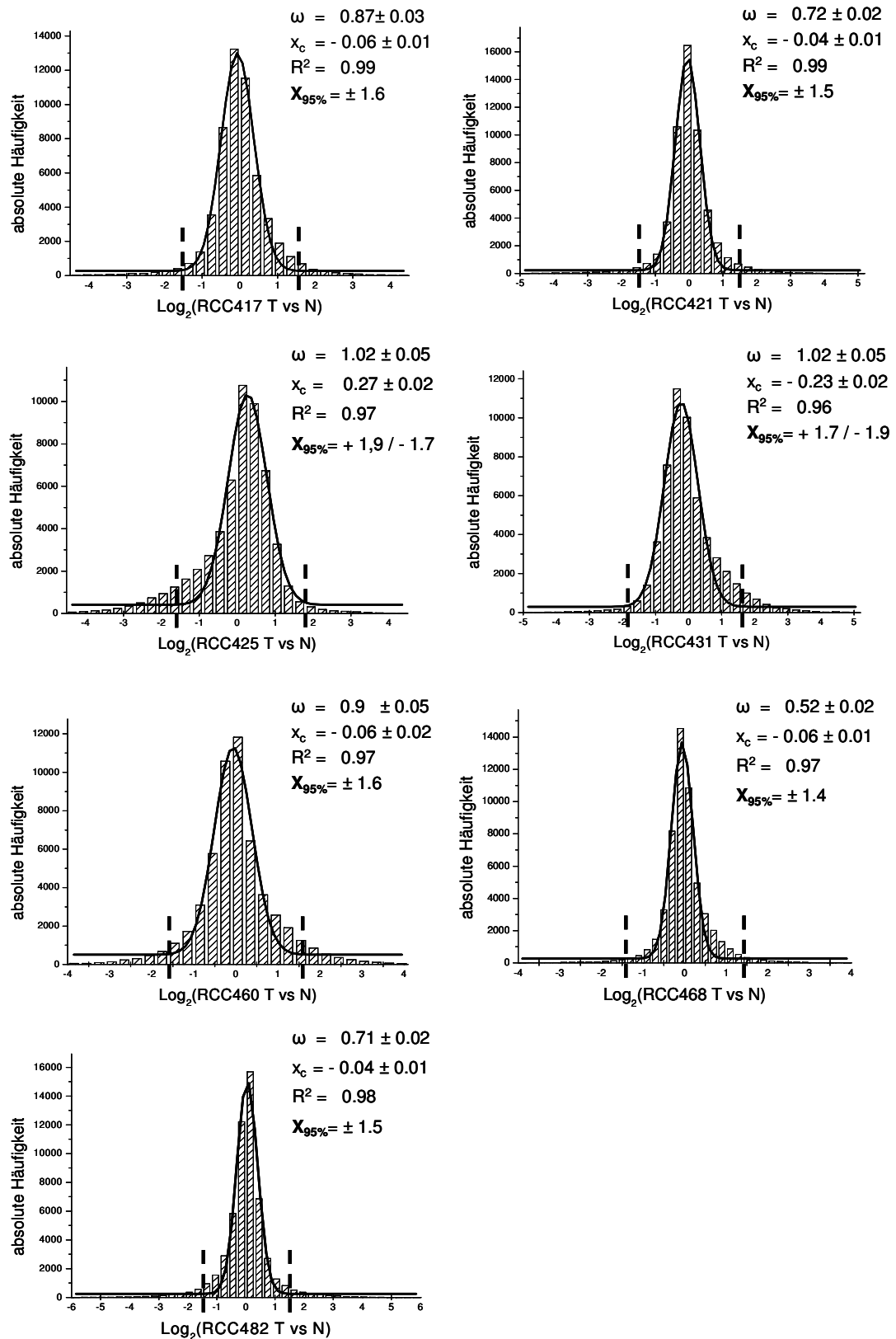


Abbildung 15: Gauß-Normalverteilung der mRNA-Expressionswerte. Tumor *versus* Normalgewebe wurde ins Verhältnis gesetzt. Das Konfidenzintervall aller sieben Proben lag bei 95 % und ist durch die senkrechten und fetten unterbrochenen Linien dargestellt. Der Korrelationskoeffizient R^2 lag nahe 1.

3.3.2 Identifizierung überexprimierter Proteine

In diesem Kapitel sollen die mRNA-Expressionswerte der Proteine, aus denen die HLA-Liganden in Tabelle 14 stammen, näher erläutert werden. Eine Vielzahl an Proteinen war in den vergleichenden Genexpressionsanalysen über- oder unterexprimiert. Jedoch gab es auch viele Proteine, die nicht detektiert werden konnten. Der Grund hierfür lag am gesetzten *Cut-Off* von $\pm 1,5$ in dessen Bereich sich eine Vielzahl weiterer Daten befanden.

Ein Teil der Proteine, von denen ein HLA-Ligand auf der Zelloberfläche ermittelt werden konnte, zeigte in der vergleichenden Genexpressionsanalyse eine Überexpression auf mRNA-Ebene. Es wurde daher davon ausgegangen, dass wenn eine Überexpression auf mRNA-Ebene stattgefunden hatte, auch eine vermehrte Präsentation von MHC-Peptid-Komplexen auf Zelloberflächen vorhanden war.

Solche präsentierte Peptide auf Zelloberflächen können vom Immunsystem potentiell erkannt werden und stellen daher die Möglichkeit für ein immuntherapeutisches Eingreifen durch Erkennen der MHC-Peptid-Komplexe von T-Zellen dar. Jedoch muss darauf geachtet werden, dass das ermittelte Zielprotein in anderen Körpergeweben nicht stark exprimiert ist, um die Gefahr einer Autoimmunreaktion zu minimieren. Daher wird das Vorhandensein von Proteinen, die als potentielle Zielproteine gelten, in anderen Körpergeweben bestimmt. Die Abbildungen 16 bis 19 zeigen vier ausgesuchte Quellproteine und deren relative mRNA-Expressionswerte in verschiedenen Normalgeweben (Quelle: www.biogps.gnf.org).

Die weiter unten aufgeführten Angaben in den eckigen Klammern hinter den Genen, respektive den Proteinen, geben den Expressionswert und das Konfidenzintervall (KI) an.

Bei den überexprimierten Proteinen wurden einige Differenzierungsantigene ermittelt, die eine zum Teil sehr hohe mRNA-Expression aufwiesen. Der Transkriptionsfaktor ***basic helix-loop-helix family, member e41 (BHLHE41)*** kann sowohl die basale als auch die spezifische Transkription unterdrücken und erreichte einen Expressionswert von + 4,5 bei einem Konfidenzintervall von $\pm 1,6$. Er kommt vor allem in quergestreifter Skelettmuskulatur und im Gehirn vor, ist aber normalerweise auch in geringem Maße in inneren Organen vorhanden.

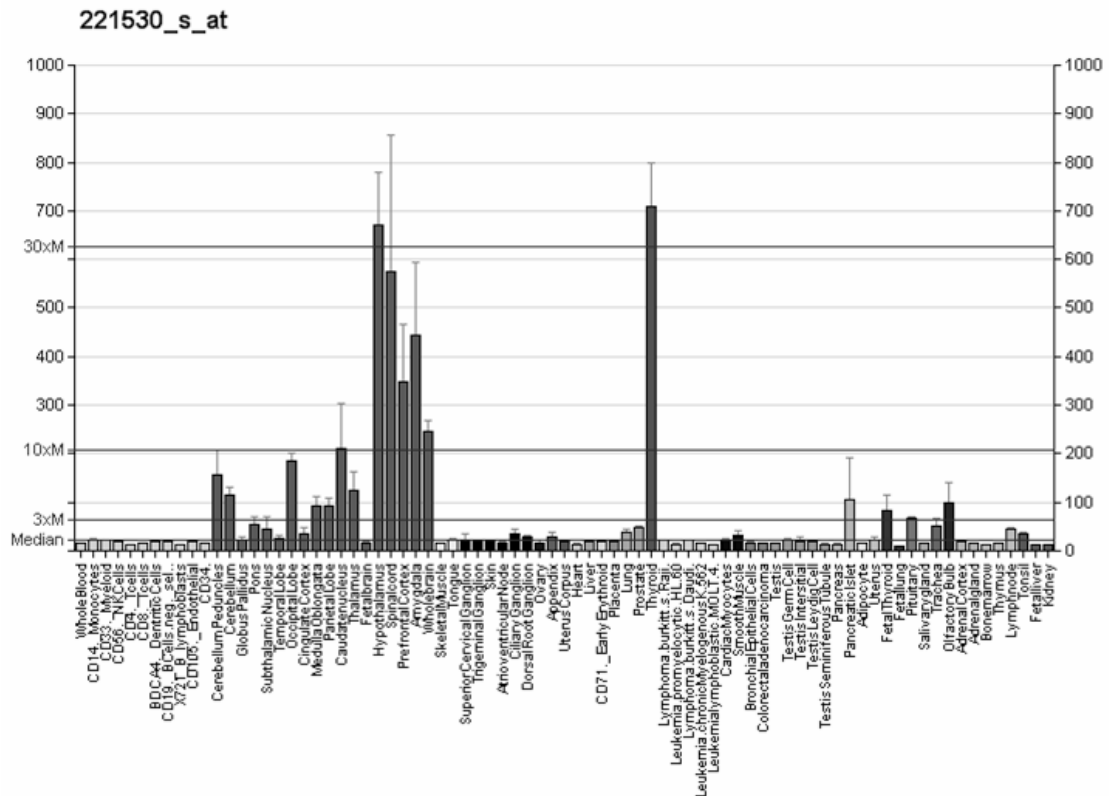


Abbildung 16: Relative mRNA-Expressionswerte des Transkriptionsfaktors BHLHE41 in verschiedenen Normalgeweben. Die Zahlenangabe links oben bezieht sich auf den verwendeten *GeneChip*. Quelle: www.biogps.gnf.org.

Als weiteres in dieser Antigengruppe ermitteltes Protein war das ***Ras suppressor protein 1 (RSU1)*** mit einem Expressionswert von + 2,1 und dem Konfidenzintervall von + 1,9 / - 1,7. Es spielt in der Differenzierung vieler Zellen als Suppressor eine wichtige Rolle.

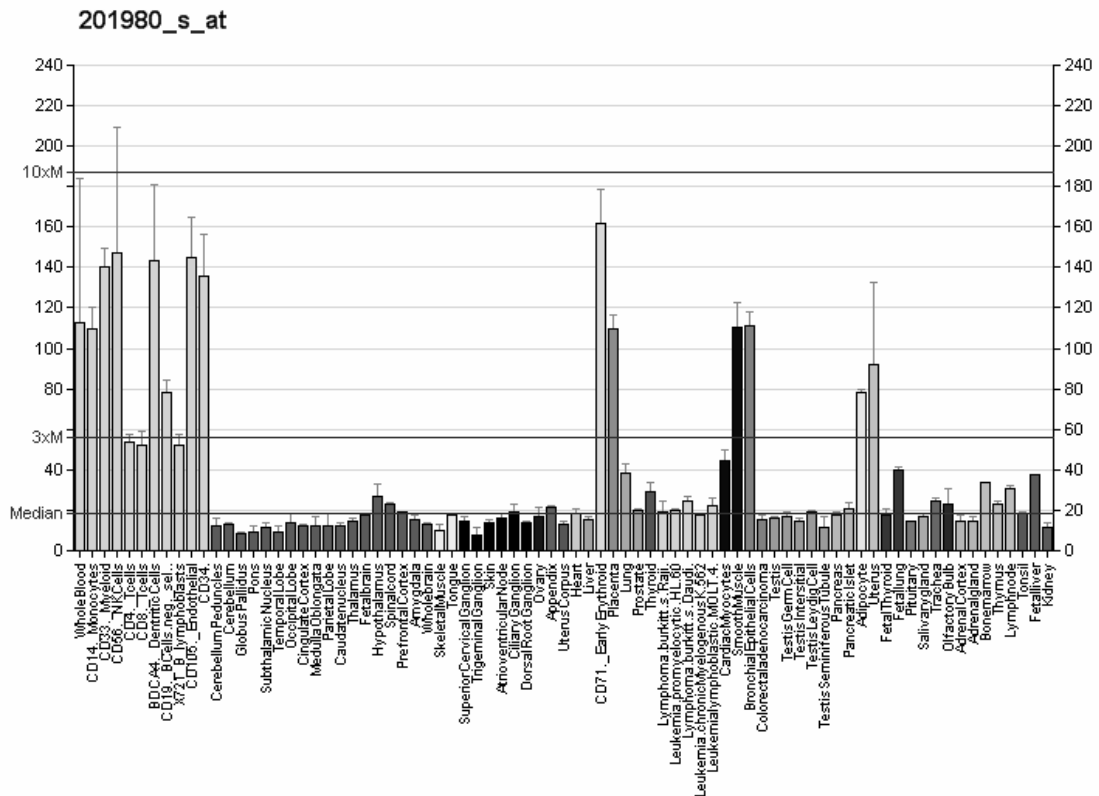


Abbildung 17: Relative mRNA-Expressionswerte des Suppressorantigens RSU1 in verschiedenen Normalgeweben. Die Zahlenangabe links oben bezieht sich auf den verwendeten *GeneChip*. Quelle: www.biogps.gnf.org.

Das ***prune homolog 2 (Drosophila) (Prune2)***, aus dem das identifizierte Peptid *GQVEIVTKV* stammt, hat eine wichtige Funktion in der Regulation bei der Zelldifferenzierung sowie dem Überleben von Zellen. In der Literatur wurde die Aggressivität von Tumorzellen bei diesem noch relativ unbekannten Protein beschrieben (Machida et al. 2006). Es ist ein Protein des Zytoplasmas und kommt überwiegend im zentralen Nervensystem und den Nebennieren vor. Der Expressionswert von PRUNE2 lag bei +2,0 und damit deutlich über dem Konfidenzintervall von $\pm 1,5$.

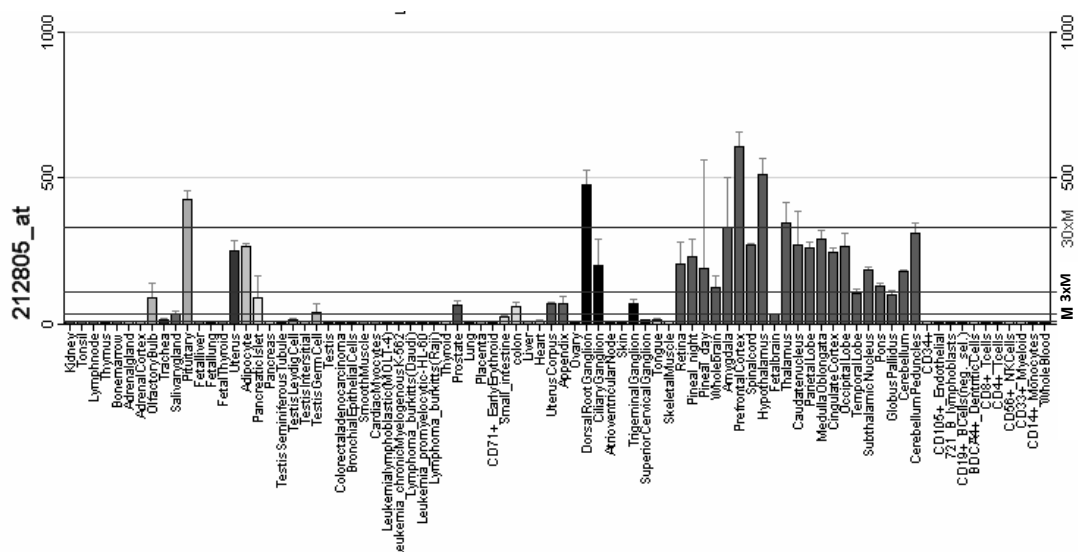


Abbildung 18: Relative mRNA-Expressionswerte von PRUNE2 in verschiedenen Normalgeweben. Die Zahlenangabe links oben bezieht sich auf den verwendeten *GeneChip*.
Quelle: www.biogps.gnf.org.

Das Protein ***signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1)*** [$+ 2,0$; $KI \pm 1,4$ (RCC468)] gehört zur STAT-Familie dessen Mitglieder insgesamt 7 STATs zählen (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6). STAT befindet sich in den meisten Körperzellen, zählt zu den Transkriptionsfaktoren des JAK-STAT-Signalwegs und leitet Informationen extrazellulärer Signalpeptide von der Zellmembran intrazellulär zu den Promotoren der Zielgene im Zellkern weiter. STAT wirkt somit an vielen verschiedenen Wachstums- und Differenzierungsprozessen mit.

Das bereits bekannte Protein ***nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin) (NPM1)*** [+ 1,9; KI \pm 1,4 (RCC468)] gehört sowohl zu den Phosphoproteinen als auch zu den Protoonkogenen und bewegt sich als Transporter von Proteinen zwischen Nukleus und Zytoplasma. Es ist in verschiedenen Zellprozessen wie Proliferation und Regulation des *Tumor suppressor TP53* (p53) beteiligt.

Ein weiteres Protein des Zytoskeletts, **Vimentin (VIM)** [+ 1,9; KI \pm 1,5 (RCC421 T); + 4,2; KI + 1,9 / -1,7 (RCC425); + 2,3; KI \pm 1,6 (RCC460)], das bereits bei vielen RCCs identifiziert wurde, wurde auch diesmal wieder mit zum Teil hohen Expressionswerten gefunden. Insgesamt wurden von diesem Strukturprotein 7 antigene Peptide identifiziert. Dieses Protein war bei vier Peptiden über- und bei einem Peptid unterexprimiert. Bei zwei Peptiden konnte VIM nicht als exprimiert gewertet werden. Auffallend war, dass in der Probe RCC425 dieses Protein mit einem Expressionswert von + 4,2 zweimal mit unterschiedlichen Sequenzen vorhanden war. Es waren dies die HLA-Liganden **REYQDLLNVKM** mit dem HLA-Allotyp B*40 und **LEQQNKILL** mit dem HLA-Allotyp B*40/B*44. Weitere Strukturproteine sind die identifizierten Proteine **collagen, type VI, alpha 2 (COL6A2)** [+ 2,1; KI \pm 1,5 (RCC482)] und **collagen, type VI, alpha 3 (COL6A3)** [+ 4,2; KI + 1,9 / -1,7 (RCC425)].

Weitere Autoantigene, die als überexprimiert identifiziert werden konnten waren **Calnexin (CANX)** [+ 2,3; KI \pm 1,4 (RCC468)], **Cyclin D1 (CCND1)** [+ 2,6; KI \pm 1,4 (RCC468)], **EH-domain containing 2 (EHD2)** [+ 2,5; KI \pm 1,5 (RCC482)] und **integrin, alpha X (complement component 3 receptor 4 subunit) (ITGAX)** [+ 2,0; KI \pm 1,5 (RCC482)].

Wie bereits in früheren Studien belegt, konnten auch diesmal mehrere Peptide des Proteins **peripilin (PLIN2)** [+ 3,3; KI \pm 1,5 (RCC421 T); + 2,6; KI \pm 1,4 (RCC468); + 3,3; KI \pm 1,5 (RCC482)], auch bekannt als *adipophilin* oder *adipose differentiation-related protein* (ADFP), mit zum Teil starken Expressionswerten diagnostiziert werden. Insgesamt kam dieses Protein einmal als neues Peptid und dreimal in unterschiedlichen bekannten Peptidvarianten vor (siehe Abbildung 13).

In der Gewebeprobe RCC431 konnte der für Endothelzellen spezifische **van Willebrand-Faktor (VWF)** [+ 5,6; KI + 1,7 / -1,9], in RCC468 bzw. RCC482 **complement component 3 (C3)** [+ 4,6; KI \pm 1,4 bzw. + 5,5; KI \pm 1,5] mit hohen Expressionswerten detektiert werden. Beides sind Plasmaproteine. Dabei hat das Protein VWF seine wesentliche Aufgabe im Blutgerinnungssystem durch Anhaftung an Endothelzellen und an Thrombozyten, das C3 hingegen im Immunsystem durch Zerstörung von Krankheitserregern und wirkt bei der Aktivierung von Entzündungsreaktionen mit.

Weiterhin sollen noch die **Hämoglobine- β bis - γ** [+ 2,3; KI + 1,7 / -1,9 (RCC425)] sowie MHC-Klasse-II-Moleküle **major histocompatibility complex, class II, DP beta 1 (HLA-DPB1)** [+ 2,3; KI \pm 1,4 (RCC421)] und **CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain (CD74)** [+ 2,4; KI \pm 1,4 (RCC468)] nicht unerwähnt bleiben.

3.3.3 Identifizierung unterexprimierter Proteine

Ein weiterer Teil der Quellproteine der auf den Zelloberflächen ermittelten HLA-Liganden zeigte in der Genexpressionsanalyse eine auffallend schwache Signalintensität und dadurch eine Unterexpression. Bei allen hier durchgeführten Genexpressionsanalysen wurde Tumor *versus* Normalgewebe ins Verhältnis gesetzt. Aufgrund dessen sind die ermittelten Peptide auf mRNA-Ebene im Normalgewebe stärker exprimiert als im Tumorgewebe. Somit können Peptide aus diesen Proteinen nicht als auf der Zelloberfläche übermäßig detektierte HLA-Liganden angesehen werden. Trotzdem sind diese Quellproteine Teil eines Expressionsmusters neoplastischer Zellen.

Das Protein ***Ras homolog gene family, member A (RHOA)*** [- 3,3; KI + 1,9 / -1,7 (RCC425)] befindet sich in den meisten Körperzellen und gehört zu den kleinen zytosolischen GTPasen (*GTPase-activating-protein*). Es hat eine Schlüsselposition in der Signalweiterleitung von Wachstums- und Differenzierungsprozessen. Die Aktivierung von RHOA führt zur Ausprägung spezialisierter kontraktile Zytoskelettstrukturen, sogenannte Stressfasern (*stress fibers*) sowie zur Bildung fokaler Adhäsionsplaques (*focal adhesions*). Diese dienen der Verbindung des Zytoskeletts mit der extrazellulären Matrix.

Das ***CD9 molecule (CD9)*** [- 4,3; KI + 1,9 / -1,7 (RCC425)] ist ein Membranprotein, das in vielen hämatopoetischen und epithelialen Zellen vorkommt. Es ist involviert in der Signalinduktion, Zelladhäsion und -migration und kann die Thrombozytenaktivierung und -aggregation auslösen.

Die ubiquitär vorkommenden Hitzeschockproteine 90 sind Chaperone, die mit anderen Chaperonen assoziiert sind. Sie spielen eine zentrale Rolle in der Faltung neu synthetisierter Proteine oder in der Stabilisierung und Rückfaltung denaturierter Proteine nach Stress. Es gibt zwei bedeutende zytosolische Hitzeschockproteine: das ***heat shock protein: 90 kDa alpha (cytosolic), class A member 1 (HSP90AA1)*** [- 3,9; KI + 1,9 / -1,7] und ***heat shock protein: 90 kDa alpha (cytosolic), class B member 1 (HSP90AB1)*** [- 2,2; KI + 1,9 / -1,7]. HSP90AA1 ist die induzierbare Form, HSP90AB1 die konstitutive Form. Interessanterweise war das im endoplasmatischen Retikulum vorkommende ***heat shock protein 90 kDa beta (Grp94), member 1 (HSP90B1)*** [+ 2,0; KI + 1,9 / -1,7] derselben Probe überexprimiert. Alle drei Proteine wurden in der Probe RCC425 identifiziert. HSP90B1 wurde zudem in RCC460 überexprimiert [+ 1,9; KI ± 1,6].

Das Protein ***myosin, light polypeptide 6, alkali, smooth muscle and non-muscle (MYL6)*** [- 2,5; KI + 1,9 / -1,7 (RCC425)] ist ein ATPase abhängiges Motorprotein und kommt in glatter Muskulatur sowie in muskulaturlosen Geweben vor. Es konnte in der Gewebeprobe RCC425 zweimal, jedoch mit unterschiedlichen Peptidsequenzen bestimmt werden.

Cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1 (CYP1B1) [- 3,3; KI \pm 1,6 (RCC460)] gehört zur Cytochrom P450-Familie. Es ist ein ubiquitäres, in hohen Konzentrationen besonders in der Leber vorkommendes Hämprotein und hat als Oxydoreduktase enzymatische Aktivität. Hauptsächlich ist es für die Oxidation körpereigener Stoffe wie beispielsweise Cholesterolsynthese, Synthese von Steroiden sowie Fetten verantwortlich. Körperfremde und körpereigene hydrophobe Stoffe werden durch Oxidation leichter in lösliche Formen biotransformiert. Sie können dadurch schneller aus dem Körper ausgeschieden werden.

4 Diskussion

Zur Identifizierung von TAAs wurden in dieser Arbeit massenspektrometrische Analysen sowie parallel durchgeführte vergleichende Genexpressionsanalysen auf mRNA-Ebene als gut etablierte Methoden durchgeführt. Die Genexpressionsanalysen wurden mit der *Micro-Array*-Methode ausgeführt. Bei dieser Methode werden differentiell exprimierte Genprodukte sowohl bei Tumorgewebe als auch bei Normalgewebe in hoher Anzahl detektiert (Kallioniemi et al. 2001). Dabei sind in transformierten Tumorzellen andere Stoffwechselvorgänge und Transkripte zu finden als in vergleichbaren gesunden Zellen des gleichen Körpergewebes. Infolgedessen weisen Tumorzellen im Vergleich zu gesunden Zellen bei Genexpressionsanalysen andere Expressionswerte auf (Ross et al. 2000).

Neben diesen beiden Untersuchungsmethoden wurde zur Beurteilung einer Tumorassoziation identifizierter Peptide respektive Proteine die biologische Funktion derselben bewertet. Da T-Zellen mit ihrem TCR Tumorzellen erkennen können, wurde zudem auf Immunreaktionen von T-Zellen geachtet. Es wurde auch darauf Wert gelegt, dass die Antigene eine möglichst hohe Tumorspezifität aufweisen, um das Risiko von Autoimmunreaktionen durch nachfolgende Immunisierung zu minimieren. Dazu wurden die relativen Expressionswerte der Antigene auf Normalgewebe mit Hilfe von Datenbanken (www.biogps.gnf.org; www.swissprot) geprüft. Ferner wurde untersucht, wie häufig die betreffenden TAAs auf bereits zuvor untersuchten RCCs zu finden waren.

Im Folgenden sollen nun diejenigen identifizierten HLA-Liganden diskutiert werden, für die sich der Verdacht einer Tumorassoziation im Nierenzellkarzinom ergab bzw. die mit einem Tumorwachstum im Zusammenhang stehen können.

4.1 Überexprimierte Proteine

4.1.1 Proteine der Signaltransduktion

GQKLEPLAY aus BHLHE41

Das Quellprotein dieses Liganden heißt *basic helix-loop-helix family, member e41* und ist ein noch relativ neu entdecktes Mitglied in der *basic helix-loop-helix*-Familie. Beide, Ligand und Quellprotein, wurden neu identifiziert. Dieses Protein ist ein Transkriptionsfaktor, der sowohl die basale als auch die spezifische Transkription unterdrücken kann (Garriga-Canut et al. 2001) und spielt eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Zelldifferenzierung, des Zellwachstums und der Morphogenese. In Studien konnte gezeigt werden, dass durch Unterdrückung von BHLHE41 die Apoptose in humanen Brustkrebszelllinien induziert werden kann. Ferner kann die Expression von Faktoren beeinflusst werden, die mit Apoptose verknüpft sind wie beispielsweise Bax, C-Myc oder Fas. In der gleichen Studie konnte festgestellt werden, dass durch den Einfluss von TNF- α (Tumornekrosefaktor alpha) die BHLHE41-Expression reguliert wird (Liu et al. 2010). In anderen Untersuchungen wurde belegt, dass unter dem Einfluss von BHLHE41 bei hypoxischen Bedingungen die VEGF-Genexpression (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) unterdrückt werden kann (Sato et al. 2008). In dieser Studie wurde auch nachgewiesen, dass BHLHE41 den VEGF negativ reguliert. Dadurch erscheint dieses Protein, das in quergestreifter Skelettmuskulatur und im Gehirn hoch exprimiert, aber nur moderat in Pankreas und Herz sowie schwach in Plazenta, Lunge und Leber exprimiert ist (Fujimoto et al. 2001), als ein hochinteressanter Kandidat für eine Peptid-basierte Immuntherapie. Es sollten daher weitere Studien über eine Eignung als T-Zell-Epitop durchgeführt werden.

GQVEIVTKV aus PRUNE2

Auch hier sind Ligand und Quellprotein neu. Diesem noch relativ unbekannten, im Zytoplasma von ZNS (Gehirn und Rückenmark) sowie Nebennieren vorkommenden Transkriptionsfaktor *prune homolog 2 (Drosophila)* wurde bei Tumorzellen eine erhöhte Aggressivität vor allem beim Neuroblastom – eine bösartige, von der Embryonalleiste ausgehende Neubildung bei Kindern – zugeschrieben. Bei dieser malignen Erkrankung dient PRUNE2 als Prognose-Faktor. PRUNE2 spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Zelldifferenzierung, dem Überleben und der Aggressivität von Tumorzellen (Machida et al. 2006). Allerdings ist über die Funktionsweise dieses Proteins nur sehr wenig bekannt. Das Vorkommen dieses Proteins in den Körpergeweben ist limitiert, es könnte daher ein Kandidat für eine Vakzinierungstherapie sein. Allerdings müssten hierzu T-Zellstimulationen durchgeführt werden um festzustellen, ob mögliche Immunreaktionen vorhanden sind.

KEIGELTQL aus RSU1

Das Quellprotein dieses Liganden ist das *Ras suppressor protein 1* und enthält 7 LRR (*leucine-rich repeat*). Es gehört als kleines GTP-bindendes Protein zur Ras-Familie und wurde nebst Peptid neu detektiert.

Die kleinen GTPasen der Ras-Proteine funktionieren als molekulare Schalter, die zwischen inaktiven GDP-gebundenen und aktiven GTP-gebundenen Konformationen wechseln. In der aktiven Form kann Ras mit nachgeschalteten Effektoren wie Raf, Phosphatidylinositol 3-Kinase und Phospholipase C – welche die Signalkaskade einleiten – reagieren. Diese Reaktion führt am Ende einer Signalkaskade zur Transkription, Translation und zum Ablauf des Zellzyklus. Das Ende eines Ras-vermittelten Signals innerhalb der Zelle ist in der Regel mit Zellwachstum und Zellproliferation verbunden. Deshalb sind Mutationen innerhalb des Ras-Proteins oft an der Tumorentstehung beteiligt. Die Ras-Proteine spielen jedoch nicht nur im Zellwachstum eine Rolle, sondern können auch als Suppressoren wirken wie beispielsweise RSU1.

Dieses Protein hat seine Funktion in der Ras-Signaltransduktion. Jedoch ist über die RSU1 spezifische RNA noch wenig bekannt, obwohl es in vielen Geweben vorkommt. Es wird vermutet, dass dieses Protein eine Rolle in der Ras-vermittelten Signaltransduktion als Protoonkogen spielt. RSU1 ist seither nur in zwei Gewebearten als Tumorsuppressor beschrieben. Aus Studien ist bekannt, dass die Expression von RSU1 das Wachstum von Zelllinien des Brustkrebses und des Glioblastoms hemmt (Chunduru et al. 2002). Weitere Studien belegen, dass RSU1 an die Domäne LIM5 des Adapterproteins PINCH-1 (*LIM and senescent cell antigen-like domains 1*, LIMS1) bindet (Dougherty et al. 2005) und dadurch eine Interaktion mit IPP (*integrin-linked kinase {ILK}*, *PINCH-1 / LIMS1*, *parvin*) eingeht. Durch die dadurch entstehende Signalkaskade kann eine Zellmigration gehemmt werden. Diese hemmende Funktion kann allerdings durch eine Ras-Aktivierung wieder aufgehoben werden (Dougherty et al. 2008). Dadurch, dass diese Proteinfamilie einerseits am Zellwachstum beteiligt ist und andererseits aber als Tumorsuppressor fungiert, ist es ein sehr interessantes Protein. Allerdings fehlen bis dato noch weitere Forschungserkenntnisse, um dieses Protein in der Immuntherapie erfolgreich einsetzen zu können.

FSDIVKQGY aus DOK4

Dieses neue und noch recht unbekannte Protein und sein zugehöriger Ligand werden von dem Gen *docking protein 4* (auch als *downstream of tyrosine kinase-4* bezeichnet) kodiert. DOK-Proteine sind wichtige Adapter-Proteine im multimolekularen Signalkomplex. DOK4 reguliert positiv den MAP-Kinase-Signalweg und hat Funktionen im RET-vermittelten Neuritenwachstum sowie bei der Regulation von T-Zell-vermittelter Immunantwort (Favre et al. 2003). Ubiquitär vorkommend weist DOK4 hohe Expressionswerte im Skelettmuskel, im Herz, in der Leber und in der Niere auf

(Grimm et al. 2001). Außerdem ist DOK4 in ruhenden T-Zellen exprimiert und greift dort negativ regulierend in die T-Zellantwort ein (Gérard et al. 2009).

Ein Zusammenhang mit malignen Erkrankungen konnte beschrieben werden. So wurde DOK4 eine Rolle im Insulin-Signalweg zugeschrieben, indem es als Adapter-Protein dem IRS5 (*insulin receptor substrate-5*) nachgeschaltet ist und mit diesem einen IRS5 / DOK4-Komplex bildet und als IRS5 / DOK4-Komplex in der Niere hoch exprimiert ist (Cai et al. 2003). In einer weiteren Studie konnte dokumentiert werden, dass der IRS5 / DOK4-Komplex beim klarzelligen Nierenzellkarzinom hohe Expressionswerte aufweist (Al-Sarraf et al. 2007). Ähnliche Ergebnisse konnten auch für das großzellige Lungenkarzinom gewonnen werden (Gray et al. 2008). Obwohl über das Protein noch recht wenig bekannt ist, scheint dennoch ein starker Zusammenhang mit neoplastischen Erkrankungen zu bestehen. Durch die zusätzlich erbrachten T-Zellreaktionen spielt dieses Protein zudem auch eine wichtige Rolle in der Immunantwort. Aufgrund dieser Ergebnisse kann der Ligand von DOK4 als neues tumorassoziiertes Antigen bezeichnet werden. Als Einsatz in der immuntherapeutischen Vakzinierung wäre dieser HLA-A*01-Ligand ein hochinteressanter Kandidat.

DEVSRIVGSVEF aus STAT1

Dieser neu entdeckte HLA-Ligand stammt aus dem Protein *signal transducer and activator of transcription 1*. Das Protein ist Bestandteil der STAT-Protein-Familie. HLA-Liganden dieses Proteins wurden bereits in unterschiedlichen Zelllinien sowie Primärtumoren an der Universität Tübingen identifiziert (Peptiddatenbank des IFIZ: www.elchtools.de). Der STAT-Signalweg ist als Reaktion auf verschiedene Zellstimuli und Pathogene sowie für die Zellvariabilität von eminenter Wichtigkeit. Als Protein des Nukleus und des Zytosols kommt STAT1 in nahezu jeder Körperzelle, besonders ausgeprägt jedoch in Herzmuskelzellen, glatter Muskulatur sowie in Zellen der Immunabwehr – insbesondere CD4- und CD8-Zellen – vor.

Durch Bindung extrazellulärer Zytokine und Wachstumsfaktoren an den Zellmembran-Oberflächen werden STAT-Proteine im Zytosol durch Rezeptor-assoziierte Janus-Kinasen phosphoryliert. Daraufhin werden die STAT-Proteine zu Homo- oder Heterodimeren dimerisiert, wodurch diese Proteine in den Nukleus verlagert werden. Im Nukleus wirken sie dann als Transkriptionsfaktoren (Rogers et al. 2003). Seit der Entdeckung dieses Proteins konnten viele Liganden ausfindig gemacht werden, die den STAT-Signalweg nutzen, so zum Beispiel IFN- α , IFN- γ , EGF (*epidermal growth factor*), PDGF (*platelet derived growth factor C*) und viele Interleukine, um nur einige zu nennen (Quelle et al. 1995; Gupta et al. 1996). Vermutlich durch die vielfältigen Aktivierungsreagentien spielt dieses Protein nicht nur bei Entzündungen, Infektionen und hormonellen Erkrankungen eine große Rolle, sondern ist auch in der Tumorgenese vieler Malignome sowie an der Pathogenese des Wilms-Tumors (Wang et al. 2010) beteiligt. Beim großzelligen Bronchialkarzinom spielt STAT1 als Biomarker bei der Diagnosestellung seit kurzem eine Rolle (Xiaoling et al. 2008),

ebenso zur Prognoseeinschätzung beim Rektumkarzinom (Clarke et al. 2008) sowie bei Kopf- und Halstumoren (Ferris 2010).

EITPPVLR aus NPM1

Das Gen, das dieses Protein reguliert, gehört zur *Nukleophosmin*-Familie. NPM1 ist ein nukleozytoplasmatisches *Shuttling*-Protein mit sehr komplexen Funktionen. Als multifunktionales regulatorisches Protein ist es in allen Zellen vertreten und an vielen verschiedenen Prozessen beteiligt wie z.B. Duplikation von Zentrosomen (Lingle und Salisbury 2000), Zusammenbau von Histonen (Swaminathan et al. 2005), Regulierung der *Tumor Suppressor Gene TP53* (p53) und ARF (*alternate reading frame*) (Tago et al. 2005) sowie in der Biogenese von Ribosomen (Maggi et al. 2008), um nur einige zu nennen. Eine Alteration von NPM1 kann zum Funktionsverlust, zur Mutation oder Translokation in Zellen führen. Der Verlust des regulatorischen Potentials dieses Proteins kann daher zur Onkogenese beitragen. Hochinteressant in diesem Zusammenhang ist, dass eine Überexpression von NPM1 in gesunden Zellen einen p53-abhängigen Zellzyklusarrest verursacht, wohingegen bei Abwesenheit von p53 die S-Phase im Zellzyklus eintritt (Lee SB et al. 2008). Im Gegensatz dazu schwächt der Verlust der NPM1-Expression das Zellwachstum und führt zu vermehrtem Zelltod. NPM1 hat deshalb sowohl Potential als Onkogen und auch als Tumor-Suppressorgen.

Als Phosphoprotein enthält NPM1 mehrere Phosphorylierungsstellen, wodurch NPM1 durch verschiedene Kinasen phosphoryliert werden kann. Über CDK2 (*cyclin-dependent kinase 2*) greift NPM1 als weiterer Bindungspartner regulatorisch in den Zellzyklus ein. Wird NPM1 durch CDK2 phosphoryliert, leitet es die Verdopplung der Zentrosome ein. Inzwischen wurde eine Reihe von Fusionspartnern von NPM1 charakterisiert, die mit Mutationen von Chromosomen bei malignen Erkrankungen des blutbildenden Systems assoziiert sind (Morris et al. 1994; Dicker et al. 2010). Aber auch bei malignen Erkrankungen anderer Organsysteme wie beispielsweise in Schilddrüsentumoren (Pianta et al. 2010), in Mammatumoren (Olson et al. 2010) sowie in soliden Tumoren verschiedenster Organsysteme (Grisendi et al. 2006) konnte dieses Protein überexprimiert nachgewiesen werden.

Zusammenfassend kann für die o.g. Proteine der Signaltransduktion beurteilt werden, dass diese Transkriptionsfaktoren aufgrund ihrer vielfältigen Funktionen, deren teilweise auslösender Immunreaktionen sowie der in der Literatur beschriebenen Funktionsweise als tumorassoziierte Antigene angesehen werden können. BHLHE41 und PRUNE2 könnten wegen ihrer Expressionsmuster sehr interessante Kandidaten für eine Peptid-basierte Immuntherapie darstellen, zumal sie physiologischerweise in nur sehr wenigen Zellen vorkommen. Die durch TNF- α regulierende Expression von BHLHE41 läßt zudem bei diesem Protein auf eine mögliche T-Zellreaktion schließen. Als weiterer möglicher und interessanter Impfkandidat wäre RSU1 zu sehen, der wie PRUNE2 ein noch sehr wenig erforschtes Protein ist. Durch sein häufiges Vorkommen in den Körpergeweben kann allerdings die Gefahr einer Autoimmunreaktion gegeben sein, weshalb seine Anwendung für eine Immuntherapie genau überdacht werden sollte.

Auch DOK4 lässt vermuten, dass bei Einsatz als Impfpeptid T-Zellstimulationen vorhanden sein könnten. Auf jeden Fall müssten diese Proteine näher erforscht und T-Zellstimulationen durchgeführt werden, um diese in der Zukunft möglicherweise als Impfpeptid einsetzen zu können.

Ein Einsatz von STAT1 in der Immuntherapie sollte nur nach ganz besonderer Abwägung erfolgen, da dieses Protein in allen Körperzellen vorkommt und nicht nur in der Tumorgenese, sondern auch bei Entzündungen, Infektionen und hormonellen Erkrankungen eine Rolle spielt. Da bei Tumorerkrankungen Entzündungsreaktionen mit vergesellschaftet sind, ist die Gefahr einer Autoimmunreaktion bei Vakzinierung mit diesem Peptid besonders groß. Ähnlich verhält es sich mit NPM1. Aufgrund seiner vielfältigen Reaktionen als Transkriptionsfaktor, Onkogen und Suppressorgen wäre es ein idealer Impfpartner vor allem auch deshalb, weil dieses Protein in hohem Maße an der Tumorgenese verschiedener Gewebe beteiligt ist. Aber genau hier liegt der limitierende Faktor. Gerade weil NPM1 in allen Körperzellen vorkommt, könnten bei einer Impftherapie die als Reaktion gebildeten T-Zellen nicht nur Tumorzellen angreifen, sondern auch Zellen, die in geringem Maße dieses Protein exprimieren, also Zellen, die beispielsweise einer ständigen Zellmauserung unterliegen wie Schleimhautepithelzellen oder Zellen des hämatopoetischen Systems. Aus diesen genannten Gründen ist es nicht empfehlenswert, STAT1 und NPM1 in der Peptid-basierten Immuntherapie einzusetzen.

4.1.2 Proteine der Faltung

VEKEFEPLL aus HSP90B1

Dieser neue Ligand mit dem HLA-Allotyp B*40 ist aus der Familie der Hitzeschockproteine. Hitzeschockproteine sind Chaperone, deren Zentralaufgaben in der Faltung von Proteinen liegen. Das Hitzeschockprotein 90B1, auch bekannt als gp96, grp94 oder ERp99 ist das einzige in dieser Familie, das konstitutiv aktiv ist (Csermely et al. 1998). HSP90B1 ist sehr gut erforscht und kommt in vielen soliden Tumoren stark exprimiert vor (Chen B et al. 2005). Es bindet viele Peptide, unter denen sich auch viele immunogene Tumorpeptide befinden, wodurch T-Zellstimulationen ausgelöst werden. Inzwischen werden aus autologem Tumorgewebe verschiedener Gewebearten HSP90B1-Proteine isoliert und Patienten als Vakzine verabreicht. Diese Behandlungsstrategie findet breite Anwendung, z.B. beim malignen Melanom (Belli et al. 2002), beim kolorektalen Karzinom (Mazzaferro et al. 2003) sowie beim Nierenzellkarzinom (Cohen et al. 2002). Durch den bewiesenen Zusammenhang mit Tumorerkrankungen sowie den bereits ausreichend dokumentierten T-Zellstimulationen und dem Einsatz eines aus autologem Gewebe gewonnenen Tumorstoffes ist *VEKEFEPLL* ein neues tumorassoziiertes Peptid. Dieses Peptid ist damit ein weiterer, sehr attraktiver Kandidat für den Einsatz einer Peptid-basierten Immuntherapie beim Nierenzellkarzinom.

4.1.3 Autoantigene

4.1.3.1 Proteine des Zytoskeletts

SVYRTPVVNLK aus NEB

Das Quellprotein des neu sequenzierten Liganden *SVYRTPVVNLK* ist das Muskelprotein *Nebulin*. Nebulin ist ein Aktin-bindendes Protein und inseriert an der Z-Scheibe des Aktin-Myosinkomplexes (Witt et al. 2006). Für die Integrität des Sarkolemmes ist es unerlässlich, da es bei der Stabilität und Kontraktion quergestreifter Muskulatur mitwirkt. Allerdings ist die genaue Funktionsweise dieses Proteins noch weitgehend ungeklärt. Mutationen in diesem Gen sind die Ursache für die Muskelschwäche *Nemaline Myopathie*. Ob und wie *Nebulin* eine Rolle im Signalweg spielt, ist weitgehend unsicher. Die kleinere Isoform von *Nebulin* ist *Nebulette*, bei der als Fusionspartner das *Mixed Lineage Leukemia (MLL)*-Gen bereits beschrieben wurde (Cóser et al. 2010). Interessant ist, dass dieses Protein in der Probe RCC425 massiv überexprimiert war, was möglicherweise auf den sarkomatoiden Charakter zurückzuführen ist. Bei diesem histologischen Typ wachsen spindelige und proliferative Tumorzellen sarkomatig und aggressiv in ihre Umgebung ein. Vermutlich handelt es sich bei diesem sarkomatoiden Typ sogar um einen Typ mit vermehrt myosarkomatigem Charakter. Dies würde die massive Expression dieses Proteins erklären. Bei diesem Patienten ist dieses Peptid als tumorassoziiert anzusehen. Ein immuntherapeutischer Einsatz mit diesem Peptid sollte versucht werden, allerdings besteht die Gefahr, dass als Komplikation eine Muskelschwäche auftreten kann.

TEISSAEKVAL aus MAP4

Das neu gefundene *Microtubule-associated protein 4* ist ein Protein, das vom Gen MAP4 kodiert wird. Es gehört zur Familie der Mikrotubuli und kommt auf allen Geweben auf niedrigem Niveau vor. Nur in Zellen des ZNS ist es hoch konzentriert. Es handelt sich um ein nicht-neurales, konstitutiv aktives Mikrotubulus-assoziiertes Protein. MAP4 ist am Aufbau des mitotischen Spindelapparats beteiligt und dafür bekannt, dass es Mikrotubuli stabilisiert. Bei der Ausbildung des Spindelapparates kommt es zur Phosphorylierung der prolinreichen Regionen von MAP4 mit dem Komplex Cyklin B-CDC2 (*cell division cycle 2*). Allerdings ist diese Phosphorylierung kritisch, da sie die Ausbildung des Spindelapparates positiv oder negativ beeinflussen kann. Die negative Beeinflussung kann pharmakologisch zur Bekämpfung von Krebs positiv genutzt werden, da eine weitere Zellteilung ohne Spindelapparat nicht erfolgen kann (Kitazawa et al. 2000). MAP4 ist ein noch relativ jung entdecktes Protein, dem bei der Tumorgenese und der Aggressivität eine wichtige Rolle zugeschrieben wird, so auch beim oralen Plattenepithelkarzinom (Jensen et al. 2008) oder dem Mammakarzinom (McGrogan et al. 2008).

In den Zellen des großzelligen Lungenkarzinoms zeigt MAP4 eine stärkere Expression als im autologen Normalgewebe (Cucchiarelli et al. 2008). Ein direkter Zusammenhang mit zellulären Komponenten des Immunsystems in Verbindung mit Tumorerkrankungen konnte bisher nicht bewiesen werden. Es existieren lediglich Untersuchungen, bei denen es bei Beimpfung von Leberzellkulturen mit Plasmodien zur Stimulation von CTLs kam (Franke et al. 2000). Dies lässt vermuten, dass die von MHC-I-Molekülen präsentierten MAP4-Peptide zu einer Stimulation von T-Zellen führen könnten.

Aufgrund der Interaktion von MAP4 mit dem *Tumorproteinp53* (Grinkevich et al. 2009; Hait und Yang 2006), der starken mRNA-Überexpression in Verbindung mit der Identifizierung auf der Zelloberfläche und einer vermutlichen zellulären Abwehr kann das Peptid *TEISSAEKVAL* als tumorassoziiert angesehen werden. Es wäre somit ein neuer Kandidat für die Immuntherapie des Nierenzellkarzinoms.

TQRPVDIVF aus COL6A2 und GVAPFTIAR aus COL6A3

Diese Strukturproteine der genannten Liganden, *collagen, type VI, alpha 2* (COL6A2) und *collagen, type VI, alpha 3* (COL6A3), gehören zum Kollagentyp 4 der hauptsächlich in der extrazellulären Matrix des Bindegewebes als zweidimensionales Netzwerk vorkommt. Dieses Netzwerk verbindet Epithel- und Muskelzellen mit der extrazellulären Matrix und bildet im Nierenglomerulus die funktionell wichtige Filterstruktur. Mutationen in diesem Gen können zu benignen Nephropathien führen (Torra et al. 2004). Insgesamt konnte in der Literatur kein Hinweis auf maligne Tumorassoziationen gefunden werden. Einzig bei benignen, tendosynovialen Riesenzelltumoren ist seither eine Überexpression für COL6A3 beschrieben worden (Möller et al. 2008). COL6A2 wurde in der Literatur nur beim Plattenepithelkarzinom von Kopf und Hals als überexprimiert beschrieben (Vachani et al. 2007). Durch immunhistochemische Untersuchungen konnte weder beim klarzelligen noch beim sarkomatoiden Nierenzellkarzinom eine Überexpression für Kollagentyp 4 nachgewiesen werden (Delahunt et al. 2007). Dieser Befund stimmt mit dem Ergebnis der sarkomatoiden Probe RCC425 überein. Die Expressionswerte befanden sich hier innerhalb des Konfidenzintervalls. Die Probe RCC482 war auf mRNA-Ebene überexprimiert und widerspricht somit den Ergebnissen der Literatur. Die Peptide können daher nicht als tumorassoziiert angesehen werden.

REYQDLLNVKM, LEQQNKILL, RPSTSRSL und EEIAFLKKL, aus VIM

Diese Liganden wurden aus dem Protein *Vimentin* sequenziert, wobei die zwei Liganden *REYQDLLNVKM* und *LEQQNKILL* neu sequenziert wurden. *RPSTSRSL* und *EEIAFLKKL* waren bereits bekannt. Von diesen Beiden wurde der MHC-Ligand *EEIAFLKKL* am Interfakultären Zentrum für Zellbiologie der Universität Tübingen (IFIZ) bereits mehrfach in verschiedenen soliden Nierenzellkarzinomen identifiziert. Auch bei diesen Untersuchungen war das zugehörige Quellprotein in vergleichenden Genexpressionsanalysen überexprimiert (Krüger et al. 2005). *Vimentin* gehört wie NEB und MAP4 zu den Autoantigenen des Zytoskeletts. Als ubiquitäres und intermediäres Filament sorgt es für die Stabilität der Zellorganellen. Es ist schon lange

bekannt, dass die Expression dieses Proteins häufig beim klarzelligen Nierenzellkarzinom vorkommt und signifikant mit einer schlechten Prognose assoziiert ist, unabhängig von Grade & Stage (Moch et al. 1999). Die Ergebnisse von Moch et al. von 1999 wurden inzwischen auch durch Expressionsanalysen auf DNA-Ebene bestätigt (Shi et al. 2005). VIM wird deshalb auch als immunhistochemischer Marker in der Pathologie eingesetzt. Diese Ergebnisse spiegeln sich in unseren hiesigen Genexpressionsdaten wider. Insgesamt war dieses Protein in vier soliden Nierenzellkarzinomen überexprimiert. Auffallend hohe Werte fanden sich in der Probe RCC425 mit dem sarkomatoiden Charakter und sind am ehesten auf die spindelförmigen, proliferativ wachsende Tumorzellen zurückzuführen.

Zusammenfassend lässt sich für die o.g. Proteine des Zytoskeletts darstellen, dass die Probe des Patienten RCC425 massiv exprimierte Strukturproteine aufwies, die mit dem histologischen Charakter des Nierenzellkarzinoms zu erklären sind. Bis auf COL6A2 und COL6A3 stellen sich obige Strukturproteine als tumorassoziiert dar. Wegen des extrem aggressiven Tumorverhaltens beim sarkomatoiden Nierenzellkarzinom könnte der Ligand *SVYRTPVVNLK* des Peptids *Nebulin* als Kandidat für eine Immuntherapie eingesetzt werden. MAP4 eignet sich wegen der Interaktion mit p53 für ein immuntherapeutisches Vorgehen. Jedoch sollten vor einem Einsatz beide antigenen Peptide auf eine T-Zellstimulation geprüft werden.

Im Folgenden werden weitere Autoantigene des Zytoskeletts diskutiert.

ILNPDNSFEIL aus CANX

Der bekannte HLA-Ligand *ILNPDNSFEIL* gehört zu *Calnexin*, einem membrangebundenen Protein des ER, das in APM (*antigen-processing machinery*) eingebettet ist. Eine der Hauptfunktionen dieses Chaperons besteht in der Faltung der α -Kette von MHC-I-Molekülen in Membranen des ER, ohne die keine stabile Antigenpräsentation stattfinden kann. Es ist in allen kernhaltigen Zellen vertreten. Aufgrund von *tumor-escape*-Mechanismen besteht bei vielen soliden Tumoren eine eingeschränkte Funktion von APM. Dieser Mechanismus dient dem Selbstschutz der Tumorzellen vor CTLs und wurde bei vielen malignen Neoplasien beschrieben (Meissner et al. 2005; Belicha-Villanueva et al. 2010; Cathro et al. 2010). Erst wenn das Zellwachstum schon weit fortgeschritten ist, kommt es durch Einfluss von IFN- γ zur Hochregulation der APM (Seliger et al. 2000). Somit kann Calnexin nicht als tumorassoziiertes Antigen angesehen werden.

ETIPLTAEKL aus CCND1

Das Gen, das dieses Protein kodiert, heißt CCND1 und kodiert für *Cyclin D1*. Das HLA-A*68 präsentierte Peptid *ETIPLTAEKL* von Cyclin D1 wurde bereits als etabliertes Tumorantigen des Nierenzellkarzinoms sequenziert (Weinschenk et al. 2002) und seit einiger Zeit in der Immuntherapie eingesetzt (Stenzl et al. 2007; Reinhardt et al. 2010). Es gehört zu einer Proteingruppe, die eine Schlüsselrolle in der Steuerung des Zellzyklus am Übergang der G1/S-Phase durch Regulation von CDK-Kinasen spielt.

Cyclin D hat die Eigenschaft, das Tumorsuppressorgen Retinoblastomprotein Rb zu inaktivieren, wodurch der mitogene Transkriptionsfaktor E2F freigesetzt wird (Müller et al. 1994; Ramana et al. 2010). Mutationen, Amplifikationen und Überexpressionen, die den Zellzyklus ändern, wurden in vielen soliden Tumoren nachgewiesen. So wurde Cyclin D1 auch im Nierenzellkarzinom nachgewiesen (Hedberg et al. 1999). Aufgrund der Überexpression von CCND1, der Interaktion mit Rb sowie dem nachgewiesenen Vorkommen in Tumoren kann dieses Protein als tumorassoziiert angesehen werden.

ALASHLIEA aus EHD2

Das Protein dieses bekannten Liganden ist *EH-domain containing 2*. Es steht mit Aktin in gegenseitiger Wechselwirkung. Durch eine Verbindung mit Aktin führt EHD2 zur Clathrin-abhängigen Endozytose und spielt dadurch eine Rolle im Membrantransport. Starke Expressionen befinden sich in der Herzmuskulatur, moderate in Plazenta, Lunge und Skelettmuskelgewebe. Nachweise über eine involvierte Tumorgenese bestehen nur für das Glioblastom und das Ovarialkarzinom (Quinn et al. 2009). Hinweise über T-Zellreaktionen bestehen nicht. Ein Polymorphismus dieses Gens konnte seither nur beim Oligodendrogliom beschrieben werden (Yang P et al. 2005).

TQRPVDIVF aus ITGAX

Dieses Peptid konnte dem Protein ITGAX zugeordnet werden, das von dem Gen *Integrin alpha-X* kodiert wird. Innerhalb der gleichen Probe RCC482 konnte diesem Protein außerdem das Protein COL6A2 zugeordnet werden (s.o.). Dieses Transmembranprotein ist ein Leukozyten-Adhäsionsprotein und bildet zusammen mit Integrin beta 2 einen Komplex. Als Komplex vermittelt dieses Protein Zell-Zell-Wechselwirkungen bei Entzündungsprozessen und ist daher bei der Monozytenadhäsion und der Chemotaxis besonders wichtig. Die höchsten relativen Expressionswerte befinden sich deshalb in Mono- und Granulozyten. Eine Überexpression dieses Proteins in soliden Tumoren wird in der Literatur nicht gesehen, allerdings findet sich in der Literatur sehr häufig ITGAX als Antwort auf die in Neoplasien stattfindenden Entzündungsreaktionen. Dies ist nicht verwunderlich, da bei der Tumorgenese durch ablaufende Gewebshypoxien Nekrosen auftreten können, die in der Folge zu Entzündungsreaktionen führen, bei denen Gewebs- und Plasmamakrophagen involviert sind. Daher kann dieses Peptid als nicht tumorassoziiert angesehen werden.

4.1.3.2 Proteine des Fettstoffwechsels

KSELLVEQY, MTSALPIQK, MAGDIYSVFR, IARNLTQQL aus PLIN2

Aus PLIN2 konnten insgesamt vier Peptide sequenziert werden. PLIN2 wird kodiert vom *Peripilin-2*-Gen auch bekannt als *lipid droplet-associated protein* oder *Adipophilin* und ist die neue Bezeichnung für ADFP bzw. ADRP (*Adipose differentiation-related protein*). Von diesen vier Peptiden konnte das Peptid *KSELLVEQY* als neues Peptid dem HLA-Allotyp A*01 zugeordnet werden. PLIN2 ist ein Differenzierungsprotein der Adipozyten und wird daher in Fettgewebszellen hoch exprimiert. In weiteren verschiedenen Zelltypen wird dieses Protein unterschiedlich exprimiert, darunter befinden sich Epithelzellen laktierender Drüsen, Zellen der Nebennierenrinde, Sertoli- und Leydigzwischenzellen sowie Hepatozyten bei alkoholischer Leberzirrhose (Yao et al. 2007). Pathophysiologisch zählt *Peripilin* zu den Hypoxie-induzierbaren Genen. Die Aktivierung der *Peripilin*-Transkription wird durch HIF (*hypoxia-inducible factor*) vermittelt (Saarikoski et al. 2002). Dieses Protein zählt zu den überpräsentierten TAAs (Novellino et al. 2005; siehe auch unter Kapitel 1.3). Die bekannten Peptide *SVASTITGV* und *SLLTSSKGQLQK*, die schon vor längerer Zeit am IFIZ in soliden Nierenzellkarzinomen identifiziert wurden (Krüger et al. 2005), konnten in dieser Arbeit allerdings nicht identifiziert werden. Für den HLA-A*02 Ligand *SVASTITGV* konnte nachgewiesen werden, dass es als immunogenes T-Zell-Epitop wirkt und dass T-Zellen eine Tumorzelllyse bewirken können (Schmidt et al. 2004). In Vakzinierungsstudien zur Bekämpfung des Nierenzellkarzinoms wird PLIN2 schon seit längerer Zeit eingesetzt (Stenzl et al. 2007; Reinhardt et al. 2010).

Bereits im frühen Erkrankungsstadium des klarzelligen Nierenzellkarzinoms zeigte PLIN2 eine Überexpression auf Proteom und Genom-Ebene (Weinschenk et al. 2002; Schultz et al. 2002; Pomara et al. 2008). Die Höhe der PLIN2-Expression auf Transkriptions- und Protein-Ebene gilt seit neueren Untersuchungen ausschlaggebend für die Prognose beim Nierenzellkarzinom und dient deshalb seit kurzem als molekularer Expressionsmarker beim Nierenzellkarzinom (Yao et al. 2007). Für den Einsatz in der Peptid-basierten Immuntherapie waren einerseits hohe Expressionswerte von PLIN2 und häufiges Vorkommen von *Peripilin*-Peptiden auf Tumorzellen des klarzelligen Nierenzellkarzinoms sowie die nachgewiesene Immunogenität dieser Peptide ausschlaggebend. Sollte der neu identifizierte HLA-A*01 Ligand *KSELLVEQY* von PLIN2 positive T-Zell-Reaktionen aufweisen, so wäre er ein neuer attraktiver Kandidat in der Vakzinierungstherapie beim Nierenzellkarzinom.

ALADGVQKV aus APOL1

APOL1 ist ein Protein, das von dem Gen *Apolipoprotein 1* reguliert wird. Es gehört zu den *High Density Lipoproteinen* (HDL), die im wesentlichen im Dünndarm und der Leber produziert und ins Plasma sezerniert werden. Hohe Expressionswerte befinden sich im Endothel von Lunge, moderate in Pankreas, Prostata, Milz und den Blutgefäßen.

Der HLA-A*02-restringierte Ligand *ALADGVQKV* ist als tumor-assoziiertes Peptid des Nierenzellkarzinoms bekannt. *APOL1* ist als Lipoprotein in oxidative Prozesse wie z.B. Entzündungen involviert (Duchateau et al. 2001). Ein pathogener Zusammenhang mit Tumorerkrankungen *via* Literatur konnte nicht eruiert werden. Trotzdem wurden an der Universität Tübingen verschiedene Peptide dieses Proteins auf mehreren klarzelligen Nierenzellkarzinomen identifiziert (Peptiddatenbank des IFIZ: www.elchtools.de). Auf mRNA-Ebene war zu diesen Peptiden eine deutliche Überexpression vorhanden. Auch in dieser Gewebeprobe eines soliden klarzelligen Nierenkarzinoms (RCC421 T) konnte für *APOL1* eine sehr hohe Überexpression von + 5,2 bei einem Konfidenzintervall von $\pm 1,5$ bestimmt werden. Dies lässt darauf schließen, dass dieses Protein vom Tumorgewebe exprimiert wird. Ein genauer Zusammenhang zwischen Expression und Tumor müsste noch weiter erforscht werden. Allerdings ist auch nicht auszuschließen, dass es sich bei der Expression um Proteine, respektive Peptide handelt, die aus dem Blutgefäßsystem gewonnen wurden. Daten zur Immunogenität fehlen, weshalb bei diesem Peptid Studien über eine Eignung als T-Zell-Epitop durchgeführt werden sollten.

EVAEKINAF und SDIVAHLL aus APOB

Diese beiden neu identifizierten HLA-Liganden (*EVAEKINAF* HLA-A*26-restringiert (RCC431); *SDIVAHLL* HLA-B*37-restringiert (RCC417)) konnten dem Protein *Apolipoprotein B* zugeordnet werden. Dieses Protein kommt im Blutplasma in zwei Isoformen, ApoB-48 und ApoB-100, vor. Ersteres wird im Dünndarm synthetisiert, ApoB-100 in der Leber. Der wesentliche Unterschied beider Isoformen besteht darin, dass ApoB-48 als Membranmolekül in den Chylomikronen eingelagert ist, ApoB-100 jedoch als LDL (*Low Density Lipoprotein*) vorkommt. Auch hier fehlt ein expliziter pathogener Zusammenhang mit Tumorerkrankungen. Die wenigen diskutierten malignen Neoplasien beziehen sich vorwiegend auf das Gallenblasenkarzinom (Pandey et al. 2007). Daten zu Immunreaktionen stehen bei diesem Protein überwiegend mit Artherosklerose in Zusammenhang. Obwohl beide Gene hohe Expressionswerte erreichten, sind die Ergebnisse kritisch zu werten.

4.1.3.3 Proteine des grundlegenden Zellstoffwechsels

NPVDWKEY und REFIAPVTL aus PLOD2

Die beiden neu detektierten Sequenzen *NPVDWKEY* und *REFIAPVTL* konnten dem neu identifizierten Protein *PLOD2* / *LH2* zugeordnet werden, das von *Procollagen-llysine, 2 oxoglutarate 5-dioxygenase 2* bzw. *Lysyl hydroxylase 2* (*LH2*) kodiert wird. Es ist ein membrangebundenes Enzym des ER, das die Hydroxylierung von Lysylresten in kollagenähnlichen Peptiden zu Hydroxylysinen katalysiert. Diese Hydroxylysine dienen als Bindungsstellen von Kohlenhydraten in Kollagen und sind entscheidend für die Stabilität der intermolekularen Quervernetzungen beim Aufbau von Kollagen. *LH2* ist vor allem in Fibroblasten der Haut, der Lunge, der Dura mater und der Aorta exprimiert (Yeowell und Walker 1999). Im Nierengewebe ist *LH2* nur niedrig exprimiert (Walker et al. 2005). Mutationen dieses Gens wurden bis jetzt nur bei benignen

fibrotischen Erkrankungen beschrieben. Überexpressionen bei malignen Erkrankungen sowie Immunreaktionen gegen dieses Enzym wurden seither nicht veröffentlicht. Da keine Daten über maligne Erkrankungen existieren und die Enzyme in jeder Zelle vorkommen können, diese Peptide nicht als tumorassoziiert angesehen werden.

NLNVTEEKY aus SOD2

NLNVTEEKY wird von dem Gen *superoxide dismutase 2, mitochondrial* kodiert. Dieses hochinteressante, in den Mitochondrien vorkommende Enzym zerstört intrazelluläre, toxisch wirkende Sauerstoffradikale durch Bindung eines Mangan-Ions pro Untereinheit. Es wurde nebst Peptid am IFIZ identifiziert. Mutationen in der SOD2-Promotor-Region bilden die molekulare Grundlage für die Expression der Mangan-Superoxiddismutase in Krebszellen. So ist bekannt, dass in neoplastisch transformierten Zellen die MnSOD in einem niedrigen Grad exprimiert, in aggressiven Tumoren jedoch überexprimiert ist (Oberley und Buettner 1979). Die Ursache dafür liegt in einer Interaktion von NF- κ B und NPM1, wobei sich beide letztgenannten Proteine gegenseitig beeinflussen. Eine Aktivierung von NF- κ B führt zur Expression von MnSOD, eine Inaktivierung zu einer Herunterregulierung von MnSOD. Die Antwort auf oxidativen Stress wird zudem durch viele Zytokine beeinflusst (Xu et al. 2008). Nach heutigem Stand bestehen für viele maligne Neoplasien Daten für die Bedeutung der Mn-Superoxiddismutase in der Tumorgenese, jedoch nicht explizit für das Nierenzellkarzinom. Zudem existieren keine Angaben über Immunreaktionen, die in direktem Zusammenhang mit T-Zellstimulationen stehen. Trotzdem kann es als neues tumorassoziiertes Peptid angesehen werden. Als Kandidat für eine Immuntherapie kommt es allerdings nicht in Frage, da es in allen Körperzellen vorhanden ist.

YSDLNTQRPHY und YSDLNTQRPY aus TYROBP

Der von dem *protein tyrosine kinase binding protein* stammende neue HLA-restringierte Ligand *YSDLNTQRPHY* stammt aus transmembranen Signalpolypeptiden, die an ihrer zytoplasmatischen Seite ITAMs (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) aufweisen. Sie stehen in Verbindung mit KIR (*killer-cell inhibitory receptor*) und spielen außer in der Signaltransduktion weitere wichtige vielfältige Rollen bei Prozessen, die bei Entzündungen ablaufen sowie bei der Knochenentwicklung und der Myelinisierung des Gehirns. In myeloischen Zellen ist dieses Gen hochexprimiert. TYROBP steht oft mit malignen Neoplasien von myeloischen Zellen in Verbindung, bei denen auch CD8-positive Immunreaktionen stattfinden. Ein Zusammenhang zum Nierenzellkarzinom konnte jedoch nicht hergestellt werden.

EVIPYTPAM aus HMOX1

Dieses Protein, das von dem Gen *heme oxygenase* kodiert wird, ist ein antioxydatives, antiinflammatorisches und zytoprotektives Enzym, das Häm zu Eisen, Biliverdin und Kohlenmonoxid oxidiert und abbaut. Seine vielfältige Rolle wird zudem auch in der Signaltransduktion über wichtige Stimuli wie Wachstumsfaktoren (TGF- β , PDGF, VEGF, SDF-1) sowie durch Gewebshypoxie und oxidativen Stress beeinflusst. In zahlreichen soliden Tumoren konnte mittlerweile eine Beziehung zwischen dem Verhalten neoplastischer Zellen und der Änderung des Expressionsverhaltens von *Heme oxygenase* bewiesen werden (Tauber et al. 2010). Das ist nicht verwunderlich. Eine Zunahme neoplastischer Zellen führt zunächst zur Gewebshypoxie. Als Antwort auf diesen oxidativen Stress kommt es zur Aktivierung von Wachstumsfaktoren der Gefäße mit anschließender Neoangiogenese. Mit der daraus resultierenden Nährstoffversorgung sowie weiteren Wachstumsfaktoren kommt es schließlich zur weiteren Zellvermehrung. Aufgrund der Anwesenheit dieses Proteins in allen Körperzellen kann trotz dieser wichtigen Pathomechanismen dieses Enzym nicht in der Immuntherapie eingesetzt werden.

Weitere überexprimierte Autoantigene, deren Peptide verschiedenen Enzymklassen zugeordnet werden konnten, wurden im Rahmen dieser Arbeit als neue oder bereits bekannte HLA-Liganden identifiziert. Darunter befand sich die *Aldolase* (ALDOA), die bereits schon bei früheren Untersuchungen des Nierenzellkarzinoms aufgefallen war und deren zwei identifizierte Peptide bereits bekannt waren (Weinschenkt et al. 2002; Krüger et al. 2005) sowie das Enzym ALOX5 (*arachidonate 5-lipoxygenase*), dessen HLA-Ligand neu sequenziert wurde. Weitere Peptide konnten den Enzymen DPYD, POLR2E, LPCAT1, SERPINA1, und PSMB8⁵ zugeordnet werden, von denen das Enzym LPCAT1 neu identifiziert wurde. Alle diese Proteine können, obwohl sie überexprimiert und teilweise mit Tumorerkrankungen in Verbindung stehen, nicht als tumorassoziierte Antigene des Nierenzellkarzinoms angesehen werden. Trotzdem sind sie durch ihre grundlegende Funktion im Zellstoffwechsel Teil eines neoplastischen Expressionsmusters, das auf ein verändertes Mikroökosystem neoplastischer Zellwucherungen zurückzuführen ist. Daraus erklärt sich auch ihre Peptid-Sequenzierung und die Überexpression auf mRNA-Ebene.

⁵ DPYD (dihydropyrimidine dehydrogenase)
 POLR2E (polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide E, 25 kDa)
 LPCAT1 (lysophosphatidylcholine acyltransferase 1)
 SERPINA1 (serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1)
 PSMB8 (proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 8 (large multifunctional peptidase 7))

4.1.4 Proteine des Blutplasmas

EVIASYAHL aus VWF

EVIASYAHL aus dem Protein VWF wird von dem Gen van Willebrand-Faktor kodiert und spielt als Glykoprotein in der Blutgerinnung eine sehr wichtige Rolle. VWF wird von den Endothelzellen gebildet, weshalb in diesen Zellen hohe Expressionswerte zu finden sind. Ferner wird es auch in den α -Granula von Thrombozyten exprimiert. Als Träger des Antihämophilen Faktors und als Vermittler zwischen Thrombozyten und der Blutgefäßwand nimmt es eine Doppelfunktion ein. Seine wichtigste Funktion bezüglich neoplastischer Zellen dürfte wohl in der Interaktion von Tumorzellen mit Thrombozyten und der Gefäßwand bestehen, was zur Extravasation von Tumorzellen führt (Terraube et al. 2007; Shavit und Motto 2006). Es beeinflusst somit eine frühe Tumorausbreitung. In den letzten Jahren wurde der van Willebrand-Faktor vermehrt im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen diskutiert. So konnte unter Einfluss des VWF eine Progression von Endothelzellen des Kolon-, Lungen-, Mamma- und Leberkarzinoms sowie von Kopf- und Halstumoren belegt werden, um nur einige zu nennen (Ahmed und Mohammed 2010; Sweeney et al. 1990). Unter anderem besteht auch ein Zusammenhang zwischen VWF-Serum-Werten und der Prognose einer Karzinomerkkrankung (Gil-Bazo et al. 2003). In einer weiteren Studie konnten Zusammenhänge zwischen hohen VWF-Serum-Werten mit verschiedenen malignen Entartungen erbracht werden, die vermutlich durch gesteigerte endotheliale Zellschäden zustande kommen (Röhsig et al. 2001). Ein direkter Zusammenhang mit zellulären Komponenten des Immunsystems in Verbindung mit Tumorerkrankungen konnte bisher nicht ermittelt werden. Aufgrund des Zusammenhanges mit tumorösen Erkrankungen sowie des hohen ermittelten Expressionswertes [+ 5,6; KI + 1,7 / -1,9 (RCC431)] könnte der VWF ein weiteres hochinteressantes tumorassoziertes Protein darstellen. Allerdings fehlen hierzu noch Angaben, die auf direkte Immunreaktionen hinweisen. Selbst wenn in den nächsten Jahren positive T-Zellstimulationen nachgewiesen werden sollten, wäre ein Einsatz von VWF-Peptiden in der Immuntherapie kontraindiziert, da durch die Doppelfunktion des VWF die Gefahr der Hemmung des Antihämophilen Faktors zu groß ist.

VTIPPKSSL, YSIITPNILRL aus C3

Diese HLA-Liganden konnten dem Quellprotein *complement component 3* zugeordnet werden. C3 spielt eine zentrale Rolle bei der Aktivierung des Komplementsystems. Die Aktivierung des Komplementsystems kann im klassischen und im alternativen Komplementsignalweg stattfinden. Für C3 konnte in der Probe RCC482 ein neuer HLA-Ligand, *VTIPPKSSL*, ermittelt werden. Zu *YSIITPNILRL* als bekanntem Peptid konnte in der Probe RCC468 keine HLA-Zuordnung erbracht werden. In diesen zwei Gewebeproben war dieses Protein stark exprimiert. Da es sich bei C3 um ein Protein handelt, das ausschließlich im Plasma vorkommt, dürften die hohen mRNA-Expressionswerte auf die bei Tumorerkrankungen assoziierten

Entzündungsreaktionen sowie auf die Bildung von Nekrosen zurückzuführen sein. Demzufolge handelt sich hier also nicht um ein tumorassoziertes Antigen.

LVVYPWTQR aus Hämoglobin-β bis Hämoglobin-γ

Das Quellprotein, das diesen Liganden liefert, ist Hämoglobin-β bis Hämoglobin-γ und gehört zur sauerstofftransportierenden Globin-Familie. Hämoglobin-β ist zusammen mit Hämoglobin-α die am häufigsten vorkommende Hämoglobinform. Verschiedene Längenvarianten des Peptids *LVVYPWTQR* wurden in mehreren der sieben untersuchten Proben detektiert, allerdings war das Gen nur in einer Gewebeprobe überexprimiert. Ein HLA-Allotyp zu diesem Liganden konnte in keiner der untersuchten Proben zugeordnet werden. In vielen weiteren Gewebeproben wurde dieser Ligand in verschiedenen Längenvarianten am IFIZ bereits sequenziert (Krüger et al. 2005). Da dieses Peptid in verschiedenen Längenvarianten vorkommt und in nahezu jeder Gewebeprobe mit den unterschiedlichsten HLA-Allotypen zu finden ist, gilt es als Artefakt. Als tumorassoziertes Antigen kann dieser Ligand nicht angesehen werden, da es mit hoher Wahrscheinlichkeit aus dem Blut der Blutgefäße der Tumormproben stammt.

APRTVALTAL aus MHC-DBP1 und LQNADPLKV aus CD74

Diese Liganden gehören zur MHC-Klasse-II-Familie. Im Gegensatz zur Präsentation von MHC-Klasse-I-Molekülen werden Peptide, die mit Hilfe von MHC-Klasse-II-Molekülen auf Zelloberflächen präsentiert werden, über den vesikulären Stoffwechsel auf die Zelloberflächen transportiert. Dies bedeutet, dass überwiegend extrazelluläre Proteine meist *via* Endozytose ins Zellinnere gelangen, bevor deren Peptide auf Zelloberflächen präsentiert werden. Maligne Neoplasien, die mit einer MHC-Klasse-II-Expression einhergehen, sind selten. Häufig werden Autoimmunerkrankungen sowie chronische Entzündungsprozesse nachgewiesen (Malviya et al. 2010). In nur einer Studie konnten MHC-Klasse-II-Moleküle bei verschiedenen soliden Tumoren sowie beim Nierenzellkarzinom nachgewiesen werden, die jedoch vermutlich auf eine durch IFN-γ induzierte MHC-Klasse-II-Expression zurück zu führen sind (Dengjel et al. 2006).

4.2 Unterexprimierte Proteine

4.2.1 Proteine der Signaltransduktion

IEVDGKQVEL aus RHOA

Das Protein dieses Liganden zählt wie RSU1 (siehe unter 4.1.1) zur RAS-Superfamilie und gilt als Schlüsselprotein bei der Regulation des Aktin-Zytoskeletts. Die Funktionsweise dieses Quellproteins wurde unter 4.1.1 ausführlich beschrieben. Beide, Protein und Ligand, sind bereits bekannt. Es wird hier nur deshalb erwähnt, weil es als Suppressorgen stark unterexprimiert ist [- 3,3; KI, KI + 1,9 / -1,7 (RCC425)]. Diese

starke Unterexpression ist Ausdruck dafür, dass RHOA in seiner Funktionsweise blockiert wurde. Fällt die supprimierende Wirkung eines Suppressorgens im Zellzyklus weg, kann folglich ein ungebremses Zellwachstum stattfinden. Dies lässt darauf schließen, dass auf molekularer Ebene Zellen so transformiert wurden, dass in der Tumorgewebeprobe RCC425 eine geringere Intensität gemessen wurde als im entsprechenden Normalgewebe.

Die Unterexpression der Genexpressionsanalysen zeigt, dass zwar die mit Hilfe der massenspektrometrischen Analysen ermittelten HLA-Liganden auf soliden Nierenzellkarzinomen vorhanden waren, die mRNA-Expression jedoch geringer war als in vergleichbarem korrespondierendem gesundem Nierengewebe. Aus diesem Ergebnis lässt sich interpretieren, dass viele der im gesunden Gewebe vorkommenden Proteine in den maligne transformierten Zellen zugrunde gegangen sind. Die meisten der herunterregulierten Proteine betrafen die Gewebeprobe RCC425, deren histologische Klassifikation ein sarkomatoides Nierenzellkarzinom war. Hier kann der Schluss gezogen werden, dass sämtliche Zellfunktionen des Tumorgewebes wie Zellstoffwechsel, Signaltransduktion, Abbau des Zytoskeletts sowie Zell-Zell-Interaktionen nicht mehr stattgefunden haben.

4.3 Peptid-Paar

Bei der Identifizierung von Peptid-Paaren konnte nur ein Peptid-Paar mit differenzieller Expression nachgewiesen werden. Es war das Protein RAC2 mit dem HLA-Liganden *DEAIRAVL*. RAC2 wird von *ras-related C3 botulinum toxin substrate 2* reguliert und ist eine GTPase, die zur Ras-Superfamilie der kleinen G-bindenden Proteine zählt. Damit liegen seine wichtigsten Funktionen in der Zellkontrolle, im Zellwachstum, der Reorganisation des Zytoskeletts und der Aktivierung von Kinasen. Mutationen in diesem Gen, die zu malignen Tumorerkrankungen führen können, beziehen sich auf Gehirntumoren (Hwang et al. 2005). Als konstitutiv aktives Protein ist RAC2 mit verschiedenen bösartigen zellproliferativen Erkrankungen assoziiert wie z.B. dem Fibrosarkom (Niggli et al. 2009) oder mit hämatopoetischen Erkrankungen (Meacham et al. 2009). Beim Prostatakarzinom wurde ein Anstieg der RAC-Expression im Tumorgewebe als prognostischer Marker beschrieben (Engers et al. 2007). Desweiteren spielt RAC2 als Protoonkogen in der T-Zell-Entwicklung eine wesentliche Rolle (Guo et al. 2008). Alle diese dokumentierten Daten zeigen, dass RAC2 als Protoonkogen eine wichtige Rolle in der Entstehung maligner Zellproliferationen spielt. Da aber für diesen Liganden kein HLA-Allotyp zur bekannten Typisierung des Patienten zugeordnet werden konnte, würde aufgrund dessen eine Vakzinierung mit diesem Peptid ausscheiden.

4.4 Endbeurteilung

Durch die vergleichenden Genexpressionsanalysen sollte gezeigt werden, in welcher Stärke die Quellproteine der mit Hilfe massenspektrometrischer Analysen ermittelten Peptide auf mRNA-Ebene exprimiert wurden. Proteine, die mit dieser Methode nicht oder nur mit geringen Signalintensitäten erfasst wurden, konnten zum Zeitpunkt der Untersuchung vielfältigen Mechanismen unterworfen sein. Da Zellen einem ständigen Fluss lebhafter Auf- und Abbauvorgänge unterworfen sind, ist die Detektion der mRNA sowie die Ausbeute der an Zelloberflächen präsentierten Antigene abhängig von der Protein- bzw. der Peptidsynthese, von der enzymatischen Aktivität und von der Halbwertszeit vorhandener Proteine. Die Quellproteine vieler sequenzierter HLA-Liganden zeigten in den *GeneChip*-Analysen eine deutliche Überexpression. Dies bedeutet eine mögliche Erkennung der immunogenen Peptide durch das Immunsystem und gleichzeitig die Möglichkeit eines immuntherapeutischen Eingreifens in der Therapie des Nierenzellkarzinoms für diese Liganden.

Bei den beschriebenen Untersuchungsmethoden gelangen ganze Gewebeproben zur Untersuchung. Daher wurden auch anhaftende Strukturen wie Fett-, Nerven- und Bindegewebe, Gefäßendothel und Zellen des hämatopoetischen Systems mit erfasst. Es ist somit nicht auszuschließen, dass ein bestimmter Anteil der ermittelten Peptide nicht nur vom Tumorgewebe stammt. Dies macht die Beurteilung einiger Peptide schwierig. Es ist ferner nicht auszuschließen, dass beispielsweise der VWF aus noch gesundem Gefäßendothel stammt. Andererseits wird in den letzten Jahren VWF eine große Rolle bei der Entstehung von Metastasen zugeschrieben. Da dieses Protein sehr hohe Expressionswerte aufwies ist davon auszugehen, dass VWF aus der Neovaskularisation des Tumors detektiert werden konnte. Ähnlich verhält es sich mit DOK4. Laut Gérard et al. (2009) ist DOK4 auch in ruhenden T-Zellen exprimiert. Demnach könnte dieses Protein aus T-Zellen und nicht aus dem Tumorgewebe stammen. Da es sich bei diesem Protein zudem um ein noch nicht lange entdecktes Protein handelt bleibt abzuwarten, ob DOK4 künftig öfter diagnostiziert werden kann. Sollte dies der Fall sein, wäre DOK4 ein weiterer möglicher Impfkandidat.

Im Gesamtergebnis konnte anhand der Unterexpressionen dargestellt werden, dass zwar die mittels massenspektrometrischer Analysen ermittelten HLA-Liganden auf soliden Nierenzellkarzinomen vorhanden waren, die mRNA-Expression jedoch geringer war als in vergleichbarem korrespondierendem gesundem Nierengewebe. Aus diesem Ergebnis lässt sich interpretieren, dass viele im gesunden Gewebe vorkommende Proteine in den maligne transformierten Zellen zugrunde gegangen sind. Die meisten der herunterregulierten Proteine betrafen die Gewebeprobe RCC425, bei der es sich gemäß histologischer Klassifikation um ein sarkomatoides Nierenzellkarzinom handelte. Hier kann der Schluss gezogen werden, dass sämtliche Zellfunktionen des Tumorgewebes wie Zellstoffwechsel, Signaltransduktion, Abbau des Zytoskeletts sowie Zell-Zell-Interaktionen nicht mehr statt gefunden haben.

Besonders bemerkenswert bei dieser Probe war zudem, dass trotz der großen Tumormasse (siehe unter 3.1 Tabelle 9) nur wenige Proteine differentiell exprimiert waren. Diese Proteine waren massiv hochreguliert und betrafen vornehmlich die Proteine des Zytoskeletts wie MAP4, NEB und VIM. Bei den klarzelligen Nierenzellkarzinomen hingegen wurde eine bunte Mischung hochregulierter Proteine ermittelt.

Charakterisierung des HLA-Klasse-I Ligandoms in Primärtumoren beim humanen Nierenzellkarzinom

Zusammenfassung

Entscheidend für die Erkennung maligner Zellen durch T-Zellen des Immunsystems sind tumorassoziierte HLA-präsentierte Peptide, da das Immunsystem im Prinzip die Fähigkeit besitzt bösartige Zellen zu erkennen und zu eliminieren. Gelingt es, diese Fähigkeit mit einer Impfung gezielt anzuregen und zu nutzen, kann eine Peptid-basierte Immuntherapie ein effizientes Verfahren zur Behandlung des Nierenkrebses darstellen. Ziel dieser Arbeit war es, durch massenspektrometrische Untersuchungen HLA-Klasse-I Ligandome von maligne transformierten Zellen des soliden Nierenzellkarzinoms zu identifizieren und mit Hilfe vergleichender Genexpressionsanalysen diejenigen Gene respektive Proteine zu identifizieren, die aufgrund ihres Expressionsmusters als tumorassoziiert angesehen werden können.

Ferner war es Ziel, die individualtypischen tumorassoziierten Peptide eines jeden einzelnen Patienten aufzuarbeiten, um individuell auf Patienten zugeschnittene Tumorstoffe herstellen zu können (*from bench to bedside*). In den sieben untersuchten soliden Nierenzellkarzinomen wurden insgesamt 318 verschiedene Peptidsequenzen identifiziert. Bei 58 dieser Peptide zeigten die zugehörigen Quellproteine in den vergleichenden Genexpressionsanalysen eine signifikante Überexpression. Einige dieser Peptide konnten Quellproteinen zugeordnet werden, die mit der Tumorgenese in Verbindung gebracht werden oder die bereits Zielmoleküle der klinischen Forschung darstellen (BHLHE41, PRUNE2, MAP4, RSU1, NEB, DOK4, PLIN2, HSP90B1). Diese aus HLA-Liganden abgeleiteten Tumorantigene stellen potentielle T-Zellepitope für eine Peptid-basierte Immuntherapie dar.

Zu den Liganden dieser neu identifizierten Quellproteinen zählen beispielsweise der Ligand *GQVEIVTKV* mit dem HLA-Allotyp B*13 aus *prune homolog 2 (Drosophila)* (PRUNE2) und der Ligand *FSDIVKQGY* mit dem HLA-Allotyp A*01 aus *docking protein 4* (DOK4). Der neue Ligand *KSELLVEQY* mit dem HLA-Allotyp A*01 hingegen gehört zu einem bereits bekannten Quellprotein.

Characterization of the HLA-class-I Ligandom in Primary Tumors of the Human Renal Cell Carcinoma

Summary

For the recognition of malignant cells by T cells of the immune system tumor-associated HLA-presented peptides are crucial, because the immune system has the ability to recognize and to eliminate such malignant cells. If it is successful to stimulate the immune system by vaccination, a peptide based immune therapy can be an efficient treatment in the therapy of RCC. The aim of this study was to identify HLA-class-I restricted peptides from *malignant / transformed* cells of solid RCC *via* mass spectrometry analysis. With additional analysis of gene expression those proteins should be identified which are tumor associated due to their pattern of expression.

A further aim was to analyse the individual typical tumor associated peptides from each patient in order to produce specific tumor vaccines for each patient, literally from bench to bedside. In the seven examined solid RCC we identified in total 318 different peptide sequences. The source proteins of 58 of these peptides showed significant overexpressions in the comparing gene expression analysis. Some of these peptides could be assigned to proteins of source, which are associated with tumorigenesis or which are known target molecules in clinical research (BHLHE41, PRUNE2, MAP4, RSU1, NEB, DOK4, PLIN2, HSP90B1). These tumor antigens, derived from the HLA-ligands, represent potential T-cell-epitopes for a peptide based vaccination therapy.

To the ligands of these new identified source proteins for example belong HLA-B*13 ligand *GQVEIVTKV* from *prune homolog 2 (Drosophila)* (PRUNE2) and the HLA-A*01 ligand *FSDIVKQGY* from *docking protein 4* (DOK4). The new ligand *KSELLVEQY* with the HLA-Allo type A*01 belongs to the known source protein *Peripilin* (PLIN2).

Keywords: renal cell carcinoma, HLA-Class-I restricted peptides, peptide based immune therapy

Abkürzungsverzeichnis

AcN	Acetonitril
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
AK	Antikörper
APC	Antigenpräsentierende Zellen
ATP	Adenosin-triphosphat
BAGE	<i>B antigen</i>
Bax	<i>BCL2-associated X protein</i>
BrCN	Bromcyanid
ccRCC	<i>Clear cell Renal Cell Carcinoma</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDK4	<i>Cyclin-dependent kinase 4</i>
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i> ; komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CEA	<i>Carcinoembryonic antigen</i>
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat
chRCC	<i>Chromophob Renal Cell Carcinoma</i>
CID	<i>Collisionally induced decay</i>
c-Myc	<i>v-Myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)</i>
CNBr	Bromcyan
CTLs	<i>Cytotoxic T lymphocytes</i>
DCs	Dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	<i>Electrospray Ionisation</i>
Fas	<i>Fas (TNF receptor superfamily, member 6)</i>
FC	<i>Fold-Change</i>
GAGE	<i>G antigen</i>
gp100	<i>Glycoprotein 100 kDa</i>
GUA	<i>O-Methyl-Isourea Hemisulfat 94 %</i>
HCl	Salzsäure
HER2/neu	<i>Human epidermal receptor 2/neurological</i>
HIF1a	<i>Hypoxia inducible factor 1 alpha</i>

HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HPV	Humanes Papillom-Virus
IFIZ	Interfakultäres Institut für Zellbiologie
IFN	Interferon
K-RAS	<i>V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LC-MS	<i>Liquid chromatography mass spectrometry</i>
LMP	<i>Low molecular weight protein</i>
LTQ	<i>Linear trap quadrupole</i>
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
MAGE	<i>Melanoma antigen</i>
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation</i>
MART-1	<i>Melanoma antigen recognized by T cells-1</i>
MCP	<i>Multi channel plate</i>
MDR1	<i>Multidrug resistance gene 1</i>
MECL1	<i>Multicatalytic endopeptidase complex subunit</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MLANA	<i>Melan-A</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid; messenger Ribonukleinsäure</i>
MUC-1	Mucin 1
MUM-1	<i>Melanoma ubiquitous mutated 1</i>
N	Korrespondierendes gesundes Nierengewebe
NF- κ B	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NK	Natürliche Killerzellen
N-RAS	<i>Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog</i>
NY-ESO-1	<i>New York esophageous 1</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDGF	<i>Platelet derived growth factor C</i>
Pgp	Phospho-Glykoprotein
PRAME	<i>Preferentially expressed antigen of melanoma</i>
pRCC	<i>Papillary Renal Cell Carcinoma</i>
Raf	<i>Zinc fingers and homeoboxes 2</i>
RCC	<i>Renal Cell Carcinoma</i>
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>Rounds per minute; Umdrehung pro Minute</i>
RT	Raumtemperatur

SDF-1	<i>Stromal cell-derived factor 1</i>
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
T	Tumorgewebe
TAA	Tumorassoziierte Antigene
TAP	<i>Transporter associated with antigen processing</i>
TCR	T-Zell Rezeptor
TFA	Trifluoressigsäure
TGF- β	<i>Transforming growth factor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TOF	<i>Time of flight</i>
TP53/p53	<i>Tumor protein p53</i>
UICC	<i>International Union Against Cancer</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VHL	Von-Hippel-Lindau-Syndrom
vs	<i>Versus</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

Literaturverzeichnis

- Abele R, Tampé R. The ABCs of immunology: structure and function of TAP, the transporter associated with antigen processing. *Physiology (Bethesda)*. 2004. 19:216-24.
- Ahmed MM, Mohammed SH. Significance of intratumoral microvessel density quantification based on immunohistochemical detection of PECAM-1 and vWF in colorectal carcinoma from Iraqi patients. *Indian J Pathol Microbiol*. 2010. 53(3):445-52.
- Al-Sarraf N, Reiff JN, Hinrichsen J, Mahmood S, Teh BT, McGovern E, De Meyts P, O'byrne KJ, Gray SG. DOK4/IRS-5 expression is altered in clear cell renal cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2007. 121(5):992-8.
- Amato RJ. Current immunotherapeutic strategies in renal cell carcinoma. *Surg Oncol Clin N Am*. 2007. 16:975–986, xi–xii.
- Atzpodien J, Kirchner H, Jonas U, Bergmann L, Schott H, Heynemann H, Fornara P, Loening SA, Roigas J, Müller SC, Bodenstein H, Pomer S, Metzner B, Rebmann U, Oberneder R, Siebels M, Wandert T, Puchberger T, Reitz M. Interleukin-2- and interferon alfa-2a-based immunochemotherapy in advanced renal cell carcinoma: a Prospectively Randomized Trial of the German Cooperative Renal Carcinoma Chemoimmunotherapy Group (DGCIN). *J Clin Oncol*. 2004. 22(7):1188-94.
- Axwijk PH, Kluijt I, de Jong D, Gille H, Teertstra J, Horenblas S. Hereditary causes of kidney tumours. *Eur J Clin Invest*. 2010. 40(5):433-9.
- Barnstable CJ, Jones EA, Crumpton MJ. Isolation, structure and genetics of HLA-A, -B, -C and -DRw (Ia) antigens. *Br Med Bull*. 1978. 34(3):241-6.
- Belicha-Villanueva A, Blickwedehl J, McEvoy S, Golding M, Gollnick SO, Bangia N. What is the role of alternate splicing in antigen presentation by major histocompatibility complex class I molecules? *Immunol Res*. 2010. 46(1-3):32-44.
- Belli F, Testori A, Rivoltini L, Maio M, Andreola G, Sertoli MR, Gallino G, Piris A, Cattelan A, Lazzari I, Carrabba M, Scita G, Santantonio C, Pilla L, Tragni G, Lombardo C, Arienti F, Marchianò A, Queirolo P, Bertolini F, Cova A, Lamaj E, Ascani L, Camerini R, Corsi M, Cascinelli N, Lewis JJ, Srivastava P, Parmiani G. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous tumor-derived heat shock protein gp96-peptide complexes: clinical and immunologic findings. *J Clin Oncol*. 2002. 20(20):4169-80.
- Bjorkman PJ, Parham P. Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu Rev Biochem*. 1990. 59:253-88.
- Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature*. 1987. 329(6139):512-8.
- Böcker W, Denk H, Heitz Ph. U, Moch H. *Pathologie*. Elsevier GmbH München. 4. Auflage 2008.
- Borst P, Elferink RO. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem*. 2002. 71:537-92.

- Bouvier M, Wiley DC. Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of MHC class I molecules. *Science*. 1994. 265(5170):398-402.
- Brennan P, van der Hel O, Moore LE, Zaridze D, Matveev V, Holcatova I, Janout V, Kollarova H, Foretova L, Szeszenia-Dabrowska N, Mates D, Rothman N, Boffetta P, Chow WH. Tobacco smoking, body mass index, hypertension, and kidney cancer risk in central and eastern Europe. *Br J Cancer*. 2008. 99(11):1912-5.
- Cai D, Dhe-Paganon S, Melendez PA, Lee J, Shoelson SE. Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. *J Biol Chem*. 2003. 278(28):25323-30.
- Cathro HP, Smolkin ME, Theodorescu D, Jo VY, Ferrone S, Frierson HF Jr. Relationship between HLA class I antigen processing machinery component expression and the clinicopathologic characteristics of bladder carcinomas. *Cancer Immunol Immunother*. 2010. 59(3):465-72.
- Cella D, Li JZ, Cappelleri JC, Bushmakin A, Charbonneau C, Kim ST, Chen I, Motzer RJ. Quality of life in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with sunitinib or interferon alfa: results from a phase III randomized trial. *J Clin Oncol*. 2008. 26(22):3763-9.
- Chandra M, Mamidi R, Ford S, Hidalgo C, Witt C, Ottenheijm C, Labeit S, Granzier H. Nebulin alters cross-bridge cycling kinetics and increases thin filament activation: a novel mechanism for increasing tension and reducing tension cost. *J Biol Chem*. 2009. 284(45):30889-96.
- Chen B, Piel WH, Gui L, Bruford E, Monteiro A. The HSP90 family of genes in the human genome: insights into their divergence and evolution. *Genomics*. 2005. 86(6):627-37.
- Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, Türeci O, Gure AO, Tsang S, Williamson B, Stockert E, Pfreundschuh M, Old LJ. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997. 94(5):1914-8.
- Chunduru S, Kawami H, Gullick R, Monacci WJ, Dougherty G, Cutler ML. Identification of an alternatively spliced RNA for the Ras suppressor RSU-1 in human gliomas. *J Neurooncol*. 2002. 60(3):201-11.
- Clarke SJ, Jankova L, Chan C, Horvath L, Song X, Kwun Y, Chapuis P, Bokey L, Baker M, Robertson G, Molloy M. Proteomic biomarkers in colorectal cancer. *ASCO Annual Meeting Proceedings*. Vol 26, No 15S (May 20 Supplement) *J Clin Oncol*. 2008:15033.
- Cohen L, de Moor C, Parker PA, Amato RJ. Quality of life in patients with metastatic renal cell carcinoma participating in a phase I trial of an autologous tumor-derived vaccine. *Urol Oncol*. 2002. 7(3):119-24.
- Cóser VM, Meyer C, Basegio R, Menezes J, Marschalek R, Pombo-de-Oliveira MS. Nebulette is the second member of the nebulin family fused to the MLL gene in infant leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010. 198(2):151-4.
- Csermely P, Schnaider T, Soti C, Prohászka Z, Nardai G. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol Ther*. 1998. 79(2):129-68.
- Cucchiarelli V, Hiser L, Smith H, Frankfurter A, Spano A, Correia JJ, Lobert S. Beta-tubulin isotype classes II and V expression patterns in nonsmall cell lung carcinomas. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2008. 65(8):675-85.

- De Peralta-Venturina M, Moch H, Amin M, Tamboli P, Hailemariam S, Mihatsch M, Javidan J, Stricker H, Ro JY, Amin MB. Sarcomatoid differentiation in renal cell carcinoma: a study of 101 cases. *Am J Surg Pathol*. 2001. 25(3):275-84.
- De Smet C, Lurquin C, Lethé B, Martelange V, Boon T. DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter. *Mol Cell Biol*. 1999. 19(11):7327-35.
- De Smet C, Lurquin C, van der Bruggen P, De Plaen E, Brasseur F, Boon T. Sequence and expression pattern of the human MAGE2 gene. *Immunogenetics*. 1994. 39(2):121-9.
- Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res*. 2001. 11(7):1156-66.
- Delahunt B, Bethwaite PB, McCredie MR, Nacey JN. The evolution of collagen expression in sarcomatoid renal cell carcinoma. *Hum Pathol*. 2007. 38(9):1372-7.
- Dengjel J, Nastke MD, Gouttefangeas C, Gitsioudis G, Schoor O, Altenberend F, Müller M, Krämer B, Missiou A, Sauter M, Hennenlotter J, Wernet D, Stenzl A, Rammensee HG, Klingel K, Stevanović S. Unexpected abundance of HLA class II presented peptides in primary renal cell carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2006. 12(14 Pt 1):4163-70.
- DiBiase SJ, Valicenti RK, Schultz D, Xie Y, Gomella LG, Corn BW. Palliative irradiation for focally symptomatic metastatic renal cell carcinoma: support for dose escalation based on a biological model. *J Urol*. 1997. 158(3 Pt 1):746-9.
- Dicker F, Haferlach C, Sundermann J, Wendland N, Weiss T, Kern W, Haferlach T, Schnittger S. Mutation analysis for RUNX1, MLL-PTD, FLT3-ITD, NPM1 and NRAS in 269 patients with MDS or secondary AML. *Leukemia*. 2010. 24(8):1528-32.
- Disis ML; Cheever, MA. Oncogenic proteins as tumor antigens. *Current Opinion in Immunology* 1996. 8:637-642.
- Dougherty GW, Chopp T, Qi SM, Cutler ML. The Ras suppressor Rsu-1 binds to the LIM 5 domain of the adaptor protein PINCH1 and participates in adhesion-related functions. *Exp Cell Res*. 2005. 306(1):168-79.
- Dougherty GW, Jose C, Gimona M, Cutler ML. The Rsu-1-PINCH1-ILK complex is regulated by Ras activation in tumor cells. *Eur J Cell Biol*. 2008. 87(8-9):721-34.
- Duchateau PN, Pullinger CR, Cho MH, Eng C, Kane JP. Apolipoprotein L gene family: tissue-specific expression, splicing, promoter regions; discovery of a new gene. *J Lipid Res*. 2001. 42(4):620-30.
- Engers R, Ziegler S, Mueller M, Walter A, Willers R, Gabbert HE. Prognostic relevance of increased Rac GTPase expression in prostate carcinomas. *Endocr Relat Cancer*. 2007. 14(2):245-56.
- Escudier B, Choueiri TK, Oudard S, Szczylik C, Négrier S, Ravaud A, Chevreau C, Venner P, Champagne P, Croteau D, Dupont E, Hariton C, Bukowski RM. Prognostic factors of metastatic renal cell carcinoma after failure of immunotherapy: new paradigm from a large phase III trial with shark cartilage extract AE 941. *J Urol*. 2007. 178(5):1901-5.

- Falk K, Rötzschke O, Stevanović S, Jung G, Rammensee HG. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*. 1991. 351(6324):290-6.
- Favre C, Gérard A, Clauzier E, Pontarotti P, Olive D, Nunès JA. DOK4 and DOK5: new Dok-related genes expressed in human T cells. *Genes Immun*. 2003. 4(1):40-5.
- Ferris R. Trial of Postoperative Radiation, Cisplatin, and Panitumumab in Locally Advanced Head and Neck Cancer. United States: Institutional Review Board. University of Pittsburgh Cancer Institute. Clinical studies 2010.
- Fisk B, Blevins TL, Wharton JT, Ioannides CG. Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines. *J Exp Med*. 1995. 181(6):2109-17.
- Franke ED, Sette A, Sacchi J Jr, Southwood S, Corradin G, Hoffman SL. A subdominant CD8(+) cytotoxic T lymphocyte (CTL) epitope from the *Plasmodium yoelii* circumsporozoite protein induces CTLs that eliminate infected hepatocytes from culture. *Infect Immun*. 2000. 68(6):3403-11.
- Fujimoto K, Shen M, Noshiro M, Matsubara K, Shingu S, Honda K, Yoshida E, Suardita K, Matsuda Y, Kato Y. Molecular cloning and characterization of DEC2, a new member of basic helix-loop-helix proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001. 280(1):164-71.
- Gao GF, Tormo J, Gerth UC, Wyer JR, McMichael AJ, Stuart DI, Bell JI, Jones EY, Jakobsen BK. Crystal structure of the complex between human CD8alpha(alpha) and HLA-A2. *Nature*. 1997. 387(6633):630-4.
- Garboczi DN, Utz U, Ghosh P, Seth A, Kim J, VanTienhoven EA, Biddison WE, Wiley DC. Assembly, specific binding, and crystallization of a human TCR-alpha-beta with an antigenic Tax peptide from human T lymphotropic virus type 1 and the class I MHC molecule HLA-A2. *J Immunol*. 1996. 157(12):5403-10.
- Garrett TP, Saper MA, Bjorkman PJ, Strominger JL, Wiley DC. Specificity pockets for the side chains of peptide antigens in HLA-Aw68. *Nature*. 1989. 342(6250):692-6.
- Garriga-Canut M, Roopra A, Buckley NJ. The basic helix-loop-helix protein, sharp-1, represses transcription by a histone deacetylase-dependent and histone deacetylase-independent mechanism. *J Biol Chem*. 2001. 276(18):14821-8.
- Gérard A, Ghiotto M, Fos C, Guittard G, Compagno D, Galy A, Lemay S, Olive D, Nunès JA. Dok-4 is a novel negative regulator of T cell activation. *J Immunol*. 2009. 182(12):7681-9.
- Germain RN, Braunstein NS, Brown MA, Glimcher LH, Lechler RI, McCluskey J, Margulies DH, Miller J, Norcross MA, Paul WE, et al. Structure and function of murine class II major histocompatibility complex genes. *Mt Sinai J Med*. 1986. 53(3):194-201.
- Gez E, Libes M, Bar-Deroma R, Rubinov R, Stein M, Kuten A. Postoperative irradiation in localized renal cell carcinoma: the Rambam Medical Center experience. *Tumori*. 2002. 88(6):500-2.
- Gil-Bazo I, Catalán V, Páramo J, Quero C, Escrivá de Romaní S, Pérez-Ochoa A, Arbea L, Navarro V, de la Cámara J, Garrán C, Espinós J, Rocha E, García-Foncillas J, Martín-Algarra S. Von Willebrand factor as an intermediate between hemostasis and angiogenesis of tumor origin. *Rev Med Univ Navarra*. 2003. 47(3):22-8.

- Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*. 2002. 2(1):48-58.
- Gray SG, Al-Sarraf N, Baird AM, Gately K, McGovern E, O'Byrne KJ. Transcriptional regulation of IRS5/DOK4 expression in non-small-cell lung cancer cells. *Clin Lung Cancer*. 2008. 9(6):367-74.
- Grimm J, Sachs M, Britsch S, Di Cesare S, Schwarz-Romond T, Alitalo K, Birchmeier W. Novel p62dok family members, dok-4 and dok-5, are substrates of the c-Ret receptor tyrosine kinase and mediate neuronal differentiation. *J Cell Biol*. 2001. 154(2):345-54.
- Grinkevich VV, Nikulenkova F, Shi Y, Enge M, Bao W, Maljukova A, Gluch A, Kel A, Sangfelt O, Selivanova G. Ablation of key oncogenic pathways by RITA-reactivated p53 is required for efficient apoptosis. *Cancer Cell*. 2009. 15(5):441-53.
- Grisendi S, Mecucci C, Falini B, Pandolfi PP. Nucleophosmin and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006. 6(7):493-505.
- Guo F, Cancelas JA, Hildeman D, Williams DA, Zheng Y. Rac GTPase isoforms Rac1 and Rac2 play a redundant and crucial role in T-cell development. *Blood*. 2008. 112(5):1767-75.
- Gupta S, Yan H, Wong LH, Ralph S, Krolewski J, Schindler C. The SH2 domains of Stat1 and Stat2 mediate multiple interactions in the transduction of IFN- α signals. *EMBO J*. 1996. 15(5):1075-84.
- Hait WN, Yang JM. The individualization of cancer therapy: the unexpected role of p53. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2006. 117:85-101.
- Hartmann JT, Bokemeyer C. Chemotherapy for renal cell carcinoma. *Anticancer Res*. 1999. 19(2C):1541-3.
- Hedberg Y, Davoodi E, Roos G, Ljungberg B, Landberg G. Cyclin-D1 expression in human renal-cell carcinoma. *Int J Cancer*. 1999. 84(3):268-72.
- Hunt DF, Yates JR 3rd, Shabanowitz J, Winston S, Hauer CR. Protein sequencing by tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986. 83(17):6233-7.
- Hwang SL, Lieu AS, Chang JH, Cheng TS, Cheng CY, Lee KS, Lin CL, Howng SL, Hong YR. Rac2 expression and mutation in human brain tumors. *Acta Neurochir (Wien)*. 2005. 147(5):551-4.
- IARC (International Agency for Research on Cancer) Monographs on the Evaluation for the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: Tobacco Smoke and Involuntary Smoking. IARC press: Lyon. 2007. Volume 89.
- Jäger E, Jäger D, Knuth A. Antigen-specific immunotherapy and cancer vaccines. *Int J Cancer*. 2003. 106(6):817-20.
- Janeway. Murphy K, Travers P, Walport M. Janeway Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag. 7. Auflage 2009.
- Jensen KB, Jones J, Watt FM. A stem cell gene expression profile of human squamous cell carcinomas. *Cancer Lett*. 2008. 272(1):23-31.
- Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, Sauter G. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet*. 2001. 10(7):657-62.

- Kebarle P. A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2000. 35(7):804-17.
- Kitazawa H, Iida J, Uchida A, Haino-Fukushima K, Itoh TJ, Hotani H, Ookata K, Murofushi H, Bulinski JC, Kishimoto T, Hisanaga S. Ser787 in the proline-rich region of human MAP4 is a critical phosphorylation site that reduces its activity to promote tubulin polymerization. *Cell Struct Funct.* 2000. 25(1):33-9.
- Kjer-Nielsen L, Clements CS, Purcell AW, Brooks AG, Whisstock JC, Burrows SR, McCluskey J, Rossjohn J. A structural basis for the selection of dominant alphabeta T cell receptors in antiviral immunity. *Immunity.* 2003. 18(1):53-64.
- Krüger T, Schoor O, Lemmel C, Kraemer B, Reichle C, Dengjel J, Weinschenk T, Müller M, Hennenlotter J, Stenzl A, Rammensee HG, Stevanović S. Lessons to be learned from primary renal cell carcinomas: novel tumor antigens and HLA ligands for immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2005. 54(9):826-36.
- Lampson LA, Levy R. Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line. *J Immunol.* 1980. 125(1):293-9.
- Lankat-Buttgereit B, Tampé R. The transporter associated with antigen processing TAP: structure and function. *FEBS Lett.* 1999. 464(3):108-12.
- Lee DJ, Hruby G, Benson MC, McKiernan JM. Renal function and oncologic outcomes in nephron sparing surgery for renal masses in solitary kidneys. *World J Urol.* 2010. Epub ahead of print.
- Lee SB, Xuan Nguyen TL, Choi JW, Lee KH, Cho SW, Liu Z, Ye K, Bae SS, Ahn JY. Nuclear Akt interacts with B23/NPM and protects it from proteolytic cleavage, enhancing cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008. 105(43):16584-9.
- Lingle WL, Salisbury JL. The role of the centrosome in the development of malignant tumors. *Curr Top Dev Biol.* 2000. 49:313-29.
- Liu Y, Sato F, Kawamoto T, Fujimoto K, Morohashi S, Akasaka H, Kondo J, Wu Y, Noshiro M, Kato Y, Kijima H. Anti-apoptotic effect of the basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor DEC2 in human breast cancer cells. *Genes Cells.* 2010. 15(4):315-25.
- Lonser RR, Glenn GM, Walther M, Chew EY, Libutti SK, Linehan WM, Oldfield EH. Von Hippel-Lindau disease. *Lancet.* 2003. 361(9374):2059-67.
- Machida T, Fujita T, Ooo ML, Ohira M, Isogai E, Mihara M, Hirato J, Tomotsune D, Hirata T, Fujimori M, Adachi W, Nakagawara A. Increased expression of proapoptotic BMCC1, a novel gene with the BNIP2 and Cdc42GAP homology (BCH) domain, is associated with favorable prognosis in human neuroblastomas. *Oncogene.* 2006. 25(13):1931-42.
- Madden DR. The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu Rev Immunol.* 1995. 13:587-622.
- Maggi LB Jr, Kuchenruether M, Dadey DY, Schwoppe RM, Grisendi S, Townsend RR, Pandolfi PP, Weber JD. Nucleophosmin serves as a rate-limiting nuclear export chaperone for the Mammalian ribosome. *Mol Cell Biol.* 2008. 28(23):7050-65.

- Malviya G, de Vries EF, Dierckx RA, Signore A. Synthesis and Evaluation of (99m)Tc-Labelled Monoclonal Antibody 1D09C3 for Molecular Imaging of Major Histocompatibility Complex Class II Protein Expression. *Mol Imaging Biol.* 2010. Epub ahead of print.
- Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Fernández-Viña M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurley CK, Lau M, Lee KW, Mach B, Maiers M, Mayr WR, Müller CR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, Tiercy JM, Trowsdale J. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens.* 2010. 75(4): 291–455.
- Mazzaferro V, Coppa J, Carrabba MG, Rivoltini L, Schiavo M, Regalia E, Mariani L, Camerini T, Marchianò A, Andreola S, Camerini R, Corsi M, Lewis JJ, Srivastava PK, Parmiani G. Vaccination with autologous tumor-derived heat shock protein gp96 after liver resection for metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2003. 9(9):3235-45.
- McGrogan BT, Gilmartin B, Carney DN, McCann A. Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2008. 1785(2):96-132.
- Meacham CE, Ho EE, Dubrovsky E, Gertler FB, Hemann MT. In vivo RNAi screening identifies regulators of actin dynamics as key determinants of lymphoma progression. *Nat Genet.* 2009. 41(10):1133-7.
- Meissner M, Reichert TE, Kunkel M, Gooding W, Whiteside TL, Ferrone S, Seliger B. Defects in the human leukocyte antigen class I antigen processing machinery in head and neck squamous cell carcinoma: association with clinical outcome. *Clin Cancer Res.* 2005. 11(7):2552-60.
- Moch H, Artibani W, Delahunt B, Ficarra V, Knuechel R, Montorsi F, Patard JJ, Stief CG, Sulser T, Wild PJ. Reassessing the current UICC/AJCC TNM staging for renal cell carcinoma. *Eur Urol.* 2009. 56(4):636-43.
- Moch H, Gasser T, Amin MB, Torhorst J, Sauter G, Mihatsch MJ. Prognostic utility of the recently recommended histologic classification and revised TNM staging system of renal cell carcinoma: a Swiss experience with 588 tumors. *Cancer.* 2000. 89(3):604-14.
- Moch H, Schraml P, Bubendorf L, Mirlacher M, Kononen J, Gasser T, Mihatsch MJ, Kallioniemi OP, Sauter G. High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma. *Am J Pathol.* 1999. 154(4):981-6.
- Möller E, Mandahl N, Mertens F, Panagopoulos I. Molecular identification of COL6A3-CSF1 fusion transcripts in tenosynovial giant cell tumors. *Genes Chromosomes Cancer.* 2008. 47(1):21-5.
- Morjani H, Madoulet C. Immunosuppressors as multidrug resistance reversal agents. *Methods Mol Biol.* 2010. 596:433-46.
- Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, Look AT. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science.* 1994. 263(5151):1281-4.
- Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Oudard S, Negrier S, Szczylik C, Pili R, Bjarnason GA, García-del-Muro X, Sosman JA, Solska E, Wilding G, Thompson JA, Kim ST, Chen I, Huang X, Figlin RA. Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2009. 27(22):3584-90.

- Motzer RJ, Mazumdar M, Bacik J, Russo P, Berg WJ, Metz EM. Effect of cytokine therapy on survival for patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2000. 18(9):1928-35.
- Müller H, Lukas J, Schneider A, Warthoe P, Bartek J, Eilers M, Strauss M. Cyclin D1 expression is regulated by the retinoblastoma protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994. 91(8):2945-9.
- Nese N, Paner GP, Mallin K, Ritchey J, Stewart A, Amin MB. Renal cell carcinoma: assessment of key pathologic prognostic parameters and patient characteristics in 47,909 cases using the National Cancer Data Base. *Ann Diagn Pathol*. 2009. 13(1):1-8.
- Niggli V, Schlicht D, Affentranger S. Specific roles of Rac1 and Rac2 in motile functions of HT1080 fibrosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009. 386(4):688-92.
- Novellino L, Castelli C, Parmiani G A. listing of human tumor antigens recognized by T cells: *Cancer Immunol Immunother*. 2005. 54(3):187-207.
- Oberley LW, Buettner GR. Role of superoxide dismutase in cancer: a review. *Cancer Res*. 1979. 39(4):1141-9.
- Olsen JV, Schwartz JC, Griep-Raming J, Nielsen ML, Damoc E, Denisov E, Lange O, Remes P, Taylor D, Splendore M, Wouters ER, Senko M, Makarov A, Mann M, Horning S. A dual pressure linear ion trap Orbitrap instrument with very high sequencing speed. *Mol Cell Proteomics*. 2009. 8(12):2759-69.
- Olson JE, Wang X, Pankratz VS, Fredericksen ZS, Vachon CM, Vierkant RA, Cerhan JR, Couch FJ. Centrosome-related genes, genetic variation, and risk of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2010. Epub ahead of print.
- Pamer EG, Harty JT, Bevan MJ. Precise prediction of a dominant class I MHC-restricted epitope of *Listeria monocytogenes*. *Nature*. 1991. 353(6347):852-5.
- Pandey SN, Srivastava A, Dixit M, Choudhuri G, Mittal B. Haplotype analysis of signal peptide (insertion/deletion) and XbaI polymorphisms of the APOB gene in gallbladder cancer. *Liver Int*. 2007. 27(7):1008-15.
- Parham P, Barnstable CJ, Bodmer WF. Use of a monoclonal antibody (W6/32) in structural studies of HLA-A, B, C, antigens. *J Immunol*. 1979. 123(1):342-9.
- Parker KC, Bednarek MA, Coligan JE. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J Immunol*. 1994. 152(1):163-75.
- Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*. 1999. 20(18):3551-67.
- Perry RH, Cooks RG, Noll RJ. Orbitrap mass spectrometry: instrumentation, ion motion and applications. *Mass Spectrom Rev*. 2008. 27(6):661-99.
- Pianta A, Puppini C, Franzoni A, Fabbro D, Di Loreto C, Bulotta S, Deganuto M, Paron I, Tell G, Puxeddu E, Filetti S, Russo D, Damante G. Nucleophosmin is overexpressed in thyroid tumors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010. 397(3):499-504.

- Plasswilm L, Kortmann RD, Hehr T, Bamberg M. Therapieansätze beim Nierenzellkarzinom aus der Sicht der Strahlentherapie. *Onkologie* 2001. 7: 759-766.
- Pomara G, Salinitri G, Nesi G, Maio E, Minervini A, Gammazza AM, Francesca F, Cappello F, Selli C. p53 and Ki-67 expression in renal cell carcinomas of pregnant women and their correlation with prognosis: a pilot study. *Int J Gynecol Cancer*. 2008. 18(1):132-5.
- Quelle FW, Thierfelder W, Witthuhn BA, Tang B, Cohen S, Ihle JN. Phosphorylation and activation of the DNA binding activity of purified Stat1 by the Janus protein-tyrosine kinases and the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*. 1995. 270(35):20775-80.
- Quinn MC, Filali-Mouhim A, Provencher DM, Mes-Masson AM, Tonin PN. Reprogramming of the transcriptome in a novel chromosome 3 transfer tumor suppressor ovarian cancer cell line model affected molecular networks that are characteristic of ovarian cancer. *Mol Carcinog*. 2009. 48(7):648-61.
- Ramana KV, Tammali R, Srivastava SK. Inhibition of aldose reductase prevents growth factor-induced G1-S phase transition through the AKT/phosphoinositide 3-kinase/E2F-1 pathway in human colon cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2010. 9(4):813-24.
- Rammensee HG, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanović S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics*. 1999. 50(3-4):213-9.
- Rammensee HG, Falk K, Rötzschke O. MHC molecules as peptide receptors. *Curr Opin Immunol*. 1993. 5(1):35-44.
- Reinhardt C, Zdrojowy R, Szczylik C, Ciuleanu T, Brugger W, Oberneder R, Kirner A, Walter S, Singh H, Stenzl A. Results of a randomized phase II study investigating multi-peptide vaccination with IMA901 in advanced renal cell carcinoma (RCC). *ASCO Annual Meeting Proceedings*. Vol 28, No 15. *Journal of Clinical Oncology*. 2010:4529.
- Rekha PR, Rajendiran S, Rao S, Shroff S, Joseph LD, Prathiba D. Histological reclassification, histochemical characterization and c-kit immunoexpression in renal cell carcinoma. *Indian J Urol*. 2008. 24(3):343-7.
- Robert Koch-Institut, Krebs in Deutschland 2005/2006; Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 7. Ausgabe 2010. 80-83.
- Rogers RS, Horvath CM, Matunis MJ. SUMO modification of STAT1 and its role in PIAS-mediated inhibition of gene activation. *J Biol Chem*. 2003. 278(32):30091-7.
- Röhlig LM, Damin DC, Stefani SD, Castro CG Jr, Roisenberg I, Schwartzmann G. Von Willebrand factor antigen levels in plasma of patients with malignant breast disease. *Braz J Med Biol Res*. 2001. 34(9):1125-9.
- Rötzschke O, Falk K, Stevanović S, Jung G, Walden P, Rammensee HG. Exact prediction of a natural T cell epitope. *Eur J Immunol*. 1991. 21(11):2891-4.
- Rosenberg SA. A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity*. 1999. 10(3):281-7.

- Ross DT, Scherf U, Eisen MB, Perou CM, Rees C, Spellman P, Iyer V, Jeffrey SS, Van de Rijn M, Waltham M, Pergamenschikov A, Lee JC, Lashkari D, Shalon D, Myers TG, Weinstein JN, Botstein D, Brown PO. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet.* 2000. 24(3):227-35.
- Rowen L, Koop BF, Hood L. The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus. *Science.* 1996. 272(5269):1755-62.
- Saarikoski ST, Rivera SP, Hankinson O. Mitogen-inducible gene 6 (MIG-6), adipophilin and tuftelin are inducible by hypoxia. *FEBS Lett.* 2002. 530(1-3):186-90.
- Saper MA, Bjorkman PJ, Wiley DC. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *J Mol Biol.* 1991. 219(2):277-319.
- Sato F, Bhawal UK, Kawamoto T, Fujimoto K, Imaizumi T, Imanaka T, Kondo J, Koyanagi S, Noshiro M, Yoshida H, Kusumi T, Kato Y, Kijima H. Basic-helix-loop-helix (bHLH) transcription factor DEC2 negatively regulates vascular endothelial growth factor expression. *Genes Cells.* 2008. 13(2):131-44.
- Schmelzeisen-Redeker G, Büttfering L and Röllgen FW. Desolvation of ions and molecules in thermospray mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes.* 1989. 90(2):139-150.
- Schmidt SM, Schag K, Müller MR, Weinschenk T, Appel S, Schoor O, Weck MM, Grünebach F, Kanz L, Stevanovic S, Rammensee HG, Brossart P. Induction of adipophilin-specific cytotoxic T lymphocytes using a novel HLA-A2-binding peptide that mediates tumor cell lysis. *Cancer Res.* 2004. 64(3):1164-70.
- Schultz ES, Chapiro J, Lurquin C, Claverol S, Burlet-Schiltz O, Warnier G, Russo V, Morel S, Lévy F, Boon T, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P. The production of a new MAGE-3 peptide presented to cytolytic T lymphocytes by HLA-B40 requires the immunoproteasome. *J Exp Med.* 2002. 195(4):391-9.
- Seliger B, Maeurer MJ, Ferrone S. Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol Today.* 2000. 21(9):455-64.
- Shavit JA, Motto DG. Coagulation and metastasis: an unexpected role for von Willebrand factor. *J Thromb Haemost.* 2006. 4(3):517-8.
- Shi T, Seligson D, Belldegrun AS, Palotie A, Horvath S. Tumor classification by tissue microarray profiling: random forest clustering applied to renal cell carcinoma. *Mod Pathol.* 2005. 18(4):547-57.
- Shih C, Padhy LC, Murray M, Weinberg RA. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature.* 1981. 290(5803):261-4.
- Sijts A, Sun Y, Janek K, Kral S, Paschen A, Schadendorf D, Kloetzel PM. The role of the proteasome activator PA28 in MHC class I antigen processing. *Mol Immunol.* 2002. 39(3-4):165-9.
- Smith C, Cerundolo V. Immunotherapy of melanoma. *Immunology.* 2001. 104(1):1-7.
- Spiotto MT, Yu P, Rowley DA, Nishimura MI, Meredith SC, Gajewski TF, Fu YX, Schreiber H. Increasing tumor antigen expression overcomes "ignorance" to solid tumors via crosspresentation by bone marrow-derived stromal cells. *Immunity.* 2002. 17(6):737-47.
- Stenzl A, Stähler M, Dietrich PY, Haferkamp A, Beck J, Eisen T. IMA901 – a novel multi-peptide vaccine for treatment of renal cell carcinoma. Phase one study. *Immunology Biotechnology Tübingen.* 2007.

- Stevanović S. Identification of tumour-associated T-cell epitopes for vaccine development. *Nat Rev Cancer*. 2002. 2(7):514-20.
- Störkel S, Eble JN, Adlakha K, Amin M, Blute ML, Bostwick DG, Darson M, Delahunt B, Iczkowski K. Classification of renal cell carcinoma: Workgroup No. 1. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). 1997. 80(5):987-989.
- Swaminathan V, Kishore AH, Febitha KK, Kundu TK. Human histone chaperone nucleophosmin enhances acetylation-dependent chromatin transcription. *Mol Cell Biol*. 2005. 25(17):7534-45.
- Sweeney JD, Killion KM, Pruet CF, Spaulding MB. Von Willebrand factor in head and neck cancer. *Cancer*. 1990. 66(11):2387-9.
- Tago K, Chiocca S, Sherr CJ. Sumoylation induced by the Arf tumor suppressor: a p53-independent function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005. 102(21):7689-94.
- Tauber S, Jais A, Jeitler M, Haider S, Husa J, Lindroos J, Knöfler M, Mayerhofer M, Pehamberger H, Wagner O, Bilban M. Transcriptome analysis of human cancer reveals a functional role of Heme Oxygenase-1 in tumor cell adhesion. *Mol Cancer*. 2010. 9:200.
- Terraube V, Marx I, Denis CV. Role of von Willebrand factor in tumor metastasis. *Thromb Res*. 2007. 120(2):64-70.
- Torra R, Tazón-Vega B, Ars E, Ballarín J. Collagen type IV (alpha3-alpha4) nephropathy: from isolated haematuria to renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 2004. 19(10):2429-32.
- Umano Y, Tsunoda T, Tanaka H, Matsuda K, Yamaue H, Tanimura H. Generation of cytotoxic T cell responses to an HLA-A24 restricted epitope peptide derived from wild-type p53. *Br J Cancer*. 2001. 84(8):1052-7.
- Vachani A, Nebozhyn M, Singhal S, Alila L, Wakeam E, Muschel R, Powell CA, Gaffney P, Singh B, Brose MS, Litzky LA, Kucharczuk J, Kaiser LR, Marron JS, Showe MK, Albelda SM, Showe LC. A 10-gene classifier for distinguishing head and neck squamous cell carcinoma and lung squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2007. 13(10):2905-15.
- Van der Bruggen P, Szikora JP, Boël P, Wildmann C, Somville M, Sensi M, Boon T. Autologous cytolytic T lymphocytes recognize a MAGE-1 nonapeptide on melanomas expressing HLA-Cw*1601. *Eur J Immunol*. 1994. 24(9):2134-40.
- Van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*. 1991. 254: 1643.
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 1988. 319(9):525-32.
- Walker LC, Overstreet MA, Yeowell HN. Tissue-specific expression and regulation of the alternatively-spliced forms of lysyl hydroxylase 2 (LH2) in human kidney cells and skin fibroblasts. *Matrix Biol*. 2005. 23(8): 515-23.
- Wang H, Yang Y, Sharma N, Tarasova NI, Timofeeva OA, Winkler-Pickett RT, Tanigawa S, Perantoni AO. STAT1 activation regulates proliferation and differentiation of renal progenitors. *Cell Signal*. 2010. 22(11):1717-26.

- Weinschenk T, Gouttefangeas C, Schirle M, Obermayr F, Walter S, Schoor O, Kurek R, Loeser W, Bichler KH, Wernet D, Stevanović S, Rammensee HG. Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. *Cancer Res.* 2002. 62(20):5818-27.
- Win SJ, Ward VK, Dunbar PR, Young SL, Baird MA. Cross-presentation of epitopes on virus-like particles via the MHC I receptor recycling pathway. *Immunol Cell Biol.* 2011. Epub ahead of print.
- Witt CC, Burkart C, Labeit D, McNabb M, Wu Y, Granzier H, Labeit S Nebulin regulates thin filament length, contractility, and Z-disk structure in vivo. *EMBO J.* 2006. 25(16):3843-55.
- Wysocki VH, Tsaprailis G, Smith LL, Breci LA. Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation. *J Mass Spectrom.* 2000. 35(12):1399-406.
- Xiaoling Li, Ximing Tang, carmen Behrens, Wenli Dong, Natalie ozburn, Denise Woods, Guosheng Yin, Waun ki Hong, Cesar Moran and Ignacio Wistuba. STAT1 protein frequently overexpressed in non-small cell lung carcinoma. 99th AACR Annual Meeting. 2008. San Diego, CA.
- Xu Y, Fang F, Dhar SK, Bosch A, St Clair WH, Kasarskis EJ, St Clair DK. Mutations in the SOD2 promoter reveal a molecular basis for an activating protein 2-dependent dysregulation of manganese superoxide dismutase expression in cancer cells. *Mol Cancer Res.* 2008. 6(12):1881-93.
- Yagoda A, Abi-Rached B, Petrylak D. Chemotherapy for advanced renal-cell carcinoma: 1983-1993. *Semin Oncol.* 1995. 22(1):42-60.
- Yang F, Yang XF. New concepts in tumor antigens: their significance in future immunotherapies for tumors. *Cell Mol Immunol.* 2005. 2(5):331-41.
- Yang P, Kollmeyer TM, Buckner K, Bamlet W, Ballman KV, Jenkins RB. Polymorphisms in GLTSCR1 and ERCC2 are associated with the development of oligodendrogliomas. *Cancer.* 2005. 103(11):2363-72.
- Yao M, Huang Y, Shioi K, Hattori K, Murakami T, Nakaigawa N, Kishida T, Nagashima Y, Kubota Y. Expression of adipose differentiation-related protein: a predictor of cancer-specific survival in clear cell renal carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2007. 13(1):152-60.
- Yeowell HN, Walker LC. Tissue specificity of a new splice form of the human lysyl hydroxylase 2 gene. *Matrix Biol.* 1999. 18(2):179-87.
- York IA, Goldberg AL, Mo XY, Rock KL. Proteolysis and class I major histocompatibility complex antigen presentation. *Immunol Rev* 1999. 172:49-66.

Danksagung

Ein ganz herzliches Dankeschön an Herrn Prof. Dr. Stefan Stevanović für die unproblematische Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die persönliche und hervorragende fachliche Betreuung. Vielen Dank auch dafür, dass er stets ein offenes Ohr für mich hatte, sowie für seine endlose Geduld und für die wirklich nette Atmosphäre in seinem Büro.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee dafür, dass er mich so selbstverständlich in seinem Institut aufgenommen hat, von welchem ich vom Fachwissen und von der hervorragenden Arbeitsatmosphäre profitiert habe. Vielen Dank auch für seine Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Ein besonderes Dankeschön an Herrn Prof. Dr. Thomas Göbel dafür, dass ich ihn für diese nicht unbedingt nur tiermedizinische Arbeit als Doktorvater gewinnen durfte und für die prompte Beantwortung aller von mir gestellten Fragen in elektronischer Form.

Ein großes Dankeschön geht an die Universitätsklinik der Urologie für die Bereitstellung der vielen Gewebeproben, ohne die diese Arbeit nicht hätte stattfinden können, insbesondere an Herrn Dr. Jörg Hennenlotter, der die Organisation und die Vorbereitung der Gewebeproben in die Wege leitete.

Vielen Dank an Herrn Dr. Michael Bonin aus der Humangenetik der Universität Tübingen für die Durchführung der GeneChip-Analysen und für die Einführung zur Interpretation der Daten.

Herzlichen Dank auch an das Stammpersonal. An Claudia für die Herstellung von Chemikalien und der vielen Antikörper, an Franziska für die Reinigung sämtlicher gebrauchter Gerätschaften, an Lynne für alle administrativen Tätigkeiten, an Patricia und Nicole für die nette Atmosphäre im Büro und die immer für einen netten Plausch zu haben waren sowie an Matthias, der sich sofort um jedes Computerproblem kümmerte.

Großen Dank an das MS-Team Oli und Marc, für die gründliche Einarbeitung in die differentielle MS-Analytik und für die von ihnen gemessenen Proben. Weiter danke ich Gabor für die Einführung der Tumorpräparation und für seine große Hilfestellung bei der Interpretation vieler undurchsichtiger Spektren, sowie Chris für die von ihm gemessenen Proben mit dem neuen Massenspektrometer.

Vielen Dank an alle Elche, die alle am Gelingen meiner Dissertation im Einzelnen beigetragen haben, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen und für die tolle Atmosphäre.

Herzlichen Dank an Regine, Katrin, Carmen und Tobi, die mir als Korrekturteam wertvolle Hilfe leisteten.

Ein ganz dickes Dankeschön an meine Mutter für ihren Rückhalt und ihre liebevolle Unterstützung sowie für all die kleinen alltäglichen Dinge, bei denen sie mir geholfen hat.

Ein ganz besonderes herzliches Dankeschön an meine Schwester Regine, ohne deren finanzielle Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Vielen herzlichen Dank auch an Marlis und Merle für die vielen Stunden, die Ihr meinem Hund gewidmet habt!