

**MHC-Klasse-I vermittelte Antigenpräsentation:
systembiologische Analyse in humanen
Krebszelllinien und Charakterisierung der ER-
residenten Aminopeptidase ERMP1**

Dissertation

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Jennifer Hahlbrock
geb. am 19.02.1988
in Detmold

Mainz, Oktober 2017

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2017

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Antigenpräsentation	1
1.1.1 Struktur und Charakteristika von HLA- und MHC-Molekülen	1
1.1.2 Antigenerkennung von T-Zellen über HLA-Moleküle	4
1.1.3 Antigenprozessierung.....	6
1.1.4 ERMP1	11
1.2 Krebsimmuntherapie	12
1.2.1 HLA-assoziierte Erkrankungen.....	12
1.2.2 Identifizierung von T-Zell-Epitopen und TZR-Manipulation	14
1.3 Personalisierte Krebstherapie	15
1.3.1 Massenspektrometrische Analysen des HLA-Klasse-I-Ligandoms	16
1.4 Zielsetzung	21
2. Material und Methoden	22
2.1 Chemikalien und Reagenzien	22
2.2 Verbrauchsmaterialien	24
2.3 Laborgeräte	25
2.4 Medien, Puffer und Zusätze	27
2.5 Zelllinien	33
2.6 Tiere	33
2.7 Antikörper	33
2.8 Kits	34
2.9 Zellkulturmethoden	34
2.9.1 Kultivierung von humanen Krebszelllinien	34
2.9.2 Kultivierung von Hybridom-Zelllinien	34
2.9.3 Zellzählung	35
2.9.4 Einfrieren von Zellen	35
2.9.5 Auftauen von Zellen	36
2.10 Proteinbiochemische Methoden	36
2.10.1 Herstellung von Zelllysaten für massenspektrometrische Analysen.....	36
2.10.2 Proteinbestimmung.....	36
2.10.3 Filter gestützte Probenvorbereitung (engl. <i>Filter-aided sample preparation</i> , FASP)	37
2.10.4 Herstellung von Zelllysaten für Western Blot Analysen	38
2.10.5 SDS-PAGE	38
2.10.6 Western Blot	39
2.11 Methoden zur Generierung von Proteom – und Ligandomdaten	40
2.11.1 Herstellung von Antikörpern aus Hybridom-Zellkulturüberstand.....	40
2.11.2 Isolierung von HLA-Peptid-Liganden	40
2.11.3 Massenspektrometrie	42
2.11.4 Auswertung massenspektrometrischer Daten.....	43
2.12 Ex vivo Aufarbeitungen	44
2.12.1 Organentnahme	44
2.12.2 Isolierung von Milzzellen.....	44
2.12.3 Mikrosomenisolation aus der Milz	44
2.13 Durchflusszytometrie	45
3. Ergebnisse	47

3.1 Proteomanalyse humaner Krebszelllinien	47
3.1.1 Auswahl der Zelllinien	47
3.1.2 Proteomanalyse der Zelllinien.....	49
3.2 Methodenetablierung zur Isolierung von HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden	53
3.2.1 Detergenzienvergleich zur optimalen Zellyse	53
3.2.2 Titration der BrCN-Sepharose-Beads	55
3.2.3 Evaluierung der optimalen Materialien wie Reaktionsgefäß, Ultrafiltrationseinheit und Umkehrphasenaustauschchromatographie-Platte	57
3.3 Charakterisierung des Ligandoms von humanen Krebszelllinien	59
3.3.1 Isolierung von HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden aus 9 humanen Krebszelllinien	59
3.3.2 Qualitätskontrolle der Isolierung von HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden	64
3.3.4 Systembiologische Analysen der verschiedenen OMICS-Datensätze.....	66
3.4 Anwendung der Isolierung von MHC-Klasse-1-Peptid-Liganden <i>in vivo</i> zur funktionellen Untersuchung der Antigenpräsentation in ERMP1-ko-Mäusen	73
3.4.1 Massenspektrometrische Analyse von Mikrosomen aus ERMP1 defizienten Mäusen.....	73
3.4.2 Isolierung des Ligandoms aus ERMP1 defizienten Mäusen	77
4. Diskussion	83
4.1 Massenspektrometrische Analysen von HLA-Liganden	83
4.2 Systembiologische Analysen der Antigenpräsentation	88
4.3 ERMP1 als Aminopeptidase in der Antigenprozessierung	93
5. Zusammenfassung.....	96
6. Abstract.....	97
7. Anhang	98
7.1 Literaturverzeichnis	98
7.2 Abbildungsverzeichnis.....	108
7.3 Tabellenverzeichnis.....	110
7.4 Abkürzungsverzeichnis.....	111
8. Curriculum Vitae.....	115
9. Danksagung	116

1. Einleitung

1.1 Antigenpräsentation

Das Immunsystem in Vertebraten dient der Abwehr von Parasiten, Bakterien, Viren und sonstigen Erregern, aber auch der Bekämpfung maligner Veränderungen. Dabei unterscheidet man zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem, wobei die Funktionalität des adaptiven Immunsystems auf T- und B-Zellen beruht, welche durch spezifische Rezeptoren in der Lage sind, Peptide (Antigene) auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen (englisch *antigen presenting cells*, APC) zu erkennen, sie als Fremd zu identifizieren und letztendlich zu eliminieren. Die Präsentation dieser Peptide erfolgt über HLA- (human) bzw. MHC-Moleküle (murin).

1.1.1 Struktur und Charakteristika von HLA- und MHC-Molekülen

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (englisch *major histocompatibility complex*, MHC) kommt in allen Wirbeltieren vor und stellt im Genom der Mammalia als auch im humanen Genom die höchst variable Region dar¹. Im Menschen wird der MHC als Histokompatibilitätsantigen oder auch humanes Leukozytenantigen-System (englisch *human leukocyte antigen*, HLA) bezeichnet, da er zuerst durch Antigene auf weißen Blutkörperchen, den Leukozyten, identifiziert wurde. Diese erste Beschreibung des HLA geht auf Jean Dausset in den 1950er Jahren zurück, der mit „MAC“ das erste Leukozyten-Antigen entdeckte und auch den Grundstein der HLA-Typisierung und damit der Forschung zur Histokompatibilität legte^{2,3}. Der MHC-Genkomplex ist beim Menschen in Centromer-Nähe auf dem Chromosom 6, bei der Maus auf Chromosom 17 lokalisiert und stellt eine Gruppe von hoch polymorphen Genen dar, die für die Funktionalität des Immunsystems essentiell sind, da sie unter anderem für die HLA-Klasse-I- und HLA-Klasse-II-Proteinkomplexe kodieren^{4,5}. HLA-Klasse-I-Moleküle finden sich auf der Oberfläche aller kernhaltiger Zellen¹ und bestehen aus einer etwa 45 kDa großen schweren Kette (α -Kette) und einer nicht-kovalent gebundenen 12 kDa großen leichten Kette, dem so genannten beta-2-Mikroglobulin (β 2M)^{6,7} (Abbildung 1). Das β 2M liegt beim Menschen auf Chromosom 15 und bei der Maus auf Chromosom 2⁴. Die α -Kette besteht aus drei α -Domänen, wobei α 1 und α 2 die Peptidbindungsfurche bilden⁸ und die Immunglobulin-ähnliche α 3-Domäne der Transmembrandomäne zugewandt ist^{7,9}. Die Peptidbindungsfurche der HLA-Klasse-I-Moleküle ist geschlossen, wodurch die Länge der gebundenen Peptide auf typischerweise 8-10 Aminosäuren begrenzt ist und diese mit ihrem N- und C-Terminus in der Tasche binden¹⁰⁻¹². Auch HLA-Klasse-II-

Moleküle bilden ein Heterodimer, diese aber aus einer α – und einer β -Kette, welche nicht-kovalent miteinander verbunden sind (Abbildung 1). Diese Ketten bestehen aus jeweils zwei Domänen, wobei $\alpha 1$ und $\beta 1$ die Peptidbindungsfurche bilden und $\alpha 2$ und $\beta 2$ Immunglobulin-ähnliche (Ig-ähnlich) Domänen darstellen. Diese Ig-ähnlichen Domänen sind den zwei Transmembrandomänen zugewandt, welche sie mit der Zelloberfläche verankern⁹. HLA-Klasse-II-Moleküle sind vorrangig auf der Oberfläche professioneller APCs wie Makrophagen, B Lymphozyten und dendritischen Zellen exprimiert¹³. Ihre Peptidbindungsfurche ist offen, wodurch die Länge der gebundenen Peptide nahezu unbegrenzt und hoch variabel ist, zumeist aber bei 13-17 AS liegt^{14,15}.

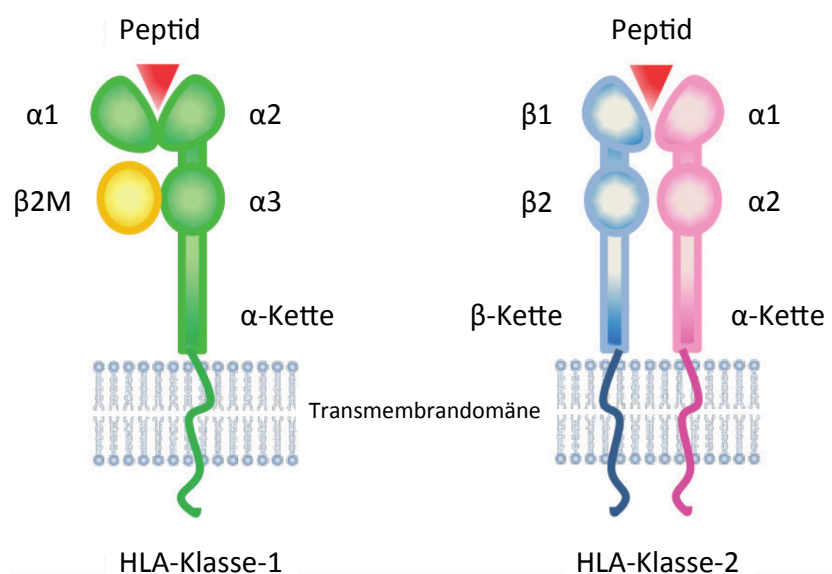


Abbildung 1: Struktur der HLA-Klasse-I-Moleküle und HLA-Klasse-II-Moleküle¹⁶

HLA-Klasse-I-Moleküle bestehen aus einer α – und einer β -Kette (beta-2-Mikroglobulin, $\beta 2M$) wobei die $\alpha 1$ und $\alpha 2$ Domänen die geschlossene Peptidbindetasche bilden und die $\alpha 3$ -Domäne nicht-kovalent mit dem $\beta 2M$ verbunden und der Transmembrandomäne zugewandt ist. HLA-Klasse-II-Moleküle bilden einen Heterodimer aus einer nicht-kovalent verbundenen α – und β -Kette, wobei $\alpha 1$ und $\beta 1$ die offene Peptidbindetasche bilden und $\alpha 2$ und $\beta 2$ Immunglobulin-ähnliche Domäne darstellen, welche den beiden Transmembrandomänen zugewandt sind.

Die oben beschriebenen HLA-Moleküle werden in verschiedene Klassen eingeteilt. Im Menschen unterscheidet man bei HLA-Klasse-I drei klassische Klasse-I Gene, die als HLA-A, -B und -C bezeichnet werden. Die korrespondierenden Subtypen der MHC-Klasse-I in der Maus sind H-2D, H-2K und H-2L. Die klassischen Gene der HLA-Klasse-II heißen HLA-DR, -DP und -DQ, die der MHC-Klasse-II H-2A und H-2E^{7,17,18}. Außerdem wurde durch das HLA Nomenklatur Komitee im Jahre 1976 die erweiternde Nomenklatur festgelegt, bei welcher im humanen System zusätzlich zur Region (HLA) und Genlocus-Bezeichnung (A, B, C, etc.) die Spezifität durch Zahlen gekennzeichnet wird¹⁹. Dadurch ergeben sich beispielsweise die Namen der in der vorliegenden Dissertation

betrachteten Allele HLA-A-02:01 und HLA-B-07:02. Bei der Maus sind diese Haplotypen durch die Kleinbuchstaben k, b und d gekennzeichnet (z.B. H-2K^b oder H-2D^b). Aufgrund dieser Polygenie des HLA und Polymorphie der HLA-Allele, ist eine hohe Variabilität in den gebundenen Peptiden möglich²⁰. Die chemischen und strukturellen Eigenschaften der Peptidbindefurche bestimmen das Repertoire der möglichen gebundenen Peptide der verschiedenen HLA-Moleküle²¹. Die Peptidbindefurche umfasst sechs verschiedene Taschen, die in HLA-Klasse-I-Molekülen als A-F Tasche und in HLA-Klasse-II-Molekülen als P1-P9 Tasche bezeichnet werden²². Diese Taschen dienen neben der N- und C-terminalen Bindung der Peptide der zusätzlichen Verankerung dieser in der Peptidbindefurche. Daher stammt der Ausdruck der Ankerpositionen, die für jedes Allel unterschiedlich und in Abbildung 2 exemplarisch für die murinen H-2K^b (2A, oben) und H-2D^b (2A, unten) sowie humanen HLA-DR3 (2B) in grün dargestellt sind. Da die Peptide nur über diese konservierten Ankerpositionen gebunden werden, ergibt sich ein Repertoire von bis zu mehreren tausend potentiellen Peptiden, die jedes HLA-Molekül binden kann.

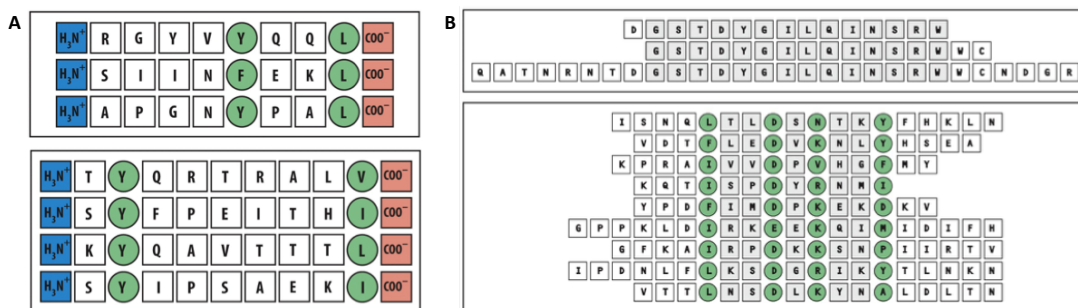


Abbildung 2: Peptidliganden verschiedener HLA-Moleküle²³

HLA-Moleküle binden in ihrer Peptidbindefurche Allel-spezifisch Peptide mit unterschiedlichen Sequenzen. Hierbei besitzt jedes Allel andere Ankerpositionen (grün) zur festen Bindung der Peptide. Exemplarisch dargestellt sind das murine H-2K^b (A, oben) und H-2D^b (A, unten) sowie das humane HLA-DR3 (B).

Besonders der mittlere Teil der Antigene (Peptide), der aus der Peptidbindefurche herausragt, ist gut zugänglich zur Erkennung durch zytotoxische CD8⁺ T-Zellen (HLA-Klasse-I) bzw. CD4⁺ T-Zellen (HLA-Klasse-II)^{24,25}. Im Folgenden wird sich auf die HLA-Klasse-I-Moleküle beschränkt.

1.1.2 Antigenerkennung von T-Zellen über HLA-Moleküle

HLA-Klasse-I-Moleküle sind auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert und präsentieren intrazelluläre Peptide zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen²⁶. Die Erkennung der HLA-Peptid Komplexe erfolgt über T-Zell-Rezeptoren (TZR), die auf der Oberfläche der zytotoxischen T-Zellen exprimiert sind²⁷ und die präsentierten Peptide erkennen. Der TZR existiert in zwei Formen: als $\alpha\beta$ TZR und als $\gamma\delta$ TZR, wobei der $\alpha\beta$ TZR mit einer Verbreitung von 95% weitaus häufiger vorkommt als der $\gamma\delta$ TZR²⁸. Wie der Name $\alpha\beta$ TZR bereits vermuten lässt, bestehen die TZRs aus einem Heterodimer aus einer α - und einer β -Kette, welche über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind²⁶. Theoretisch ist das Immunsystem in der Lage 10^{15} bis 10^{20} verschiedene $\alpha\beta$ TZRs herzustellen, was aber durch die Selektion im Thymus auf etwa 10^5 bis 10^8 im Menschen und 2×10^6 in der Maus reduziert wird²⁹⁻³³. Diese dennoch sehr hohe Diversität an TZRs wird auf drei Ebenen generiert³⁴. Zunächst kommt es während der T-Zell-Reifung im Thymus durch die genetische Rekombination von Exons, die für die variable Domäne (V) des TZR kodieren zur Ausbildung des großen Repertoires von verschiedenen $\alpha\beta$ TZRs. Hierbei bilden die Gensegmente V, J (englisch *joining*) und C (englisch *constant*) die α -Kette ($V\alpha$) und die Segmente V, D (englisch *diversity*), J und C die β -Kette ($V\beta$)³⁵. Des Weiteren werden an den V(D)J Stellen zufällig Nukleotide eingebaut oder entfernt. Auf der letzten Ebene kommt es zu einer kombinatorischen Paarung der so gebildeten, in sich schon variablen α - und β -Ketten. Die V-Domäne der α - und β -Kette besitzt jeweils drei zusätzliche, hoch variable Schleifen, die so genannten Komplementaritäts-bestimmenden Regionen (englisch *complementary-determining regions*, CDRs) CDR1, CDR2 und CDR3, welche den Antigenerkennungsbereich darstellen^{36,37}. Die CDR1 und CDR2 Schleifen sind Keimbahn-kodiert und daher genetisch nicht variabel²⁶. Dies passt auch mit den Beobachtungen überein, dass sie bei der Bindung des TZR an ein HLA-Molekül nur an den ebenfalls wenig variablen Regionen des HLA-Moleküls binden, nicht aber an den Peptiden. Die CDR3 Schleife hingegen ist in den oben beschriebenen V(D)J Regionen des TZR codiert, in welchen durch die genannten Modifikationen eine hohe Variabilität besteht. Daher ist CDR3 in dem Bereich der α - und β -Kette des TZR lokalisiert (CDR3 α und CDR3 β), der direkt mit den ebenfalls hoch variablen Peptiden des HLA-Komplexes interagiert³⁸. Für eine erfolgreiche Antigenerkennung benötigt die T-Zelle neben diesen spezifischen Rezeptoren noch weitere co-stimulatorische Faktoren. Zum einen ist dies das Differenzierungsantigen 8 (englisch *cluster of differentiation*, CD8), welches neben dem TZR an den HLA-Klasse-I-Peptid-Komplex bindet und dadurch erst einen stabilen Komplex ermöglicht³⁹. Zum anderen bildet der TZR einen Komplex mit CD3. Dabei sind die α - und β -Kette des TZR intrazellulär nicht-kovalent mit dem CD3 verbunden⁴⁰. Das CD3 selbst besteht aus vier Proteinen, die die zwei Heterodimere CD3 $\delta\epsilon$ und CD3 $\gamma\epsilon$ bilden sowie einem Homodimer, dem CD3 $\zeta\zeta$ ⁴¹. Zusätzlich besitzt jeder TZR/CD3 Komplex insgesamt 10 ITAMs (englisch *immune receptor*

tyrosine-based activation motifs): jeweils eins an CD3 δ , CD3 ϵ und CD3 γ und drei an jedem CD3 ζ ⁴². Diese ITAMS dienen als Phosphorylierungsstellen durch die Lymphozyten-spezifische Protein-Tyrosin-Kinase (LCK), welche mit der zytoplasmatischen Domäne des Co-Rezeptors CD8 assoziiert ist und durch die Phosphorylierung der ITAMs schließlich die Signalkaskade der T-Zellen initiiert³⁹. Damit ist der TZR/CD3 Komplex mit seinen Co-Rezeptoren vollständig und kann schließlich effektiv und selektiv an den HLA-Klasse-I-Peptid-Komplexen binden, die präsentierten Antigene erkennen und die Immunantwort initiieren. All dies ist in Abbildung 3 noch einmal schematisch dargestellt.

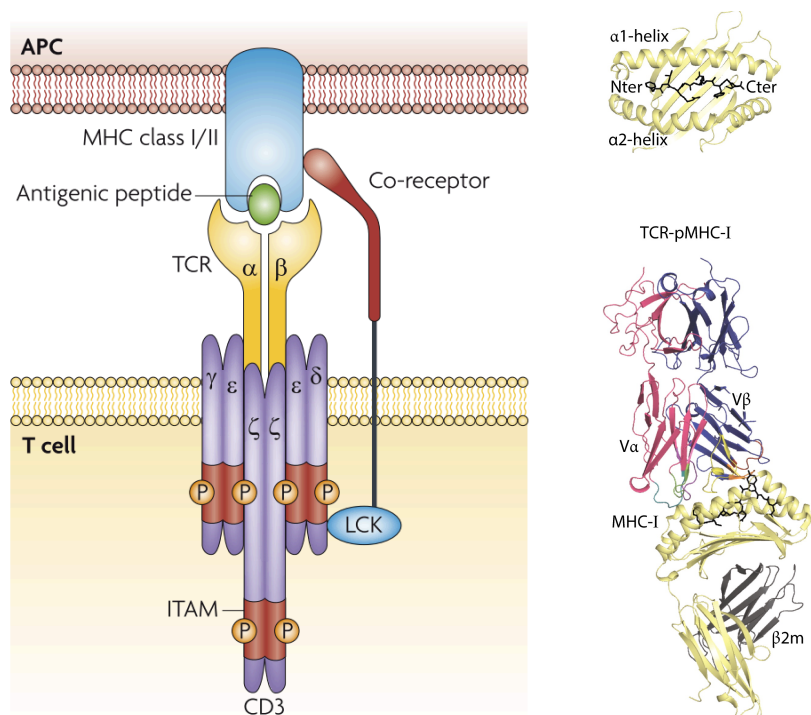


Abbildung 3: HLA-Peptid-Komplex Erkennung über den T-Zell-Rezeptor^{27,39}

An HLA-Moleküle gebundene Peptide werden durch T-Zellen und ihre spezifischen Rezeptoren (TZR) erkannt. Der TZR besteht aus einem Heterodimer aus einer α - und β -Kette, welche jeweils drei CDR-Regionen besitzen (CDR1, CDR2, CDR3). Diese wiederum besitzen ITAMS, welche durch LCK phosphoryliert werden und hierdurch schließlich die Signalkaskade der T-Zellen initiiert wird (links). In der rechten Hälfte ist diese Interaktion zwischen dem HLA-Peptid-Komplex und der T-Zelle als Kristallstruktur dargestellt.

Bevor die Erkennung der Antigene durch den TZR allerdings stattfinden kann, müssen die Peptide generiert, auf die HLA-Moleküle geladen und an die Zelloberfläche transportiert werden.

1.1.3 Antigenprozessierung

Die effektive Generierung von Peptiden zur Beladung auf HLA-Klasse-I-Komplexe und die anschließende Präsentation an T-Zellen ist essentiell für die Aktivierung des adaptiven Immunsystems. Dies ist ein mehrstufiger Prozess, die so genannte Antigenprozessierung⁴³ und ist im Überblick in Abbildung 4 dargestellt.

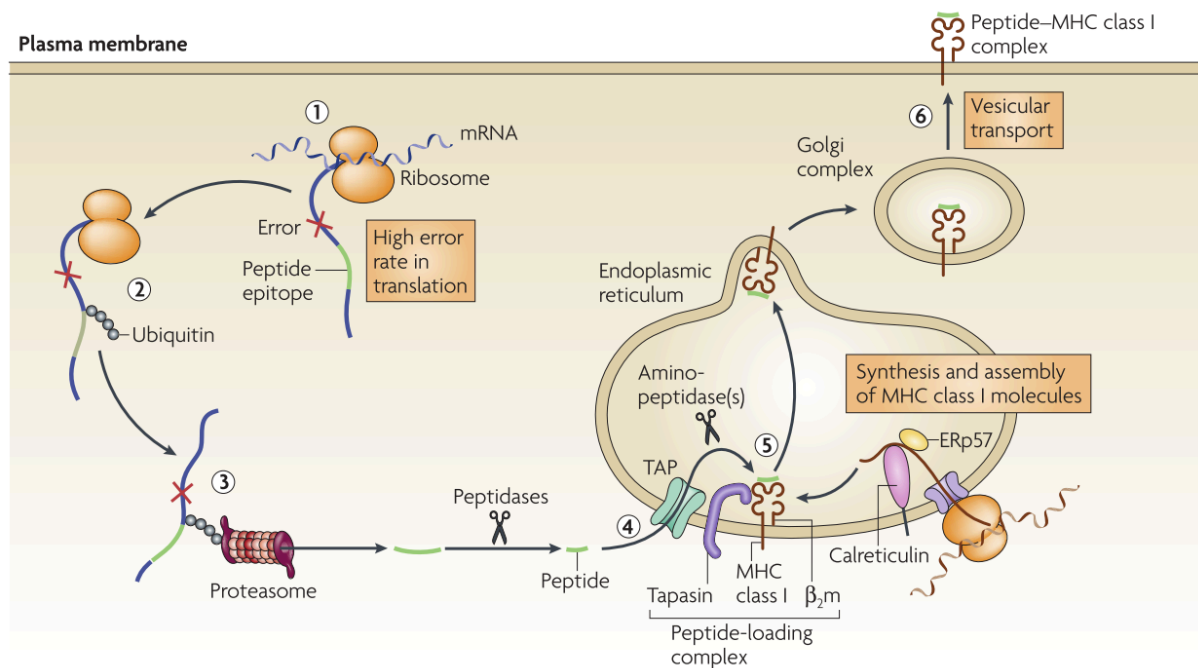


Abbildung 4: Antigenprozessierung⁴⁴

Die Antigenprozessierung dient der Herstellung von HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden. Zu Beginn werden Proteine mit Ubiquitin zum Abbau durch das Proteasom markiert. Nach dem proteasomalen Abbau folgt der Transport aus dem Cytosol in das endoplasmatische Retikulum durch TAP (englisch *transporter associated with antigen presentation*), wo das finale Trimming der Proteine durch Aminopeptidasen stattfindet. Die Peptide werden mit Hilfe eines Peptidladekomplexes auf die HLA-Moleküle geladen, so dass die HLA-Peptid-Komplexe abschließend das ER verlassen und über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche gelangen können.

HLA-Klasse-I-Peptide sind Degradationsprodukte von endogenen Proteinen, viralen oder bakteriellen Proteinen oder Produkten mutierter Gene z.B. im Rahmen einer malignen Erkrankung⁴⁵. Die genaue Herkunft dieser Proteine ist bis heute ein kontrovers diskutiertes Forschungsfeld, doch eine hoch anerkannte mögliche Quelle für endogene Proteine stellt die in den 1990er Jahren durch Yewdell aufgestellte Theorie der DRiPs dar. Dabei handelt es sich um falsch translatierte oder falsch gefaltete Proteine (englisch *defective ribosomal products*)⁴⁶. Ein wichtiger Hinweis für die Hypothese der DRiPs besteht darin, dass sie neu synthetisiert werden, nie ihre reife, funktionale Form erreichen und somit mit einer Halbwertszeit von weniger als 10 Minuten schnell degradiert und präsentiert werden können⁴⁷. Allerdings werden auch langlebige

und stabile zelluläre Proteine nicht als Quelle für präsentierte Peptide ausgeschlossen⁴⁸. Der nächste Schritt der Antigenprozessierung ist unabhängig ihrer Herkunft stets die Ubiquitinierung der Proteine als Markierung für den folgenden Abbau durch das Proteasom. Die Ubiquitinierung erfolgt in einem dreistufigen Prozess. Zuerst wird das Ubiquitin ATP-abhängig durch das Enzym E1 aktiviert, welches mit dem C-Terminus des Ubiquitin einen Thiolester bildet, welcher dann im zweiten Schritt auf das Ubiquitin-Trägermolekül E2 geladen wird. Im dritten und letzten Schritt wird dieser C-Terminus katalysiert durch die Ubiquitin-Protein Ligase E3, über eine Isopeptid-Bindung mit der Aminogruppe des Lysins des Zielproteins gekoppelt. Dadurch entsteht eine Polyubiquitinierung des Zielproteins, welches dieses zum Abbau durch das Proteasom markiert^{49,50}. Das Proteasom ist eine multikatalytische Einheit im Nukleus und Zytoplasma aller eukaryotischen Zellen⁵¹. Das konstitutive 26S Proteasom besteht aus einem katalytisch aktiven 20S Kern, welcher die Form eines hohlen Zylinders besitzt und 19S Einheiten, welche als Deckel auf den beiden Öffnungen des 20S-Komplexes sitzen. Diese Deckel erkennen die zum Abbau markierten Proteine, entfalten sie und bringen sie in das Innere des Proteasoms. Hier gelangen sie zu dem 20S Kern, der wiederum aus vier Ringen mit insgesamt 28 Untereinheiten besteht. Die beiden äußeren Ringe setzen sich aus sieben homologen α -Untereinheiten ($\alpha 1 - \alpha 7$) zusammen, an denen die eingetretenen Proteine erkannt werden und ihnen den Zugang zu den beiden inneren Ringen, an denen die proteolytische Aktivität lokalisiert ist, ermöglicht wird. Diese Ringe bestehen aus sieben homologen β -Untereinheiten ($\beta 1 - \beta 7$), wobei nur $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ Proteaseaktivität zeigen. Die drei proteolytisch aktiven Untereinheiten zeigen dabei verschiedene Spezifitäten: $\beta 1$ spaltet nach sauren Aminosäuren (Glutaminsäure, Asparaginsäure) und zeigt damit eine Caspase-ähnliche Aktivität, $\beta 2$ schneidet nach basischen Aminosäuren (Arginin und Lysin) wodurch ihm eine Trypsin-ähnliche Aktivität zugesprochen wird und $\beta 5$ spaltet nach hydrophoben Aminosäuren (Leucin, Isoleucin, Methionin, Valin, Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan) und vereint damit Chymotrypsin-ähnliche Eigenschaften in sich⁵²⁻⁵⁴. Kommt es beispielsweise aufgrund einer Infektion zur Ausschüttung des Zytokins IFN- γ durch Immunzellen wie Th1-Zellen, CD8⁺ T-Zellen oder NK-Zellen, so führt dies zu einer veränderten Zusammensetzung des Proteasoms und damit zur Expression des so genannten Immunoproteasoms^{55,56}. Von der Grundstruktur ist das Immunoproteasom identisch zu dem konstitutiven Proteasom. Es unterscheidet sich allerdings in den katalytischen β -Untereinheiten: LMP2 (englisch *low molecular weight protein*, LMP) oder $\beta 1i$ ersetzt $\beta 1$, MECL1 (englisch *multicatalytic endopeptidase complex subunit*, MECL) oder $\beta 2i$ ersetzt $\beta 2$ und LMP7 oder $\beta 5i$ ersetzt $\beta 5$ ^{57,58}. Das Immunoproteasom zeichnet sich dadurch aus, dass es durch veränderte Schnittpräferenzen eine gesteigerte Anzahl an Peptiden zur Beladung auf HLA-Klasse-I-Moleküle generiert als das Standard-Proteasom⁵⁹. Aufgrund der Anwesenheit von einer Vielzahl an

Aminopeptidasen und Endopeptidasen im Zytosol der Zelle wie beispielsweise der Puromycin-sensitiven Aminopeptidase (PSA) und der Bleomycin Hydrolase (BH), schafft es nur ein kleiner Teil der generierten Peptide dem Abbau zu Aminosäuren zur Generierung neuer Proteine zu entkommen und durch TAP (englisch *transporter associated with antigen presentation*) in das endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert zu werden⁶⁰⁻⁶². Hierbei transportiert TAP Peptide besonders aufgrund ihrer ersten drei N-terminalen und der letzten C-terminalen AS mit unterschiedlicher Präferenz⁶³. Diese Motive sind in Abbildung 5 dargestellt, wobei die rot gekennzeichneten AS einen negativen und die grün gekennzeichneten AS einen positiven Einfluss auf die TAP-Affinität besitzen.

Murine										Human									
TAP	Position									TAP	Position								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	-0.4	-0.1	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1	0.2	0.3	A	-0.7	-0.1	0.0	0.1	0.0	0.1	0.1	0.0	0.2
C	0.0	-0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	-0.2	-0.1	-0.4	C	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.1	0.0
D	0.0	0.1	0.5	-0.5	0.1	0.1	0.1	0.1	1.2	D	0.6	0.6	0.8	-0.1	0.1	0.1	0.5	0.1	0.8
E	0.1	0.0	0.4	-0.2	0.0	0.1	0.0	0.1	1.1	E	0.7	0.0	0.7	0.0	0.2	-0.1	0.3	0.2	0.7
F	0.3	0.1	0.7	0.0	-0.2	-0.2	-0.4	-0.3	-1.4	F	0.4	-0.2	0.5	-0.2	-0.1	0.0	-0.2	0.1	-1.1
G	0.0	0.3	0.3	0.3	0.0	0.0	0.1	0.1	0.9	G	0.1	0.5	0.7	0.2	0.3	0.1	0.6	-0.2	0.6
H	0.1	0.1	-0.4	0.2	0.0	-0.1	0.0	-0.1	-0.2	H	0.1	0.1	-0.1	-0.1	0.0	0.0	-0.1	0.2	0.2
I	0.0	0.0	-0.4	0.1	-0.1	-0.1	-0.1	0.0	-0.7	I	0.0	-0.2	-0.3	0.0	-0.2	-0.3	-0.4	0.2	-0.2
K	-0.1	-0.1	0.0	0.0	0.1	0.2	0.4	0.1	1.0	K	-0.4	-0.2	0.0	-0.1	0.0	-0.1	0.2	0.1	-0.2
L	0.0	0.2	0.1	0.2	-0.1	-0.2	-0.1	0.1	-0.6	L	-0.2	0.0	0.0	0.0	-0.1	0.0	-0.3	0.0	-0.4
M	-0.2	-0.2	-0.3	0.2	-0.1	-0.1	-0.1	-0.1	-1.2	M	-0.2	-0.2	-0.3	-0.2	-0.1	0.1	-0.3	0.0	-0.1
N	-0.2	0.1	0.3	0.0	0.1	-0.1	0.0	0.1	0.2	N	-0.6	0.3	0.4	0.2	0.2	-0.1	0.1	0.1	0.6
P	0.8	0.9	0.8	0.1	0.1	0.1	0.1	0.3	-0.1	P	0.6	1.3	0.1	0.0	-0.3	-0.1	-0.4	0.0	0.0
Q	0.0	-0.2	0.4	0.1	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1	Q	0.2	-0.4	0.2	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1	0.1
R	-0.3	-0.5	0.0	-0.1	0.1	0.2	0.1	-0.2	0.9	R	-0.6	-0.6	-0.2	-0.1	-0.1	-0.3	0.0	-0.2	-0.6
S	-0.2	-0.1	0.2	0.0	0.1	0.1	0.2	0.0	0.6	S	-0.2	-0.1	0.0	0.1	0.2	0.1	0.4	-0.2	1.0
T	-0.1	0.0	-0.1	-0.1	0.0	0.1	0.2	0.1	0.6	T	-0.1	0.0	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	-0.2	0.3
V	-0.1	-0.2	-0.3	0.0	-0.1	0.0	0.2	0.2	-0.3	V	-0.2	-0.2	-0.3	0.1	0.2	0.0	-0.1	0.0	-0.1
W	0.2	-0.3	-0.4	-0.3	-0.1	-0.1	-0.2	-0.3	-1.1	W	0.2	-0.3	-0.7	-0.1	-0.3	0.1	-0.2	-0.3	-0.4
Y	0.2	-0.1	0.6	0.0	-0.1	-0.1	-0.4	-0.5	-1.0	Y	0.2	-0.3	-0.8	-0.1	-0.1	0.1	-0.4	0.0	-1.3
Offset	2.0									Offset	2.7								

Abbildung 5: Einfluss verschiedener AS auf die Affinität des murinen und humanen TAP-Transporters⁶³

Dargestellt ist die negative (rot) oder positive (grün) Beeinflussung bestimmter AS an bestimmten Positionen eines Peptids mit der Länge von 9 AS auf die Affinität von TAP.

TAP gehört zu den ABC-Transportern (englisch *ATP binding cassette*, ABC) und bildet ein Heterodimer aus TAP1 und TAP2, die durch jeweils eine Transmembrandomäne im ER verankert und für die Bindung von ATP verantwortlich sind⁶⁴. TAP bildet das Zentrum des Peptid-Lade-Komplexes (englisch *peptide loading complex*, PLC) und steht im Prozess der Antigenprozessierung am Übergang vom Zytosol in das ER. Der PLC besteht neben TAP aus der schweren Kette des HLA-Moleküls, dem β 2M, dem Chaperon Tapasin (Tpn), der ER-residenten Oxidoreduktase ERp57 und dem Chaperon Calreticulin⁶⁵. Der erste Schritt der Bildung des PLC besteht in der Bindung der schweren Kette des HLA-Moleküls mit den Chaperonen BiP (englisch *binding immunoglobulin protein*) und dem mit Erp57 assoziierten Calnexin. Als nächstes erfolgt die Bindung des β 2M an diesen Komplex, wodurch der Austausch von Calnexin durch Calreticulin induziert wird. Parallel bindet Tpn an TAP und vereint über seine Bindung an die schwere Kette des HLA-Moleküls sowie an ERp57 alle Komponenten des PLC^{66,67}. Zum besseren Verständnis ist

der PLC noch einmal in Abbildung 6 grafisch dargestellt.

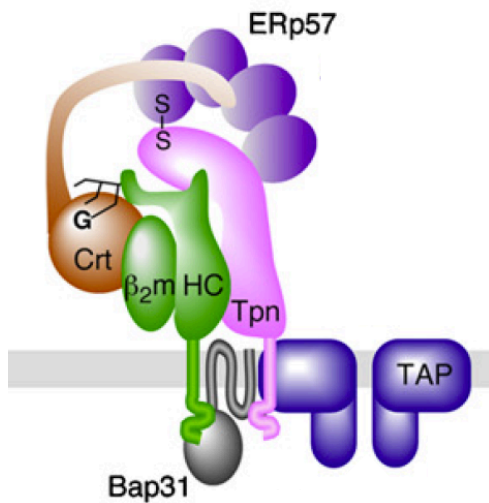


Abbildung 6: Peptidladekomplex (PLC) ⁶⁷

Der Peptidladekomplex dient der Beladung von Peptiden auf HLA-Moleküle. Er besteht aus dem ABC-Transporter TAP, der schweren Kette des HLA-Moleküls mit dem β_2m , dem Chaperon Tapasin (Tpn), der ER-residenten Oxidoreduktase ERp57, dem Chaperon Calreticulin (Crt) und dem Export-Rezeptor Bap31.

Die bedeutenden Rollen von TAP und Tpn konnten in verschiedenen *in vitro* als auch *in vivo* Modellen gezeigt werden. So haben humane Zelllinien, in denen die HLA-Moleküle nicht in der Lage sind mit TAP zu assoziieren, nicht mehr die Fähigkeit Peptide effizient auf die HLA-Moleküle zu laden⁶⁸. Im murinen Modell zeigen Mäuse mit einer Tpn-Defizienz weniger stabile HLA-Peptid-Komplexe und daraus resultierend eine schlechtere Immunantwort bei einer Infektion^{69,70}. Insofern sie bereits durch den Abbau im Proteasom die richtige Länge besitzen, können nun die durch TAP in das ER transportierten Peptide auf die HLA-Klasse-I-Moleküle geladen werden. Ist dies der Fall, dissoziiert der HLA-Peptid-Komplex zusammen mit dem Export-Rezeptor Bap31 vom PLC. Anschließend verlassen sie in sekretorischen COP II Vesikeln das ER und werden durch den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert, wo sie die Antigene zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen präsentieren⁶⁷. Meist generiert das Proteasom allerdings Peptide, die am C-Terminus kompatibel zu HLA-Klasse-I-Molekülen, N-terminal aber verlängert sind und deshalb ein N-terminales Trimming durch Aminopeptidasen benötigen⁷¹. Die Forschung auf diesem Feld ist mit ihren Anfängen vor rund 15 Jahren noch sehr jung und auch bis heute sind noch nicht alle Fragen zu den Mechanismen und den beteiligten Aminopeptidasen geklärt. Im Jahr 2001 wurden die ersten Beobachtungen gemacht, dass es ER-residente Aminopeptidasen gibt, die für das N-terminale Trimming von Vorläufer-Peptiden verantwortlich sind. So wurde festgestellt, dass es Aminopeptidasen im ER gibt, welche N-terminale Enden von Peptiden mit Ausnahme von Prolin

schneiden⁷² und dass der Prozess des Trimming hoch effizient und rapide innerhalb von wenigen Minuten stattfindet⁷³. Auch Versuche mit dem OVA-Modell-Antigen SIINFEKL bestätigten, dass es eine ER-residente Aminopeptidase gibt, die für die finale Prozessierung des Peptids verantwortlich ist⁷⁴. Doch alle anfänglichen Studien konnten keine genaue Peptidase benennen, durch die das Trimming stattfindet. Dies gelang erstmals Saric *et. al*, die im Jahr 2002 mit ERAP1 (englisch *endoplasmic reticulum aminopeptidase 1* oder *adipocyte-derived leucine aminopeptidase*, A-LAP) die erste Aminopeptidase benennen konnten⁷⁵. ERAP1 ist eine Zink-Metallopeptidase, gehört zur Oxytocinase Subfamilie der M1 Aminopeptidasen, ist durch IFN- γ induzierbar und kürzt Vorläufer-Epitope unter anderem auf die für HLA-Klasse-I-Moleküle optimale Länge von 8-9 Aminosäuren⁷⁶. ERAP1 schneidet mit Ausnahme von Prolin alle N-terminalen Reste, allerdings mit unterschiedlicher Präferenz und damit einhergehend auch unterschiedlicher Effizienz. Bevorzugt schneidet ERAP1 hydrophobe Reste wie Leucin, gefolgt von Methionin und Cystein, dagegen aber kaum saure und basische Reste⁷⁶. Aufgrund dieser unterschiedlichen Präferenzen ist es naheliegend, dass es noch weitere Aminopeptidasen geben muss. Die zweite und damit auch letzte bisher bekannte ist ERAP2 (auch *leukocyte-derived aminopeptidase*, L-RAP). ERAP1 und ERAP2 teilen eine Sequenzhomologie von etwa 50%, ERAP2 aber schneidet bevorzugt basische Aminosäuren und hier besonders Arginin^{77,78}. ERAP1 liegt als murines Homolog in Form von ERAAP vor, von ERAP2 ist bisher kein Homolog beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass ERAP1 und ERAP2 auch als Heterodimer in humanen Mikrosomen vorliegen (etwa 30%) und dadurch ihr Wirkungsspektrum noch einmal erweitern. Dennoch wird bis heute ERAP1 durch die Expression in einem größeren Spektrum an Geweben und einer größeren Substratspezifität die dominante Rolle als Aminopeptidase im ER zugesprochen⁷⁹. Aufgrund der Diversität der durch HLA-Komplexe präsentierten Antigene und der komplexen Maschinerie der Antigenprozessierung ist es naheliegend, dass es noch weitere, bisher unbekannte Aminopeptidasen gibt. Ein möglicher Kandidat hierfür ist ERMP1 (englisch *endoplasmic reticulum metalloproteinase 1*), welches von Frau Dr. Nadja Akkad im Rahmen ihrer Dissertation am Institut für Immunologie identifiziert wurde.

1.1.4 ERMP1

ERMP1 ist im humanen und murinen Organismus als ER-ständige Peptidase exprimiert und gehört zu den Zink-Metallopeptidasen. Bis zum heutigen Zeitpunkt gibt es nur zwei Publikationen, die sich mit ERMP1 beschäftigen. Die erste aus dem Jahr 2007 beschreibt ERMP1 (FxnA) als entscheidendes Enzym in der Entwicklung der Eierstöcke von Ratten, genauer gesagt in Signalwegen zur Organisation von somatischen Zellen und Oozyten in Ovarialfollikeln⁸⁰. In der Dissertation von Frau Dr. Nadja Akkad im Jahr 2011 wurde ERMP1 eine neue, bisher nicht bekannte Rolle als ER-residente Aminopeptidase zur Herstellung von HLA-Klasse-I-Peptiden zugesprochen⁸¹. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Expression von ERMP1 wie viele andere Komponenten der Antigenprozessierungs-Maschinerie durch IFN- γ reguliert wird, ERMP1 in lymphatischen Geweben stark exprimiert ist und mit TAP und MHC-1-Molekülen im ER kolokalisiert. Außerdem konnte ERMP1 eine Beeinflussung der MHC-Klasse-I-Expression in Abhängigkeit des Haplotyps nachgewiesen werden, sowie eine Auswirkung auf die Präsentation des OVA-Epitops SIINFEKL. Erst kürzlich (September 2016) ist eine Veröffentlichung erschienen, die ERMP1 erstmals mit malignen Geschehnissen in Verbindung bringt⁸² und damit eine mögliche Bestätigung der Daten von Frau Dr. Nadja Akkad darstellt. Hier wird gezeigt, dass ERMP1 in Brustkrebs, kolorektalen Karzinomen, Lungenkrebs und Ovarialkarzinomen stark exprimiert ist und sowohl die Proliferation als auch Migration und Invasivität von Krebszellen signifikant verringert. Diese Arbeit zeigt außerdem die Notwendigkeit des besseren Verständnisses der zugrundeliegenden Mechanismen im Bereich der Präsentation von Antigenen über HLA-Klasse-I-Komplexe, um eine effiziente Anti-Tumor-Therapie hervorzubringen.

1.2 Krebsimmuntherapie

Neben der klassischen Chemotherapie zur Behandlung von Krebserkrankungen haben sich in den letzten Jahren immer mehr immuntherapeutische Ansätze etabliert. Hier sind vor allem Erfolge durch die Behandlung mit so genannten Checkpoint-Inhibitoren zu nennen. Das Wirkprinzip dieser Inhibitoren liegt darin, die Interaktion von inhibitorischen Rezeptoren auf der T-Zelle mit ihren Liganden zu unterbinden und dadurch die Effektorfunktion der T-Zelle zu reaktivieren⁸³. Die größten Erfolge konnten bisher mit Antikörpern gegen die inhibitorischen Rezeptoren CTLA-4 (englisch *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) und PD-1 (englisch *programmed cell death protein 1*) erzielt werden^{84,85}. Da sich aber in den letzten Jahren gezeigt hat, dass eine Vielzahl der Krebspatienten nicht auf die Behandlung mit Checkpoint-Inhibitoren anspricht, ist es notwendig weitere immuntherapeutische Ansätze zu entwickeln. Aufgrund der großen Bedeutung von HLA-Molekülen und der Erkennung ihrer Antigene über T-Zellen für ein funktionierendes Immunsystem ist es naheliegend, dass maligne Erkrankungen mit dem Expressionslevel von HLA-Klasse-I-Molekülen zusammenhängen als auch, dass verschiedenste (immunvermittelte) Erkrankungen mit bestimmten HLA-Varianten assoziiert sind. Daher ist das HLA-System sowie die Interaktion der HLA-Moleküle mit T-Zellen ein attraktives Ziel zur Weiterentwicklung der Immuntherapie.

1.2.1 HLA-assoziierte Erkrankungen

Erste Erkenntnisse zu Zusammenhängen zwischen bestimmten HLA-Allelen und Erkrankungen gehen bereits auf die 1970er Jahre zurück. So konnten zwei Arbeitsgruppen um Schlosstein und Brewerton in den Jahren 1973 und 1974 eine Korrelation zwischen der Expression von HLA-B-27 und dem Krankheitsbild der ankylosierenden Spondylitis (Morbus Bechterew) darstellen^{86,87}. Heute ist bekannt, dass über 90% der Betroffenen HLA-B-27 positiv sind, wohingegen die Verteilung in der Normalbevölkerung bei nur 8-12% liegt⁸⁸. In großangelegten genomweiten Assoziationsstudien konnten bisher zahlreiche Verbindungen zwischen HLA-Allelen und Erkrankungen gezogen werden. Nahezu alle bekannten Autoimmunerkrankungen als auch viele inflammatorische und infektiöse Erkrankungen zeigen eine HLA-Assoziation. Um nur ein paar zu nennen sind dies neben der ankylosierenden Spondylitis z.B. die Typ1 Diabetes (HLA-DRB und HLA-DQ), rheumatoide Arthritis (HLA-DRB1 und HLA-DQA1), systemischer Lupus erythematodes (HLA-DRB1) und Multiple Sklerose (HLA-DRB1)^{89,90}. In 2017 konnten auch bisher unbekannte HLA-DRB1-Assoziationen mit malignen Erkrankungen wie Lymphomen, Zervixkarzinomen, malignen Neoplasien der weiblichen Brust und Krebserkrankungen des Gehirns und Nervensystems

aufgedeckt werden⁸⁹. Bezüglich des Zervixkarzinoms konnte außerdem eine signifikant verstärkte Anwesenheit von HLA-B-40:06 sowie eine signifikant verringerte Anwesenheit von HLA-B-15:02 in den Patienten verglichen mit gesunden Probanden gezeigt werden⁹¹. Des Weiteren zeigen Patienten mit Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen eine geringe Häufigkeit von HLA-B:44, aber ein vermehrtes Auftreten von HLA-B:13, HLA-B:52 und HLA-B:57⁹². Diese HLA-Assoziation bestimmter Erkrankungen birgt auch eine Therapiemöglichkeit. Da wie in Abbildung 2 erläutert jedes HLA-Allel spezifische Ankerpositionen und damit auch spezifische Peptidsequenzen aufweist, können nach erfolgreicher Epitop-Vorhersage auf die Erkrankung abgestimmte T-Zellen hergestellt und zur Therapie eingesetzt werden.

1.2.2 Identifizierung von T-Zell-Epitopen und TZR-Manipulation

Im Rahmen einer Immunantwort werden durch die Antigenprozessierung HLA-Allel spezifische Peptide aus zuvor von der Zelle aufgenommenen Proteinen generiert und an T-Zellen präsentiert. Hierbei definiert jedes HLA-Allel eigene Sequenzvoraussetzungen für die HLA-Peptide, so dass sich die Möglichkeit ergibt, Vorhersagen von potentiellen Liganden eines spezifischen HLA-Alles für jede beliebige Proteinsequenz zu treffen^{93,94}. Eins der meist verwendeten Programme zur Epitopvorhersage ist das durch die Arbeitsgruppe von Hans-Georg Rammensee entwickelte SYFPEITHI⁹⁵. Die Vorhersage beruht hierbei auf natürlich vorkommenden Liganden, welche direkt durch Analysen bezüglich der Peptidsequenz, MHC-Spezifität, Ankerpositionen und Quellproteinen nachgewiesen werden konnten. So ergibt sich als Ausgabe ein Wert, welcher mit der Wahrscheinlichkeit zur Präsentation als Ligand korreliert. Ein weiteres stark genutztes Programm stellt NetMHC dar^{96,97}. NetMHC arbeitet mit Sequenzabgleichmethoden basierend auf künstlichen neuronalen Netzen zur Epitopvorhersage. Als Ausgabe generiert NetMHC verschiedene Parameter wie beispielsweise die Aminosäuresequenz des potentiellen Liganden, eine Bindungswahrscheinlichkeit und einen Rang, der den Liganden als stark oder schwach bindend einstuft. Mit Hilfe von Programmen wie eben dieser wurden zahlreiche heute bekannte HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden aus Tumorantigenen identifiziert. Dazu zählen z.B. *MAGE-3*⁹⁸, *Survivin*⁹⁹ und *TRP2*¹⁰⁰. Diese und auch durch andere Methoden entdeckten Tumorantigene wie *NY-ESO-1*¹⁰¹ oder *MUC1*¹⁰² stellten die Grundlage für eine neue Richtung der Tumorimmuntherapie, die TZR-Manipulation dar. Durch Manipulation an TZRs ist es möglich, Tumorantigen-spezifische T-Zellen *in vitro* in einer therapeutisch vertretbaren Zeit sowie in ausreichender Menge herzustellen, so dass bereits klinische Erfolge in Patienten mit metastasierenden Melanomen¹⁰³, Kolorektalkarzinomen¹⁰⁴, Synovialsarkomen¹⁰⁵ und multiplen Myelom¹⁰⁶ verzeichnet werden konnten. Auch Neoantigene, die durch somatische Punktmutationen im Tumorgewebe entstehen, repräsentieren gut geeignete Ziele solcher Immuntherapien. Dabei werden TZR-Sequenzen retroviral in T-Zellen eingebracht, die spezifisch solche zuvor identifizierten Neoantigene erkennen und dadurch zu einer Eliminierung des Tumors führen^{107,108}. Diese neuen Wege der Krebsimmuntherapie über adoptiven T-Zell-Transfer zeigen einen Ansatz auf, der durch die Identifizierung neuer Epitope und neuer Neoantigene in einer Tumorentitätsspezifischen oder letztendlich in einer personalisierten Krebstherapie mündet. Dies bedarf eines tieferen Verständnisses der HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden-Präsentation, wodurch auch die Programme zur Epitopvorhersage optimiert werden können.

1.3 Personalisierte Krebstherapie

Die Tatsache, dass Krebs sowohl eine extrem hohe Heterogenität zwischen individuellen Tumoren als auch eine hohe intratumorale Heterogenität aufweist¹⁰⁹ zeigt die Notwendigkeit, aber auch die Herausforderungen einer personalisierten Krebstherapie. Die Auswahl möglicher Antigene ist unter anderem dadurch limitiert, dass diese gar nicht oder zumindest nur sehr gering auf normalen Körperzellen exprimiert werden dürfen, um zu starke Nebenwirkungen zu vermeiden. Bisher haben schon mehrere Peptid-Vakzinierungen den Weg in die Klinik gefunden. So haben Noguchi und Kollegen die Gesamtüberlebensdauer von Patienten mit Prostatakrebs durch die Behandlung mit personalisierten Peptid-Vakzinen auf 17,8 Monate im Vergleich zu 10,5 Monaten in der Kontrollgruppe erhöht¹¹⁰. Ein anderes Beispiel ist die Phase-1- und Phase-2-Studie von Walter *et. al.*, in der eine Peptid-Mischung aus 9 HLA-A-02-restringierten und einem HLA-DR-restringierten Peptid zur Behandlung von Patienten mit Nierenzellkarzinom verwendet wurde¹¹¹. Die Tumorantigene wurden zuvor mit der XPRESIDENT-Plattform, die eine Kombination aus massenspektrometrischen Analysen, Genexpressionsanalysen, *in vitro* T-Zell-Versuchen und bioinformatischen Analysen verwendet, identifiziert^{112,113}. Die Studie konnte zeigen, dass die Behandlung mit der Peptid-Mischung keine schweren oder gar tödlichen Nebenwirkungen hervorruft und eine positive Korrelation zwischen der Behandlung und der Gesamtüberlebensrate darstellen. Weitere Arbeiten mit einzelnen oder multiplen Antigenen zeigten erfolgreiche Therapien z.B. gegen Brustkrebs (Antigen: Her2/neu)¹¹⁴, Melanome (Antigene: Melan-A, Tyrosinase, gp100, MAGE-A3, MAGE-A1, Survivin)¹¹⁵, nicht-kleinzellige Lungenkarzinome (Antigen: Telomerase)¹¹⁶ und vulväre intraepitheliale Neoplasien (Antigene: HPV-16 Onkoproteine)¹¹⁷. Diese Tumorantigene sind in verschiedene Typen wie Tumor-Hoden-Antigene (Antigene, die sich nur auf Krebszellen und bei gesundem Gewebe nur in den männlichen Keimzellen befinden), durch Mutationen entstandene Neoantigene oder gewebsspezifische Genprodukte einzuteilen¹¹⁸. All diese Arten von Antigenen sind für eine personalisierte Vakzinierung geeignet und können in verschiedenen Formen verwendet werden: z.B. als Protein¹¹⁹, als Viruskonstrukt¹²⁰, als RNA¹²¹ oder auch als Peptide, die exakt den natürlichen HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden widerspiegeln¹¹¹. Um die letztgenannten HLA-Peptide synthetisch herzustellen und zur personalisierten Krebstherapie zu nutzen, ist eine umfangreiche Analyse der Gesamtheit der präsentierten HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden, dem so genannten Ligandom essentiell. Hierzu hat sich in den letzten Jahren vor allem die Massenspektrometrie als besonders geeignete Methode etabliert.

1.3.1 Massenspektrometrische Analysen des HLA-Klasse-I-Ligandoms

Die Identifikation von HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden ist ein wichtiger Schritt in der Entwicklung von neuen personalisierten Peptid-Vakzinierungs-Strategien. Hierbei spielt seit einigen Jahren die Massenspektrometrie eine immer größere Rolle. Ein Massenspektrometer besteht definitionsgemäß aus drei Teilen: einer Ionenquelle, einem Analysator und einem Detektor. An der Ionenquelle wird die Probe ionisiert und in die Gasphase überführt. Anschließend kann der Analysator die Ionen gemäß ihres Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z) auftrennen bevor sie final am Detektor erfasst werden. Diese drei Komponenten sind in verschiedenen technischen und physikalischen Varianten erhältlich und werden in unterschiedlichen Geräten variabel kombiniert, wie von Aebersold und Mann in ihrem Review näher beschrieben¹²². In der vorliegenden Dissertation wurde mit dem Synapt G2-S von Waters gearbeitet, dessen Aufbau in Abbildung 7 schematisch dargestellt ist (übernommen von Kuharev¹²³, adaptiert nach Pringle et al.¹²⁴).

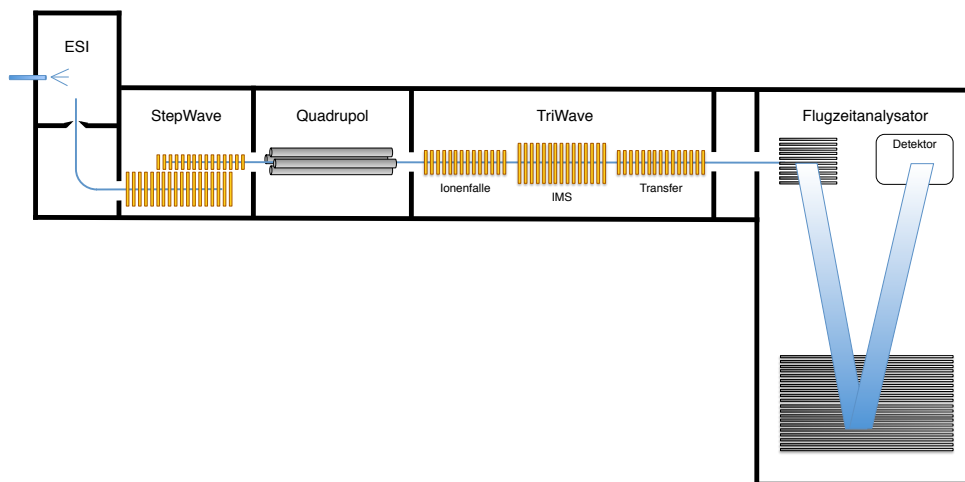


Abbildung 7: Schematischer Aufbau des Waters Synapt G2-S^{123,124}

Das Synapt G2-S ist ein Flugzeitmassenspektrometer (TOF-MS), welches die Proben über eine ESI-Quelle ionisiert und die Ionen anschließend über eine Ionentransfereinheit (*StepWave*) zum Quadrupol leitet. Diesem ist eine *TriWave*-Einheit nachgeschaltet, die eine Trennung nach Ionenmobilität ermöglicht, aber auch als Ionenfalle und Kollisionszelle dienen kann. Letztendlich werden die Ionen dem Flugzeitanalysator zugeführt und am Detektor erfasst.

Bezüglich der Ionenquelle haben sich im Bereich der Proteomik vor allem schonende Ionisationsverfahren wie die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (englisch *matrix-assisted laser desorption/ionisation*, MALDI)¹²⁵ und die Elektrospray-Ionisation (ESI)¹²⁶ durchgesetzt. Wie in Abbildung 7 zu sehen, nutzt das Synapt G2-S die ESI, bei welcher die Probe durch eine wenige μm dicke Kapillare geleitet wird¹²⁷. Beim Austritt aus dieser unter Spannung stehenden Kapillare bildet sich durch das Auftreffen des Analyts auf ein orthogonal angelegtes

elektrisches Feld ein so genannter Taylor-Konus, so dass sich die Ionen in Form feiner geladener Tröpfchen von der Kapillare lösen¹²⁸. Durch die zumeist stattfindende Einleitung von Stickstoffgas wird an dieser Stelle die Verdampfung des Lösungsmittels unterstützt, so dass die Größe der Tröpfchen sinkt und ihre Oberflächenladung steigt, was letztendlich zum vollständigen Übergang des Analyts in die Gasphase führt und dieser als Spray auf das Massenspektrometer auftrifft. Die so erzeugten Ionen werden im Synapt G2-S durch die Ionentransfereinheit (StepWave) zum Analysator, dem Quadrupol geleitet. Der Quadrupol besteht aus parallel angeordneten Stabelektroden, die ein elektrisches Wechselfeld erzeugen und die beschleunigten Ionen nach ihrem m/z selektieren¹²⁹. Beim Synapt G2-S wird das Prinzip der Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) angewandt. Das bedeutet, dass wie beschrieben zunächst die intakten Ionen (Vorläuferionen) analysiert werden und anschließend in einer Kollisionszelle durch Kollisionen mit neutralen Gasmolekülen wie Helium, Stickstoff oder Argon fragmentiert (Fragmentionen) und erneut massenspektrometrisch analysiert werden^{130,131}. Diese im Synapt G2-S angewandte Technologie wird als kollisionsinduzierte Dissoziation (englisch *collision induced dissociation*, CID) bezeichnet. Dabei beschleunigen die Ionen nach jeder Kollision mit einem Gasmolekül neu, bis es zur nächsten Kollision kommt. Bei diesen Zusammenstößen des Analyts mit einem Gasmolekül nimmt dieser einen Teil der Kollisionsenergie auf, so dass es zu einem Anstieg der inneren Energie und dadurch letztendlich zur Fragmentierung des Analyts kommt. Jede Ionenspezies besitzt eine für ihre Ladung und Struktur charakteristische Geschwindigkeit im elektrischen Feld, die so genannte Driftgeschwindigkeit, die die Identifizierung des Analyts erlaubt¹³². Das Verhältnis der auftretenden Geschwindigkeiten zur Stärke des elektrischen Felds wird als Ionenmobilität und die so stattfindende Analyse der Proben als Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS) bezeichnet¹³³. Durch die zusätzliche Analyse der Ionenmobilität ergibt sich die Möglichkeit, isomere Moleküle, welche die gleiche Masse und Ladung aber eine unterschiedliche Struktur aufweisen, zu unterscheiden. Letztendlich gelangen die Ionen zum Flugzeitanalysator (englisch *time of flight mass spectrometry*, TOF-MS), wo sie final in Abhängigkeit von ihrem m/z zu unterschiedlicher Zeit am Detektor eintreffen und erfasst werden.

Bei der Analyse von komplexen Proben werden diese vor der massenspektrometrischen Analyse chromatographisch aufgetrennt. Dabei wird die ESI-Quelle an ein Flüssigkeitschromatographie-System (englisch *liquid chromatography*, LC) gekoppelt. Meist kommt hierbei die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (englisch *high performance LC*, HPLC) zum Einsatz, bei welcher durch stete Weiterentwicklung der Trennleistung heutzutage Partikel mit einer Größe von etwa 3,5µm verwendet werden. Durch die dadurch mögliche Reduktion des Durchmessers der Chromatographiesäulen ergibt sich eine um etwa das 4000-fache gesteigerte Sensitivität. Bei diesen Systemen reichen wenige Nanoliter der zu analysierenden Proben aus, weshalb man auch

von nanoLC spricht¹³⁴. In den letzten Jahren wurde auch diese Technik immer weiterentwickelt, so dass die modernsten Systeme die *ultra-performance liquid chromatography* (UPLC) nutzen. Dabei werden Partikel mit einer Größe von lediglich 1,7µm verwendet, was letztendlich zu einer optimierten Dauer der Experimente sowie gesteigerter Sensitivität und Auflösung führt¹³⁵.

Zur Datenakquisition stehen drei Methoden zur Verfügung: die datenabhängige Akquisition (englisch *data dependent acquisition*, DDA), die gezielte Akquisition und die datenunabhängige Akquisition (englisch *data independent acquisition*, DIA).

Bei der gezielten Akquisition werden nur vor der Messung festgelegte Proteine detektiert und quantifiziert. Die hierbei am häufigsten angewandte Methode stellt die *selected reaction monitoring* (SRM) dar, wobei zu dem zu analysierenden Protein passende Vorläuferionen und die korrespondierenden Fragmentionen gezielt analysiert werden. Dadurch stellt die gezielte Akquisition die sensitivste Methode dar, kann aber durch die benötigten Vorkenntnisse nur eine geringe Abdeckung des gesamten Proteoms erzielen¹³⁶. Bei der DDA dagegen kann die höchste Abdeckung des Proteoms erreicht werden. Hierbei werden in einem so genannten MS1-Scan alle Vorläuferionen erfasst und automatisch ausgewertet. Anhand dieser Auswertung werden anschließend die Ionen mit der höchsten Signalintensität dem MS2-Scan zugeführt, wo sie erneut fragmentiert und analysiert werden. So ergeben sich zwei Spektren (Vorläuferionenspektrum und Fragmentionenspektrum) mit sich ergänzenden Informationen, wobei die Informationen aus dem Fragmentionenspektrum eindeutig der passenden Vorläuferionenspezies zugeordnet werden können¹³⁷. Durch diese Art der Datenakquisition und der Tatsache, dass keinerlei Vorabwissen über die Probe notwendig ist, ergibt sich die hohe Abdeckung des Proteoms sowie die Möglichkeit des quantitativen Vergleichs mehrerer Proben. DDA weist aber auch Limitierungen auf, welche sich beispielsweise in einer nicht reproduzierbaren Auswahl der Vorläuferionen, *Under-sampling* und langen Messzeiten zeigen^{138,139}. Diese Limitationen umgeht die DIA, da weder eine Analyse der Vorläuferionen noch eine Vorkenntnis über die zu identifizierenden Proteine benötigt wird. Bei der DIA erfolgt keine serielle, sondern eine parallel stattfindende Fragmentierung von nahezu allen Vorläuferionen, was sowohl in einer Zeitersparnis als auch einer hohen Reproduzierbarkeit resultiert. Durch die zusätzliche Kombination von DIA mit IMS und die dadurch erhöhte Fragmentierungseffizienz konnte eine signifikante Steigerung der Abdeckung des Proteoms erreicht werden, welche nahezu identisch mit der von DDA-Methoden ist¹⁴⁰.

Zur Quantifizierung von Proteinmengen mittels LC-MS/MS stehen zwei Methoden zur Verfügung – die Quantifizierung durch die Markierung mit Isotopen und die markierungsfreie Proteinquantifizierung. Für die Markierung mit Isotopen haben sich die Methoden der Isotopen-kodierten Affinitätsmarkierung (englisch *Isotope-coded affinity tag*, ICAT) und der stabilen Isotopen-Markierung durch Aminosäuren in Zellkultur (englisch *stable isotope labeling with amino*

acids in cell culture, SILAC) etabliert^{141,142}. In beiden Verfahren werden leichte und schwere Varianten eines Isotops mit bekannten Masseunterschieden verwendet, um zwei Proteome quantitativ miteinander zu vergleichen. Bei ICAT werden diese Isotope durch funktionelle Gruppen chemisch an spezifische Seitenketten der Probe gekoppelt und sind zusätzlich durch beispielsweise Biotin markiert, so dass die mit Isotopen ummantelten Peptide zur Fehlerminimierung durch eine Avidin-Affinitätschromatographie isoliert werden können. Bei SILAC macht man sich den normalen Metabolismus der Zelle zu nutze und fügt dem normalen Zellkulturmedium zum Beispiel schwer markiertes Arginin hinzu, wodurch die Proteine bei der Proteinbiosynthese markiert werden. Anhand der resultierenden unterschiedlichen Massen können die markierten Peptide identifiziert werden. Aufgrund der hohen Kosten und begrenzten Verfügbarkeit von Isotopen zur Markierung ist bei diesen Methoden die Anzahl an Proben limitiert, so dass sich in den letzten Jahren markierungsfreie Methoden immer stärker etabliert haben und auch in der vorliegenden Arbeit angewandt wurden. Bei der markierungsfreien Quantifizierung wird sich die Tatsache zu nutze gemacht, dass ein Zusammenhang zwischen der Konzentration des Analyts und der Signalintensität im Massenspektrometer besteht. Das heißt, die Signalintensitäten können zur Quantifizierung herangezogen werden, wobei im Rahmen dieser Arbeit die so genannte TOP3-Methode verwendet wurde¹⁴³. Dabei wird die Proteinabundanz anhand der durchschnittlichen Signalintensität der drei meist abundanten Peptide des Proteins ermittelt.

Die Identifikation der massenspektrometrisch charakterisierten Proteine erfolgt durch Datenbanken mit bekannten Proteinsequenzen wie beispielsweise die im Rahmen der vorliegenden Dissertation verwendeten Uniprot/Swissprot Datenbank¹⁴⁴. Dabei erfolgt die Identifikation anhand verschiedener Suchalgorithmen, wobei hier besonders SEQUEST¹⁴⁵, MASCOT¹⁴⁶, PLGS¹⁴⁷ und PEAKS¹⁴⁸ zu erwähnen sind. Dabei werden die gemessenen Spektren mit theoretischen Spektren von *in silico*-Peptiden verglichen.

Mit Hilfe von Massenspektrometern wie z.B. dem hier beschriebenen Synapt G2-S und den beschriebenen Akquisitionen – und Identifizierungsmethoden ist es nun also unter anderem möglich neben der Gesamtheit der Proteine, dem Proteom auch die Gesamtheit der präsentierten HLA-Liganden, das Ligandom zu identifizieren und zu analysieren. Die ersten Beschreibungen von Arbeiten zur Isolierung von HLA-Peptiden durch massenspektrometrische Analysen gehen auf das Jahr 1990 zurück, in denen Rötzschke *et al.* HLA-assozierte Viruspeptide aus infizierten Zellen isoliert haben¹⁴⁹. Zwei Jahre später konnten Hunt *et al.* die erfolgreiche Isolation von zelleigenen Peptiden durchführen¹⁵⁰. Seitdem hat sich die Technik immer weiter entwickelt, so dass sie mittlerweile zu vielen erfolgreichen Studien beigetragen hat, von denen nur manche genannt werden können: Identifizierung eines neuen Tumorantigens in Kolon- und Lungenkarzinomzellen

(SUV39H2)¹⁵¹, HDAC1-Peptide (englisch *histone deacetylase 1*) zur Vakzinierung von Patienten mit Ovarialkarzinom¹⁵², Ermittlung von Nierenzellkarzinom-assoziierten Antigenen mit T-Zell-Reaktivität (PLOD2, LOX, ENEP, TGFBI)¹⁵³, Herstellung einer Patienten-spezifischen Peptidmischung zur Vakzinierung gegen metastasierendes Gallengangkarzinom mit andauernder Remission des Patienten seit 2013¹⁵⁴, oder auch die Charakterisierung eines Sets bestehend aus 58 Myelom-assoziierten Antigenen, die in der Lage sind eine T-Zell-Reaktion auszulösen¹⁵⁵. Für die Ligandomanalysen haben sich zwei Methoden etabliert: die milde saure Elution und die Immunoaffinitätsaufreinigung (englisch *immunoaffinity purification*, IP). Bei der milden sauren Elution werden die Zellen für wenige Minuten mit einem Zitronensäure-Puffer mit einem pH von 3 inkubiert, was zu einer Denaturierung der HLA-Moleküle führt, so dass die Peptide von ihnen gelöst und analysiert werden können¹⁵⁶. Diese Methode ist allerdings auf Einzelsuspensionen beschränkt, so dass sie nur für einen kleinen Anteil an Fragestellungen geeignet ist. Bei der IP hingegen werden HLA-spezifische Antikörper genutzt, um die HLA-Peptid-Komplexe beispielsweise aus einem Zelllysate zu isolieren und die Liganden anschließend durch saure Elution und anschließende Größenfiltration oder Umkehrphasenchromatographie von den Komplexen zu trennen^{157,148}. Diese Methode bietet viele Vorteile: anwendbar in Zelllinien und Geweben, hoch spezifisch durch die Verfügbarkeit einer Vielzahl von HLA-Allel-spezifischen Antikörpern, anwendbar für HLA-Klasse-I und HLA-Klasse-II¹⁵⁸. Aufgrund dieser Punkte hat sich die IP zur Methode der Wahl zur Isolierung von HLA-Liganden etabliert und wurde auch im Rahmen dieser Dissertation verwendet und optimiert und ist daher im Ergebnisteil detailliert erläutert. All diese Entwicklungen im Bereich der Identifikation von HLA-Peptid-Liganden zeigen, dass sowohl die Methodik der massenspektrometrisch basierenden Ligandomanalyse als auch das Verständnis der Prozesse der Antigenprozessierung und -präsentation immer mehr an Bedeutung gewinnen und damit ein sich stets weiterentwickelndes Forschungsfeld darstellen.

1.4 Zielsetzung

Die Antigenprozessierung und –präsentation stellt einen zentralen Aspekt der Immunologie dar. Mit Hilfe von spezifischen Aminopeptidasen werden Vorläuferepitope auf die korrekte Länge getrimmt, um effizient auf HLA-Klasse-I-Moleküle geladen und durch diese CD8⁺ zytotoxische T-Zellen präsentiert zu werden, wodurch eine Immunantwort ausgelöst wird.

Da sich in den letzten Jahren gezeigt hat, dass Mutationen in Tumoren zur Präsentation von Tumor-spezifischen Antigenen durch HLA-Moleküle führen, bietet dies die Möglichkeit zur Entwicklung von personalisierten Peptid-Vakzinierungs-Strategien. Hierzu ist es notwendig, Zusammenhänge zwischen Proteinen und den später daraus resultierenden HLA-Liganden zu verstehen und verlässliche Methoden zur Analyse des HLA-Ligandoms zu entwickeln. Aufgrund dessen war es ein vorrangiges Ziel dieser Arbeit ein reproduzierbares Protokoll zur massenspektrometrisch basierten Ligandomanalyse zu etablieren und so weit zu optimieren, dass eine möglichst große Abdeckung aller zu dem Zeitpunkt der Analyse präsentierten Liganden erreicht werden kann. Dieses Protokoll sollte anschließend auf zehn humane Zelllinien angewandt werden und durch Analysen des Proteoms und Transkriptoms derselben Zelllinien ergänzt werden. Die so erhaltenen und in dem Umfang noch nicht existierenden Datensätze sollten zum einem für Korrelationsanalysen genutzt werden, aber auch als Grundlage zur Entwicklung neuer oder Optimierung vorhandener Epitop-Vorhersagemodelle genutzt werden.

Neben dieser globalen Analyse der Antigenprozessierung, sollte im zweiten Teil der vorliegenden Dissertation eine detaillierte Analyse einer einzelnen Aminopeptidase folgen. Da die Antigenprozessierung eine enorme Vielzahl an variablen Liganden hervorbringt, ist es naheliegend, dass es mehr als die bisher bekannten Aminopeptidasen ERAP1 und ERAP2 zur Generierung eben dieser gibt. Erste Hinweise zur Anwesenheit einer weiteren Aminopeptidase namens ERMP1 konnten in vorhergegangenen Arbeiten *in vitro* erzielt werden, so dass diese in der vorliegenden Arbeit *in vivo* verifiziert werden sollten.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von den Firmen Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) und Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Standardchemikalien wurden in dem Reinheitsgrad *p.a.* (pro analysis) verwendet, Chemikalien für massenspektrometrische Analysen in LC-MS-Qualität. Zellkulturmedien und –zusätze wurden von Gibco, Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Hersteller
Accutase	Gibco (Darmstadt, Deutschland)
Acetonitril	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung 29:1	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Agarose	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Alanin	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ameisensäure (FA)	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)
APS	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Asparagin	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Asparaginsäure	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Beta-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Biotin	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Bromcyan-Sepharose (BrCN Sepharose)	GE Healthcare (Frankfurt am Main, Deutschland)
Bromphenolblau	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
BSA	PAN Biotech (Aidenbach, Deutschland)
CHAPS	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Cystein	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
DDM	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
DMEM Trockenpulver	PAN Biotech (Aidenbach, Deutschland)
DMSO GC headspace grade	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

dNTPs	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
DTT	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
EDTA	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Enolase	Waters (Eschborn, Deutschland)
Ethidiumbromid	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
FCS	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Glutaminsäure	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Glycerin	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Glycin	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Harnstoff	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
HCl	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
HEPES	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Hot Start <i>Taq</i> DNA Polymerase	New England Biolabs (Frankfurt a.M., Deutschland)
IAA	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Insulin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
KCl	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
KHCO ₃	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
L-Glutamin	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
MEM Trockenpulver	PAN Biotech (Aidenbach, Deutschland)
Methanol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
MgCl ₂	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Milchpulver	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
NaCl	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
NaHCO ₃	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
NaH ₂ PO ₄	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumazid	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumpyruvat	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natrium-Selenit	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
NH ₄ Cl	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
NH ₄ CO ₃	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
(NH ₄) ₂ SO ₄	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
OGP	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Penicillin	Serva (Tübingen, Deutschland)
Phenolrot	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

Prolin	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche (Mannheim, Deutschland)
Saccharose	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
SDS	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Standard <i>Taq</i> Puffer	New England Biolabs (Frankfurt a.M., Deutschland)
Streptomycin	Serva (Tübingen, Deutschland)
TEMED	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
TFA	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)
Thioharnstoff	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
TRIS	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
TRIS HCl	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Trypanblau	Calbiochem (Darmstadt, Deutschland)
Trypsin für Massenspektrometrie	Promega (Mannheim, Deutschland)
Tween 20	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Vitamin B12	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)

2.2 Verbrauchsmaterialien

Alle Plastikwaren wurden steril bezogen.

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Chromatographiesäulen (HPLC)	Waters (Eschborn, Deutschland)
Chromatographiesäulen (Isolierung von HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden)	Bio-Rad (München, Deutschland)
Cryos (2 mL)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Filterpapier (Whatman-Paper)	GE Healthcare (Frankfurt am Main, Deutschland)
Glasröhrchen (Massenspektrometrie)	Waters (Eschborn, Deutschland)
Latexhandschuhe/Nitrilhandschuhe	Starlab (Hamburg, Deutschland)
OASIS® HLB µElution Plate 30 µm	Waters (Eschborn, Deutschland)

PD 10 Einwegsäulen	GE Healthcare (Frankfurt am Main, Deutschland)
Pipettenspitzen (10 µL, 100 µL, 1000 µL)	Starlab (Hamburg, Deutschland)
Pipettenspitzen Maximum Recovery (20 µL, 200 µL, 1000 µL)	Axygen Scientific (Union City, CA, USA)
Polyacrylamidgele, 4-20 %	Bio-Rad (München, Deutschland)
Protein G Sepharose 4 Fast Flow Säule	GE Healthcare (Frankfurt am Main, Deutschland)
PVDF-Membran 0,45 µm	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Reaktionsgefäße (0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL)	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
Reaktionsgefäße Ultrazentrifuge (1,5 mL, 15 mL)	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)
Reaktionsgefäße Protein LoBind (0,5 mL, 1,5 mL, 5 mL)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Reagenzgefäße (Durchflusszytometrie)	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
Rundbodenplatte (96-well)	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
SepPak® tC18 µElution Plate	Waters (Eschborn, Deutschland)
Spritzen (2 mL, 10 mL)	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
Waters 1 mL Round Collection Plate	Waters (Eschborn, Deutschland)
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²)	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
Zellsieb (40 µm)	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
Zentrifugaleinheiten Vivacon 500 (10 kDa, 30 kDa)	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Zentrifugenröhrchen (15 mL, 50 mL)	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)

2.3 Laborgeräte

Tabelle 3: Verwendete Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Bioruptor Plus inkl. Wasserbad	Diagenode (Liège, Belgien)
CO ₂ Inkubator	Sanyo (München, Deutschland)
Dokumentationssysteme für Western Blot (Chemi Doc)	Bio-Rad (München, Deutschland)
Durchflusszytometer (LSRII)	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
Heizblock (Rotilabo H250)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Massenspektrometer (Synapt G2-S)	Waters (Milford, MA, USA)
Mikroplattenleser (GENios)	Tecan Group AG (Männedorf, Schweiz)
Mikroskop (ID03)	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
NanoAcquity UPLC	Waters (Milford, MA, USA)
Neubauer Zählkammer	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
pH Meter (CG 840)	Schott (Mainz, Deutschland)
Pipetten pipetman (0,2-2 µL, 1-10 µL, 2-20 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL)	Gilson (Limburg an der Lahn, Deutschland)
Pipettierhilfe (RF 3000)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Potter-Elvehjem-Homogenisator	neoLab (Heidelberg, Deutschland)
Rollenschüttler (KS 250 basic)	IKA Labortechnik (Staufen im Breisgau, Deutschland)
Rotator mit Vortexer	neoLab (Heidelberg, Deutschland)
SpeedVac (SVC 100)	Savant Instruments (Farmingdale, NY, USA)
Sterilbank (MSC Advantage)	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)
Stromgeber (Power Supply E3500)	Pharmacia Biotech (Freiburg im Breisgau, Deutschland)
Tiefkühlschrank -20°C	Liebherr (Bulle, Schweiz)
Tiefkühlschrank -80°C	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Trans-Blot SD Semi-Dry Transferzelle	Bio-Rad (München, Deutschland)
Trans-Blot Turbo Transfersystem	Bio-Rad (München, Deutschland)
Ultraschallbad (Sonorex)	Bandelin (Berlin, Deutschland)
Ultraschall-Homogenisator (Sonoplus)	Bandelin (Berlin, Deutschland)
Ultrazentrifuge (Optima L-80XP)	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)
Vortexer	neoLab (Heidelberg, Deutschland)
Zentrifuge (Multifuge 3L-R, Biofuge Fresco)	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge (Sorvall RC-5)	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)

2.4 Medien, Puffer und Zusätze

Aminosäure-Mischung

32 mM	Alanin
17 mM	Asparagin
26 mM	Asparaginsäure
58 mM	Glutaminsäure
40 mM	Prolin
114 mM	Natriumpyruvat

in vollentsalztem (VE) Wasser

Diese Mischung wurde bei 40 °C für 3 Stunden inkubiert. Währenddessen wurde eine zweite Lösung wie folgt angesetzt:

1 mM	Biotin
184 µM	Vitamin B12
1 M	HCl

in VE-Wasser

Diese zweite Lösung wurde der oben beschriebenen im Verhältnis 1:185 zugefügt, so dass sich die finale Aminosäure-Mischung ergab.

Ammoniumbicarbonat-Puffer (AMBIC)

50 mM	NH ₄ CO ₃
-------	---------------------------------

in LC-MS-Grade H₂O

Blotpuffer 10x

250 mM	Tris
1,9 M	Glycin

in VE-Wasser

Blotpuffer 1x

200 mL	Methanol
700 mL	VE-Wasser
100 mL	Blotpuffer 10x
400 µL	10 % SDS in VE-Wasser

Bovines Serumalbumin (BSA)

10 % (w/v) BSA

in PBS

Anschließend wurde die Lösung 0,2 µm steril filtriert und in 50 mL Aliquots bei 4 °C gelagert.

Cystein-Lösung

58 µM Cystein

in 0,25 M HCl

DTT-Lösung

8 mM DTT

in FASP Harnstoffpuffer

FASP Harnstoffpuffer

8 M Harnstoff

100 mM Tris HCl

pH 8,5

FASP Lysepuffer

7 M Harnstoff

2 M Thioharnstoff

5 mM DTT

2 % (w/v) CHAPS

in LC-MS-Grade H₂O

Fötiales Kälberserum (FCS)

Zur Inaktivierung von Komplementkomponenten wurde das FCS für 45 Minuten bei 56 °C erwärmt und nachfolgend bei 4 °C gelagert. Vor Verwendung für Kulturmedien wurde das FCS für 20 min bei 1100 x g zentrifugiert und ausschließlich der Überstand für Medien verwendet.

Gey's Lysepuffer

16 mM NH_4Cl
10 mM KHCO_3
126 μM EDTA
pH 7,4
in VE-Wasser

GM-Puffer (Großer MACS-Puffer)

0,5 % 10 % BSA
5 mM EDTA
0,01 % 1 % NaN_3 -Lösung
in PBS

Harnstoffpuffer zur Zelllyse für Western Blot

7 M Harnstoff
2 M Thioharnstoff
5 mM DTT
2 % (w/v) CHAPS
in VE-Wasser

IAA-Lösung

50 mM IAA
in FASP Harnstoffpuffer

Iscove's Medium

Trockenpulver DMEM plus folgende Zusätze:

44 mM NaHCO_3
12,5 mM HEPES
1:100 Aminosäure-Mischung
1:2500 Cystein-Lösung
128 μM Natrium-Selenit
1 % (v/v) Pen/Strep
50 μM Beta-Mercaptoethanol
pH 6,9

Kopplungspuffer

0,5 M NaCl

0,1 M NaHCO₃

pH 8,3

in LC-MS-Grade H₂O

Kulturmedium für Mel-HO, Mel 526, LCLC-103H, COLO-699N, JAR, K562_A0201, JY

10 % (v/v) FCS

1 % (v/v) 200 mM Glutamin

1 % (v/v) 0,1 M Natriumpyruvat

in RPMI

Kulturmedium für NIH-OVCAR-3

20 % (v/v) FCS

1 % (v/v) 200 mM Glutamin

1 % (v/v) 0,1 M Natriumpyruvat

0,01 mg/mL Insulin

in RPMI

Kulturmedium für SK-Mel 37, HEK 293

10 % (v/v) FCS

1 % (v/v) 200 mM Glutamin

1 % (v/v) 0,1 M Natriumpyruvat

in DMEM

Minimal Essential Medium (MEM)

MEM Trockenpulver

1 % (v/v) Pen/Strep

50 µM Beta-Mercaptoethanol

PBS (Phosphate Buffered Saline)

1,4 M NaCl

0,1 M NaH₂PO₄

pH 7,2

in VE-Wasser

Probenpuffer Western Blot 5x

40 % (w/v) Glycerin
6,82 % (w/v) Tris
6,66 % (w/v) Tris HCl
8 % (w/v) SDS
0,06 % (w/v) EDTA
0,075 % (w/v) Bromphenolblau
in VE-Wasser

Protease-Assay-Puffer (PA-Puffer)

20 mM HEPES/KOH, pH 7,6
150 mM KCl
5 mM MgCl₂
0,5 mM DTT
in VE-Wasser, 0,45 µm filtriert

Puffer A

0,1 % (v/v) FA
3 % (v/v) DMSO
in LC-MS-Grade H₂O

Puffer B

0,1 % (v/v) FA
3 % (v/v) DMSO
in LC-MS-Grade Acetonitril

Penicillin/Streptomycin-Lösung (Pen/Strep)

172 µM Penicillin
137 µM Streptomycin
in VE-Wasser

SDS-Laufpuffer 10x

250 mM Tris
1,9 M Glycin
1 % (w/v) SDS
in VE-Wasser

Solubilisationspuffer 2x

1,2 % (w/v) CHAPS
1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail
in 33 mL PBS

TBS 20x

50 mM Tris
150 mM NaCl
pH 8
in VE-Wasser

TBST 20x

0,05 % (w/v) Tween20
in TBS 20x

Testmedium 10 (TM 10) für W6/32, Y3, 28-14-8S

10 % (v/v) FCS
1 % (v/v) 200 mM Glutamin
1 % (v/v) 0,1 M Natriumpyruvat
in Iscove's Medium

Trypanblau-Lösung

0,5 % (w/v) Trypanblau
0,02 % (w/v) Natriumazid
in PBS

Diese Lösung wurde vor Verwendung 1:10 in PBS verdünnt.

Trypsinlösung

1:100 1 µg/µL Trypsin
in AMBIC

2.5 Zelllinien

Die Zelllinien JAR, COLO-699N, JY, Mel 526, NIH-OVCAR-3, SK-Mel 37, K562_A0201, HEK 293, LCLC-103H und Mel-HO wurden vom Projektpartner TRON zur Verfügung gestellt. Die Hybridom-Zelllinien W6/32, Y3 und 28-14-8S wurden von dem Institut für Immunologie in Tübingen bereitgestellt.

2.6 Tiere

Die Tiere des Stammes B6N(Cg)-Ermp1tm1.1(KOMP)Vlclg/J (ERMP1 KO) wurden kommerziell von Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) erworben. Für *ex vivo* Versuche wurden zur Organentnahme Tiere verschiedenen Alters, mindestens aber von 10 Wochen, verwendet. Die Mäuse wurden in Tierhaltungseinrichtungen des „Translational Animal Research Center“ (TARC) der Johannes Gutenberg-Universität Mainz nach aktuellen Tierschutzbedingungen gezüchtet und gehalten. Die Mäuse wurden unter einem künstlichen 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus gehalten.

2.7 Antikörper

Die in Tabelle 4 aufgelisteten Antikörper wurden für Ligandomanalysen, Durchflusszytometrie und Western Blot Analysen verwendet.

Tabelle 4: Verwendete Antikörper

Antikörper	Klon	Hersteller
anti-HLA PAN (Ligandom, FACS)	W6/32	eigene Herstellung, Institut für Immunologie, Mainz
anti-H-2K ^b (Ligandom)	Y3	eigene Herstellung, Institut für Immunologie, Mainz
anti-H-2D ^b (Ligandom)	28-14-8S	eigene Herstellung, Institut für Immunologie, Mainz
anti-H-2K ^b (FACS)	AF6-88.5.5.3	affymetrix Bioscience
anti-H-2D ^b (FACS)	28-14-8	affymetrix Bioscience
SA-PE (FACS)		eBioscience (Frankfurt am Main, Deutschland)
anti-mouse-PE (FACS)		eBioscience (Frankfurt am Main, Deutschland)

anti-HLA Klasse1 (Western Blot)	EMR8-5	abcam (Cambridge, United Kingdom)
anti-mouse-HRP (Western Blot)		Santa Cruz Biotechnology

2.8 Kits

Im Rahmen der Dissertation wurden folgende Kits nach Herstellerangaben verwendet.

Tabelle 5: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
Clarity™ Western ECL Substrate	Bio-Rad (München, Deutschland)
Pierce™ 660nm Protein Assay Reagent	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)

2.9 Zellkulturmethoden

Alle Arbeiten mit Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.9.1 Kultivierung von humanen Krebszelllinien

Die Krebszelllinien JAR, COLO-699N, JY, Mel 526, NIH-OVCAR-3, SK-Mel 37, K562_A0201, HEK 293, LCLC-103H und Mel-HO wurden in den in 2.4 genannten Medien kultiviert. Hierzu wurden die Zellen im Brutschrank bei 37 °C im wasserdampfgesättigter Umgebung und 5 % CO₂ bis zu einer Konfluenz von etwa 90 % kultiviert. Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen gesplittet. Hierzu wurde bei adhärenenten Zellen das Zellkulturmedium abgesaugt, die Zellkulturflasche einmal mit PBS gewaschen und anschließend 3 mL (75 cm² Zellkulturflasche) bzw. 5 mL (175 cm² Zellkulturflasche) Accutase auf die Zellen gegeben. Nach einer kurzen Inkubationszeit haben sich die Zellen gelöst, so dass sie in frisches Zellkulturmedium aufgenommen und in neue Zellkulturflaschen verdünnt werden konnten.

2.9.2 Kultivierung von Hybridom-Zelllinien

Bei Hybridom-Zelllinien handelt es sich um Verschmelzungsprodukte von B-Lymphozyten und einer Tumorzelle. Dabei produzieren die B-Zell-Hybridome Antikörper einer definierten Spezifität und dienen als klassische Quelle von monoklonalen Antikörpern. Die Hybridom-Zelllinien wachsen

in Suspension. Zur Kultivierung wurden sie in entsprechendem Medium aufgenommen (siehe 2.4) und im Brutschrank bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Umgebung und 5 % CO₂ gehalten. Jeden zweiten Tag wurden die Zellen gesplittet, wobei lediglich das vorhandene Medium resuspendiert wurde und die Zellen entsprechend ihres Wachstumsverhaltens auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt wurden.

2.9.3 Zellzählung

Zur Zellzählung wurde eine Neubauer Zählkammer verwendet. Diese besteht aus 3x3 Großquadraten, welche wiederum in 4x4 Kleinquadrate gegliedert sind. In der Regel wurden 16 Kleinquadrate zur Bestimmung der Zellzahl ausgezählt, wobei zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen eine Trypanblau-Färbung durchgeführt wurde. Trypanblau durchdringt nur die defekte Zellmembran von toten Zellen, so dass diese im Mikroskop blau erscheinen, wohingegen die lebenden Zellen ungefärbt bleiben. Die Zellzahl berechnet sich nach der Formel $N \times V \times 10^4 = \text{Zellzahl}/\text{mL}$. Dabei beschreibt N die gezählten Zellen, V den Verdünnungsfaktor und 10^4 den Verdünnungsfaktor der Neubauer Zählkammer.

2.9.4 Einfrieren von Zellen

Zur dauerhaften Lagerung von Zellen wurden diese in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurden adhärente Zellen von der Zellkulturflasche abgelöst, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 400 x g sedimentiert. In Suspension wachsende Zellen wurden lediglich in Zentrifugenröhrchen überführt und sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen gezählt und 4×10^6 Zellen in 1mL Einfriermedium aufgenommen. Das Einfriermedium bestand aus FCS + 10 % DMSO. Das DMSO dient dabei dazu, dass sich keine Kristalle bilden, welche die Zellen zerstören würden. Nach Resuspension der Zellen wurden diese in 1,5 mL Cryo-Röhrchen überführt und zunächst in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierhilfe bei -80 °C eingefroren. Das Isopropanol dient der kontinuierlichen Abkühlung der Zellen von 1 °C pro Minute. Nach 24-48 h wurden die Zellen zur dauerhaften Lagerung in den Stickstofftank umgelagert.

2.9.5 Auftauen von Zellen

Eingefrorene Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und schnell in 15 mL vorgewärmtes Zellkulturmedium gegeben. Zur Entfernung des restlichen DMSO wurden die Zellen bei 400 x g für 5 min zentrifugiert und in frischem Zellkulturmedium aufgenommen. Anschließend wurden sie in 75 cm² Zellkulturflaschen ausgesät.

2.10 Proteinbiochemische Methoden

2.10.1 Herstellung von Zelllysaten für massenspektrometrische Analysen

Zur Herstellung von Zelllysaten für anschließende massenspektrometrische Analysen des Proteoms wurden die Zellen zunächst wie in 2.9.1 und 2.9.3 beschrieben kultiviert, geerntet und gezählt. Anschließend wurden 5 x 10⁵ Zellen dreimal mit PBS gewaschen und in 200 µL FASP-Lysepuffer aufgenommen. Die Zellyse erfolgte durch Ultraschallbehandlung im Bioruptor bei 4 °C für 15 min (alternierende Zyklen von 30 s Ultraschall und 30 s Pause). Von dem Zelllysat wurde anschließend die Proteinmenge bestimmt (2.10.2) und 20 µg für den FASP-Verdau (2.10.3) eingesetzt.

2.10.2 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung des Proteingehalts in einer Probe wurde das 660 nm Protein-Kit von Pierce verwendet. Hierbei wird sich zu Nutze gemacht, dass es aufgrund von der Bindung des Reagenz an Proteine zu einem Farbumschlag und dadurch zu einer Absorption der Proben bei 660 nm statt vorher 450 nm kommt. Die Reaktion wurde in einer 96 *well* Mikrotiterplatte angesetzt. Es wurden jeweils in Doppelbestimmung 10 µL Probe, 10 µL Leerprobe und 10 µL eines BSA-Standards im Bereich von 0,5-2,0 µg/µL in die *wells* pipettiert und in jedes *well* 150 µL des Pierce Proteinreagenz dazugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurden die Absorptionen bei 660 nm in einem GENios Mikrotiterplattenleser bestimmt. Die Auswertung erfolgte in Microsoft Excel mithilfe einer Regressionsgeraden.

2.10.3 Filter gestützte Probenvorbereitung (engl. *Filter-aided sample preparation, FASP*)

Für die Herstellung von Proben zur massenspektrometrischen Analyse des Proteoms einer Zelllinie wurde die Methode der Filter gestützten Probenvorbereitung (englisch *Filter-aided sample preparation, FASP*) verwendet. Das Ausgangsmaterial waren stets 20 µg Gesamtprotein aus Zelllysaten (siehe 2.10.1). Zu Beginn wurden 100 µL 1 % (v/v) FA auf Zentrifugaleinheiten gegeben, welche Proteine mit einem Molekulargewicht kleiner als 30 kDa durch die Membran passieren lassen und größere Proteine auf der Membran konzentrieren. Nach einer 15 minütigen Zentrifugation bei 16.000 x g wurde das Zelllysate auf die Membran gegeben und erneut für 15 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Zur Entfernung von restlichen Pufferkomponenten wurden anschließend 200 µL Harnstoffpuffer auf die Membran gegeben und für weitere 15 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Die weiteren Schritte erfolgten mit dem Retentat, welches sich auf der Membran befand. Zur Reduktion der Disulfidbrücken zwischen den Proteinen wurden 100 µL 8 mM DTT auf die Membran gegeben, bei 56 °C für 15 min inkubiert und anschließend für 10 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Im Anschluss wurde die Membran zweimal mit 100 µL Harnstoffpuffer gewaschen bevor die Alkylierung der freien Thiolgruppen erfolgte. Hierzu wurden 100 µL 50 mM IAA auf die Membran gegeben und diese 20 min bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Als nächstes wurden die Proben für 10 min bei 16.000 x g zentrifugiert und anschließend gewaschen. Hierbei wurden zunächst zweimal 100 µL Harnstoffpuffer, dann einmal 100 µL 8 mM DTT und abschließend erneut zweimal 100 µL Harnstoffpuffer auf die Membran gegeben und zwischen jedem Waschschrift für 10 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Nach einem letzten Pufferaustausch durch die dreimalige Zugabe von 100 µL AMBIC erfolgte der tryptische Verdau der Proteine über Nacht. Dazu wurden 0,5 µg Trypsin in 40 µL AMBIC auf die Proben gegeben und diese in einer feuchten Kammer über Nacht (max. 16 Stunden) bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Filtereinheiten in saubere LoBind Reaktionsgefäße überführt und für 10 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Im Anschluss wurde die Membran noch einmal mit 40 µL AMBIC gespült, um auch die restlichen Peptide zu eluieren. Der Durchfluss mit den Peptiden wurde mit 10 % (v/v) TFA auf eine Endkonzentration von 1 % (v/v) TFA angesäuert und abschließend lyophilisiert. Zur anschließenden Messung im Massenspektrometer (2.11.3) wurden die Peptide in 20 µL 1 % (v/v) FA aufgenommen und in ein Glasröhrchen überführt.

2.10.4 Herstellung von Zelllysaten für Western Blot Analysen

Zur Herstellung von Zelllysaten zur anschließenden Analyse mittels Western Blot wurden die Zellen zunächst wie in 2.9.1 und 2.9.3 beschrieben kultiviert und gezählt. Für die Lyse wurden stets 1×10^6 Zellen verwendet. Das Zellpellet wurde dreimal in PBS gewaschen und dann in Harnstoffpuffer aufgenommen. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen entweder für 15 min in ein gekühltes Ultraschallbad gestellt und anschließend für 10 min bei $16.000 \times g$ zentrifugiert oder für 15 min bei 4°C im Bioruptor behandelt. Bei vergleichenden Analysen erfolgte anschließend eine Proteinbestimmung.

2.10.5 SDS-PAGE

Zur Auftrennung von Proteinen wurde eine diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Bei der SDS-PAGE werden Proteine nach ihrer molekularen Masse aufgetrennt. Standardmäßig wurden $10 \mu\text{g}$ Protein verwendet, welche in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt, mit 5 x Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C gekocht wurden. Durch das Erhitzen in Anwesenheit von DTT kommt es zu einer Zerstörung von Disulfidbrücken, welches zur Folge hat, dass das Protein anschließend nicht in seiner Sekundär – oder Tertiärstruktur, sondern in linearer Form vorliegt. Das sich im Puffer befindliche SDS überdeckt die Eigenladung des Proteins und erzeugt somit eine negative Gesamtladung, so dass die Proteine in der anschließenden Gelelektrophorese zur Anode wandern. Hierbei wandern kleine Proteine schneller als große. Für die SDS-PAGE wurden entweder fertige 4-20 %ige Gradientengele der Firma Bio-Rad oder selbstgegossene 10 %ige Gele verwendet, wobei sich die Prozentangabe auf den Acrylamid-Gehalt bezieht. Um Gele selbst herzustellen wurde zunächst das Trenngel gegossen und zur Vermeidung von Blasenbildung mit Isopropanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Trenngel mit einem 4 %igen Sammelgel übergossen und dieses mit einem Plastikkamm versehen, welcher nach Polymerisation des Gels die Probenaschen erzeugt.

Tabelle 6: Rezept zur Herstellung von SDS-Gelen

Substanz	10 % Trenngel	4 % Sammelgel
VE-Wasser	4,8 mL	3,2 mL
1,5 M Tris HCl, pH 8,6	2,5 mL	-
0,5 M Tris HCl, pH 8,6	-	1,2 mL
10 % (w/v) SDS	100 µL	50 µL
40 % Acrylamid/Bisacrylamid 29:1	2,5 mL	0,5 mL
TEMED	20 µL	10 µL
10 % (w/v) APS	100 µL	50 µL

Das Gel wurde in die Laufkammer eingesetzt, welche mit 1 x SDS-Laufpuffer befüllt wurde und die Proben auf das Gel aufgetragen. Zur späteren Größenbestimmung der Proteine wurde in die erste Tasche 5 µL Größenmarker aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 100 V für etwa 1,5 Stunden. Anschließend wurde das Gel für Western Blot Analysen verwendet.

2.10.6 Western Blot

Um Proteine nach der SDS-PAGE mit spezifischen Antikörpern nachzuweisen wurden diese auf eine PVDF-Membran übertragen. Hierzu wurde das Semi-Dry-Blot-Verfahren angewendet, bei welchem alle Materialien mit Blotpuffer befeuchtet in die Apparatur gelegt werden. Als Apparatur wurde die Transblot Semi-Dry Transferzelle sowie das Trans-Blot Turbo Transfersystem der Firma Bio-Rad verwendet. Der Transfer fand bezüglich der Transferzelle für 3 Stunden bei 50 mA pro Gel statt, bezüglich des Turbo Transfersystems bei 1 A für 30 min. Anschließend wurde die Membran zur Verhinderung von unspezifischen Bindungen mit 5 % (w/v) Milchpulver in TBST oder 3 % (w/v) BSA in TBST für 1 Stunde blockiert, dreimal mit TBST gewaschen und anschließend mit spezifischen Antikörpern über Nacht bei 4 °C inkubiert. Um die Proteine sichtbar zu machen, wurde die Membran am nächsten Tag erneut dreimal mit TBST gewaschen und mit einem der Spezies des Erstantikörpers entsprechenden Zweitantikörper für 1 Stunde inkubiert, welcher wiederum mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (englisch *horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt war. Die HRP setzt das Substrat Luminol (Clarity™ Western ECL Blotting Substrate von Bio-Rad) mit Wasserstoffperoxid zu 3-Aminophthalat um, welches Licht der Wellenlänge 425 nm emittiert. Dieses wurde mit dem Chemi Doc von Bio-Rad gemessen und die Aufnahmen anschließend mit dem Computerprogramm QuantityOne ausgewertet.

2.11 Methoden zur Generierung von Proteom – und Ligandomdaten

2.11.1 Herstellung von Antikörpern aus Hybridom-Zellkulturüberstand

Zur Herstellung von Antikörpern aus Hybridom-Zellkulturüberständen wurden die entsprechenden Zellen zunächst geerntet und bei 3000 x *g* für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in Glasflaschen gesammelt und bis zur Aufreinigung bei -20 °C gelagert. Nach dem Auftauen bei 4 °C wurde der Überstand mit 50 % (w/v) Ammoniumsulfat gefällt und erneut bei 3000 x *g* für 30-40 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in PBS aufgenommen. Nach einer erneuten Zentrifugation (8000 x *g* für 40 min) wurde der Überstand über einen 0,45 µm Filter gegeben und mit Hilfe einer Protein G Sepharose 4 Fast Flow Säule aufgereinigt. Hierzu wurde die Säule zunächst 20 min mit PBS gespült und anschließend die Probe aufgetragen. Als nächstes wurde die Säule erneut mit PBS gespült. Zur Elution der Probe wurde 1 M Glycin auf die Säule gegeben. Das so erhaltene Eluat wurde dann durch 1 M Tris HCl bei pH 9 neutralisiert, wobei hiervon 34 µL/mL Eluat verwendet wurden. Die Säule wurde zur Aufbewahrung mit 0,1 % (w/v) Triton in PBS und anschließend reinem PBS gespült. Zur Lagerung wurde die Säule mit 0,1 M Borat/0,1 % (w/v) Natriumazid bedeckt.

Zur finalen Fällung des Eluats wurden 50 % (w/v) Ammoniumsulfat zugegeben und bei 8000 x *g* für 40 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in PBS aufgenommen. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 8000 x *g* für 10 min wurde der Überstand mit Hilfe einer PD 10 Säule entsalzt. Hierzu wurden zunächst 25 mL PBS mit Hilfe der Schwerkraft durch die Säule gegeben, gefolgt von der Probe, welche dann mit 3,5 mL PBS eluiert werden konnte. Abschließend wurde die Säule mit 0,1 M Borat/0,1 % (w/v) Natriumazid gespült.

2.11.2 Isolierung von HLA-Peptid-Liganden

Die Isolierung von HLA-Peptid-Liganden erfolgte aus Zellen sowie aus Organen der Maus.

Wie in den Ergebnissen der vorliegenden Dissertation beschrieben, war ein vorrangiges Ziel der Arbeit die Etablierung der Methode zur Isolierung von HLA-Klasse-1-Peptid-Liganden. Das in 2.11.2.1 und 2.11.2.2 folgende Protokoll beschreibt die optimierte und final angewandte Versuchsdurchführung.

2.11.2.1. aus Zellen

Zur Isolierung von HLA-Peptid-Liganden aus humanen Krebszelllinien wurde das Prinzip der Immunpräzipitation angewandt. Hierzu wurden in einem ersten Schritt 40 mg BrCN Sepharose pro mg W6/32 Antikörper in ein 50 mL Zentrifugationsröhrchen abgewogen. Die Menge an Antikörper war abhängig von der Menge an Zellen, wobei 1 mg Antikörper pro mL Zellpellet verwendet wurde. Zur Aktivierung der Sepharose wurde diese in 50 mL 1 mM HCl aufgenommen und für 30 min bei Raumtemperatur auf einem Rollenschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose bei 300 rpm für 4 min ohne Bremse sedimentiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Als nächstes wurde die der Zellmenge entsprechende Antikörpermenge in 20 mL Kopplungspuffer aufgenommen und auf die Sepharose gegeben. Nach 2-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Rotationsschüttler wurde die Sepharose erneut zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Zur Bindung von unspezifischen freien Bindungsstellen wurde die Sepharose dann für 1 Stunde rotierend mit 50 mL 0,2 M Glycin inkubiert. Abschließend wurde die Sepharose erneut zentrifugiert, zweimal mit PBS gewaschen, in 5 mL PBS aufgenommen und in ein 5 mL LoBind Reaktionsgefäß überführt. So wurde es bei 4 °C bis zur Fertigstellung des Zelllysats gelagert.

Zur Herstellung des Lysats wurde das bei -80 °C gelagerte Zellpellet in gefrorenem Zustand mit 1 Volumenanteil 2 x Solubilisationspuffer bedeckt und bei 4 °C für 1 Stunde auf einem Rotator mit Vortexfunktion bei voller Stärke mit einem Neigungswinkel von 6° schüttelnd inkubiert. Nach dieser Stunde war das Pellet vollständig aufgetaut und es wurde 1 Volumenanteil 1 x Solubilisationspuffer hinzugefügt und die Zellen für eine weitere Stunde schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zur vollständigen, aber dennoch sanften Lyse auf Eis lagernd mit einem Ultraschallstab behandelt. Hierbei wurden 3 Zyklen (20 Sekunden Ultraschall / 20 Sekunden Pause) bei einer Intensität von 50 % durchgeführt. Im Anschluss wurden die Zellen erneut für eine Stunde bei 4 °C auf dem Rotator schüttelnd inkubiert. Nach der vollständigen Lyse wurden die Zellen für 90-120 min bei 125.000 x g zentrifugiert und der Überstand anschließend zu dem 5 mL LoBind Reaktionsgefäß mit der zuvor sedimentierten Sepharose gegeben. Dieses Gemisch wurde zur Immunpräzipitation und damit der Bindung der HLA-Peptid-Komplexe an den Antikörper über Nacht bei 4 °C und mit einer Geschwindigkeit von 3 rpm rotierend inkubiert. Zur Entfernung von unspezifischen Bindungspartnern wurde die Sepharose am nächsten Tag für 30 min mit PBS und anschließend für 1 Stunde mit LC-MS-Grade H₂O gewaschen. Zur Elution der HLA-Peptid-Komplexe von der Sepharose wurde diese für eine Stunde trocken schüttelnd inkubiert und anschließend mit 200 µL 0,2 % (v/v) TFA bedeckt. Beim ersten Elutionsschritt wurden zusätzlich 10 µL 10 % (v/v) TFA hinzugeben. Die mit TFA bedeckte Sepharose wurde dann bei 4 °C schüttelnd mit einem Neigungswinkel von 6° und 66 rpm für 15 min inkubiert und

anschließend bei minimaler Geschwindigkeit und 4 °C für 4 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein sauberes LoBind Reaktionsgefäß überführt. Dieser Elutionsvorgang wurde 7-mal wiederholt. Zur finalen Trennung von HLA-Peptid-Liganden und HLA-Molekülen wurde eine Größenfiltration durchgeführt. Hierzu wurden 400 µL Probe auf Filtrationseinheiten mit einem *cut off* von 10 kDa gegeben und für 15-20 min bei 16.000 x *g* zentrifugiert, so dass sich im Durchfluss nur noch die Peptid-Liganden befanden. Diese Zentrifugation wurde so oft wiederholt, bis das komplette Eluat durch die Filtereinheit gegeben war. Die Proben wurden bis zur massenspektrometrischen Messung bei -80 °C gelagert. Für die finale Vorbereitung der Messung wurden die Proben in gefrorenem Zustand in der SpeedVac bis auf wenige µL reduziert und in 100 µL 0,1 % (v/v) aufgenommen. Als letzter Schritt erfolgte vor der Messung die Entsalzung und Konzentration der Proben mittels einer OASIS HLB 96 *well* Platte der Firma Waters nach Herstellerangaben. Die in das *well* gegebenen Lösungen wurden dabei durch ein erzeugtes Vakuum durch das SPE-Festphasenmaterial gezogen. Dabei wurden zur Konditionierung der Platte 200 µL 100 % ACN in das *well* gegeben, gefolgt von 200 µL 0,1 % (v/v) TFA zur Equilibrierung und der Beladung des *wells* mit der Probe. Anschließend wurde das *well* mit 800 µL 0,1 % (v/v) TFA und 200 µL LC-MS-Grade H₂O gewaschen. Die Elution der Peptide von dem SPE-Festphasenmaterial erfolgte durch Zugabe von 50 µL 50 % (v/v) ACN/0,1 % (v/v) TFA. Dieses Eluat wurde erneut lyophilisiert und anschließend in 15 µL 1 % (v/v) FA aufgenommen, in Glasröhrchen überführt und zur Analyse in das Massenspektrometer gestellt.

2.11.2.2 aus Milzen der Maus

Die oben beschriebene Methode zur Isolierung von HLA-Klasse-1-Peptid-Liganden konnte auch mit Primärmaterial aus der Maus durchgeführt werden. Hierbei unterschieden sich lediglich die Antikörper (Y3 und 28-14-8S) sowie die Gewinnung der Zellen. Die Milzen wurden wie in 2.12.1 beschrieben entnommen und die Milzzellen gemäß der Beschreibung in 2.12.2 isoliert. Das so gewonnene Zellpellet wurde anschließend bei -80 °C gelagert und die Isolierung der HLA-Klasse-1-Peptid-Liganden wie in 2.11.2.1 beschrieben durchgeführt.

2.11.3 Massenspektrometrie

Die Flüssigkeitschromatographie (englisch *liquid chromatography*, LC) von tryptisch verdauten Proteinen (2.10.3) oder MHC-Peptid-Liganden (2.11.2) erfolgte mit dem *NanoAcquity* UPLC System der Firma Waters, das mit einer 75 µm x 250 mm Umkehrphasen-Säule ausgestattet war. Diese Säule enthielt ein HSS-T3 C₁₈-Material, welches der Separation der Peptide diente. Bezüglich Proteomanalysen wurden 200 ng der Probe direkt auf die Säule (englisch *direct-injection mode*)

geladen, wohingegen die Probe bei Ligandomanalysen zuvor über eine so genannte *Trap*-Säule mit den Maßen 180 µm x 20 mm lief, so dass sie vor der massenspektrometrischen Analyse einen weiteren Aufreinigungsschritt durchlief. Hierbei wurde stets mit der maximalen Injektionsmenge von 2,6 µL gearbeitet. Als wässrige mobile Phase diente der Puffer A, als organische mobile Phase der Puffer B. Der Lauf startete mit 97 % Puffer A/3 % Puffer B bei einer Flussrate von 400 nL/min, gefolgt von einem Waschschrift mit ebenfalls 97 % Puffer A/3 % Puffer B. Anschließend erfolgte die Elution der Peptide über eine Dauer von 90 Minuten bei einer Flussrate von 300 nL/min mit einem Puffergradienten von 5 % Puffer B bis 40 % Puffer B. Nach dem folgenden Spülvorgang mit 90 % Puffer B für 20 min wurde die Säule auf ihre Anfangsbedingungen re-equilibriert.

Die anschließende massenspektrometrische Analyse erfolgte auf dem Synapt G2-S der Firma Waters. Die Verbindung zwischen dem LC-System und dem Massenspektrometer stellte eine nanoESI-Quelle dar. Die Analysen wurden im positiven Ionenmodus und je nach Fragestellung im Datenabhängigen Modus (DDA), Datenunabhängigen Modus (DIA) oder einer durch IMS modifizierten Form des hochenergetischen Erfassungsmodus (MS^E)¹⁴⁰ durchgeführt. Zur Kalibrierung dienten 500 fmol/µL [Glu1]-Fibrinopeptide B und alle Proben wurden in technischen Triplikaten gemessen.

2.11.4 Auswertung massenspektrometrischer Daten

Zur Auswertung der Proteom – und Ligandomdaten wurden die Computerprogramme PLGS (Waters Corporations) und PEAKS (Bioinformatics Solutions Inc) sowie das im Institut für Immunologie entwickelte Programm ISOQuant¹⁴⁰ verwendet. PLGS wurde zur Rohdatenprozessierung von Proteomproben verwendet. Dabei wurde in der UniProtKB/SwissProt Datenbank mit der entsprechenden Spezies (*Homo sapiens* oder *Mus musculus*) gesucht. Carbamidomethyl Cystein wurde als feste Modifikation und Methionin als variable Modifikation festgelegt und Trypsin als Enzym angegeben, wobei nur Peptidfragmente akzeptiert wurden, die maximal eine fehlende tryptische Spaltung aufwiesen. Die Datenbanksuche wurde auf Peptide mit mindestens drei identifizierten Fragmentationen, Proteinen mit mindestens zwei identifizierten Peptiden und eine Falsch-positiv Rate (englisch *False discovery rate*, FDR) von 1 % beschränkt. Die finale Auswertung bezüglich Alignment, Normalisierung, Clustering und Homologie-Filterung wurde mit ISOQuant durchgeführt.

Die Auswertung von Ligandomdaten fand in PEAKS statt. Hierbei wurden die Rohdaten ebenfalls in der UniProtKB/SwisProt Datenbank der entsprechenden Spezies (*Homo sapiens* oder *Mus musculus*) gesucht, hier allerdings ohne Angabe eines Enzyms, da es sich um nicht-tryptische Peptide handelt. Als Massentoleranz wurden 10 ppm und 0,03 Da zugelassen. Oxidation wurde als

variable posttranslationale Modifikation (PTM) eingestellt, wobei maximal 3 PTMs pro Peptid zulässig waren. Die Falsch-positiv Rate betrug auch hier 1 %. Die so generierten Daten konnten in Microsoft Excel importiert und final verarbeitet werden.

2.12 Ex vivo Aufarbeitungen

2.12.1 Organentnahme

Zur Organentnahme wurden die Tiere mittels CO₂ euthanasiert. Anschließend wurden die Tiere mit Isopropanol eingesprüht und der Bauchraum eröffnet. Hier konnten die gewünschten Organe entnommen und zur weiteren Verwendung entweder in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder in MEM +2 % FCS gelegt werden.

2.12.2 Isolierung von Milzzellen

Zur Verwendung für durchflusszytometrische Analysen wurde die Milz entnommen und anschließend über einem 40 µm Zellsieb mit dem Spritzenstempel einer 1 mL Spritze zerrieben. Das Zellsieb sowie der Stempel wurden anschließend mit 3 mL MEM + 2 % FCS gespült. Nach der Sedimentierung der Zellen bei 400 x g für 5 min wurde der Überstand abgenommen und die Zellen zur Lyse der Erythrozyten durch einen osmotischen Schock in 1 mL Gey's Lysepuffer pro Milz resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 2,5 min wurde die Lyse durch die Zugabe des vierfachen Volumens MEM + 2 % FCS abgestoppt und die Zellen erneut zentrifugiert. Abschließend wurden die Zellen zur weiteren Färbung einmal mit PBS gewaschen, gezählt und in GM-Puffer aufgenommen.

Wurde die Milz für massenspektrometrische Analysen des Ligandoms verwendet, wurde nach dem selben Protokoll vorgegangen, die Zellen aber am Ende nach zweimaligem Waschen mit PBS zentrifugiert und als trockenes Pellet bei -80 °C eingefroren.

2.12.3 Mikrosomenisolation aus der Milz

Alle Schritte wurden bei 4 °C oder auf Eis durchgeführt, um proteolytische Aktivität auch ohne die Zugabe von Protease-Inhibitoren zu minimieren. Zur Isolierung der Mikrosomen wurde die Milz wie beschrieben aus der Maus entnommen, mit einem minimalen Volumen an PA-Puffer mit 250 mM Saccharose bedeckt und in einem Elvehjem-Potter homogenisiert. Anschließend wurde

das Lysat für 10 min bei 1000 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt und erneut für 15 min bei 16.000 x g und 4 °C zentrifugiert. In dieser Zeit wurde ein Saccharose-Gradient in 15 mL Ultrazentrifugations-Röhrchen geschichtet. Dieser bestand von unten nach oben gesehen aus 1 mL 0,5 M Saccharose, 1 mL 0,75 M Saccharose, 1,5 mL 1 M Saccharose, 1,5 mL 1,25 M Saccharose und 1 mL 2 M Saccharose. Dieser Gradient wurde anschließend vorsichtig mit dem Überstand des Lysats überschichtet und 2 Stunden bei 150.000 x g und 4 °C ohne Bremse zentrifugiert. Danach konnte das Röhrchen von unten angestochen und die unterste Schicht in einem sauberen 1,5 mL LoBind Reaktionsgefäß gesammelt werden. Die Probe wurde anschließend mit der SepPak HLB 96 *well* Platte von Waters final konzentriert und entsalzt. Hierzu wurde das *well* zunächst mit 200 µL Methanol und 200 µL 50 % (v/v) Acetonitril konditioniert. Anschließend wurden zur Equilibrierung 200 µL 0,1 % (v/v) TFA durch das *well* gegeben und die Probe auf das *well* geladen. Nach zwei Waschschrritten (800 µL 0,1 % (v/v) TFA und 200 µL 0,1 % (v/v) TFA) konnte die Probe mit 50 µL 50 % (v/v) Acetonitril/0,1 % (v/v) TFA in ein sauberes 1,5 mL LoBind Reaktionsgefäß eluiert werden. Nach einer finalen Lyophilisierung wurde die Probe in 1 % (v/v) FA aufgenommen und massenspektrometrisch analysiert.

2.13 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Zellen anhand ihrer Größe, Struktur und Oberflächenmarkern unterschieden werden. Dazu werden sie mit fluoreszenzmarkierten, spezifischen Antikörpern gekoppelt, so dass sie von einem Laserstrahl erfasst werden und durch die gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe Licht bestimmter Wellenlänge emittiert wird. Dadurch erzeugt jeder fluoreszenzmarkierte Antikörper ein spezifisches Signal. Zur durchflusszytometrischen Analyse wurden entweder Milzzellen, wie in 2.12.2 beschrieben, isoliert oder Zellen direkt aus der Zellkultur verwendet. Es wurden stets 1×10^6 Zellen zur Färbung in einer 96*well* Spitzbodenplatte eingesetzt. Die Zellen wurden für 15 min bei 4 °C in GM-Puffer mit dem entsprechenden Antikörper inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 400 x g für 2 min zentrifugiert, zweimal mit GM-Puffer gewaschen und zur Analyse im Durchflusszytometer in 100 µL GM-Puffer aufgenommen. Sofern der Erstantikörper anstelle einer Fluoreszenzmarkierung einen Biotin-Tag besaß, erfolgte eine Sekundärfärbung mit einem fluoreszenzmarkierten Streptavidin. Hierzu wurden die Zellen nach der Inkubation mit dem primären Antikörper zweimal mit GM-Puffer gewaschen und anschließend in 100 µL GM-Puffer mit dem sekundären Antikörper für 15 min bei 4 °C inkubiert. Abschließend wurden auch diese Zellen zweimal mit GM-Puffer

gewaschen und zur Analyse in 100 μ L GM-Puffer aufgenommen. Die verwendeten Antikörper sind in 2.7 aufgelistet.

3. Ergebnisse

3.1 Proteomanalyse humaner Krebszelllinien

3.1.1 Auswahl der Zelllinien

In den letzten Jahren wurde es aufgrund von enormen Fortschritten in gentechnischen Methoden möglich, groß angelegte Genomstudien von humanen soliden Tumoren durchzuführen. Diese haben gezeigt, dass zwischen verschiedenen Tumoren eine starke Heterogenität^{159–164} sowie eine genetische intratumorale Diversität zu finden ist^{165–173}. Aufgrund dessen ist es notwendig, Zelllinien für eine vergleichende Arbeit wie der hier vorliegenden sorgfältig auszuwählen.

Da für die im späteren Verlauf dieser Arbeit beschriebenen Analysen von HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden große Zellzahlen von 10^9 Zellen benötigt wurden, war ein erstes Kriterium zur Auswahl der Zelllinien die Kultivierungseigenschaften sowie Erfahrungen bezüglich der jeweiligen Proliferationsraten. Der weitaus wichtigere Faktor war aber die genetische Beschaffenheit der Zelle bezüglich ihrer HLA-Allele A und B sowie eine möglichst große Vielfalt in den Krebsarten. Hierbei konnte auf eine umfangreiche Datenbank mit HLA-Typisierungsdaten von über tausend Zelllinien des Projektpartners TRON zurückgegriffen werden¹⁷⁴. Auf Basis dieser Daten wurden letztendlich zehn humane Krebszelllinien ausgewählt (Tabelle 7).

Tabelle 7: Übersicht der verwendeten humanen Krebszelllinien

Zelllinie	HLA-A	HLA-B	Entität
COLO-699N	02:01;02:01	07:02;58:01	Lungen Adenokarzinom
JY	02:01;02:01	07:02;07:02	EBV-immortalisierte lymphoblastische B-Zell-Linie
Mel 526	02:01;02:01	15:01;15:01	Melanom
NIH-OVCAR-3	02:01;29:03	07:02;58:01	Ovarialkarzinom
SK-Mel 37	02:01;02:01	07:02;15:01	Melanom
K562_A0201	02:01;02:01	-	Chronische myeloische Leukämie
HEK 293	03:01;03:01	07:02;07:02	embryonale Nierenzellen
JAR	03:01;03:02	07:02;47:01	Chorionkarzinom
LCLC-103H	03:01;03:01	07:02;07:02	großzelliges Lungenkarzinom
Mel-HO	03:01;03:01	07:02;14:02	Melanom

Da die im späteren Verlauf gezeigte Isolierung von HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden mittels des HLA-ABC-Antikörpers W6/32 durchgeführt wurde, wurde zusätzlich die HLA-Expression der Zellen mittels dieses Antikörpers durchflusszytometrisch bestimmt (Abbildung 8).

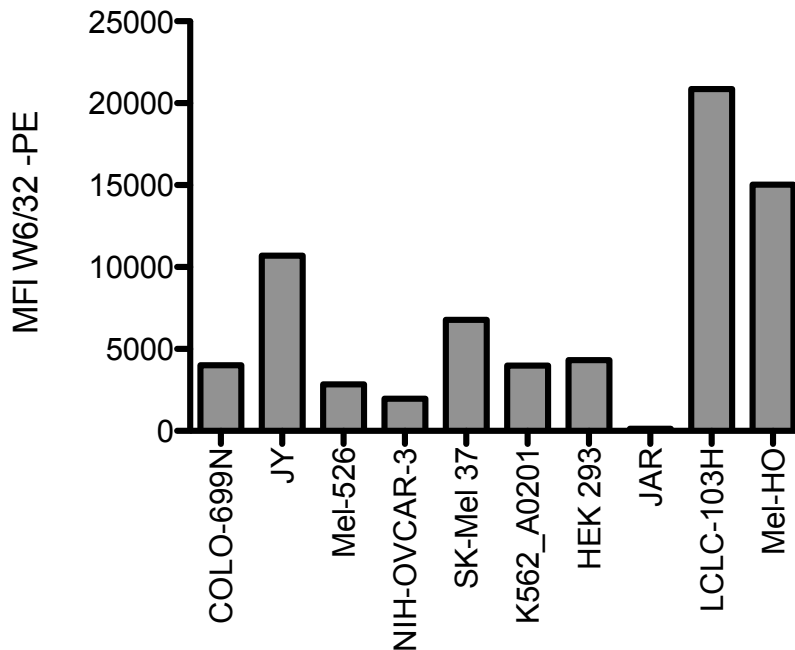


Abbildung 8: Durchflusszytometrische Analyse der HLA-Expression aller verwendeten Krebszelllinien

Zur Bestimmung der HLA-Expression der zehn ausgewählten humanen Krebszelllinien wurden jeweils 1×10^6 Zellen mit dem anti-HLA-ABC-Antikörper W6/32 gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI).

Die hier abgebildeten mittleren Fluoreszenzintensitäten zeigen, dass die JAR Zelllinie entgegen der Datenbank-basierten Annahme keine HLA-Expression aufwies, so dass sie für die folgenden Analysen nicht berücksichtigt wurde. Final wurde demnach mit neun humanen Krebszelllinien sechs verschiedener Entitäten gearbeitet. Für eine erste Charakterisierung der Krebszelllinien wurden diese hinsichtlich ihrer Gesamtheit aller Proteine, dem so genannten Proteom analysiert.

3.1.2 Proteomanalyse der Zelllinien

Zur Analyse von komplexen Proteinproben hat sich die Massenspektrometrie in den letzten 15 Jahren immer deutlicher als die Methode der Wahl etabliert¹⁷⁵. Für die Analysen in dieser Arbeit wurden Synapt G2-S Massenspektrometer der Firma Waters verwendet, welche sich in vorangegangenen Arbeiten als besonders stabil und sensitiv für markierungsfreie massenspektrometrische Quantifizierung von Proteinen erwiesen haben¹⁷⁶. Für die Proteomanalysen der neun oben genannten Krebszelllinien wurden jeweils 5×10^5 Zellen lysiert und anschließend 20 µg Gesamtprotein gemäß des FASP-Protokolls tryptisch verdaut. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte in jeweils fünf technischen Replikaten. Die hohe Korrelation zwischen den technischen Replikaten der einzelnen Zelllinien ist in Abbildung 9 zu sehen und unterstreicht die Reproduzierbarkeit des Arbeitsablaufs.

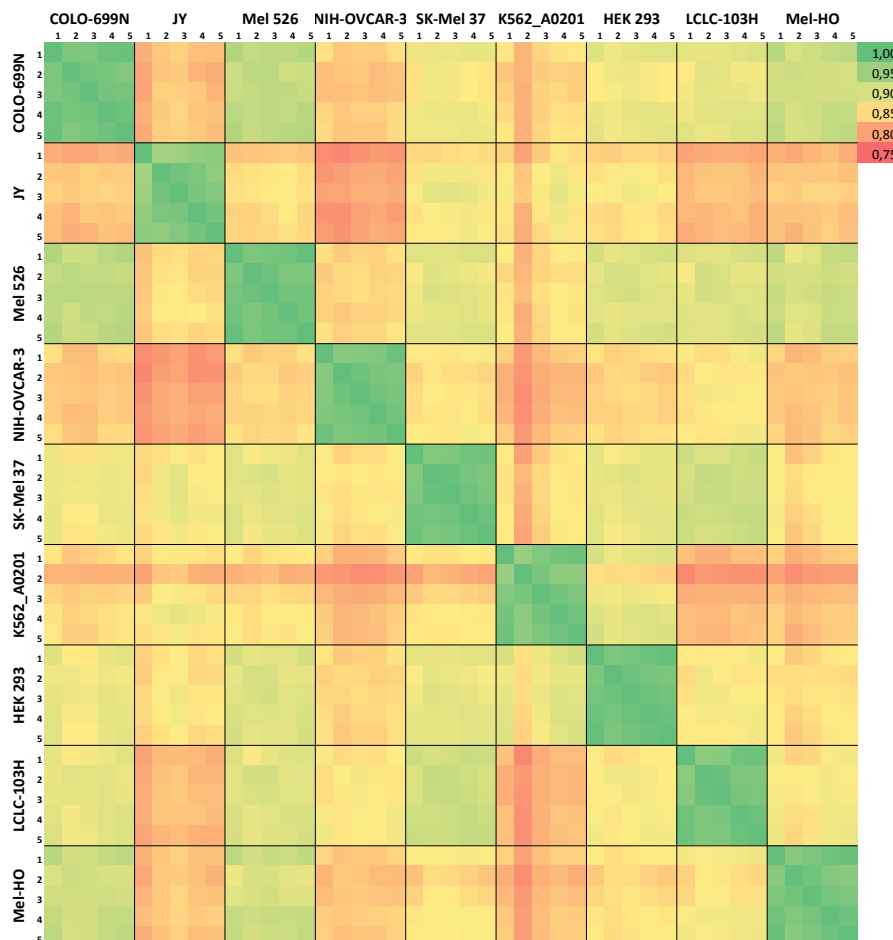


Abbildung 9: Korrelationsmappe der Proteomanalyse der neun humanen Krebszelllinien

Gezeigt ist die Korrelation zwischen den technischen Replikaten der Proteomanalyse in humanen Krebszelllinien. Hierbei wurden jeweils 5×10^5 Zellen nach dem FASP-Protokoll tryptisch verdaut und anschließend massenspektrometrisch untersucht. Gemessen wurden jeweils fünf technische Replikate. Die dargestellte Korrelation nimmt von grün (1,0) nach rot (0,75) ab.

Wie in Tabelle 8 zu sehen ist, konnten in den einzelnen Krebszelllinien zwischen 4638 und 5220 Proteine und über alle Zelllinien hinweg über 6700 Proteine identifiziert werden, was einer Abdeckung des menschlichen Proteoms von etwa 33 % entspricht.

Tabelle 8: Anzahl der identifizierten Proteine in neun humanen Krebszelllinien

Zelllinie	Anzahl der identifizierten Proteine
COLO-699N	4757
JY	4844
Mel 526	4977
NIH-OVCAR-3	4751
SK-Mel 37	4784
K562_A0201	4907
HEK 293	5220
LCLC-103H	4638
Mel-HO	4833

Zur Analyse der Ähnlichkeit der Zelllinien bezüglich ihrer Expressionsprofile der identifizierten Proteine wurden die sie mit dem frei verfügbaren Programm Past3¹⁷⁷ mittels hierarchischem Clustering auf Ähnlichkeiten der Proteinexpressionsprofile untersucht. In Abbildung 10 ist das Ergebnis dieser Analyse zu sehen. Hierbei ist zu erkennen, dass beispielsweise die Zelllinien JAR und NIH-OVCAR-3, welche beide ihren Ursprung in malignen Veränderungen weiblicher Organe haben (Plazenta bzw. Ovarien) ein gemeinsames Cluster bilden. Auch die Zelllinien JY und K562_A0201, welche beide gemäß ihrer Entität das blutbildende System betreffen, bilden ein gemeinsames Cluster. Die drei Melanomzelllinien Mel-HO, Mel 526 und SK-Mel 37 bilden zwar nicht direkt ein gemeinsames Cluster, liegen aber dennoch nah beieinander.

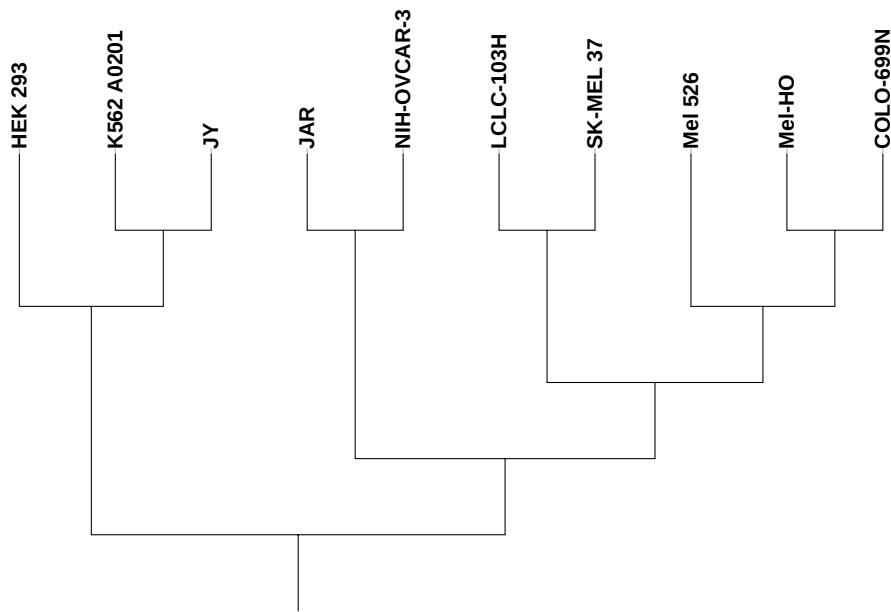


Abbildung 10: Stammbaum der zehn humanen Krebszelllinien auf Grundlage ihrer Proteome

Zur Identifizierung der Proteome wurden jeweils 5×10^5 Zellen nach dem FASP-Protokoll tryptisch verdaut und anschließend massenspektrometrisch untersucht. Diese Datensätze wurden daraufhin mit dem Programm Past3 mittels hierarchischem Clustering auf Ähnlichkeiten in den Expressionsprofilen ihrer Proteine untersucht. Dargestellt ist der hieraus resultierende Stammbaum.

Im nächsten Schritt sollte die Qualität des hier vorliegenden Datensatzes untersucht werden. Diese ist immer durch den dynamischen Bereich sowie die Anzahl der identifizierten Peptide pro Protein gekennzeichnet. Als dynamischer Bereich wird der Unterschied zwischen dem höchst und niedrigsten abundanten Protein bezeichnet¹⁷⁸, weshalb ein hoher dynamischer Bereich mit einer hohen Abdeckung des gesamten Proteoms einhergeht.

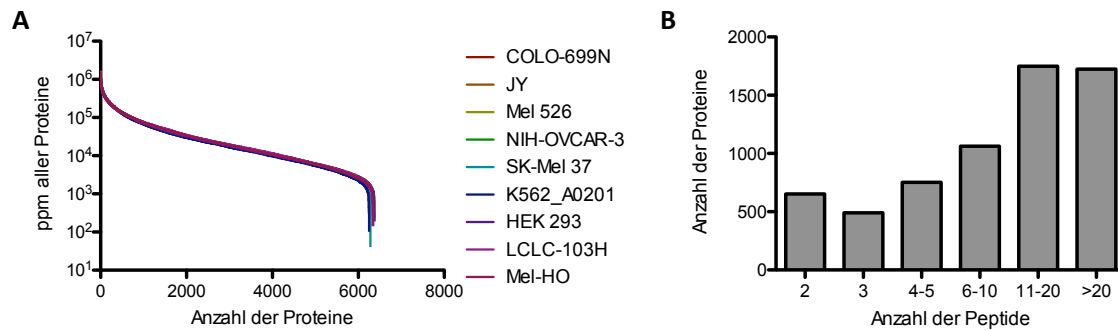


Abbildung 11: Dynamischer Bereich und Anzahl der Peptide pro Protein der Proteomanalyse neun humaner Krebszelllinien

Zur Bestimmung der Qualität des Proteom-Datensatzes wurde der dynamische Bereich sowie die Anzahl der Peptide pro identifiziertem Protein betrachtet. **A.** Der dynamische Bereich erstreckt sich in dem hier vorliegenden Datensatz über vier Größenordnungen, was einer hohen Abdeckung des gesamten Proteoms entspricht. **B.** Die Mehrheit der identifizierten Proteine (70 %) konnte durch mindestens 6 Peptide identifiziert werden, ca. 50 % durch mehr als 10 Peptide und noch etwa 25% aller Proteine durch mindestens 20 Peptide.

Wie in Abbildung 11 zu sehen ist erstreckt sich der dynamische Bereich der hier gemessenen Proben über vier Größenordnungen. Des Weiteren konnten 70 % aller Proteine durch mindestens 6 Peptide identifiziert werden, etwa die Hälfte durch mehr als 10 und noch ein Viertel aller Proteine durch mindestens 20.

Insgesamt lässt sich sagen, dass hier mittels hoch sensitiver und reproduzierbarer massenspektrometrischer Analysen ein umfassender Datensatz der Proteome von neun humanen Krebszelllinien geschaffen wurde, welcher die Grundlage tiefergehender Untersuchungen dieser Zelllinien in Bezug auf ihre Eigenschaften in der Präsentation von HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden darstellt.

3.2 Methodenetablierung zur Isolierung von HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden

Zur weiterführenden Analyse der Krebszelllinien sollte die Gesamtheit der präsentierten HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden, das so genannte Ligandom untersucht werden. Aufgrund der Tatsache, dass diese Art von Analysen in unserem Labor zuvor noch nicht durchgeführt wurden und Messungen nach Beispielprotokollen aus anderen Laboren nicht zum Erfolg geführt haben, war es ein primäres Ziel dieser Arbeit ein Protokoll zur Ligandomanalyse zu etablieren.

3.2.1 Detergenzienvergleich zur optimalen Zelllyse

Zu Beginn des Protokolls steht die Zelllyse. Hierfür stehen verschiedene Detergenzien zur Auswahl, welche man anhand ihrer chemischen Struktur, ihrem Ladungszustand und auch ihrer Fähigkeit Proteine zu solubilisieren (milde Detergenzien) oder zu denaturieren (starke Detergenzien) unterscheidet. Da bei einer Ligandomanalyse intakte HLA-Peptid-Komplexe aus den Zellen isoliert werden sollen ist eine sanfte Zelllyse erforderlich. Anhand ihrer Charakteristika wurden die Detergenzien 3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS), n-Dodecyl β -D-maltosid (DDM) und n-Octyl- β -D-glucopyranosid (OGP) zur Optimierung der Zelllyse ausgewählt. Bei CHAPS handelt es sich um ein zwitterionisches Detergenz, welches aufgrund seiner nicht-denaturierenden Eigenschaften bereits seit den 80er Jahren Anwendung im Bereich der Proteinisolation findet und hierbei in den letzten Jahren auch vermehrt zur Extraktion von Proteinen mit anschließender Proteomik-Analyse genutzt wird^{179,180}. Sowohl DDM als auch OGP sind nicht-ionische Detergenzien mit einer aliphatischen Kette von acht (OGP) bzw. 12 (DDM) Kohlenstoffatomen und besitzen beide, ebenso wie CHAPS, milde, nicht-denaturierende Eigenschaften¹⁸¹. Zur vergleichenden Untersuchung der drei Detergenzien wurden jeweils 1×10^8 JY Zellen in einem PBS-Puffer mit Proteaseinhibitoren und 1,2 % (w/v) CHAPS, DDM oder OGP für insgesamt drei Stunden bei 4 °C inkubiert und eine Immunpräzipitation bis zum Schritt der Ultrafiltration wie in 2.11.2.1 beschrieben durchgeführt. Anschließend wurden jeweils 10 μ L Probe aus den einzelnen Schritten mittels Western Blot Analyse auf die Menge an HLA-Peptid-Komplexen untersucht.

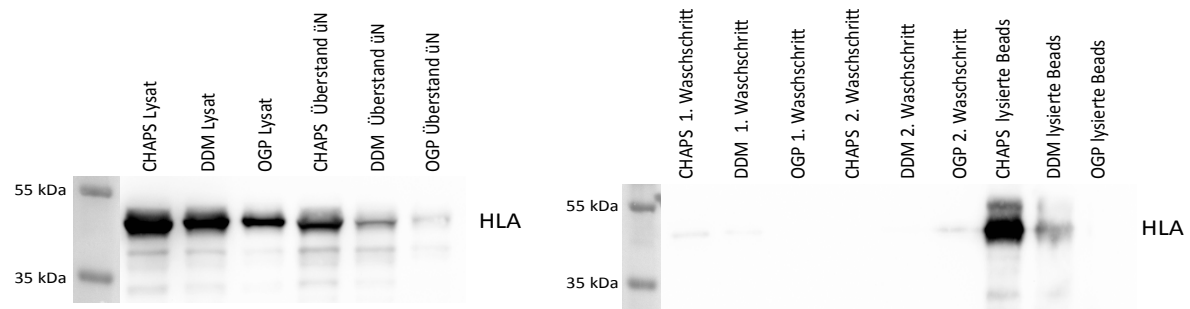


Abbildung 12: Western Blot Analyse von JY Zellen nach unterschiedlicher Zellyse mit folgender Isolierung von HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden

Zur Ermittlung des optimalen Detergenz zur Zellyse der Proben für die anschließende Isolierung von HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden wurden jeweils 1×10^8 JY Zellen mit 1,2% (w/v) CHAPS, DDM oder OGP solubilisiert und die Immunpräzipitation mit Hilfe des Antikörpers W6/32 durchgeführt. Pro Tasche wurden 10 μ L Probe aufgetragen und auf die Menge an HLA-Peptid-Komplexen untersucht.

Wie in Abbildung 12 zu sehen ist, ist die reine Zellyse mit CHAPS am effektivsten. Die Menge an ungebundenen HLA-Peptid-Komplexen, sprich der Überstand nach einer über Nacht Inkubation auf den Antikörper-gekoppelten Beads, ist zwar in der CHAPS-behandelten Probe am größten, dafür ist aber auch die Menge an gebundenen Proteinkomplexen („lysierte Beads“) in eben diesen Proben deutlich größer als in den Proben, in denen die Zellen mit DDM oder OGP lysiert wurden. Demnach lässt sich festhalten, dass aufgrund des Ziels möglichst viele HLA-Peptid-Komplexe zu isolieren und an die Antikörper-gekoppelten Beads zu binden, eine Lyse mit CHAPS am effektivsten ist.

Der nächste kritische Punkt in dem Protokoll der Ligandomanalyse ist die Bindung der HLA-Peptid-Komplexe an die Antikörper-gekoppelten Beads.

3.2.2 Titration der BrCN-Sepharose-Beads

Zur effektiven Bindung der HLA-Peptid-Komplexe an die Beads über den an diese gekoppelten HLA-Klasse-I Antikörper W6/32, ist ein optimales Bead-Antikörper-Verhältnis essentiell. Werden zu wenige Beads verwendet besteht die Gefahr, nicht alle HLA-Peptid-Komplexe zu binden. Werden allerdings zu viele Beads verwendet, kann dies beispielsweise durch sterische Beeinträchtigungen der Beads untereinander ebenso zu einer Verringerung der Bindungseffizienz führen. Basierend auf Literaturangaben wurden 1 mg Antikörper pro mL Zellpellet verwendet und die Beadmenge hierbei von 8 mg/mL bis 400 mg/mL titriert. Hierzu wurden pro Ansatz 1×10^8 JY Zellen verwendet und die HLA-Klasse-I-Peptid-Komplexe wie in 2.11.2.1 beschrieben isoliert. Für diesen Versuch wurde das Protokoll nach den Waschschritten beendet und anschließend je 10 μ L Probe aus den einzelnen Schritten mittels Western Blot Analyse untersucht.

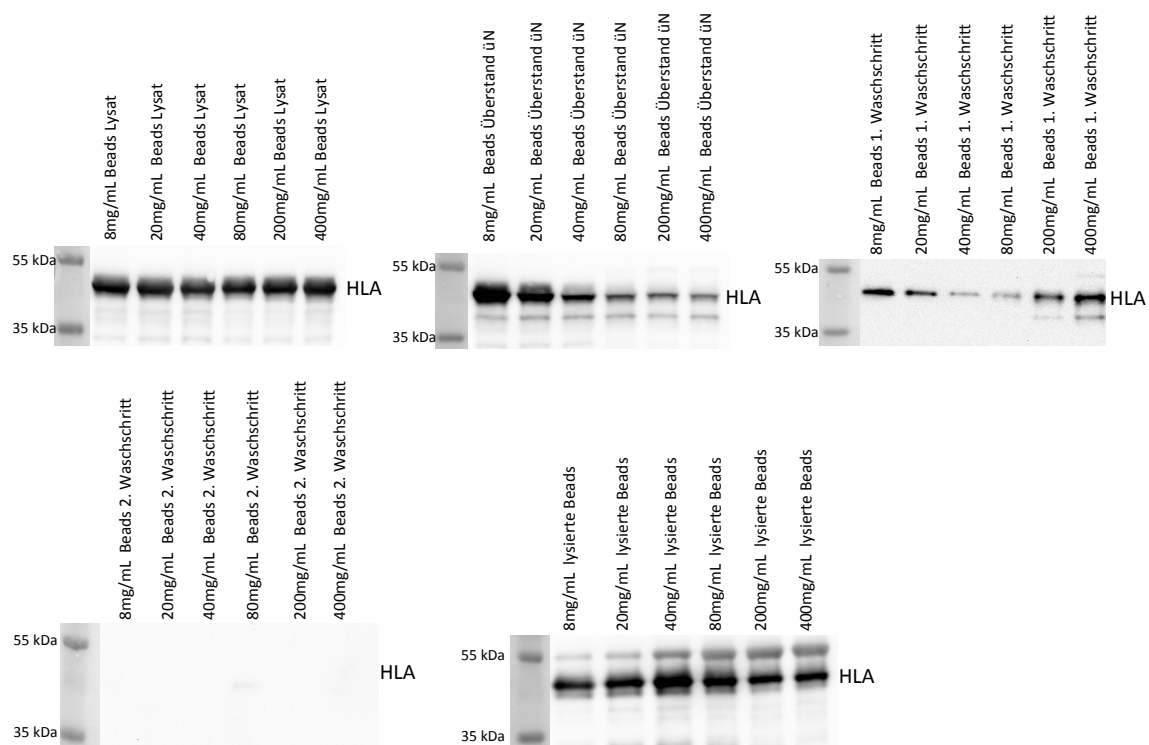


Abbildung 13: Western Blot Analyse von JY Zellen mit titrierten Mengen an BrCN Sepharose Beads zur Isolierung von HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden

Zur Ermittlung des optimalen Verhältnisses von BrCN Sepharose Beads zum Antikörper (1 mg pro mL Zellpellet) wurde die Menge von 8 mg Beads/mL Zellepellet bis 400 mg Beads/mL Zellpellet austitriert. Hierzu wurden jeweils 1×10^8 JY Zellen verwendet und aus diesen die HLA-Peptid-Komplexe mittels Immunpräzipitation und dem Antikörper W6/32 isoliert. Zur Analyse auf die Menge an HLA-Peptid-Komplexen wurden jeweils 10 μ L Probe mittels Western Blot und einem HLA-Antikörper untersucht.

Abbildung 13 zeigt, dass, wie zu erwarten, keine Unterschiede in der Lyse der Zellen zu sehen ist. Allerdings ist deutlich zu sehen, dass die Menge an ungebundenen HLA-Peptid-Komplexen („Überstand üN“) mit zunehmender Beadmenge abnimmt, wobei der Unterschied zwischen den Proben ab 80 mg/mL gering ist. Die Menge an schwach gebundenen Komplexen, die in dem ersten Waschschrift von den Beads gelöst werden, ist in den Proben mit einer Beadmenge von 40 mg/mL und 80 mg/mL am geringsten. Die lysierten Beads zeigen, dass bei der Verwendung von 40 mg BrCN-Sepharose-Beads pro mL Zellpellet die größte Menge an HLA-Peptid-Komplexen zu detektieren war. Aufgrund dieser Ergebnisse ist festzuhalten, dass für das Protokoll eine Verwendung von 40 mg Beads pro mL Zellpellet und dementsprechend pro mg Antikörper optimal ist. Für eine optimale Bindung der Peptid-Komplexe an die Beads spielt neben der bis zu diesem Punkt getesteten Aspekte der Zelllyse und des Verhältnisses der Beads zum Antikörper auch die räumliche Distanz sowie die optimale Größenfiltration und Probenaufreinigung eine Rolle, so dass dies der nächste Schritt des Etablierungsprozesses war.

3.2.3 Evaluierung der optimalen Materialien wie Reaktionsgefäß, Ultrafiltrationseinheit und Umkehrphasenaustauschchromatographie-Platte

Bei der Immunpräzipitation spielt auch die räumliche Nähe der Interaktionspartner zueinander eine Rolle. Um hier eine möglichst hohe Bindungseffizienz von HLA-Peptid-Komplexen an die BrCN-Sepharose-Beads zu erreichen, wurden zwei verschiedene Reaktionsgefäße miteinander verglichen, 15 cm lange Chromatographie-Säulen und 5 mL LoBind Reaktionsgefäße. Der darauffolgende Schritt der Ultrafiltration dient der Trennung der Peptide von ihren HLA-Molekülen, welche durch Filtrationseinheiten mit einem *cut off* von 10 kDa erreicht wird. Für diesen Schritt wurden 15 mL Amicon Ultra-Zentrifugen-Filtereinheiten mit 500 μ L Vivacon Zentrifugaleinheiten verglichen. Der finale Schritt in dem Protokoll zur Isolierung von HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden besteht aus der Aufreinigung und Konzentration der Proben mittels Umkehrphasenaustauschchromatographie. Hierbei wurde die OASIS HLB 96 *well* Mikrotiterplatte mit der Sep-Pak-C18 96 *well* Mikrotiterplatte verglichen. Zur Evaluierung der optimalen Kombination der drei Schritte wurden verschiedene Konditionen gewählt: **1.** Eine Kombination aus 15 cm Chromatographie-Säule, Amicon-Zentrifugen-Filtereinheit und der Sep-Pak-C18 Mikrotiterplatte, **2.** 5 mL LoBind Reaktionsgefäß, Vivacon Zentrifugaleinheit und Sep-Pak-C18 Mikrotiterplatte, **3.** 5 mL LoBind Reaktionsgefäß, Vivacon-Zentrifugaleinheit und OASIS HLB Mikrotiterplatte. In jedem Ansatz wurden die HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden aus 5×10^8 JY Zellen wie in 2.11.2.1 beschrieben isoliert. Tabelle 9 zeigt die Anzahl der identifizierten HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden in dem jeweiligen Ansatz.

Tabelle 9: Anzahl der identifizierten Peptid-Liganden in verschiedenen Versuchsansätzen zur Ermittlung der optimalen Kombination aus Reaktionsgefäß, Ultrafiltrationseinheit und Umkehrphasenaustauschchromatographie-Platte

Versuchsansatz	Anzahl der identifizierten Peptid-Liganden	Anzahl der identifizierten Peptid-Liganden mit 8-11 AS
1 (Kombination aus 15 cm Chromatographie-Säule, Amicon und Sep-Pak-C18)	115	114
2 (Kombination aus 5 mL LoBind Reaktionsgefäß, Vivacon und Sep-Pak-C18)	2403	1246
3 (Kombination aus 5 mL LoBind Reaktionsgefäß, Vivacon und OASIS HLB)	2648	1367

Die Ergebnisse zeigen, dass die Benutzung eines 5mL LoBind Reaktionsgefäßes und der Vivacon-Zentrifugaleinheit (Ansatz 2 und 3) eine deutlich bessere Isolation von HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden im Vergleich zur Nutzung von Chromatographie-Säulen und Amicon-Zentrifugeneinheiten bringt. Die Kombination aus 5 mL LoBind Reaktionsgefäß zur Zellyse, Vivacon-Zentrifugaleinheit zur Größenfiltration und OASIS HLB Mikrotiterplatte zur Entsalzung und Konzentration der Proben (Ansatz 3) bringt die höchste Anzahl an HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden hervor.

Alle Optimierungsversuche zusammengenommen, lässt sich feststellen, dass im Rahmen der vorliegenden Dissertation das in Abbildung 14 schematisch dargestellte Protokoll zur Isolierung von HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden aus humanen Krebszelllinien optimiert und etabliert werden konnte.

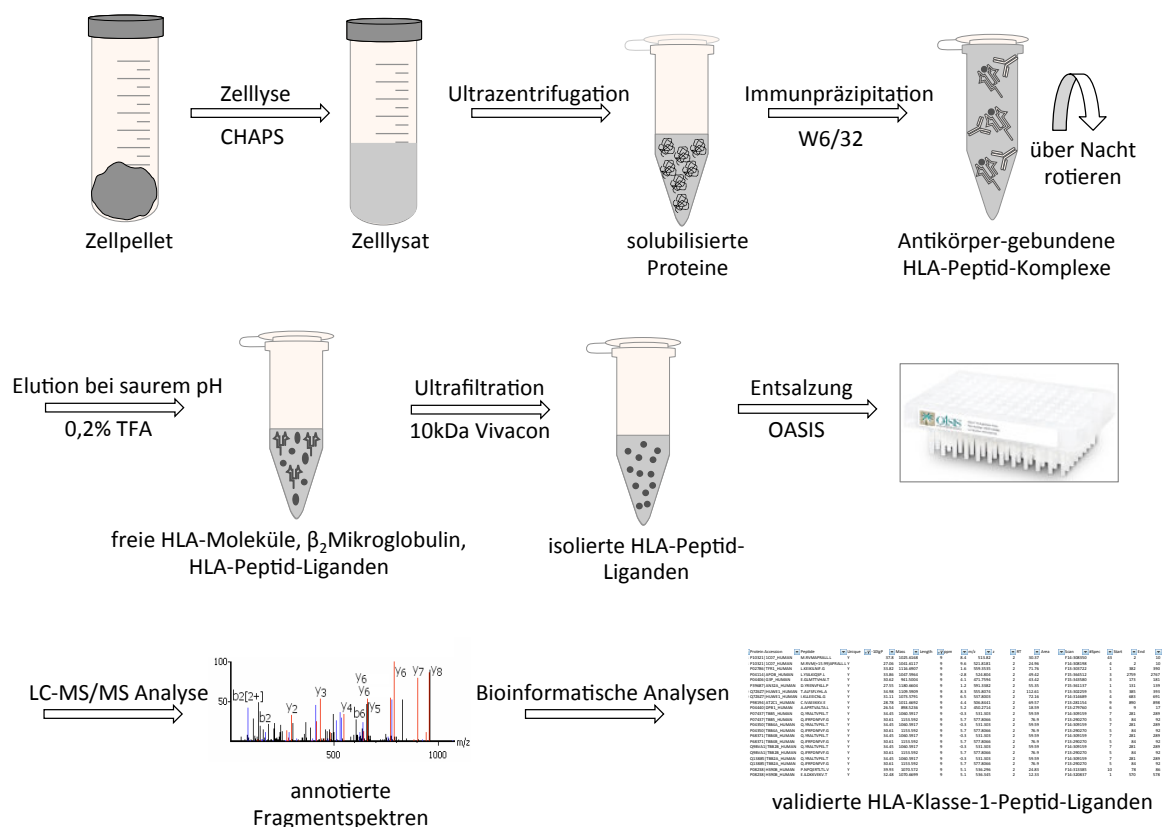


Abbildung 14: Schematische Darstellung des neu etablierten Arbeitsablaufs zur Isolierung von HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden

Der nächste Schritt war nun die Anwendung des Protokolls auf die in 3.1.1 genannten humanen Krebszelllinien.

3.3 Charakterisierung des Ligandoms von humanen Krebszelllinien

Zur Ergänzung der bereits gezeigten Proteomdaten der in 3.1 genannten neun humanen Krebszelllinien, sollte im Folgenden das Ligandom dieser Zelllinien anhand des im Rahmen dieser Arbeit etablierten Protokolls zur Isolierung von HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden untersucht werden.

3.3.1 Isolierung von HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden aus 9 humanen Krebszelllinien

Im Bereich der Immuntherapie zur Behandlung von Krebserkrankungen ist die Identifizierung von Peptid-Liganden, welche durch HLA-Klasse-I-Moleküle CD8⁺ T-Zellen präsentiert werden von großer Bedeutung. So sind diese Daten beispielsweise Grundlage bei der Entwicklung von Vakzinen und neuen Strategien für T-Zell-Therapien.¹⁸² Aufgrund dessen wurde zur tiefergehenden Charakterisierung der Krebszelllinien nach dem Proteom auch das Ligandom untersucht. Hierzu wurden jeweils 1×10^9 Zellen lysiert und die HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden mit Hilfe des Antikörpers W6/32 mittels Immunpräzipitation isoliert und massenspektrometrisch analysiert.

Tabelle 10: Anzahl der identifizierten Peptid-Liganden aus neun humanen Krebszelllinien

Zelllinie	Anzahl der identifizierten Peptid-Liganden	Anzahl der identifizierten Peptid-Liganden mit 8-11 AS
COLO-699N	2153	1940
JY	2910	2264
Mel 526	1334	1100
NIH-OVCAR-3	1548	849
SK-Mel 37	2314	2169
K562_A0201	1022	935
HEK 293	762	481
LCLC-103H	2311	1278
Mel-HO	3338	1843

In Tabelle 10 ist zu sehen, dass in den neun Krebszelllinien zwischen 762 und 3338 HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden beliebiger Länge und zwischen 481 und 2264 Liganden mit einer Länge von 8–11 Aminosäuren identifiziert werden konnten. Dass es sich bei den identifizierten Peptiden um HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden handelt, zeigt sich zum einen in Abbildung 15 in der Größe der Peptide.

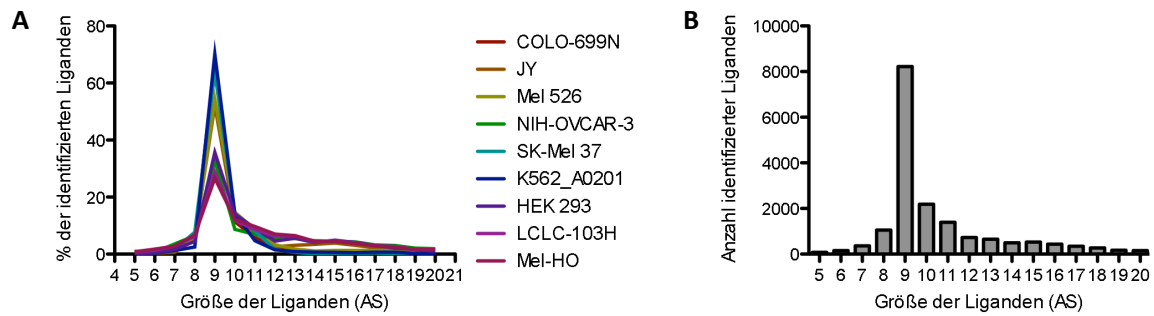


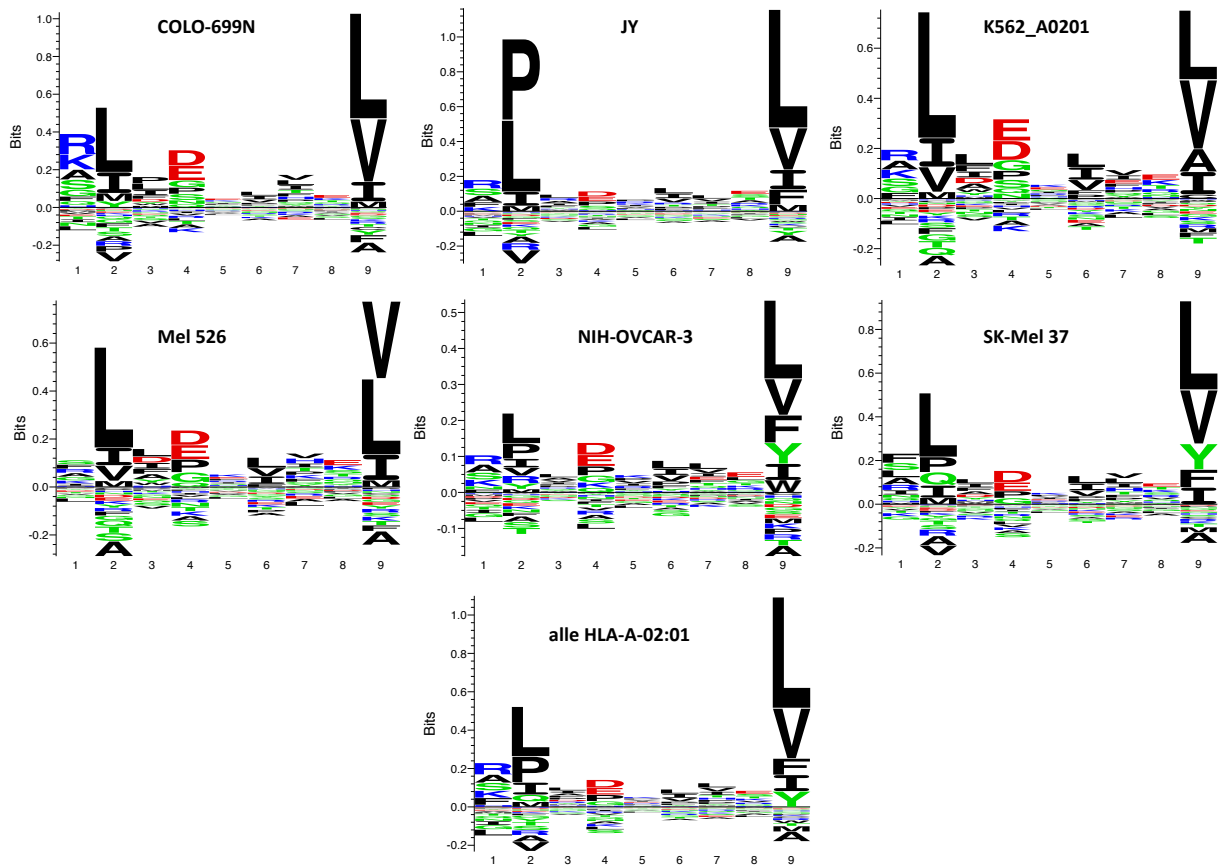
Abbildung 15: Größenverteilung der identifizierten HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden

Zur Isolierung von HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden wurden jeweils 1×10^9 Zellen in einem CHAPS-Puffer lysiert, die HLA-Peptid-Komplexe mittels Immunpräzipitation und dem Antikörper W6/32 isoliert und abschließend die Peptid-Liganden durch einen Größenfiltrationsschritt mit einem *cut off* von 10 kDa von den HLA-Molekülen getrennt. Gezeigt ist die Größe der massenspektrometrisch detektierten Liganden in Aminosäuren (AS) für jede Zelllinie einzeln (**A**) und gemittelt über alle Zelllinien (**B**).

HLA-Klasse-I-Moleküle präsentieren in der Regel Peptide mit einer Größe von 8-11, typischerweise von 9 Aminosäuren.¹⁸³ Die hier identifizierten Peptide zeigen sowohl in den einzelnen Zelllinien einen Anteil der Peptide bestehend aus 9 Aminosäuren von bis zu knapp 80 % (Abb. 15A) als auch gemittelt über alle Zelllinien eine deutliche Mehrheit in Peptiden mit einer Länge von 9 Aminosäuren (Abb. 15B). Zum anderen zeichnen sich HLA-Moleküle durch charakteristische Bindungsmotive für ihre Peptid-Liganden aus. Hierbei ist es für HLA-Moleküle mit dem Allel A-02:01 kennzeichnend, dass ihre Ankerpositionen mit den Aminosäuren Leucin (L) und Methionin (M) an P2 und Valin (V) und Leucin (L) an P9 zu finden sind. Bei HLA-Molekülen mit dem Allel B-07:02 befinden sich die Ankerpositionen an P2 und P9 mit den Aminosäuren Prolin (P) und Leucin (L)⁹⁵. Da die in dieser Arbeit betrachteten Zelllinien vor allem eine Übereinstimmung in den Allelen HLA-A-02:01 und HLA-B-07:02 aufweisen (Tabelle 7), sind in den Abbildungen 16 (HLA-A-02:01) und 17 (HLA-B-07:02) die Bindungsmotive dieser Allele für alle identifizierten HLA-Peptid-Liganden mit einer Größe von 9 Aminosäuren dargestellt. Dabei spiegelt die Größe der Buchstaben die Häufigkeit dieser Aminosäuren an den entsprechenden Positionen wider. Abbildung 16A zeigt, dass die Bindungsmotive der HLA-A-02:01 positiven Zelllinien mit der Literatur übereinstimmen, da an P2 in 5 der 6 Zelllinien Leucin dominiert und an P9 Leucin oder Valin. Gemittelt über alle sechs Zelllinien findet sich an P2 und P9 am häufigsten ein Leucin. Bei JY fällt auf, dass es an P2 vorrangig die Aminosäuren Prolin und Leucin aufweist, was damit einhergeht, dass diese Zellen HLA-A-02:01 und HLA-B-07:02 positiv sind. Betrachtet man dahingegen die in Abbildung 16B dargestellten Zelllinien, die negativ für HLA-A-02:01 sind, so zeigen alle drei Zelllinien diffuse Bindungsmotive, welche nicht mit den typischen Ankerpositionen für HLA-A-02:01 übereinstimmen. LCLC-103H exprimiert neben HLA-A-02:01 auch das Allel HLA-B-

07:02 und zeigt dessen spezifisches Bindungsmotiv. Mel-HO und HEK 293 sind beide HLA-A-03:01 positiv und ihre dargestellten Bindungsmotive stimmen durch Lysin (K) als dominierende Aminosäure an P9 mit Literaturangaben für das Muster von HLA-A-03:01 Allelen überein⁹⁵.

A



B

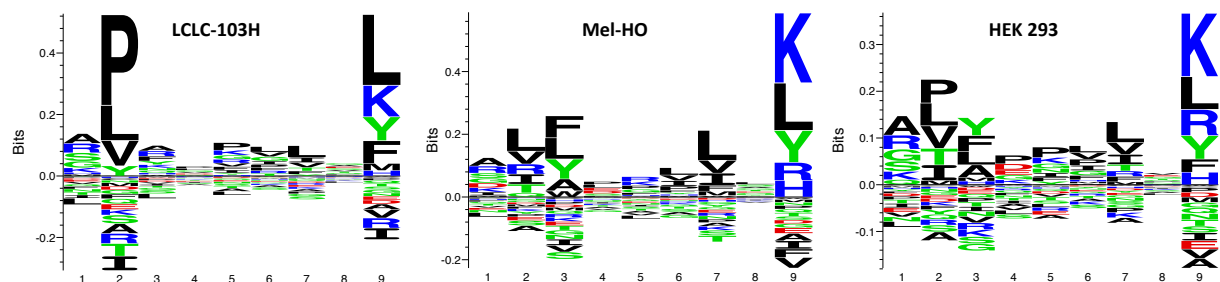


Abbildung 16: Bindungsmotive der identifizierten HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden für HLA-A-02:01

Die HLA-Peptid-Liganden wurden aus jeweils 1×10^9 Zellen isoliert und auf ihre Bindungsmotive hinsichtlich HLA-A-02:01 untersucht. Gezeigt sind die Ergebnisse der HLA-A-02:01 positiven (A) und negativen (B) Zelllinien. Die Größe der Buchstaben spiegelt die Häufigkeit dieser Aminosäure an der Position wider.

In Abbildung 17A ist zu erkennen, dass der Großteil der HLA-B-07:02 positiven Zelllinien an den Ankerpositionen P2 und P9 mit Leucin die charakteristische Aminosäure für diese Position aufweist. Dasselbe gilt für die Verteilung über alle Zelllinien. Auch die Melanomzelllinie Mel 526 (Abb. 17B), welche negativ für HLA-B-07:02 ist, weist an P2 und P9 vorwiegend ein Leucin auf.

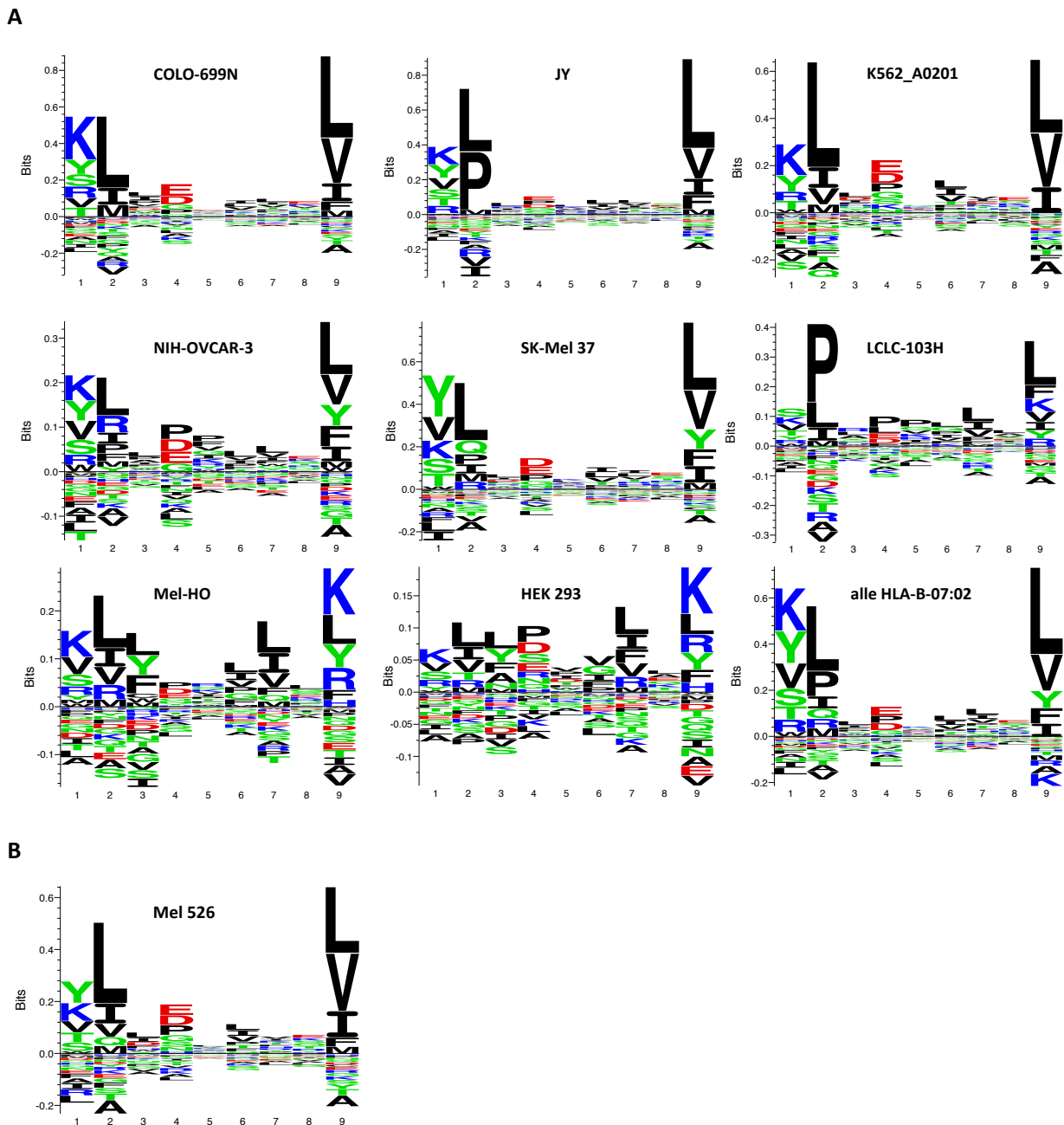


Abbildung 17: Bindungsmotive der identifizierten HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden für HLA-B-07:02

Die HLA-Peptid-Liganden wurden aus jeweils 1×10^9 Zellen isoliert und auf ihre Bindungsmotive hinsichtlich HLA-A-02:01 untersucht. Gezeigt sind die Ergebnisse der HLA-A-07:02 positiven (A) und negativen (B) Zelllinien. Die Größe der Buchstaben spiegelt die Häufigkeit dieser Aminosäure an der Position wider.

Ergänzend zu den Analysen der Bindungsmotive für die HLA-A-02:01 und HLA-B-07:02 spezifischen Peptid-Liganden mit einer Länge von 9 Aminosäuren, wurde mit Hilfe des öffentlich zugänglichen Alignment-Programms GibbsCluster¹⁸⁴ eine generelle Annotation aller identifizierten Peptide mit allen bekannten HLA-Allelen untersucht. In Abbildung 18 ist diese Analyse beispielhaft für die Zelllinie LCLC-103H dargestellt.

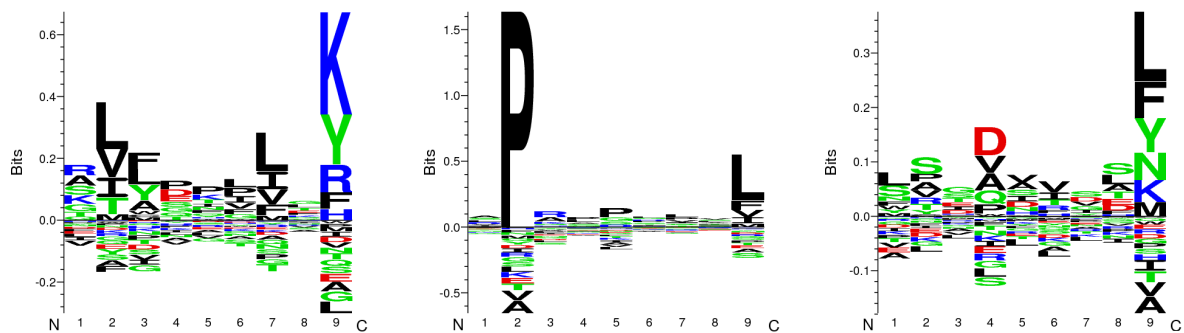


Abbildung 18: GibbsClustering von identifizierten HLA-Klasse-I-Peptiden aus LCLC-103H Zellen

Die HLA-Peptid-Liganden wurden aus 1×10^9 Zellen isoliert und auf ihre Bindungsmotive untersucht. Gezeigt sind die Ergebnisse der Zelllinie LCLC-103H. Die Größe der Buchstaben spiegelt die Häufigkeit dieser Aminosäure an der Position wider.

LCLC-103H ist positiv für die Allele HLA-A-03:01, HLA-B-07:02 und HLA-C-07:02. Die in Abbildung 10 gezeigten, durch GibbsCluster vorhergesagten Bindungsmotive stimmen mit den typischen Motiven dieser Allele überein. Die linke Seite in Abb. 10 zeigt mit Lysin (K) als dominierende Aminosäure an P9 das typische Motiv von HLA-A-03:01, die mittlere Darstellung mit Prolin (P) an P2 und Leucin (L) an P9 das typische Bild von HLA-B-07:02 und die rechte Seite der Abbildung mit Leucin (L), Phenylalanin (F) und Tyrosin (Y) an P9 ein bekanntes Motiv von HLA-C-07:02. Damit stimmt das Alignment der identifizierten Peptide mit dem HLA-Expressionsmuster der LCLC-103H Zellen überein und unterstreicht die Tatsache, dass es sich bei den identifizierten Peptiden um HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden handelt.

Betrachtet man all diese Ergebnisse zusammen ist festzustellen, dass das neu etablierte Protokoll zur Isolierung von HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden erfolgreich auf die neun humanen Krebszelllinien angewendet werden konnte.

3.3.2 Qualitätskontrolle der Isolierung von HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden

Um die Isolierung des Ligandoms aus den humanen Krebszelllinien auf ihre Effizienz zu überprüfen, wurden zu jedem möglichen Zeitpunkt des Protokolls Proben für Western Blot Analysen genommen: Proben der Lysate zur Überprüfung der Zellyse, Proben der Waschschriffe zur Überprüfung der möglichst vollständigen Bindung der HLA-Peptid-Komplexe an die Antikörper-gekoppelten Beads, Proben des Eluats von den Antikörper-gekoppelten Beads zur Überprüfung der Menge an gebundenen HLA-Peptid-Komplexen und Proben des Eluats nach der Ultrafiltration zur Überprüfung der gelungenen Trennung von Peptiden und HLA-Molekülen aufgrund ihres Molekulargewichtes. Von diesen Proben wurden jeweils 10 μ L auf ein SDS-Gel aufgetragen und mittels Western Blot Analyse mit einem HLA-Antikörper untersucht.

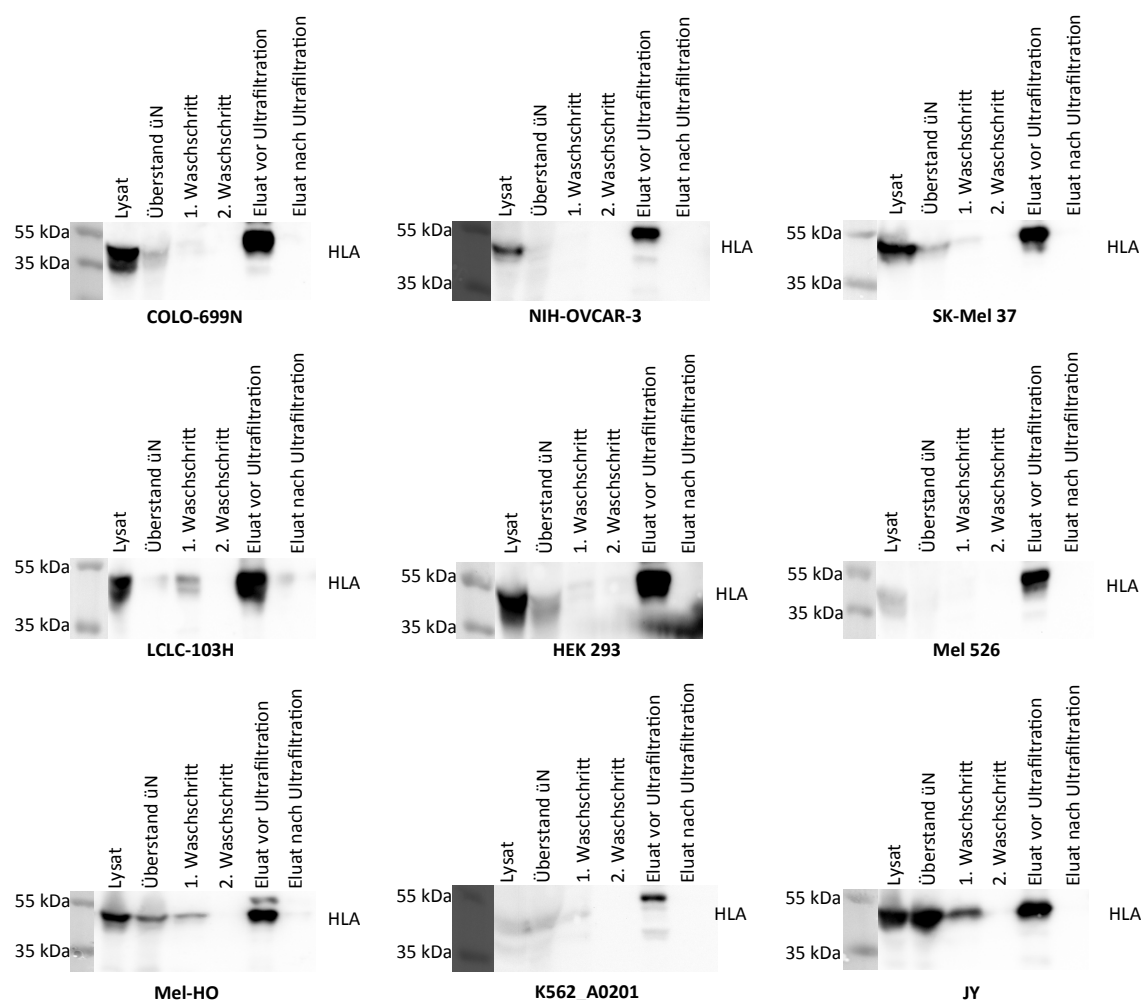


Abbildung 19: Western Blot Analyse zur Qualitätskontrolle der Isolierung von HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden

Zur Überprüfung der Effizienz der Isolierung von HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden aus jeweils 1×10^9 Zellen wurden während des Protokolls Proben folgender Schritte genommen: der Lysate, der Waschschriffe, des Eluats von den Antikörper-gekoppelten Beads und des Eluats nach der Ultrafiltration. Zur Western Blot Analyse mittels eines HLA-Antikörpers wurden jeweils 10 μ L Probe aufgetragen.

In Abbildung 19 ist zu sehen, dass beim Großteil der Zelllinien ausschließlich oder zumindest mit einer deutlich stärkeren Intensität, nur beim Lysat sowie im Eluat von den Beads HLA-Moleküle detektierbar waren. Das spricht dafür, dass eine nahezu optimale Immunoaffinitätsanreicherung erzielt werden konnte, womit eine größtmögliche Abdeckung des Ligandoms erreicht werden konnte. Um zu überprüfen, ob die Anzahl der isolierten Peptid-Liganden in Verbindung zu der entsprechenden HLA-Molekül-Expression steht, wurde nochmal die in 3.1.1. bestimmte Expressionsrate der HLA-Moleküle betrachtet.

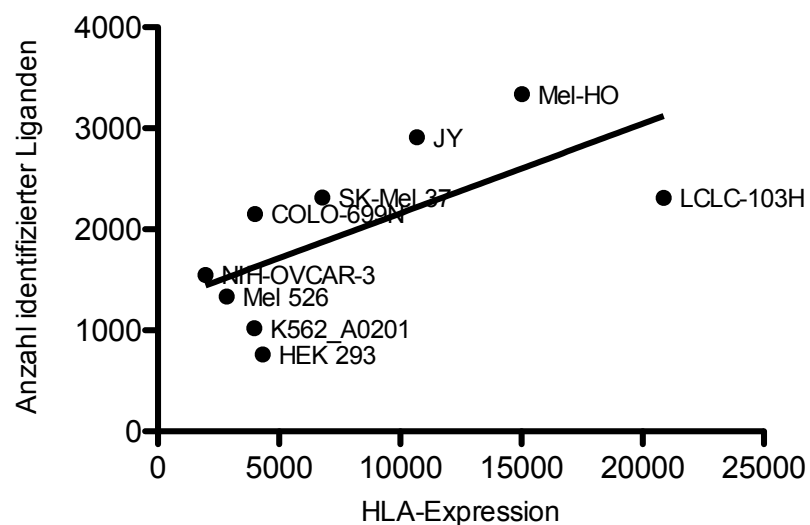


Abbildung 20: Korrelation der HLA-Expression und der Anzahl identifizierter HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden

Zur Analyse der Qualität der identifizierten HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden aus 1×10^9 Zellen wurden die erhaltenen Daten mit der HLA-Expression der Zelllinien in Korrelation gesetzt.

Setzt man die HLA-Expression mit der Anzahl der identifizierten Peptid-Liganden in Korrelation, so sieht man in Abbildung 20, dass eine positive Korrelation zwischen der Expressionsrate und den identifizierten Liganden besteht. Das bedeutet, dass bei einer stärkeren Expression von HLA-Molekülen auf der Zelloberfläche eine größere Anzahl von Peptid-Liganden identifiziert werden konnten. Aufgrund der hier aufgeführten Kontrollen ist anzunehmen, dass mit dem verwendeten Protokoll eine sehr effiziente Immunoaffinitätsanreicherung der HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden der neun humanen Krebszelllinien erreicht werden konnte, so dass dieser Datensatz in einem nächsten Schritt funktionell mit dem zuvor untersuchten Proteom verglichen werden sollte.

3.3.4 Systembiologische Analysen der verschiedenen OMICS-Datensätze

Nach der Etablierung des Protokolls zur umfangreichen massenspektrometrischen Analyse von HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden folgte die erfolgreiche Anwendung des Protokolls in der Untersuchung des Ligandoms von humanen Krebszelllinien. Zusammen mit den zuvor erhaltenen Proteomdatensätzen der Zelllinien, sollten im Folgenden systembiologische Analysen angestellt werden. Hierzu konnte zusätzlich zum Proteom und Ligandom auch das Transkriptom, also die Gesamtheit aller transkribierten Gene in der Zelle verwendet werden. Die Transkriptomdaten wurden von dem Projektpartner TRON erstellt und sind demnach in der vorliegenden Dissertation methodisch nicht im Detail erläutert. Als Überblick zeigt die Tabelle 11 die Anzahl der identifizierten Proteine, Liganden und Gene (*reads per kilobase per million mapped reads*, RPKM ≥ 1) in den Krebszelllinien.

Tabelle 11: Anzahl der identifizierten Proteine, Liganden und Gene in neun humanen Krebszelllinien

Zelllinie	# der ident. Proteine	# der ident. Liganden	# der ident. exprimierten Gene (RPKM ≥ 1)
COLO-699N	4757	2153	11398
JY	4844	2910	10519
Mel 526	4977	1334	11982
NIH-OVCAR-3	4751	1548	12217
SK-Mel 37	4784	2314	12251
K562_A0201	4907	1022	10843
HEK 293	5220	762	12467
LCLC-103H	4638	2311	11954
Mel-HO	4833	3338	11123

In einem ersten Schritt wurden die Datensätze des Proteoms und Transkriptoms gegeneinander analysiert.

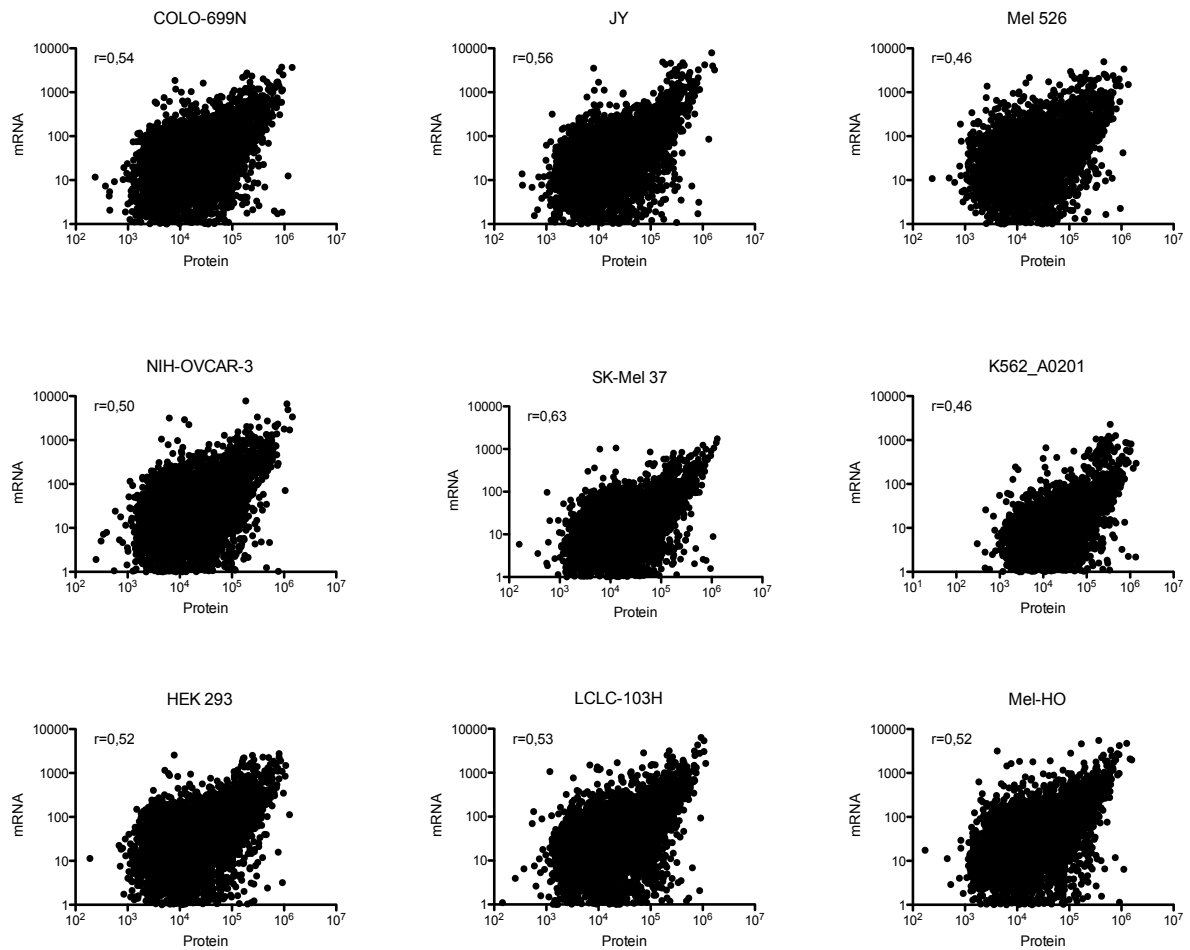


Abbildung 21: Korrelation der identifizierten Proteine und Gene aus neun humanen Krebszelllinien

Zur genaueren Betrachtung der Beziehung zwischen den identifizierten Proteinen und Genen aus neun humanen Krebszelllinien wurden die beiden Datensätze in Korrelation zueinander gesetzt. Hierbei wurde die Korrelation nach Pearson bestimmt, welche den Wert r als dimensionsloses Maß für den Grad des linearen Zusammenhanges zweier Merkmale angibt. Ist r größer 0 so spricht man von einer positiven linearen Korrelation, bei $r = 1$ wird von einem vollständig positiven linearen Zusammenhang ausgegangen.

Hierzu wurde auf eine mögliche Korrelation zwischen transkribierten Genen (RPKM ≥ 1) und exprimierten Proteinen untersucht, indem die Korrelation nach Pearson bestimmt wurde. Dabei wird der Wert r als dimensionsloses Maß für den Grad des linearen Zusammenhanges zweier Merkmale angegeben. Ist r ein positiver Wert, wird von einer positiven linearen Korrelation ausgegangen. Erreicht der Wert r 1, so spricht man von einem vollständig positiven linearen Zusammenhang. In Abbildung 21 ist zu erkennen, dass bei dem Vergleich von Proteom und Transkriptom eine positive Pearson-Korrelation von $r = 0,46$ bis $r = 0,63$ in den Zelllinien besteht. Bei einem detaillierten Blick auf die Daten konnte die Korrelation bis auf Einzelgenebene bestätigt werden, wie in Abbildung 22 am Beispiel von Claudin 6 gezeigt.

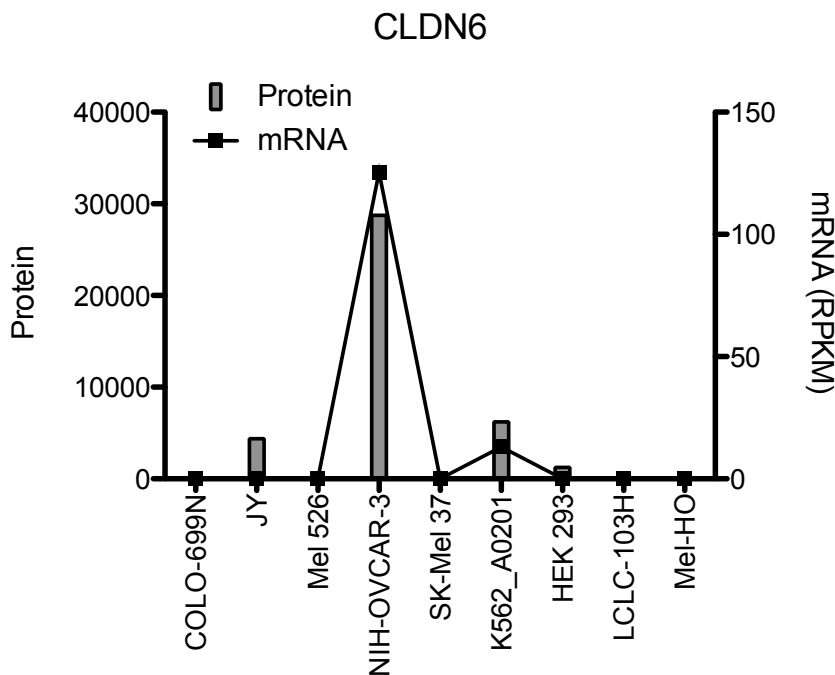


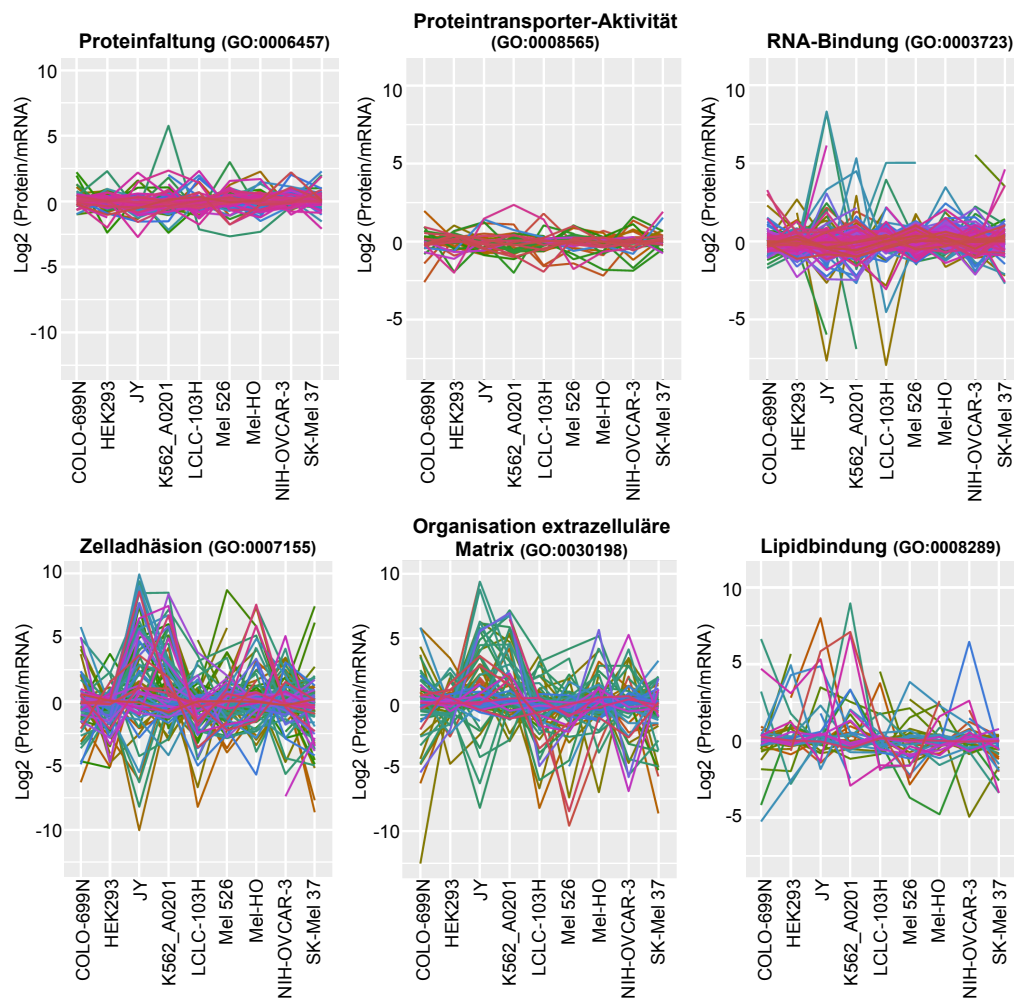
Abbildung 22: Korrelation der Expressionsdaten von Claudin 6 auf Protein - und mRNA-Ebene

Zur detaillierten Betrachtung der Korrelation zwischen Proteomdaten und Transkriptomdaten wurden diese bezüglich des Transmembranproteins Claudin 6 (CLDN6) analysiert. Dazu wurde die Expressionsstärke des Proteins als Balken und die der entsprechenden mRNA als Punkte dargestellt.

Bei Claudin 6 handelt es sich um ein so genanntes onkofötales Transmembranprotein¹⁸⁵. Das bedeutet, dass es nur im frühen fötalen Entwicklungsstadium sowie bei Erwachsenen mit bestimmten Krebserkrankungen zu finden ist. Bei gesunden Menschen dagegen ist die Transkription von Claudin 6 stillgelegt und das Protein daher nicht exprimiert. Eine veränderte Expression von Claudin 6 wurde beispielsweise im Zusammenhang mit malignen Veränderungen der Ovarien beschrieben¹⁸⁶, was mit den in Abbildung 13 gezeigten hohen Expressionsraten in den NIH-OVCAR-3 Zellen sowohl auf mRNA, als auch auf Proteinebene übereinstimmt.

Im nächsten Schritt der vergleichenden Analyse der Datensätze wurde eine Gene Ontology (GO) Analyse durchgeführt. Hierbei wurde die Korrelation zwischen Proteom und Transkriptom in den Bereichen der biologischen Prozesse und molekularen Funktionen untersucht. Wie in Abbildung 23 gezeigt, ist die Stärke der Korrelation von Protein und mRNA abhängig von der jeweiligen GO-Annotation.

A



B

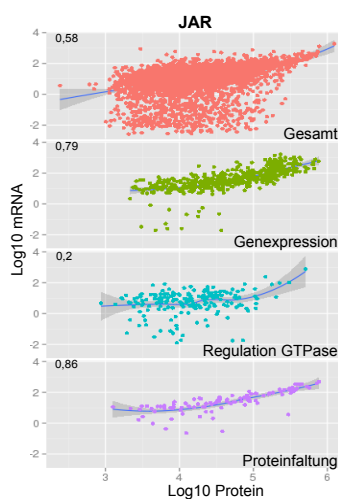


Abbildung 23: Korrelationsanalysen der Proteom – und Transkriptomdaten von neun humanen Krebszelllinien in Abhängigkeit der GO-Annotation

Zur genaueren Betrachtung der Zusammenhänge von Proteom und Transkriptom wurden die gewonnenen Datensätze logarithmisch zueinander in Verbindung gesetzt ($\text{Log}_2(\text{Protein/mRNA})$) und diese Beziehung auf Unterschiede hinsichtlich verschiedener GO-Annotationen untersucht. Dazu sind die Ergebnisse verschiedener Bereiche der biologischen Prozesse und molekularen Funktionen in allen Zelllinien (A) und im Detail in der Zelllinie JAR (B) dargestellt.

Hierbei fällt auf, dass bei konservierten Prozessen, die in allen Zellen entweder auf die gleiche Art und Weise oder in gleicher Intensität stattfinden, eine hohe Korrelation der beiden untersuchten Zellebenen zu erkennen ist (Abb. 23A). Hierzu zählen zum Beispiel Proteinfaltung, Proteintransporter-Aktivität und RNA-Bindeprozesse. Hingegen Vorgänge, welche eine große Heterogenität zwischen verschiedenen Zellen aufweisen, zeigen eine geringere Korrelation auf Protein – und Genebene, wie zum Beispiel bei der Zelladhäsion, Lipidbindung und der Organisation der extrazellulären Matrix. Bei einer detaillierten Betrachtung der Zelllinie JAR fällt auf, dass die Korrelation von Protein und mRNA abhängig der betrachteten GO-Annotation bis auf 0,86 steigt (Abb. 23B).

Um nun auch das Proteom und Ligandom im Kontext der Antigenpräsentation zu analysieren, wurden die beiden Datensätze auf Zusammenhänge der Proteinexpression und der anschließenden Präsentation als HLA-Klasse-I-Peptid untersucht.

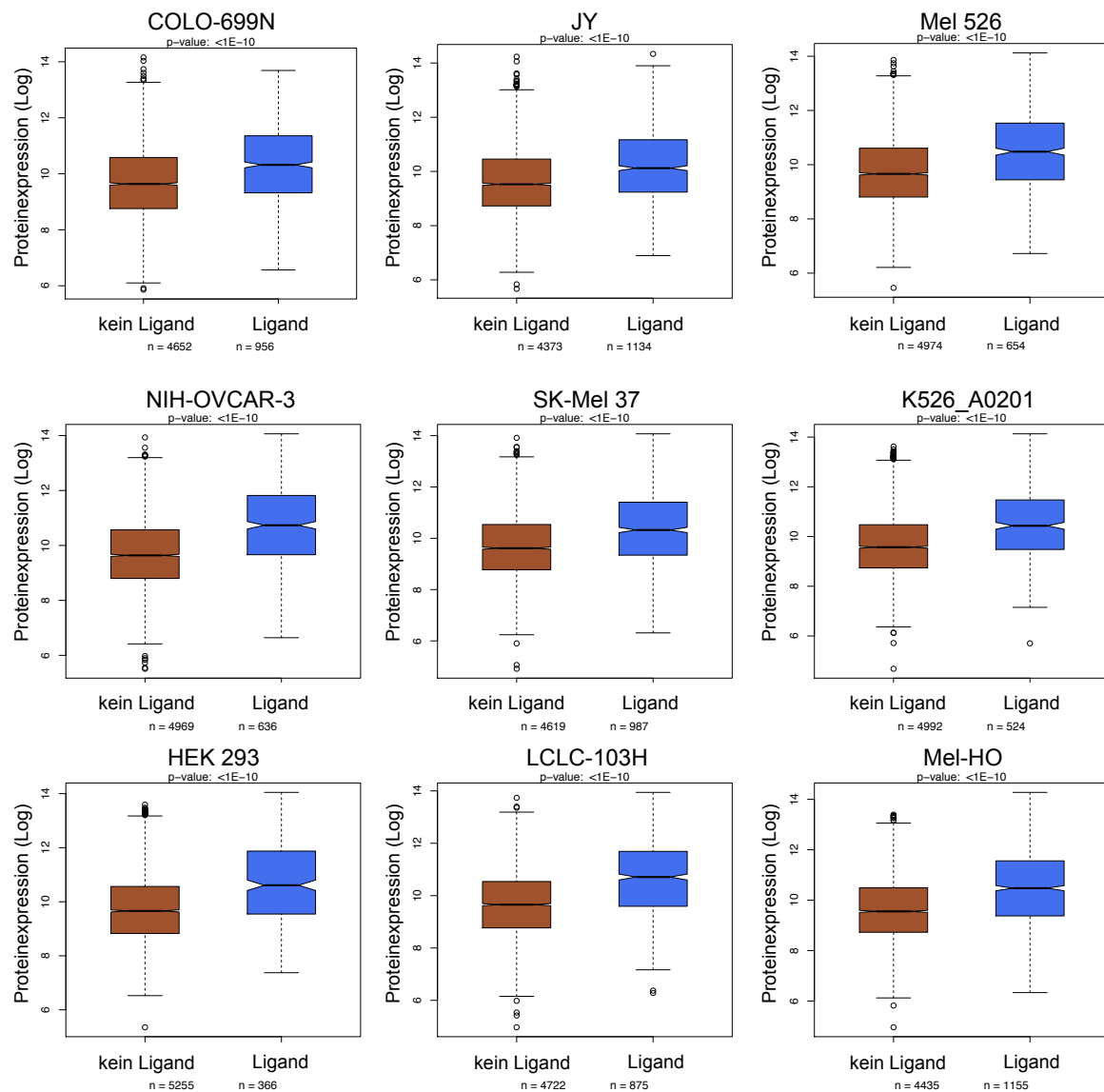


Abbildung 24: Analyse von Zusammenhängen der Proteinexpressionsstärke und der Präsentation als HLA-Ligand

Zur Untersuchung von möglichen Zusammenhängen der Expressionsstärke eines Proteins und der Wahrscheinlichkeit zur Präsentation als HLA-Peptid-Ligand, wurden die gewonnenen Daten der Proteom – und Ligandomanalysen in Beziehung zueinander gesetzt. Dazu wurden die identifizierten HLA-Liganden ihren Ursprungsproteinen in dem Proteomdatensatz zugeordnet und dieser dadurch in Proteine, die keinen Liganden und Proteine, die Liganden hervorgebracht haben unterteilt. Anschließend wurde die Proteinexpression logarithmisch für diese beiden Gruppen aufgetragen.

Hierbei zeigt sich, dass die Präsentation als HLA-Klasse-I-Peptid mit der Stärke der entsprechenden Proteinexpression zusammenhängt. Über alle untersuchten Zelllinien hinweg ist zu erkennen, dass Proteine mit einer höheren Expression eher prozessiert und als Liganden präsentiert werden („Ligand“) als solche mit einer geringen Expression („kein Ligand“) (Abb. 24).

Insgesamt lässt sich sagen, dass im Rahmen dieser Dissertation umfangreiche Datensätze auf RNA-, Protein-, und HLA-Klasse-I-Peptid-Ligandenlevel von neun humanen Krebszelllinien geschaffen wurden. Mit Hilfe dieser Datensätze konnten bisher unbekannte Zusammenhänge zwischen den Zellebenen untersucht und gezeigt werden.

Neben dieser globalen Analyse der Antigenpräsentation war es ein zusätzliches Ziel der vorliegenden Dissertation mit ERMP1 eine einzelne Protease im Rahmen der Antigenprozessierung genauer zu untersuchen.

3.4 Anwendung der Isolierung von MHC-Klasse-1-Peptid-Liganden *in vivo* zur funktionellen Untersuchung der Antigenpräsentation in ERMP1-ko-Mäusen

Nach der vorhergegangenen globalen Analyse der Antigenpräsentation sollte nun ein detaillierter Blick auf eben diese geworfen werden. Dazu wurde die Rolle der bisher wenig erforschten „*Endoplasmic reticulum metallopeptidase 1*“, kurz ERMP1 in der Antigenprozessierung betrachtet. Hierbei wurde die im Rahmen dieser Arbeit etablierte Methode zur Isolierung von HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden auch *in vivo* angewandt und Mäuse mit einer Defizienz in ERMP1 verwendet. Für ERMP1 konnte Dr. Nadja Akkad im Rahmen ihrer Dissertation am Institut für Immunologie eine Rolle in der Antigenpräsentation *in vitro* nachweisen. So beeinflusst ERMP1 die MHC I Expression *in vitro* in Abhängigkeit des Haplotyps und zeigte Auswirkungen auf die Präsentation des immundominanten OVA Epitops SIINFEKL. Aufgrund dieser Ergebnisse war eine *in vivo* Charakterisierung des Ligandoms von ERMP1 defizienten Mäusen der nächste notwendige Schritt zur genaueren Beschreibung der Funktion der Metallopeptidase. Um der murinen Nomenklatur zu entsprechen, wird nachfolgend die Bezeichnung MHC-Klasse-I-Peptid-Liganden verwendet.

3.4.1 Massenspektrometrische Analyse von Mikrosomen aus ERMP1 defizienten Mäusen

Zur Untersuchung des Einflusses von ERMP1 auf die Antigenpräsentation *in vivo* wurden ERMP1 defiziente Mäuse kommerziell erworben. Daher war es als erstes notwendig, den Verlust der Funktion zur Produktion von ERMP1 in diesen Tieren nachzuweisen. Aufgrund der fehlenden Verfügbarkeit eines ERMP1-spezifischen Antikörpers wurden zum Nachweis des Knockouts Mikrosomen aus den Milzen von jeweils drei homozygot defizienten Tieren (ERMP1^{-/-}) sowie passender heterozygoter (ERMP1^{+/-}) und wildtypischer (WT) Kontrolltieren isoliert und massenspektrometrisch analysiert.

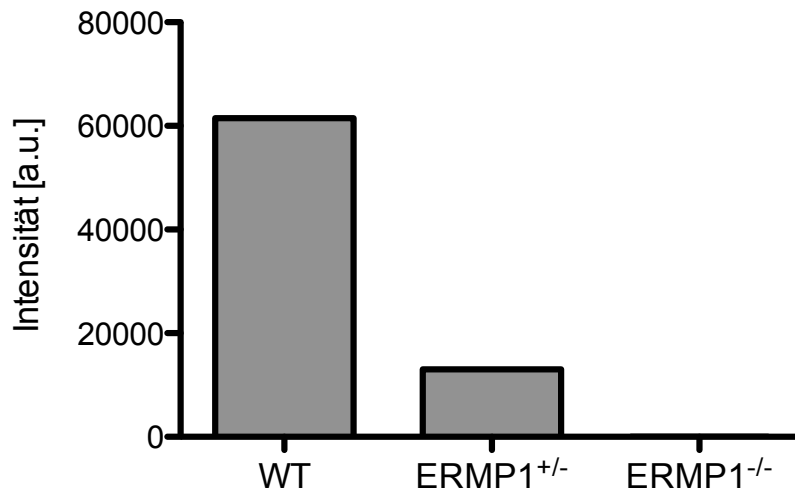


Abbildung 25: Massenspektrometrische Analyse von Mikrosomen aus ERMP1 defizienten und Wildtyp Mäusen

Zur Bestätigung des Vorliegens eines knockouts für ERMP1 in den kommerziell erworbenen Tieren wurden die Mikrosomen aus den Milzen von jeweils drei homozygot defizienten Mäusen, heterozygot defizienten Mäusen und wildtypischen Mäusen isoliert, gepoolt und massenspektrometrisch analysiert. Dabei ist die Expressionsstärke von ERMP1 als Intensität für die verschiedenen Genotypen aufgetragen.

In Abbildung 25 ist zu erkennen, dass mit Hilfe der massenspektrometrischen Untersuchung keine Expression von ERMP1 in den homozygot defizienten Tieren zu detektieren war, in den wildtypischen Kontrolltieren hingegen schon. Somit konnte die Anwesenheit der ERMP1 Defizienz in den Tieren nachgewiesen und diese für weitere Analysen verwendet werden.

Betrachtet man die durch die Mikrosomenanalyse erhaltenen Daten weiter, so fallen hier Zusammenhänge zu Prozessierungsvorgängen im ER sowie der Antigenprozessierung und Antigenpräsentation auf. Die Abbildungen 26 und 27 zeigen die entsprechenden DAVID-Analysen und die genannten Wege, wobei die mit einem Stern markierten Proteine deutlich geringer in den ERMP1 defizienten Tieren gefunden wurden.

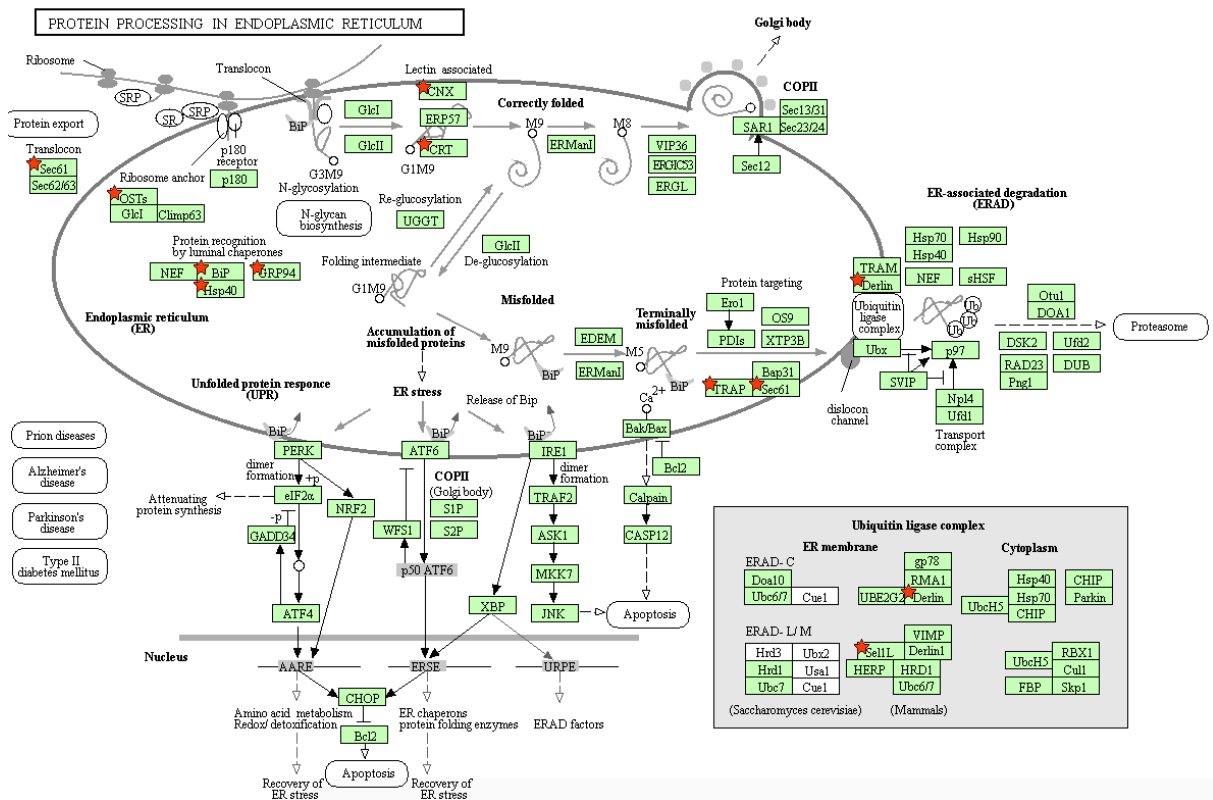


Abbildung 26: DAVID-Analyse von Mikrosomendaten aus ERMP1 defizienten und wildtypischen Mäusen bezüglich Proteinprozessierung im ER

Zur massenspektrometrischen Analyse von Mikrosomen aus der Milz ERMP1 defizienter und wildtypischer Mäuse wurden pro Genotyp drei Milzen gepoolt und die Mikrosomen isoliert. Die so erhaltenen Daten wurden mit dem frei zugänglichen Programm DAVID analysiert. Dargestellt sind Proteine, die in Prozessen der Prozessierung von Proteinen im ER beteiligt sind. Mit einem Stern markiert sind solche Proteine, die in den Mikrosomen aus ERMP1 defizienten Tieren deutlich geringer vorliegen als in denen aus wildtypischen Tieren.

Bezüglich der Prozesse im ER (Abb. 26) fallen bei den herunterregulierten Proteinen beispielsweise Calnexin, Calreticulin und BiP, welche alle Teil des Peptidladekomplexes sind (siehe auch 1.1.3) auf.

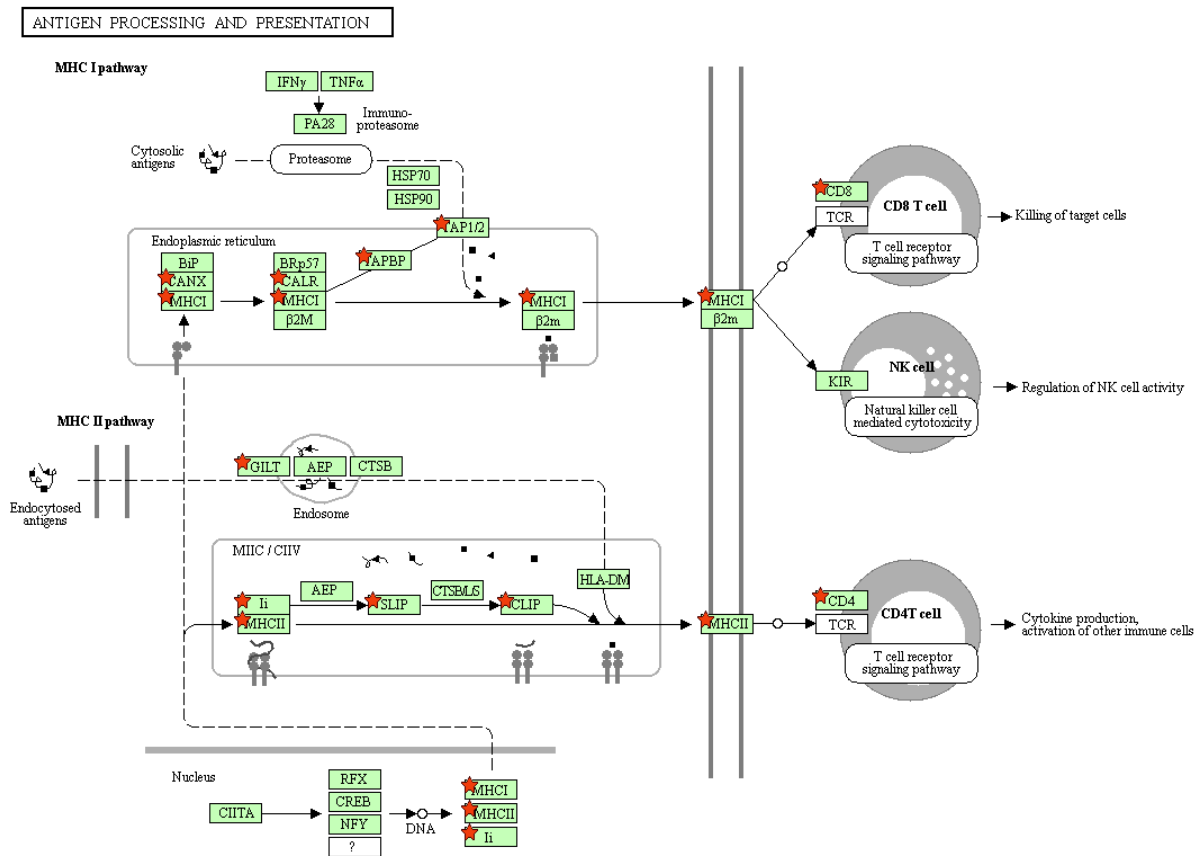


Abbildung 27: DAVID-Analyse von Mikrosomendaten aus ERMP1 defizienten und wildtypischen Mäusen bezüglich Antigenprozessierung und – präsentation

Zur massenspektrometrischen Analyse von Mikrosomen aus der Milz ERMP1 defizienter und wildtypischer Mäuse wurden pro Genotyp drei Milzen gepoolt und die Mikrosomen isoliert. Die so erhaltenen Daten wurden mit dem frei zugänglichen Programm DAVID analysiert. Dargestellt sind Proteine, die in Prozessen der Antigenprozessierung – und präsentation beteiligt sind. Mit einem Stern markiert sind solche Proteine, die in den Mikrosomen aus ERMP1 defizienten Tieren deutlich geringer vorliegen als in denen aus wildtypischen Tieren.

Bezüglich der Antigenprozessierung und Antigenpräsentation (Abb. 27) betrifft die stark geringere Expression Proteine wie TAP, MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II.

Des Weiteren war festzustellen, dass ERAP1, eine der wenigen bisher bekannten Aminopeptidasen im ER, die eine Rolle in der Generierung von MHC-Klasse-I-Peptid-Liganden spielt, in den Mikrosomen von ERMP1 defizienten Mäusen deutlich stärker exprimiert war als in wildtypischen Kontrolltieren (Abb. 28).

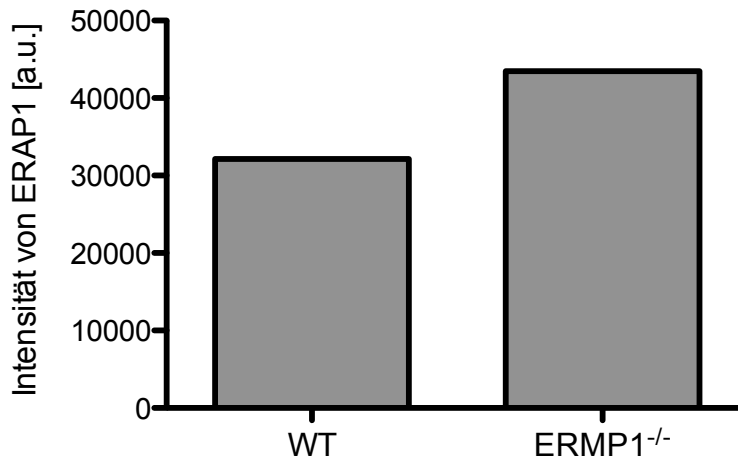


Abbildung 28: Expression von ERAP1 in Mikrosomen aus den Milzen von ERMP1 defizienten Mäusen und wildtypischen Kontrolltieren

Zur Analyse der Mikrosomen von ERMP1 defizienten Tieren und deren wildtypischen Kontrollen wurden die Milzen entnommen, die Mikrosomen isoliert und massenspektrometrisch analysiert. Dargestellt ist die gemessene Intensität von ERAP1, wobei pro Genotyp drei Milzen gepoolt wurden.

Insgesamt geben die dargestellten Daten erste Hinweise darauf, dass ERMP1 auch *in vivo* eine Rolle in Prozessen der Antigenprozessierung und Antigenpräsentation spielt.

3.4.2 Isolierung des Ligandoms aus ERMP1 defizienten Mäusen

Zur genaueren Betrachtung der Rolle von ERMP1 in der Antigenpräsentation wurde das Protokoll zur Isolierung von MHC-Klasse-I-Peptid-Liganden aus der Milz ERMP1 defizienter und wildtypischer Kontrolltiere angewendet. Hierzu wurden die Organe von zehn Tieren jedes Genotyps entnommen und die isolierten Zellen vereint, so dass die Peptid-Liganden aus jeweils 8×10^8 Zellen wie in 2.11.2.2 beschrieben isoliert werden konnten. In Tabelle 12 ist zu sehen, dass zwischen 1182 und 1533 Peptid-Liganden beliebiger Länge und zwischen 369 und 645 Liganden mit einer Länge von 8-11 AS detektiert werden konnten.

Tabelle 12: Anzahl der identifizierten MHC-Klasse-I-Liganden aus Milzen ERMP1 defizienter und kompetenter Mäuse

Probe	Anzahl der identifizierten Peptid-Liganden	Anzahl der identifizierten Peptid-Liganden mit 8-11 AS
Milz ERMP1 ^{-/-} H-2D ^b	1445	567
Milz WT H-2D ^b	1533	645
Milz ERMP1 ^{-/-} H-2K ^b	1182	369
Milz WT H-2K ^b	1337	473

Zur Überprüfung, ob diese aus murinem Primärmaterial isolierten Peptide dem üblichen Bindungsmotiv der analysierten MHC-Allele entsprechen, ist in Abbildung 29 das Bindungsmotiv der isolierten H-2K^b-Peptide mit einer Länge von 8 AS (links) und der isolierten H-2D^b-Peptide mit einer Länge von 9 AS (rechts) dargestellt.

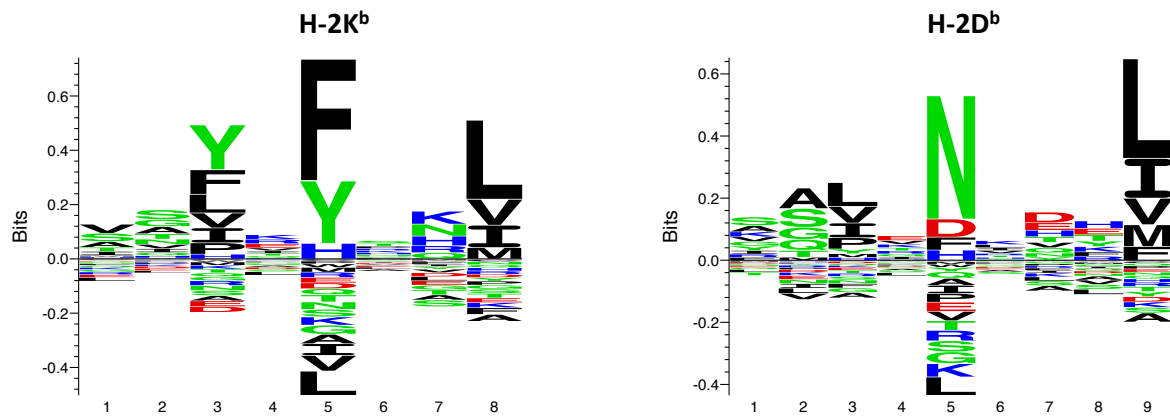


Abbildung 29: Bindungsmotiv der isolierten H-2K^b-Liganden aus Milzen von WT Mäusen mit einer Länge von 8 AS (links) und der isolierten H-2D^b-Liganden mit einer Länge von 9 AS (rechts)

Die H-2K^b-Liganden wurden aus 8×10^8 Milzzellen isoliert und auf ihre Bindungsmotive untersucht. Gezeigt ist das Ergebnis ERMP1 kompetenter Mäuse. Die Größe der Buchstaben spiegelt die Häufigkeit dieser Aminosäure an der Position wider.

Hier ist zu erkennen, dass bezüglich H-2K^b an Position 5 besonders häufig die Aminosäuren Phenylalanin (F) und Tyrosin (Y) zu finden sind und bezüglich H-2D^b die Aminosäure Asparagin (N) an Position 5 und Leucin (L) an Position 9, was mit Literaturangaben der präferierten Aminosäuren an diesen Ankerpositionen der beiden Allele übereinstimmt^{95,187}.

In den Abbildungen 30 und 31 ist die Größenverteilung der identifizierten Peptide noch einmal grafisch dargestellt. Hierbei zeigt sich die Qualität der Isolierung der Peptid-Liganden darin, dass bezüglich H-2D^b eine deutliche Mehrheit an Nonameren, bezüglich H-2K^b an Oktameren isoliert wurden, welches den entsprechenden Längenpräferenzen zur Bindung von Liganden der beiden MHC-Haplotypen entspricht.

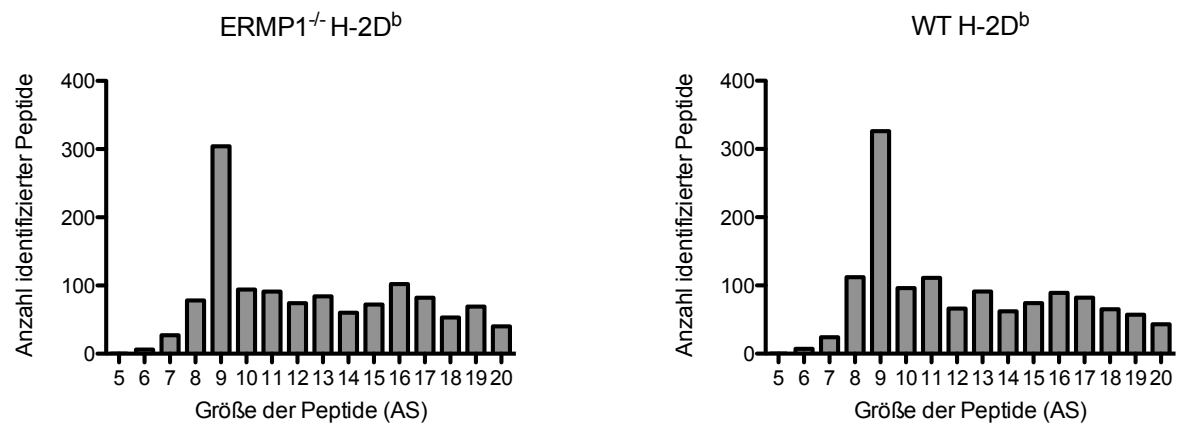


Abbildung 30: Größenverteilung der isolierten H-2D^b-Peptide aus Milzen ERMP1 defizienter und kompetenter Mäuse

Zur Isolierung von MHC-Klasse-I-Peptid-Liganden des Haplotyps H-2D^b ERMP1 defizienter (ERMP1^{-/-}) und kompetenter (WT) Mäuse wurden die Milzen aus jeweils 10 Tieren entnommen, die Milzzellen isoliert und vereint. Dargestellt ist die Anzahl identifizierter Peptide in Abhängigkeit ihrer Größe in AS.

Betrachtet man die Unterschiede zwischen ERMP1 defizienten Mäusen und den wildtypischen Kontrolltieren, so ist festzustellen, dass im Wildtyp 49 % der H-2D^b-isolierten Peptiden eine Länge von 8-11 AS aufweisen, in den knockout-Tieren dagegen nur 46 % (Abb. 30).

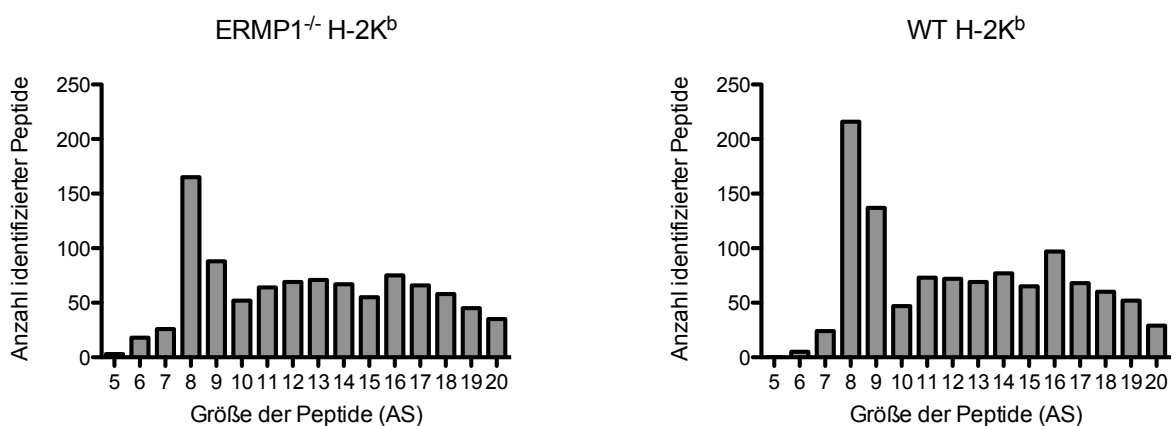


Abbildung 31: Größenverteilung der isolierten H-2K^b-Peptide aus Milzen ERMP1 defizienter und kompetenter Mäuse

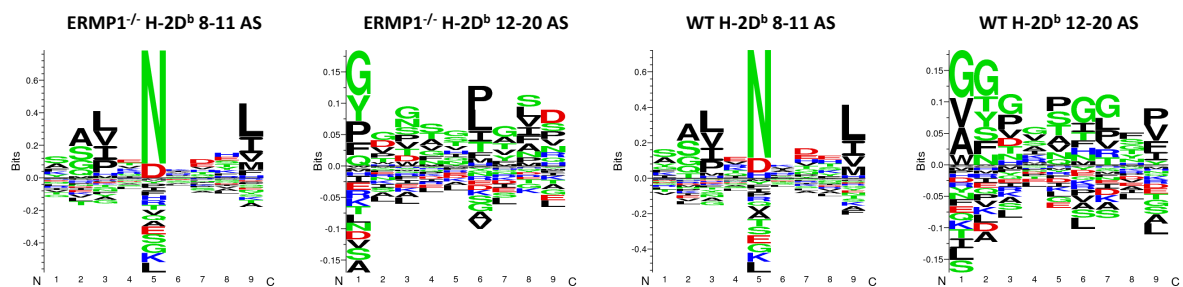
Zur Isolierung von MHC-Klasse-I-Peptid-Liganden des Haplotyps H-2K^b ERMP1 defizienter (ERMP1^{-/-}) und kompetenter (WT) Mäuse wurden die Milzen aus jeweils 10 Tieren entnommen, die Milzzellen isoliert und vereint. Dargestellt ist die Anzahl identifizierter Peptide in Abhängigkeit ihrer Größe in AS.

Die typische Größe von H-2K^b-Liganden liegt bei 8-9 AS. Die in Abbildung 31 dargestellte Verteilung der isolierten H-2K^b-Peptiden zeigt einen Anteil von 32 % mit einer Länge von 8-9 AS im Wildtyp und 26 % in den knockout-Tieren.

Die Abwesenheit von ERMP1 scheint ein weniger effizientes Trimming von Peptiden auf die ideale Größe zur Beladung auf MHC-Klasse-I-Moleküle zu bedingen.

Insgesamt fällt aber auf, dass viele Peptide isoliert wurden, die für typische MHC-Klasse-I-Liganden zu lang sind. Um zu überprüfen, ob es sich auch bei diesen um Liganden handelt, wurden die Bindungsmotive dieser der Peptide und der Peptide mit den präferierten Längen für H-2D^b (8-11 AS) und H-2K^b (8-9 AS) untersucht.

A



B

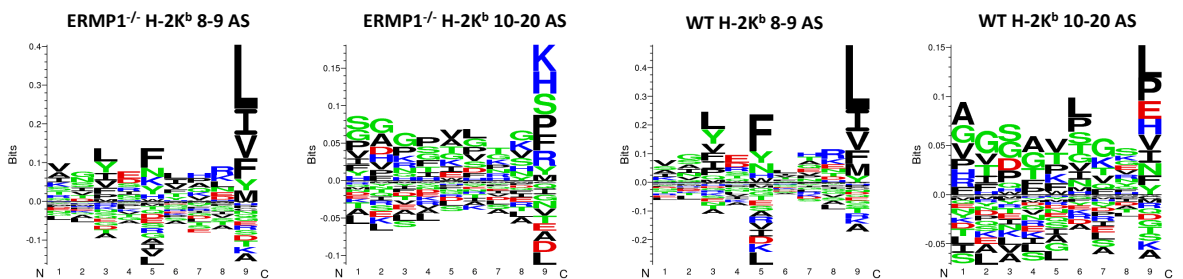


Abbildung 32: Bindungsmotive der isolierten MHC-Klasse-I-Peptide aus Milzen ERMP1 defizienter und kompetenter Mäuse basierend auf ihrer Länge

Die MHC-Klasse-I-Peptide wurden aus 8×10^8 Milzzellen isoliert und basierend auf ihrer Länge auf ihre Bindungsmotive untersucht. Gezeigt ist das Ergebnis für die Allele H-2D^b (A) und H-2K^b (B). Die Größe der Buchstaben spiegelt die Häufigkeit dieser Aminosäure an der Position wider.

Die in Abbildung 32 dargestellte Analyse der Bindungsmotive zeigt, dass Peptide mit einer Länge von 8-11 AS (H-2D^b) bzw. 8-9 AS (H-2K^b) die bekannten Motive der jeweiligen Allele zeigen. Dahingegen weisen die vorhergesagten Motive der längeren Peptide diese Muster nicht auf und zeigen generell ein sehr diffuses Muster. Dies gilt sowohl für die isolierten Peptide aus ERMP1 kompetenten als auch aus ERMP1 defizienten Mäusen. Damit muss davon ausgegangen werden, dass bei der Anwendung des Protokolls zur Isolierung von MHC-Klasse-I-Peptid-Liganden *in vivo* im Vergleich zur Anwendung *in vitro* (Abb. 15) neben tatsächlichen Liganden noch viele unspezifische Peptide unbekannter Herkunft isoliert wurden.

In einem letzten Schritt zur Charakterisierung der Funktion von ERMP1 wurden die isolierten Peptide mit einer Länge von 8 AS (H-2K^b) bzw. 9 AS (H-2D^b) auf ihre Schnittmuster untersucht. Dabei wurde die Häufigkeit der letzten N-terminalen Aminosäure vor dem Sequenzstart des Liganden („P0“) als auch der ersten N-terminalen Aminosäure im Liganden („P1“) zwischen ERMP1 defizienten und kompetenten Mäusen verglichen.

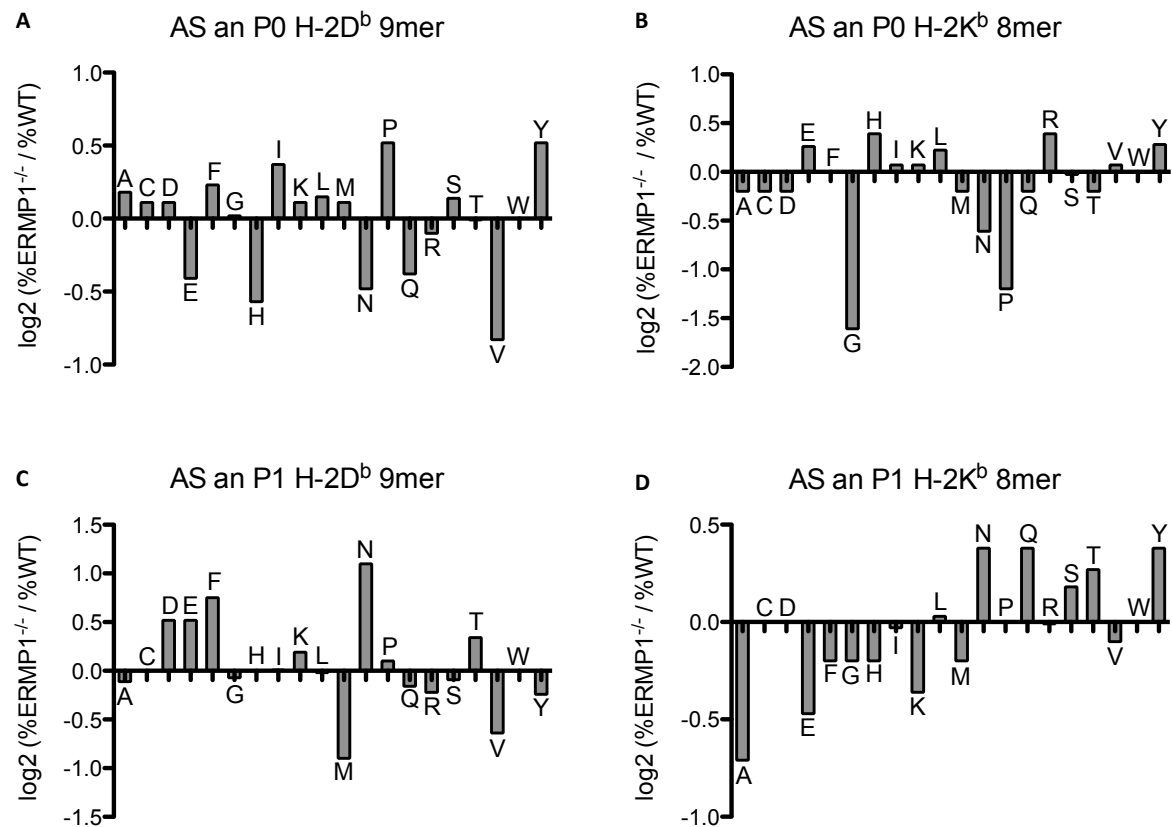


Abbildung 33: Änderungen in der Häufigkeit der N-terminalen Aminosäure vor („P0“) und im Ligand („P1“)

Dargestellt sind die Änderungen der letzten N-terminalen AS vor dem Liganden („P0“) und der ersten N-terminalen AS im Liganden („P1“) in Abhängigkeit der Abwesenheit von ERMP1. Dazu wurden die MHC-Klasse-I-Peptid-Liganden aus den Milzen ERMP1 kompetenter und defizienter Mäuse isoliert und solche mit einer Länge von 8 AS (H-2K^b) bzw. 9 AS (H-2D^b) hinsichtlich ihrer Sequenzen untersucht. Die Abbildung zeigt die logarithmische Auftragung des Verhältnisses der prozentualen Anteile der jeweiligen Aminosäuren von ERMP1 defizienten zu ERMP1 kompetenten Mäusen.

Hier fällt in Abb. 33 auf, dass es sowohl an P0 als auch an P1 Unterschiede zwischen KO und WT Tieren gibt. So finden sich bezüglich der AS an P0 bei H-2D^b isolierten Peptiden deutlich geringere Mengen an Valin (V) und deutlich größere Mengen an Tyrosin (Y) und Prolin (P) in ERMP1 defizienten Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren (Abb. 33A). Bei H-2K^b isolierten Peptiden ist der Unterschied noch etwas größer. Hierbei zeigen sich für P0 in KO Tieren deutlich seltener die Aminosäuren Glycin (G) und Prolin (P), dafür etwas mehr die Aminosäuren Histidin (H), Arginin (R) und Tyrosin (Y) (Abb. 33B). Auch für die Aminosäuren an der ersten N-terminalen Stelle im Liganden zeigen sich Unterschiede zwischen KO und WT Tieren. So weisen die H-2D^b-isolierten

Peptide aus Milzen ERMP1 defizienter Tiere seltener ein Methionin (M) oder Valin (V) an P1 auf, dafür häufiger die Aminosäuren Asparagin (N) und Phenylalanin (F) (Abb. 33C). Bezüglich der H-2K^b-isolierten Peptide zeigten sich seltener Alanin (A) und Glutaminsäure (E) und häufiger Asparagin (N), Glutamin (Q) und Tyrosin (Y) an P1 (Abb. 33D). Alles in allem ist also festzustellen, dass es unterschiedliche Schnittmuster in ERMP1 defizienten und kompetenten Mäusen gibt.

Insgesamt ist damit festzustellen, dass mit Hilfe ERMP1 defizienter Mäuse auch *in vivo* eine bisher unbekannte Rolle von ERMP1 als Protease in der Antigenprozessierung und Antigenpräsentation nachgewiesen werden konnte. Dies spiegelt sich in der ERMP1-abhängigen unterschiedlichen Expression von Proteinen innerhalb der Antigenprozessierungsmaschinerie sowie der veränderten Expression der MHC-Haplotypen H-2K^b und H-2D^b und der daraus resultierenden veränderten Zusammensetzung von präsentierten MHC-Klasse-I-Peptid-Liganden wider.

4. Diskussion

4.1 Massenspektrometrische Analysen von HLA-Liganden

Das menschliche Genom umfasst annähernd 10.000 verschiedene HLA-Klasse-I-Allele wobei jeder Mensch bis zu sechs verschiedene HLA-Klasse-I Allotypen exprimiert, was in einem enorm komplexen Repertoire von HLA-Peptid-Liganden resultiert¹⁸⁸. Diese Variabilität spiegelt sich auch in Tumoren wider. Aufgrund einer Vielzahl von somatischen Mutationen in Tumoren führen diese potentiell zur Präsentation von Neoantigenen durch HLA-Moleküle, welche durch das Immunsystem als Fremd erkannt und bekämpft werden können. Das Potential dieser Neoantigene zur Auslösung einer T-Zell-Antwort konnte bereits mehrfach gezeigt werden¹⁸⁹⁻¹⁹². In einer Vielzahl von Tumoren konnte aber auch festgestellt werden, dass diese Defekte in der Antigenprozessierungsmaschinerie bezüglich Proteasom-Untereinheiten, TAP oder ERAP1 sowie eine geringere Oberflächenexpression der HLA-Moleküle aufweisen. Im Umkehrschluss bedeutet dies beispielsweise im Falle der Neoepitope, dass solche, die *in silico* als immunogen vorhergesagt werden können, nicht zwangsläufig von den Tumorzellen präsentiert werden und dementsprechend auch keine Immunantwort oder gar eine Tumorregression bewirken können¹⁹³. Um diesem Problem zu entkommen, ist es essentiell solche Antigene zu identifizieren, die tatsächlich von den Tumorzellen präsentiert werden. Hierfür gibt es bis heute noch keine standardisierten Methoden, so dass die Entwicklung eines reproduzierbaren und auch erfolgreichen Protokolls zur Isolierung von HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden essentiell ist.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte solch ein Protokoll zur Isolierung von HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden aus humanen Krebszelllinien erfolgreich etabliert (Abb. 14) und später auch auf murines Primärmaterial angewandt werden (3.4.2). Hierbei wurden verschiedene Schritte während der Isolierung der HLA-Peptid-Liganden optimiert, begonnen bei der Zelllyse. Hierzu wurden die Detergenzien CHAPS, DDM und OGP verglichen (3.2.1). Detergenzien sind lösliche, amphiphile Moleküle, die in der Lage sind in Liposomen und Zellmembranen einzudringen und diese so zu solubilisieren¹⁹⁴. Man unterscheidet drei verschiedene Arten: ionische Detergenzien mit einer hydrophilen Gruppe und einer Nettoladung, nicht-ionische Detergenzien mit einer ungeladenen hydrophilen Gruppe und zwitterionische Detergenzien, die die Eigenschaften ionischer und nicht-ionischer Detergenzien kombinieren. Aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften bilden Detergenzien in Lösung Mizellen, welche mit den Membranproteinen interagieren und ein Gemisch bestehend aus Protein und Detergenz bilden, so dass die isolierten Proteine analysiert werden können (Abb. 34)¹⁹⁵.

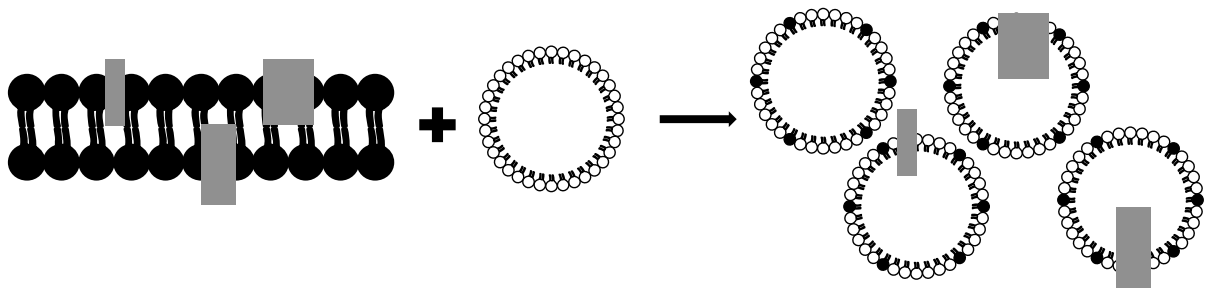


Abbildung 34: Wirkprinzip von Detergenzien (adaptiert nach Lichtenberg *et. al*¹⁹⁵)

Das Prinzip der verwendeten Detergenzien zur Zellyse und Proteinisolierung liegt darin, dass die Detergenzien aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften Mizellen bilden und diese nach Inkubation mit den Zellen ein Gemisch mit den Membranproteinen (grau) bilden. Auf diese Weise können die Proteine isoliert werden.

Die Komplexe mit Proteinen werden dann gebildet, wenn das Detergenz in einer Konzentration oberhalb der so genannten kritischen Mizellbildungskonzentration (englisch *critical micelle concentration*, CMC) vorliegt, welche die Konzentration angibt, bei der es zu einer spontanen Mizellbildung kommt¹⁹⁶. Die in dieser Dissertation verwendeten Detergenzien decken ein weites Spektrum von CMCs ab, wobei die CMC von CHAPS bei 8-10mM, von DDM bei 0,17mM und von OGP bei 23-25mM liegt (Herstellerangaben).

Bei CHAPS handelt es sich um ein zwitterionisches Detergenz und ein Derivat der Cholsäure, bei DDM und OGP um nicht-ionische Detergenzien¹⁷⁹⁻¹⁸¹. Im Rahmen dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass die Zellyse mit CHAPS am effektivsten funktioniert und dementsprechend in den CHAPS-lysierten Proben am meisten HLA-Peptid-Komplexe an die Antikörper-gekoppelten Beads gebunden werden konnten (Abb. 12). Dies bestätigt andere Arbeiten, in denen CHAPS zur milden Zellyse und Isolierung von Membranproteinen genutzt wurde¹⁹⁷⁻²⁰¹. Eine Erklärung hierfür könnte darin bestehen, dass CHAPS im Vergleich zu DDM eine hohe CMC besitzt, was bedeutet, dass die Solubilisation sanfter abläuft und damit potentiell mehr HLA-Klasse-I-Peptid-Komplexe in ihrer Struktur und Funktion unbeeinflusst bleiben. Im Vergleich zu OGP ist die CMC von CHAPS zwar deutlich geringer, aber hier gereichen die zwitterionischen Eigenschaften von CHAPS der Zellyse zum Vorteil. Diese bestehen beispielsweise darin, dass die CMC bei nicht-ionischen Detergenzien in erster Linie von der Temperatur beeinflusst wird, bei zwitterionischen Detergenzien hingegen nur gering²⁰².

Ein weiterer Schritt im Optimierungsprozess des Protokolls zur Isolierung von HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden bestand in der Evaluierung der geeignetsten Materialien bezüglich Reaktionsgefäß, Ultrafiltrationseinheit und Umkehrphasenaustauschchromatographie-Platte. Hierbei hat sich gezeigt, dass insbesondere durch die Verwendung von 5mL LoBind Reaktionsgefäßen für den Bindungsschritt der HLA-Peptid-Komplexe an die Antikörper-gekoppelten Beads eine enorme

Steigerung der Anzahl an isolierten HLA-Peptid-Liganden gegenüber der Verwendung von 15cm langen Chromatographie-Säulen erzielt werden konnte (3.2.3). Dies begründet sich vermutlich im Versuchsaufbau. Bei der Verwendung von Chromatographie-Säulen wird das Zelllysate mit Hilfe einer Peristaltikpumpe über Nacht durch einen Schlauch über die Säule, die mit den Antikörpergekoppelten Beads beladen ist, geleitet. Hingegen wird das Zelllysate bei der Verwendung von 5mL LoBind Reaktionsgefäßen direkt auf die Beads gegeben und gemeinsam mit diesen in dem Reaktionsgefäß bei einer Geschwindigkeit von 3rpm rotierend über Nacht inkubiert. Das bedeutet, dass das Zelllysate mit den enthaltenen HLA-Peptid-Komplexen im Falle der Chromatographie-Säule deutlich verstärkt in Kontakt mit Plastikwaren kommt als es bei der Verwendung von LoBind Reaktionsgefäßen der Fall ist. Dieser Kontakt geht zwangsläufig mit einem Verlust von Proteinen einher, da diese an die Kunststoffoberfläche binden. Die Verwendung der LoBind Reaktionsgefäßen hingegen bietet den Vorteil, dass diese durch einen speziellen Zwei-Komponenten Polymermix eine hydrophile Oberfläche besitzen, die eine optimale Rückgewinnungsrate der Proben ermöglicht (Herstellerangaben Eppendorf). Dadurch ist es zu erklären, dass durch die Verwendung dieser Materialien eine deutliche Steigerung der Effizienz des Protokolls erreicht werden konnte (Tab. 9). Sowohl die getesteten Ultrafiltrationseinheiten als auch Umkehrphasenaustauschchromatographie-Platten zeigen hingegen nur einen geringen Unterschied in der Ausbeute an HLA-Peptid-Liganden. Dies ist am ehesten dadurch zu erklären, dass zum einen die Amicon Ultra-Zentrifugen-Filtereinheiten und Vivacon Zentrifugaleinheiten und zum anderen die OASIS HLB 96 *well* Mikrotiterplatte und die Sep-Pak-C18 96 *well* Mikrotiterplatte jeweils nahezu identische Wirkprinzipien besitzen. Insgesamt aber konnte mit Hilfe dieser Optimierungsschritte ein Protokoll zur Isolierung von HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden etabliert werden, welches eine nahezu vollständige Immunoaffinitätsanreicherung hervorbringt (Abb. 14).

Trotz dieses effizienten Protokolls muss davon ausgegangen werden, dass mit einer Anzahl von insgesamt etwa 11.000 identifizierten Liganden über alle analysierten Zelllinien hinweg und einer Anzahl von identifizierten Liganden in den einzelnen Zelllinien im Bereich von 762 bis 3338 bei Liganden beliebiger Länge und von 481 bis 2264 bei Liganden mit einer Länge von 8–11 Aminosäuren (Tab. 10) sicherlich nicht alle zu dem Zeitpunkt der Analyse präsentierten Liganden identifiziert wurden. Dies lässt sich beispielsweise mit Limitationen der Massenspektrometrie begründen. Zur Identifizierung von HLA-Peptid-Liganden wurden die Proben im datenabhängigen Modus (DDA) gemessen. Das bedeutet, dass die ionisierten Peptide (Vorläuferionen) zunächst in einer ersten Messung detektiert wurden (MS1 Scan) und die höchst abundanten Vorläuferionen anschließend durch Kollisionen mit neutralen Gasmolekülen wie Helium, Stickstoff oder Argon fragmentiert (Fragmentationen) und erneut massenspektrometrisch analysiert wurden. Diese

Fragmentationen treffen in Abhängigkeit ihres Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z) zu unterschiedlichen Zeitpunkten am Detektor ein, wo sie final im MS2 Spektrum aufgenommen wurden (siehe auch 1.3.1.). Dieses Spektrum konnte gegen öffentlich zugängliche humane Datenbanken gesucht werden, woraus sich die identifizierten HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden ergaben. Der Erfolg der Messung und der anschließenden Datenbanksuche ist allerdings stark vom Massenspektrometer sowie den Versuchsbedingungen abhängig. Zum Beispiel kommt es hierbei auf die Dauer der Messung, die Grenzwert-Einstellungen zur Detektion von Ionen und die vorhandene Probenmenge an²⁰³. Aber auch die Natur von HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden darf nicht außer Betracht gelassen werden. Hierbei handelt es sich um nicht-tryptische Peptide, wobei viele von ihnen aufgrund ihrer fehlenden basischen Aminosäurereste nicht effizient ionisiert und damit auch nicht detektiert werden können²⁰⁴. Dies resultiert in informationsarmen MS2 Spektren, wodurch es durchaus realistisch ist, von einer Identifikationsrate von nur etwa 10% auszugehen²⁰³.

Trotz technischer Limitierungen ist die Anzahl der in der vorliegenden Dissertation identifizierten Liganden im vergleichbaren Bereich mit anderen Studien, was wiederum die Qualität des etablierten Protokolls unterstreicht. So konnten beispielsweise Hassan *et. al* 10.867 Peptide aus der B-Zelllinie B-LCL-HCC und 6493 Peptide aus der B-Zelllinie B-LCL-JYpp65 identifizieren, was eine Gesamtzahl von 14.065 nicht redundanten Peptid-Liganden ergibt und den bisher größten Datensatz von identifizierten HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden darstellt²⁰⁵. Dies sieht auf den ersten Blick nach einer deutlich höheren Anzahl an identifizierten Liganden im Vergleich zu der hier vorliegenden Arbeit aus, relativiert sich aber mit einem genaueren Blick auf die angewendeten Methoden. So wurden die HLA-Liganden auch bei Hassan *et. al* mit Hilfe des Antikörpers W6/32 isoliert, allerdings wurde hier mit einem Ausgangsmaterial von $40\text{-}60 \times 10^9$ Zellen gearbeitet. Dies war notwendig, da mehrere Fraktionierungsschritte vor der massenspektrometrischen Analyse durchgeführt wurden. Dies reduzierte zwar die Komplexität der Proben und resultierte daher in einer höheren Ausbeute an identifizierten Peptiden, machte allerdings eine so hohe Ausgangsmenge der zu untersuchenden Probe notwendig. Damit konnte im Vergleich zu der in der vorliegenden Dissertation untersuchten B-Zelllinie JY zwar etwa die 4-fache Anzahl an Peptid-Liganden identifiziert werden, machte aber auch den Einsatz von der bis zu 60-fachen Menge an Ausgangsmaterial notwendig. Die Studie von Hassen *et. al* stellt aufgrund der sehr hohen Anzahl an identifizierten Liganden einen enorm informativen Datensatz bezüglich tatsächlich präsentierter HLA-Peptid-Liganden zur Verfügung, bietet aufgrund der hohen Zellzahlen aber im Gegensatz zu dem in der vorliegenden Arbeit präsentierten Protokoll nicht die Möglichkeit zur routinemäßigen Anwendung. In Studien mit zu der vorliegenden Arbeit vergleichbareren Vorgehensweisen bezüglich der Isolierung von Liganden und der massenspektrometrischen Identifikation eben

dieser wurden auch vergleichbarere Ergebnisse erzielt. So konnte die Arbeitsgruppe um Aebersold mit markierungsfreien Identifikationsmethoden im datenabhängigen Akquisitionsmodus ca. 4100 annotierte Peptide aus humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes identifizieren²⁰⁶, Ritz *et. al* konnten in fünf humanen Zelllinien zwischen 3000 und 6000 Peptide identifizieren²⁰⁷ und eine Studie von Abelin *et. al* konzentrierte sich auf die Identifikation HLA-Allel-spezifischer Liganden ohne Beeinflussung durch die Ko-Expression mehrerer HLA-Allele und nutzte daher 16 Zelllinien, welche jeweils nur ein HLA-Allel exprimieren. Hier konnten durch eine Kombination aus Immunpräzipitation von HLA-Liganden und LC-MS/MS über alle Zelllinien hinweg über 24.000 Peptide, in den einzelnen Zelllinien zwischen etwa 1000 und 3500 Peptide identifiziert werden²⁰⁸, was in etwa dem Größenbereich an identifizierten Liganden in der vorliegenden Arbeit entspricht. Auch bei der Identifizierung von klinisch relevanten Neoepitopen auf humanen Melanomproben durch Bassani-Sternberg *et. al*²⁰⁹ sowie der Charakterisierung des HLA-Klasse-I-vermittelten Antigenrepertoires in HIV-1 infizierten Zellen durch Ternette *et al*²¹⁰ fanden massenspektrometrische Methoden ihre Anwendung.

Insgesamt ist festzustellen, dass das in dieser Arbeit etablierte Protokoll zur Isolierung von HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden auch im Vergleich mit aktueller Literatur optimal funktioniert und erfolgreich angewandt werden konnte. Für weiterführende Arbeiten ist es essentiell, auch von technischer und informatischer Seite optimierte Verfahren im Bezug auf Datengewinnung und –auswertung zu schaffen, damit die massenspektrometrisch basierte Analyse von HLA-Liganden durch Protokolle wie dem hier gezeigten effektiv in die klinische Routine eingebracht werden kann.

4.2 Systembiologische Analysen der Antigenpräsentation

Neben der Methodenetablierung zur Isolierung von HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden war ein großer Bestandteil der vorliegenden Dissertation die systembiologische Analyse des Proteoms, Transkriptoms und Ligandoms der ausgewählten neun humanen Krebszelllinien (3.3.4).

Durch Francis Crick wurde im Jahre 1958 das zentrale Dogma der Molekularbiologie postuliert, welches besagt, dass der Informationsfluss von DNA zu RNA zu Protein verläuft und keine sequenzielle Information von Protein zu Protein oder zu Nukleinsäure übertragen werden kann²¹¹. Trotz dieser Feststellung vor mehr als 60 Jahren, ist die Korrelation von mRNA und den korrespondierenden Proteinen seither ein kontrovers beschriebenes Forschungsfeld. So haben beispielsweise Anderson und Seilhamer 1997 in einer der ersten Korrelationsstudien beschrieben, dass für 19 Genprodukte aus humanen Leberproben eine Pearson-Korrelation von 0,48 zwischen Protein und mRNA besteht, wobei die Expressionsdaten der Proteine mittels 2D-Elektrophorese, die der mRNA mittels RNA-Isolierung mit anschließender cDNA-Synthese und DNA-Sequenzierung erhoben wurden²¹². Ähnliche Korrelationswerte wurden 2009 von Gry *et.al* erhoben, die 23 humane Zelllinien mittels immunhistochemischen Methoden und *Microarrays* verglichen haben und im Mittel einen Korrelationskoeffizienten von 0,52 ermitteln konnten²¹³. Ebenfalls im Jahr 2009 haben Maier, Güell und Serrano in einer Übersichtsarbeit dargestellt, dass in verschiedenen Organismen wie Hefe, Maus, *E.coli* und Gram-negativen Bakterien Pearson-Korrelationen von 0,36 bis 0,76 detektiert werden konnten²¹⁴. In den dort beschriebenen Studien wurden zur Erhebung der mRNA-Daten *Microarrays*, *ChIP-Seqs* (englisch *Chromatin ImmunoPrecipitation DNA-Sequencing*) oder mRNA Datenbanken genutzt, zur Erfassung der Protein-Daten 2D-Elektrophorese und massenspektrometrische Methoden. Auch in Arbeiten mit einem detaillierten Fokus auf der Identifizierung einzelner immunogener Neoantigene kam bereits eine Kombination aus Transkriptom und Ligandomanalysen zum Einsatz. So haben beispielsweise Kalaora *et al* durch das *Whole-Exome Sequencing* von Melanomproben in Kombination mit der Analyse des HLA-Ligandoms der gleichen Probe ein Neoantigen identifiziert, welches eine Mutations-spezifische T-Zell-Antwort ausgelöst hat²¹⁵. Auch die Arbeit um die Arbeitsgruppe von Delamarre konnte durch die Kombination aus massenspektrometrischen Analysen und Sequenzierungsmethoden therapeutische T-Zell-Antworten im Mausmodell durch vorhergesagte immunogene Peptide hervorrufen²¹⁶.

Im Rahmen der hier vorliegenden Dissertation wurden die Daten bezüglich des Proteoms mit Hilfe der Massenspektrometrie und die des Transkriptoms mittels *Next Generation Sequencing (NGS)* erhoben. Dabei konnten Pearson-Korrelationen bezogen auf die Gesamtheit der Proteine und Gene der jeweiligen Zelllinien zwischen 0,46 und 0,63 beobachtet werden (Abb. 21), welche sich

bis auf Einzelgenebene nachweisen ließen (Abb. 22). Interessanterweise konnte bei einer detaillierteren Analyse der Datensätze erstmals ein Zusammenhang zwischen der Korrelationsstärke und der untersuchten GO-Annotation festgestellt werden (Abb. 23). Hierbei fiel auf, dass solche Prozesse, die wenig Zelltypspezifisch sind bzw. in allen Zellen entweder in gleicher Intensität oder auf die gleiche Art und Weise stattfinden, wie beispielsweise Proteinfaltung oder RNA-Bindeprozesse, eine hohe Korrelation zwischen mRNA und Protein in allen untersuchten Zelllinien aufwiesen. Dahingegen konnte nur eine geringere bis gar keine Korrelation der beiden Zellebenen festgestellt werden, wenn spezifischere bzw. heterogene Prozesse betrachtet wurden. In Zahlen ausgedrückt bedeutet dies, dass zum Beispiel für die JAR-Zelllinie (in den Ergebnissen nicht erwähnt, da aufgrund fehlender HLA-Klasse-I-Expression keine Ligandom-Daten erhoben wurden, siehe 3.1.1) eine Gesamtkorrelation von mRNA zu Protein von 0,58 bestand, diese bei einem Blick auf die GO-Annotationen aber zum Beispiel bezüglich der Proteinfaltung auf 0,86 gesteigert war. Im Gegensatz dazu lag der Korrelationskoeffizient von mRNA zu Protein bezogen auf die Regulierung der Aktivität einer einzelnen GTPase nur bei 0,2. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass für die generelle Vorhersagemöglichkeiten des Proteoms durch das Transkriptom immer berücksichtigt werden sollte, in welchem Zusammenhang diese getroffen werden sollen. Bezogen auf die Gesamtheit der untersuchten Zelllinien konnten auch hier vergleichsweise starke Korrelationen des Proteoms und Transkriptoms mit einer Pearson-Korrelation von bis zu 0,63 beobachtet werden. Dies mag unter anderem in der definierten Vorgehensweise zur Probengenerierung im Rahmen dieser Dissertation begründet sein. So wurden alle Proben für Proteomanalysen, Transkriptomanalysen und auch Ligandomanalysen zum gleichen Zeitpunkt und unter definierten Bedingungen genommen. Während der gesamten Dauer der Experimente wurde mit der identischen Charge an Zellkulturmedien und Zellkulturzusätzen wie beispielsweise FCS gearbeitet. Die Zellen wurden stets bezüglich ihrer Vitalität und Morphologie makroskopisch beurteilt und auf Verunreinigungen durch Mykoplasmen untersucht. Generell wurde eine Fluktuation bezüglich der durchführenden Personen vermieden und Proben einer Zelllinie stets von derselben Person genommen, so dass jedwede externe Beeinflussung der Zellcharakteristika ausgeschlossen werden konnte. Auch die Methodenwahl zur Datenerhebung war sorgfältig gewählt. Das Transkriptom wurde mittels modernster NGS-Techniken bestimmt, welche aufgrund verschiedener Charakteristika optimal dafür geeignet sind²¹⁷. So ist ein Vorab-Wissen über das zu untersuchende Genom nicht notwendig, die Proben werden direkt sequenziert und nicht zuvor beispielsweise mit bekannten Sequenzen hybridisiert und die Quantifizierung der Expressionen beruht auf der Anzahl der gezählten Sequenzen relativ zur Gesamtlänge (RPKM), was die Sensitivität im Vergleich zu anderen Methoden wie beispielsweise den oben genannten *Microarrays* deutlich erhöht. Die benötigte Menge an DNA liegt für NGS-Analysen im

Nanogramm-Bereich, was eine vorherige Amplifikation der zu untersuchenden Probe überflüssig macht und die Qualität und Zuverlässigkeit der Daten erhöht. Basierend auf diesen Eigenschaften der *NGS*-Analyse kann davon ausgegangen werden, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine hohe Abdeckung des Transkriptoms der untersuchten Zellen erreicht wurde, was für die weitergehenden vergleichenden Analysen mit dem Proteom essentiell war.

Auch seitens der Proteomanalyse (und Ligandomanalyse) wurde mit der Wahl der Massenspektrometrie auf eine hoch sensitive und reproduzierbare Methode zurückgegriffen. So konnte im Fall der Proteomanalyse durch die Nutzung der Synapt G2-S Massenspektrometer der Firma Waters auf eine markierungsfreie datenunabhängige massenspektrometrische Analyse gepaart mit den Vorteilen der Ionenmobilität zurückgegriffen werden (siehe auch 1.3.1), welche sich in den letzten Jahren als besonders reproduzierbar und sensitiv erwiesen hat¹⁷⁶. Diese am Institut für Immunologie etablierte Methode bietet den Vorteil, dass die Flugzeiten der Vorläuferionen mit ihren Kollisionsenergien synchronisiert werden und dadurch deren Fragmentierung optimiert wird, was wiederum auch in einer höheren Reproduzierbarkeit resultiert¹⁴⁰. Aufgrund der Nutzung dieser hoch sensitiven massenspektrometrischen Methode kann davon ausgegangen werden, dass im Vergleich zu den oben genannten Vergleichsstudien mit geringeren Korrelationskoeffizienten als denen in dieser Dissertation beobachteten, eine deutlich bessere Abdeckung des Proteoms der untersuchten Zellen erzielt werden konnte.

Ein sicherlich auch nicht zu vernachlässigender Vorteil der hier vorliegenden Analysen liegt darin, dass sämtliche Daten selbst generiert wurden und die angestellten Vergleiche nicht auf öffentlich zugänglichen Datensätzen basieren. Außerdem wurden die Zelllinien hinsichtlich einer Übereinstimmung ihrer HLA-Allele ausgewählt, wodurch Varianzen, verursacht durch die Expression zu vieler unterschiedlicher HLA-Allele, ausgeschlossen werden konnten.

All diese Eigenschaften der angewandten Methoden geben zum einen eine Erklärung der vergleichsweise hohen beobachteten Korrelationen zwischen dem Transkriptom und Proteom der untersuchten humanen Krebszelllinien, zum anderen zeigen sie die hohe Plausibilität der dargestellten Ergebnisse auf.

Im letzten Schritt der systembiologischen Analyse der Antigenpräsentation von humanen Krebszelllinien wurde das Proteom und HLA-Klasse-I-Ligandom der Zellen in Beziehung zueinander gesetzt. Hierbei konnte festgestellt werden, dass eine höhere Proteinexpression in einem positiven Zusammenhang mit der Wahrscheinlichkeit zur Präsentation als Peptid-Ligand steht (Abb. 24). Eine weit verbreitete und anerkannte Theorie zum Ursprung von HLA-Peptid-Liganden besteht in wenig abundanten, falsch gefalteten oder falsch translatierten unreifen Proteinen, den DRiPs⁴⁶. Es gibt aber auch Hinweise darauf, dass langlebige und stabile zelluläre Proteine als Quelle für präsentierte Peptide dienen⁴⁸. Die aus der hier vorliegenden Arbeit resultierten Daten

schließen im Grunde keine der beiden Theorien aus. Die dargestellten Ergebnisse in Abb. 24 unterstützen zunächst die Theorie, dass stabile Proteine als Quelle für HLA-Peptide dienen, da gezeigt werden konnte, dass solche Proteine, die stärker exprimiert vorliegen zu Peptiden degradiert und als Liganden auf HLA-Molekülen präsentiert werden. Betrachtet man aber die reinen Zahlen, so fällt auf, dass die Anzahl der als „Ligand“ gekennzeichneten Peptide nicht mit der Gesamtanzahl an identifizierten Liganden (Tab. 10) übereinstimmt. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass für viele Liganden kein Ursprungprotein in dem Proteomdatensatz gefunden werden konnte. Auch die in der vorliegenden Dissertation verwendeten Massenspektrometer besitzen Grenzen bezüglich ihrer Sensitivität. Somit ist es durchaus vorstellbar, dass es sich bei den nicht identifizierten Ursprungproteinen um wenig abundante und dadurch durch die Massenspektrometrie nicht zu detektierende Proteine handelt, wodurch die Möglichkeit besteht, dass es sich hierbei um die genannten DRiPs handelt. Zusammengenommen geben die ermittelten Korrelationen der Proteinexpression und der Präsentation als Peptid-Ligand Hinweise darauf, dass sowohl instabile als auch reife Proteine als Quelle von HLA-Liganden in Betracht kommen.

Insgesamt lässt sich sagen, dass im Rahmen der hier vorliegenden Dissertation eine umfangreiche Analyse von HLA-übereinstimmenden humanen Krebszelllinien auf drei Datenebenen (Proteom, Transkriptom und Ligandom) durchgeführt wurde. Mit Hilfe der gewonnenen Datensätze bezüglich Transkriptom, Proteom und Ligandom der Zelllinien und der beobachteten Zusammenhänge zwischen den einzelnen Ebenen besteht nun die Möglichkeit, diese beispielsweise zur Entwicklung eines neuen Modells zur Vorhersage von tatsächlich präsentierten HLA-Klasse-I-Liganden, basierend auf Transkriptomdaten oder Proteomdaten, zu nutzen. Ähnliche Bestrebungen finden sich auch in aktuellen Studien. Pearson *et. al* zeigten in einer 2016 veröffentlichten Arbeit das Potential der Kombination von Analysen mittels NGS und LC-MS/MS zur Vorhersage, ob ein Gen ein HLA-Peptid-Ligand generiert²¹⁸. Zur Analyse wurden lymphoblastische B-Zellen (englisch *B lymphoblastoid cell lines*, B-LCLs) aus dem Blut von 18 gesunden Spendern generiert und so 25.270 HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden und 6.195 dazugehörige Ursprungsgene identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass nur 59% der exprimierten und annotierten Gene in B-LCLs detektierbare HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden produzieren. Mit Hilfe dieser Datensätze haben sie ein Vorhersagemodell basierend auf logistischer Regression entwickelt, welches die Wahrscheinlichkeit zur Generierung eines HLA-Klasse-I-Peptids aus einem Gen vorhersagt. Dieses Modell konnten sie sowohl erfolgreich auf ihre eigenen Daten als auch auf Daten anderer Arbeitsgruppen unabhängig von der Isolations – und Identifikationsmethode der Liganden anwenden. Eine andere Arbeit von Abelin *et. al* konzentrierte sich auf B-Zellen, welche durch retrovirale Transduktion nur ein einziges HLA-Allel exprimieren, um Allel-spezifische Vorhersagen

über die Präsentation von HLA-Liganden zu treffen²⁰⁸. Im Rahmen der Studie konnten sie durch Immunpräzipitation gepaart mit LC-MS/MS Analysen zwischen 900 und 3550 Peptide für die einzelnen Allele identifizieren. Auf Grundlage dieser Daten konnten sie neue Allel-spezifische Bindungsmotive und proteasomale Schnittmuster identifizieren. Diese Daten nutzten Abelin *et. al* im folgenden als Trainingsgrundlage für neuronale Netze zur Vorhersage von HLA-Liganden. Als Vergleich nutzten sie öffentlich zugängliche Datensätze zum trainieren ihrer Modelle und konnten so letztendlich zeigen, dass sie anhand ihrer eigenen Daten bessere Epitopvorhersagen treffen konnten.

Diese Studien und auch eine kurze Übersichtsarbeit von Dersh und Yewell²¹⁹ demonstrieren, dass solche Modelle auch in Zukunft essentiell zur Entwicklung von Peptid-basierten Vakzinierungsstrategien beispielsweise bei malignen Erkrankungen und auch zur Weiterentwicklung personalisierter Therapieansätze beitragen werden. Daher bieten auch die im Rahmen dieser Arbeit generierten umfangreichen Datensätze bezüglich Proteom, Transkriptom und Ligandom eine wichtige und gute Grundlage zur Entwicklung eines solchen Vorhersagemodells, so dass dies den nächsten notwendigen Schritt zur Fortführung dieser Arbeit darstellt.

4.3 ERMP1 als Aminopeptidase in der Antigenprozessierung

Nach der globalen Analyse der Antigenpräsentation, folgte im letzten Teil der Arbeit die detaillierte Untersuchung der Aminopeptidase ERMP1.

Aufgrund der bisher mehrfach erwähnten enorm großen Diversität der durch HLA-Moleküle präsentierten Peptide ist es naheliegend, dass es neben den bisher beschriebenen ER-residenten Aminopeptidasen ERAP1 und ERAP2 noch weitere geben muss.

ERMP1 wurde durch Frau Dr. Nadja Akkad im Rahmen ihrer Dissertation am Institut für Immunologie erstmals im Zusammenhang mit der Antigenprozessierung beschrieben. Ihr war es möglich zu zeigen, dass ERMP1 durch IFN- γ stimulierbar ist, in lymphatischen Geweben stark exprimiert vorliegt und mit TAP und MHC-Klasse-I-Molekülen kolokalisiert. Aufgrund dieser Beobachtungen *in vitro* war eine nun folgende Analyse *in vivo* im Rahmen der hier vorliegenden Dissertation der nächste notwendige Schritt zur Beschreibung von ERMP1 als mögliche Aminopeptidase in der Antigenprozessierung. Hierbei wurden Mäuse kommerziell erworben, so dass als erster Schritt der Nachweis der ERMP1 Defizienz notwendig war. Mit Hilfe massenspektrometrischer Analysen von Mikrosomen aus der Milz dieser Mäuse konnte die Defizienz bestätigt werden (Abb. 25), so dass ein genauere Blick auf die aus Mikrosomen gewonnenen Daten möglich war. Hierbei fiel auf, dass Proteine, die im Zusammenhang mit Prozessierungsvorgängen im ER sowie der Antigenprozessierung und Antigenpräsentation stehen deutlich geringer in den ERMP1 defizienten Tieren vorlagen als in deren wildtypischen Kontrolltieren (Abb. 26 und 27). Zur Vertiefung dieses Hinweises auf eine Beteiligung von ERMP1 an der Antigenprozessierung und Antigenpräsentation wurde das im Rahmen dieser Dissertation etablierte Protokoll zur Isolierung von MHC-Peptid-Liganden auf H-2K^b und H-2D^b-spezifische Liganden aus der Milz ERMP1 defizienter und kompetenter Tiere angewendet. Dabei ergab sich für beide Allele die Erkenntnis, dass unter Abwesenheit von ERMP1 ein weniger effizientes Trimming auf eine optimale Länge von 8-11 AS (H-2D^b) bzw. 8-9 AS (H-2K^b) stattgefunden hat (Abb. 30 und 31). Zusätzlich zeigten Analysen der N-terminalen Sequenzen vor und im Liganden ein verändertes Schnittmuster in Abhängigkeit von ERMP1 (Abb. 33). Die veränderte Zusammensetzung mit einem höheren Anteil an verlängerten Peptiden in ERMP1 defizienten Tieren ist konsistent mit anderen Studien bezüglich der bereits identifizierten Aminopeptidase ERAP1. So haben zum einen Chen *et. al* durch *in vitro* Versuche gezeigt, dass eine lentiviral erzeugte Stilllegung von ERAP1 zu einer Reduktion in der Anzahl HLA-B27-gebundenen Peptiden mit einer Länge von 9 AS führt²²⁰. Ebenso konnten Blanchard *et. al* einen deutlichen Anstieg an verlängerten Peptiden in ERAAP defizienten Mäusen beobachten²²¹. Die in der vorliegenden Dissertation beobachteten Effekte, dass ein weniger effizientes Trimming von Peptiden auf die Längenpräferenzen der verschiedenen MHC-Allele in ERMP1 defizienten Mäusen vorliegt, gehen

damit mit den Eigenschaften bereits bekannter Aminopeptidasen einher. So kann davon ausgegangen werden, dass auch ERMP1 eine mögliche Rolle in der Antigenprozessierung erfüllt. Sicherlich sind die Unterschiede von 3-6% weniger Peptiden mit einer Länge von 8-11 AS bzw. 8-9 AS in ERMP1 defizienten Mäusen vergleichsweise gering. Dies kann aber unter anderem mit der ebenfalls erhaltenen Erkenntnis, dass in ERMP1 defizienten Tieren eine erhöhte Expression von ERAP1 festgestellt werden konnte, (Abb.28) erklärt werden. Daher ist es naheliegend, dass ERAP1 bei einer fehlenden Expression von ERMP1 dessen Funktionen teilweise übernimmt und daher den relativ geringen Unterschied in der Anzahl von Peptiden der optimalen Länge zur Beladung von MHC-Molekülen erklärt. Passend zu den Änderungen in dem Repertoire der MHC-Liganden gibt es abhängig von der ERMP1-Defizienz auch Änderungen in der Expression von Proteinen, die an der Antigenprozessierung und Antigenpräsentation beteiligt sind. So sind beispielsweise Calnexin, Calreticulin und BiP, welche alle Teil des Peptidladekomplexes sind, in ERMP1 defizienten Mäusen geringer exprimiert, ebenso wie TAP und MHC-Klasse-I (3.4.1), was dazu passt, dass weniger Peptide zur Beladung auf die entsprechenden MHC-Moleküle vorhanden sind. Insgesamt war aber auch festzustellen, dass bei der Isolierung von MHC-Klasse-I-Peptid-Liganden aus der Milz ERMP1 defizienter und kompetenter Mäuse (Abb. 30 und 31) im Vergleich zur Anwendung des Protokolls auf Zelllinien (Abb. 15) deutlich mehr zu lange Peptide identifiziert wurden. Bei diesen Peptiden handelt es sich nach Analysen der vorhergesagten Bindungsmotive auch ziemlich sicher nicht um MHC-Klasse-I-Liganden (Abb. 32). Verschiedene Untersuchungen zur möglichen Identität dieser Peptide brachten kein Erfolg. So konnten sie beispielsweise weder als N-terminal oder C-terminal verlängerte Liganden identifiziert werden noch anhand ihrer Ursursprogsproteine anderen Zellkompartimenten als den MHC-Liganden zugeordnet werden. Damit konnte das Protokoll zwar auch erfolgreich auf murines Primärmaterial angewendet werden, nicht aber genau so effizient wie in Zelllinien.

Zusammenfassend liefern die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten Hinweise darauf, dass ERMP1 auch *in vivo* eine bisher unbekannte Rolle als Aminopeptidase in der Antigenprozessierung zugesprochen werden kann. So verändert die Abwesenheit von ERMP1 die Längenverhältnisse und N-terminalen Sequenzen von H-2K^b und H-2D^b präsentierten Liganden, die Expressionsstärke bekannter Aminopeptidasen (ERAP1) sowie die Expression bekannter Proteine, die an der Antigenprozessierung und Antigenpräsentation beteiligt sind. Insgesamt scheint ERMP1 damit eine wichtige Rolle in der Generierung von 8-11 AS bzw. 8-9 AS langen Peptiden zu spielen. Ein nächster wichtiger Schritt zur Charakterisierung von ERMP1 stellen weiterführende *in vivo* Versuche dar. So sollte beispielsweise mit dem etablierten Infektionsmodell der Lymphozytären Choriomeningitis (LCMV) ein Infektionsversuch mit ERMP1 defizienten Mäusen durchgeführt

werden, so dass auch eine funktionelle Rolle von ERMP1 zur Präsentation von Krankheits-assoziierten Epitopen untersucht werden kann.

5. Zusammenfassung

Zur Entwicklung neuer Peptid-Vakzinierungsstrategien und anderen immuntherapeutischen Ansätzen zur Behandlung maligner Erkrankungen ist die Identifizierung von Neoantigenen, die nicht nur *in silico* vorhergesagt werden können, sondern auch tatsächlich von Tumorzellen CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen präsentiert werden, essentiell. Hierfür werden reproduzierbare und sensitive Methoden benötigt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Protokoll zur massenspektrometrischen Identifizierung von HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden, dem so genannten Ligandom, etabliert und erfolgreich auf neun humane Krebszelllinien angewendet. Die Optimierung des Protokolls hinsichtlich des Lyse-Detergenz, des Antikörper-Bead-Verhältnisses zur Immunpräzipitation und der Kombination verschiedener Komponenten wie Reaktionsgefäß, Ultrafiltrationseinheit und Umkehrphasenaustauschchromatographie-Platte ermöglichte die Identifikation von etwa 11.000 HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden in den neun Zelllinien. Ergänzend zum Ligandom wurde auch das Proteom und Transkriptom der Zelllinien analysiert und miteinander in Verbindung gesetzt. So wurden für das Proteom zwischen 4638 und 5220 Proteine und für das Transkriptom zwischen 10519 und 12467 exprimierte Gene identifiziert. Die Analysen zeigten im Vergleich zu bisherigen Studien hohe Pearson-Korrelationen zwischen Proteom und Transkriptom von bis zu 0,63. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Stärke der Korrelation abhängig von der betrachteten GO-Annotation variiert. Auch konnte ein positiver Zusammenhang zwischen der Expressionsstärke eines Proteins und der Wahrscheinlichkeit zur anschließenden Präsentation als HLA-Peptid-Ligand festgestellt werden. Mit Hilfe dieser gewonnenen Datensätze bezüglich Transkriptom, Proteom und Ligandom der Zelllinien und der beobachteten Zusammenhänge zwischen den einzelnen Ebenen besteht nun die Möglichkeit, diese zur Entwicklung eines neuen Modells zur Vorhersage von tatsächlich präsentierten HLA-Klasse-I-Liganden, basierend auf Transkriptom - oder Proteomdaten, zu nutzen.

Im zweiten Teil der vorliegenden Dissertation wurde die Funktion der ER-residenten Amino-peptidase ERMP1 untersucht und der Einfluss von ERMP1 auf das präsentierte MHC-Klasse-I-Ligandom charakterisiert. Dabei wurde festgestellt, dass in Mäusen mit einer Defizienz in ERMP1 weniger Peptide mit der optimalen Länge von 8-11 AS (H-2D^b) bzw. 8-9 AS (H-2K^b) auf der Oberfläche der MHC-Moleküle exprimiert werden und diese Peptide ein geändertes Muster in den N-terminalen Sequenzen aufwiesen. Außerdem war die Expression bekannter Proteine, die an der Antigenprozessierung und Antigenpräsentation beteiligt sind (z.B. TAP, MHC-Klasse-I, Calnexin und Calreticulin) in ERMP1 defizienten Mäusen reduziert. Diese Ergebnisse unterstreichen die Funktion von ERMP1 als potentielle Amino-peptidase im ER.

6. Abstract

For the development of new peptide vaccination strategies and other immunotherapeutic approaches for the treatment of cancer, the identification of neoantigens that are not only predicted *in silico* but actually presented by the tumor cells to cytotoxic T cells is a crucial requirement. For that purpose, reproducible and sensitive methods are needed. In this dissertation a protocol for the identification of HLA-class-I-peptide-ligands (so called ligandome) using mass spectrometry could be established and applied to nine human cancer cell lines. Due to several optimisation steps regarding cell lyses, antibody-bead-ratio for immunoprecipitation, and the combination of different components like reaction vessel, ultrafiltration spin columns and reversed phase chromatography elution plates led to the identification of about 11.000 HLA-class-I-peptide-ligands over the nine cell lines. Additionally, the proteome and transcriptome of those cell lines was analysed and studied for correlations. Proteome analysis of the cell lines led to the identification of 4638 to 5220 proteins and transcriptome analysis revealed between 10519 and 12467 expressed genes. Using all these data sets, comparatively high correlations between proteome and transcriptome were observed, meaning a Pearson coefficient of up to 0.63. Furthermore, it could be shown that the strength of this correlation varies dependent on the analysed GO term. It could also be shown that proteins with a higher expression rate are more likely presented as a HLA-peptide-ligand. Conclusively, the generated data sets regarding proteome, transcriptome and ligandome in combination with the observed correlations between these three data sets give the possibility to develop a new prediction tool for actually presented HLA-class-I-peptide-ligands, based on proteome or transcriptome data as input.

The second part of this dissertation dealt with the analysis of the function of the ER-resident aminopeptidase ERMP1 and the characterisation of the influence of ERMP1 on the MHC-class-I-ligandome. It could be shown that there are reduced numbers of optimal suited peptides with a length of 8-11 amino acids (H-2D^b) or 8-9 amino acids (H-2K^b) in ERMP1 deficient mice. Those peptides additionally showed altered N-terminal sequences. Furthermore, known proteins playing a role in antigen processing and antigen presentation like TAP, MHC-class-I, Calnexin or Calreticulin showed a decreased expression in ERMP1 deficient mice. Taken together, the obtained results underline the role of ERMP1 as a potential ER-resident aminopeptidase.

7. Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

1. Goldberg, A. C., Rizzo, L. V., Avenida, – & Einstein, A. MHC structure and function - antigen presentation. Part 1. *einstein* **13**, 153–6 (2015).
2. Terasaki, P. Jean Dausset (1916-2009). *Am. J. Transplant.* (2009). doi:10.1111/j.1600-6143.2009.02823.x
3. Dausset, J. The Birth of MAC. *Vox Sang.* **46**, 235–237 (1984).
4. Rammensee, H.-G., Friede, T. & Stevanovic, S. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* **41**, 178–228 (1995).
5. Satta, Y., Li, Y.-J. & Takahata, N. The Neutral Theory And Natural Selection In The HLA Region. *Front. Biosci.* **3**, 459–467 (1998).
6. Klein John Wiley, J. & Welsh, K. I. Natural History of the Major Histocompatibility Complex. *Immunology* **60**, (1987).
7. York, I. A. & Rock, K. L. Antigen Processing and Presentation by the Class I Major Histocompatibility Complex. *Annu. Rev. Immunol* **14**, 369–96 (1996).
8. Madden, D. R., Gorga, J. C., Strominger, J. L. & Wiley, D. C. The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC. *Cell* **70**, 1035–1048 (1992).
9. An, J., Lein, K., Kie, A. & Ato, S. The HLA System First of Two Parts. *N. Engl. J. Med.* (2000).
10. Matsumura, M., Fremont, D., Peterson, P. & Wilson, I. Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. *Science (80-.).* **257**, (1992).
11. Bouvier, M. & Wiley, D. C. Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of MHC class I molecules. *Science* **265**, 398–402 (1994).
12. Zacharias, M. & Springer, S. Conformational flexibility of the MHC class I alpha1-alpha2 domain in peptide bound and free states: a molecular dynamics simulation study. *Biophys. J.* **87**, 2203–14 (2004).
13. Brown, J. H. *et al.* Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* **364**, (1993).
14. Rudensky, A. Y., Preston-Hurlburt, P., Hong, S.-C., Barlow, A. & Janeway, C. A. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* **353**, 622–627 (1991).
15. Chicz, R. M. *et al.* Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. *Nature* **358**, 764–768 (1992).
16. Gutiérrez, S. E., Esteban, E. N., Lützelshwab, C. M. & Juliarena, M. A. in *Trends and Advances in Veterinary Genetics* (InTech, 2017). doi:10.5772/65804
17. Shiina, T., Hosomichi, K., Inoko, H. & Kulski, J. K. The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. *J. Hum. Genet.* **54**, 15–39 (2009).
18. Horton, R. *et al.* Gene map of the extended human MHC. *Nat. Rev. Genet.* **5**, 889–899 (2004).
19. New Nomenclature for the HLA System. *J. Immunol.* **116**, 573–574 (1976).
20. Stern, L. J. & Wiley, D. C. Antigenic peptide binding by class I and class II histocompatibility proteins. *Structure* (1994).
21. Theodossis, A. *et al.* Constraints within major histocompatibility complex class I restricted peptides: Presentation and consequences for T-cell recognition. *PNAS* **107**, (2010).
22. Adams, E. J. & Luoma, A. M. The Adaptable Major Histocompatibility Complex (MHC) Fold: Structure and Function of Nonclassical and MHC Class I-Like Molecules. *Annu. Rev. Immunol.* **31**, 529–561 (2013).
23. Murphy, K., Travers, P. & Walport, M. *Janeway's Immunobiology-Seventh Edition.* (Garland

- Science, 2007).
24. Wieczorek, M. *et al.* Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. *Front. Immunol* **8**, 2923389–292 (2017).
 25. Zhang, W., Youngt, A. C. M., Imarai, M., Nathenson, S. G. & Sacchetrinit, J. C. Crystal structure of the major histocompatibility complex class I H-2Kb molecule containing a single viral peptide: Implications for peptide binding and T-cell receptor recognition. *Immunology* **89**, 8403–8407 (1992).
 26. Miles, J. J., McCluskey, J., Rossjohn, J. & Gras, S. Understanding the complexity and malleability of T-cell recognition. *Immunol. Cell Biol.* **93**, 433–441 (2015).
 27. Rossjohn, J. *et al.* T Cell Antigen Receptor Recognition of Antigen-Presenting Molecules. *Annu. Rev. Immunol* **33**, 169–200 (2015).
 28. Glusman, G. *et al.* Comparative Genomics of the Human and Mouse T Cell Receptor Loci. *Immunity* **15**, 337–349 (2001).
 29. Gras, S. *et al.* Reversed T Cell Receptor Docking on a Major Histocompatibility Class I Complex Limits Involvement in the Immune Response. *Immunity* **45**, 749–760 (2016).
 30. Nikolich-Zugich, J., Slifka, M. K. & Messaoudi, I. The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 123–132 (2004).
 31. Qi, Q. *et al.* Diversity and clonal selection in the human T-cell repertoire. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 13139–13144 (2014).
 32. Li, H. M. *et al.* TCR repertoire of CD4+ and CD8+ T cells is distinct in richness, distribution, and CDR3 amino acid composition. *J. Leukoc. Biol.* **99**, 505–513 (2016).
 33. Robins, H. S. *et al.* Overlap and effective size of the human CD8+ T cell receptor repertoire. *Sci. Transl. Med.* **2**, 47ra64 (2010).
 34. Chen, G. *et al.* Sequence and Structural Analyses Reveal Distinct and Highly Diverse Human CD8+ TCR Repertoires to Immunodominant Viral Antigens. *Cell Rep.* **19**, 569–583 (2017).
 35. Miles, J. J., Douek, D. C. & Price, D. A. Bias in the $\alpha\beta$ T-cell repertoire: implications for disease pathogenesis and vaccination. *Immunol. Cell Biol.* **89**, 375–387 (2011).
 36. Kjer-Nielsen, L. *et al.* The 1.5 Å Crystal Structure of a Highly Selected Antiviral T Cell Receptor Provides Evidence for a Structural Basis of Immunodominance. *Structure* **10**, 1521–1532 (2002).
 37. Burrows, S. R. *et al.* Hard wiring of T cell receptor specificity for the major histocompatibility complex is underpinned by TCR adaptability. *PNAS* **107**, (2010).
 38. Janeway, C. J., Travers, P. & Walport, M. in *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease* (Garland Science, 2001).
 39. Gascoigne, N. R. J. Do T cells need endogenous peptides for activation? *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 895–900 (2008).
 40. Smith-Garvin, J. E., Koretzky, G. A. & Jordan, M. S. T Cell Activation. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, (2009).
 41. Wucherpfennig, K. W., Gagnon, E., Call, M. J., Huseby, E. S. & Call, M. E. Structural Biology of the T-cell Receptor: Insights into Receptor Assembly, Ligand Recognition, and Initiation of Signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* (2009). doi:10.1101/cshperspect.a005140
 42. Govers, C., Sebestyén, Z., Coccoris, M., Willemsen, R. A. & Debets, R. T cell receptor gene therapy: strategies for optimizing transgenic TCR pairing. *Trends Mol. Med.* **16**, 77–87 (2010).
 43. Paz, P., Brouwenstijn, N., Perry, R. & Shastri, N. Discrete Proteolytic Intermediates in the MHC Class I Antigen Processing Pathway and MHC I-Dependent Peptide Trimming in the ER. *Immunity* **11**, 241–251 (1999).
 44. Vyas, J. M., Van der Veen, A. G. & Ploegh, H. L. The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 607–618 (2008).
 45. Shastri, N., Cardinaud, S., Schwab, S. R., Serwold, T. & Kunisawa, J. All the peptides that fit: the beginning, the middle, and the end of the MHC class I antigen-processing pathway. *Immunol. Rev.* **207**, 31–41 (2005).

46. Yewdell, J. W., Antón, L. C. & Bennink, J. R. Defective ribosomal products (DRiPs): a major source of antigenic peptides for MHC class I molecules? *J. Immunol.* **157**, (1996).
47. Qian, S.-B. *et al.* Tight Linkage between Translation and MHC Class I Peptide Ligand Generation Implies Specialized Antigen Processing for Defective Ribosomal Products. *J. Immunol.* **177**, (2006).
48. Colbert, J. D., Farfán-Arribas, D. J. & Rock, K. L. Substrate-induced protein stabilization reveals a predominant contribution from mature protein to peptides presented on MHC class I. *J. Immunol.* (2013). doi:10.4049/jimmunol.1300078
49. Rock, K. L. & Goldberg, A. L. Degradation of Cell Proteins and the Generation of MHC Class I-Presented Peptides. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 739–779 (1999).
50. Chau, V. *et al.* A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science (80-.)*. **243**, (1989).
51. Rechsteiner, M., Hoffman, L. & Dubiel, W. The Multicatalytic and 26 S Proteases*. *J. Biol. Chem.* **268**, 6065–6068 (1993).
52. Wilk, S. & Orlowski, M. Evidence that Pituitary Cation-Sensitive Neutral Endopeptidase Is a Multicatalytic Protease Complex. *J. Neurochem.* **40**, 842–849 (1983).
53. Hill, C. P. *et al.* Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators. *Nature* **408**, 115–120 (2000).
54. Glickman, M. H. & Ciechanover, A. The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction. *Physiol. Rev.* **82**, (2002).
55. Groettrup, M., Soza, A., Kuckelkorn, U. & Kloetzel, P.-M. Peptide antigen production by the proteasome: complexity provides efficiency. *Immunol. Today* **17**, 429–435 (1996).
56. Strehl, B. *et al.* Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. *Immunol. Rev.* **207**, 19–30 (2005).
57. Akiyama, K. *et al.* cDNA cloning and interferon gamma down-regulation of proteasomal subunits X and Y. *Science (80-.)*. **265**, (1994).
58. Aki, M. *et al.* Interferon-gamma induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. *J. Biochem.* **115**, 257–269 (1994).
59. Groettrup, M., Khan, S., Schwarz, K. & Schmidtke, G. Interferon- γ inducible exchanges of 20S proteasome active site subunits: Why? *Biochimie* **83**, 367–372 (2001).
60. York, I. A. *et al.* The Cytosolic Endopeptidase, Thimet Oligopeptidase, Destroys Antigenic Peptides and Limits the Extent of MHC Class I Antigen Presentation. *Immunity* **18**, 429–440 (2003).
61. Reits, E. *et al.* Peptide Diffusion, Protection, and Degradation in Nuclear and Cytoplasmic Compartments before Antigen Presentation by MHC Class I. *Immunity* **18**, 97–108 (2003).
62. Stoltze, L. *et al.* Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nat. Immunol.* (2000).
63. Burgevin, A. *et al.* A detailed analysis of the murine TAP transporter substrate specificity. *PLoS One* **3**, 1–8 (2008).
64. Elliott, T., Eisenlohr, L. C., Tampé, R. & Lehnert, E. Structure and Dynamics of Antigenic Peptides in Complex with TAP. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
65. Neefjes, J. J., Hammerling, G. J. & Momburg, F. Folding and Assembly of Major Histocompatibility Complex Class I Heterodimers in the Endoplasmic Reticulum of Intact Cells Precedes the Binding of Peptide. *J. Exp. Med.* **178**, (1993).
66. Hulpke, S. & Tampé, R. The MHC I loading complex: a multitasking machinery in adaptive immunity. *Trends Biochem. Sci.* **38**, 412–420 (2013).
67. Chapman, D. C. & Williams, D. B. ER quality control in the biogenesis of MHC class I molecules. *Semin. Cell Dev. Biol.* **21**, 512–519 (2010).
68. Grandea, A. M., Androlewicz, M. J., Athwal, R. S., Geraghty, D. E. & Spies, T. Dependence of Peptide Binding by MHC Class I Molecules on Their Interaction with TAP. *Science (80-.)*. **207**, (1995).
69. Garbi, N. *et al.* Impaired immune responses and altered peptide repertoire in tapasin-deficient mice. *Nat. Immunol.* **1**, (2000).

70. Granda Iii, A. G., Golovina, T. N., Hamilton, S. E. & Sriram, V. Impaired Assembly yet Normal Trafficking of MHC Class I Molecules in Tapasin Mutant Mice. *Immunity* **13**, 213–222 (2000).
71. Mo, X. Y., Cascio, P., Lemerise, K., Goldberg, A. L. & Rock, K. Distinct Proteolytic Processes Generate the C and N Termini of MHC Class I-Binding Peptides. *J Immunol Ref.* **163**, 5851–5859 (1999).
72. Serwold, T., Gaw, S. & Shastri, N. ER aminopeptidases generate a unique pool of peptides for MHC class I molecules. *Nat. Immunol.* (2001).
73. Fruci, D., Niedermann, G., Butler, R. H. & Van Endert, P. M. Efficient MHC Class I-Independent Amino-Terminal Trimming of Epitope Precursor Peptides in the Endoplasmic Reticulum. *Immunity* **15**, 467–476 (2001).
74. Komlosch, A. *et al.* A Role for a Novel Luminal Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase in Final Trimming of 26 S Proteasome-generated Major Histocompatibility Complex Class I Antigenic Peptides. *J. Biol. Chem.* (2001). doi:10.1074/jbc.M103177200
75. Saric, T. *et al.* An IFN- γ -induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat. Immunol.* **3**, 1169–1176 (2002).
76. Hearn, A., York, I. A. & Rock, K. L. The Specificity of Trimming of MHC Class I-Presented Peptides in the Endoplasmic Reticulum. *J. Immunol.* (2009). doi:10.4049/jimmunol.0803663
77. Tsujimoto, M. & Hattori, A. The oxytocinase subfamily of M1 aminopeptidases. in *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* (2005). doi:10.1016/j.bbapap.2004.09.011
78. Tanioka, T. *et al.* Human leukocyte-derived arginine aminopeptidase. The third member of the oxytocinase subfamily of aminopeptidases. *J. Biol. Chem.* (2003). doi:10.1074/jbc.M305076200
79. Saveanu, L. *et al.* Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum. *Nat. Immunol.* (2005). doi:10.1038/ni1208
80. Garcia-Rudaz, C. *et al.* Fxna, a novel gene differentially expressed in the rat ovary at the time of folliculogenesis, is required for normal ovarian histogenesis. *Development* (2007). doi:10.1242/dev.02795
81. Akkad, N. Isolierung und Charakterisierung der ER-residenten Aminopeptidase ERMP1 und Untersuchung ihrer Funktion in der Prozessierung MHC I restringierter CTL Epitope. (2011).
82. Grandi, A. *et al.* ERMP1, a novel potential oncogene involved in UPR and oxidative stress defense, is highly expressed in human cancer. *Oncotarget* **7**, (2016).
83. Barber, D. L. *et al.* Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* **439**, 682–687 (2006).
84. Hodi, F. S. *et al.* Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **363**, 711–723 (2010).
85. Wang, C. *et al.* In Vitro Characterization of the Anti-PD-1 Antibody Nivolumab, BMS-936558, and In Vivo Toxicology in Non-Human Primates. *Cancer Immunol. Res.* **2**, (2014).
86. Brewerton, D. A., Caffrey, M., Nicholls, A. & James, D. C. O. Histocompatibility Antigen (HL-A 27) and Its Relation to Disease. *Ann. Rheum. Dis.* (1974).
87. Schlosstein, L., Terasaki, P. I., Bluestone, R. & Pearson, C. M. High Association of an HL-A Antigen, W27, with Ankylosing Spondylitis. *N. Engl. J. Med.* **288**, 704–706 (1973).
88. Zink, A., Minden, K. & List, S. M. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. (2010).
89. Karnes, J. H. *et al.* Phenome-wide scanning identifies multiple diseases and disease severity phenotypes associated with HLA variants. *Sci. Transl. Med.* (2017).
90. Trowsdale, J. & Knight, J. C. Major histocompatibility complex genomics and human disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **14**, 301–23 (2013).
91. Ghosh, D. *et al.* Impact of genetic variations and transcriptional alterations of HLA class I genes on cervical cancer pathogenesis. *Int. J. Cancer* **140**, 2498–2508 (2017).
92. Wichmann, G. *et al.* HLA traits linked to development of head and neck squamous cell

- carcinoma affect the progression-free survival of patients. *Oral Oncol.* **69**, 115–127 (2017).
93. Röttschke, O. *et al.* Exact prediction of a natural T cell epitope. *Eur. J. Immunol.* **21**, 2891–2894 (1991).
 94. Konstantinou, G. N. in *Food Allergens: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* 211–222 (2017). doi:10.1007/978-1-4939-6925-8_17
 95. Rammensee, H., Bachmann, J., Emmerich, N. P., Bachor, O. A. & Stevanović, S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* **50**, 213–9 (1999).
 96. Andreatta, M. & Nielsen, M. Gapped sequence alignment using artificial neural networks: application to the MHC class I system. *Bioinformatics* **32**, 511–517 (2016).
 97. Nielsen, M. *et al.* Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations. *Protein Sci.* (2003). doi:10.1110/ps.0239403
 98. Celis, E. *et al.* Induction of anti-tumor cytotoxic T lymphocytes in normal humans using primary cultures and synthetic peptide epitopes. *Immunology* **91**, 2105–2109 (1994).
 99. Schmitz, M. *et al.* Generation of Survivin-specific CD8+ T Effector Cells by Dendritic Cells Pulsed with Protein or Selected Peptides. *Cancer Res.* **60**, (2000).
 100. Sun, Y. *et al.* Identification of a new HLA-A*0201-restricted T-cell epitope from the tyrosinase-related protein 2 (TRP2) melanoma antigen. *Int. J. Cancer* **87**, 399–404 (2000).
 101. Chen, J.-L. *et al.* Identification of NY-ESO-1 Peptide Analogues Capable of Improved Stimulation of Tumor-Reactive CTL. *J Immunol Ref. J. Immunol.* **165**, 948–955 (2017).
 102. Brossart, P. *et al.* Identification of HLA-A2–Restricted T-Cell Epitopes Derived From the MUC1 Tumor Antigen for Broadly Applicable Vaccine Therapies. *Blood* **93**, (1999).
 103. Johnson, L. A. *et al.* Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood* **114**, 535–46 (2009).
 104. Parkhurst, M. R. *et al.* T cells targeting carcinoembryonic antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis. *Mol. Ther.* **19**, 620–6 (2011).
 105. Robbins, P. F. *et al.* Tumor Regression in Patients With Metastatic Synovial Cell Sarcoma and Melanoma Using Genetically Engineered Lymphocytes Reactive With NY-ESO-1. *J Clin Oncol* **29**, 917–924 (2011).
 106. Rapoport, A. P. *et al.* NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma. *Nat. Med.* **21**, 914–21 (2015).
 107. Ping, Y., Liu, C. & Zhang, Y. T-cell receptor-engineered T cells for cancer treatment: current status and future directions. *Protein Cell* 1–13 (2017). doi:10.1007/s13238-016-0367-1
 108. Tran, E. *et al.* Cancer Immunotherapy Based on Mutation-Specific CD4+ T Cells in a Patient with Epithelial Cancer. *Science (80-.)*. **344**, (2014).
 109. Gerlinger, M. *et al.* Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *N. Engl. J. Med.* **366**, (2012).
 110. Noguchi, M. *et al.* Phase II study of personalized peptide vaccination for castration-resistant prostate cancer patients who failed in docetaxel-based chemotherapy. *Prostate* **72**, 834–45 (2012).
 111. Walter, S. *et al.* Multi-peptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival. *Nat. Med.* (2012). doi:10.1038/nm.2883
 112. Singh-Jasuja, H., Emmerich, N. P. N. & Rammensee, H. G. The Tübingen approach: Identification, selection, and validation of tumor-associated HLA peptides for cancer therapy. *Cancer Immunol. Immunother.* **53**, 187–195 (2004).
 113. Weinschenk, T. *et al.* Integrated Functional Genomics Approach for the Design of Patient-individual Antitumor Vaccines. *Cancer Res.* **62**, (2002).
 114. Mittendorf, E. A. *et al.* Clinical Trial Results of the HER-2/neu (E75) Vaccine to Prevent Breast Cancer Recurrence in High-Risk Patients. *Cancer* (2012).
 115. Weide, B. *et al.* Direct Injection of Protamine-protected mRNA: Results of a Phase 1/2 Vaccination Trial in Metastatic Melanoma Patients. *J. Immunother.* **32**, 498–507 (2009).

116. Brunsvig, P. F. *et al.* Telomerase Peptide Vaccination in NSCLC: A Phase II Trial in Stage III Patients Vaccinated after Chemoradiotherapy and an 8-Year Update on a Phase I/II Trial. *Clin. Cancer Res.* **17**, (2011).
117. Kenter, G. G. *et al.* Vaccination against HPV-16 Oncoproteins for Vulvar Intraepithelial Neoplasia. *N. Engl. J. Med.* **361**, 1838–1847 (2009).
118. Rammensee, H.-G. & Singh-Jasuja, H. HLA ligandome tumor antigen discovery for personalized vaccine approach. *Expert Rev. Vaccines* **12**, 1211–1217 (2013).
119. Kantoff, P. W. *et al.* Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* (2010). doi:10.1056/NEJMoa1001294
120. Eder, J. P. *et al.* A Phase I Trial of a Recombinant Vaccinia Virus Expressing Prostate-specific Antigen in Advanced Prostate Cancer. *Clin. Cancer Res.* **6**, (2000).
121. Rittig, S. M. *et al.* Intradermal Vaccinations With RNA Coding for TAA Generate CD8+ and CD4+ Immune Responses and Induce Clinical Benefit in Vaccin. *Mol. Ther.* **19**, 990–999 (2011).
122. Aebersold, R. & Mann, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422**, 198–207 (2003).
123. Kuharev, J. Algorithmen zur labelfreien quantitativen Proteomanalyse auf Basis datenunabhängig-akquirierter LC-MS-Daten. (2015).
124. Pringle, S. D. *et al.* An investigation of the mobility separation of some peptide and protein ions using a new hybrid quadrupole/travelling wave IMS/oa-ToF instrument. *Int. J. Mass Spectrom.* **261**, 1–12 (2007).
125. Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U. & Hillenkamp, F. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* **78**, 53–68 (1987).
126. Yamashita, M. & Fenn, J. B. Electrospray Ion Source. Another Variation on the Free-Jet Theme. *J. Phys. Chem.* **88**, 4451–4459 (1984).
127. Wilm, M. S. & Mann, M. Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last? *Int. J. Mass Spectrometry Ion Process.* **136**, 167–180 (1994).
128. Moroshkin, P., Leiderer, P., Möller, T. B. & Kono, K. Taylor cone and electro spraying at a free surface of superfluid helium charged from below. *Phys. Rev.* **53110**, 1–9 (2017).
129. Paul, W. & Steinwedel, H. Ein neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld. *Zeitschrift Naturforsch.* 448–450 (1953).
130. McLafferty, F. W. & Bockhoff, F. M. Separation/identification system for complex mixtures using mass separation and mass spectral characterization. *Anal. Chem.* **50**, 69–76 (1978).
131. Biemann, K. MASS SPECTROMETRY OF PEPTIDES AND PROTEINS. *Annu. Rev. Biochem* **61**, 977–1010 (1992).
132. Baumbach, J. I. & Eiceman, G. A. Ion Mobility Spectrometry: Arriving On Site and Moving Beyond a Low Profile. *Appl. Spectrosc.* **53**, (1999).
133. Hill, H. H., Siems, W. F., Louis, R. H. St. & McMinn, D. G. ION MOBILITY SPECTROMETRY. *Anal. Chem.* **62**, 1201A–1209A (1990).
134. Rieux, L., Sneekes, E.-J. & Swart, R. *Nano LC: Principles, Evolution, and State-of-the-Art of the Technique.* (2011).
135. Swartz, M. E. & Murphy, B. J. Ultra performance liquid chromatography:tomorrow's HPLC technology today. *Lab Plus Int.* (2004).
136. Holman, S. W., Sims, P. F. G. & Eyers, C. E. The use of selected reaction monitoring in quantitative proteomics. *Bioanalysis* **4**, 1763–1786 (2012).
137. Bensimon, A., Heck, A. J. R. & Aebersold, R. Mass Spectrometry-Based Proteomics and Network Biology. *Annu. Rev. Biochem. Vol 81* **81**, 379–405 (2012).
138. Geromanos, S. J. *et al.* The detection, correlation, and comparison of peptide precursor and product ions from data independent LC-MS with data dependant LC-MS/MS. *Proteomics* **9**, 1683–1695 (2009).
139. Michalski, A., Cox, J. & Mann, M. More than 100,000 detectable peptide species elute in single shotgun proteomics runs but the majority is inaccessible to data-dependent LC-

- MS/MS. *J. Proteome Res.* **10**, 1785–1793 (2011).
140. Distler, U. *et al.* Drift time-specific collision energies enable deep-coverage data-independent acquisition proteomics. *Nat. Methods* **11**, 167–70 (2014).
 141. Gant-Branum, R. L., Kerr, T. J. & McLean, J. A. Labeling strategies in mass spectrometry-based protein quantitation. *Analyst* **134**, 1525 (2009).
 142. Ong, S.-E. *et al.* Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **1**, 376–386 (2002).
 143. Silva, J. C., Gorenstein, M. V., Li, G.-Z., Vissers, J. P. C. & Geromanos, S. J. Absolute Quantification of Proteins by LCMS^E. *Mol. Cell. Proteomics* **5**, 144–156 (2006).
 144. Leinonen, R. *et al.* UniProt archive. *Bioinformatics* **20**, 3236–3237 (2004).
 145. Eng, J. K., McCormack, A. L. & Yates III, R. J. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **5**, 976–989 (1994).
 146. Perkins, D., Pappin, D., Creasy, D. & Cottrell, J. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* (1999).
 147. Waters GmbH. http://www.waters.com/waters/de_DE/ProteinLynx-Global-SERVER-%28PLGS%29/nav.htm?cid=513821&locale=de_DE.
 148. Ternette, N. *et al.* Early Kinetics of the HLA Class I-Associated Peptidome of MVA.HIVconsv-Infected Cells. *J. Virol.* **89**, 5760–5771 (2015).
 149. Röttschke, O. *et al.* Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells. *Nature* **348**, (1990).
 150. Hunt, D. *et al.* Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. *Science (80-)*. **255**, (1992).
 151. Kochin, V. *et al.* HLA-A24 ligandome analysis of colon and lung cancer cells identifies a novel cancer-testis antigen and a neoantigen that elicits specific and strong CTL responses. *Oncoimmunology* **6**, e1293214 (2017).
 152. Peper, J. K. *et al.* HLA ligandomics identifies histone deacetylase 1 as target for ovarian cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* **5**, e1065369 (2016).
 153. Klatt, M. G. *et al.* Carcinogenesis of renal cell carcinoma reflected in HLA ligands: A novel approach for synergistic peptide vaccination design. *Oncoimmunology* **5**, e1204504 (2016).
 154. Löffler, M. W. *et al.* Personalized peptide vaccine-induced immune response associated with long-term survival of a metastatic cholangiocarcinoma patient. *Journal of Hepatology* **65**, (2016).
 155. Walz, S. *et al.* The antigenic landscape of multiple myeloma: mass spectrometry (re)defines targets for T-cell-based immunotherapy. *Blood* **126**, 1203–13 (2015).
 156. Sugawara, S., Abo, T. & Kumagai, K. A simple method to eliminate the antigenicity of surface class I MHC molecules from the membrane of viable cells by acid treatment at pH 3. *J. Immunol. Methods* **100**, 83–90 (1987).
 157. Kowalewski, D. J. & Stevanovic, S. Biochemical Large-Scale Identification of MHC Class I Ligands. *Antigen Process. Methods Protoc. Methods Mol. Biol.* **960**, 145–157 (2013).
 158. Di Marco, M., Kerstin Peper, J. & Rammensee, H.-G. Identification of Immunogenic Epitopes by MS/MS. *Cancer J.* (2017).
 159. Cancer Genome Atlas Research Network, T. C. G. A. R. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* **474**, 609–15 (2011).
 160. Jones, S. *et al.* Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* **321**, 1801–6 (2008).
 161. Mardis, E. R. *et al.* Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N. Engl. J. Med.* **361**, 1058–66 (2009).
 162. Parsons, D. W. *et al.* An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* **321**, 1807–12 (2008).
 163. Sjöblom, T. *et al.* The Consensus Coding Sequences of Human Breast and Colorectal Cancers. *Science (80-)*. **314**, (2006).
 164. Varela, I. *et al.* Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex

- gene PBRM1 in renal carcinoma. *Nature* **469**, 539–42 (2011).
165. Campbell, P. J. *et al.* Subclonal phylogenetic structures in cancer revealed by ultra-deep sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 13081–6 (2008).
 166. Campbell, P. J. *et al.* The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer. *Nature* **467**, 1109–13 (2010).
 167. Inukai, M. *et al.* Presence of Epidermal Growth Factor Receptor Gene T790M Mutation as a Minor Clone in Non–Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res.* **66**, (2006).
 168. Mullighan, C. G. *et al.* Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science* **322**, 1377–80 (2008).
 169. Roche-Lestienne, C. *et al.* Several types of mutations of the Abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI571, and they can pre-exist to the onset of treatment. *Blood* **100**, (2002).
 170. Shah, N. P. *et al.* Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell* **2**, 117–125 (2002).
 171. Lee, A. J. X. *et al.* Chromosomal Instability Confers Intrinsic Multidrug Resistance. *Cancer Res.* **71**, (2011).
 172. Gerlinger, M. & Swanton, C. How Darwinian models inform therapeutic failure initiated by clonal heterogeneity in cancer medicine. *Br. J. Cancer* **103**, 1139–1143 (2010).
 173. Navin, N. *et al.* Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature* **472**, 90–94 (2011).
 174. <http://cellines.tron-mainz.de/>.
 175. Mallick, P. & Kuster, B. Proteomics: a pragmatic perspective. *Nat. Biotechnol.* **28**, 695–709 (2010).
 176. Distler, U., Kuharev, J., Navarro, P. & Tenzer, S. Label-free quantification in ion mobility-enhanced data-independent acquisition proteomics. *Nat. Protoc.* **11**, 795–812 (2016).
 177. Hammer, Ø., Harper, D. A. T. a. T. & Ryan, P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol. Electron.* **4(1)**, 1–9 (2001).
 178. Yates, J. R. *et al.* Status of complete proteome analysis by mass spectrometry: SILAC labeled yeast as a model system. *Nat. Biotechnol.* **17**, 676–682 (1999).
 179. Man, T.-K. *et al.* Optimising the use of TRIzol-extracted proteins in surface enhanced laser desorption/ ionization (SELDI) analysis. *Proteome Sci.* **4**, 3 (2006).
 180. Hjelmeland, L. M. A nondenaturing zwitterionic detergent for membrane biochemistry: design and synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 6368–70 (1980).
 181. Hiruma-Shimizu, K., Shimizu, H., Thompson, G. S., Kalverda, A. P. & Patching, S. G. Deuterated detergents for structural and functional studies of membrane proteins: Properties, chemical synthesis and applications. *Mol. Membr. Biol.* **32**, 139–155 (2015).
 182. Parmiani, G. *et al.* Cancer Immunotherapy With Peptide-Based Vaccines: What Have We Achieved? Where Are We Going? *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **94**, 805–818 (2002).
 183. Hassan, C. *et al.* Naturally processed non-canonical HLA-A*02:01 presented peptides. *J. Biol. Chem.* **290**, 2593–603 (2015).
 184. Andreatta, M., Alvarez, B. & Nielsen, M. GibbsCluster: Unsupervised clustering and alignment of peptide sequences. *Nucleic Acids Res.* **45**, W458–W463 (2017).
 185. Stadler, C. R. *et al.* Characterization of the first-in-class T-cell-engaging bispecific single-chain antibody for targeted immunotherapy of solid tumors expressing the oncofetal protein claudin 6. *Oncoimmunology* **5**, (2016).
 186. Wang, L. *et al.* Clinicopathologic significance of claudin-6, occludin, and matrix metalloproteinases -2 expression in ovarian carcinoma. *Diagn. Pathol.* **8**, 190 (2013).
 187. Molano, A. *et al.* Peptide Selection by an MHC H-2Kb Class I Molecule Devoid of the Central Anchor ('C') Pocket. *J Immunol* **160**, 2815–2823 (1998).
 188. Cole, D. K. The ultimate mix and match: making sense of HLA alleles and peptide repertoires. *Immunol. Cell Biol.* **93**, 515–516 (2015).
 189. DuPage, M., Mazumdar, C., Schmidt, L. M., Cheung, A. F. & Jacks, T. Expression of tumour-

- specific antigens underlies cancer immunoediting. *Nature* **482**, 405–409 (2012).
190. Castle, J. C. *et al.* Exploiting the mutanome for tumor vaccination. *Cancer Res.* **72**, 1081–1091 (2012).
 191. van Rooij, N. Tumor Exome Analysis Reveals Neoantigen-Specific T-Cell Reactivity in an Ipilimumab-Responsive Melanoma. *J. Clin. Oncol.* **31**, 439–442 (2013).
 192. Brown, S. D. *et al.* Neo-antigens predicted by tumor genome meta-analysis correlate with increased patient survival. *Genome Res.* **24**, 743–50 (2014).
 193. Brennick, C. A., Corwin, W. L., Srivastava, P. K. & Ebrahimi-nik, H. Neoepitopes as cancer immunotherapy targets : key challenges and opportunities. *Immunotherapy* **9**, 361–371 (2017).
 194. Lichtenberg, D., Opatowski, E. & Kozlov, M. M. Phase boundaries in mixtures of membrane-forming amphiphiles and micelle-forming amphiphiles. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1508**, 1–19 (2000).
 195. Lichtenberg, D., Ahyayauch, H., Alonso, A. & Goñi, F. M. Detergent solubilization of lipid bilayers: A balance of driving forces. *Trends Biochem. Sci.* **38**, 85–93 (2013).
 196. Baeurle, S. A. & Kroener, J. Modeling effective interactions of micellar aggregates of ionic surfactants with the Gauss-core potential. *J. Math. Chem.* **36**, (2004).
 197. Leimgruber, R. M. *et al.* Development of improved cell lysis, solubilization and imaging approaches for proteomic analyses. *Proteomics* **2**, 135–44 (2002).
 198. Sarto, C. *et al.* Expression of heat shock protein 27 in human renal cell carcinoma. *Proteomics* **4**, 2252–2260 (2004).
 199. Weems, H. B., Chalecka-Franaszek, E. & Côté, T. E. Solubilization of high-affinity, guanine nucleotide-sensitive mu-opioid receptors from rat brain membranes. *J. Neurochem.* **66**, 1042–50 (1996).
 200. Evans, E. A., Gilmore, R. & Blobel, G. Purification of microsomal signal peptidase as a complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 581–5 (1986).
 201. Simonds, W. F. *et al.* Solubilization of Active Opiate Receptors Source : Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America , Published by : National Academy of Sciences Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/9157> Solubilization of active opiate . *PNAS* **77**, 4623–4627 (2017).
 202. <https://www.applichem.com/produkte/laborbiochemikalien/detergenzien-tenside/>.
 203. Caron, E. *et al.* Analysis of Major Histocompatibility Complex (MHC) Immunopeptidomes Using Mass Spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* 3105–3117 (2015). doi:10.1074/mcp.
 204. Escobar, H., Reyes-Vargas, E., Jensen, P. E., Delgado, J. C. & Crockett, D. K. Utility of Characteristic QTOF MS/MS Fragmentation for MHC Class I Peptides. *J. Proteome Res.* **10**, 2494–2507 (2011).
 205. Hassan, C. *et al.* The human leukocyte antigen-presented ligandome of B lymphocytes. *Mol. Cell. Proteomics* **12**, 1829–43 (2013).
 206. Caron, E. *et al.* An open-source computational and data resource to analyze digital maps of immunopeptidomes. *Elife* **4**, 1–17 (2015).
 207. Ritz, D. *et al.* High-sensitivity HLA class I peptidome analysis enables a precise definition of peptide motifs and the identification of peptides from cell lines and patients' sera. *Proteomics* **16**, 1570–1580 (2016).
 208. Abelin, J. G. *et al.* Mass Spectrometry Profiling of HLA-Associated Peptidomes in Mono-allelic Cells Enables More Accurate Epitope Prediction. *Immunity* **46**, 315–326 (2017).
 209. Bassani-Sternberg, M. *et al.* Direct identification of clinically relevant neoepitopes presented on native human melanoma tissue by mass spectrometry. *Nat. Commun.* **7**, 13404 (2016).
 210. Ternette, N. *et al.* Defining the HLA class I-associated viral antigen repertoire from HIV-1-infected human cells. *Eur. J. Immunol.* **46**, 60–69 (2016).
 211. Crick, F. Central dogma of molecular biology. *Nature* **227**, 561–3 (1970).
 212. Anderson, L. & Seilhamer, J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis* **18**, 533–537 (1997).

213. Gry, M. *et al.* Correlations between RNA and protein expression profiles in 23 human cell lines. *BMC Genomics* (2009). doi:10.1186/1471-2164-10-365
214. Maier, T., Güell, M. & Serrano, L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett.* **583**, 3966–3973 (2009).
215. Kalaora, S. *et al.* Use of HLA peptidomics and whole exome sequencing to identify human immunogenic neo-antigens. *Oncotarget* **7**, 5110–7 (2016).
216. Yadav, M. *et al.* Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing. *Nature* **515**, 572–6 (2014).
217. Hurd, P. J. & Nelson, C. J. Advantages of next-generation sequencing versus the microarray in epigenetic research. *Briefings Funct. Genomics Proteomics* **8**, 174–183 (2009).
218. Pearson, H. *et al.* MHC class I – associated peptides derive from selective regions of the human genome. *J. Clin. Invest.* **126**, 1–12 (2016).
219. Dersh, D. & Yewdell, J. W. I've got algorithm: Predicting tumor and autoimmune peptide targets for CD8+ T cells. *J. Clin. Invest.* **126**, 4399–4401 (2016).
220. Chen, L. *et al.* Critical role of endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 in determining the length and sequence of peptides bound and presented by HLA-B27. *Arthritis Rheumatol.* **66**, 284–294 (2014).
221. Blanchard, N. *et al.* Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase Associated with Antigen Processing Defines the Composition and Structure of MHC Class I Peptide Repertoire in Normal and Virus-Infected Cells. *J. Immunol.* (2010). doi:10.1007/s11103-011-9767-z.Plastid

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur der HLA-Klasse-I-Moleküle und HLA-Klasse-II-Moleküle ¹⁶	2
Abbildung 2: Peptidliganden verschiedener HLA-Moleküle ²³	3
Abbildung 3: HLA-Peptid-Komplex Erkennung über den T-Zell-Rezeptor ^{27,39}	5
Abbildung 4: Antigenprozessierung ⁴⁴	6
Abbildung 5: Einfluss verschiedener AS auf die Affinität des murinen und humanen TAP-Transporters ⁶³	8
Abbildung 6: Peptidladekomplex (PLC) ⁶⁷	9
Abbildung 7: Schematischer Aufbau des Waters Synapt G2-S ^{123,124}	16
Abbildung 8: Durchflusszytometrische Analyse der HLA-Expression aller verwendeten Krebszelllinien	48
Abbildung 9: Korrelationsmappe der Proteomanalyse der neun humanen Krebszelllinien	49
Abbildung 10: Stammbaum der zehn humanen Krebszelllinien auf Grundlage ihrer Proteome	51
Abbildung 11: Dynamischer Bereich und Anzahl der Peptide pro Protein der Proteomanalyse neun humaner Krebszelllinien	52
Abbildung 12: Western Blot Analyse von JY Zellen nach unterschiedlicher Zelllyse mit folgender Isolierung von HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden	54
Abbildung 13: Western Blot Analyse von JY Zellen mit titrierten Mengen an BrCN Sepharose Beads zur Isolierung von HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden	55
Abbildung 14: Schematische Darstellung des neu etablierten Arbeitsablaufs zur Isolierung von HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden	58
Abbildung 15: Größenverteilung der identifizierten HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden	60
Abbildung 16: Bindungsmotive der identifizierten HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden für HLA-A-02:0161	61
Abbildung 17: Bindungsmotive der identifizierten HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden für HLA-B-07:0262	62
Abbildung 18: GibbsClustering von identifizierten HLA-Klasse-I-Peptiden aus LCLC-103H Zellen	63
Abbildung 19: Western Blot Analyse zur Qualitätskontrolle der Isolierung von HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden	64
Abbildung 20: Korrelation der HLA-Expression und der Anzahl identifizierter HLA-Klasse-I-Peptid-Liganden	65
Abbildung 21: Korrelation der identifizierten Proteine und Gene aus neun humanen Krebszelllinien	67
Abbildung 22: Korrelation der Expressionsdaten von Claudin 6 auf Protein - und mRNA-Ebene	68
Abbildung 23: Korrelationsanalysen der Proteom – und Transkriptomdaten von neun humanen Krebszelllinien in Abhängigkeit der GO-Annotation	69
Abbildung 24: Analyse von Zusammenhängen der Proteinexpressionsstärke und der Präsentation als HLA-Ligand	71
Abbildung 25: Massenspektrometrische Analyse von Mikrosomen aus ERMP1 defizienten und Wildtyp Mäusen	74
Abbildung 26: DAVID-Analyse von Mikrosomendaten aus ERMP1 defizienten und wildtypischen Mäusen bezüglich Proteinprozessierung im ER	75
Abbildung 27: DAVID-Analyse von Mikrosomendaten aus ERMP1 defizienten und wildtypischen Mäusen bezüglich Antigenprozessierung und – präsentation	76
Abbildung 28: Expression von ERAP1 in Mikrosomen aus den Milzen von ERMP1 defizienten Mäusen und wildtypischen Kontrolltieren	77
Abbildung 29: Bindungsmotiv der isolierten H-2K ^b -Liganden aus Milzen von WT Mäusen mit einer Länge von 8 AS (links) und der isolierten H-2D ^b -Liganden mit einer Länge von 9 AS (rechts)	78
Abbildung 30: Größenverteilung der isolierten H-2D ^b -Peptide aus Milzen ERMP1 defizienter und kompetenter Mäuse	79
Abbildung 31: Größenverteilung der isolierten H-2K ^b -Peptide aus Milzen ERMP1 defizienter und kompetenter Mäuse	79

Abbildung 32: Bindungsmotive der isolierten MHC-Klasse-I-Peptide aus Milzen ERMP1 defizienter und kompetenter Mäuse basierend auf ihrer Länge80

Abbildung 33: Änderungen in der Häufigkeit der N-terminalen Aminosäure vor („PO“) und im Ligand („P1“)81

Abbildung 34: Wirkprinzip von Detergenzien (adaptiert nach Lichtenberg *et. al*¹⁹⁵)84

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Reagenzien	22
Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien	24
Tabelle 3: Verwendete Laborgeräte.....	25
Tabelle 4: Verwendete Antikörper	33
Tabelle 5: Verwendete Kits	34
Tabelle 6: Rezept zur Herstellung von SDS-Gelen	39
Tabelle 7: Übersicht der verwendeten humanen Krebszelllinien	47
Tabelle 8: Anzahl der identifizierten Proteine in neun humanen Krebszelllinien	50
Tabelle 9: Anzahl der identifizierten Peptid-Liganden in verschiedenen Versuchsansätzen zur Ermittlung der optimalen Kombination aus Reaktionsgefäß, Ultrafiltrationseinheit und Umkehrphasenaustauschchromatographie-Platte	57
Tabelle 10: Anzahl der identifizierten Peptid-Liganden aus neun humanen Krebszelllinien	59
Tabelle 11: Anzahl der identifizierten Proteine, Liganden und Gene in neun humanen Krebszelllinien	66
Tabelle 12: Anzahl der identifizierten MHC-Klasse-I-Liganden aus Milzen ERMP1 defizienter und kompetenter Mäuse	77

7.4 Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
AMBIC	Ammoniumbicarbonat
APC	<i>antigen presenting cell</i>
APS	Adenosinphosphosulfat
AS	Aminosäure
β2M	beta-2-Mikroglobulin
BH	Bleomycin Hydrolase
BiP	<i>binding immunoglobulin protein</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDR	<i>complementary-determining regions</i>
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
<i>ChIP-Seq</i>	<i>Chromatin ImmunoPrecipitation DNA-Sequencing</i>
CID	<i>collision induced dissociation</i>
cm ²	Quadratzenimeter
CMC	<i>critical micelle concentration</i>
CO ₂	Kohlendioxid
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
DDA	<i>data dependent acquisition</i>
DDM	n-Dodecyl β-D-maltosid
DIA	<i>data independent acquisition</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxyribonukleosid-Triphosphate
DRiPs	<i>defective ribosomal products</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERAP	<i>endoplasmic reticulum aminopeptidase</i>
ERMP	<i>endoplasmic reticulum metallopeptidase</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation
<i>et. al</i>	<i>et alia</i> (und andere)

FA	Ameisensäure
FASP	Filter-aided sample preparation
FCS	Fötales Kälberserum
FDR	<i>False discovery rate</i>
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HDAC	Histon-Deacetylase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HLA	<i>human leucocyte antigen</i>
IAA	Iodoacetamid
ICAT	<i>Isotope-coded affinity tag</i>
IFN- γ	Interferon gamma
IMS	Ionenmobilitätsspektrometrie
IP	<i>immunaffinity purification</i>
ITAM	<i>immune receptor tyrosine-based activation motif</i>
KCl	Kaliumchlorid
kDa	kilo Dalton
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
KO	Knockout
LC	<i>liquid chromatography</i>
LCK	Lymphozyten-spezifische Protein-Tyrosin-Kinase
LMP	<i>low molecular weight protein</i>
M	molar
MALDI	<i>matrix-assisted laser desorption/ionisation</i>
MECL	<i>multicatalytic endopeptidase complex subunit</i>
MEM	Minimal Essential Medium
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mL	Milliliter
mM	mmol/L
min	Minuten

MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NH ₄ CO ₃	Ammoniumbicarbonat
(NH ₄) ₂ SO ₄	Ammoniumsulfat
nm	Nanometer
OGP	n-Octyl-β-D-glucopyranosid
OVA	Ovalbumin
PD-1	<i>programmed cell death protein 1</i>
PLC	<i>peptide loading complex</i>
PSA	Puromycin-sensitiven Aminopeptidase
PTM	Posttranslationale Modifikation
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RPKM	Reads per Kilobase per Million mapped reads
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SA	Streptavidin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SILAC	<i>stable isotope labeling with amino acids in cell culture</i>
SRM	<i>selected reaction monitoring</i>
Tab	Tabelle
TAP	<i>transporter associated with antigen presentation</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	<i>time of flight</i>
Tpn	Tapasin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRIS HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
TZR	T-Zell-Rezeptor

UPLC	<i>ultra-performance liquid chromatography</i>
VE	Vollentsalzt
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
°C	Grad Celcius

8. Curriculum Vitae

9. Danksagung