

Aus dem Institut für Biochemie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Charakterisierung der Ubiquitinierung des Tumorantigens
NY-ESO-1 und deren Einfluss auf die MHC-Klasse I
Antigenpräsentation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Richard Golnik

aus Jena

Datum der Promotion: 14.09.2018

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
Abstrakt	7
Abstract	8
1 Einleitung	9
1.1 Einführung in das Immunsystem von Säugetieren	9
1.2 Die MHC-Klasse I Antigenpräsentation	9
1.3 Das Proteasom	10
1.3.1 Funktion und Aufbau des Proteasoms	10
1.3.2 Das 20S Proteasom	11
1.3.3 Das 26S Proteasom und der 19S Regulator	16
1.4 Das Ubiquitin-System	20
1.4.1 Ubiquitin	20
1.4.2 Die Synthese von Ubiquitinketten	21
1.4.3 Kanonische Ubiquitinierung	23
1.4.4 Atypische (Nicht-kanonische) Ubiquitinierung	23
1.4.5 Ubiquitinierung und MHC Klasse I Antigenpräsentation	24
1.5 Das Tumorantigen NY-ESO-1	26
1.6 Zielsetzung der Arbeit	27
2 Material und Methoden	28
2.1 Material	28
2.1.1 Chemikalien, Lösungen und Puffer	28
2.1.2 Peptide	29
2.1.3 Antikörper	29
2.1.4 Zytokine	30
2.1.5 Inhibitoren	30
2.1.6 Enzyme	30
2.1.7 siRNA	30
2.1.8 Plasmide, Primer und Oligonukleotide	30
2.1.9 Laborzubehör und Geräte	31
2.2 Methoden	32

2.2.1	Zellkultur	32
2.2.1.1	Zellkulturmaterialien, -medien und -additive	32
2.2.1.2	Zelllinien	32
2.2.1.3	Arbeit mit Zellen	33
2.2.1.4	Transfektion von Plasmid-DNA und si-RNA	33
2.2.2	Immunbiologische Methoden	33
2.2.2.1	Durchflusszytometrie und FACS	33
2.2.2.2	Peptidbeladung	34
2.2.2.3	Generierung monoklonaler CD8 ⁺ T-Effektorzellen	34
2.2.2.4	Antigenpräsentationsversuch	36
2.2.2.5	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	36
2.2.2.6	Immunopräzipitation	36
2.2.3	Molekularbiologische Methoden	37
2.2.3.1	RNA-Isolation und cDNA-Synthese	37
2.2.3.2	Polymerase-Ketten-Reaktion und Mutagenese	37
2.2.3.3	Klonierung von Plasmid-DNA	37
2.2.3.4	Herstellung von LB-Agarplatten	38
2.2.3.5	Transformation von Plasmid-DNA in kompetente E.Coli	38
2.2.3.6	Plasmid-DNA Isolation aus E.Coli	38
2.2.4	Proteinbiochemische Methoden	39
2.2.4.1	Herstellung von Proteinlysaten	39
2.2.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	39
2.2.4.3	Western Blot und Proteindetektion	39
2.2.4.4	Spaltung von Carboxyestern	40
2.2.4.5	Tobacco-Etch-Virus-Protease Verdau	40
2.2.5	Physikalische Methoden - Bestrahlung von Zellen	40
2.2.6	Statistische Methoden	40
3	Ergebnisse	41
3.1	Generierung von NY-ESO-1 kodierender Vektor-DNA	41
3.1.1	Klonierung von CTAG1B-DNA in pcDNA3.1 Myc/HIS Version B (+)	41
3.1.2	K→R Mutagenese von pcDNA3.1 NY-ESO-1-Myc/HIS	42
3.1.3	N-Terminale Verlängerung der NY-ESO-1-Konstrukte mit V5/TEV	43

3.2	Expression der NY-ESO-1-Konstrukte in HeLa-Zellen	44
3.3	Generierung eines NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅ spezifischen CD8 ⁺ T-Effektorzellklons	45
3.3.1	Analyse der Differenzierungsmarker dendritischer Zellen	45
3.3.2	Bestimmung der Spezifität polyklonaler CD8 ⁺ T-Effektorzellpopulationen	47
3.3.3	ICC und FACS-Analyse des CD8 ⁺ T-Effektorzellklons RG39	48
3.4	Prozessierung des NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅ Epitops	50
3.4.1	Bedeutung des Lysins K124 von NY-ESO-1	50
3.4.2	Beteiligung des lysosomalen Kompartments	51
3.4.3	Einfluss der katalytisch aktiven Untereinheiten des Standardproteasoms	52
3.4.4	Die Prozessierung durch das Immunoproteasom	54
3.4.5	Einfluss der Ubiquitinrezeptoren Rpn10 und Rpn13	55
3.4.6	Modifikation durch unterschiedliche Polyubiquitinketten	56
3.5	Ubiquitinierungsprofil der NY-ESO-1 Proteine	58
3.5.1	Gesamtpolyubiquitinierungsprofile von NY-ESO-1 und NY-ESO-1 ^{K0}	58
3.5.2	Qualitative Unterschiede der Ubiquitinierung	59
4	Diskussion	66
4.1	Diskussion ausgewählter Methoden	66
4.1.1	Analyse der Ubiquitinierungsprofile isolierter NY-ESO-1 Proteine	66
4.1.2	Auswertung der Antigenpräsentationsexperimente	68
4.1.3	Statistische Methoden	69
4.2	Diskussion der Ergebnisse	69
4.2.1	Unterschiede der Ubiquitinierungsprofile von NY-ESO-1 und NY-ESO-1 ^{K0}	69
4.2.2	Prozessierung des NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅ Epitops	71
4.2.3	Relevanz der identifizierten Ubiquitinierungsprofile	77
4.3	Ausblick	79
	Literaturverzeichnis	81
	Eidstattliche Versicherung	94
	Lebenslauf	95
	Publikationsliste	96
	Danksagung	97

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin	FACS	<i>fluorescence activated cell scanning</i>
AAA⁺-ATPase	<i>ATPase associated with diverse activities</i>	FAT10	<i>HLA-F adjacent transcript 10</i>
AK	Antikörper	FCS	Fetales Kälberserum
APC	Allophycocyanin	FITC	Fluoresceinisothiocyanat
APS	Ammoniumpersulfat	FSC	<i>forward scatter</i>
APZ	Antigenpräsentierende Zelle	FW	<i>forward</i>
AS	Aminosäure	GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-dehydrogenase
BPB	Bromphenolblau	GFP	grün fluoreszierendes Protein
BCA	Bicinchoninsäure	GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie stimulierender Faktor
BLCL	<i>B-lymphoblastoid cell line</i>	GP100	Glycoprotein 100
BLMH	Bleomycin Hydrolase	h	Stunde
BSA	Bovines Serum Albumin	HAc	Essigsäure
BrAAP	<i>branched chain amino acid preferring</i>	HCMV	humanes Cytomegalievirus
Cas	Caspase-ähnlich	HECT	<i>homologous to the E6-associated protein carboxyl terminus</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>	Hel	Helix
ChT	Chymotrypsin-ähnlich	hHR23	<i>human homologue of Rad23</i>
CTAG1B	<i>cancer/testis antigen 1B</i>	HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
CTL	Cytotoxische T-Lymphozyten	HLA	Humanes Leukozytenantigen
DC	Dendritische Zelle	HRP	Meerrettichperoxidase
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>	IAV	Influenza A Virus
DMF	N,N-Dimethylformamid	IB	Immunoblot
DMSO	Dimethylsulfoxid	IBM	Iscove Basal Medium
DRiP	<i>defective ribosomal product</i>	ICC	Intrazelluläre Zytokinfärbung
DTT	1,4-Dithiotreitol	IFN	Interferon
DUB	Deubiquitinase	IL	Interleukin
E.Coli	Escherichia coli	IKKγ	<i>inhibitor of NFκB kinase γ</i>
E:T	Effektor:Ziel-Zell	IntP	Intermediärproteasom
E1-Enzym	Ub-aktivierendes Enzym	IP	Immunoproteasom
E2-Enzym	Ub-konjugierendes Enzym	IPräz	Immunopräzipitation
E3-Ligase	Ub-Protein-Ligase	ISG15	<i>interferon-stimulate gene 15</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus	KAc	Kaliumacetat
ECM29	<i>proteasome-associated protein ECM29 homologue</i>	KO	<i>knock-out</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	LAP	Leucinaminopeptidase
EGFR	<i>endothelial growth factor receptor</i>	LCMV	Lymphozyten Choriomeningitis Virus
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>	LMP	<i>low molecular mass protein</i>
ELISPOT	<i>enzyme-linked immunospot</i>	LPS	Lipopolysaccharid
EPO	Erythropoetin	MACS	magnetischen Zellseparation
ER	Endoplasmatisches Retikulum	MAGE	Melanom-assoziiertes Antigen
ERAD	<i>ER-associated degradation</i>	MART-1	<i>melanoma antigen recognized by T cells 1</i>
ERAP	ER-Amino-peptidase	MDSC	Myeloide Suppressorzellen
ERp57	<i>ER-resident protein 57</i>	Mecl-1	<i>multicatalytic endopeptidase complex like 1</i>
EtBr	Ethidiumbromid		

MeOH	Methanol	RT	reverse Transkriptase
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex	RW	<i>reward</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure	S. cerevisiae	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
MPN	Mpr1-Pad1 N-terminale	SD	Standardabweichung
MS	Massenspektrometrie	SDS	Natriumdodecylsulfat
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid	SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
MyoD	<i>myoblast determination protein 1</i>	siRNA	<i>small interfering RNA</i>
NEB	New England Biolabs	SNAAP	<i>small neutral amino acid preferring</i>
NEDD8	<i>neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8</i>	SP	Standardproteasom
NEM	N-Ethylmaleimid	SSC	<i>side scatter</i>
NFκB	<i>nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B-cells</i>	St	β-Faltblatt
NP40	Nonoxinol	SUMO	<i>small Ub-like modifier</i>
NY-ESO-1	<i>New York esophageal squamous cell carcinoma-1</i>	TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
OptiMEM	<i>Opti-Minimal essential medium</i>	TCR	T-Zell Rezeptor
ORF	<i>open reading frame</i>	TEMED	Tetramethylethyldiamin
P/S	Penicillin/Streptomycin	TEV	<i>tobacco etch virus</i>
PA	Proteasomaktivator	TMB	3,3',5,5' Tetramethylbenzidin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung	TNF	Tumornekrosefaktor
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes	TPPII	Tripeptidylpeptidase II
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion	Tr	Trypsin-ähnlich
PE	Phycoerythrin	TRAF6	<i>TNF receptor associated factor 6</i>
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein Komplex	TRP2	<i>tyrosinase related protein 2</i>
PFA	Paraformaldehyd	Ub	Ubiquitin
PGPH	<i>peptidylglutamyl-peptide hydrolyzing</i>	UBA	<i>UBL modifier activating enzyme</i>
PHA	Phytohämagglutinin	UBC	Ub-konjugierende
PHD	Pleckstrin-homologe Domäne	UBD	Ub-bindende Domäne
POMP	<i>proteasome maturation protein</i>	UBL	<i>Ub-like</i>
PP_i	Pyrophosphat	UBP	Ub-bindendes Protein
Pru	<i>pleckstrin-like receptor for Ub binding</i>	UCHL5	Ub C-terminale Hydrolase L5
PVDF	Polyvinylidenfluorid	UE	Untereinheit
PWO	<i>Pyrococcus woesei</i>	UFD	<i>Ub fold domain</i>
RING	<i>really interesting new gene</i>	UIM	Ub-interagierendes-Motiv
RP	Regulatorproteinkomplex	UPR	<i>unfolded protein response</i>
RPMI	RPMI 1640 Medium	UPS	Ub-Proteasom-System
Rpn	<i>regulatory particle non-ATPase</i>	USP14	Ub-spezifische Protease 14
Rpt	<i>regulatory particle AAA⁺ ATPase</i>	VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
		vHL	von-Hippel-Lindau
		WB	Western Blot
		WEHI	WEHI-164 Klon 3
		WT	Wildtyp

Aminosäuren werden nach dem Buchstabencode (Großbuchstaben) der IUPAC/IUB Vereinbarung (1969) abgekürzt.

Abstrakt

Lysin-verknüpfte K48-Polyubiquitinketten gelten als kanonisches Signal, das Proteine für den Abbau durch 26S Proteasomen markiert. Obwohl der überwiegende Teil der per MHC Klasse I präsentierten Epitope proteasomal generiert werden, ist nur wenig über den Einfluss von Ubiquitinakzeptorstellen und -verknüpfungen eines Substrates auf die MHC Klasse I Antigenprozessierung bekannt. In diesem Zusammenhang stellt das *cancer/testis* Antigen NY-ESO-1, das nur ein einziges Lysin (K124) enthält, ein ideales Modellantigen zur Untersuchung Ubiquitin-abhängiger Antigenpräsentation dar. Durch die Substitution des Lysin 124 mit Arginin entstand ein Lysin-freies NY-ESO-1 (NY-ESO-1^{K0}), das überraschenderweise sogar stärker als das Wildtypprotein polyubiquitiniert wurde. Dennoch blieb die Präsentation des HLA-A*0201 restringierten NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ Epitops, die für beide Proteinvarianten durch die katalytisch-aktiven Untereinheiten $\beta 2$ und $\beta 1$ des 20S Standardproteasoms sichergestellt und von den Ub-Rezeptoren Rpn10 und Rpn13 des 19S Regulators vermittelt wurde, davon unbeeinträchtigt. Die daraufhin durchgeführte qualitative Analyse der Ubiquitinierungsprofile demonstrierte für NY-ESO-1^{K0} einen Verlust von K48-Poly-Ub-Ketten sowie einer kompensatorisch gesteigerten Verknüpfung mit alternativen Ketten (K11, K29, K33) auf alternativen Akzeptorstellen (C, S und T). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass ein Fehlen des kanonischen Abbausignals in NY-ESO-1 durch Synthese atypischer Formen der Polyubiquitinierung kompensiert und die MHC Klasse I Antigenpräsentation aufrecht erhalten werden kann.

Abstract

Lysine-linked K48-polyubiquitin-chains are considered as the canonical signal marking proteins for degradation via 26S proteasomes. Although the generation of the majority of the MHC class I presented epitopes depends on proteasomal activity, little is known regarding the role of ubiquitin-linkages and -acceptor sites of a given substrate in antigen processing. Addressing this issue, the cancer/testis antigen NY-ESO-1 provides an ideal target to study ubiquitin-dependent antigen presentation, because of its single lysine residue K124. Unexpected, the introduction of a K124R substitution in NY-ESO-1 did not lead to an abrogation but to an increase of polyubiquitination. Nevertheless the wildtype and the lysine-free protein were equal in their ability to simulate monoclonal CD8⁺ T-cells specific for the HLA-A2*0201 restricted NY-ESO-1_{157–165} epitope, whose generation was driven by the $\beta 2$ and $\beta 1$ catalytic subunits of the 20S standard proteasome and regulated by the activity of the major ubiquitin receptors Rpn10 and Rpn13 of the 19S regulatory particle. A profound analysis of the polyubiquitination profile exhibited a loss of K48 poly-Ub-chains in NY-ESO-1^{K0} accompanied by an increase in the assembly of alternative chains (K11, K29, K33) on alternative acceptor sites (C, S and T). These data clearly demonstrate, that the absence of the canonical degradation signal in NY-ESO-1 can be compensated by the generation of atypical forms of ubiquitination, ensuring the sufficient generation of MHC class I presented epitopes.

1 Einleitung

1.1 Einführung in das Immunsystem von Säugetieren

Das Immunsystem von Säugetieren stellt ein komplexes Netzwerk aus zellulären und humoralen Bestandteilen dar, das dem Körper zum Schutz vor pathogenen Erregern (Bakterien, Viren und Parasiten), Verletzungen, Fremdkörpern oder malignen Erkrankungen dient. Es gliedert sich in einen angeborenen und einen adaptiven (erworbenen) Anteil. Die Komponenten der angeborenen Immunantwort (Neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten, natürliche Killerzellen, Akut-Phase-Proteine, Komplement- und Gerinnungssystem) bilden die erste Linie der Verteidigung. Sie sind durch konservierte Rezeptoren, Erkennungsstrukturen und Mechanismen in der Lage die Entzündung zu begrenzen sowie Zellen des adaptiven Immunsystems, wie dendritische Zellen (DCs), T-Zellen, B-Zellen, zur Ausbildung einer hochspezifischen Immunantwort anzulocken und zu stimulieren. Im Rahmen einer viralen Infektion werden unter anderem naive CD (*cluster of differentiation*) 8^+ T-Zellen durch professionell Antigenpräsentierende Zellen (APZ), wie DCs, Makrophagen oder B-Zellen geprägt (*Priming*), um anschließend virusinfizierte Zellen zu eliminieren. Ein wesentliches Merkmal der adaptiven Immunantwort stellt vor diesem Hintergrund die Fähigkeit zur Unterscheidung zwischen selbst und nicht-selbst dar. Zu diesem Zweck ist das T-Zellsystem mit einem sehr vielfältigen Repertoire an T-Zell Rezeptoren (TCRs) ausgestattet ($>10^{18}$), die erkrankte Zellen durch einen Komplex aus einem antigenen Peptid (Epitop) und einem Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) Klasse I Molekül erkennen (1).

1.2 Die MHC-Klasse I Antigenpräsentation

MHC Klasse I gebundene Epitope sind Peptide mit einer Länge von in der Regel 8-11 Aminosäuren (AS) und werden durch die Kreuz- oder die direkte Präsentation generiert. Die Kreuzpräsentation beinhaltet die proteasomal abhängige Prozessierung und Präsentation exogen aufgenommener Antigene durch APZ im Rahmen des *Priming* naiver CD 8^+ T-Zellen (1). Der direkte Weg (Abbildung 1) stellt die Epitopgenerierung aus endogen gebildeten Proteinen oder Polypeptiden (auch körpereigenen) dar, die kontinuierlich von fast allen Körperzellen patrouillierenden CD 8^+ T-Effektorzellen präsentiert werden (2). Der überwiegende Anteil, der auf diese Weise generierten Epitope ist von der Aktivität des Proteasoms abhängig (3), das sowohl lineare als auch zusammengesetzte (*spliced*) Epitope bildet (4). Während circa zwei Drittel der proteasomal generierten Peptide zu klein für die Epitopbindungstasche eines MHC Klasse I Moleküls sind, eignen sich lediglich 15% (Okta-, Nona- oder Decapeptide) direkt für die Präsentation (5). Die verbleibenden 15% sind N-terminal verlängert (6) und bedürfen einer zusätzlichen Prozessierung durch Ami-

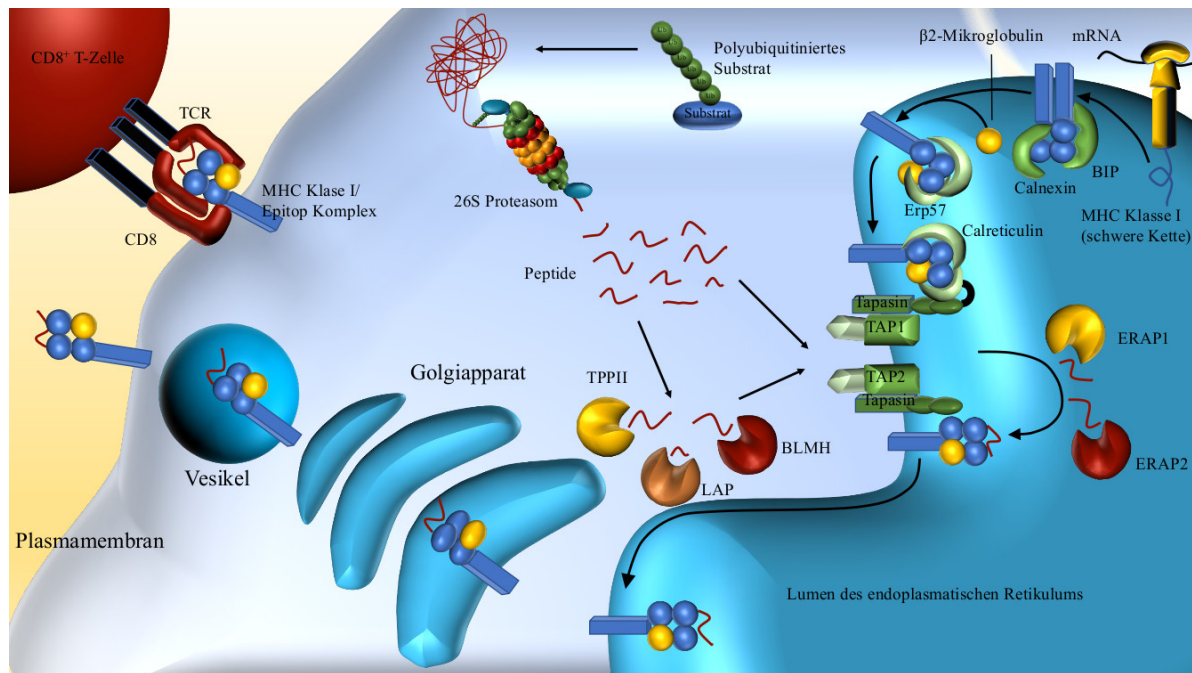


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Antigenprozessierung MHC Klasse I präsentierter Epitope (eigene Abbildung).

nopeptidasen des Cytosols, wie der Tripeptidylpeptidase II (TPPII), Leucinaminopeptidase (LAP) und Bleomycin Hydrolase (BLMH) sowie der ER (Endoplasmatisches Retikulum)-ständigen Aminopeptidasen ERAP 1 und 2 (2). Den ATP-abhängigen Transport ins Lumen des ER realisiert der TAP (*transporter associated with antigen processing*)-Transporter, bestehend aus TAP 1 und 2 (7). Von dort aus werden die Peptide durch den *peptide loading complex* (MHC Klasse I Molekül, TAP1/2, Tapasin, ERp57 (*ER-resident protein 57*), Calreticulin) auf ein neusynthetisiertes MHC Klasse I Molekül transferiert und gelangen über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche. Als Antigenquelle für MHC Klasse I präsentierte Epitope dienen sowohl reife Proteine (*Retirees*) als auch DRiPs (*defective ribosomal products*) in unterschiedlicher Quantität (8, 9). DRiPs sind fehlerhaft, unvollständig oder *out of frame* translatierte bzw. falsch gefaltete Polypeptide sowie solche, die aus mRNA nicht-kodierender Regionen gebildet werden. Sie wirken in hohen Konzentrationen toxisch auf die Zelle, weswegen sie rasch polyubiquitiniert und proteasomal abgebaut werden (10).

1.3 Das Proteasom

1.3.1 Funktion und Aufbau des Proteasoms

Die Lebensfähigkeit einer Zelle ist in hohem Maße von der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen Proteinsynthese und -abbau (Proteostase) abhängig. Aus diesem Grund ist es essentiell, falsch gefaltete, oxidierte, gealterte oder nicht mehr benötigte Proteine möglichst zügig zu eliminieren. Das wichtigste nicht-lysosomale, ATP-abhängige Fragmentationssystem intrazellulärer

Proteine ist das Ub-Proteasom-System (UPS) mit der Fähigkeit Proteine zu markieren und effizient abzubauen (Kapitel 1.4) (11).

Das Proteasom ist ein multikatalytischer Proteinkomplex, der evolutionär hochgradig konserviert ist und in allen drei Domänen des Lebens (Bakterien, Archaeen und Eukaryoten) nachgewiesen werden konnte (12). Seine Konzentration kann in Mammaliazellen je nach Gewebeart bis zu 1% der gesamten Zellproteine betragen (13). Es besteht aus einem zylinderartig geformten 20S Kernkomplex, an den ein- oder beidseitig unterschiedliche Regulatorproteinkomplexe (RP), wie der Proteasomaktivator (PA)700 (19S RP), PA28 $\alpha\beta$, PA28 γ , PA200, ECM29 (*proteasome-associated protein ECM29 homologue*) oder der Proteasominhibitor 31 binden können (12, 13). Dadurch bilden sich verschiedenartige proteasomale Komplexe (Kapitel 1.3.3), die im Cytosol, Zellkern und in Assoziation mit dem ER lokalisiert sind (13).

1.3.2 Das 20S Proteasom

Der zylinderförmige 20S Kernkomplex des Proteasoms misst circa 15nm in Länge und 11nm im Durchmesser (14). Er setzt sich aus vier Ringen á sieben Untereinheit (UE) von 21-30kDa zusammen, woraus sich eine Gesamtgröße von circa 700kDa ergibt (15). Die beiden äußeren und inneren Ringe eukaryotischer 20S Proteasomen bestehen aus sieben anti-parallel angeordneten α - ($\alpha1$ - $\alpha7$) bzw. β -UE ($\beta1$ - $\beta7$), woraus sich die stöchiometrische Komposition $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$

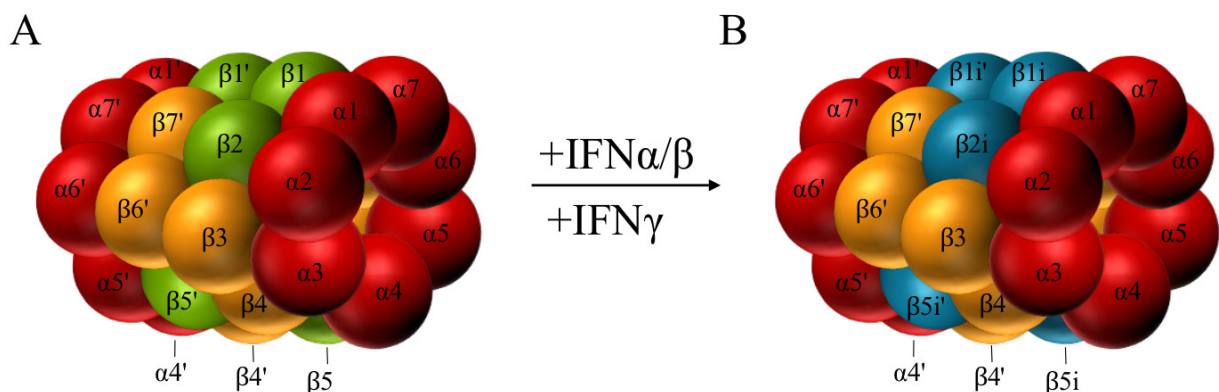


Abbildung 2: Modell des **A** 20S Standard- und **B** Immunoproteasoms (eigene Abbildung, angelehnt an (16)).

ergibt (Abbildung 2). Durch diese Konformation werden drei Kavitäten gebildet, zwei Vorkammern zwischen je einem α - und einem β -Ring und eine innere, zentrale Kammer zwischen den beiden β -Ringern (14).

Die Kristallstrukturanalyse des 20S Proteasoms von *Thermoplasma acidophilum* zeigte eine zentrale Pore im α -Ring mit einem Durchmesser von 13Å, die im Ruhezustand sowohl in Archaeobakterien, als auch in Hefe- und Mammaliazellen versiegelt ist und den Substrateintritt verhindert

(17, 18, 19). Die Substitution des Asparat 9 der α 3-UE durch Alanin resultierte in einer Konformationsänderung der N-terminalen Polypeptidketten der α -UE, die den Eintritt des Substrats ermöglicht (17, 20, 21). Diesen Vorgang bezeichnet man als Porenöffnung (*Gate-Opening*) (Kapitel 1.3.3) und wird *in vivo* unter anderem durch die Bindung eines RP erreicht (21).

α - und β -Ringe bilden gemeinsam zwei 50Å breite Vorkammern, in denen das Substrat nach Passieren der zentralen Pore des α -Rings, durch Interaktion mit den α -UE in einem entfaltenen Zustand stabilisiert wird, bevor es die 22Å große Öffnung des β -Rings passiert und in die zentrale Kavität (Durchmesser ca. 53Å) des 20S Proteasoms gelangt (17, 22). Zwischen β - und α -Ringen existieren 10Å breite Öffnungen, die den entstandenen Peptiden einen Austritt aus dem 20S Proteasom ermöglichen könnten (18).

Das Standardproteasom

Die innere Kavität zwischen den beiden β -Ringen beinhaltet die katalytischen Zentren. In Eukaryoten weisen lediglich β 1, β 2 und β 5 ein N-terminales Threonin auf, das während der Assemblierung des 20S Proteasoms durch Autoproteolyse freigelegt wird (18, 19, 21, 23). Während der hydrolytischen Spaltung einer Peptidbindung dient die γ -ständige OH-Gruppe als Elektronendonator und vollzieht den nukleophilen Angriff (24). Das Proteasom zählt damit zu den N-terminal nukleophilen Hydrolasen und war die erste Threoninprotease, die entdeckt wurde.

Der Einsatz von fluorogenen Substraten charakterisierte drei katalytisch distinkte Aktivitäten des eukaryotischen 20S Proteasoms, die sich in ihrer Präferenz für den N-terminal der Schnittstelle gelegenen Aminosäurerest unterscheiden: *peptidylglutamyl-peptide hydrolyzing* (PGPH) saure AS, Trypsin-ähnlich (Tr) basische AS und Chymotrypsin-ähnlich (ChT) hydrophobe AS (25, 26). Von einigen Autoren (24, 36) wurden zusätzlich die Fähigkeiten Peptidbindungen nach AS mit verzweigten Seitenketten, *branched chain amino acid preferring* (BrAAP) und kleinen, neutralen AS, *small neutral amino acid preferring* (SNAAP) zu spalten, beschrieben. Mit Hilfe von Röntgenstruktur- und Mutationsanalysen sowie dem Einsatz spezifischer Inhibitoren wurde den einzelnen UE die jeweilige Aktivität (β 1→PGPH, β 2→Tr und β 5→ChT) zugeordnet (Tabelle 1) (18, 19, 23). Allerdings ist diese Charakterisierung nicht restriktiv, da das Proteasom nach fast allen AS proteolytisch aktiv ist (24, 27).

Die Erkenntnisse über die Struktur der aktiven Zentren führte zur Entwicklung zahlreicher Inhibitoren der proteasomalen Aktivität, die nicht-kovalent oder kovalent im katalytischen Zentrum binden können. In der Regel ist die Hemmung durch nicht-kovalente Inhibitoren reversibel, während die von kovalenten mit einigen Ausnahmen zumeist irreversibel ist (28). Kovalente Inhibitoren lassen sich anhand ihrer chemischen Struktur unterteilen und umfassen unter anderem Peptidalde-

Untereinheit	Gen (Homo Sapiens)	Katalytische Aktivität
$\beta 1$ (δ , Y)	PSMB6	PGPH/Caspase-ähnlich (Cas), BrAAP
$\beta 1i$ (LMP2)	PSMB9	ChT
$\beta 2$ (Z)	PSMB7	Tr
$\beta 2i$ (Mecl-1)	PSMB10	Tr
$\beta 5$ (X)	PSMB5	ChT, BrAAP, SNAAP
$\beta 5i$ (LMP7)	PSMB8	ChT, BrAAP

Tabelle 1: Katalytische Aktivitäten der Standard- und Immununtereinheiten

hyde (z. B. MG132), α' β' -Epoxyketone (z. B. Epoxomycin, YU-102, PR-893), Boronate (z. B. Bortezomib) und β -Lactone/Lactacystin. Peptidaldehyde inhibieren schon bei sehr geringen Konzentrationen (10^{-9} M), unter Bildung eines Hemiacetals mit der γ -OH-Gruppe des N-terminalen Threonins, reversibel die ChT Aktivität des Proteasoms sowie die von Cathepsinen und Calpainen. Peptid- α' β' -Epoxyketone hingegen sind irreversible Inhibitoren, die mit der γ -OH- und α -NH₂-Gruppe des N-terminalen Threonins einen Morpholinring bilden. Aufgrund dieses katalytischen Mechanismus sind Epoxyketone sehr spezifisch für das Proteasom, da die katalytischen Zentren von Cystein- und Serinproteasen keine α -NH₂-Gruppe enthalten. Die Kenntnisse über die Kristallstrukturen der einzelnen Substratbindungskanäle ermöglichte daraufhin die Synthese UE-spezifischer Epoxyketone.

Das Immunoproteasom

Mammaliazellen können, unter anderem durch Stimulation mit Interferon (IFN) Typ-I (IFN α/β) oder Typ-II (IFN γ), z. B. im Rahmen einer Entzündungsreaktion, zur Expression von drei zusätzlichen, katalytischen UE, $\beta 1i$ bzw. LMP2 (*low molecular mass protein 2*), $\beta 2i$ bzw. Mecl-1 (*multicatalytic endopeptidase complex like 1*) und $\beta 5i$ bzw. LMP7, angeregt werden (29, 30). Diese Immuno-UE werden während der de-novo Synthese des Proteasoms anstelle von $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ bevorzugt eingebaut, wodurch es zur Bildung des Immunoproteasom (IP) kommt. In spezifischen Zellen des Immunsystems wie DCs, T- und B-Lymphozyten (31, 12, 32), lässt sich sogar eine konstitutive Expression an IP nachweisen. Ob IP verglichen mit Standardproteasomen (SP) vermehrt in der Lage sind polyubiquitinierte, geschädigte und oxidierte Substrate schneller abzubauen (33) oder nicht (34), ist noch nicht abschließend geklärt.

Katalytische Aktivitäten Die Änderung des Phänotyps vom SP zum IP geht mit einer deutlich reduzierten PGPH-Aktivität einher (35, 36, 37, 38). Obwohl dem IP im Vergleich zum SP häufig eine erhöhte ChT und Tr Aktivität zugesprochen wurde (27, 35, 38, 39), existieren in der Literatur keine einheitlichen Ergebnisse, die dies belegen (37, 36, 40). Zudem sind Studien, in denen IFN γ zur Induktion von IP verwendet wurde (27, 37, 38), kritisch zu betrachten, da der IFN γ -induzierbare PA28 den Umsatz kleiner fluorogener Peptide durch einen verbesserten Substratein- bzw. -austritt

modifiziert (41). Außerdem wurde für das TRP2 (*tyrosinase related protein 2*) gezeigt, dass die Präsentation des TRP2_{360–368} Epitops vollständig von der Aktivität des PA28 abhängt, der die Generierung des korrekten N-Terminus des antigenen Peptids vermittelt (42). Daraus wird ersichtlich, dass trotz häufiger Nutzung fluorogener Peptidsubstrate zur Messung proteasomaler Aktivitäten, deren Ergebnisse nicht zwangsläufig die Hydrolyserate gegenüber natürlich auftretenden Oligo- oder Polypeptiden widerspiegeln (35). Aus diesem Grund liefern sie keine zuverlässigen Aussagen über die Fähigkeiten von SP und IP zur Generierung MHC Klasse I präsentierter Epitope.

Epitopgenerierung Das Proteasom determiniert in der Generierung MHC Klasse I präsentierter Epitope vorwiegend die Bildung des korrekten C-Terminus, während der N-terminale Schnitt deutlich unpräziser ist. Aus diesem Grund erzeugt das Proteasom mehrheitlich N-terminal verlängerter Vorläuferpeptide (2, 6). Obwohl dem IP im Vergleich zum SP nicht eindeutig erhöhte ChT und Tr Aktivitäten nachgewiesen werden konnten, wird dem IP die Fähigkeit zugesprochen, dass es effizienter Peptide mit hydrophoben und basischen Ankeraminosäuren am C-Terminus bildet, die stabiler mit der Bindungstasche von MHC-Klasse I Molekülen assoziieren (43). In dieser Hinsicht fällt LMP7 eine besondere Rolle zu, da in $\beta 5i^{-/-}$ -Mäusen die Gesamtkonzentration an MHC-Klasse I Molekülen um 50% reduziert ist (44), was für LMP2^{-/-}- oder Mecl-1^{-/-}-Mäuse nicht zutrifft (45, 46). Allerdings ist es epitopabhängig, ob dessen Bildung durch die Anwesenheit des IP verbessert (4, 47), reduziert (48, 49) oder nicht beeinflusst wird (42, 45).

In diesem Zusammenhang postulierten Tenzer et al., dass die Generierung bestimmter Peptide lediglich einer Proteasomsubpopulation vorbehalten ist (50). Im Gegensatz dazu wiesen Mishto et al. mittels Massenspektrometrie (MS) und QME (*quantification with minimal effort*) nach, dass sich SP und IP nicht in der Qualität, sondern lediglich in der Quantität der Peptidgenerierung unterscheiden (51). IP kommen bevorzugt in reifen DCs vor (31) und ihre Expression kann in Tumorzellen zytokinvermittelt induziert werden (29, 30). Daher ist es für die Aktivierung CD8⁺ T-Zellen im Rahmen des *Priming* und der Erkennung entarteter Zellen aber mitunter essentiell, dass das jeweilige Epitop effizient durch das IP generiert wird, weil dies direkten Einfluss auf die Etablierung einer adaptiven Immunantwort *in vivo* nehmen kann. Zum Beispiel verringerte sich im Rahmen einer Influenza A Virus (IAV) Infektion in LMP2^{-/-}-, Mecl-1^{-/-}- und Mecl-1^{-/-}/LMP7^{-/-}-Mäusen die Immunogenität des dominanten PA_{224–233} Epitops sowie die Aktivierung PA_{224–233}-spezifischer T-Zellen, aufgrund einer verminderten Präsentation durch APZ (52). Im Gegensatz dazu erhöhte sich die des subdominanten Epitops (PB1F2_{62–70}) bei erhaltener Präsentation in allen drei Fällen. Allerdings entscheidet für die Ausbildung einer effizienten CD8⁺ T-Zellantwort nicht allein die Tatsache, ob ein Epitop überhaupt, sondern ob eine genügende Menge pro Zeit-

einheit gebildet wird. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass $Mecl^{-/-}/LMP7^{-/-}$ -Mäuse keine suffiziente $CD8^{+}$ T-Zellantwort auf das IP-abhängige E1B_{192–200} Epitop (*Listeria* Monozytogenes) entwickelten, obwohl sich APZ von KO- und Wildtypmäusen nicht im *steady state*-Level antigener Peptide der Oberfläche unterschieden, wohl aber in der Kinetik der Epitopgenerierung (53).

Darüber hinaus spielt für die Immunogenität eines Epitops auch ein intaktes T-Zell Repertoire eine Rolle, das durch die Anwesenheit der IP-UE entscheidend mitbestimmt wird. So war die Generierung des zweiten dominanten IAV Epitops (NP_{366–374}) zwar in allen drei oben genannten KO-Modellen unverändert, seine Immunogenität hatte allerdings nur in $Mecl-1^{-/-}$ und $Mecl-1^{-/-}/LMP7^{-/-}$ -Mäusen Bestand (52). $LMP2^{-/-}$ -Mäuse dagegen wiesen ein so stark defizientes NP_{366–374}- und PA_{224–233}-spezifisches T-Zell-Repertoire auf, dass sich die gesamte Immunodominanzhierarchie zu Gunsten des subdominanten Epitops (PB1F2_{62–70}) verschob. Dass solche Veränderungen allerdings IP-UE- und virusspezifisch sind, zeigte sich in Lymphozyten Chorio-meningitis Virus (LCMV) infizierten $LMP2^{-/-}$ - bzw. $LMP7^{-/-}$ -Mäusen, die keinerlei derartige Veränderungen aufwiesen (54), $Mecl-1^{-/-}$ -Mäuse hingegen schon (46).

Ferner scheinen auch strukturelle Veränderungen, die mit dem Einbau der einzelnen Immuno-UE einhergehen, Einfluss auf die Schnittpräferenz zu nehmen. Sowohl Wildtyp-, als auch katalytisch inaktives LMP7 (T1A-Substitution) begünstigen die Generierung des Hepatitis B *core* Antigen (HBcAg)_{141–151} Epitops, für dessen Bildung die Anwesenheit aller drei IP-UE essentiell ist (47).

Intermediärproteasomen

Der Einbau der IP-UE findet in der *de-novo* Synthese des 20S Proteasoms nicht vollständig statt (55). Da LMP7 aufgrund seiner höheren Affinität zu POMP (*proteasome maturation protein*) gegenüber $\beta 5$ bevorzugt eingebaut wird (15), kann es zur Synthese sogenannter Intermediärproteasomen (IntP) kommen (56). In einem natürlichen Umfeld wurden bislang nur die Kombinationen $\beta 1$ - $\beta 2$ -LMP7 (LMP7) und $LMP2$ - $\beta 2$ -LMP7 (LMP2/7) identifiziert (12, 57). Diese Entdeckung bestätigt Untersuchungen, die gezeigt haben, dass für die effiziente Prozessierung von Pro-LMP2 und Pro-Mecl-1, die Anwesenheit des Propeptids von LMP7 (58) und für die Inkorporation von Mecl-1 die Anwesenheit von LMP2 erforderlich ist (58, 59).

Die ChT und Tr Aktivität der beiden natürlich vorkommenden IntP (LMP7 und LMP2/7) gleicht in etwa denen des IP, wohingegen die PGPH-Aktivität von LMP2/7- der des IP und von LMP7-IntP der des SP entspricht (57). In Bezug auf die Generierung antigener Peptide zeigte sich, dass exklusiv LMP2/7-IntP das MAGE (*Melanom-assoziiertes Antigen*)-A10_{254–262} Epitop generieren (57). Die Bildung des MAGE-A3_{271–279} Epitops hingegen wird lediglich durch LMP7-IntP und in ge-

ringem Maße auch durch SP, aber nicht durch LMP2/7-IntP- oder IP realisiert. Interessanterweise wurden Zellen, die ausschließlich SP enthielten, im Gegensatz zu Zellen, die ausschließlich LMP7-IntP enthielten, nicht durch MAGEA3₂₇₁₋₂₇₉ spezifische CD8⁺ T-Zellen erkannt. Die Analyse der Immunogenität von 38 IAV Epitopen in LMP2^{-/-}, Mecl-1^{-/-} bzw. Mecl-1^{-/-}/LMP7^{-/-}-Mäusen demonstrierte zudem, dass IntP die Diversität viraler Epitope vergrößern und entscheidenden Einfluss auf das T-Zell-Repertoire nehmen (60), da sie einen Großteil der Proteasomsubpopulationen in reifen DCs darstellen (57).

Unter der Vorstellung, dass bei der Proteasombiogenese 15S präproteasomale Halbkomplexe (α_{1-7} β_{1-7}) gebildet werden, die anschließend dimerisieren (15), wiesen Klare et al. in IFN γ -stimulierten HeLa-Zellen die Existenz asymmetrischer IntP nach, die unter diesen Bedingungen den überwiegenden Teil der 20S Proteasomsubpopulationen darstellten (55). Sie postulierten, dass unter Respektierung der Assemblierungsregeln für die Proteasom-UE, 14 bzw. 8 IntP-Subpopulationen vorstellbar wären, deren Einfluss auf die Antigenpräsentation bislang noch ungeklärt ist.

1.3.3 Das 26S Proteasom und der 19S Regulator

Der 20S Kernkomplex kann als funktionelles Enzym allein vorliegen oder an einem bzw. beiden α -Ringen einen zusätzlichen RP (19S RP, PA28, PA200, ECM29 oder Proteasominhibitor 31) binden. Aus den stochastisch möglichen Kombinationen der verschiedenen Zusammensetzungen seien lediglich die wichtigsten genannt, zu denen das 26S- (19S RP-20S), das 30S- (19S RP-20S-19S RP), das PA28- (PA28-20S-PA28) oder Hybridproteasomen (PA28-20S-19S RP, PA200-20S-19S RP) gehören (12, 13). Zur Vereinfachung wird im folgenden der Begriff 26S Proteasom sowohl für 19S RP-20S, als auch für 19S RP-20S-19S RP Komplexe verwendet (Abbildung 3).

Das 26S Proteasom ist in der Lage polyubiquitinierte Proteine ATP-abhängig abzubauen (61), während dem 20S Proteasom eine wichtige Rolle im Abbau oxidierter Proteine zufällt, für den Ubiquitin (Ub) und ATP nach aktuellem Erkenntnisstand nicht erforderlich sind (62). Der Prozess, an dessen Ende die Proteolyse des Substrates durch die katalytisch, aktiven β -UE steht, erfordert die Abfolge der einzelnen Schritte: 1. Bindung des ubiquitinierten Substrates, 2. seine Deubiquitinierung, 3. *Gate-opening* des α -Rings, 4. Entfaltung und 5. Translokation des Substratproteins. Der 19S RP vereinigt alle genannten Fähigkeiten in einem 19 UE umfassenden 700kDa großen Proteinkomplex. Er setzt sich aus sechs AAA⁺-ATPasen (*ATPases associated with diverse activities*), die in Eukaryoten Rpt (*regulatory particle triple-A ATPases*) 1-6 genannt werden und 13 nicht-ATPasen (Rpn (*regulatory particle non-ATPases*) 1-3 und 5-13 sowie Sem1 in Hefen) zusammen. Die Struktur des 19S RP erlaubt eine Gliederung in Deckel (*Lid*) und Basis (*Base*) (63). Der *Lid* ist aus Rpn3-9 und Rpn11-12 aufgebaut, während die *Base* aus Rpn1, 2, 10 und 13 sowie Rpt1-

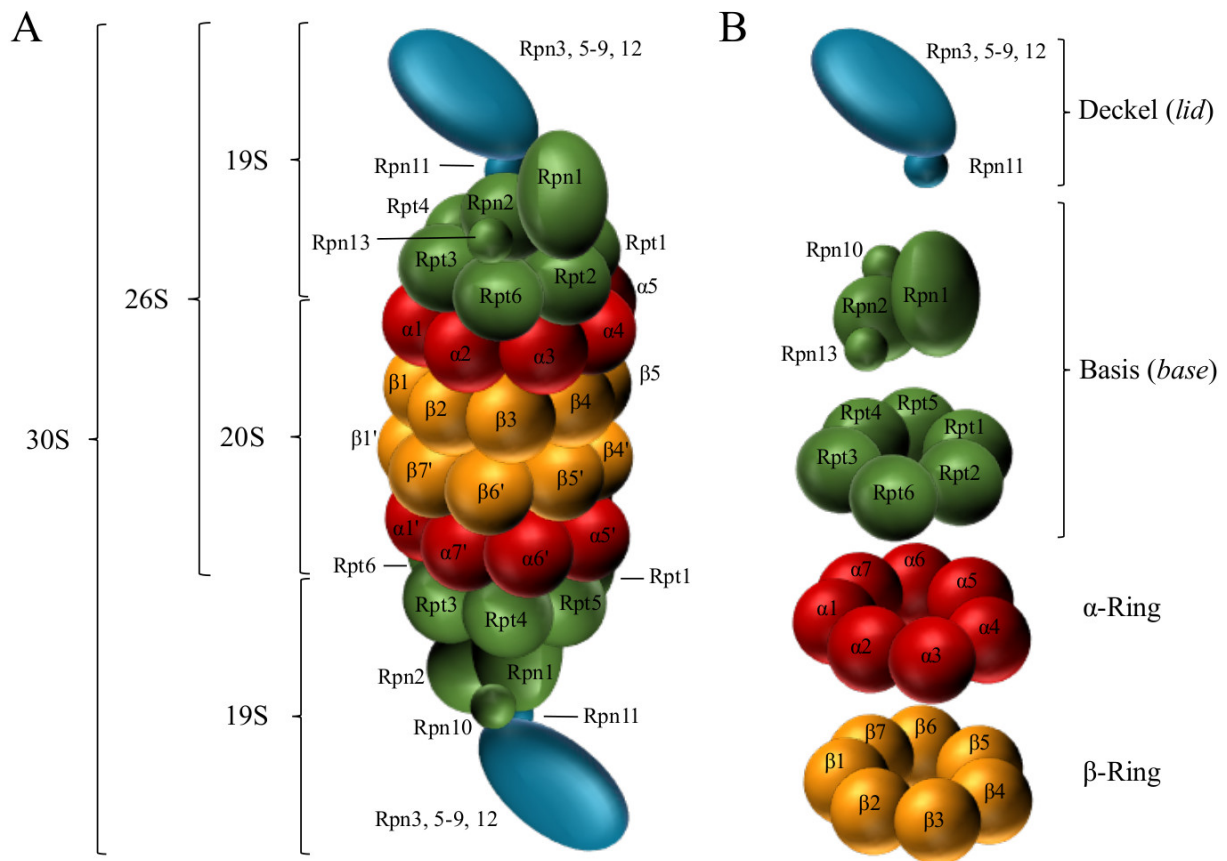


Abbildung 3: Das 26S Proteasom (eigene Abbildung). **A** Darstellung eines 30S Proteasoms bestehend aus einem 20S Kernprotein und zwei 19S RP. **B:** Schematische Darstellung eines halben 30S Proteasoms, unterteilt in 20S, bestehend aus einem α - und β -Ring sowie einem 19S RP bestehend aus Basis und Deckel.

6 besteht. *Lid* und *Base* kommunizieren über verschiedene UE, unter anderem Rpt3 mit Rpn5 und Rpn6, die *coiled-coil* Domäne von Rpt3/Rpt6 mit Rpn8 sowie die Mpr1-Pad1 N-terminale (MPN)-Domäne von Rpn11 mit Rpn2 (63, 64).

Gate-Opening

Sowohl *Lid*, als auch *Base* assoziieren über die jeweils subkomplexeigenen UE mit dem 20S Proteasom. Im Falle des *Lid* bilden Rpn5 und Rpn6 fingerförmige Domänen aus, die mit den C-Termini von $\alpha 1$ und $\alpha 2$ interagieren. Die AAA^+ -ATPasen der *Base* formen einen heterohexameren Ring (Rpt1-2-6-3-4-5), der sich nach ATP-Bindung auf den heteroheptameren α -Ring des 20S Kernkomplexes lagert (65, 66). In diesem Zuge interagieren Rpt2, Rpt3 und Rpt5 mittels eines konservierten HbYX-Motives (Hb=hydrophobe AS, X=beliebige AS) am C-Terminus in Taschen zwischen zwei α -Untereinheiten ($\alpha 3/\alpha 4$, $\alpha 1/\alpha 2$, $\alpha 5/\alpha 6$) des 20S Kernproteins (63, 67). In *Thermoplasma acidophilum* konnte mittels Kryoelektronenmikroskopie gezeigt werden, dass dieser Kontakt eine Konformationsänderung auslöst infolgedessen die Pore des α -Rings freigeben (*Gate-opening*) und der Eintritt entfalteter Substrate in das 20S Proteasom ermöglicht wird (68).

Translokation und Entfaltung

Im Gegensatz zum *Gate-opening* ist für die Translokation und Entfaltung des Substrates durch den 19S RP, die Hydrolyse von ATP notwendig. Aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen an 26S Proteasomen in *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) und *Mammalia* wurde ein Modell entworfen, in dem sich hydrophobe Schleifen der Rpt-UE ringförmig in einer Wendeltreppe über dem α -Ring anordnen, mit Rpt2 in der höchsten und Rpt3 in der niedrigsten Position (63, 69). Die einzelnen Positionen spiegeln demnach distinkte energetische Zustände wider, die im Zuge der ATP-Bindung und -Hydrolyse einzeln durchlaufen werden. Die chemische Energie wird auf diese Weise in mechanische umgesetzt, was eine Konformationsänderung in den Rpt-UE auslöst, durch die das Substrat in die Pore des α -Rings transloziert und entfaltet wird.

Die N-terminalen Domänen der Rpt-UE bilden oberhalb der AAA^+ -ATPase-Domänen einen zusätzlichen N-Ring, aus dem drei Paare an *coiled-coil* Helices (Rpt1/2, Rpt3/6 und Rpt4/5) herausragen. Matyskiela et al. entwickelten diese Modellvorstellung weiter, indem sie zeigen konnten, dass durch Substratbindung der N-Ring um 16\AA verschoben und um 13° gekippt wird, während sich gleichzeitig die Wendeltreppenstruktur zu Gunsten eines planen Rings mit zentraler Pore auflöst (64). Infolgedessen kommt diese Pore in einer Linie mit der des N-Rings und des gesamten Zentralkanals des 20S Proteasoms zu liegen. Durch ATP-Hydrolyse und Interaktion der kleinen mit der großen AAA^+ -ATPase-Domäne der jeweils benachbarten Rpt-UE entsteht eine vorwärtstreibende Kraft, die das Substrat in den zentralen Kanal transloziert und währenddessen entfaltet.

Deubiquitinierung

Die Drehung des N-Rings setzt sich über die Rpt3-Rpt6 *coiled-coil* Helix auf Rpn2 fort und löst eine 25° Rotation des gesamten *Lid* aus (64). Diese Konformationsänderung schiebt das aktive Zentrum von Rpn11 exakt über die Pore des N-Rings und legt es frei. Genau in diesem Moment ist das ubiquitinierte Substrat zwischen N-Ring und Pore des α -Rings (13\AA) gebunden. Eine Fortführung der Translokation mit anschließendem Abbau kann, unter Betrachtung der Länge eines Ub (circa 30\AA), nur dann vollzogen werden, wenn die Ub-Moleküle restlos vom Substrat gelöst sind. Rpn11 ist eine MPN-Domäne tragende Zn^{2+} -Metalloprotease und spaltet die Isopeptidbindung zwischen dem proximalen Ub und der ϵ - NH_2 -Gruppe des substrateigenen Lysins ohne eine bestimmte Verknüpfungsart zu favorisieren (70). Sie ist die einzige UE des 19S RP, für die gezeigt wurde, dass sie die Deubiquitinierung polyubiquitinerter Substrate vermittelt, wodurch sie essentiell für das Überleben von Hefezellen ist (71).

Ubiquitinbindung

Bislang wurden circa 20 Ub-bindende Domänen (UBD) identifiziert, die in über hundert verschiedenen Ub-bindenden Proteinen (UBP) bzw. Ub-Rezeptoren vertreten sind. Ub-Rezeptoren des UPS können in intrinsische, die integraler Bestandteil des 19S RP sind (Rpn10, Rpn13) und extrinsische, wie hHR23 (*human homologue of Rad23*) A/B oder Ubiquilin-2, die als Vermittler zwischen Substrat und 26S Proteasom ihre Wirkung entfalten, gegliedert werden (63, 72).

Rpn10 beinhaltet eine N-terminal gelegene von-Willebrand-Faktor A Domäne, die im wesentlichen für die Assoziation mit Rpn9 und Rpn11 verantwortlich ist. Die Bindung von Ub bzw. *Ub-like* (UBL)-Proteinen, wie FAT10 (*HLA-F adjacent transcript 10*), SUMO (*small Ub-like modifier*) oder ISG15 (*interferon-stimulate gene 15*), entweder als Bestandteil des 19S RP (63) oder als freie UE (73), wird durch ein (*S. cerevisiae*) bzw. zwei (Mammalia) flexible Ub-interagierende Motive (UIMs) vermittelt. Von diesen beiden weist UIM-2 eine höhere Affinität zu Ub/UBL-Proteinen (werden im Weiteren vereinfacht Ub genannt) auf (73). In einem Ub-Dimer liegt die Bindungsstelle für Rpn10 in der Interaktionszone der beiden Ub-Moleküle (*Ub/Ub-Interface*) verborgen und wird erst durch Bindung an UIM-2 freigelegt (74). Dabei interagiert UIM-1 mit dem distalen und UIM-2 mit dem proximalen Ub. Rpn10 als vollständiges Protein favorisiert die Bindung von Ub-Ketten mit mehr als vier Ub-Molekülen (Tetra-Ub), wobei die Verknüpfungsart der Ub-Moleküle keinen Einfluss auf die Affinität der Bindung zu haben scheint (75, 76).

Rpn13 bindet Ub über eine Pleckstrin-homologe Domäne (PHD), genannt *pleckstrin-like receptor for Ub binding* (Pru) (77). Pru ist gleichzeitig für die Assoziation mit Rpn2 zuständig und in freiem Rpn13 unzugänglich, wodurch die Bindung von Ub verhindert wird (78). Die Gesamtbindungsfläche mit Ub ist besonders groß (1256\AA^2) und bietet neben der Tatsache, dass Rpn13 in einer Di-Ub-Kette speziell mit dem proximalen Ub-Molekül interagiert, die Erklärung, warum Rpn13 Mono- mit gleicher Avidität wie Di- und Tetra-Ub erkennt (77). Bezüglich der Art der Verknüpfung wurde bislang lediglich die Bindung von K48-Ketten an Rpn13 gezeigt.

Im substratungebundenen Zustand liegen die UIMs von Rpn10 und Rpn13 circa 70-80Å vom aktiven Zentrum der Deubiquitinase (DUB) Rpn11 entfernt, was in etwa der Länge von drei K48-verknüpften Ub-Molekülen entspricht. Da Rpn10 und Rpn13 vor allem mit AS des *Ub/Ub-Interface* interagieren, wäre eine Tetra-Ub-Kette vonnöten, um die Länge zwischen Rpn10/13 und Rpn11 zu überbrücken, was mit Beobachtungen übereinstimmt, die eine Tetra-Ub-Kette als Mindestabbausignal charakterisiert haben (79). Allerdings existieren Beispiele, für die Ketten von weniger als vier Ub-Molekülen ein suffizientes Abbausignal darstellen (80), deren Erkennung durch extrinsische Ub-Rezeptoren vermittelt werden kann.

Anders als in *S. cerevisiae*, ist die Anwesenheit von Rpn10 und Rpn13 in Säugetieren essentiell. Der genetische Verlust eines der beiden Rezeptoren wirkt in Mäusen bereits in der Embryonal- (Rpn10) bzw. erst in der Neonatalperiode (Rpn13) letal (81, 82). Das Fehlen eines der beiden Proteine führte in Maushepatozyten zu einer milden, der Verlust beider Proteine zu einer starken Akkumulation polyubiquitinerter Substrate mit Aktivierung der UPR (*unfolded protein response*). Desweiteren legt eine Untersuchung nahe, dass in 30S Proteasomen Rpn13, im Gegensatz zu Rpn10, lediglich in einem der beiden 19S RP enthalten ist (83). Zusammen betrachtet suggerieren diese Daten, dass Rpn10 und Rpn13 zum Teil verschiedene Rollen ausfüllen. Dabei kann der Verlust des einen eventuell nur teilweise durch die Funktion des anderen kompensiert werden.

1.4 Das Ubiquitin-System

Die Ubiquitinierung stellt einen streng regulierten ATP-abhängigen Prozess posttranslationaler Modifikation dar, in dem ein bzw. mehrere Ub-Moleküle durch das Zusammenspiel spezifischer Enzyme kovalent mit dem Zielprotein verbunden werden (84). Sie ermöglicht eine Vielzahl an Protein-Interaktionen und spielt, außer in der Markierung von Proteinen zum Abbau durch das 26S Proteasom (11), in zahlreichen weiteren biologischen Prozessen, wie der Regulation der Endozytose, des Zellzyklus, von DNA-Reparaturmechanismen oder der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren eine große Rolle (85, 86, 87). Eine Fehlfunktion einzelner Komponenten des UPS spiegelt sich unter anderem im Auftreten von genetisch bedingten Erkrankungen wider (88). Beim von-Hippel-Lindau (vHL)-Syndrom z. B. führt eine Mutation des vHL-Proteins, einer Ub-Protein-Ligase (E3-Ligase), zum verminderten Abbau des Transkriptionsfaktors Hypoxie-induzierter Faktor (HIF)-1 α , wodurch verstärkt angiogene Faktoren wie *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und Erythropoetin (EPO) sezerniert werden. In der Folge kommt es zum vermehrten Auftreten retinozerebellärer Angiome oder Nierenzellkarzinome.

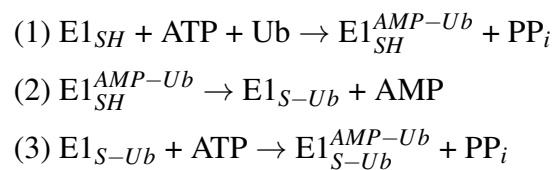
1.4.1 Ubiquitin

Ubiquitin ist ein 76AS langes Protein und wird in humanen Zellen von vier Genen codiert, die gleichermaßen zur Gesamtmenge an Ub in der Zelle beitragen (89). Es besitzt eine Größe von 8,5kDa und wurde im Cytosol, Nukleus und auf der Zelloberfläche von allen Zellen der drei Domänen des Lebens entdeckt (89). Die Struktur des Ub bildet sich aus einer 3,5 fachen α -Helix, einem fünfsträngigen β -Faltblatt mit zwei parallelen (β -Faltblatt (St)1, St5) und drei antiparallelen Strängen (St2, St3, St4). Es enthält zwei hydrophobe Bereiche, L8/I44/V70 und I36/L71/L73, die durch UBD-Proteine, DUBs und Ub-Ligasen erkannt und gebunden werden können (90). Zur Bildung einer Poly-Ub-Kette stehen die ϵ -NH₂-Gruppen der sieben Lysine (K6, -11, -27, -29, -33,

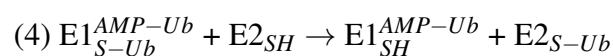
-48, -63) und die α -NH₂-Gruppe des N-terminalen Methionins zur Verfügung (87).

1.4.2 Die Synthese von Ubiquitinketten

Ubiquitin wird in einer ATP-abhängigen Kaskade durch die Kooperation von drei Enzymen mit dem Zielprotein verknüpft (Abbildung 4). Der erste Schritt wird durch ein Ub-aktivierendes Enzym (E1-Enzym) katalysiert (91), von denen in eukaryotischen Zellen acht identifiziert wurden (89). Allerdings vermitteln lediglich zwei, UBA (*UBL modifier activating enzyme*) 1 und UBA6, die Aktivierung von Ub, während die restlichen sechs in die Aktivierung von UBL-Proteinen eingebunden sind. Humanes UBA1 und UBA6 sind strukturell sehr ähnliche Proteine, die ATP binden und es zu AMP und Pyrophosphat (PP_i) hydrolysieren (92). In diesem Zuge wird Ub über seine C-terminale COOH-Gruppe zunächst als hochenergetisches Intermediat E1^{AMP-Ub} (Ub-Adenylat) gebunden (Reaktion 1) und im nächsten Schritt (Reaktion 2) auf die SH-Gruppe des Cysteins im zweiten aktiven Zentrums des E1-Enzyms übertragen (91, 93). Auf diese Weise wird die durch ATP-Spaltung entstandene Energie in einer Thioesterbindung (S-Ub) gespeichert. Gleichzeitig erfolgt die Rekrutierung und Hydrolyse eines zweiten ATP-Moleküls, um ein weiteres Ub als Adenylat zu binden (Reaktion 3).



Anschließend wird das per Thioester gebundene Ub in einer Trans-Thiol-Esterifikation auf ein Cystein im aktiven Zentrum eines Ub-konjugierenden Enzyms (E2-Enzym) übertragen, von dem in humanen Zellen circa 35 Varianten bekannt sind (84, 89):



Dessen aktives Zentrum liegt in einer Ub-konjugierenden (UBC)-Domäne, die eine Länge von 150-200AS umspannt. Eine darin enthaltene E2-individuelle α -Helix (Hel1) definiert in Kombination mit der *Ub fold domain* (UFD) von UBA1 bzw. UBA6, die E1-E2-Interaktion (94). Allerdings stellt die UBC-Domäne auch die Bindungsstelle für die E3-Ligase dar (95), weswegen vor Etablierung der E2-E3-Interaktion die Dissoziation des E1- vom E2-Enzym notwendig ist (96). Die E3-Ligase rekrutiert das Substrat und bildet mit dem E2-Enzym einen Proteinkomplex, der den Transfer von Ub auf die Akzeptorstelle des Zielproteins oder des vorangegangenen Ub-Moleküls katalysiert (84).

Die mehr als 600 bekannten E3-Ligasen können in zwei große Familien eingeteilt werden, die in ihrer Struktur durch die Existenz von entweder einer RING (*really interesting new gene*)-Finger-

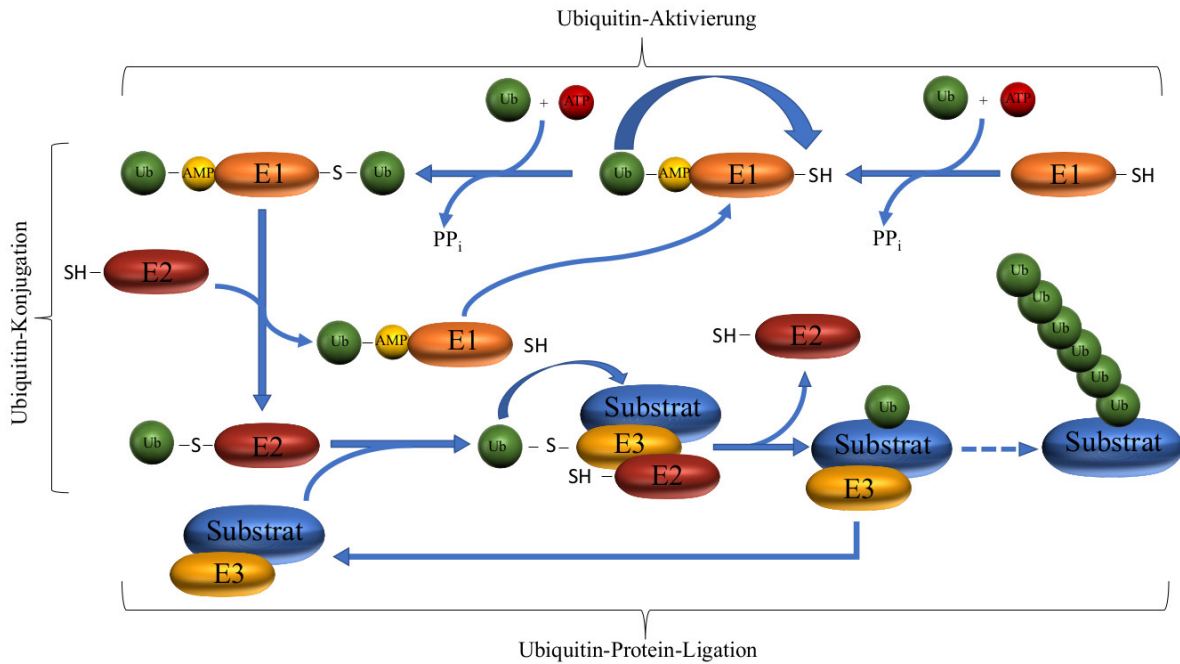
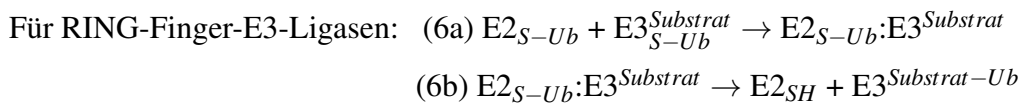
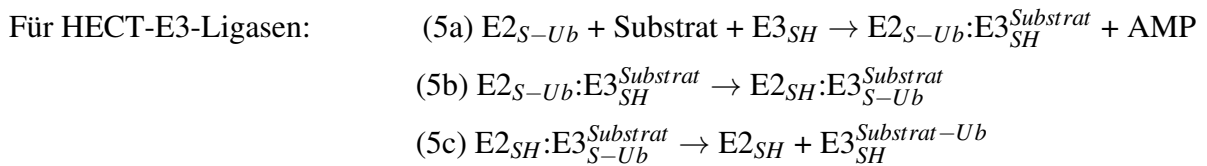


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Synthese einer Poly-Ub-Kette durch das Zusammenwirken von E1-Enzym, E2-Enzym und E3-Ligase (eigene Abbildung).

oder einer HECT (*homologous to the E6-associated protein carboxyl terminus*)-Domäne gekennzeichnet sind (97). Der maßgebliche Unterschied liegt im Mechanismus des Ub-Transfers auf das Zielprotein. HECT-E3-Ligasen enthalten ein zusätzliches aktives Zentrum mit einem Cystein und binden Ub in einem Zwischenschritt kovalent über einen Thioester (Reaktionen 5a-5c). RING-FINGER-E3-Ligasen dagegen übertragen Ub direkt auf das Substrat (Reaktionen 6a-6b), z. B. unter Bildung einer Isopeptidbindung mit der ϵ -NH₂-Gruppe eines Lysins (84, 97).



Zur Synthese einer Poly-Ub-Kette wird der beschriebene Zyklus, gegebenenfalls unter Einbeziehung eines E4-Enzyms, mehrfach wiederholt. Die folgenden Ub-Moleküle werden in analoger Weise über ihre C-terminalen COOH-Gruppen an eine der acht Ub-Akzeptorstellen des vorangehenden Ub gebunden (97). Während die Ub-Akzeptorstelle des Substrates von der jeweiligen E3-Ligase abhängt, wird die Art der Ub-Ketten durch das E3- und das E2-Enzym determiniert.

1.4.3 Kanonische Ubiquitinierung

Von den zahlreichen Kombinationen aus Ub-Akzeptorstellen und Ub-Verknüpfungen, stellt eine homogene Poly-Ub-Kette von mindestens vier Ub-Molekülen, das wichtigste Signal zur Markierung von Proteinen für den Abbau durch das 26S Proteasom dar (79, 87, 98). In einer derartigen Verknüpfung ist das erste Ub über eine Isopeptidbindung mit der ϵ -NH₂-Gruppe eines Lysins des Substrates und jedes weitere mit der ϵ -NH₂-Gruppe von K48 im jeweils proximalen Ub verankert. Sie wird auch als kanonische Ubiquitinierung bezeichnet. Massenspektrometrische Analysen identifizierten K48-Ketten als die häufigste Modifikation (52,8%) in HEK293-Zellen (99). In HeLa-Zellen wurden dagegen gleichmäßige Level an K6-, K11-, K27-, K29-, K48- und K63-Ketten assoziiert mit 26S Proteasomen gefunden (100). Weiterhin zeigten diese Untersuchungen, dass eine eingeschränkte Funktion von 26S Proteasomen nicht zu einer exklusiven Akkumulation von K48-Ketten führt, sondern andere Kettenformen (wie K6, K11 und K29) gleichermaßen oder sogar stärker betroffen sind (99, 100). Aus diesen Gründen ist es fraglich, ob Lysin-gebundene K48-Poly-Ub-Ketten als wichtigstes Signal für den Abbau durch 26S Proteasomen anzusehen sind.

1.4.4 Atypische (Nicht-kanonische) Ubiquitinierung

Vermutlich liegt die Ursache, dass gerade Lysine die präferierte Ub-Akzeptorstelle sind, in der Tatsache begründet, dass sie bevorzugt an der Oberfläche eines Proteins zu finden und daher für E3-Ligasen frei zugänglich sind (72). Allerdings ist Lysin nicht die ausschließliche Akzeptorstelle für die Polyubiquitinierung eines Substratproteins. Darüber hinaus dient nicht nur K48, sondern auch alle anderen Lysine und die N-terminale Aminogruppe des Ub-Moleküls zur Bildung von linearen oder verzweigten Poly-Ub-Ketten. Neben homogenen Poly-Ub-Ketten konnte zudem die Existenz von heterogenen Ketten aus Ub und UBL-Proteinen nachgewiesen werden. Als weiteres, variables Charakteristikum hat man gefunden, dass auch Ketten mit weniger als vier Ub-Molekülen ein suffizientes Signal proteasomalen Abbaus darstellen können (80). Bedenkt man darüber hinaus, dass mehrere solcher Modifikationen gleichzeitig auf einem Substrat vorhanden sein können, gibt es eine Vielzahl an Kombinationen, von denen bisher nur ein Bruchteil charakterisiert wurde.

Alternative Ubiquitinakzeptorstellen

Cadwell und Coscoy zeigten, dass eine Lysin-freie Form des cytosolischen Teils des HLA (Humanes Leukozytenantigen)-B7 Moleküls durch die E3-Ligase MIR1 des humanen Karposi-Sarkomavirus suffizient polyubiquitiniert und proteasomal abgebaut wurde (101). Da sich die Poly-Ub-Ketten mit β -Mercaptoethanol vom Protein lösen ließen, schlussfolgerten sie, dass diese über eine Thioesterbindung an SH-Gruppen von Cysteinen an HLA-B7 gebunden sein müssten.

Serin und Threonin, die Ub durch Bildung eines Carboxyesters binden, konnten als Akzeptorstellen unter anderem auf dem N-terminalen Teil von t-Bid nachgewiesen werden (102). Dessen proteasomale Fragmentation stellt die Freilassung des C-terminalen Teils von t-Bid sicher und induziert die Apoptose der Zelle.

Die Tatsache, dass *in vivo* N-terminal acetylierte Substrate nicht durch das UPS abgebaut werden, führte zur Entdeckung, dass die α -NH₂-Gruppe des Methionin 1 als Ub-Akzeptorstelle dienen kann. Ein Beispiel ist der Transkriptionsfaktor MyoD (*myoblast determination protein 1*), der nach N-terminaler Ubiquitinierung im Zellkern proteasomal abgebaut wird (103).

Alternative Ubiquitinverknüpfungen

Die posttranslationale Modifikation von Proteinen mit unterschiedlichen Ub-Ketten ist mit verschiedenen Funktionen in der Zelle assoziiert. K63-Ketten z. B. spielen eine sehr wichtige Rolle für den nicht-proteasomalen Abbau von Proteinen und bei intrazellulären Signalkaskaden (85, 86, 87). Der membranständige EGFR (*endothelial growth factor receptor*) z. B. wird über Lysine in seiner Kinasedomäne K63-polyubiquitiniert, was seine Internalisierung und lysosomalen Abbau vermittelt (85). Ein anderes Beispiel ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B (*nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B-cells*). Die Stimulation durch proinflammatorische Zytokine, wie Interleukin (IL)-1 β , aktiviert die E3-Ligase TRAF6 (*TNF receptor associated factor 6*), welche IKK γ (*inhibitor of NF κ B kinase γ*) und sich selbst K63-polyubiquitiniert. Dadurch wird eine Signalkaskade ausgelöst, die zur Freisetzung und Translokation des p65/p50 NF κ B-Komplexes in den Zellkern führt (86). K11-verknüpfte Poly-Ub-Ketten nehmen eine besondere Stellung beim Abbau ER-ständiger Membranproteine, auch *ER-associated degradation* (ERAD) genannt sowie in der Regulation des Zellzyklus ein (87). K27- und K29-Ketten können die Aggregation von geschädigten Proteinen in Lewy-Körperchen vermitteln, um Neurone vor Zellschädigung zu schützen (104). Darüber hinaus wurde *in vivo* neben K48 für alle Modifikationen bis auf K63 gezeigt, dass sie Substrate für den proteasomalen Abbau markieren (99, 105), wodurch sie potentiell Einfluss auf die Bildung MHC Klasse I präsentierter Epitope nehmen könnten.

1.4.5 Ubiquitinierung und MHC Klasse I Antigenpräsentation

Die Ubiquitinierung spielt eine große Rolle im Rahmen immunologischer Reaktionen, unter anderem bei der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren durch Stimulationen mit proinflammatorischen Zytokinen (86), der Reifung von DCs (31) oder der Generierung MHC Klasse I präsentierter Epitope (106). Obwohl jedoch bekannt ist, dass der Großteil der per MHC Klasse I präsentierten Epitope proteasomaler Aktivität unterliegt (3) und polyubiquitinierte Proteine die Hauptquelle der Substrate für das 26S Proteasom darstellen (11), existieren nur wenige Arbeiten, die den Zusam-

menhang zwischen Ubiquitinierung und der Generierung antigener Peptide untersucht haben.

Der Einfluss der deubiquitinierenden Fähigkeit des 26S Proteasoms wird durch den Einsatz von b-AP15, einem potenten Inhibitor der DUBs UCHL5 (Ub C-terminale Hydrolase L5) und USP14 (Ub-spezifische Protease 14), deutlich. Er ließ die Präsentation eines HLA-B35 restringierten Epitops des BZLF1-Proteins des Epstein-Barr-Virus (EBV) fast vollständig verschwinden (107). In Bezug auf die Ub-Bindungsfähigkeit wiesen zwei Untersuchungen für Rpn10 nach, dass für die Generierung und spätere Präsentation des linearen pp65₄₉₅₋₅₀₃ des humanen Cytomegalievirus (HCMV) und des *spliced* GP100 (Glycoprotein 100)_{47-52/40-42} Epitops vermittelt (4, 108).

Andere Untersuchungen konzentrierten sich auf die Synthese von Ub-Ketten. Die Inhibition der E1-Enzyme durch MLN7243 oder nicht-permissive Temperaturen in Zellen, die eine temperatur-sensitive E1-Mutante exprimierten, offenbarte mannigfaltige Effekte je nach Zelllinie, Antigen, Art der Applikation (Virusinfektion, natives oder denaturiertes Antigen), HLA-Molekül und untersuchtem Epitop (106, 109). Allerdings gestaltete sich deren Interpretation durch den starken Einfluss auf die zelluläre Homöostase besonders schwierig. Ähnlich markante Beeinflussung bewirkte der Einsatz einer Lysin-freien Ub-Mutante, durch den die Polyubiquitinierung der gesamten Zelle reduziert und die Präsentation eines ER-ständigen Antigens vermindert wurde, während die eines cytosolischen unverändert blieb (110). Der Einsatz von siRNA gegen Hrd1, einer wichtigen E3-Ligase beim Abbau ER-assoziiierter Proteine, stellte einen spezifischeren Ansatz dar und zeigte eine Reduktion der Präsentation von Epitopen ER-ständiger Proteine (110).

Ein wichtiger Punkt, der bisher nahezu unadressiert blieb, ist der Effekt der unterschiedlichen Ub-Akzeptorstellen und Ub-verknüpfungen auf die Präsentation MHC Klasse I restringierter Epitope. Die Methylierung von 99% aller Lysine in einer denaturierten Form des Ovalbumin reduzierte nach exogener Applikation signifikant die Präsentation eines H2-K^b restringierten Epitops, während eine 70-80% Methylierung der des unmethylierten Proteins glich (111). *In vivo* wurde gezeigt, dass neben K48- alle Poly-Ub-Ketten bis auf solche, die durch K63 gebildet werden, Substrate für den proteasomalen Abbau markieren können (99, 105). Dennoch konnte bislang nur K48-Poly-Ub-Ketten eine indirekte Rolle in der proteasomal abhängigen Präsentation des HLA-A*0201 (kurz HLA-A2) restringierten YVL-Epitops eines BZFL-YVL-GFP (grün fluoreszierendes Protein) Fusionsantigens zugeschrieben werden (107). Interessanterweise verminderte der Einsatz einer Ub-Mutante (Ub^{K48R}), die an Position 48 ein Arginin anstatt eines Lysins enthielt, nicht nur die Präsentation des Wildtyp (WT)-Proteins, sondern auch die einer Mutante, auf der keine Polyubiquitinierung mehr nachgewiesen werden konnte.

1.5 Das Tumorantigen NY-ESO-1

Immunogene Tumorantigene umfassen unter anderem Proteinprodukte mutierter Gene, veränderte Glykolipide/-proteine, virale, onkofetale und Differenzierungsantigene sowie abnormal exprimierte zelluläre Proteine (z. B. *Cancer/Testis* Antigene). NY-ESO-1 (*New York esophageal squamous cell carcinoma-1*) ist ein cytosolisches Protein mit unbekannter Funktion und gehört zu den *cancer/testis*-Antigenen. Diese besitzen den großen Vorteil, dass sie nur in malignen Zellen, nicht aber in gesundem Gewebe außer frühen Spermatogonien nachgewiesen wurden, die jedoch keine MHC Klasse I Moleküle auf der Oberfläche exprimieren und auf diese Weise vor CD8⁺ T-Effektorzellen geschützt sind (112). NY-ESO-1 ist zudem von besonderem medizinischen Interesse, da es in einer Reihe unterschiedlicher maligner Entitäten exprimiert wird, unter anderem in Synovialsarkomen, Ovarialkarzinomen, Melanomen und multiple Myelomen (113). Dabei korreliert seine Expression mit der Aggressivität der Malignome, was sich in einer schlechten Prognose widerspiegelt und die Notwendigkeit zur Entwicklung effizienter Therapieoptionen unterstreicht. Außer des 11mers MLMAQEALAF_L, das durch die Translation eines alternativen *open reading frame* (ORF) von NY-ESO-1 gebildet wird (114), ist das 157-165 Epitop (SLLMWITQC) das bis dato einzige beschriebene HLA-A2 gebundene Epitop das natürlicherweise von HLA-A2⁺ NY-ESO-1⁺ Tumorzellen gebildet wird (115). Allerdings existierten über dessen Prozessierungsweg bis zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit nur wenig Informationen. Chen et al. publizierten, dass die Präsentation des NY-ESO-1_{157–165} Epitops proteasomal unabhängig stattfindet (116), während Batchu et al. eine Stabilisierung des reifen Antigens nach proteasomaler Inhibition nachweisen konnten (117). Trotz Expression von NY-ESO-1 mRNA in medullären Thymusepithelzellen (118), lassen sich spezifische naive CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut gesunder HLA-A2⁺ Spender detektieren (113), wodurch deren TCRs wissenschaftlichen Fragestellungen und therapeutischen Maßnahmen prinzipiell zugänglich sind. Klinische Studien, die NY-ESO-1_{157–165} spezifische TCR-modifizierte T-Zellen zur adoptiven Zell-Therapie von HLA-A2⁺ Patienten mit NY-ESO-1 exprimierenden Malignomen verwendeten, zeigten vielversprechende Ergebnisse (119, 120). Dennoch profitierte ein Großteil der Patienten nicht von der Behandlung, wofür eine Vielzahl an Gründen in Frage kommen - unter anderem eine fehlerhafte Antigenprozessierung. Aus diesem Grund stellt die Entschlüsselung des direkten Weges der zur Generierung und Präsentation des NY-ESO-1_{157–165} Epitops durch MHC Klasse I Moleküle führt, die Basis für das Verständnis und die Entwicklung neuer Therapiekonzepte zur Behandlung maligner Erkrankungen dar.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

In Kapitel 1.4.5 wird deutlich, dass die Verknüpfung von Polyubiquitinierung und MHC Klasse I Antigenpräsentation bislang nur selten Gegenstand immunologischer Forschung war. Zudem ist nur unzureichend charakterisiert, welchen Einfluss die Verwendung unterschiedlicher Ub-Akzeptorstellen und Ub-Verknüpfungen eines gegebenen Substrates auf die Präsentation eines spezifischen MHC Klasse I gebundenen Epitops nimmt. Um diese Fragestellung konkreter zu untersuchen ohne die biochemischen Eigenschaften des Antigens substantiell zu verändern, wurde NY-ESO-1 als Modellantigen ausgewählt, das den besonderen Vorteil bietet, lediglich ein einziges Lysin an Position 124 (K124) im gesamten 22kDa großen Protein (180 AS) zu enthalten. Aus diesem Grund hat sich die vorliegende Arbeit zum Ziel gesetzt, folgende Fragen zu beantworten:

1. Welchen Stellenwert besitzt K124 in der Generierung des NY-ESO-1_{157–165} Epitops?
2. Ist die Präsentation im Kontext eines lysinhaltigen und eines lysinfreien NY-ESO-1-Proteins (NY-ESO-1^{K0}) als Antigenquelle proteasomal abhängig? Unterscheiden sich SP, IP und IntP in der Epitopgenerierung? Welche katalytischen UE fördern die Bildung des Epitops?
3. Wird die Generierung des NY-ESO-1_{157–165} Epitops aus NY-ESO-1 bzw. NY-ESO-1^{K0} durch die Aktivität des 26S Proteasoms vermittelt (Ub-Abhängigkeit)?
4. Wie unterscheiden sich das quantitative und qualitative Ubiquitinierungsprofil von NY-ESO-1 und NY-ESO-1^{K0}? Existieren alternative Ub-Akzeptorstellen außer K124? Welche Ub-Verknüpfungen lassen sich auf NY-ESO-1 und NY-ESO-1^{K0} nachweisen?
5. Welchen Einfluss nehmen Ub-Akzeptorstellen und Ub-Verknüpfungen auf die Antigenpräsentation von NY-ESO-1 und NY-ESO-1^{K0}?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Hersteller	Bezeichnung	Hersteller
Aceton	Merck	Acrylamid 4k (30%)	AppliChem
Actinomycin D	SigmaAldrich	Agar	AppliChem
Agarose	Serva	Bovines Serum Albumin (BSA)	AppliChem
Amidoschwarz 10B	Merck	Ammoniumchlorid	AppliChem
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva	Ampicillin	Roth
Bacto Trypton	AppliChem	β -Mercaptoethanol	Roth
Borsäure	Roth	Brefeldin A	SigmaAldrich
Bromphenolblau (BPB)	Roth	Calciumchlorid-Dihydrat	Merck
Dinatrium-Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Dihydrat	AppliChem	Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Roth
N,N-Dimethylformamid (DMF)	SigmaAldrich	Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem
1,4-Dithiotreitol (DTT)	Roth	Essigsäure (HAc)	Merck
Ethanol (70%, 100% vergällt)	Roth	Ethidiumbromid (EtBr)	Roth
Glycerol (1,2,3-Propantriol)	AppliChem	Glycin	AppliChem
Hefeextrakt	Oxoid LTD.	Hygromycin B (50mg/ml)	Roth
2-Propanol (99%)	Roth	Lithiumchlorid	Merck
Kaliumacetat (KAc)	Merck	Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhydroxid	Merck	Kanamycin	SERVA
Kupfer(II)-Sulfat	Merck	Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck	Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck
Magermilchpulver	AppliChem	Manganchlorid-Tetrahydrat	Ferak Berlin
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	SigmaAldrich	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	SigmaAldrich
Methanol (MeOH)	Merck	Natriumchlorid	AppliChem
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem	Natriumhydroxid	Roth
Nonoxinol (NP40)	AppliChem	Rubidiumchlorid	SigmaAldrich
Paraformaldehyd (PFA)	SigmaAldrich	Puromycindihydrochlorid	PAA
Phosphorsäure	Merck	Poly(hydroxethylmethacrylate)	SigmaAldrich
Salzsäure	Merck	Saponin	Roth
Trichloressigsäure	Roth	Tris	AppliChem
Tween 20	AppliChem	Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Biomol

Tabelle 2: Chemikalien

Alle pH-Werte der im Folgenden aufgelisteten Lösungen und Puffer wurden mit HCL (37, 32 oder 25 %-ig) bzw. 10 M NaOH oder KOH eingestellt.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Amidoschwarzfärbelösung	Amidoschwarz10B 1,62 μ M, HAc 1,75 M, MeOH 388,44 M
Blot-Puffer	Glycin 1 M, MeOH 4,9 M, SDS 21 mM, Tris 0,125 M
DNA-Probenpuffer	BPB 2,9 mM, EDTA 0,5 M, Glycerol 6,84 M, TBE
enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-Blockpuffer	Fetales Kälberserum (FCS) (10%), Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

Bezeichnung	Zusammensetzung
ELISA-Waschpuffer	PBS, Tween 20 0,45 mM
Fixierungspuffer	PBS, PFA 0,67 M
SDS-Probenpuffer	BPB 7,2 mM, DTT 50 mM, Glycerol 1,37 M, Tris 62,5 mM
LB-Medium	Bacto Trypton 1%, Hefeextrakt 0,5%, NaCl 0,1 M
Lysepuffer	MgCl ₂ 10 mM, NaCl 50 mM, NP40 0,53 mM, Tris 50 mM
WEHI-Puffer	DMF 4,3 M, SDS 0,7 M, pH 4,7
MACS Puffer	BSA 0,115 mM, EDTA 2 M, PBS, steril filtriert (0,45 μm)
PBS	NaCl 0,14 M, Na ₂ HPO ₄ 65 mM, KCl 2,7 mM, KH ₂ PO ₄ 1,15 mM, pH 7,4
Permeabilisierungspuffer	BSA 1,15 mM, PBS, Saponin 0,1%
SDS-Gelelektrophoresepuffer	Glycin 0,2 M, SDS 3,5 mM, Tris 25 mM
TST	NaCl 0,15 M, Tris 30 mM, Tween20 0,9 mM
TBE	Borsäure 90 mM, EDTA 2 mM, Tris 90 mM
Tfb1	KAc 30 mM, RbCl 0,1 M, CaCl ₂ 10 mM, MnCl ₂ 50 mM, Glycerol 15%, pH 5,8, steril filtriert (0,45 μm)
Tfb2	MOPS 0,01 M, CaCl ₂ , RbCl 0,01 M, Glycerol 15%, steril filtriert (0,45 μm)

Tabelle 3: Lösungen und Puffer

2.1.2 Peptide

Das 9-mer Peptid SLLMWITQC (NY-ESO-1_{157–165}) wurde von der Peptidsynthese-Core-Facility des Charité Crossover durch eine Standard-Fmoc (N-(9-fluorenyl)methoxycarbonyl) Methode (0,1 mM) mit Hilfe eines automatischen Syntheseapparates (*Applied Biosystems 433A automated synthesiser*) hergestellt und per Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gereinigt, lyophilisiert und in DMF gelöst ($c=10 \frac{mg}{ml}$). 7-Aminoactinomycin (7-AAD) ist ein organisches Peptid und wurde von der Firma BD erworben.

2.1.3 Antikörper

Monoklonale Maus-Antikörper (AK), gerichtet gegen die folgenden humanen Proteine, wurden im Western Blot (WB) eingesetzt: $\alpha 6$ (MCP20), $\beta 1$ (MCP421), $\beta 2$ (MCP165), Rpn10 (S5a-18) und Ub (FK2) von Enzo Life Science, β -Actin (C4), Cathepsin D (sc-6486), c-Myc (9E10), LMP7 (A-12), NY-ESO-1 (E978) und Rpn13 (Q31) von Santa Cruz Technologies, $\beta 5$ (Ab3330) und LMP2 (Ab3328) von Abcam, GFP (JL-8) von TaKaRa Clontech, HA.11 (16B12) von Covance und LC3B (2775) von Cell Signaling Technology. Der polyklonale Ziegen-AK gegen Mecl-1 (PA5-19146) wurde von der Firma Thermo Scientific erworben. Polyklonale, sekundäre Kaninchen anti-Maus- und Ziege anti-Kaninchen-AK von Calbiochem sowie Esel anti-Ziege-AK von Sigma waren mit einer Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt.

Zur durchflusszytometrischen Detektion von Zellen wurden die monoklonalen Maus-AK gegen humanes CD8 (HIT8a), CD40 (5C3), CD83 (HB15e), CD86 (2331) und HLA-DR (G46-6), die mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) sowie gegen CD11c (B-ly6), CD80 (L307.4), CXCR4 (12G5), HLA-ABC (DX17) und IFN γ (4S.B3), die mit Phycoerythrin (PE) markiert waren, von BD Phar-

mingen eingesetzt. Der PE-gekoppelte, monoklonale AK gegen humanes CCR7-AK (DX17, BD) wurde in Ratten generiert.

Zur magnetischen Zellseparation (MACS) dienen *micro-beads* (mit magnetischen Kügelchen gekoppelte AK) gegen CD8 und CD14, zur Immunopräzipitation (IPräz) gegen c-Myc von Miltenyi Biotec.

2.1.4 Zytokine

Humaner Granulozyten-Monozyten-Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF), IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12 und Tumornekrosefaktor (TNF)- α (Miltenyi Biotec) sowie Phytohämagglutinin (PHA) (SigmaAldrich) wurden zur Generierung monoklonaler CD8⁺ T-Effektorzellen verwendet. Humanes IFN γ stammte von der Firma BD und Lipopolysaccharid (LPS) von Sigma.

2.1.5 Inhibitoren

Die Proteasominhibitoren MG-132 und Epoxomycin wurden von Calbiochem sowie PR893 von der Firma Onyx Pharmaceuticals Inc. erworben. YU-102 war ein freundliches Geschenk von Dr. Kyung-Bo Kim (Department of Pharmaceutical Sciences, University of Kentucky, Lexington, KY). Der DUB-Inhibitor N-Ethylmaleimid (NEM) stammte von SigmaAldrich.

2.1.6 Enzyme

Die Restriktionsenzyme KpnI, XhoI, Hind-III und DpnI wurden bei Thermo Scientific, AcTEV (*tobacco etch virus*)-Protease bei Invitrogen und T4-DNA-Ligase bei New England Biolabs (NEB) erworben.

2.1.7 siRNA

ON-TARGET-plus SMARTpool Kontroll-siRNA (*small interfering RNA*) sowie siRNA gegen LMP2, LMP7, Rpn10 bzw. Rpn13 stammten von der Firma Dharmacon.

2.1.8 Plasmide, Primer und Oligonukleotide

Der Vektor pcDNA3.1 Myc/HIS Version B (Invitrogen, kurz pcDNA3.1 Myc/HIS) wurde zur Klonierung der NY-ESO-1 Konstrukte verwendet. Die Generierung des pcDNA3.1 MART-1 (*melanoma antigen recognized by T cells 1*)-Myc/HIS (kurz MART-1), des pcDNA3.1 HLA-A2 sowie des pEGFP-N3 (BD Clontech) HA-Ub^{Wt}-GFP Konstruktes wurde an anderer Stelle beschrieben (108, 121). Andrea Lehmann (Institut für Biochemie, Charité) generierte die HA-Ub^{KxR/Kx-only}-GFP Konstrukte, in denen alle, 6/7 oder 1/7 Lysine durch Arginin substituiert wurden (Ebstein et al., unpublizierte Daten).

Die aufgelisteten Primer bzw. Oligonukleotide wurden eigenständig entworfen und anschließend durch die Firma Biotez synthetisiert. Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind als solche gekenn-

zeichnet und die Sequenzen in 5' zu 3' Richtung angeben:

- Kpn1-NY-ESO-1 *forward* (FW): aaaggtaccatgcaggccgaaggccgggg
- NY-ESO-1-Xho *reward* (RW): tttctcgagttgctcctctgccctgaggag
- pcDNA3.1 NY-ESO-1-Myc/HIS K192R FW: ggcccgcggttcgaacaaagactcatctcaga
- pcDNA3.1 NY-ESO-1-Myc/HIS K192R RW: tctgagatgagtctttgttcgaaccgcgggcc
- pcDNA3.1 NY-ESO-1-Myc/HIS K124R FW: tgccaggggtgcttctgagggagttcactg
- pcDNA3.1 NY-ESO-1-Myc/HIS K124R RW: cagtgaactccctcagaagcaccctggca
- pcDNA3.1 V5/Tev-NY-ESO-1-Myc/HIS M20V FW: ggccgcggtaccgtgcaggccgaag
- pcDNA3.1 V5/Tev-NY-ESO-1-Myc/HIS M20V RW: cttcggcctgcacggtaccgcgggc
- HindIII-Short V5/TEV-KpnI in pcDNA3.1 NY-ESO-1-Myc/HIS *sense*: P-agcttatgattccgaa cccgctgctgggcctggatgagaacctgtacttccaaggaggtac
- HindIII-Short V5/TEV-KpnI in pcDNA3.1 NY-ESO-1-Myc/HIS *antisense*: P-ctccttggaagt acaggttctcatccaggcccagcagcgggttcggaatcata
- Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase (GAPDH) FW: cagacaccatggggaaggtg
- GAPDH RW: cagcagtgagggtctctctc

2.1.9 Laborzubehör und Geräte

Bezeichnung	Hersteller	Bezeichnung	Hersteller
100Bp DNA-Marker	NEB	1 kBp DNA-Marker	ThermoScientific
8-Kanalpipette 200 μ l	Peqlab	10 und 15-Well Kamm	TGC
<i>Avanti J-E Centrifuge</i>	Beckmann Coulter	Analysewaagen	Sartorius
Blotkammer	Peqlab	Blotpapier	VWR
Bechergläser	Simax	<i>Centrifuge 5417 R</i>	Eppendorf
<i>Countess</i>	Invitrogen	<i>Cryo Freezing Container</i>	Nalgene
Elektrophoresekammer	Biorad	ELISA-Platten	Greiner
Erlenmeyerkolben	Schott, Duran	FACS Calibur	BD
<i>Gammacell40E (GC40E)</i>	MDS Nordion	<i>Gastight 1700 50 μl</i>	SigmaAldrich
Glasflaschen	Schott, Duran	Glaspipetten	VWR
Glasplatten 100x75 mm	TGC	<i>HERA Cell 240</i>	Thermo Electron
Inkubatorschüttler <i>Certomat IS 2</i>	B.Braun Biotech Int.	Konische Röhre	FALCON
<i>MACS Multi Stand</i>	Miltenyi Biotec	Magnetrührgeräte: <i>MR 2002, MR 3001K</i>	Heidolph
Messbecher	VITLAB	Messzylinder	VITLAB
<i>Nanodrop, NanoVuePlus</i>	GE	<i>Octo MACS Separator</i>	Miltenyi Biotec
pH-Meter 8F93	inoLab	Pipetten	Abimed
Pipettenspitzen	Sarstedt	<i>Pipetus</i>	Hirschmann
Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran	EMD Milipore	Reagenzglas 130x15mm	Schott Duran
Reagiergefäße	Sarstedt	Röntgenfilme	Carestream
Rührfische	VITLAB	<i>Rotanta 460R</i>	SigmaAldrich

Bezeichnung	Hersteller	Bezeichnung	Hersteller
Schalen (20x20x6,5cm)	Gerda	Sicherheitswerkbank	Holten
Stickstoffbehälter	KGW Isotherm	<i>Spacer</i> (10x8x0,1cm)	TGC
Spectrophotometer	Amersham Bioscience	Spectrophotometer	Synergy
Stromversorgungsgerät <i>EPS 1001</i>	Amersham Bioscience	<i>Structurmix Dryer</i>	GE
Thermocycler T1	Biometra	Thermomix Comfort	Eppendorf
Trichter	Schott Duran	Vortex-2 Genie	Scientific Industries

Tabelle 4: Laborzubehör und Geräte

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Zellkulturmaterialien, -medien und -additive

Folgende Materialien wurden in der Zellkultur verwendet: Abdeckplatte für 96-Well Platte (9mm), Kryogefäß 2ml, Zellkulturflaschen (50, 250 und 550ml, kurz Flaschen), Zellkulturplatten (6-, 24- und 96-Well F/U-Boden, kurz Platten), Zellkulturschalen (6, 10 und 15cm, kurz Schalen) und Pipettenspitzen (1ml, 200 μ l, 2 μ l) von Greiner Bio-one, Serologische Pipetten (25, 10 und 5ml), Sterile Filter (*Filtropur BT50 Bottle Top Filter*, d=0,45 μ m, 500ml) und *Tissue Culture Coverslips 13mm* von Sarsted sowie Countess Zellzählkammer (Invitrogen), Neubauer Zellzählkammer (Optik Labor), Pasteurpipetten (Schott, Duran) und Pipetten (1ml-200 μ l, 200 μ l-20 μ l, 20 μ l-2 μ l, 2 μ l-0,5 μ l, Abimed).

Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM), Iscove Basal (IBM) und RPMI 1640 (RPMI) Medium (Biochrom) wurden 9% FCS (Biochrom), 1% Penicillin/Streptomycin (P/S, PAA) und 1% L-Glutamin (L-Q, PAA) zugesetzt. CTL (Cytotoxische T-Lymphozyten)-Medium enthielt 9% Humanes AB-Serum „Off the clot“ (Biochrom) anstatt FCS und wurde steril filtriert (d=0,45 μ m). 33/2-Medium ist IBM mit Puromycin (c=2 $\frac{\mu$ g}{ml}) und Hygromycin (c=300 $\frac{\mu$ g}{ml}). Weitere Substanzen umfassen *Opti-Minimal essential medium* (OptiMEM, Gibco), Biocoll und Trypanblau (Biochrom).

2.2.1.2 Zelllinien

HeLa-Zellen sind adhärenente Cervixkarzinomzellen, PSG33- mit HLA-A2 und 33/2-Zellen mit HLA-A2, LMP2, Mecl-1 sowie LMP7 stabil transfizierte HeLa-Zellen (108, 122). Beide wurden auf 10cm Schalen oder 6-Well Platten in IBM, IBM mit Puromycin (2 $\frac{\mu$ g}{ml}) bzw. 33/2-Medium kultiviert. HT1080-Zellen (humane Fibrosarkomzellen), wurden auf 10cm Schalen in DMEM, WEHI-164 Klon 3 (WEHI)-Zellen (murine Fibrosarkomzellen) (123) und BLCLs (*B-lymphoblastoid cell line*) (124) in 250ml Flaschen mit RPMI kultiviert.

2.2.1.3 Arbeit mit Zellen

Die Arbeit mit Zellen fand unter der Sicherheitswerkbank (*MaxiSafe2010*, Holten) unter sterilen Bedingungen statt. Die Zellen wurden im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Adhärenz Zellen wurden nach Entfernung des Kulturmediums einmalig mit PBS gewaschen, mittels PBS/EDTA (5mM) von der Schale/Platte gelöst und in 10ml Kulturmedium aufgenommen. Darauf wurden sie, genauso wie Suspensionszellen, zentrifugiert (258g, 4°C, 5min). Zur Weiterkultivierung wurden die Zellpellets in Kulturmedium resuspendiert und die Zellzahlkonzentrationen durch eine Färbung toter Zellen mittels Trypanblau in einer Neubauerkammer manuell unter dem Lichtmikroskop oder durch einen Zählautomaten bestimmt. Anschließend erfolgte die Aussaat in gewünschter Konzentration auf/in neue, sterile Platten/Flaschen. Zur Ernte von Zellen wurden die Zellpellets nicht resuspendiert, sondern mit PBS gewaschen, nochmals zentrifugiert (4°C, 8000g, 2min), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Zur Kryokonservierung wurden die Zellpellets á 2·10⁶ (T-Zellen), 5·10⁶ (HeLa-, 33/2-, HT1080-, WEHI- und BLCL-Zellen) oder 1·10⁷ PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) in 1ml DMSO (10%)/FCS (90%) resuspendiert und in Kryogefäßen in einem Isopropanol umspülten Kryocontainer um 1°C/min abgekühlt, um nach 24 Stunde (h) in flüssigen Stickstoff überführt zu werden. Zum Auftauen wurden sie rasch bei 37°C erwärmt, in Kulturmedium überführt, zentrifugiert (258g, 4°C, 5min) und in Kultur genommen.

2.2.1.4 Transfektion von Plasmid-DNA und si-RNA

24 bzw. 4µg Plasmid-DNA wurde in 2·10⁶ bzw. 3·10⁵ HeLa- oder 33/2-Zellen nach 24-stündiger Kultur mittels Lipofectamin 2000 (Invitrogen) und OptiMEM nach Herstellerangaben transfiziert. Sequentielle Transfektionen erforderten eine analoge Behandlung 24h später. Je 2·10⁵ HeLa-Zellen wurden in einem Well einer 6-Well Platte für 24h kultiviert und anschließend mit siRNA gegen Rpn10, Rpn13 oder Rpn10 und Rpn13 bzw. Kontroll-siRNA mittels *X-TremeGene siRNA Transfection Reagent* und OptiMEM nach Angaben des Herstellers behandelt. Experimente mit 33/2-Zellen und siRNA gegen LMP2 und LMP7 wurden in analoger Weise durchgeführt. Transfektionen mit HLA-A2 und NY-ESO-1/NY-ESO-1^{K0} folgten 72h bzw. 48h später.

2.2.2 Immunbiologische Methoden

2.2.2.1 Durchflusszytometrie und FACS

Zur Durchflusszytometrischen Messung wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit den jeweiligen AK, gelöst in PBS/1% BSA, inkubiert (30min, 4°C). Nach drei weiteren Waschschritten folgte die Analyse der Zellen im Durchflusszytometer (Lösungsmittel:

PBS/1% BSA). Zu diesem Zweck wurde die Probe über einen Mikrokanal angesaugt, sodass jede Zelle einzeln durch zwei monochromatische Argon-Laser der Wellenlängen 488 nm und 635 nm analysiert wurde. Jedes Ereignis wird durch die Registrierung von Photonen in den wellenlängenspezifischen Kanälen *forward scatter* (FSC, 488 nm), *side scatter* (SSC, 488 nm) sowie FL-1 (530 nm, z. B. FITC), FL-2 (585 nm, z. B. PE), FL-3 (661 nm, z. B. Peridinin Chlorophyll Protein Komplex (PerCP)) und FL-4 (670 nm, z. B. Allophycocyanin (APC)) definiert. Größe bzw. Granularität der Zellen bestimmen die Beugung (FSC) bzw. Streuung (SSC) des emittierten Lichts. In allen anderen Kanälen ist die Intensität proportional zur Konzentration an gebundenem AK, dessen gekoppelte Farbstoffe Absorptionsmaxima von 488 nm (FITC, PE, PerCP) bzw. 635 nm (APC) aufweisen, sich aber in ihren Emmisionsmaxima unterscheiden. Diesen Teil bezeichnet man als FACS (*fluorescence activated cell scanning*). Mit Hilfe des Computerprogramms FlowJo (Version 10.3) wurden die erhobenen Daten analysiert und die Grafiken erstellt.

2.2.2.2 Peptidbeladung

Die extrazelluläre Beladung HLA-A2⁺ HeLa-, 33/2-Zellen oder DCs ($c=1 \cdot 10^6 \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}}$) mit $c=50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Peptid erfolgte über 2h bei 4°C.

2.2.2.3 Generierung monoklonaler CD8⁺ T-Effektorzellen

Präparation Mononuklärer Zellen PBMCs wurden aus den *buffy-coats* (Deutsches Rotes Kreuz) gesunder Vollblutspender von Erythrozyten und Serum durch Ficoll vermittelte Dichtegradientenzentrifugation (258g, Raumtemperatur, 30min, ohne Bremse) separiert. Die gewonnenen Zellen wurden drei mal in RPMI (ohne Zusätze) gewaschen und die Expression von HLA-A2 an der Zelloberfläche mittels FACS überprüft.

MACS Zellseparation CD14⁺ und CD8⁺ Zellen wurden in zwei Schritten durch MACS voneinander getrennt. Zur Isolation CD14⁺ Zellen wurden PBMCs mit CD14 *microbeads* in MACS-Puffer inkubiert (15min, 4°C), auf eine mit einem Magneten verbundene LS-Säule (Miltenyi Biotec) gebunden und durch zweimaliges Waschen mit MACS Puffer von CD14⁻ Zellen separiert. In einem zweiten Schritt wurden CD8⁺ Zellen in analoger Weise aus CD14⁻ Zellen isoliert.

Entwicklung reifer, dendritischer Zellen CD14⁺ Zellen (Monozyten) differenzierten sich in RPMI unter Einfluss von IL-4 ($c=100 \frac{\text{U}}{\text{ml}}$) und GM-CSF ($c=500 \frac{\text{U}}{\text{ml}}$) innerhalb von 5 Tagen zu unreifen DCs (31, 124). Diese wurden auf eine mit Polyhydroxyethylmethacrylat beschichtete 24-Well Platte umgesetzt und durch Stimulation mit LPS ($c=500 \frac{\text{U}}{\text{ml}}$) binnen 24h zur Reifung angeregt (31, 124). Zur Verifizierung der erfolgreichen Reifung erfolgte die Bestimmung charakteristischer Oberflächenmarker mittels FACS.

In vitro Priming CD8⁺ T-Zellen Das *Priming* naiver CD8⁺ T-Zellen zu Effektorzellen wurde durch eine 1-wöchige Co-Kultur von NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ beladenen, reifen DCs mit zuvor isolierten CD8⁺ T-Zellen desselben Spenders im Verhältnis 1:1 in CTL-Medium mit IL-6 ($c=200 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$) und IL-12 ($c=30 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$) bei 37°C erreicht (124).

T-Zell Restimulation Wöchentlich erfolgte eine Restimulation mit NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ beladenen DCs, IL-2 ($c=10 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$) und IL-7 ($c=200 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$). 1/3 des Mediums wurde alle zwei Tage durch frisches CTL-Medium mit IL-2 und IL-7 ersetzt. Proliferative Aktivität wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert, bei Bedarf reaktive Wells im Verhältnis 1:1 geteilt und mit frischem CTL-Medium (+IL-2 und IL-7) versetzt.

TNF- α -Zytotoxizitätstest Zur Identifikation Epitop spezifischer CD8⁺ T-Effektorzellen, wurden die geprägten und restimulierten CD8⁺ T-Zellpopulationen mit HLA-A2⁺, NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ beladenen HeLa-Zellen für 6h co-kultiviert und zur Produktion von TNF- α angeregt. WEHI-Zellen, auf die TNF- α zytotoxisch wirkt, wurden mit den Überständen der Co-Kultur sowie Actinomycin D ($c=2 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$) und LiCl ($c=10 \frac{\text{mmol}}{\text{l}}$) für 12h bei 37°C inkubiert. Die Differenzierung lebendiger von toten Zellen gelang durch Färbung mit MTT ($c=2,5 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$), das zelluläre Reduktasen unter NAD(P)H-Verbrauch in ein violette Formazan umwandeln. Der Farbstoff wurde durch Lyse der Zellen mit WEHI-Puffer freigesetzt und die Extinktion von Licht der Wellenlänge 570 nm gemessen.

Intrazelluläre Zytokinfärbung (ICC) Im TNF- α -Zytotoxizitätstest reaktive T-Zellpopulationen wurden erneut mit NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ beladenen PSG33-Zellen in IBM mit Brefeldin A ($c=1 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$) für 6h co-kultiviert. Brefeldin A ist ein potenter Inhibitor der Exozytose, sodass synthetisiertes IFN γ im ER aktivierter T-Zellen verbleibt und an dieser Stelle nachgewiesen werden kann. Nach der Co-Kultur wurden die Zellen in Fixierungspuffer stabilisiert, durch Inkubation mit saponinhaltem Puffer permeabilisiert und mit AK gegen CD8 und IFN γ gefärbt. Im letzten Schritt wurde der prozentuale Anteil doppeltpositiver Zellen mittels FACS ermittelt.

T-Zell Klonierung Polyklonale T-Effektorzellpopulationen mit ausreichender Spezifität (mind. 3%) wurden kloniert. Zu diesem Zweck wurden durchschnittlich 1 bzw. 0,3 T-Zellen in einem Well einer 96-Well Platte auf $2 \cdot 10^5$ bestrahlte PBMCs eines beliebigen Spenders und $2 \cdot 10^4$ bestrahlte BLCL (zusammen: Feederzellen) in CTL-Medium mit IL-2 ($c=150 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$) und PHA ($c=1 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$) für 14 Tage zur Proliferation angeregt (124). 1/3 des Mediums wurde nach drei und darauf alle zwei Tage durch frisches CTL-Medium (+IL-2) ersetzt. Proliferativ aktive Wells wurden unter Zugabe frischen CTL-Mediums (+IL-2) 1:1 geteilt. Zwei Wochen nach Beginn der Co-Kultur wurden Aliquots auf Klonalität mittels TNF- α -Zytotoxizitätstest und ICC untersucht.

Expansion monoklonaler T-Zellpopulationen Je $2 \cdot 10^4$ epitopspezifische, monoklonale $CD8^+$ T-Effektorzellen wurden analog zur T-Zell Klonierung zur Expansion angeregt und behandelt. Bei ausreichend proliferativer Aktivität wurden die T-Zellen nach sieben Tagen in frischem CTL-Medium (+IL-2) auf 6-Well Platten mit einer Konzentration von $5 \cdot 10^5 \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}}$ sowie $5 \frac{\text{ml}}{\text{Well}}$ überführt. 14 Tage nach Beginn der Expansion und Übergang der Zellen in einen Ruhezustand wurden Aliquots á $2 \cdot 10^6$ Zellen eingefroren.

2.2.2.4 Antigenpräsentationsversuch

Die Präsentation des HLA-A2 restringierten NY-ESO-1_{157–165} Epitops wurde mit Hilfe einer 12-stündigen Co-Kultur aus Ziel- und Effektorzellen nachgewiesen. Als Zielzellen dienten pro Well einer 96-Well Platte $2 \cdot 10^4$ HLA-A2⁺ und NY-ESO-1/NY-ESO-1^{K0} transfizierte HeLa- bzw. 33/2-Zellen, deren Konzentration in einer Verdünnungsreihe fünf mal halbiert wurde. Je $2 \cdot 10^4$ monoklonale, NY-ESO-1_{157–165} spezifische $CD8^+$ T-Zellen fungierten als Effektorzellen, sodass daraus Effektor:Ziel-Zell (E:T)-Verhältnisse von 1:1, 2:1, 4:1, 8:1, 16:1 und 32:1 resultierten. Als Negativ- bzw. Positivkontrolle dienten HLA-A2⁺ unbeladene oder peptidbeladene HeLa- bzw. 33/2-Zellen.

2.2.2.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Die Konzentration an $IFN\gamma$ im Überstand der Antigenpräsentationsversuche wurde durch einen Sandwich-ELISA mit Hilfe des *Human IFN γ -ELISA Kit* (BD) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Die einzelnen Schritte umfassten: 1. Bindung des *Capture-AK* ($\frac{1}{250}$ in *ELISA-Coating-puffer*), 2. Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit ELISA-Blockpuffer, 3. Inkubation der Überstände, 4. Bindung des Detektions-AK zusammen mit Streptavidin-gekoppelter HRP (je $\frac{1}{250}$) und 5. Zugabe der ELISA-Substratlösung (3,3',5,5' Tetramethylbenzidin (TMB) und H_2O_2). TMB wird unter Verbrauch von H_2O_2 durch HRP zu einem blauen Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei 652 nm oxidiert. Je nach Stärke des Farbsignals wurde die Reaktion nach 5-10min mittels 1M H_3PO_4 abgestoppt, wodurch ein Farbwechsel zu gelb mit einem Absorptionsmaximum bei 450 nm stattfand. Die Extinktion von Licht der Wellenlänge 450 nm wurde mit Hilfe eines Spectrophotometers gemessen und die Konzentrationen anhand eines $IFN\gamma$ Standards bestimmt.

2.2.2.6 Immunopräzipitation

Myc-markierte Proteine wurden mit Hilfe des *μ MACS c-Myc Isolation Kit* (Miltenyi Biotec) isoliert. Zu diesem Zweck wurden $2 \cdot 10^6$ HeLa-Zellen sequentiell mit HA-Ub-GFP oder einer der HA-Ub-GFP-Mutanten und anschließend mit pcDNA3.1 Leervektor, NY-ESO-1, NY-ESO-1^{K0} bzw. MART-1 transfiziert (siehe 2.2.1.4). Zur Anreicherung polyubiquitinerter Substrate erfolgte 16h später für 6h eine Behandlung mit $10\mu M$ MG132. Zellpellets wurden mit 1ml kiteigenem Lysepuf-

fer sowie NEM ($c=50mM$) und MG132 ($c=10\mu M$) für 30min bei $4^{\circ}C$ inkubiert und zentrifugiert ($13.000g$, 10min, $4^{\circ}C$). Die Überstände wurden in 1ml auf einheitliche Proteinkonzentrationen eingestellt und je $50\mu l$ für die Herstellung von Zelllysaten abgezweigt. 5mg Gesamtprotein inkubierten mit $50\mu l$ c-Myc-microbeads für 1h bei $4^{\circ}C$. Die Präzipitate wurden auf eine 10μ -Säule (Miltenyi Biotec), die an einem Dauermagneten hing, gebunden und vier mal mit Waschpuffer I (unter anderem 50mM NaCl) und 2x mit 20 mM Tris/HCl (pH 7,5) behandelt. In einigen Experimenten wurde die NaCl-Konzentration bis auf 3M erhöht. Abschließend erfolgte die Denaturierung und Elution der Proteine von der Säule mittels $95^{\circ}C$ -heißem, DTT-haltigem Puffer.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 RNA-Isolation und cDNA-Synthese

RNA wurde unter Verwendung des *RNA Isolation Kit High Pure* (Roche) nach Herstellerangaben isoliert. Dazu wurden Zellpellets in PBS resuspendiert, mit kationischem Puffer lysiert, RNA über eine Nukleinsäure bindende Säule (*High Pure Filter Tubes*) isoliert, die Konzentration photometrisch ermittelt und die RNA bei $-80^{\circ}C$ gelagert. Die Isolation von DNA wurde durch Einsatz einer DNase verhindert. Die gereinigte RNA wurde mit Hilfe des *Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit* (Roche) durch eine reverse Transkriptase in 30min in cDNA umgeschrieben.

2.2.3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion und Mutagenese

NY-ESO-1 DNA wurde aus $1\mu l$ cDNA und den in 2.1.8 angegebenen Primern mit Hilfe des *PWO-SuperYield DNA Polymerase, dNTPack* (Roche) amplifiziert. In einem PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)-Block wurden, nach 5-minütiger Inkubation bei $95^{\circ}C$, 30 Zyklen der folgenden Sequenz wiederholt: 1. Denaturierung ($95^{\circ}C$, 1min) 2. Primerhybridisierung ($48^{\circ}C$, 1min) und 3. Elongation ($72^{\circ}C$, 1min). Abschließend folgte ein 10-minütiger Elongationsschritt bei $72^{\circ}C$. Zur Modifikation der Aminosäuresequenz (Mutagenese) von NY-ESO-1 wurden spezifische Primer konzipiert, um auf DNA-Ebene die Nukleotidsequenz in gewünschter Weise zu verändern. Die PCR mit Plasmid-DNA wurde in analoger Weise mit 17 Zyklen bei Einsatz von 10ng DNA, je nach Primer adäquater Hybridisierungstemperatur und 8min Elongationszeit durchgeführt. Ausgangs-DNA, die schon einmal in *Escherichia coli* (E.Coli) exprimiert wurde, konnte durch einen Verdau mit DpnI eliminiert werden. Die PCR-Produkte wurden mit dem *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (kurz *Illustra Kit*, GE) gereinigt und in $50\mu l$ Elutionspuffer gelöst.

2.2.3.3 Klonierung von Plasmid-DNA

$2\mu g$ Plasmid bzw. $35\mu l$ der amplifizierten und gereinigten DNA-Fragmente wurden durch passende Restriktionsenzyme für 1h bei $37^{\circ}C$ verdaut. Die DNA-Fragmente wurden anschließend

mittels Elektrophorese (20min, 180mV, Laufpuffer TBE) in 0,4-2%-igen Agarosegelen mit 0,05% EtBr der Größe nach getrennt und durch ultraviolettes Licht der Wellenlänge 210 nm visualisiert. Die entsprechenden Banden wurden ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des *Illustra Kit* (GE) nach Entwicklerangaben isoliert. Oligonukleotide ($c=37,5 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$) wurden in 0,1M NaCl für 10min bei 65°C hybridisiert und anschließend über 3h langsam auf 27°C abgekühlt. Verdaut und gereinigte PCR-Fragmente bzw. hybridisierte Oligonukleotide wurden mit korrespondierender, verdauter und gereinigter Vektor-DNA durch T4 DNA-Ligase innerhalb 1h bei Raumtemperatur verknüpft.

2.2.3.4 Herstellung von LB-Agarplatten

LB-Medium wurde wie in 2.1.1 angegeben mit 15g/l Agar hergestellt und autoklaviert. Nach Abkühlung auf 55°C und Zugabe des jeweiligen Resistenzantibiotikums (Ampicillin $c=50 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$, Kanamycin $c=25 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$) wurden je 20ml in eine sterile 10cm Kulturschale pipettiert. Nach Polymerisation wurden die Platten bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend bei 4°C gelagert.

2.2.3.5 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente E.Coli

Kompetente DH5 α E.Coli-Zellen wurden durch eine modifizierte Methode nach (125) angezüchtet. 5 μl des Ligationansatzes bzw. gereinigten PCR-Produktes der Mutagenese wurden mit 50 μl kompetenten E.Coli für 30min bei 4°C inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 2min bei 42°C, bevor die Zellen für 1h bei 37°C in LB-Medium bei 180 RPM geschüttelt wurden. Nach Abnahme überschüssigen Mediums wurden 50 μl transformierte E.Coli-Zellen mit einem sterilen Trigalskispatel auf einer resistenzantibiotikahaltigen LB-Agarplatte ausgestrichen. Nach 24h bei 37°C konnten einzelne Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und in 5ml LB-Medium mit dem jeweiligen Resistenzantibiotikum für 24h bei 37°C und 180 RPM geschüttelt werden. 1ml der Über-Nacht Kultur wurde mit 400 μl sterilem, 80%-igem Glycerol in einem 2ml Glycerolstockgefäß bei -80°C gelagert.

2.2.3.6 Plasmid-DNA Isolation aus E.Coli

Mini-Präp 2ml einer Über-Nacht Kultur aus 2.2.3.5 wurden mit Hilfe des *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN) über eine DNA-bindende Säule gereinigt und in 50 μl Elutionspuffer gelöst.

Maxipräp 250ml antibiotikahaltiges LB-Medium wurde mit reichlich Material eines Glycerolstocks über 24h bei 37°C und 180 RPM geschüttelt und anschließend mit Hilfe des *QIAGEN Plasmid Maxi Kit* (QIAGEN) über eine DNA-bindende Säule gereinigt und in 200 μl Elutionspuffer gelöst. Die Konzentration wurde photometrisch ermittelt und mit kiteigenem Elutionspuffer auf 1 $\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}}$ eingestellt. Die Sequenzierung erfolgte mittels Ketten-Abbruch-Synthese durch die Firma LGC Genomics (Berlin) mit Hilfe vektorspezifischer Primer.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 Herstellung von Proteinlysaten

Außer für die IPráz wurden Zellpellets in NP40-haltigen Lysepuffer mit $10\mu\text{M}$ MG132 und 50mM NEM resuspendiert und die Zellmembranen durch fünfmaliges Einfrieren (-196°C) und Auftauen (37°C) aufgeschlossen. Nach Zentrifugation ($13.000g$, 20min, 4°C) erfolgte die Abnahme der proteinhaltigen Überstände zur weiteren Analyse. Die Proteinkonzentrationen der Überstände wurden mit Hilfe des *Bicinchoninsäure (BCA) Protein Assay Kit Pierce TM* (Thermo Scientific) anhand eines BSA-Standards mittels Lambert-Beer'schen Gesetzes bestimmt.

2.2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Polyacrylamidtrenngel (Volumina für 2 Gele á $80\times 75\times 1\text{mm}$): 1. H_2O 4,85ml (7,5%)/4ml (10%)/3,5ml (12%)/2,35ml (15%), 2. Acrylamid (30%-ige Stammlösung): 2,5ml (7,5%)/3,3ml (10%)/4ml (12%)/ 5ml (15%), 3. Tris (1,5M) 2,5ml, 4. SDS (10%) $100\mu\text{l}$, 5. APS (10%) $50\mu\text{l}$; 6. TEMED $5\mu\text{l}$

Polyacrylamidsammelgel (4%, Volumina für 2 Gele á $20\times 75\times 1\text{mm}$): 1. H_2O 3,05ml, 2. Acrylamid (30%-ige Stammlösung) $650\mu\text{l}$, 3. Tris 0,5M 1,25ml, 4. SDS (10%) $50\mu\text{l}$, 5. APS (10%) $25\mu\text{l}$, 6. TEMED $5\mu\text{l}$

Proteinlysate wurden mit Lyse- und DTT-haltigem SDS-Probenpuffer auf einheitliche Konzentrationen von $2\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ eingestellt und durch fünfminütiges Erhitzen auf 95°C denaturiert. Identische Volumina wurden in je eine Tasche des Sammelgels pipettiert und die Proteine bei 180V für 1-1,5h in 7,5%-, 10%-, 12,5%- oder 15%-igen Gelen aufgetrennt (Laufpuffer: SDS-Gelelektrophoresepuffer).

2.2.4.3 Western Blot und Proteindetektion

Mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) getrennte Proteine wurden in einer *semi-dry* Blotkammer über 1h mit 8mA in methanolhaltigem Blotpuffer auf eine Methanol-aktivierte PVDF Membran übertragen. Zur Kontrolle, dass identische Proteinmengen aufgetragen wurden, erfolgte eine 10-minütige Färbung der PVDF Membranen mit Amidoschwarz. Unspezifische Bindungsstellen auf der PVDF Membran wurden durch Inkubation in 5% Magermilchlösung für 1h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler blockiert. Anschließend erfolgte die Bindung des Primär-AK in 5% Magermilchlösung für 12h bei 4°C . Unspezifisch gebundene AK wurden durch 3x 20-minütiges Waschen mit TST-Puffer entfernt. Anschließend wurden die Membranen für 3h mit einem sekundären, HRP-gekoppelten Anti- F_c (Maus/Kaninchen/Ziege) AK inkubiert und erneut 3x20min mit TST-Puffer gewaschen. Abschließend wurden sie für 30 Sekunden in 10ml H_2O_2 -haltiger Chemolumineszenzlösung (POD) eingelegt und die Signale in einer Filmkassette unter

Lichtausschluss auf einen Röntgenfilm übertragen. Die Filme wurden mit Entwickler- und Fixierlösung des *RP-X-OMAT LO Kit* (Carestream) entwickelt.

2.2.4.4 Spaltung von Carboxyestern

Zum Nachweis von Ub-Molekülen, die über Carboxyester gebunden waren, wurden mittels IPräz isolierte Proteine mit 50mM NaOH für 30min bei 32°C behandelt. Über Carboxyester an Proteine gebundenes Ub löst sich bei einem pH-Wert von 12 (102). Thioester- sowie Säureamidbindungen werden hierdurch nicht hydrolysiert.

2.2.4.5 Tobacco-Etch-Virus-Protease Verdau

Myc-markierte Proteine wurden wie in 2.2.2.6 beschrieben isoliert. Vor ihrer Elution erfolgte zusätzlich ein Verdau mit AcTEV-Protease. Dazu wurde jede Säule mit 35µl (20U) TEV-Protease für 2,5h bei 22°C behandelt und die Proben nach zwei Waschschrinen in bekannter Weise eluiert.

2.2.5 Physikalische Methoden - Bestrahlung von Zellen

BLCLs wurden mit einer Dosis von 50Gy und PBMCs mit einer Dosis von 30Gy durch eine ¹³⁷Cs-Quelle (GC 40E, MDS Nordion) bestrahlt.

2.2.6 Statistische Methoden

Um zu prüfen, ob sich zwei Zellpopulationen in der Ausprägung eines Merkmals signifikant unterscheiden, wurde mit Hilfe des Computerprogrammes Graph Pad Prism bei normalverteilten Merkmalen ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Zum Vergleich mehrerer Zellpopulationen mit einer Kontrollgruppe kam ein *one-way ANOVA* zum Einsatz.

3 Ergebnisse

Die in diesem Kapitel präsentierten Daten basieren auf den Ergebnissen, die Golnik et al. im J Biol Chem. 2016 Apr 15;291(16):8805-15 (126) publiziert haben. Die Abbildungen sind für die Verfassung dieser Doktorarbeit modifiziert oder erweitert worden. Die Erlaubnis zur Verwendung der Ergebnisse und Abbildungen ist durch JBC gegeben. Die Darlegung der Ergebnisse folgt im wesentlichen der Struktur der Veröffentlichung. Auf redundante Zitation der genannten Publikation wird im Folgenden verzichtet.

3.1 Generierung von NY-ESO-1 kodierender Vektor-DNA

3.1.1 Klonierung von CTAG1B-DNA in pcDNA3.1 Myc/HIS Version B (+)

HeLa-Zellen exprimieren natürlicherweise NY-ESO-1 nicht und sollten zur Analyse der Ubiquitinierung und MHC Klasse I Antigenpräsentation von NY-ESO-1 jeweils transient mit NY-ESO-1 Plasmid-DNA transfiziert werden. Zur Herstellung von CTAG1B (*cancer/testis antigen 1B*)-DNA, die für das NY-ESO-1 Protein kodiert, wurde Gesamt-mRNA aus HT1080-Zellen isoliert und mittels reverse Transkriptase (RT)-PCR in cDNA umgeschrieben. Durch eine anschließende PCR mit der DNA-Polymerase des Bakteriums *Pyrococcus woesei* (PWO) und den in Kapitel 2.1.8 angegebenen Primern (KpnI-NY-ESO-1 FW und NY-ESO-1-XhoI RW) wurde die CTAG1B-DNA amplifiziert (Abbildung 5A). Der KpnI-NY-ESO-1 FW Primer beinhaltet am 5'-Ende die Schnittstelle 5' G[↓]GTACC 3' für das Restriktionsenzym KpnI sowie der NY-ESO-1-XhoI RW Primer die Schnittstelle 5' C_↑TCGAG 3' für das Restriktionsenzym XhoI. Beide Primer enthielten zudem einen 5' Überhang (AAA für KpnI-NY-ESO-1 FW bzw. TTT für NY-ESO-1-XhoI RW), damit die Restriktionsenzyme an die amplifizierten DNA-Fragmente binden konnten. Die verbleibende Sequenz entsprach der korrespondierenden Basensequenz der CTAG1B-cDNA. Nach Restriktionsverdau mit KpnI und XhoI sowie Isolation der Amplifikate wurde die CTAG1B-DNA im Bereich des Polylinkers mit dem ebenfalls KpnI- und XhoI-verdauten und gereinigten pcDNA 3.1 Myc/HIS Version B (kurz pcDNA3.1) Vektor ligiert (Abbildung 5B). Die auf diese Weise gebildete Vektor-DNA wurde in kompetente E.Coli-Zellen transformiert. Plasmidhaltige Zellen wurden durch einen Ausstrich auf einer LB-Platte, die das Resistenzantibiotikum Ampicillin enthielt, selektioniert und kloniert. Nach eintägiger Kultur wurden 20 Klone isoliert, die in einer Über-Nacht-Kultur angereichert und deren Plasmid-DNA durch einen Minipräp extrahiert wurden. Mittels eines Kontrollverdaus mit den Restriktionsenzymen KpnI und XhoI sowie anschließender Agarose-Gelelektrophorese der Fragmente erfolgte die Kontrolle, welche Klone das CTAG1B-Gen enthielten. 17 von 20 zeigten ein Fragment, das seinem Laufverhalten nach zu urteilen, der Größe

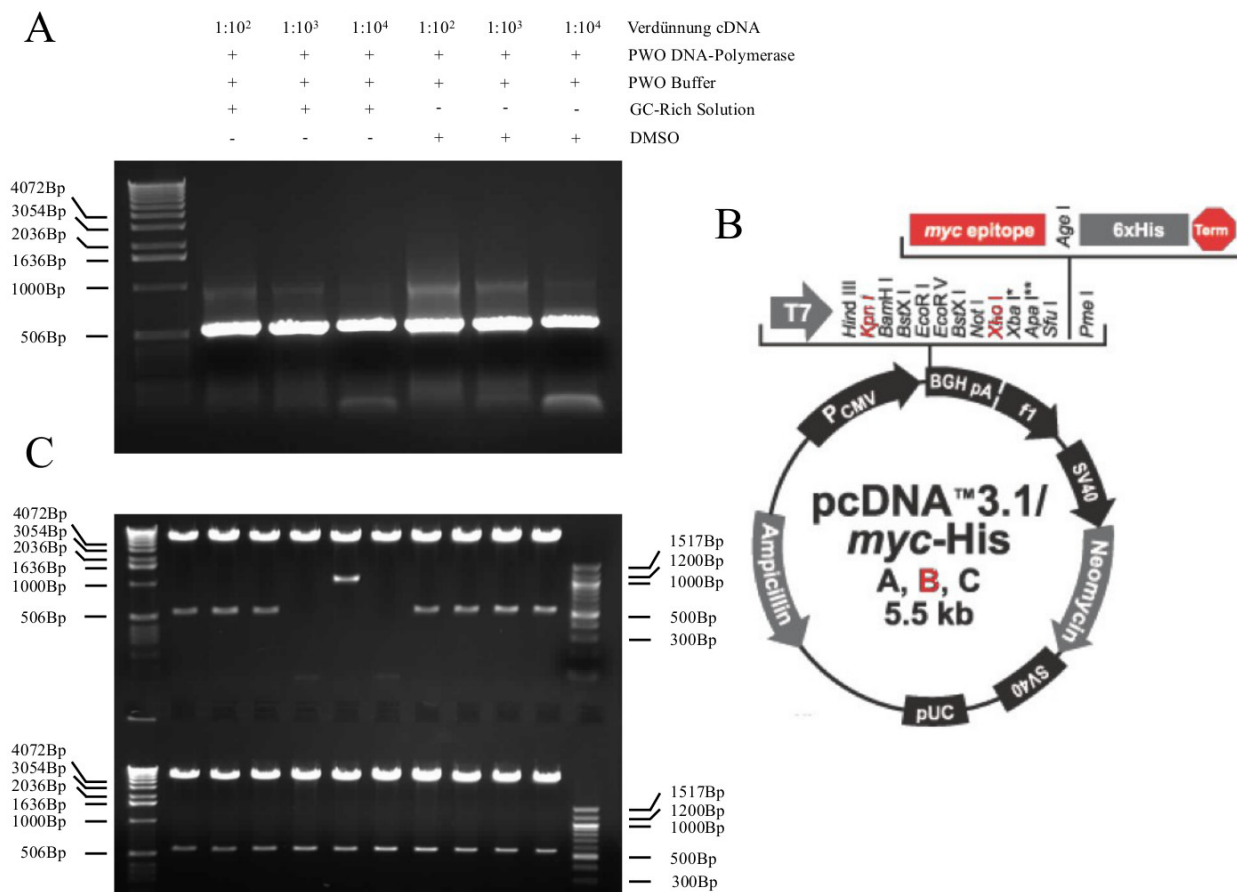


Abbildung 5: Klonierung des *CTAG1B*-Gens in *pcDNA3.1 Myc/HIS* Version B (+). **A** cDNA wurde aus mRNA von HT1080-Zellen umgeschrieben. Je $1\mu\text{l}$ der angegebenen Verdünnungen wurde anschließend mit KpnI-NY-ESO-1 FW und NY-ESO-1-XhoI RW Primern unter unterschiedlichen Bedingungen mittels PCR amplifiziert und die Amplifikate in einem 1%-igen Agarosegel durch eine Elektrophorese aufgetrennt. **B** Schematische Darstellung des *pcDNA3.1 Myc/HIS* Vektors Version B. Die zur Klonierung vorgesehenen Schnittstellen (KpnI und XhoI) sind zur besseren Orientierung rot markiert. **C** *CTAG1B*-DNA wurde nach dem Schema aus **B** in einen *pcDNA3.1 Myc/HIS* Vektor Version B (+) kloniert, in *DH5 α* -Zellen transformiert und 20 Klone isoliert. Nach Anreicherung in einer Über-Nacht-Kultur und anschließender Extraktion der Plasmid-DNA mittels eines Minipräps wurden $2\mu\text{l}$ Plasmid-DNA mit je $0,5\mu\text{l}$ KpnI und $0,5\mu\text{l}$ XhoI über eine Stunde bei 37°C verdaut und die Fragmente in einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt. Als Marker wurden jeweils links ein 1kbp und rechts ein 100bp *Ladder* verwendet.

des amplifizierten KpnI-*CTAG1B*-XhoI Fragments von errechneten 552 Bp entsprach (Abbildung 5C). Drei von diesen 17 Klonen wurden sequenziert, der *pcDNA3.1 NY-ESO-1-Myc/HIS* Klon10 als richtig identifiziert und zur weiteren Verwendung ausgewählt.

3.1.2 K→R Mutagenese von *pcDNA3.1 NY-ESO-1-Myc/HIS*

Der *Myc-tag* des *pcDNA3.1* Vektor enthält die Lysin-haltige Sequenz EQKLISEEDL. Um eine Lysin-abhängige Polyubiquitinierung des NY-ESO-1-Myc/HIS Fusionsproteins im *Myc-tag* zu verhindern, erfolgte eine K→R Mutagenese mit Hilfe der in 2.1.8 angegebenen *pcDNA 3.1 NY-ESO-1-Myc/HIS* K192R FW und RW Primern. Auf diese Weise wurde an Stelle des Lysins

ein Arginin exprimiert, das aufgrund seiner Nukleophilie nicht mit Ub modifiziert werden kann (Abbildung 6). Die K→R Modifikation wird durch die alternative Bezeichnung Myc* deutlich gemacht. Wie in 3.1.1 wurde die amplifizierte Plasmid-DNA in DH5 α -Zellen transformiert, kloniert, gereinigt und ebenfalls drei Klone sequenziert. Der pcDNA 3.1 NY-ESO-1-Myc^{K192R}/HIS Klon 1 bzw. pcDNA 3.1 NY-ESO-1-Myc*/HIS Klon 1 (kurz NY-ESO-1) enthielt die richtige Sequenz und wurde für die weiteren Experimente verwendet. Zur Untersuchung lysin-abhängiger Ubiquitinierung und MHC Klasse I Antigenpräsentation von NY-ESO-1 wurde in analoger Weise pcDNA3.1 NY-ESO-1-Myc*/HIS Plasmid-DNA mit Hilfe der NY-ESO-1 K124R FW und RW Primer in einer Mutagenese der Gestalt verändert, dass die Expression des einzigen Lysins an Stelle 124 des NY-ESO-1-Proteins durch die eines Arginins substituiert wurde (Abbildung 6). Der isolierte pcDNA3.1 NY-ESO-1^{K124R}-Myc*/HIS Klon1 (kurz NY-ESO-1^{K0}) wurde ebenfalls mittels Sequenzierung als richtig bestätigt und für die weiteren Experimente verwendet.

3.1.3 N-Terminale Verlängerung der NY-ESO-1-Konstrukte mit V5/TEV

Da der N-Terminus als alternative Ub-Akzeptorstelle beschrieben wurde (103), war ein Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, ob auch NY-ESO-1 N-terminal ubiquitiniert wird. Zu diesem Zweck sollten isolierte NY-ESO-1 Proteine *in vitro* von potentiell N-terminalen Ub-Ketten getrennt werden. Hierfür wurden Oligonukleotide konfiguriert, welche die Sequenz eines verkürzten V5*-Tags (IPN-PLLGLD) fusioniert mit einer TEV-Proteaseschnittstelle (ENLYFQ↓G) enthielten. Die natürliche Schnittstelle der TEV-Protease wurde als ENLYFQ↓S beschrieben (127). Diese Sequenz wurde zur Vermeidung einer zusätzlichen Polyubiquitinierungsstelle modifiziert, indem Serin an Position P1' durch Glycin substituiert wurde, da die TEV-Protease gegen ENLYFQ↓G ebenfalls eine gute proteolytische Aktivität aufweist (127). Die AS-Sequenz des entstandenen N-terminalen Fragments war demzufolge MIPNPLLGLDENLYFQGGT. Das C-terminale Threonin, als zusätzliche Ub-Akzeptorstelle des V5/TEV-Fragments, lag in der KpnI-Schnittstelle und ließ sich aus diesem Grund nicht vermeiden. Die Primer wurden so konfiguriert, dass die *sense* Oligonukleotide am 5'-Ende einen AGCTT und am 3'-Ende einen GGTAC Überhang gegenüber den *antisense* Oligonukleotiden aufwiesen. Die entstandene T-Form der hybridisierten Oligonukleotide korrespondierte zur Struktur der HindIII- und KpnI-verdauten NY-ESO-1 und NY-ESO-1^{K0} Plasmid-DNA. Nach Ligation wurde die Plasmid-DNA in bekannter Weise in kompetente E.Coli-Zellen transformiert, kloniert und jeweils drei Klone sequenziert. Um einen alternativen Translationsstart zu verhindern (Abbildung 7), enthielten die V5/TEV NY-ESO-1-Konstrukte eine zusätzliche Substitution der Art, dass an Stelle des ursprünglichen Methionin 1 des NY-ESO-1-Proteins (in V5/TEV-NY-ESO-1 an Stelle 20) ein Valin exprimiert wurde (Abbildung 6). Die Sequenzen der vier entstandenen Kon-

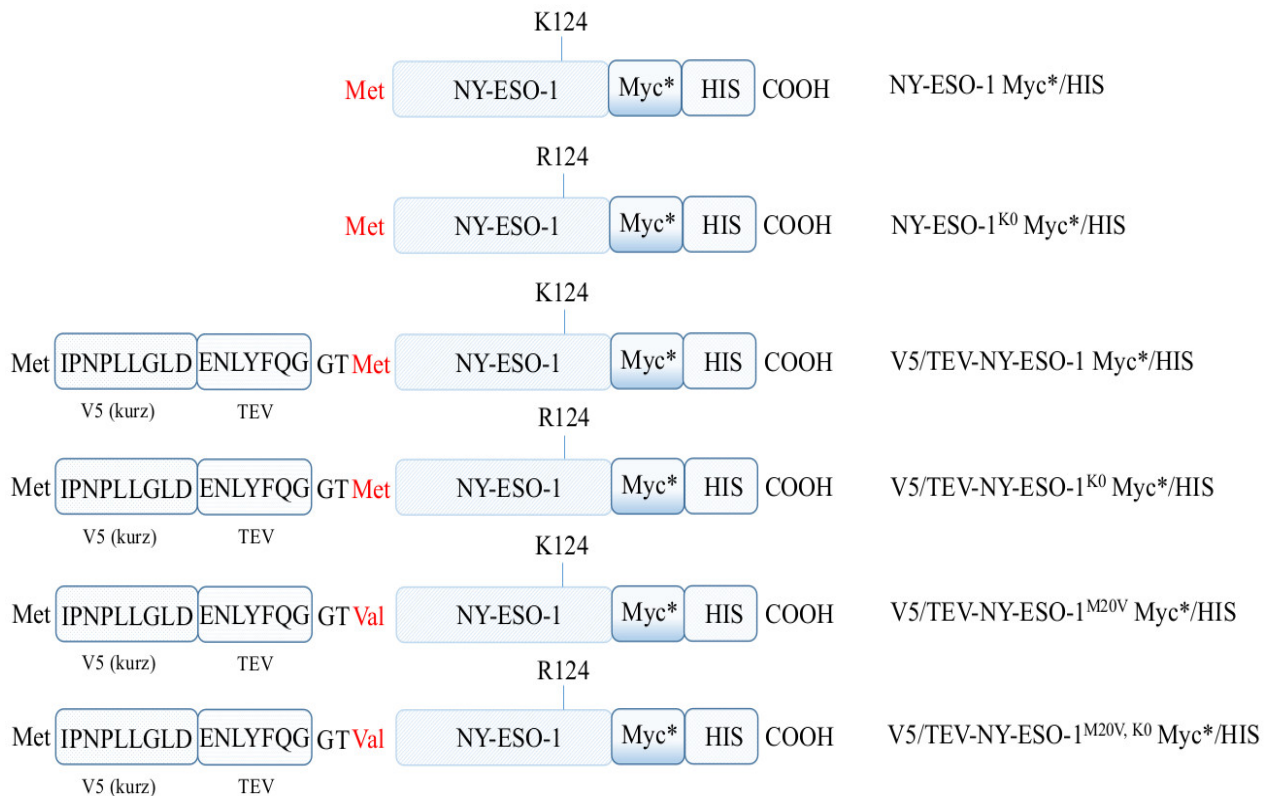


Abbildung 6: Klonierungsschema der einzelnen *pcDNA3.1 NY-ESO-1*-Konstrukte. Myc* ist ein modifizierter Variante des ursprünglichen *tags*, der anstatt eines Lysins ein Arginin enthält. V5 (kurz) (IPNPLLGLD) ist eine verkürzte Form von V5 (GKPIPNPLLGLDST).

strukte *pcDNA3.1 V5/TEV NY-ESO-1-Myc*/HIS*, *pcDNA3.1 V5/TEV NY-ESO-1^{K0}-Myc*/HIS*, *pcDNA3.1 V5/TEV NY-ESO-1^{M20V}* und *pcDNA3.1 V5/TEV NY-ESO-1^{M20V,K0}* (kurz *V5/TEV NY-ESO-1*, *V5/TEV NY-ESO-1^{K0}*, *V5/TEV NY-ESO-1^{M20V}*, *V5/TEV NY-ESO-1^{M20V,K0}*) erwiesen sich allesamt als korrekt.

3.2 Expression der NY-ESO-1-Konstrukte in HeLa-Zellen

Die Konstrukte *NY-ESO-1*, *NY-ESO-1^{K0}*, *V5/TEV NY-ESO-1*, *V5/TEV NY-ESO-1^{K0}*, *V5/TEV NY-ESO-1^{M20V}* und *V5/TEV NY-ESO-1^{M20V,K0}* wurden in HeLa-Zellen transfiziert und ihre Funktionsfähigkeit mittels SDS-PAGE und WB analysiert. Wie in Abbildung 7 gezeigt, werden alle Konstrukte in HeLa-Zellen exprimiert. Wie angenommen, führte die Transfektion von *V5/TEV NY-ESO-1* und *V5/TEV NY-ESO-1^{K0}* zur Bildung von zwei Proteinen unterschiedlicher Größe. Interessanterweise läuft das kleinere Protein auf derselben Höhe wie *NY-ESO-1* bzw. *NY-ESO-1^{K0}* und ist nach Substitution des ehemaligen Methionin 1 des *NY-ESO-1* mit Valin (*M20V*) nicht mehr nachweisbar. Das Größere bewegt sich dagegen auf der gleichen Höhe wie *V5/TEV NY-ESO-1^{M20V}* bzw. *V5/TEV NY-ESO-1^{M20V,K0}*. In diesem Fall ist es daher sehr wahrscheinlich, dass zusätzlich zum M1 des *V5/TEV* Tags als alternativer Translationsstart das ursprüngliche Methionin an Stelle 1 des *NY-ESO-1* Proteins diene. Zum Nachweis N-terminaler Ubiquitinierung wurden aus die-

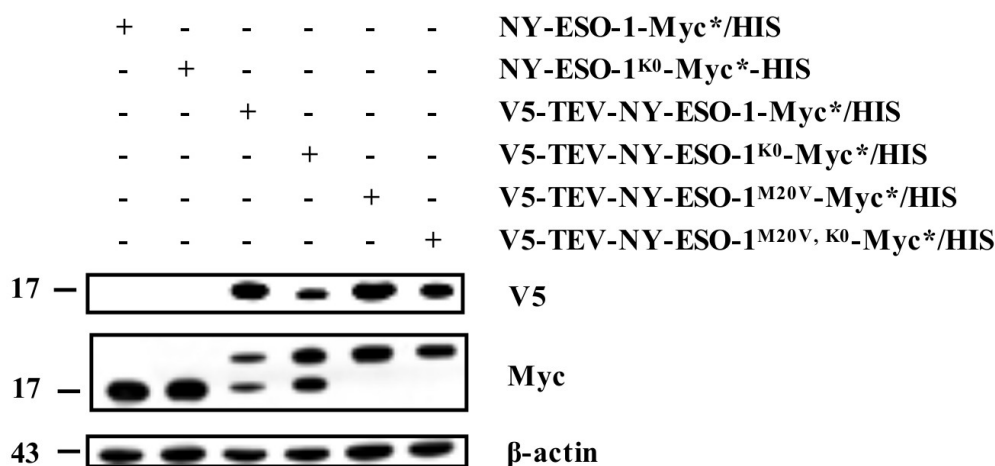


Abbildung 7: Expression der verschiedenen NY-ESO-1-Konstrukte. HeLa-Zellen wurden nach 24-stündiger Kultur mit den unterschiedlichen NY-ESO-1-Konstrukten transfiziert, deren Expression mittels SDS-PAGE und WB (Anti-V5 und Anti-Myc) überprüft wurde. β -Actin diente als Ladekontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten.

sem Grund, statt V5/TEV NY-ESO-1 und V5/TEV NY-ESO-1^{K0}, ausschließlich die Konstrukte V5/TEV NY-ESO-1^{M20V} und V5/TEV NY-ESO-1^{M20V,K0} verwendet. Ebenfalls gut zu erkennen ist, dass die K124R Mutation im Falle von NY-ESO-1^{K0} und V5/TEV NY-ESO-1^{M20V,K0} nicht zu einer Stabilisierung des reifen Proteins führt. Die *steady-state* Level der reifen Proteine blieben demzufolge durch das Fehlen des einzigen Lysins unbeeinträchtigt.

3.3 Generierung eines NY-ESO-1_{157–165} spezifischen CD8⁺ T-Effektorzellklons

3.3.1 Analyse der Differenzierungsmarker dendritischer Zellen

Zur Analyse der Präsentation des HLA-A2 restringierten NY-ESO-1_{157–165} Epitops sollten monoklonale NY-ESO-1_{157–165} spezifische CD8⁺ T-Effektorzellen aus naiven CD8⁺ T-Zellen *in vitro* mit Hilfe reifer DCs *geprimed* und expandiert werden. Zu diesem Zweck wurden PBMCs aus *buffy-coats* von sechs gesunden Vollblutspendern mittels Ficoll-vermittelter Dichtegradientenzentrifugation isoliert und auf die Expression des MHC Klasse I Moleküls HLA-A2 an der Zelloberfläche mittels FACS untersucht. PBMCs eines HLA-A2 positiven Spenders wurden zur Isolation CD14⁺ und CD8⁺-Zellen verwendet. CD14⁺-Zellen wurden, wie in 2.2.2.3 beschrieben, zu unreifen DCs differenziert. Durch 24-stündige Stimulation mit LPS reifen DCs (31, 124) und exprimieren verstärkt MHC Klasse I und II sowie co-stimulatorische Moleküle, wie CD40, CD80 (B7.1), CD83 und CD86 (B7.2) (31, 128).

Um die Reifung von DCs zu überprüfen, wurde die Expression spezifischer Oberflächenmoleküle mittels FACS-Analyse untersucht. Zu diesem Zweck diente eine Reihe fluoreszenzfarbstoffgekopp-

pelter AK sowie das organische Peptid 7-AAD. DCs konnten aufgrund ihres charakteristischen Spektrums im FSC/SSC *dotplot* identifiziert werden. Ihr prozentualer Anteil lag zwischen 11,7% und 44,5%. Zur Unterscheidung lebendiger von toten Zellen erfolgte eine Färbung mit 7-AAD (129). Die weitere Analyse schloss nur 7-AAD negative (lebendige) Zellen ein.

Sowohl nicht-stimulierte (unreife DCs), als auch stimulierte Zellen (reife DCs) exprimierten den charakteristischen Differenzierungsmarker CD11c (Abbildung 8A und B). Die Konzentration an MHC Klasse I Molekülen an der Zelloberfläche nahm im Verlauf der Reifung lediglich leicht zu (Abbildung 8C und I), während sich die Expression an MHC Klasse II Molekülen reifer DCs kaum von unreifen unterschied (Abbildung 8D). Allerdings ließen sich mehr co-stimulatorische Mole-

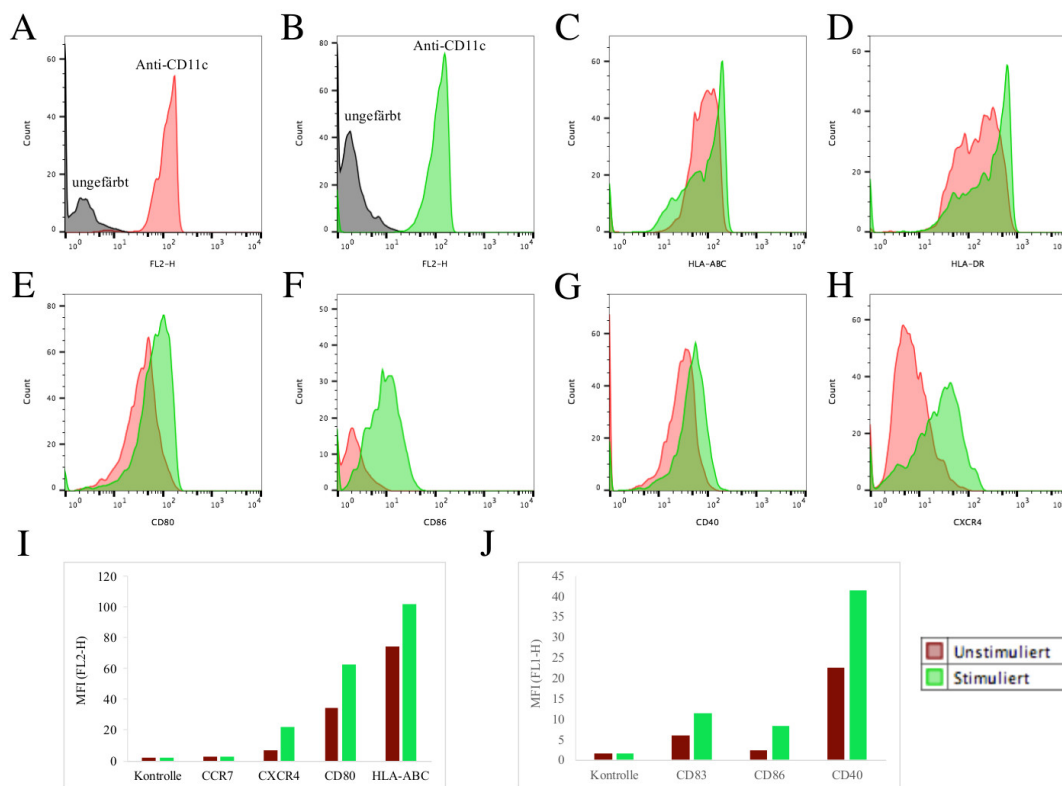


Abbildung 8: Oberflächenprofil unreifer und reifer DCs. Unstimulierte (rot) und 24h mit LPS stimulierte Zellen (grün) einer 5-tägigen Kultur CD14⁺-Zellen mit GM-CSF und IL-4 wurden mittels geeigneter fluoreszenzfarbstoffgekoppelter AK markiert und per Durchflusszytometrie analysiert. **A-H** zeigen Histogramm-overlays ausgewählter Färbungen einzelner Oberflächenmoleküle von unstimulierten (rot) und stimulierten (grün) Zellen. **I und J** Geometrisches Mittel der Fluoreszenzintensität ausgewählter Färbungen einzelner Oberflächenmoleküle im Vergleich zu nicht gefärbten Zellen.

küle nachweisen. Erstens zeigte sich eine erhöhte Konzentration an CD80 und CD86 (Abbildung 8E, F, I und J), die als Liganden von CD28 für das Priming naiver T-Zellen essentiell sind (128). Zweitens war auch die Expression von CD83, einem Markerprotein reifer DCs, das für die Langlebigkeit CD8⁺ T-Effektorzellen unabdingbar ist (130), verstärkt (Abbildung 8J). Als drittes ließ

sich auch eine erhöhte Signalintensität für CD40 registrieren (Abbildung 8G und J), einem Rezeptor für CD40L (CD4⁺ T-Helfer Zellen), dessen Aktivierung die Biosynthese von CD80, CD86 und IL-12 in DCs stimuliert und sie dadurch als Mediator für die Aktivierung CD8⁺ T-Zellen durch CD4⁺ T-Helferzellen wirken lässt (128).

Während ihrer Reifung synthetisieren DCs verstärkt Chemokinrezeptoren, unter anderem CCR7 und CXCR4, um für das Priming naiver T-Zellen in die Lymphknoten zu migrieren (131). CCR7 ist ein Rezeptor für die Chemokine CCL19 und CCL21, die von Endothelzellen hochendothelialer Venolen und Stromazellen der T-Zellzonen des Lymphknotens gebildet werden. Allerdings zeigten DCs nach Stimulation mit LPS keine höheren CCR7-Konzentrationen auf der Zelloberfläche (Abbildung 8I). Im Gegensatz dazu ließ sich eine verstärkte Expression von CXCR4 detektieren (Abbildung 8H und I).

Zusammenfassend wiesen LPS-stimulierte Zellen im Vergleich zu nicht-stimulierten lediglich in einigen Differenzierungsmarkern (vor allem Co-stimulatorische Moleküle und CXCR4) einen Reifungsprozess auf. Eine vorzeitige Aktivierung böte eine mögliche Erklärung für die geringen Unterschiede. Nichtsdestotrotz wurden die reifen DCs zum *Priming* naiver CD8⁺ T-Zellen verwendet.

3.3.2 Bestimmung der Spezifität polyklonaler CD8⁺T-Effektorzellpopulationen

96 Polyklonale CD8⁺ T-Zellpopulationen, die durch NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ peptidbeladene DCs geprägt und restimuliert wurden, sollten im nächsten Schritt auf ihre Reaktivität gegenüber dem NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ Epitop untersucht werden. Zu diesem Zweck erfolgte eine Co-Kultur mit HLA-A2⁺ NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ peptidbeladenen HeLa-Zellen. Die Konzentration an sezerniertem TNF- α wurde durch einen TNF- α -Zytotoxizitätstest ermittelt. Die Effizienz der Transfektion von HLA-A2 betrug 79,4% (Abbildung 9A und B). Eine deutliche TNF- α -Produktion war lediglich in 3 der 96 Wells zu registrieren (Abbildung 9C), die anschließend in einer ICC auf den prozentualen Anteil NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ spezifischer T-Zellen analysiert wurden. In 2 der 3 polyklonalen Populationen war eine Reaktivität von 3,5% (F3) bzw. 9,54% (D8) nachweisbar, wohingegen CD8⁺ T-Zellen aus B12 in diesem Experiment nicht durch NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ peptidbeladene HeLa-Zellen zur Produktion von IFN γ angeregt werden konnten (Abbildung 9F-K). Auch in der Negativkontrolle ließen sich in allen 3 Populationen (F3, D8 und B12) doppelpositive Zellen nachweisen (Abbildung 9 F-H). Diese Beobachtung lässt sich auf die Erkennung nicht-untersuchter HLA-A2-gebundener Epitope oder Epitope, die durch andere MHC Klasse I Moleküle präsentiert werden, zurückführen.

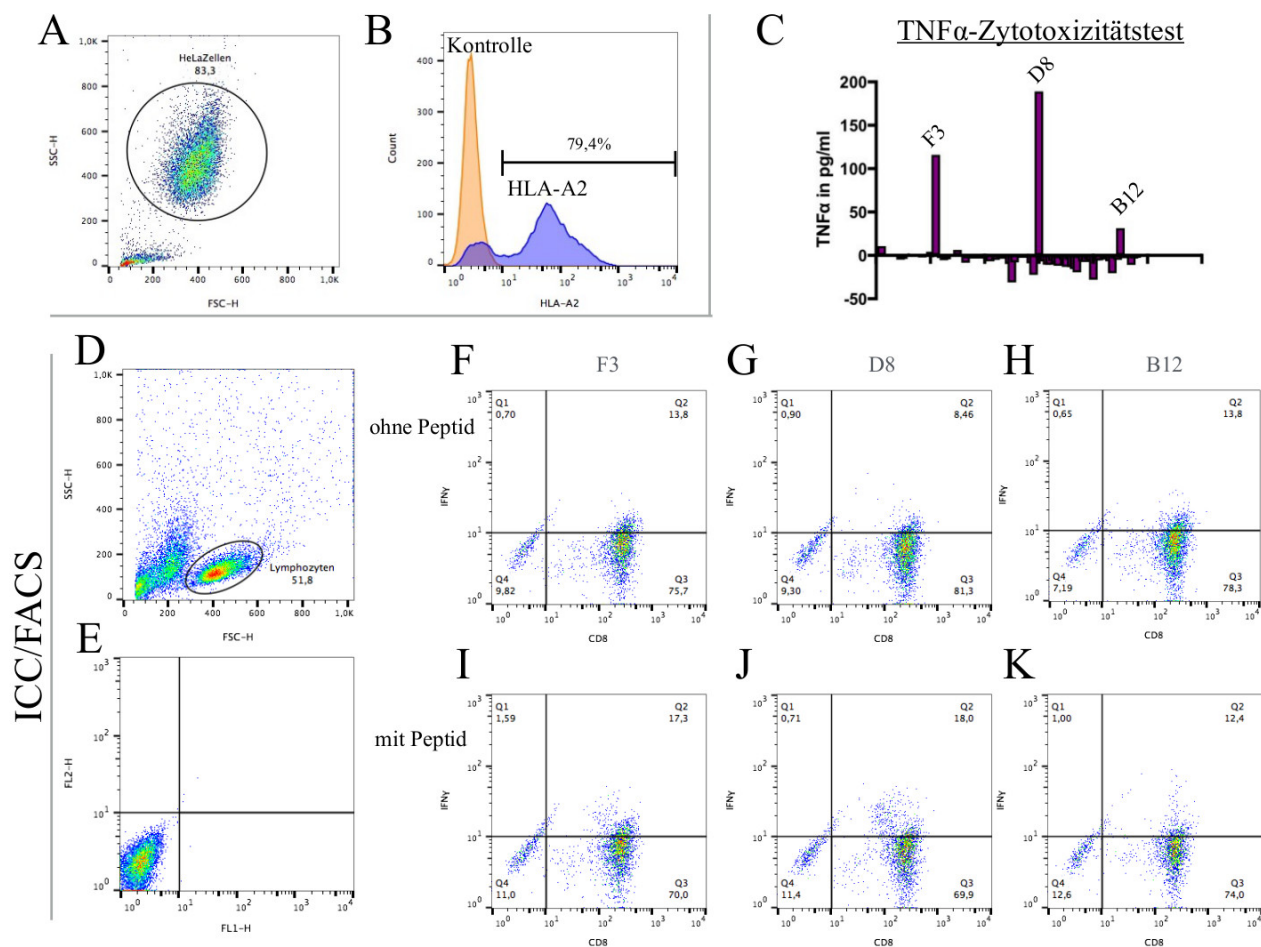


Abbildung 9: *TNF- α -Zytotoxizitätstest, ICC und FACS polyklonaler T-Effektorzellpopulationen.* Polyklonale T-Effektorzellen wurden mit HLA-A2⁺ NY-ESO-1_{157–165} peptidbeladenen HeLa-Zellen für 8h co-kultiviert und die Überstände mittels TNF- α -Zytotoxizitätstest auf den Gehalt an TNF- α sowie reaktive Wells mittels ICC und FACS auf ihren Anteil epitopspezifischer T-Zellen analysiert. In **A** ist der FSC/SSC *dotplot* von HLA-A2 transfizierten HeLa-Zellen dargestellt, in **B** der *overlay* der FL1-H (FITC-HLA-A2)-Histogramme der in **A** markierten ungefärbten (orange) bzw. HLA-A2 gefärbten (blau) Zellen. **C** TNF- α -Zytotoxizitätstest der einzelnen T-Effektorzellpopulationen. **D** zeigt den FSC/SSC *dotplot* der Co-Kultur mit entsprechender Markierung für Lymphozyten und **E** den FL1-H/FL2-H *dotplot* der in **D** markierten ungefärbten Population. **F-H** Doppelfärbung mittels FITC- und PE-gekoppelter AK gegen CD8 bzw. IFN γ nach Co-Kultur mit unbeladenen bzw. **I-K** NY-ESO-1_{157–165} peptidbeladenen HeLa-Zellen.

3.3.3 ICC und FACS-Analyse des CD8⁺T-Effektorzellklons RG39

Polyklonale CD8⁺ T-Effektorzellen aus D8 (Abbildung 9G und J) wurden in einer Einzelzellklonierung (0,3 Zellen/Well) auf Feederzellen mit IL-2 und PHA zwei Wochen zur Expansion angeregt und anschließend mittels ICC und FACS auf Klonalität untersucht. Stabil mit HLA-A2 transfizierte HeLa-Zellen (PSG33-Zellen) wurden vor Peptidbeladung und Co-Kultur auf die Expression von HLA-A2 untersucht. Circa 99% der Zellen exprimierten das gewünschte MHC Klasse I Molekül (Abbildung 10A und B). Die Färbung der gewonnenen RG5, RG39 und FE9 T-Zellpopulationen mit FITC- und PE-gekoppelten AK gegen CD8 bzw. IFN γ zeigte nach Co-

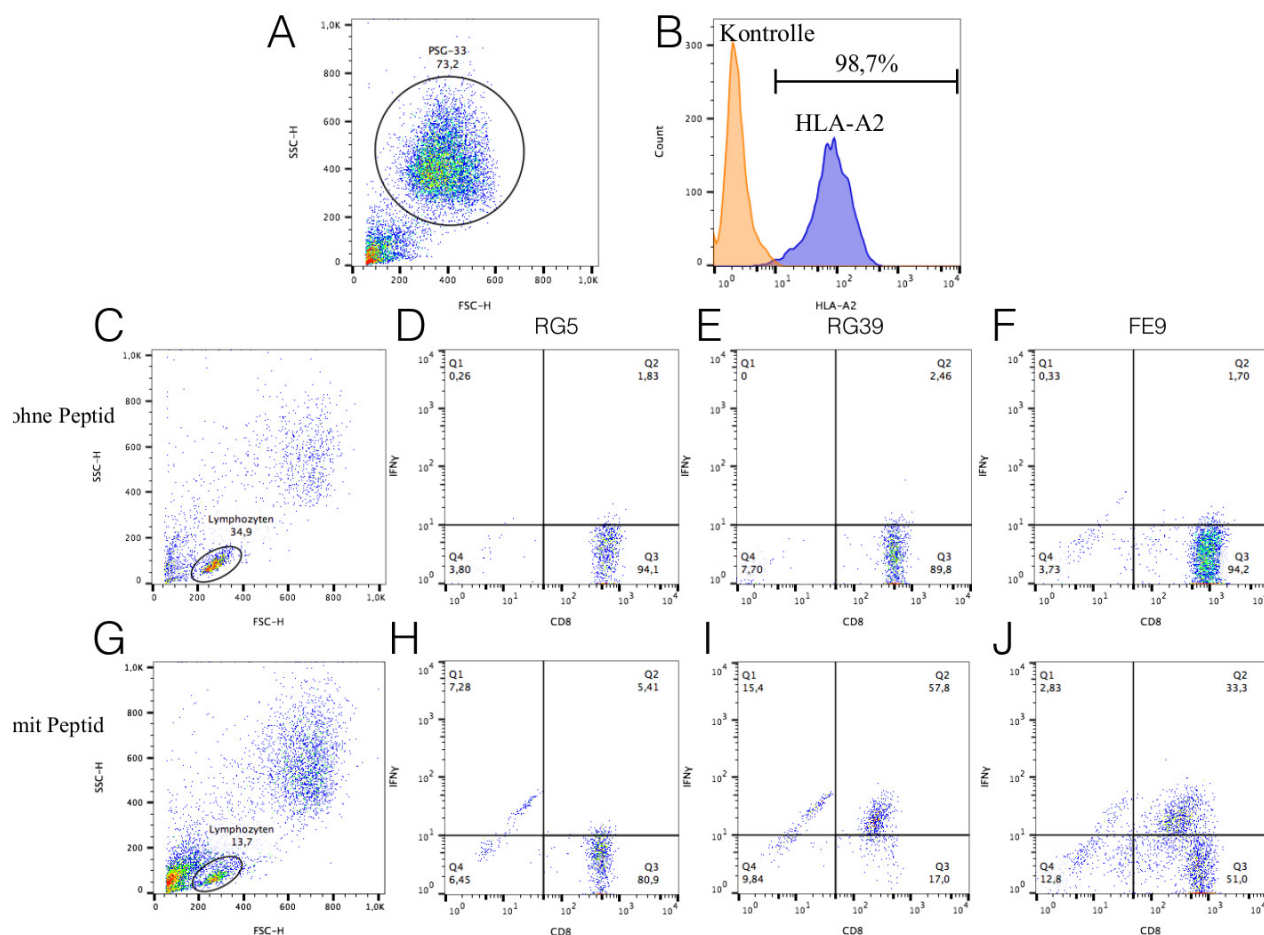


Abbildung 10: ICC und FACS-Analyse ausgewählter $CD8^+$ T-Effektorzellpopulationen der Einzelzellklonierung. Polyklonale T-Effektorzellen aus D8 wurden in einer Einzelzellklonierung mit Feederzellen über zwei Wochen co-kultiviert. Anschließend erfolgte eine 8-stündige Co-Kultur mit unbeladenen oder NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ peptidbeladenen PSG33-Zellen unter Einfluss von Brefeldin A mit ICC und FACS-Analyse. In **A** ist der FSC/SSC dotplot unbeladener PSG-33 Zellen und in **B** der FL1-H (FITC-HLA-A2)-Histogramm overlay der in **A** markierten Subpopulation ungefärbter (orange) und gefärbter (blau) Zellen dargestellt. **C** (ohne Peptid) und **G** (mit Peptid) zeigen die FSC/SSC dotplots der Co-Kulturen mit Markierungen für Lymphozyten, **D-F** (ohne Peptid) und **G-I** (mit Peptid) die FL1-H (FITC-CD8)/FL2-H (PE-IFN γ) dotplots der in **A** und **E** markierten Zellen ausgewählter T-Zellpopulationen.

Kultur mit unbeladenen PSG33-Zellen lediglich 2,67%, 1,91% bzw. 1,77% doppelpositive aller $CD8^+$ -Zellen (Abbildung 10D-F). Während die Stimulation mit NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ peptidbeladenen PSG33-Zellen im Falle von RG5 zum Nachweis von lediglich 6,27% doppelpositiven Zellen führte (Abbildung 10H), ließen sich für RG39 T-Zellen nach Co-Kultur in der $CD8^+$ Population 77,2% doppelpositive Zellen nachweisen (Abbildung 10I). Allerdings blieben 23% der $CD8^+$ T-Zellen weiterhin IFN γ -negativ, die aber lediglich den linken Rand der Verteilungskurve der IFN γ -Histogramma abbilden. Im Gegensatz dazu reagierten nur 37,83% der $CD8^+$ FE9 T-Zellen auf Epitopstimulation mit einer Zunahme der IFN γ -Produktion, während 60,4% weiterhin IFN γ negativ gefärbt wurden, wie es für eine bi- bzw. triklonale Population charakteristisch ist (Abbildung

10J). Entscheidend für die Klonalität der RG39 T-Zellen ist an dieser Stelle, dass sich die gesamte CD8⁺ Population zu stärkeren Fluoreszenzintensitäten im FL2-H (PE-IFN γ)-Kanal verschob (Abbildung 10E und I). Darüber hinaus bestätigte die Sequenzierung des TCR mittels RACE-PCR durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. Gerald Willimsky (Institut für Immunologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin), die im Rahmen der Klonierung des TCR für eine *in vivo* Charakterisierung durchgeführt wurde, die Monoklonalität der RG39 T-Zellen. Zur Auswertung der folgenden Antigenpräsentationsexperimente wurden ausschließlich NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ spezifische, monoklonale CD8⁺ RG39 T-Zellen verwendet.

3.4 Prozessierung des NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ Epitops

3.4.1 Bedeutung des Lysins K124 von NY-ESO-1

Polyubiquitinierung zum Abbau durch das 26S Proteasom designierter Proteine stellt den ersten Schritt der Antigenprozessierung eines Großteils MHC Klasse I präsentierter Peptide dar. Daraus leitete sich die Frage ab, ob der einzige Lysinrest (K124) des NY-ESO-1 Proteins als präferierte Ub-Akzeptorstelle Einfluss auf die Präsentation des HLA-A2 restringierten NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ Epitops nimmt. Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen sequentiell mit HLA-A2 sowie NY-ESO-1 oder NY-ESO-1^{K0} transfiziert und 24h später mit NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ spezifischen, monoklonalen

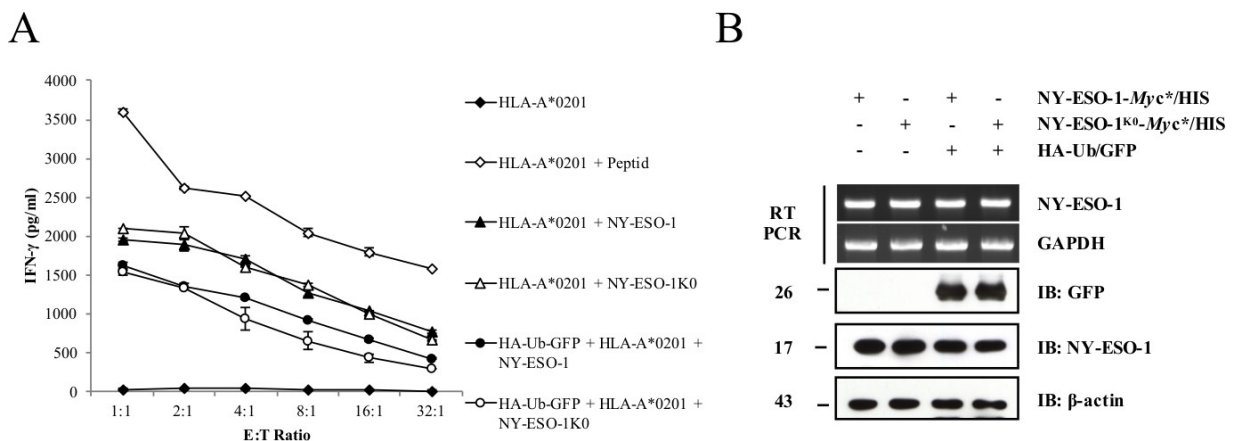


Abbildung 11: Präsentation des HLA-A2 restringierten NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ Epitops in Abhängigkeit von K124. HLA-A2⁺ HeLa-Zellen, die entweder NY-ESO-1 oder NY-ESO-1^{K0} exprimierten, wurden für 8h mit NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ spezifischen, monoklonalen CD8⁺ T-Effektorzellen co-kultiviert. Optional erfolgte eine Transfektion mit HA-Ub^{Wt}-GFP 24h vor der Transfektion mit HLA-A2 und NY-ESO-1 oder NY-ESO-1^{K0}. Als Negativ- bzw. Positivkontrolle dienten unbeladene oder NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ peptidbeladene HLA-A2⁺ HeLa-Zellen. **A** Konzentration an IFN γ der Überstände des Antigenpräsentationsexperimentes in Abhängigkeit verschiedener E:T Verhältnisse. Dargestellt sind die Mittelwerte (n=2) mit den jeweiligen Standardabweichung (SD) als Fehlerbalken eines repräsentativen von drei unabhängigen Experimenten. **B** Die gleichmäßige Expression der Konstrukte wurde mittels RT-PCR auf mRNA Ebene und mittels WB auf Proteinebene verifiziert. Als Ladekontrolle diente die Menge an GAPDH mRNA oder β -Actin Protein.

RG39 T-Zellen für 8h co-kultiviert. Die Analyse der Überstände auf ihren Gehalt an IFN γ mittels ELISA demonstrierte, dass es in der Präsentation des untersuchten Epitops keinen Unterschied gab, ungeachtet der Tatsache, ob die Zellen das WT- oder das Lysin-freie Protein exprimierten (Abbildung 11A). Eine zusätzliche Stimulation der Zellen mit HA-Ub^{Wt}-GFP, jeweils 24h vor Transfektion mit HLA-A2 und NY-ESO-1 bzw. NY-ESO-1^{K0}, erbrachte keinen zusätzlichen Effekt. Sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene wurden beide Konstrukte unter den untersuchten Bedingungen gleichmäßig exprimiert (Abbildung 11B). Um weiterhin auszuschließen, dass RG39 T-Zellen im Zuge der Expansion ihre Spezifität verloren haben, wurden zusätzlich unbeladene und NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ Epitop-beladene HLA-A2⁺ HeLa-Zellen mit RG39 T-Zellen co-kultiviert. Diese zeigten keine bzw. eine deutlich stärkere Aktivierung als durch Transfektion mit NY-ESO-1 bzw. NY-ESO-1^{K0} erreicht werden konnte (Abbildung 11A).

3.4.2 Beteiligung des lysosomalen Kompartments

NY-ESO-1 und NY-ESO-1^{K0} unterschieden sich nicht in der Fähigkeit, RG39 T-Zellen zur Synthese von IFN γ zu stimulieren. Zudem wurde in früheren Arbeiten bei Einsatz des proteasomalen Inhibitors Lactacystin kein Effekt auf die Präsentation des NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ Epitops beobachtet (116). Aus diesem Grund stellte sich zunächst die Frage, ob das NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ Epitop über einen alternativen Prozessierungsweg gebildet wird. Lysosomal generierte Peptide dienen in erster Linie der Beladung von MHC Klasse II Molekülen. Allerdings existieren Untersuchungen, die vor allem im Kontext einer viralen Infektion darlegen, dass MHC Klasse I Moleküle mit Peptiden beladen werden können, die durch lysosomale Prozessierung autophagozytierter Proteine entstanden sind (132). Um die proteolytische Aktivität der Lysosomen zu reduzieren, wurden HLA-A2⁺ HeLa-Zellen, die entweder NY-ESO-1 oder NY-ESO-1^{K0} exprimierten, für 24h mit NH₄Cl behandelt, wodurch der für die Aktivitäten der Cathepsine essentiell saure pH-Wert neutralisiert wurde (133). Die erfolgreiche Inhibition des lysosomalen Kompartments wurde durch die Akkumulation der Prä-Proform von Cathepsin D, einer wichtigen lysosomalen Protease sowie deren verminderter Prozessierung zur reifen Form deutlich (Abbildung 12B). In einer entsprechenden Co-Kultur mit RG39 T-Zellen konnte eine vergleichbare Produktion an IFN γ beobachtet werden egal, ob die Zellen NH₄Cl ausgesetzt worden waren oder nicht (Abbildung 12A). Diese Beobachtung galt sowohl für NY-ESO-1, als auch für NY-ESO-1^{K0}. Gleichzeitig zeigte sich durch die Behandlung mit NH₄Cl ebenfalls keine Veränderung im *steady state* Level des reifen NY-ESO-1 Proteins.

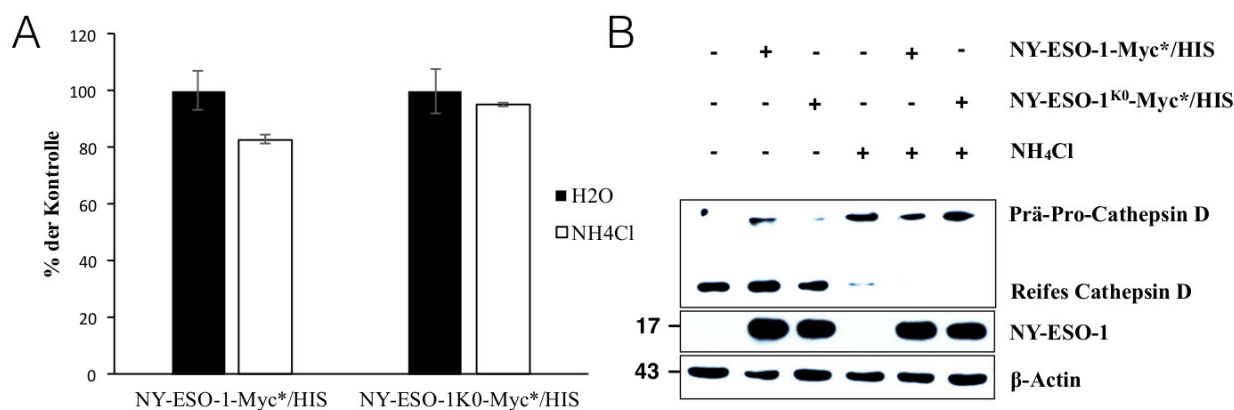


Abbildung 12: Einfluss des lysosomalen Kompartments auf die Präsentation des NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ Epitops. **A** HLA-A2⁺ HeLa-Zellen, die entweder NY-ESO-1 oder NY-ESO-1^{K0} exprimierten, wurden mit 30mM NH₄Cl für 24h behandelt und anschließend mit RG39 T-Zellen für 8h co-kultiviert. Die Überstände wurden mittels ELISA auf ihre IFN γ -Konzentration analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (n=2) mit SD der E:T Ratio 1:1 eines repräsentativen von drei unabhängigen Experimenten. **B** Die Expression von NY-ESO-1, β -Actin und Cathepsin D wurde mittels SDS-PAGE und WB aus Zelllysaten kontrolliert.

3.4.3 Einfluss der katalytisch aktiven Untereinheiten des Standardproteasoms

Da eine lysosomale Beteiligung an der Prozessierung des NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ Epitops nicht nachgewiesen werden konnte, sollte im nächsten Schritt der Einfluss des 20S Proteasoms auf die Antigenpräsentation untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden HLA-A2- und NY-ESO-1- bzw. NY-ESO-1^{K0}-transfizierte HeLa-Zellen für 2h mit PR893(125nM), YU-102 (500nM), Epoxomicin (250nM), PR893 (125nM)/YU-102 (500nM) oder YU-102 (500nM)/Epoxomicin (250nM) behandelt. PR893 ist ein spezifischer Inhibitor für die chymotryptische Aktivität von β 5 (134) und YU-102 hemmt in niedrigen Konzentrationen (500nM) sehr selektiv die PGPH-Aktivität von β 1 (135). Epoxomicin hingegen inhibiert bei 15nM lediglich die ChT-Aktivität von β 5, jedoch in höheren Konzentrationen (250nM) ebenfalls die Tr-Aktivität von β 2 (136). Die kovalente Bindung der Inhibitoren an ihre jeweilige Standarduntereinheit, die sich in einem langsameren Laufverhalten des Proteins in der SDS-PAGE widerspiegelte, wurde anhand der Positionsänderung der Bande in Richtung größerer Molekulargewichte deutlich. Die idealen Inhibitorkonzentrationen wurden in Titrationsversuchen ermittelt (Ebstein et al., unveröffentlichte Daten).

Sowohl die alleinige Behandlung von HLA-A2⁺ HeLa-Zellen, die NY-ESO-1 oder NY-ESO-1^{K0} exprimierten, mit PR893, als auch der zusätzliche Einsatz von PR893 zu YU-102 zeigte im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (DMSO bzw. YU-102 allein) keinen Effekt auf die Präsentation des HLA-A2 restringierten NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ Epitops (Abbildung 13C und D). Gleichzeitig war eine langsamere Laufgeschwindigkeit ausschließlich der β 5-Untereinheit im Immunoblot (IB) zu beobachten (Abbildung 13A und B), was die Wirksamkeit und Spezifität des β 5-Inhibitors unter-

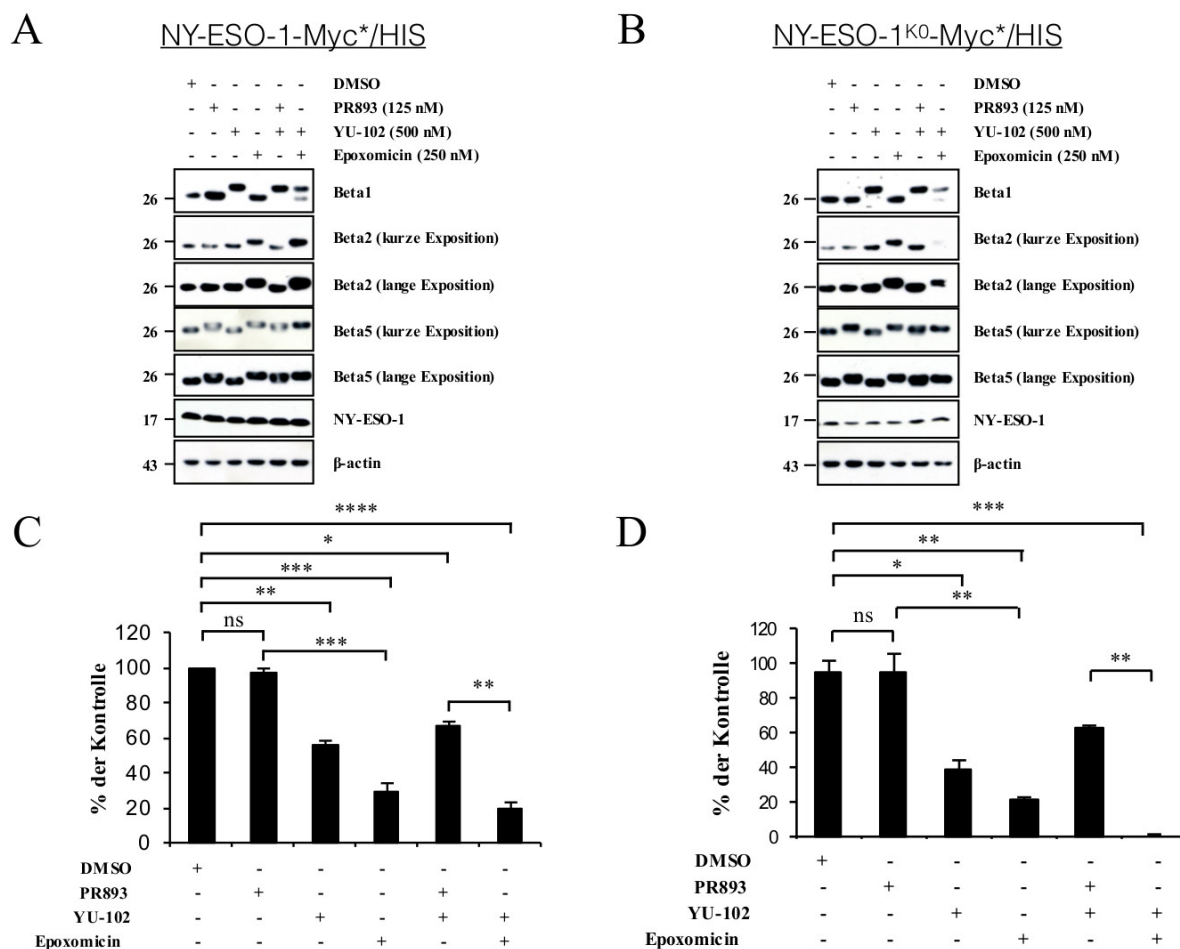


Abbildung 13: Einfluss der proteasomalen UE $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ auf die Prozessierung des NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ Epitops. HLA-A2⁺ HeLa-Zellen, die entweder NY-ESO-1 (**A und C**) oder NY-ESO-1^{K0} (**B und D**) exprimierten, wurden mit den Proteasominhibitoren PR893 (125nM), YU-102 (500nM), Epoxomicin (250nM), PR893(125nM)/YU-102 (500nM) oder YU-102 (500nM)/Epoxomicin (250nM) für 2h behandelt und anschließend mit RG39 T-Zellen für 8h co-kultiviert. **A und B** Zelllysate der behandelten und unbehandelten HeLa-Zellen wurden mittels SDS-PAGE und IB auf die Expression von NY-ESO-1, β -Actin sowie der proteasomalen Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ untersucht. **C und D** Die Überstände der Co-Kultur wurden mittels ELISA auf ihre IFN γ -Konzentration analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von Duplikaten mit SD der E:T Ratio 1:1 aus einem repräsentativen von drei unabhängigen Experimenten (****<0,0001, ***<0,001, ** p<0,01; * p<0,05; nachgewiesen mittels *one-way ANOVA*).

strich. Im Gegensatz dazu führte der Einsatz von YU-102 nicht nur zu einer veränderten Position der Bande für $\beta 1$ im IB in Richtung eines höheren Molekulargewichtes (Abbildung 13A und B), sondern auch zu einer substantiellen, jedoch nicht vollständigen Reduktion der Antigenpräsentation (Abbildung 13C und D). Diese Beobachtung galt für das WT- und das Lysin-freie Protein. Wurden die Zellen mit Epoxomicin behandelt, verringerte sich die gemessene Antigenpräsentation auf 30% (NY-ESO-1) bzw. 22% (NY-ESO-1^{K0}) im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen. Die Wirksamkeit von Epoxomicin bildete sich in der Größenzunahme der $\beta 5$ - und $\beta 2$ -Bande im Kontrollblot ab (Abbildung 13A und B). Eine langsamere Laufgeschwindigkeit von $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ in

der SDS-PAGE nach kompletter Inhibition aller katalytischen Untereinheiten unter Verwendung von Epoxomicin und YU-102 war begleitet von einer drastischen Reduktion der IFN γ -Produktion von 80% (NY-ESO-1) bzw. 100% (NY-ESO-1^{K0}), was den Einfluss des 20S Proteasoms auf die Epitopgenerierung unterstreicht.

3.4.4 Die Prozessierung durch das Immunoproteasom

Um zu überprüfen, welche Rolle das IP in der Prozessierung des NY-ESO-1_{157–165} Epitops spielt, wurden 33/2-Zellen mit siRNA für LMP2, LMP7, LMP2/LMP7 oder Kontroll-siRNA behandelt und nach Transfektion mit NY-ESO-1 oder NY-ESO-1^{K0} für 8h mit RG39 Zellen co-kultiviert. Der *knock-down* von LMP7 alleine zeigte für beide Proteinvarianten keinen Effekt auf die An-

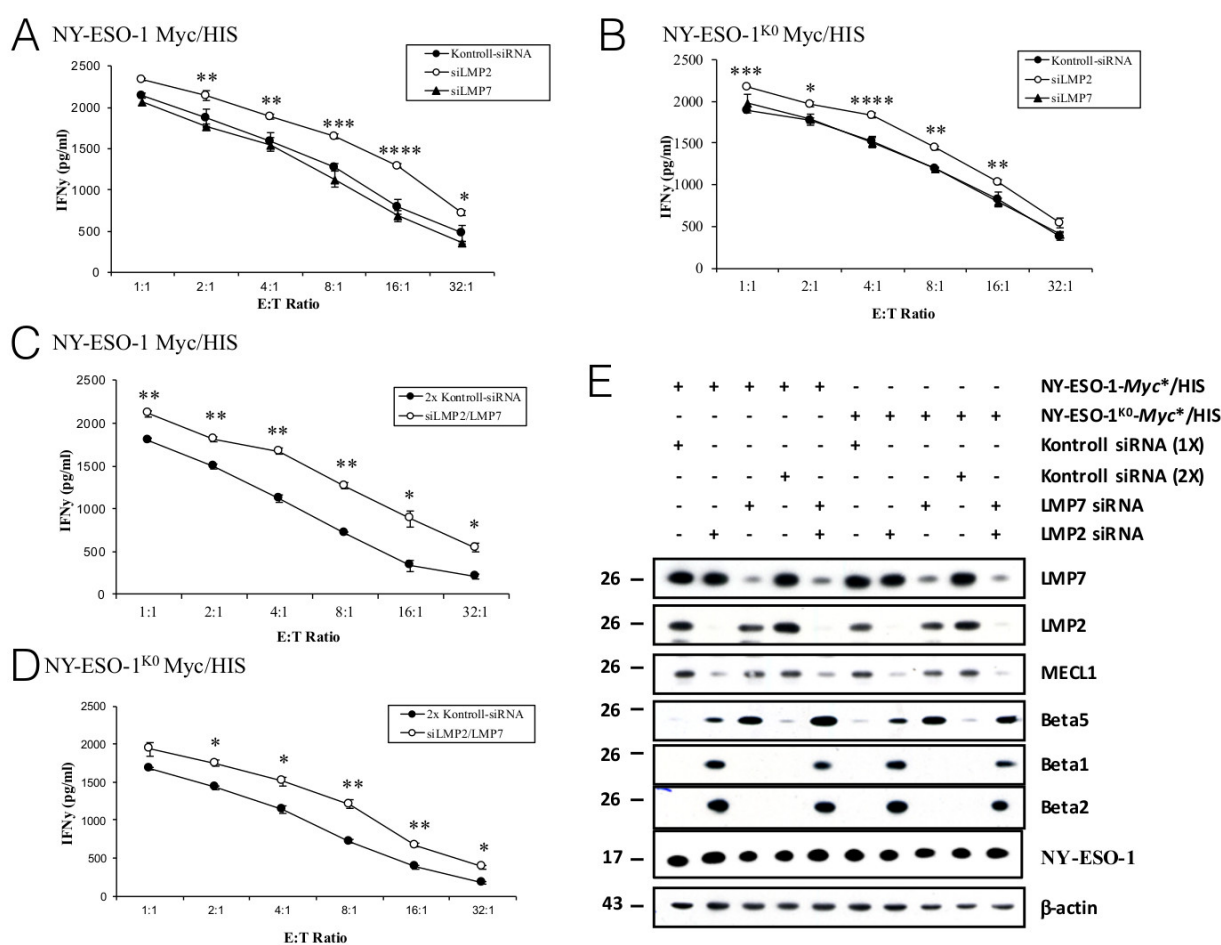


Abbildung 14: Beteiligung des IP an der NY-ESO-1_{157–165} Epitopgenerierung. A, B, C und D 33/2-Zellen, wurden mit Kontroll siRNA, siRNA gegen LMP2, LMP7 oder LMP2/LMP7 für zwei Tage behandelt und anschließend mit NY-ESO-1 oder NY-ESO-1^{K0} transfiziert. Die Co-Kultur mit RG39 T-Zellen fand für 8h statt und die Überstände wurden mittels ELISA auf ihren IFN γ -Gehalt analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (n=2) mit SD eines repräsentativen von drei unabhängigen Experimenten (**** p<0,0001, *** p<0,001, ** p<0,01; * p<0,05; nachgewiesen für A und B mittels *one-way ANOVA* und für C und D mittels unabhängigem t-Test). E Die Wirksamkeit der siRNA wurde mittels SDS-PAGE und IB gegen LMP2, Mecl-1, LMP7, β 1, β 2 und β 5 kontrolliert. NY-ESO-1 diente als Transfektions- und β -Actin als Ladekontrolle.

tigenpräsentation (Abbildung 14A und B). Er wurde begleitet von einer verminderten Detektion von LMP7 im IB bei gleichzeitig verstärkter Expression der korrespondierenden Standarduntereinheit $\beta 5$ (Abbildung 14E). Interessanterweise blieb der Einbau von LMP2 und Mecl-1 unter diesen Bedingungen unverändert. Im Gegensatz dazu verbesserte sich sowohl für NY-ESO-1 als auch NY-ESO-1^{K0} die Antigenpräsentation signifikant durch den Einsatz von siRNA gegen LMP2 (Abbildung 14A und B), als auch gegen LMP2 und LMP7 (Abbildung 14C und D), verglichen mit der jeweiligen Kontrolle (1x bzw. 2x Kontroll-siRNA). Der inhibierende Effekt von siRNA gegen LMP2 richtete sich nicht nur auf die Translation von LMP2, sondern auch auf die von Mecl-1 und führte zu einem vermehrten Einbau der Standarduntereinheiten $\beta 1$ und $\beta 2$ (Abbildung 14E). Die Anwendung von siRNA gegen LMP2 und LMP7 resultierte in einer Komposition der katalytisch aktiven Untereinheiten, die typisch für das SP ist, mit der Expression von $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ sowie einer parallel verminderten Biosynthese von LMP2, Mecl-1 und LMP7 (Abbildung 14E). Demzufolge wiesen SP und LMP7-IntP gegenüber IP eine verbesserte Generierung des NY-ESO-1_{157–165} Epitops auf.

3.4.5 Einfluss der Ubiquitinrezeptoren Rpn10 und Rpn13

Die Ergebnisse aus 3.4.3 und 3.4.4 verdeutlichen, dass die Präsentation des NY-ESO-1_{157–165} Epitops direkt von der Aktivität des 20S Proteasoms abhängig war, obwohl sich kein Unterschied zwischen WT- und Lysin-freiem Protein detektieren ließ. Aus diesem Grund sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob die Antigenpräsentation durch die Ub-Rezeptoren Rpn10 und Rpn13 des 26S Proteasoms beeinflusst wird. Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen für drei Tage mit siRNA gegen Rpn10, Rpn13, Rpn10/Rpn13 oder Kontroll-siRNA behandelt und anschließend mit HLA-A2 sowie einem der beiden NY-ESO-1 Varianten transfiziert.

Die Präsentation des NY-ESO-1_{157–165} Epitops war, ungeachtet der Tatsache welches der beiden NY-ESO-1 Proteine die Zellen exprimierten, vollständig von der Anwesenheit des Ub-Rezeptors Rpn10 abhängig (Abbildung 15A und B). Lediglich eine leichte, jedoch signifikante Reduktion der Antigenpräsentation war für beide Proteinvarianten bei Verwendung von siRNA gegen Rpn13 zu beobachten (Abbildung 15A und B), obwohl Rpn13 Protein im IB nicht mehr nachweisbar war (Abbildung 15C). Der Doppel-*knock-down* von Rpn10 und Rpn13 zeigte für beide Proteinvarianten eine substantielle Inhibition der Antigenpräsentation. Interessanterweise war diese zwar stärker als bei Einsatz von siRNA gegen Rpn13 allein, erreichte jedoch nicht den Effekt des Einzel-*knock-down* von Rpn10 (Abbildung 15A und B). Dies erscheint unter dem Gesichtspunkt logisch, dass durch die Behandlung mit siRNA gegen Rpn10 und Rpn13, zwar kein Rpn13-, aber immer noch Rpn10-Protein im IB detektiert wurde (Abbildung 15C).

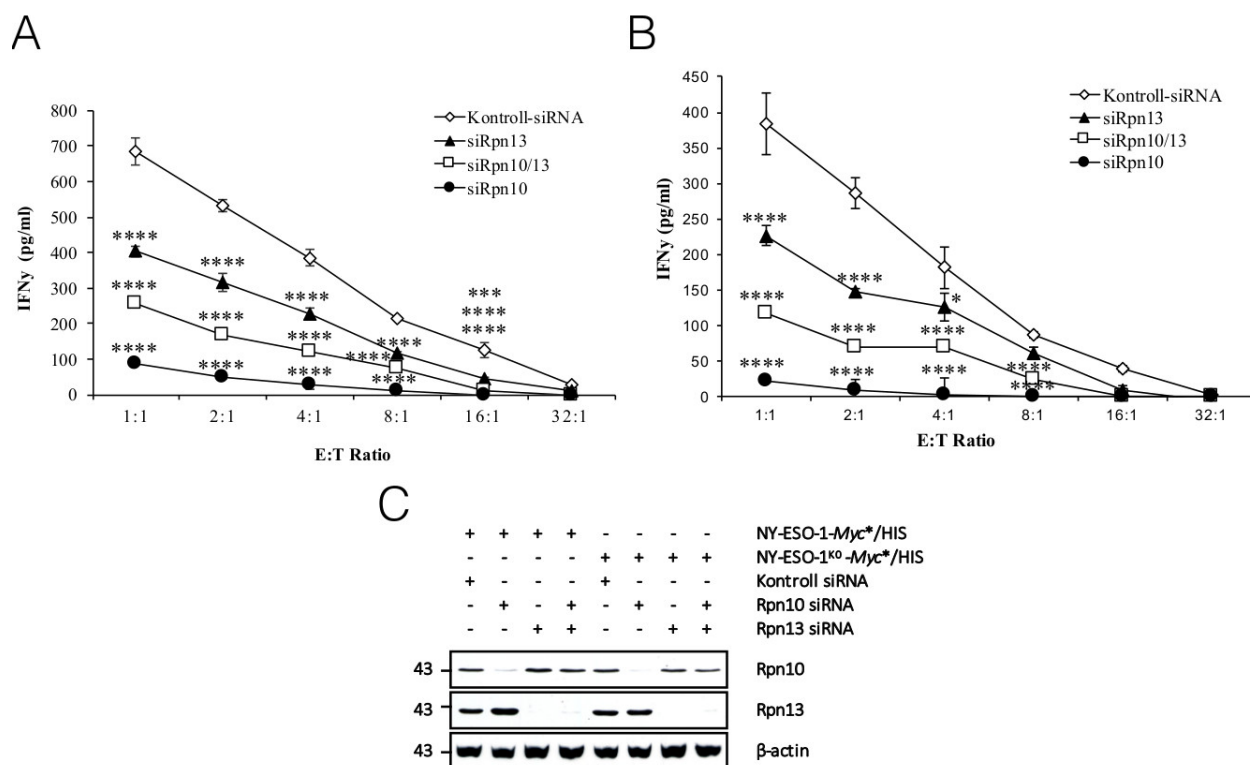


Abbildung 15: Einfluss der Ub-Rezeptoren Rpn10 und Rpn13 auf die Präsentation des NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ Epitops. HeLa-Zellen wurden über drei Tage mit siRNA gegen Rpn10, Rpn13, Rpn10/Rpn13 oder Kontroll-siRNA behandelt. **A und B** Die Auswirkung auf die Antigenpräsentation wurde mittels einer 8-stündigen Co-Kultur mit RG39 T-Zellen und anschließendem ELISA der Überstände auf IFN γ -Konzentration ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte (n=2) mit SD eines repräsentativen von drei unabhängigen Experimenten (**** p<0,0001*** p<0,001; ** p<0,01; * p<0,05; nachgewiesen mittels *one-way ANOVA*). **C** Die Wirksamkeit der siRNA erfolgte mittels SDS-PAGE und WB gegen Rpn10 und Rpn13. β -Actin diente als Ladekontrolle.

3.4.6 Modifikation durch unterschiedliche Polyubiquitinketten

Da die Präsentation des NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ Epitops nicht nur absolut proteasomal, sondern auch vollständig von der Anwesenheit des Ub-Rezeptors Rpn10 des 19S RP abhängig war, stellte sich die Frage, ob bestimmte Arten von Poly-Ub-Ketten die Bildung des antigenen Peptids begünstigen. Zu diesem Zweck diente eine Reihe von HA-Ub-GFP-Konstrukten, in denen jeweils eines von sieben oder alle Lysine durch Arginine substituiert wurden. Die entstandenen Konstrukte erhielten die Bezeichnungen HA-Ub^{K6R}-, HA-Ub^{K11R}-, HA-Ub^{K27R}-, HA-Ub^{K29R}-, HA-Ub^{K33R}-, HA-Ub^{K48R}- und HA-Ub^{K63R}-GFP (HA-Ub^{KxR}-GFP) sowie HA-Ub^{K0} (Ebstein et al., unveröffentlichte Daten). HeLa-Zellen wurden daraufhin mit HA-Ub^{Wt}-, HA-Ub^{K0}-GFP oder einem der sieben HA-Ub^{KxR}-GFP Mutanten sowie 48h später mit HLA-A2 und NY-ESO-1 oder NY-ESO-1^{K0} transfiziert. Der Einfluss auf die Antigenpräsentation wurde in einer 8-stündigen Co-Kultur mit RG39 T-Zellen evaluiert und die gleichmäßige Expression der HA-Ub-GFP-Konstrukte durch einen IB gegen GFP kontrolliert. Die Analyse der Überstände mittels ELISA auf die Konzentration an IFN γ zeigte für

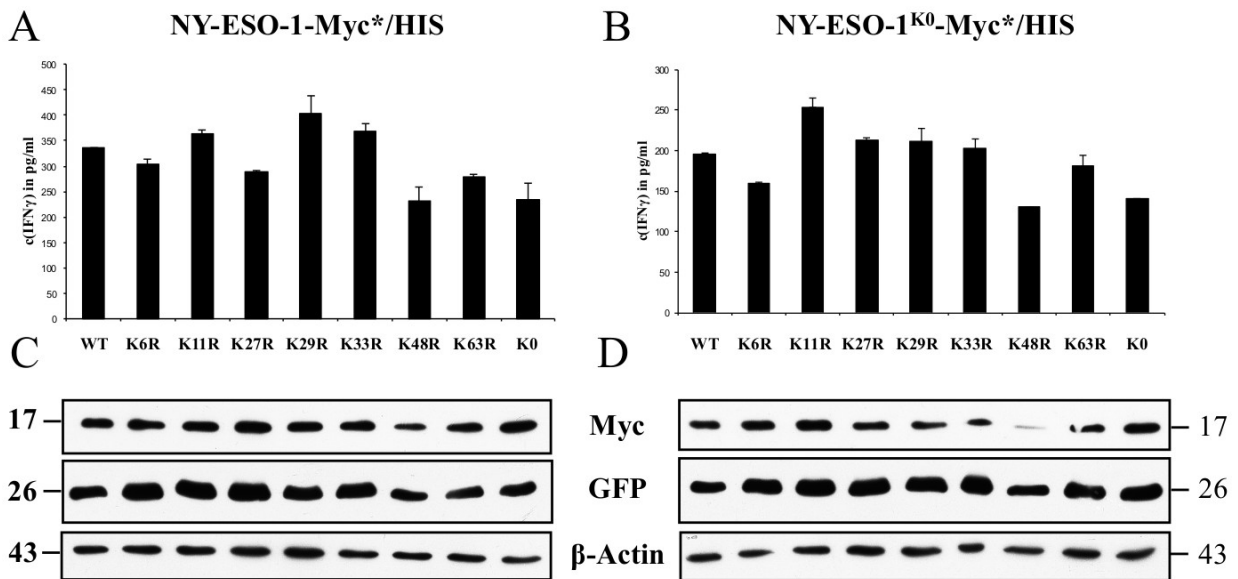


Abbildung 16: Einfluss unterschiedlicher Ub-Ketten auf die Präsentation des NY-ESO-1_{157–165} Epitops. HeLa-Zellen wurden sequentiell mit HA-Ub^{Wt}-, HA-Ub^{K0}- oder einem der HA-Ub^{KxR}-GFP-Konstrukte sowie HLA-A2 und NY-ESO-1 oder NY-ESO1^{K0} transfiziert. **A und B** Der Einfluss der einzelnen Ub-Mutanten auf die Antigenpräsentation wurde mit Hilfe einer 8-stündigen Co-Kultur mit RG39 T-Zellen sowie Analyse der Überstände auf ihre IFN γ -Konzentration mittels ELISA ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte (n=2) mit SD der IFN γ -Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle (HA-Ub^{Wt}-GFP) des E:T-Verhältnisses 1:1 eines repräsentativen von zwei unabhängigen Experimenten. **C und D** Zelllysate der einzelnen Experimente wurden mittels SDS-PAGE und WB auf die Expression von Myc, GFP und β -Actin untersucht.

beide Proteinvarianten eine leichte, jedoch nicht signifikante Verbesserung der Antigenpräsentation bei Fehlen von K11-, K29- und K33- sowie eine leichte, ebenfalls nicht signifikante Reduktion bei Fehlen von K6-Poly-Ub-Ketten im Vergleich zu HA-Ub^{Wt}-GFP transfizierten Zellen (Abbildung 16A und B). Nahezu keine Unterschiede bezüglich der IFN γ -Produktion ließen sich hingegen bei Einsatz von HA-Ub^{K27R}- und -Ub^{K63R}-GFP detektieren. Die Verwendung der K48R Mutante zeigte für beide Proteinvarianten eine Reduktion der Präsentation des NY-ESO-1_{157–165} Epitops (um 22% für NY-ESO-1 und um 20% für NY-ESO-1^{K0}). Jedoch war gleichzeitig ein deutlich verminderter Nachweis reifer NY-ESO-1 Proteine im anti-Myc IB bei gleichmäßiger Expression der Ladekontrolle (β -Actin) im Vergleich zu HA-Ub^{Wt}-GFP transfizierten Zellen zu beobachten (Abbildung 16C und D). Überraschenderweise vermochte nicht einmal die Lysin-freie Ub-Mutante, HA-Ub^{K0}-GFP, deren Wirkung auf die Polyubiquitinierung von NY-ESO-1 bzw. aller Zellproteine an anderer Stelle untersucht wurde (Abbildung 21), die Präsentation des NY-ESO-1_{157–165} Epitops signifikant zu reduzieren (Abbildung 16A und B).

3.5 Ubiquitinierungsprofil der NY-ESO-1 Proteine

3.5.1 Gesamtpolyubiquitinierungsprofile von NY-ESO-1 und NY-ESO-1^{K0}

Aus der Beobachtung, dass die Präsentation des NY-ESO-1_{157–165} Epitops durch die Abwesenheit von Rpn10 drastisch reduziert wurde, ließ sich schlussfolgern, dass sowohl NY-ESO-1 als auch NY-ESO-1^{K0} Ub-abhängig durch das 26S Proteasom abgebaut wurden. In diesem Zusammenhang sollte der Einfluss des einzigen Lysinrestes auf das Polyubiquitinierungsprofil von NY-ESO-1 ermittelt werden. Hierfür wurden HeLa-Zellen sequentiell mit HA-Ub^{Wt}-GFP und pcDNA3.1, NY-ESO-1, NY-ESO-1^{K0} oder MART-1 transfiziert. Zur Anreicherung von Poly-Ub-Konjugaten erfolgte 16h nach der zweiten Transfektion für 6h eine Behandlung mit 10 μ M MG132 oder DMSO als Kontrolle. Myc-markierte Proteine wurden in einer IPräz isoliert und mittels SDS-PAGE und

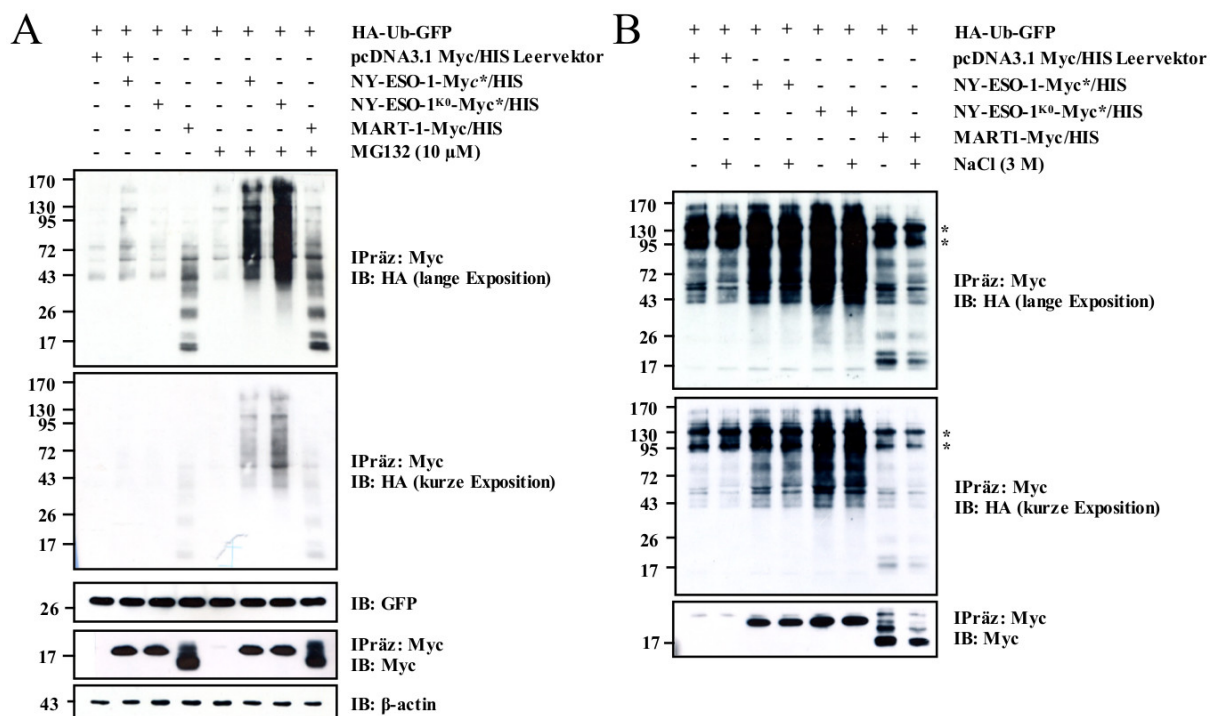


Abbildung 17: Einfluss der K124R Substitution auf das Gesamtubiquitinierungsprofil von NY-ESO-1. **A** HA-Ub^{Wt}-GFP-transfizierte HeLa-Zellen, die entweder pcDNA3.1, NY-ESO-1, NY-ESO-1^{K0} oder MART-1 exprimierten, wurden für 6h mit 10 μ M MG132 behandelt und Myc-markierte Proteine durch eine IPräz gegen Myc isoliert. Zum Nachweis polyubiquitiniertes Substrate wurden die Eluate durch SDS-PAGE (7,5%-iges Gel) aufgetrennt und im WB mit einem AK gegen HA detektiert. Als Kontrolle gleicher Mengen an präzipitierten Proteinen diente der IB gegen Myc, als Transfektionskontrolle die gleichmäßige Expression von GFP im Lysat sowie β -Actin als Ladekontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten. **B** Das gleiche Experiment wurde in analoger Weise durchgeführt und während der Reinigung auf der 10M Säule mit 50mM oder 3M NaCl gewaschen. * Markieren unspezifische Banden, die ebenfalls nach Isolation Myc-markierter Proteine von pcDNA3.1 transfizierten HeLa-Zellen (Negativkontrolle) auftauchen. Dargestellt ist ein repräsentatives von zwei unabhängigen Experimenten.

WB analysiert.

Beide Proteinvarianten hoben sich in ihrem Gesamtpolyubiquitinierungsprofil lediglich nach proteasomaler Inhibition durch MG132 deutlich von der Negativkontrolle (pcDNA3.1 Leervektor) ab, während sich nach Behandlung mit DMSO keine Unterschiede detektieren ließen (Abbildung 17A). Die Lysin-freie Variante von NY-ESO-1 war unter diesen Bedingungen im Vergleich zum WT-Protein sogar stärker ubiquitiniert, was sich in der vergleichsweise stärkere Bindung von HA-AK an Myc-präzipitierte Substrate widerspiegelte. Dieser Unterschied war nur detektierbar, wenn die Zellen mit MG132 behandelt worden waren, um proteasomalen Abbau zu hemmen.

Um auszuschließen, dass die Polyubiquitinierung nicht-kovalent an NY-ESO-1 gebundener Proteine mit der von NY-ESO-1 interferieren könnte, wurde der gleiche Versuch unter stringenteren Waschbedingungen im Verlauf der IPräz durchgeführt. Dafür wurde die NaCl-Konzentration während der Reinigung auf der 10 μ Säule im Waschpuffer 1 auf 3M erhöht, damit potentiell nicht-kovalent an NY-ESO-1 gebundene Proteine gelöst würden. Somit nahm das Poly-Ub-Signal auch unter verschärften im Vergleich zu Standardwaschbedingungen nicht ab (Abbildung 17B). Es lässt sich also schlussfolgern, dass die im IB detektierte Polyubiquitinierung der von NY-ESO-1 entsprach.

3.5.2 Qualitative Unterschiede der Ubiquitinierung

Serin- und Threonin-gebundene Ubiquitinierung

Aufgrund der Tatsache, dass die Lysin-freie Form von NY-ESO-1 stärker polyubiquitiniert wurde als das Wildtypprotein (Abbildung 17A), blieb zu klären, ob alternative Akzeptorstellen zur Verknüpfung von Poly-Ub-Ketten in NY-ESO-1^{K0} verwendet wurden. Zur Identifizierung Serin- bzw. Threonin gebundener Ub-Konjugate wurden Myc-markierte Proteine aus sequentiell mit HA-Ub^{Wt}-GFP und pcDNA3.1, NY-ESO-1, NY-ESO-1^{K0} oder MART-1 transfizierten HeLa-Zellen, die einer 6-stündigen Behandlung mit 10 μ M MG132 ausgesetzt worden waren, durch eine IPräz in bekannter Weise isoliert. Nach Reinigung der Präzipitate wurde über Carboxyester-gebundenes Ub durch eine Behandlung mit 50mM Natronlauge aus seiner Bindung gelöst. Die Analyse der Eluate mittels SDS-PAGE und IB unter Nutzung eines AK gegen HA zeigte sowohl für NY-ESO-1 als auch für NY-ESO-1^{K0} eine deutlich verringerte Menge an gebundenem HA-Ub (Abbildung 18A). Dieses Ergebnis wies auf Serin/Threonin-gebundene Poly-Ub-Ketten hin. Gleichzeitig blieben die quantitativen Verhältnisse der Polyubiquitinierung aus Abbildung 17 auch durch die Behandlung mit NaOH stabil.

In diesem Experiment kam auch ein Ub-AK (FK2) zum Einsatz, der lediglich K29-, K48- und K63-verknüpfte Ub-Ketten erkennt. Dieser offenbarte deutlich mehr NaOH-resistente Ub-Konjugate auf

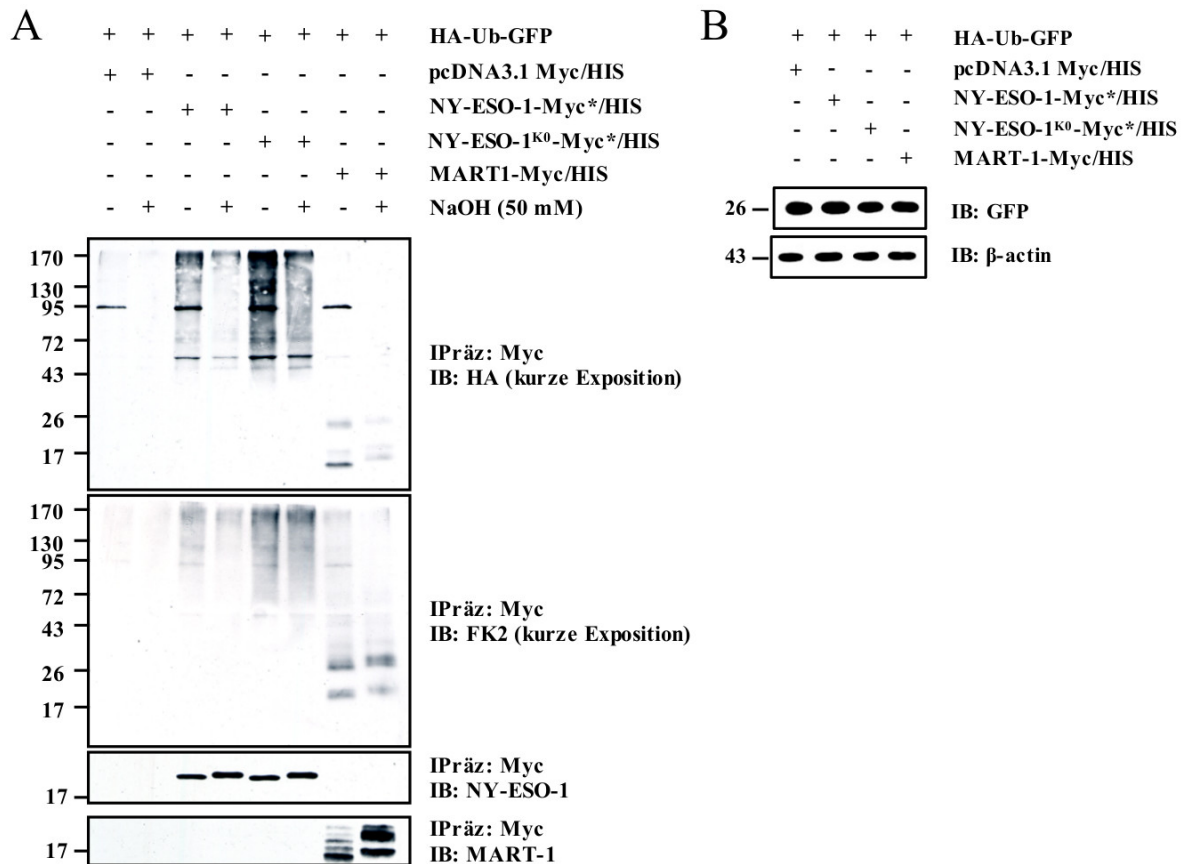


Abbildung 18: Serin- und Threonin-gebundene Ub-Konjugate. **A** HeLa-Zellen wurden sequentiell mit HA-Ub^{Wt}-GFP und pcDNA3.1, NY-ESO-1, NY-ESO-1^{K0} oder MART-1 transfiziert und Myc-markierte Proteine mittels einer IPräz isoliert. Zur Spaltung Carboxyester-gebundener Poly-Ub-Ketten wurden die an die Säule gebundenen Proteine gewaschen, eluiert und anschließend mit 50mM NaOH-Lösung behandelt sowie unter Nutzung äquimolarer Mengen an HCl neutralisiert. Der Nachweis polyubiquitinerter Substrate gelang durch Auftrennung der Eluate mittels SDS-PAGE und IB mit AK gegen HA und Ub (FK2). Als Kontrolle gleicher Mengen an präzipitierten Proteinen diente der IB gegen Myc. **B** Die Transfektion gleicher Mengen an HA-Ub^{Wt}-GFP wurden durch Analyse der Zelllysate mittels SDS-PAGE und WB gegen GFP und β -Actin sichergestellt. Dargestellt ist ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten.

NY-ESO-1^{K0} als auf dem Wildtypprotein (Abbildung 18A). Nach Behandlung mit NaOH zeigten NY-ESO-1, NY-ESO-1^{K0} und MART-1 ein leicht verzögertes Laufverhalten in der SDS-PAGE, wie es für andere Proteine nach analoger Behandlung bereits beobachtet worden war (137).

N-terminale Ubiquitinierung

Um zu untersuchen, ob die α -NH₂ Gruppe des N-terminalen Methionins eine mögliche Ub-Akzeptorstelle darstellt, wurden die NY-ESO-1- bzw. NY-ESO-1^{K0}-Konstrukte N-terminal mit V5/TEV verlängert (3.1.3). Sie enthielten, außer einem Threonin distal der TEV-Schnittstelle exakt vor dem ehemaligen Methionin 1 des NY-ESO-1 Proteins, keine zusätzlichen Polyubiquitinierungsstellen. HeLa-Zellen wurden daraufhin sequentiell mit HA-Ub^{Wt}-GFP und pcDNA3.1, V5/TEV NY-ESO-1^{M20V}, V5/TEV NY-ESO-1^{M20V,K0} oder MART-1 transfiziert und zur Anreicherung von

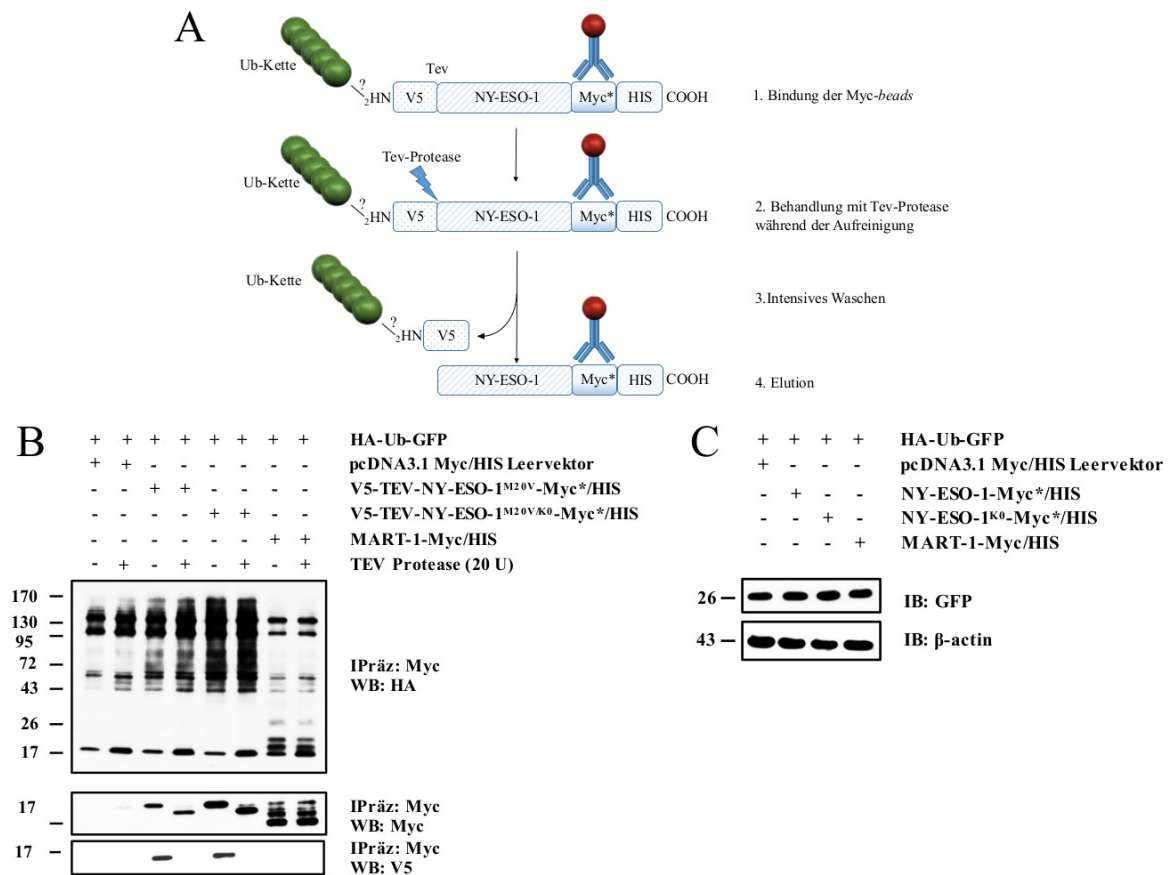


Abbildung 19: *NY-ESO-1* und *NY-ESO-1^{K0}* werden nicht N-terminal ubiquitiniert. In **A** ist das Prinzip des Experimentes dargestellt. $2 \cdot 10^6$ HeLa-Zellen wurden 24h kultiviert und sequentiell mit HA-Ub^{Wt}-GFP und V5/TEV NY-ESO-1^{M20V}, V5/TEV NY-ESO-1^{M20V,K0} oder MART-1 transfiziert. Myc-markierte Proteine wurden in bekannter Weise durch eine IPPräz isoliert. Zur Separation des N-terminalen Fragments wurden die präzipitierten Proteine während der Reinigung auf der 10 μ Säule für 150min mit 20U TEV-Protease oder 35 μ l TEV-Protease-Puffer (Negativkontrolle) behandelt und anschließend intensiv gewaschen. Nach Elution wurden die Probe zum Nachweis polyubiquitiniertes Substrate mittels SDS-PAGE und WB (AK gegen HA) analysiert. Als Kontrolle gleicher Mengen an präzipitierten Proteinen diente der IB gegen Myc sowie als Kontrolle der erfolgreichen proteolytischen Spaltung der IB gegen V5. **C** Die Transfektion gleicher Mengen an HA-Ub^{Wt}-GFP wurde durch Analyse der Zelllysate mittels SDS-PAGE und WB gegen GFP und β -Actin überprüft. Dargestellt ist ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten.

Ub-Konjugaten 16h nach der zweiten Transfektion für 6h mit 10 μ M MG132 behandelt. Myc-markierte Proteine wurden in bekannter Weise durch eine IPPräz isoliert, jedoch erfolgte vor Elution der Präzipitate von der 10M Säule bei 21°C eine 2,5-stündige Behandlung mit 20U TEV-Protease zur Separation potentiell N-terminal verknüpfter Ub-Ketten. Wie in Abbildung 19B gezeigt, führte der Verdau mit TEV-Protease nicht zu einer Abnahme der Polyubiquitinierung. Gleichzeitig verschwand im anti-Myc IB nach TEV-Proteaseverdau die Bande auf Höhe von V5/TEV-NY-ESO-1- bzw. V5/TEV NY-ESO-1^{K0}-Myc/HIS fast vollständig. Sie wurde durch das Erscheinen einer Bande mit niedrigerem Molekulargewicht ersetzt, welche die prozessierten GT-NY-ESO-1^{M20V}-Myc/HIS bzw. GT-NY-ESO-1^{M20V,K0}-Myc/HIS Proteine darstellte. Der Anti-Myc IB von MART-1

blieb, wie zu erwarten, unverändert, was die Spezifität der TEV-Protease unterstrich. Des Weiteren war in behandelten Proben im Gegensatz zu unbehandelten im IB gegen V5 keine Bande auf Höhe von V5/TEV NY-ESO-1^{M20V}Myc/HIS und V5/TEV NY-ESO-1^{M20V,K0}Myc/HIS mehr nachweisbar. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass tatsächlich der N-Terminale V5/TEV-Tag bis auf die Aminosäuren G und T von NY-ESO-1 getrennt wurde. Aus beiden Kontrollergebnissen ließ sich ableiten, dass eine sehr effiziente proteolytische Spaltung durch die TEV-Protease stattgefunden hat.

Verknüpfung mit unterschiedlichen Polyubiquitinketten

Obwohl die Präsentation des NY-ESO-1_{157–165} Epitops nicht durch die Anwesenheit des einzigen Lysinrestes des NY-ESO-1 Proteins beeinflusst wurde, hing dessen Prozessierung dennoch vollständig von der Funktion des 26S Proteasoms und des Ub-Rezeptors Rpn10 des 19S RP ab. Im quantitativen Vergleich der beiden Proteine ließ sich sogar eine verstärkte Gesamtpolyubiquitinierung von NY-ESO-1^{K0} gegenüber dem WT-Protein nachweisen. Ebenfalls dienten beiden Proteinen Serine und Threonine, aber nicht der N-Terminus als Akzeptorstelle für Poly-Ub-Ketten. Der Einsatz eines Ub-AK (FK2), der ausschließlich K29-, K48- und K63-verknüpfte Poly-Ub-Ketten detektiert, verdeutlichte, dass NY-ESO-1^{K0} mehr NaOH-resistente Poly-Ub-Konjugate genannter Verknüpfungen enthielt als das WT-Protein (Abbildung 18A). Diese Beobachtung warf die Frage auf, ob sich beide Proteine grundsätzlich durch die Verknüpfung mit verschiedenen Ub-Ketten voneinander unterscheiden.

Um den Sachverhalt näher zu untersuchen, kam ein Reihe an HA-Ub-GFP-Konstrukten zum Einsatz, bei denen im Ub-Protein jeweils alle bis auf eins oder alle sieben Lysine durch Arginine ersetzt worden waren. Die entstanden Konstrukte wurden HA-Ub^{K6only}-, HA-Ub^{K11only}-, HA-Ub^{K27only}-, HA-Ub^{K29only}-, HA-Ub^{K33only}-, HA-Ub^{K48only}-, HA-Ub^{K63only}-GFP (HA-Ub^{Kx-only}-GFP) sowie HA-Ub^{K0}-GFP bezeichnet (Ebstein et. al, unveröffentlichte Daten). HeLa-Zellen wurden daraufhin sequentiell mit HA-Ub^{Wt}-GFP, HA-Ub^{K0}-GFP oder einem der sieben HA-Ub^{Kx-only}-GFP-Konstrukte und NY-ESO-1 bzw. NY-ESO-1^{K0} transfiziert. Als Negativkontrolle dienten zudem pcDNA3.1 Leervektor transfizierte Zellen, die entweder HA-Ub^{Wt}- oder HA-Ub^{K0}-GFP exprimierten. Zur Anreicherung von Poly-Ub-Konjugaten erfolgte 16h nach der zweiten Transfektion eine 6-stündige Behandlung mit 10µM MG132. Myc-markierte Proteine wurden in bekannter Weise durch eine IPräz isoliert und die Eluate mittels SDS-PAGE und WB analysiert.

In Zellen, die pcDNA3.1 und HA-Ub^{Wt}-GFP bzw. HA-Ub^{K0}-GFP exprimierten, ließen sich keine polyubiquitinierten Substrate detektieren (Abbildung 20A und B). Im Gegensatz dazu zeigte die Verwendung von HA-Ub^{Wt}-GFP in Zellen, die mit NY-ESO-1 oder NY-ESO-1^{K0} transfiziert

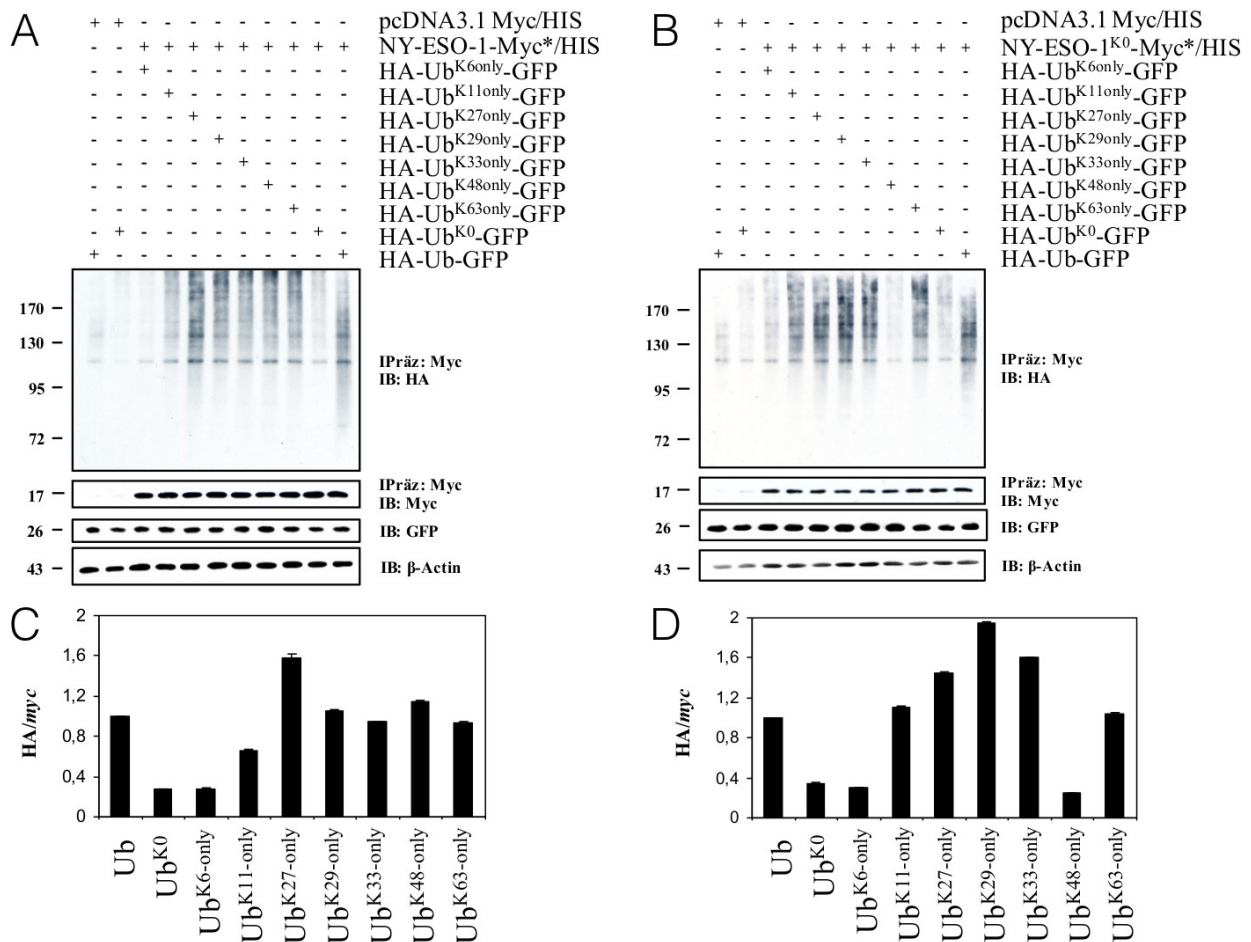


Abbildung 20: NY-ESO-1 und NY-ESO-1^{K0} werden durch Ub-Konjugate unterschiedlicher Verknüpfungen charakterisiert. HeLa-Zellen wurden sequentiell mit HA-Ub^{Wt}-GFP oder einem von acht HA-Ub^{Mut}-GFP-Konstrukten sowie **A** NY-ESO-1 oder **B** NY-ESO-1^{K0} transfiziert und anschließend für 6h mit 10 μ M MG132 behandelt. Als Negativkontrolle dienten jeweils HA-Ub^{Wt}-GFP oder HA-Ub^{K0}-GFP transfizierte HeLa-Zellen allein. Myc-markierte Proteine wurden durch eine IPräz in bekannter Weise isoliert und die Eluate mittels SDS-PAGE (7,5%-iges Gel) und WB (AK gegen HA und Myc) untersucht. Zur Kontrolle gleicher Mengen an transfiziertem HA-Ub^{K-only/K0/WT}-GFP wurden Zelllysate mittels SDS-PAGE und WB gegen GFP und β -Actin untersucht. Zur besseren Darstellung wurden densitometrisch die optischen Dichten der jeweiligen HA-Ub-Signale gegen die optischen Dichten der Myc-Bande von NY-ESO-1 (**C**) und NY-ESO-1^{K0} (**D**) normalisiert. Dargestellt ist ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten.

worben waren, verglichen mit HA-Ub^{K0}-GFP eine deutlich stärkere Polyubiquitinierung Myc-präzipitierter Substrate, wie am intensiveren Signal im Anti-HA Blot erkennbar ist.

Für beide Proteinvarianten ließen sich unter Einsatz von HA-Ub^{K11only}, HA-Ub^{K27only}-, HA-Ub^{K29only}-, HA-Ub^{K33only}- und HA-Ub^{K63only}-GFP eine mit der Kontrolle (HA-Ub^{Wt}-GFP) vergleichbare Polyubiquitinierung Myc-präzipitierter Substrate detektieren (Abbildung 20A und B). Darüber hinaus konnten für das Lysin-haltige und Lysin-freie Protein keine polyubiquitinierten Substrate nachgewiesen werden, wenn die Zellen mit HA-Ub^{K6only}-GFP transfiziert worden waren. Durch densitometrische Analyse der Ub-Signale ließ sich des Weiteren zeigen, dass NY-

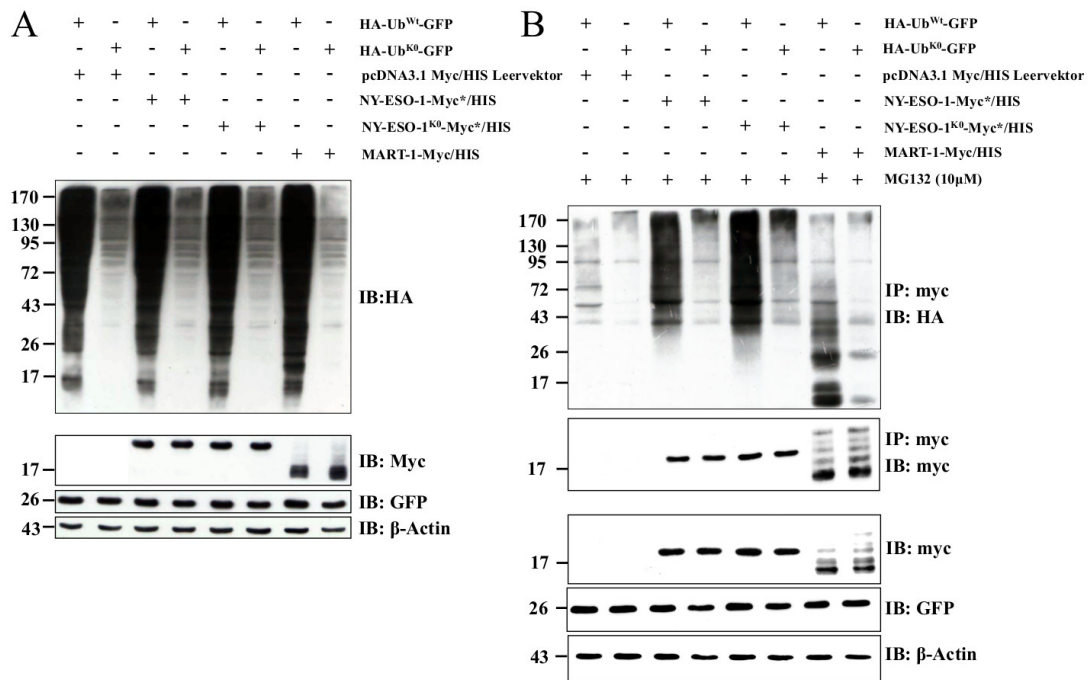


Abbildung 21: HeLa-Zellen wurden sequentiell mit HA-Ub^{Wt}-GFP oder HA-Ub^{K0}-GFP und pcDNA3.1, NY-ESO-1, NY-ESO-1^{K0} oder MART-1 transfiziert. **A** Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE und WB auf die Expression von HA-markierten Polyubiquitinkonjugaten sowie Myc, GFP und β -Actin untersucht. Dargestellt ist ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten. **B** 16h nach der zweiten Transfektion wurden die Zellen zur Anreicherung von Polyubiquitinkonjugaten zusätzlich für 6h mit 10 μ M MG132 behandelt und Myc-markierte Proteine in einer IPräz in bekannter Weise isoliert. Die Eluate sowie Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE und WB mit den jeweilig angegebenen AK untersucht. Dargestellt ist ein repräsentatives von zwei unabhängigen Experimenten.

ESO-1^{K0} im Vergleich zum WT-Protein durch eine verstärkte Verknüpfung mit HA-Ub^{K11only}-, HA-Ub^{K29only}- und HA-Ub^{K33only}-GFP charakterisiert war (Abbildung 20C und D). Allerdings lag der entscheidende Unterschied zwischen beiden Proteinen darin, dass unter Einsatz von HA-Ub^{K48only}, lediglich für NY-ESO-1, nicht jedoch für NY-ESO-1^{K0}, ein mit der Kontrolle (HA-Ub^{Wt}-GFP) vergleichbares Ub-Signal detektiert wurde (Abbildung 20A und B). Der Verlust an K48-Poly-Ub-Ketten des Lysin-freien Proteins war besonders in der densitometrischen Auswertung der Daten deutlich (Abbildung 20C und D). Diese Ergebnisse legten nahe, dass ohne das Lysin 124 eine K48-Polyubiquitinierung von NY-ESO-1 nicht möglich war, was auf die Präsentation des NY-ESO-1_{157–165} Epitops allerdings keinen Einfluss nahm (Abbildung 11 und 16).

Das Fehlen aller Lysine im Ub-Proteins verhindert die Bildung von K6-, K11-, K27-, K29-, K33-, K48- und K63-verknüpfter Poly-Ub-Ketten sowie deren Verzweigungen. Genau wie das Zielprotein besitzt Ub eine freie NH₂-Gruppe am N-terminalen Methionin, die ebenfalls, wie die ϵ -ständigen NH₂-Gruppe der sieben Lysine, zur Ubiquitinierung verwendet werden kann (103). Auf diese Weise entstehen sogenannte lineare Ketten, die sich durch eine N-zu-C-Verknüpfung der

einzelnen Ub-Moleküle untereinander auszeichnen. Sie sind ihrerseits in der Lage, Proteine für den proteasomalen Abbau zu markieren (105).

Abbildung 16 verdeutlicht, dass durch den Einsatz eines Ub-Moleküls, in dem alle sieben Lysine durch Arginine ersetzt worden waren, die Präsentation des NY-ESO-1_{157–165} Epitops unbeeinflusst blieb. Um zu untersuchen, ob die Überexpression von HA-Ub^{K0}-GFP einen Einfluss auf die Polyubiquitinierung der gesamten Zellproteine und das *steady-state* Level von NY-ESO-1 bzw. NY-ESO-1^{K0} nahm, wurden HeLa-Zellen sequentiell mit HA-Ub^{Wt}- oder -Ub^{K0}-GFP sowie pcDNA3.1, NY-ESO-1, NY-ESO-1^{K0} bzw. MART-1 transfiziert.

Die Analyse der Zelllysate mittels SDS-PAGE und WB zeigte, dass es durch Einsatz von HA-Ub^{K0}-GFP weder für NY-ESO-1 noch für NY-ESO-1^{K0} zu einer Akkumulation des reifen Proteins kam (Abbildung 21A). Diese Beobachtung deckte sich mit den Ergebnissen aus Abbildung 16C und D sowie der durch HA-Ub^{K0}-GFP ebenfalls unveränderten Antigenpräsentation (Abbildung 16A und B). In gleichem Maße blieb auch das *steady-state* Level des reifen MART-1 Proteins von der Überexpression mit HA-Ub^{K0}-GFP unbeeinflusst. Dessen ungeachtet reduzierte sich die HA-Polyubiquitinierung der gesamten Zellproteine durch den Einsatz der Lysin-freien Ub-Mutante eindrucksvoll, erkennbar am deutlich schwächeren Ub-Signal im HA-IB (Abbildung 21A).

Um nachzuweisen, dass NY-ESO-1 bzw. NY-ESO-1^{K0} ebenfalls von dieser Veränderung betroffen waren, wurde der gleiche Versuch mit einer zusätzlichen Inhibition proteasomaler Aktivität mittels 6-stündiger Behandlung mit 10 μ M MG132 durchgeführt, um den Abbau polyubiquitiniertes Substrate zu unterdrücken. Myc-markierte Proteine wurden in bekannter Weise durch eine IPräz isoliert und die Eluate mittels SDS-PAGE und WB analysiert. Durch den Einsatz von HA-Ub^{K0}-GFP wurde sowohl in Zellen, die NY-ESO-1, als auch in Zellen, die NY-ESO-1^{K0} exprimierten, deutlich weniger polyubiquitinierte Substrate detektiert, was sich in Abbildung 20 bereits andeutete.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das lysinfreie Ubiquitinkonstrukt die Bildung von HA-Poly-Ub-Ketten auf allen Zellproteinen sowie auf NY-ESO-1 unterdrückte. Allerdings verblieb auch in diesen Zellen für NY-ESO-1 und NY-ESO-1^{K0} ein residuales HA-Signal sichtbar, das sich deutlich von der Negativkontrolle (pcDNA3.1) abhob (Abbildungen 20A und B sowie 21B).

4 Diskussion

4.1 Diskussion ausgewählter Methoden

4.1.1 Analyse der Ubiquitinierungsprofile isolierter NY-ESO-1 Proteine

Zur Untersuchung des Ubiquitinierungsprofils eines spezifischen Proteins mit besonderem Augenmerk auf Gesamtpolyubiquitinierung, Akzeptorstellen, homogene (Ub-Ub) oder heterogene Verknüpfungen (Ub-UBL) in linearer oder verzweigter Form stehen unterschiedliche Möglichkeiten zur Verfügung.

Experimentelles Design Unter physiologischen Bedingungen liegt nur ein Bruchteil aller Proteine in ubiquitinierten Form vor (138, 139), wodurch der Nachweis eines Ub-modifizierten Substrates ohne geeignete Methoden zur Signalverstärkung kaum möglich ist. Um den Anteil verfügbarer Ub-Moleküle in der Zelle zu erhöhen, diente die Überexpression eines N-terminal HA-markierten Ub-GFP Fusionsproteins (108). Das Fusionsprotein wird intrazellulär durch UCH-vermittelte Spaltung freigesetzt, wodurch die Transfektion mittels IB gegen GFP kontrolliert werden kann (138). Gleichzeitig reduziert die Überexpression die Biosynthese des endogenen Ub sehr stark (110), sodass der Nachweis von ubiquitinierten Substraten stets mit Hilfe des deutlich sensitiveren HA-AK erfolgte. Durch diese Verfahrensweise bleibt ein kleiner Anteil an Modifikationen mit endogenen Ub-Proteinen unerkant. Allerdings betreffen Veränderungen, die auf diese Weise entstehen, immer beide Proteinvarianten, sodass Unterschiede zwischen NY-ESO-1^{K0} und seinem Lysin-haltigen Pendant im Anti-HA IB nicht auf die Markierung mit endogenem Ub zurückgeführt werden können. Zudem zeigte die Verwendung des Ub-AK (FK2), der sowohl Mono- als auch Polyubiquitinierung erkennt, unter nicht reduzierenden Bedingungen keinen Unterschied im Vergleich zum Anti-HA IB (Abbildung 18A).

Zur selektiven Untersuchung der Modifikationen von C-terminal Myc-markierten NY-ESO-1 Proteinen erfolgte die Anreicherung mittels einer gegen Myc-gerichteten IPräz. Zusätzlich wurden HA-Ub-GFP und NY-ESO-1/NY-ESO-1^{K0} exprimierende Zellen mit 10 μ M MG132 zur Inhibition der proteasomalen Aktivität behandelt, um den Abbau polyubiquitinierten Substrate zu verlangsamen. Der hemmende Effekt von MG132 in der verwendeten Konzentration (10 μ M) auf die Aktivität lysosomaler Cysteinproteasen und Calpaine (28) spielte für die Charakterisierung des Ubiquitinierungsprofils von NY-ESO-1 und NY-ESO-1^{K0} keine Rolle. Die Abhängigkeit der Präsentation des NY-ESO-1_{157–165} Epitops von der proteasomalen Aktivität wurde genau aus diesem Grund mit Hilfe proteasomspezifischer α' β' -Epoxyketoninhibitoren nachgewiesen.

Ub-Akzeptorstellen NY-ESO-1 bietet den Vorteil, dass es lediglich ein einziges Lysin im gesamten Protein enthält. Deshalb stellte die molekularbiologische K→R Substitution mit anschließender Analyse Myc-präzipitierter Substrate mittels SDS-PAGE und IB gegen HA-Ub eine sehr zielgerichtete und effiziente Methode zur Detektion Lysin-gebundener Ubiquitinierung dar. Da beide Aminosäuren Seitenketten mit basischen Eigenschaften enthalten, ist davon auszugehen, dass die biochemischen Eigenschaften des Proteins weitgehend erhalten blieben.

Serin- und Threonin-verankerte Ubiquitinierung ließ sich, aufgrund der Labilität der Carboxyesterbindung gegenüber basischen pH-Werten, sehr einfach durch die Behandlung Myc-präzipitierter Substrate mit 50mM NaOH nachweisen. Eine Behandlung mit 600mM DTT böte die Möglichkeit zur Identifizierung von Cystein-gebundenem Ub (101). Auf diese Art und Weise lässt sich zwar keine Informationen über die Position der modifizierten AS erhalten, allerdings bestände die Möglichkeit, dass mehr als eine Akzeptorstelle der 28 Serine, Threonine und Cysteine des NY-ESO-1-Myc/HIS Fusionsproteins zur Ubiquitinierung verwendet werden. Bedenkt man die möglichen Kombinationen, so wären im Falle von einer bzw. 27 alternativen Ub-Akzeptorstelle 28 verschiedene Konstrukte notwendig, im Falle von 2 bzw. 26 $\binom{28}{2} = \binom{28}{26} = 378$, im Falle von 3 bzw. 25 $\binom{28}{3} = \binom{28}{25} = 3276$ usw. Im Falle von 14 wären sogar $\binom{28}{14} = 40.116.600$ Plasmide nötig, um die Akzeptorstellen molekulargenetisch exakt zu charakterisieren.

Die Detektion N-terminaler Ubiquitinierung durch Fusion eines 6-fachen Myc-Tags (103) stellt einen alternativen Ansatz dar und böte zudem die Möglichkeit den Einflusses N-terminaler Ubiquitinierung auf die Antigenprozessierung *in cellulo* zu analysieren. In diesem Zusammenhang wurde bereits gezeigt, dass die N-terminale Markierung von MyoD mit 6x Myc dessen Abbau *in vitro* und *in vivo* verlangsamt statt beschleunigt (103). Allerdings bestünde für NY-ESO-1 weiterhin die Gefahr, dass die 30 zusätzlichen potentiellen Ub-Akzeptorstellen (6xK, 24xS/T) das Ergebnis beeinflussen. Aus diesem Grund nahmen wir von dieser Methode Abstand.

Einen alternativen Ansatz zur Charakterisierung der Ub-Akzeptorstellen stellt die Analyse gereinigter NY-ESO-1 Substrate mittels MS dar (139). *Bottom-up* MS analysiert Peptide, die durch den Verdau mit z. B. Trypsin (proteolytische Aktivität C-Terminal von Arginin und nicht-modifiziertem Lysin) oder einer anderen Protease entstehen. Da die drei unmittelbar C-terminal gelegenen AS des Ub-Proteins R-G-G sind, entstehen durch den proteolytischen Prozess mit Trypsin, aus ubiquitinierten Proteinen Peptide mit einem Diglycyl-Rest. Deren Änderung des Masse/Ladungsverhältnisses im Vergleich zu unmodifizierten Peptiden ist massenspektrometrisch detektierbar. Allerdings lässt sich durch Standard-MS-Verfahren eine Modifikation mit Ub nicht von einer mit ISG15 oder NEDD8 (*neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8*) unterscheiden

(139), wodurch eine differenzierte Markierung (z. B. mit stabilen Isotopen) notwendig geworden wäre. Darüber hinaus besaßen die am Institut für Biochemie im Zeitraum der Arbeit verfügbaren ESI- und MALDI-Massenspektrometer keine ausreichende Sensitivität zur Unterscheidung Diglycyl-modifizierter von unmodifizierten Peptiden, sodass die Geräte die Durchführung der beschriebenen Experimente nicht gewährleisteten.

Polyubiquitinketten Zur Identifikation der mit NY-ESO-1 verknüpften Poly-Ub-Ketten wurde N-terminal HA-markiertes Ub, in dem alle oder 6/7 Lysine durch Arginine substituiert wurden, in HeLa-Zellen überexprimiert und Myc-präzipitierte Substrate mittels SDS-PAGE und IB gegen HA analysiert. Im Vergleich dazu eignet sich MS als sensitivere und physiologischere Alternative, da es die zelluläre Homöostase unberührt lässt. Allerdings ist für die Beantwortung dieser Fragestellung eine *top-down* MS-Analyse vonnöten (Sensitivitätsproblem siehe oben).

Im Gegensatz dazu existierten bereits Erfahrungen mit den einzelnen HA-Ub^{Mut}-GFP Konstrukten (Ebstein et al., unveröffentlichte Daten). Aus diesem Grund stellte die Identifizierung der Ub-Verknüpfungen auf NY-ESO-1 mittels Co-Transfektion der HA-Ub^{Kx-only}-GFP sowie einem der NY-ESO-1 Konstrukte eine sehr zielgerichtete Vorgehensweise im Rahmen dieser Arbeit dar. Darüber hinaus erlaubte die Verwendung der HA-Ub^{KxR}-GFP Konstrukte die Bestimmung des Einflusses einzelner Ub-Ketten auf die Präsentation des NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ Epitops.

4.1.2 Auswertung der Antigenpräsentationsexperimente

Zur Auswertung der Antigenpräsentationsexperimente stehen prinzipiell direkte und indirekte Verfahren zur Verfügung. Eine direkte Analyse umfasst die Detektion des Epitop:MHC Klasse I Komplexes mittels eines AK. z. B. 25D1.16 für H2-K^b:SIINFEKL (106). Für NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅:HLA-A2 Komplexe ist bisher kein kommerzieller AK erhältlich. Die Generierung eines spezifischen AK hätte den Rahmen dieser Arbeit überschritten.

Die indirekte Variante beinhaltet unter anderem die Detektion der Effektorfunktion CD8⁺ T-Zellen (Lyse der Zielzellen, z. B. durch *Cr-release assay*) oder der Antigen-induzierten Zytokinfreisetzung Epitop-spezifischer CD8⁺T-Effektorzellen. Zum Nachweis sezernierter Zytokine wie IFN γ eignen sich vor allem *enzyme-linked immunospot* (ELISPOT), ICC/FACS und ELISA. ELISPOT und ICC/FACS sind im Vergleich zum ELISA deutlich sensitiver in der Detektion zytokinpositiver Zellen und verhindern den Konsum der produzierten Botenstoffe durch die analysierten Zellen selbst, wodurch Messfehler möglichst reduziert werden. Der ELISPOT stellt im Gegensatz zum ELISA allerdings ein eher qualitatives Verfahren dar und eignet sich vorwiegend zur Detektion der Frequenz epitopspezifischer T-Zellen (140). Seine Aussagekraft für die Quantifizierung der gebildeten Zytokine einer monoklonalen CD8⁺ T-Effektorzellpopulation ist jedoch eingeschränkt,

weswegen er für die Auswertung der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente nicht zur Anwendung kam. Die Analyse verschiedener E:T-Verhältnisse (1:1, 2:1, 4:1, 8:1, 16:1, 32:1) bei unterschiedlichen experimentellen Bedingungen führt rasch zu einer großen Anzahl an auszuwertenden Proben (>100), wodurch sich eine Analyse mittels ICC/FACS nicht effizient gestalten würde. Da in den durchgeführten Antigenpräsentationsexperimenten die Analyse der Gesamtkonzentration an sezerniertem IFN γ für die Auswertung ausreichend sensitiv war, wurde der ELISA als Methode der Wahl festgelegt.

4.1.3 Statistische Methoden

Die IFN γ -Produktion einer einzelnen T-Zelle einer monoklonalen T-Zellpopulation (wie RG39 T-Zellen) ausgelöst durch TCR:MHC:Epitop-Interaktion, strebt bei einer hinreichend großen Anzahl an gemessenen Ereignissen aufgrund deren biologischen Eigenschaften einer Normalverteilung entgegen (141). In jedem Antigenpräsentationsexperiment wurden 20.000 CD8⁺ RG39 T-Zellen eingesetzt, die eine ausreichend große Population der Grundgesamtheit darstellen, wodurch die Normalverteilung widergespiegelt wird. Daraus ergibt sich, dass die Summen der IFN γ -Konzentrationen beliebiger Populationen aus 20.000 RG39 T-Zellen ebenfalls normalverteilt sind. Aus diesem Grund ist die Anwendung eines ungepaarten t-Tests bzw. des *one-way ANOVA* für normalverteilte Daten zum Vergleich der Mittelwerte der Summen der IFN γ -Konzentrationen von RG39 T-Effektorzellen zwischen stimulierter und Kontrollgruppe zulässig. Die t-Verteilung berücksichtigt sogar bei kleinen Stichproben, die Anzahl der Replikate bei der geometrischen Ermittlung der Überschreitungswahrscheinlichkeit (p), sodass die Ergebnisse, trotz eingeschränkter Güte, mit ausreichend großer Sicherheit als signifikant zu beurteilen sind, wenn p kleiner als 0,05 ist. Bei mehr als zwei zu analysierenden Gruppen ist die Anwendung des *one-way ANOVA* dem t-Test vorzuziehen, da sich ansonsten der Fehler erster Art multipliziert.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Unterschiede der Ubiquitinierungsprofile von NY-ESO-1 und NY-ESO-1^{K0}

Gesamtpolyubiquitinierungsprofil

Die Substitution der theoretischen Hauptubiquitinierungsstelle - des einzigen Lysins von NY-ESO-1 führte, anders als es für eine Reihe anderer Proteinen beschrieben worden ist, nicht zu einem reduzierten (101, 103, 137), sondern zu einem verstärkten Nachweis polyubiquitinerter Substrate (Abbildung 17). Diese ließen sich jedoch lediglich durch den Einsatz von MG132 anreichern, was am ehesten der Inhibition der proteasomalen Aktivität zugesprochen werden kann.

Eine Erklärung für den vermehrten Nachweis ubiquitinerter Substrate von NY-ESO-1^{K0} im Ver-

gleich zu NY-ESO-1 wäre, dass nicht jedes einzelne Protein verstärkt polyubiquitiniert wird, sondern lediglich der relative Anteil modifizierter Proteine erhöht ist. Allerdings zeigten sich keine Unterschiede im *steady-state* Level von NY-ESO-1 und NY-ESO-1^{K0}. Daher ist nicht anzunehmen, dass die K124R Mutation einen verlangsamten Abbau des Proteins oder eine biochemische Instabilität zur Folge hat, wodurch NY-ESO-1^{K0} anfälliger für die Modifikation mit Ub ist. Ein Nachweis längerer Poly-Ub-Ketten ist ebenfalls zu bezweifeln, weil sich die stärkeren HA-Ub-Signale gleichmäßig über alle Molekulargewichte erstreckten und nicht auf hochmolekulare Substrate beschränkt waren (Abbildung 17A). Des Weiteren konnte ausgeschlossen werden, dass nicht-kovalent an NY-ESO-1^{K0} gebundene Proteine mit der Detektion ubiquitiniertes Substrate interferieren, da eine intensive Behandlung mit NaCl-Konzentrationen (3M), bei denen selbst AK aus ihrer Bindung gelöst werden können (142), die Gesamtpolyubiquitinierungsprofile der beiden Proteine nicht veränderten (Abbildung 17B).

Ub-Akzeptorstellen von NY-ESO-1 Die Ursache für die stärkere Polyubiquitinierung von NY-ESO-1^{K0} im Vergleich zu NY-ESO-1 lag den vorliegenden Ergebnissen zufolge in der Verwendung Lysin-unabhängiger Ub-Akzeptorstellen. Beide Proteinvarianten enthielten zwar kein N-Terminal gebundenes Poly-Ub (Abbildung 19), stattdessen wurden unter anderem Serine und Threonine als Ub-Akzeptorstellen verwendet (Abbildung 18). Die in dieser Arbeit verwendete Methode liefert zwar keine Information darüber, wieviele der 23 Serine und Threonine ubiquitiniert vorlagen, allerdings erscheint eine erhöhte Anzahl an ubiquitinierten AS als Grund für die verstärkte Polyubiquitinierung von NY-ESO-1^{K0} unwahrscheinlich, da die Unterschiede im Gesamtpolyubiquitinierungsprofil zwischen Lysin-haltigem und -freiem Protein auch nach Behandlung mit NaOH nachgewiesen werden konnten (Abbildung 18A). Deutlich wahrscheinlicher ist hingegen eine zusätzlich präferierte Ubiquitinierung der fünf Cysteine in NY-ESO-1^{K0}, da die Verwendung des Ub-AK (FK2) auf dem Lysin-freien Protein deutlich mehr NaOH-resistente Ub-Konjugate nachwies als auf dem Lysin-haltigen Protein (Abbildung 18A). Unter Berücksichtigung, dass beide Proteine nicht N-terminal ubiquitiniert werden, verbleiben, für die durch FK2 erkannten K29- K48- und K63-Ketten, lediglich Cysteine als verfügbare Ub-Akzeptorstellen auf NY-ESO-1^{K0}.

Polyubiquitinketten auf NY-ESO-1 Ein weiterer entscheidender Unterschied der beiden Proteinvarianten bestand den vorliegenden Ergebnissen zufolge in dem Verlust von K48-verknüpften Poly-Ub-Ketten auf NY-ESO-1^{K0}, deren Akzeptorstelle in NY-ESO-1 mit großer Sicherheit durch das Lysin an Position 124 repräsentiert wird (Abbildung 20A und B). Aus diesem Grund werden die NaOH-resistenten Poly-Ub-Konjugate auf NY-ESO-1^{K0}, die durch Einsatz des Ub-AK (FK2) aufgedeckt wurden (Abbildung 18A), durch K29- und K63-Ketten widergespiegelt, die sich auf

beiden Proteinen nachweisen ließen (Abbildung 20A und B).

Ein Wechsel der Akzeptorstellen K29- und K63-verknüpfter Poly-Ub-Ketten von Serinen/Threoninen zu Cysteinen würde diese Beobachtung erklären. Allerdings demonstrierte die densitometrische Analyse der Poly-Ub-Signale beider Proteine eine verstärkte Verknüpfung von NY-ESO-1^{K0} mit K11-, K29- und K33-Ketten (Abbildung 20C und D). Daher ist dem verstärkten Nachweis NaOH-stabiler Ub-Konjugate auf NY-ESO-1^{K0} (Abbildung 18A) am ehesten eine gesteigerte Bildung Cystein-gebundener K29-Ketten zuzuschreiben. Vor diesem Hintergrund kann auch der vermehrten Bildung von K11- und K33-Ketten die Nutzung zusätzlicher Akzeptorstellen (wie Cysteine) zu Grunde liegen.

Beide Proteine zeichnen sich demzufolge durch alternative Poly-Ub-Ketten (K11, K27, K29, K33, K63), gebunden an alternativen Ub-Akzeptorstellen (C, S, T) aus. Zudem ist der Verlust an Lysin-verankerten K48-Ketten auf NY-ESO-1^{K0} mit einer verstärkten Verknüpfung von K11-, K29- und K33-Ketten gekennzeichnet, von denen K29-Ketten über Cysteine mit NY-ESO-1^{K0} verbunden sind. Die Analyse der Ubiquitinierungsprofile beider NY-ESO-1 Proteine mittels MS böte die Möglichkeit, die Aussagen über die Akzeptorstellen spezifischer Kettenarten zu präzisieren.

4.2.2 Prozessierung des NY-ESO-1_{157–165} Epitops

***β*2 und *β*1 als treibende Kraft der Epitopgenerierung**

Die vorliegende Arbeit hatte sich zum Ziel gesetzt, nicht nur die Ub-Akzeptorstellen und Ub-Verknüpfungen auf NY-ESO-1 zu charakterisieren, sondern ebenfalls deren Einfluss auf die Präsentation des NY-ESO-1_{157–165} Epitops zu untersuchen. Die Substitution des einzigen Lysins durch Arginin zeigte keinen Einfluss auf die Präsentation des HLA-A2⁺ restringierten NY-ESO-1_{157–165} Epitops. Weil die Ubiquitinierung als Voraussetzung für den Abbau eines gegebenen Substrates durch das 26S Proteasom gilt, stellte sich die Frage, inwieweit die direkte Präsentation des NY-ESO-1_{157–165} Epitops proteasomaler Prozessierung unterlag.

In diesem Zusammenhang existieren in der Literatur kontroverse Ergebnisse (116, 117). Chen et al. beobachteten auch nach proteasomaler Inhibition mit Lactacystin eine Aktivierung NY-ESO-1_{157–165} spezifischer CD8⁺ T-Zellen (116). Im Gegensatz dazu wiesen Batchu et. al (117) eine verlängerte Halbwertszeit des reifen NY-ESO-1 in Protein-transduzierten DCs bei eingeschränkter proteasomaler Aktivität durch das Peptid aldehyd N-acetyl-L-leucyl-L-norleucinal (LLNL) nach. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich nach Hemmung der Aktivität aller katalytisch-aktiven UE des 20S Standardproteasoms eine drastische Reduktion (80% für NY-ESO-1 und 100% für NY-ESO-1^{K0}) der Antigenpräsentation (Abbildung 13C und D). Diesen unterschiedlichen Ergebnissen kann unter anderem die Verwendung verschiedener Zielzellen (.45- und .174-Melanomzellen

(116), DCs (117), HeLa-Zellen) bzw. eine unterschiedliche Art der Antigenapplikation (virale Transduktion (116), Proteintransduktion (117), Transfektion von Plasmid-DNA) zu Grunde liegen. Diesbezüglich wurde erst kürzlich gezeigt, dass die Anforderungen der Prozessierung bei sich unterscheidender Antigenquelle in den gleichen Zielzellen bzw. gleicher Antigenquelle in unterschiedlichen Zielzellen stark differieren können (106). Ferner nutzten Chen et al. (116) zur Hemmung der proteasomalen Aktivität NY-ESO-1 exprimierender Melanomzellen $1\mu\text{M}$ Lactacystin, das in genannter Konzentration lediglich die ChT Aktivität ($\beta 5$, LMP7, LMP2) vollständig inhibiert (136). Da sich die Aktivität von $\beta 5$ negativ auf die Generierung ihres Kontrollepitops M1_{58–66} (Influenza A Virus) auswirkte (143), ist es denkbar, dass ein Effekt von $\beta 1$ und $\beta 2$ auf die Generierung des NY-ESO-1_{157–165} Epitops nicht erfasst wurde.

Der Einsatz von PR893 (isolierte Hemmung von $\beta 5$) zeigte in HeLa-Zellen, in denen durch Inhibitortitrationsexperimente nur die Existenz von SP-UE nachgewiesen werden konnten (Ebstein et al., unveröffentlichte Daten), keinen Hinweis auf eine Beteiligung von $\beta 5$ an der Antigenprozessierung (Abbildung 13C und D). Im Gegensatz dazu lässt die substantielle Reduktion (ca. 55% bzw. 40%) der IFN γ -Produktion NY-ESO-1_{157–165} spezifischer T-Zellen durch Einsatz von YU-102 darauf schließen, dass $\beta 1$ die Bildung des antigenen Peptids begünstigt. Da $\beta 5$ keinen Einfluss auf die Generierung des Epitops nimmt, liegt der Hemmung der Antigenpräsentation durch 250nM Epoxomicin ($\beta 2$, $\beta 5$) eine verminderte katalytische Aktivität von $\beta 2$ zu Grunde. Diese Schlussfolgerung wird zusätzlich durch eine signifikante Reduktion der Präsentation des NY-ESO-1_{157–165} Epitops bei Einsatz von Epoxomicin und YU-102 ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$) im Vergleich zur Inhibition mit PR893 und YU-102 ($\beta 1$, $\beta 5$) unterstrichen (Abbildung 13C und D). Dementsprechend sind $\beta 2$ und $\beta 1$ die entscheidenden Kräfte in der Generierung des NY-ESO-1_{157–165} Epitops bzw. eines relevanten Vorläuferpeptids aus NY-ESO-1 und NY-ESO-1^{K0}.

Die Beteiligung unterschiedlicher Proteasomsubpopulationen

Das IP gilt dem SP als überlegen in Bezug auf die Fähigkeit zur Bildung MHC Klasse I gebundener Epitope (43, 44). Allerdings existiert eine Reihe von Untersuchungen, die diese Ansicht für definierte Epitope in Frage stellt (45, 48, 49, 57). Darüber hinaus lassen Veröffentlichungen, in denen IP-*knock-out* (KO)-Mäuse verwendet wurden, um die Effizienz in der Epitopgenerierung zwischen IP und SP zu vergleichen (52, 54), die Komposition der entstandenen Subpopulationen in APZ häufig unbeachtet. Ferner wurde gezeigt, dass in artifiziellen Systemen Assemblierungsregeln nicht ausnahmslos greifen (40) und dass IntP zum Teil Standard- und Immunoproteasom in der Generierung einzelner Epitope überlegen sind (57) sowie die Diversität an antigenen Peptiden vergrößern (60). Zudem stellen sie einen Großteil (bis zu 40%) der Proteasomsubpopulationen in

reifen DCs dar (57), wodurch ihre Bedeutung für das *Priming* naiver CD8⁺ T-Zellen unterstrichen wird. Aus diesen Gründen ist eine genaue Differenzierung der Subpopulationen erforderlich, um die katalytischen und strukturellen Effekte der einzelnen UE auf die Generierung eines spezifischen Epitops zu beurteilen. Da die Prozessierung der katalytischen β -UE erst im finalen Schritt der 20S Proteasomassemblierung (Dimerisierung von zwei 15S α/β -Komplexen) stattfindet (15), war die Analyse der proteasomalen Subpopulationen mittels SDS-PAGE und IB eine adäquate Methode zur Beantwortung der Fragestellungen dieser Arbeit.

Die Behandlung von 33/2-Zellen mit siRNA gegen LMP7 demonstrierte eine verminderte Biosynthese von $\beta 5i$ mit einem parallel verstärkten Einbau von $\beta 5$ (Abbildung 14E). Daraus resultierte eine Konformation des 20S Proteasoms, bestehend aus $\beta 5$, LMP2 und Mecl-1, die den Assemblierungsregeln widerspricht (58, 59), allerdings bereits in Hepatozyten und Milzzellen von LMP7^{-/-}-Mäusen nachgewiesen wurde (40). Ergebnisse einer älteren Untersuchung bestätigend (116), stand diese Proteasomsubpopulation dem IP bezüglich der Aktivierung NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ spezifischer T-Zellen in keiner Weise nach (Abbildung 14A und B). Deshalb erscheint ein struktureller Effekt von LMP7, wie für die Generierung des HbcAg₁₄₁₋₁₅₁ Epitops beschrieben (47), eher unwahrscheinlich. Da die katalytische Aktivität von $\beta 5$ nicht zur Epitopgenerierung beiträgt, ist eine Beteiligung der Aktivität von LMP7 ebenfalls nicht zu erwarten.

Der *knock-down* von LMP2 verminderte gleichfalls den Einbau von Mecl-1 mit parallel verstärkter Expression von $\beta 1$ und $\beta 2$ (Abbildung 14E). Daraus ergab sich die für das natürlich vorkommende LMP7-IntP typische Konfiguration (57) sowie nach Behandlung mit siRNA gegen LMP2 und LMP7 die des SP (Abbildung 14E). In beiden Fällen ließ sich eine stärkere Aktivierung NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ spezifischer T-Zellen im Vergleich zu Kontroll-siRNA detektieren (Abbildung 14A-D). Demnach sind SP und LMP7-IntP hinsichtlich der Fähigkeit das NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ Epitop zu generieren dem IP überlegen. NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ gehört damit wie MART-1₂₆₋₃₅ (48) und GP100_{40-42/47-52} (49) zu einer wachsenden Familie von Peptiden, deren Generierung durch das IP reduziert wird. Gleichzeitig ist es neben MAGE-A3₂₇₁₋₂₇₉ (57) ein weiteres Epitop, dessen Bildung durch LMP7-IntP vermittelt wird.

Als Ursache der Ergebnisse kommen strukturelle oder katalytische Effekte in Frage, die entweder durch die Abwesenheit von LMP2 bzw. Mecl-1 oder durch die Anwesenheit von $\beta 1$ bzw. $\beta 2$ hervorgerufen werden. Da der Einbau von Mecl-1 nicht vollständig stattfindet (55) und die Substratbindungskanäle von Mecl-1 und $\beta 2$ nahezu identisch sind (144), ist die verbesserte Antigenpräsentation kaum auf den Einbau von $\beta 2$ statt Mecl-1 zurückzuführen. Demnach ist der Austausch von LMP2 mit $\beta 1$, das eine besondere Rolle bei der Bildung des NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ Epitops spielt (Ab-

bildung 13C und D), für die verstärkte IFN γ -Produktion von RG39 T-Zellen nach Behandlung von 33/2-Zellen mit siRNA gegen LMP2 bzw. LMP2/LMP7 verantwortlich (Abbildung 14A-D). Diese Beobachtungen stehen zum Teil im Widerspruch zu bereits veröffentlichten Ergebnissen (116), die der Abwesenheit von LMP2 keinen Effekt auf die Präsentation von NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ zuschrieben, obwohl der damals beobachtete Effekt zwischen LMP2^{-/-} und WT-Zellen mit den Daten der vorliegenden Arbeit vergleichbar ist. Um katalytische von strukturellen Effekten zu differenzieren, können Experimente Auskunft geben, in denen die Aktivitäten von LMP2 bzw. Mecl-1 in 33/2-Zellen (z. B. mit YU-102 und LU-102) gehemmt werden oder katalytisch inaktives LMP2 bzw. Mecl-1 verwendet wird (nach (47)).

Der Einfluss der Ubiquitinierung auf die Antigenpräsentation

Inwiefern die posttranslationale Modifikation mit Ub, ganz besonders in Bezug auf Akzeptorstellen und Verknüpfungen, Einfluss auf die Prozessierung eines Antigens nimmt, wird stark von der präsentierenden Zelle und der intrazellulären Lokalisation des potentiellen Antigens bestimmt ((106, 110) und Kapitel 1.4.5).

Die Präsentation des NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ Epitops hängt nahezu vollständig von der Aktivität des 20S Proteasoms ab (Abbildung 13). Obwohl NY-ESO-1^{K0} ein stärkeres Gesamtpolyubiquitinierungsprofil als das Wildtypprotein aufwies (Abbildung 17), ließ sich durch Substitution des einzigen Lysins im gesamten NY-ESO-1 Protein mit Arginin keine Veränderung in der Präsentation des HLA-A2 restringierten NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ Epitops detektieren (Abbildung 11). Trotzdem gelang es, eine Ub-abhängige Präsentation durch Verminderung der Biosynthese der Ub-Rezeptoren Rpn10 bzw. Rpn13 des 19S RP mittels siRNA zu belegen (Abbildung 15). Für beide NY-ESO-1-Varianten reduzierte sich dabei die Aktivierung epitopspezifischer T-Zellen um 100% (siRpn10) bzw. 50% (siRpn13). Der Doppel-*knock-down* von Rpn10 und Rpn13 entpuppte sich als nicht gleichermaßen potent wie der von Rpn10 allein, was sich auf die unvollständige Herunterregulierung von Rpn10 zurückführen lässt. Diese Beobachtungen weisen auf eine Bestätigung der Asymmetrie eines 30S Proteasoms bezüglich der Verteilung der beiden internen Ub-Rezeptoren auf die zwei 19S RP hin (83), die sich folglich in ihrer Funktionsweise unterschieden. Während ein 19S RP seine volle Wirkung nur dann entfalten würde, wenn beide Rezeptoren gleichzeitig vorliegen, genügte dem anderen allein die Anwesenheit von Rpn10. Allerdings trüge jeder 50% zur Gesamtfunktion bei. Zusammengefasst suggerieren diese Ergebnisse eine Art Hierarchie in der biologischen Bedeutung der beiden Ub-Rezeptoren des 19S RP, wie sie durch die deutlich vorzeitige Letalität von Rpn10^{-/-} (Embryonalperiode) im Vergleich zu Rpn13^{-/-}-Mäusen (Neonatalperiode) bereits angedeutet wurde (81, 82).

Neben pp65_{495–503} (4) und GP100_{47–52/40–42} (108) gehört damit NY-ESO-1_{157–165} zu einer Gruppe von MHC Klasse I Epitopen, deren Präsentation durch die Aktivität von Rpn10 vermittelt wird. Darüber hinaus weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, als bis dato einzige, ebenfalls Rpn13 eine besondere Stellung in der Präsentation MHC Klasse I gebundener Epitope zu. Die klinische Bedeutung unserer Erkenntnisse für die Anti-Tumor-Therapie wird durch eine Studie hervorgehoben, die den Effekt eines Rpn13-spezifischen Inhibitors (RA190) in Ovarialkarzinomtragenden Mäusen untersuchte (145). Zum einen demonstrierten die Autoren in dieser Veröffentlichung einen direkt cytotoxischen Einfluss von RA190 auf Tumorzellen. Zum anderen zeigten sie, dass RA190 die inhibierende Wirkung von MDSCs auf Anti-Tumor-CD8⁺ T-Effektorzellen minimiert. In diesem Kontext könnte sich die 50%-ige Inhibition der Antigenpräsentation des ovariellen Tumorantigens NY-ESO-1 durchaus als vorteilhaft erweisen, da durch die Behandlung mit RA190 die Erkennung von Karzinomzellen durch CD8⁺ T-Effektorzellen erhalten bliebe.

Obwohl NY-ESO-1 und NY-ESO-1^{K0} Ub-abhängig durch 26S Proteasomen abgebaut werden, schlugen sich die quantitativ und qualitativ unterschiedlichen Ubiquitinierungsprofile (Abbildung 17, 18 und 20) nicht in einer veränderten Antigenpräsentation nieder (Abbildung 11). Die effiziente Epitopgenerierung wird demzufolge bei Abwesenheit von K48-Poly-Ub-Ketten durch alternative Verknüpfungen vermittelt. Deren wurde Erkennung bislang lediglich für Rpn10 *in vitro*, nicht jedoch, wie in der vorliegenden Arbeit, *in cellulo*, geschweige denn für Rpn13 beschrieben (75, 76, 77).

Von solch alternativen Ketten ließen sich auf NY-ESO-1^{K0} alle bis auf K6-Ketten detektieren (Abbildung 20B), wobei K11, K27 und K29 im Vergleich zum WT-Protein sogar noch stärker vertreten waren (Abbildung 20C und D). Zu bemerken ist, dass all diese Ketten bei Einsatz von MG132 detektiert wurden, was ihr Potenzial unterstreicht, NY-ESO-1 Proteine zum Abbau durch 26S Proteasomen zu markieren. Für all diese Ketten ausgenommen K63, die vor allem Proteine zum lysosomalen Abbau markieren und bei intrazellulären Signalkaskaden eine Rolle spielen (85, 86), konnte gezeigt werden, dass sie *in vivo* Substrate für den proteasomalen Abbau markieren (99). Zudem wurde in HeLa-Zellen nach proteasomaler Inhibition eine Akkumulation solch alternativer Ub-Ketten gebunden an 26S Proteasomen nachgewiesen (100). Allerdings sind K11-Verknüpfungen vor allem für die Vermittlung des proteasomalen Abbaus ER-ständiger Proteine verantwortlich (87), wohingegen NY-ESO-1 im Cytosol lokalisiert ist (113). Aus diesem Grund ist die erhaltene Präsentation des NY-ESO-1_{157–165} Epitops bei Abwesenheit Lysin-gebundener K48-Ketten vor allem der Erkennung Serin-, Threonin- bzw. Cystein-gebundener K27-, K29- bzw. K33-Ketten zuzusprechen.

Unterstrichen wird diese Schlussfolgerung durch die Beobachtung, dass die Abwesenheit von K48-Poly-Ub-Ketten, durch Überexpression einer HA-Ub^{K48R}-GFP Mutante, nicht nur in NY-ESO-1^{K0}-, sondern auch in NY-ESO-1-exprimierenden HeLa-Zellen keine signifikante Reduktion der Antigenpräsentation zur Folge hatte (Abbildung 16). Zwar widersprechen sich diese Beobachtungen mit einer bereits veröffentlichten Untersuchung, die K48-Ketten eine indirekte (nicht Antigen-gebundene) Wirkung in der Generierung MHC Klasse I präsentierter Epitope bescheinigt (107). Allerdings liegt die Ursache dafür vermutlich in einem veränderten *steady-state* Level des reifen Antigens. Im Fall von NY-ESO-1 bzw. NY-ESO-1^{K0} erklärt der verminderte Nachweis des reifen Proteins im Kontrollblot anschaulich die um 20% verminderte Reduktion der Aktivierung epitopspezifischer T-Zellen (Abbildung 16C und D), den Fiebiger et al. in ihrer Veröffentlichung nicht abgebildet haben (107).

Interessanterweise zeigte auch die Überexpression weiterer HA-Ub^{KxR}-GFP-Mutanten keinen Effekt auf die Präsentation von NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ (Abbildung 16A und B), obwohl das Lysin-freie NY-ESO-1 durch die vermehrte Verknüpfung mit K11-, K29- und K33-Ketten charakterisiert ist (Abbildung 20D). Wie zuvor dargelegt können unterschiedliche Signale den Abbau des Substrates durch 26S Proteasomen vermitteln (99, 105, 100). Aus diesem Grund erscheint es plausibel, dass der Verlust eines Signals durch den eines anderen kompensiert wird, um die zellulären Funktionen aufrecht zu erhalten.

Wie bereits für eine cytosolische Variante des Nukleoproteins (IAV) gezeigt werden konnte (110), war nicht einmal eine Lysin-freie Ub-Mutante (HA-Ub^{K0}-GFP) in der Lage, die Präsentation von NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ signifikant zu reduzieren (Abbildung 16A und B). Dennoch verdeutlichte die Charakterisierung dieser Mutante eine tiefgreifende Reduktion des HA-Ubiquitinierungsprofils aller Proteine in HeLa-Zellen sowie von isoliertem NY-ESO-1 und NY-ESO-1^{K0} (Abbildung 21). Frühere Untersuchungen zeigten zudem, dass eine virale Transduktion von HA-Ub^{K0}-GFP die Expression des endogenen Ub unterdrückt (110). Sie bedienen sich des FK1-AK, der nur Poly- und keine Monoubiquitinierung erkennt, sodass ein Nachweis von Ub^{K0} verhindert wurde. Dessen ungeachtet bleibt nicht ausgeschlossen, dass eine verstärkte Biosynthese von zelleigenem Ub den Funktionsverlust von HA-Ub^{K0}-GFP in HeLa-Zellen kompensiert und die Antigenpräsentation sicherstellt, da auch eine Poly-Ub-Kette aus endogenem Ub mit jeweils einem HA-Ub^{K0}-GFP Molekül am Ende den verbleibenden Nachweis an HA-Ub Myc-präzipitierter Substrate erklären würde (Abbildung 21B). Andererseits besteht nach Transfektion von HA-Ub^{K0}-GFP weiterhin die Möglichkeit der (mehrfachen) Monoubiquitinierung, zur Bildung C-zu-N verknüpfter linearer Poly-Ub-Ketten sowie zur Modifikation mit UBL-Proteinen. Für alle Varianten wurde bereits

gezeigt, dass sie den Abbau spezifischer Substrate durch das 26S Proteasom vermitteln können (80, 105, 108). Der Abbau monoubiquitiniertes Substrate ist offenbar ein deutlich häufigeres Ereignis als bisher angenommen. Eine kürzlich veröffentlichte Studie legt nahe, dass bis zu 40% der zellulären Proteine (vor allem kleine) in Mammalia und 20% in *S. cerevisiae* monoubiquitinabhängig durch 26S Proteasomen abgebaut werden (146). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der proteasomale Abbau von monoubiquitiniertem Pax-3 durch hHR23B vermittelt wird (80), dem bei Versuchen in Mäusen eine Rolle in der Präsentation des H2-K^d restringierten GFP_{200–208} Epitops zugewiesen wurde (147). Für die Modifikation mit FAT10, dem einzigen UBL-Protein, das nach heutigem Erkenntnisstand Proteine für den Abbau durch 26S Proteasomen markieren kann, wurde gezeigt, dass sie die Präsentation des HLA-A2 restringierten pp65_{495–509} Epitops vermittelt (108). Somit ist es möglich, dass die Antigenpräsentation von NY-ESO-1_{157–165} nach Überexpression von HA-Ub^{K0}-GFP durch eine der drei diskutierten Modifikationsformen aufrecht erhalten wird.

4.2.3 Relevanz der identifizierten Ubiquitinierungsprofile

Lange existierte eine intensiv geführte Diskussion über die Hauptquelle der Antigene MHC Klasse I präsentierter Peptide. Während die eine Hypothese neu-synthetisierte Polypeptide, die aus verschiedenen Gründen nicht die native Form des Proteins erreichen (sog. DRiPs), als Hauptquelle der Antigenpräsentation ansah (8), machte eine zweite reife Proteine (sog. *retirees*) dafür verantwortlich (9). Da für jede Theorie Beispiele existieren, die belegen, dass beide Antigenquellen zur Generierung MHC Klasse I präsentierter Peptide beitragen, wird deutlich, dass dies keine konkurrierenden, sondern sich ergänzende Theorien darstellen.

Unter DRiPs werden unter anderem fehlerhaft-synthetisierte, falsch-gefaltete und frühzeitig terminierte Polypeptide subsumiert, von denen im Falle von NY-ESO-1 ein Teil durch Isolierung mittels des C-terminal gelegenen Myc-tag nicht erfasst wurde. Dieser Punkt ist von entscheidender Bedeutung, da NY-ESO-1 DRiPs als potentielle Antigene zur Präsentation des NY-ESO-1_{157–165} beitragen können. Gleichzeitig kommt eine große Menge antigener DRiPs, wie Polypeptide, die aus defekter bzw. alternativ-*gesplicer* mRNA oder aus alternativen ORF translatiert werden (siehe Kapitel 1.5), als Quelle für die Präsentation des NY-ESO-1_{157–165} Epitops nach NY-ESO-1-Plasmid-DNA-Transfektion gar nicht in Frage. Letztlich liegt das HLA-A2 restringierte NY-ESO-1_{157–165} Epitop am C-terminalen Ende des 180AS langen Proteins. Aus diesem Grund muss die Translation nahezu vollständig ablaufen, damit das Epitop überhaupt synthetisiert wird. Demzufolge bleibt aus dem antigenen DRiP-Reservoir lediglich ein kleiner Teil frühzeitig terminierter Polypeptide, von mindestens 165 und maximal 198AS Länge, welche durch die verwendete Isolierungsmethode

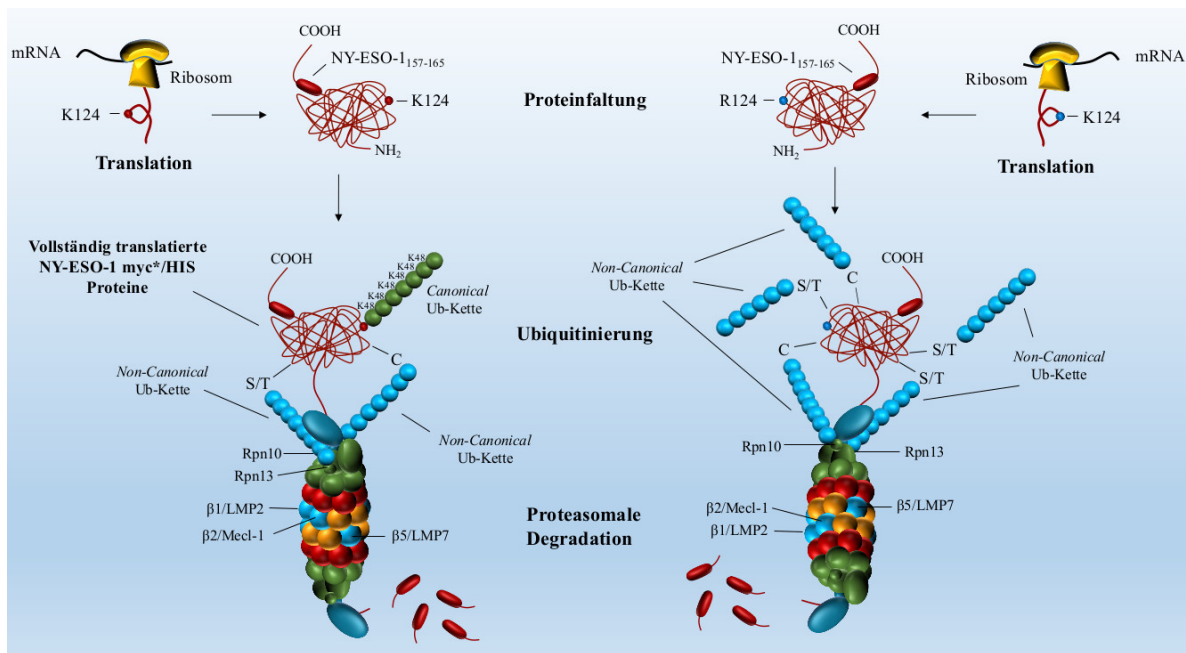


Abbildung 22: Schema der Ub-abhängigen Prozessierung des NY-ESO-1_{157–165} Epitops aus vollständig translatierten NY-ESO-1 Proteinen.

nicht erfasst wurden und gleichzeitig eine Rolle für die Antigenpräsentation spielen könnten. N-terminal Myc/HIS-markiertes NY-ESO-1 würde dieses Problem umgehen, allerdings bliebe fraglich, ob diese Struktur des Fusionsproteins eine mögliche N-terminale Ubiquitinierung *a priori* ausgeschlossen hätte (103).

Ungeachtet der Tatsache, ob NY-ESO-1 DRiPs oder *Retirees* zur Generierung des HLA-A2 restringierten Epitops rekrutiert werden, schließt die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode zur Identifizierung des Ubiquitinierungsprofil von NY-ESO-1 und NY-ESO-1^{K0} den größten Teil der antigen wirksamen Substrate ein, wodurch die bislang gezogenen Schlussfolgerungen Bestand haben. Demzufolge lassen sich keine Unterschiede in den Anforderungen, die Lysin-freies und Wildtypprotein an die einzelnen Komponenten der Antigenprozessierungsmaschinerie in HeLa-Zellen stellen, identifizieren (Abbildung 22). Bei Abwesenheit des kanonischen Ub-Signals (Lysin-verknüpfte K48-Polyubiquitinierung, siehe 1.4.3) existieren biologische Kompensationsmechanismen (Verknüpfung alternativer Poly-Ub-Ketten an alternativen Akzeptorstellen), um die zelluläre Homöostase aufrechtzuerhalten und die MHC Klasse I Antigenpräsentation sicherzustellen. Gleichzeitig bleibt zu bemerken, dass diese Schlussfolgerungen lediglich für HeLa-Zellen nach Plasmid-DNA Transfektion gelten. Eine Verallgemeinerung bedarf der Ausweitung der Experimente auf andere Zell- und Antigenapplikationssysteme sowie einer Charakterisierung *in vivo*.

4.3 Ausblick

Ein wichtiges Ziel immunbasierter Anti-Tumor-Therapie ist die Identifizierung eines universellen Zielantigens, das unabhängig vom Rezipienten mit Hilfe eines allgemein verfügbaren Effektorinstruments wie Vakzinierungen, Antikörper, DCs, CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen, CAR (*Chimeric Antigen Receptor*) T-Zellen oder TRUCKS (*CAR T cells redirected for universal cytokine killing*) die Abstoßung der malignen Tumorzellen vermitteln kann.

Erstens sollte die Expression des geeigneten Antigens auf den Tumor beschränkt sein, um starke Nebenwirkungen der Therapie möglichst zu vermeiden. Zweitens ist die Verbreitung auf eine Vielzahl an malignen Entitäten vorteilhaft, um verschiedene Krebserkrankungen mit derselben Therapie behandeln zu können. Drittens ist die Immunogenität des Antigens entscheidend für die Ausbildung einer adaptiven Immunantwort und den Erfolg einer immunbasierten Anti-Tumor-Therapie. In dieser Hinsicht ist das *cancer/testis* Antigen NY-ESO-1 ein vielversprechendes Ziel, da seine Expression lediglich auf Tumorzellen und immunologisch privilegiertes Gewebe beschränkt ist (113) (siehe Kapitel 1.5). Darüber hinaus ist es mit steigender Aggressivität des Malignoms in einer Reihe unterschiedlicher maligner Entitäten zu finden, z. B. in Synovialsarkomen (80%), Ovarialkarzinomen (40%), Melanomen (30-40%) und multiplen Myelomen (30%) (113). Zudem ließ sich in 40-50% HLA-A2⁺ Patienten mit NY-ESO-1 exprimierenden Malignomen die spontane Entwicklung von NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ spezifischen CD8⁺ T-Effektorzellen detektieren (148), deren TCRs für die adoptive Zelltherapie von besonderer Bedeutung sind.

Der therapeutische Einsatz Epitop-spezifischer CD8⁺ T-Zellen ist allerdings auf den HLA-Haplotyp des Patienten beschränkt. Dahingehend eignet sich NY-ESO-1 besonders gut, da das 157-165 Epitop auf HLA-A2 restringiert ist, was mit ca. 29% das häufigste HLA-A Allel in der europäischen Bevölkerung darstellt (149). Klinische Studien, die auf der Verwendung von TCR-modifizierten NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ spezifischen T-Zellen beruhten, beobachteten in HLA-A2⁺ Patienten mit NY-ESO-1 exprimierenden multiplen Myelomen (119), Synovialsarkomen oder Melanomen (120) klinische Ansprechraten in bis zu 50% der Fälle. Allerdings zeigte die Behandlung eines Großteils der Patienten keine messbaren Effekte. Ursachen dafür können unter anderem HLA- bzw. Antigen-Verlust, die immunsuppressive Wirkung von MDSCs der Tumorumgebung oder eine unzureichende Affinität des TCRs sein. Diesbezüglich stellt der TCR des RG39 T-Zell Klons ein sehr vielversprechendes Instrument dar, da eine suffiziente Aktivierung sogar durch $9 \cdot 10^{-19} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$ Epitopkonzentration erreicht werden konnte (4) und eine *in vivo* Charakterisierung angestrebt ist. Dennoch stellt die Basis einer effizienten Erkennung und Abstoßung von Tumorzellen durch NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ spezifische CD8⁺ T-Zellen eine genaue Kenntnis der Anforderungen an

die Antigenprozessierungsmaschinerie des immunogenen Tumorantigens dar. Im Falle von HLA-A2⁺ Patienten mit NY-ESO-1⁺ multiplem Myelom, die mittels einer adoptiven Zell-Therapie mit NY-ESO-1_{157–165} spezifischen CD8⁺ T-Zellen behandelt werden, ist es essentiell zu wissen, dass die MHC Klasse I Präsentation des Epitops proteasomaler Aktivität unterliegt, da Proteasominhibitoren wie Bortezomib und Carfilzomib eine wichtige Therapiesäule im fortgeschrittenem Stadium bilden.

Ein alternativer Ansatz ist die Stimulation einer adaptiven Immunantwort mit Aktivierung Antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen durch Vakzinierung mit Tumorantigen-kodierender mRNA-transfizierten DCs. Eine Studie aus 2008 (150) konnte zeigen, dass die Transfektion von Ub-MART-1 kodierender mRNA zu einer stärkeren CD8⁺ T-Zell-Antwort führte als MART-1-kodierende mRNA allein. Erkenntnisse über den Einfluss einer bestimmten Form der Ubiquitinierung auf die Antigenpräsentation MHC Klasse I restringierter Epitope bieten die Möglichkeit, neue therapeutische Ansatzpunkte zu identifizieren, in dem E3-Ligasen, die spezifische Polyubiquitinierungsarten vermitteln, in ihrer Aktivität gefördert oder gehemmt werden. Darüber hinaus könnten zukünftige Studien dieser Art mit NY-ESO-1 als Zielantigen das Priming langlebiger CD8⁺ T-Effektorzellen durch Inhibition der Aktivität von LMP2 eventuell verbessern.

Obwohl die vorliegende Arbeit einen großen Teil des Prozessierungsweges des NY-ESO-1_{157–165} Epitops *in cellulo* entschlüsseln konnte, bedarf es der Bestätigung und Vertiefung der Ergebnisse in unterschiedlichen Zelllinien, Organismen und experimentellen Designs, um die gewonnenen Erkenntnisse zur Konzipierung einer effizienten Anti-Tumor-Therapie in der Klinik anzuwenden.

Literatur

- [1] Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 2007;449:419–426.
- [2] Rock KL, Goldberg AL. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol* 1999;17:739–779.
- [3] Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 1994;78:761–771.
- [4] Ebstein F, Textoris-Taube K, Keller C, Golnik R, Vigneron N, Van den Eynde BJ, Schuler-Thurner B, Schadendorf D, Lorenz FKM, Uckert W, Urban S, Lehmann A, Albrecht-Koepke N, Janek K, Henklein P, Niewianda A, Kloetzel PM, Mishto M. Proteasomes generate spliced epitopes by two different mechanisms and as efficiently as non-spliced epitopes. *Sci Rep* 2016;6:24032.
- [5] Kisselev AF, Akopian TN, Woo KM, Goldberg AL. The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J Biol Chem* 1999;274:3363–3371.
- [6] Cascio P, Hilton C, Kisselev AF, Rock KL, Goldberg AL. 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. *EMBO J* 2001;20:2357–2366.
- [7] Lauvau G, Kakimi K, Niedermann G, Ostankovitch M, Yotnda P, Firat H, Chisari FV, van Endert PM. Human transporters associated with antigen processing (TAPs) select epitope precursor peptides for processing in the endoplasmic reticulum and presentation to T cells. *J Exp Med* 1999;190:1227–1240.
- [8] Yewdell JW. DRiPs solidify: progress in understanding endogenous MHC class I antigen processing. *Trends Immunol* 2011;32:548–558.
- [9] Rock KL, Farfán-Arribas DJ, Colbert JD, Goldberg AL. Re-examining class-I presentation and the DRiP hypothesis. *Trends Immunol* 2014;35:144–152.
- [10] Schubert U, Antón LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 2000;404:770–774.
- [11] Hershko A, Ciechanover A. The Ubiquitin System for Protein Degradation. *Annu Rev Biochem* 1992;61:761–807.
- [12] Dahlmann B. Mammalian proteasome subtypes: Their diversity in structure and function. *Arch Biochem Biophys* 2016;591:132–140.
- [13] Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* 1996;65:801–847.
- [14] Hegerl R, Pfeifer G, Pühler G, Dahlmann B, Baumeister W. The three-dimensional structure of proteasomes from *Thermoplasma acidophilum* as determined by electron microscopy using random conical tilting. *FEBS Lett* 1991;283:117–121.

- [15] Murata S, Yashiroda H, Tanaka K. Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:104–115.
- [16] Kloetzel PM. Antigen processing by the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:179–187.
- [17] Löwe J, Stock D, Jap B, Zwickl P, Baumeister W, Huber R. Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* 1995;268:533–539.
- [18] Groll M, Ditzel L, Löwe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD, Huber R. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 1997;386:463–471.
- [19] Unno M, Mizushima T, Morimoto Y, Tomisugi Y, Tanaka K, Yasuoka N, Tsukihara T. The Structure of the Mammalian 20S Proteasome at 2.75 Å Resolution. *Structure* 2002;10:609–618.
- [20] Groll M, Bajorek M, Köhler A, Moroder L, Rubin DM, Huber R, Glickman MH, Finley D. A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol* 2000;7:1062–1067.
- [21] Groll M, Huber R. Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:606–616.
- [22] Ruschak AM, Religa TL, Breuer S, Witt S, Kay LE. The proteasome antechamber maintains substrates in an unfolded state. *Nature* 2010;467:868–871.
- [23] Groll M, Heinemeyer W, Jäger S, Ullrich T, Bochtler M, Wolf DH, Huber R. The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:10976–10983.
- [24] Orłowski M, Wilk S. Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. *Arch Biochem Biophys* 2000;383:1–16.
- [25] Orłowski M. The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system. *Biochemistry* 1990;29:10289–10297.
- [26] Heinemeyer W, Fischer M, Krimmer T, Stachon U, Wolf DH. The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J Biol Chem* 1997;272:25200–25209.
- [27] Driscoll J, Brown MG, Finley D, Monaco JJ. MHC-linked LMP gene products specifically alter peptidase activities of the proteasome. *Nature* 1993;365:262–264.
- [28] Kisselev AF, van der Linden WA, Overkleeft HS. Proteasome inhibitors: an expanding army attacking a unique target. *Chem Biol* 2012;19:99–115.
- [29] Aki M, Shimbara N, Takashina M, Akiyama K, Kagawa S, Tamura T, Tanahashi N, Yoshimura T, Tanaka K, Ichihara A. Interferon-gamma induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. *J Biochem* 1994;115:257–269.
- [30] Groettrup M, Kraft R, Kostka S, Standera S, Stohwasser R, Kloetzel PM. A third interferon-gamma-induced subunit exchange in the 20S proteasome. *Eur J Immunol* 1996;26:863–869.

- [31] Ebstein F, Lange N, Urban S, Seifert U, Krüger E, Kloetzel PM. Maturation of human dendritic cells is accompanied by functional remodelling of the ubiquitin-proteasome system. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:1205–1215.
- [32] Hensley SE, Zanker D, Dolan BP, David A, Hickman HD, Embry AC, Skon CN, Grebe KM, Griffin TA, Chen W, Bennink JR, Yewdell JW. Unexpected role for the immunoproteasome subunit LMP2 in antiviral humoral and innate immune responses. *J Immunol* 2010;184:4115–4122.
- [33] Seifert U, Bialy LP, Ebstein F, Bech-Otschir D, Voigt A, Schröter F, Prozorovski T, Lange N, Steffen J, Rieger M, Kuckelkorn U, Aktas O, Kloetzel PM, Krüger E. Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress. *Cell* 2010;142:613–624.
- [34] Nathan JA, Spinnenhirn V, Schmidtke G, Basler M, Groettrup M, Goldberg AL. Immuno- and constitutive proteasomes do not differ in their abilities to degrade ubiquitinated proteins. *Cell* 2013;152:1184–1194.
- [35] Kuckelkorn U, Frenz S, Kraft R, Kostka S, Groettrup M, Kloetzel PM. Incorporation of major histocompatibility complex–encoded subunits LMP2 and LMP7 changes the quality of the 20S proteasome polypeptide processing products independent of interferon-gamma. *Eur J Immunol* 1995;25:2605–2611.
- [36] Eleuteri AM, Kohanski RA, Cardozo C, Orlowski M. Bovine spleen multicatalytic protease complex (proteasome). Replacement of X, Y, and Z subunits by LMP7, LMP2, and MECL1 and changes in properties and specificity. *J Biol Chem* 1997;272:11824–11831.
- [37] Ustrell V, Pratt G, Rechsteiner M. Effects of interferon gamma and major histocompatibility complex-encoded subunits on peptidase activities of human multicatalytic proteases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:584–588.
- [38] Gaczynska M, Rock KL, Goldberg AL. Gamma-interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. *Nature* 1993;365:264–267.
- [39] Gaczynska M, Rock KL, Spies T, Goldberg AL. Peptidase activities of proteasomes are differentially regulated by the major histocompatibility complex-encoded genes for LMP2 and LMP7. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:9213–9217.
- [40] Stohwasser R, Kuckelkorn U, Kraft R, Kostka S, Kloetzel PM. 20S proteasome from LMP7 knock out mice reveals altered proteolytic activities and cleavage site preferences. *FEBS Lett* 1996;383:109–113.
- [41] Stohwasser R, Salzmann U, Giesebrecht J, Kloetzel PM, Holzhütter HG. Kinetic evidences for facilitation of peptide channelling by the proteasome activator PA28. *Eur J Biochem* 2000;267:6221–6230.
- [42] Sun Y, Sijts AJAM, Song M, Janek K, Nussbaum AK, Kral S, Schirle M, Stevanovic S, Paschen A, Schild H, Kloetzel PM, Schadendorf D. Expression of the proteasome activator PA28 rescues the presentation of a cytotoxic T lymphocyte epitope on melanoma cells. *Cancer Res* 2002;62:2875–2882.
- [43] Kloetzel PM, Ossendorp F. Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 2004;16:76–81.

- [44] Fehling HJ, Swat W, Laplace C, Kühn R, Rajewsky K, Müller U, von Boehmer H. MHC class I expression in mice lacking the proteasome subunit LMP-7. *Science* 1994;265:1234–1237.
- [45] Van Kaer L, Ashton-Rickardt PG, Eichelberger M, Gaczynska M, Nagashima K, Rock KL, Goldberg AL, Doherty PC, Tonegawa S. Altered peptidase and viral-specific T cell response in LMP2 mutant mice. *Immunity* 1994;1:533–541.
- [46] Basler M, Moebius J, Elenich L, Groettrup M, Monaco JJ. An altered T cell repertoire in MECL-1-deficient mice. *J Immunol* 2006;176:6665–6672.
- [47] Sijts AJ, Ruppert T, Rehmann B, Schmidt M, Koszinowski U, Kloetzel PM. Efficient generation of a hepatitis B virus cytotoxic T lymphocyte epitope requires the structural features of immunoproteasomes. *J Exp Med* 2000;191:503–514.
- [48] Morel S, Lévy F, Burlet-Schiltz O, Brasseur F, Probst-Kepper M, Peitrequin AL, Monsarrat B, Van Velthoven R, Cerottini JC, Boon T, Gairin JE, Van den Eynde BJ. Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity* 2000;12:107–117.
- [49] Dalet A, Stroobant V, Vigneron N, Van den Eynde BJ. Differences in the production of spliced antigenic peptides by the standard proteasome and the immunoproteasome. *Eur J Immunol* 2011;41:39–46.
- [50] Tenzer S, Stoltze L, Schönfish B, Dengjel J, Müller M, Stevanović S, Rammensee HG, Schild H. Quantitative analysis of prion-protein degradation by constitutive and immunoproteasomes indicates differences correlated with disease susceptibility. *J Immunol* 2004;172:1083–1091.
- [51] Mishto M, Liepe J, Textoris-Taube K, Keller C, Henklein P, Weberruß M, Dahlmann B, Enenkel C, Voigt A, Kuckelkorn U, Stumpf MPH, Kloetzel PM. Proteasome isoforms exhibit only quantitative differences in cleavage and epitope generation. *Eur J Immunol* 2014;44:3508–3521.
- [52] Pang KC, Sanders MT, Monaco JJ, Doherty PC, Turner SJ, Chen W. Immunoproteasome subunit deficiencies impact differentially on two immunodominant influenza virus-specific CD8+ T cell responses. *J Immunol* 2006;177:7680–7688.
- [53] Deol P, Zaiss DMW, Monaco JJ, Sijts AJAM. Rates of processing determine the immunogenicity of immunoproteasome-generated epitopes. *J Immunol* 2007;178:7557–7562.
- [54] Nussbaum AK, Rodriguez-Carreno MP, Benning N, Botten J, Whitton JL. Immunoproteasome-deficient mice mount largely normal CD8+ T cell responses to lymphocytic choriomeningitis virus infection and DNA vaccination. *J Immunol* 2005;175:1153–1160.
- [55] Klare N, Seeger M, Janek K, Jungblut PR, Dahlmann B. Intermediate-type 20 S proteasomes in HeLa cells: asymmetric subunit composition, diversity and adaptation. *J Mol Biol* 2007;373:1–10.
- [56] Heink S, Ludwig D, Kloetzel PM, Krüger E. IFN-gamma-induced immune adaptation of the proteasome system is an accelerated and transient response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:9241–9246.

- [57] Guillaume B, Chapiro J, Stroobant V, Colau D, Van Holle B, Parvizi G, Bousquet-Dubouch MP, Théate I, Parmentier N, Van den Eynde BJ. Two abundant proteasome subtypes that uniquely process some antigens presented by HLA class I molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:18599–18604.
- [58] Griffin TA, Nandi D, Cruz M, Fehling HJ, Kaer LV, Monaco JJ, Colbert RA. Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits. *J Exp Med* 1998;187:97–104.
- [59] Groettrup M, Standera S, Stohwasser R, Kloetzel PM. The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:8970–8975.
- [60] Zanker D, Waithman J, Yewdell JW, Chen W. Mixed proteasomes function to increase viral peptide diversity and broaden antiviral CD8+ T cell responses. *J Immunol* 2013;191:52–59.
- [61] Livnat-Levanon N, Kevei \, Kleifeld O, Krutauz D, Segref A, Rinaldi T, Erpapazoglou Z, Cohen M, Reis N, Hoppe T, Glickman MH. Reversible 26S proteasome disassembly upon mitochondrial stress. *Cell Rep* 2014;7:1371–1380.
- [62] Raynes R, Pomatto LCD, Davies KJA. Degradation of oxidized proteins by the proteasome: Distinguishing between the 20S, 26S, and immunoproteasome proteolytic pathways. *Mol Aspects Med* 2016;50:41–55.
- [63] Lander GC, Estrin E, Matyskiela ME, Bashore C, Nogales E, Martin A. Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle. *Nature* 2012;482:186–191.
- [64] Matyskiela ME, Lander GC, Martin A. Conformational switching of the 26S proteasome enables substrate degradation. *Nat Struct Mol Biol* 2013;20:781–788.
- [65] Tomko RJ, Funakoshi M, Schneider K, Wang J, Hochstrasser M. Heterohexameric ring arrangement of the eukaryotic proteasomal ATPases: implications for proteasome structure and assembly. *Mol Cell* 2010;38:393–403.
- [66] Smith DM, Kafri G, Cheng Y, Ng D, Walz T, Goldberg AL. ATP binding to PAN or the 26S ATPases causes association with the 20S proteasome, gate opening, and translocation of unfolded proteins. *Mol Cell* 2005;20:687–698.
- [67] Smith DM, Chang SC, Park S, Finley D, Cheng Y, Goldberg AL. Docking of the proteasomal ATPases' carboxyl termini in the 20S proteasome's alpha ring opens the gate for substrate entry. *Mol Cell* 2007;27:731–744.
- [68] Rabl J, Smith DM, Yu Y, Chang SC, Goldberg AL, Cheng Y. Mechanism of gate opening in the 20S proteasome by the proteasomal ATPases. *Mol Cell* 2008;30:360–368.
- [69] Schweitzer A, Aufderheide A, Rudack T, Beck F, Pfeifer G, Plitzko JM, Sakata E, Schulten K, Förster F, Baumeister W. Structure of the human 26S proteasome at a resolution of 3.9 Å. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016;113:7816–7821.
- [70] Worden EJ, Padovani C, Martin A. Structure of the Rpn11–Rpn8 dimer reveals mechanisms of substrate deubiquitination during proteasomal degradation. *Nat Struct Mol Biol* 2014; 21:220–227.

- [71] Verma R, Aravind L, Oania R, McDonald WH, Yates JR, Koonin EV, Deshaies RJ. Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* 2002;298:611–615.
- [72] Ciechanover A, Stanhill A. The complexity of recognition of ubiquitinated substrates by the 26S proteasome. *Biochim Biophys Acta* 2014;1843:86–96.
- [73] Young P, Deveraux Q, Beal RE, Pickart CM, Rechsteiner M. Characterization of two polyubiquitin binding sites in the 26 S protease subunit 5a. *J Biol Chem* 1998;273:5461–5467.
- [74] Haririnia A, D’Onofrio M, Fushman D. Mapping the interactions between Lys48 and Lys63-linked di-ubiquitins and a ubiquitin-interacting motif of S5a. *J Mol Biol* 2007;368:753–766.
- [75] Wang Q, Young P, Walters KJ. Structure of S5a bound to monoubiquitin provides a model for polyubiquitin recognition. *J Mol Biol* 2005;348:727–739.
- [76] Baboshina OV, Haas AL. Novel multiubiquitin chain linkages catalyzed by the conjugating enzymes E2EPF and RAD6 are recognized by 26 S proteasome subunit 5. *J Biol Chem* 1996;271:2823–2831.
- [77] Schreiner P, Chen X, Husnjak K, Randles L, Zhang N, Elsasser S, Finley D, Dikic I, Walters KJ, Groll M. Ubiquitin docking at the proteasome through a novel pleckstrin-homology domain interaction. *Nature* 2008;453:548–552.
- [78] Chen X, Lee BH, Finley D, Walters KJ. Structure of proteasome ubiquitin receptor hRpn13 and its activation by the scaffolding protein hRpn2. *Mol Cell* 2010;38:404–415.
- [79] Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* 2000;19:94–102.
- [80] Boutet SC, Disatnik MH, Chan LS, Iori K, Rando TA. Regulation of Pax3 by Proteasomal Degradation of Monoubiquitinated Protein in Skeletal Muscle Progenitors. *Cell* 2007;130:349–362.
- [81] Hamazaki J, Sasaki K, Kawahara H, Hisanaga SI, Tanaka K, Murata S. Rpn10-mediated degradation of ubiquitinated proteins is essential for mouse development. *Mol Cell Biol* 2007;27:6629–6638.
- [82] Hamazaki J, Hirayama S, Murata S. Redundant Roles of Rpn10 and Rpn13 in Recognition of Ubiquitinated Proteins and Cellular Homeostasis. *PLoS Genet* 2015;11:e1005401.
- [83] Berko D, Herkon O, Braunstein I, Isakov E, David Y, Ziv T, Navon A, Stanhill A. Inherent asymmetry in the 26S proteasome is defined by the ubiquitin receptor RPN13. *J Biol Chem* 2014;289:5609–5618.
- [84] Hershko A, Heller H, Elias S, Ciechanover A. Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem* 1983;258:8206–8214.
- [85] Huang F, Kirkpatrick D, Jiang X, Gygi S, Sorkin A. Differential regulation of EGF receptor internalization and degradation by multiubiquitination within the kinase domain. *Mol Cell* 2006;21:737–748.
- [86] Ghosh S, Dass JFP. Study of pathway cross-talk interactions with NF- κ B leading to its activation via ubiquitination or phosphorylation: A brief review. *Gene* 2016;584:97–109.

- [87] Kravtsova-Ivantsiv Y, Ciechanover A. Non-canonical ubiquitin-based signals for proteasomal degradation. *J Cell Sci* 2012;125:539–548.
- [88] Robinson CM, Ohh M. The multifaceted von Hippel-Lindau tumour suppressor protein. *FEBS Lett* 2014;588:2704–2711.
- [89] Clague MJ, Heride C, Urbé S. The demographics of the ubiquitin system. *Trends Cell Biol* 2015;25:417–426.
- [90] Vijay-Kumar S, Bugg CE, Cook WJ. Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol* 1987;194:531–544.
- [91] Ciechanover A, Elias S, Heller H, Hershko A. Covalent affinity purification of ubiquitin-activating enzyme. *J Biol Chem* 1982;257:2537–2542.
- [92] Ciechanover A, Heller H, Katz-Etzion R, Hershko A. Activation of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:761–765.
- [93] Haas AL, Warms JV, Hershko A, Rose IA. Ubiquitin-activating enzyme. Mechanism and role in protein-ubiquitin conjugation. *J Biol Chem* 1982;257:2543–2548.
- [94] Jin J, Li X, Gygi SP, Harper JW. Dual E1 activation systems for ubiquitin differentially regulate E2 enzyme charging. *Nature* 2007;447:1135–1138.
- [95] van Wijk SJL, Timmers HTM. The family of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s): deciding between life and death of proteins. *FASEB J* 2010;24:981–993.
- [96] Eletr ZM, Huang DT, Duda DM, Schulman BA, Kuhlman B. E2 conjugating enzymes must disengage from their E1 enzymes before E3-dependent ubiquitin and ubiquitin-like transfer. *Nat Struct Mol Biol* 2005;12:933–934.
- [97] Zheng N, Shabek N. Ubiquitin Ligases: Structure, Function, and Regulation. *Annu Rev Biochem* 2017;.
- [98] Chau V, Tobias JW, Bachmair A, Marriott D, Ecker DJ, Gonda DK, Varshavsky A. A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* 1989;243:1576–1583.
- [99] Dammer EB, Na CH, Xu P, Seyfried NT, Duong DM, Cheng D, Gearing M, Rees H, Lah JJ, Levey AI, Rush J, Peng J. Polyubiquitin linkage profiles in three models of proteolytic stress suggest the etiology of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 2011;286:10457–10465.
- [100] Jacobson AD, Zhang NY, Xu P, Han KJ, Noone S, Peng J, Liu CW. The lysine 48 and lysine 63 ubiquitin conjugates are processed differently by the 26 S proteasome. *J Biol Chem* 2009;284:35485–35494.
- [101] Cadwell K, Coscoy L. Ubiquitination on nonlysine residues by a viral E3 ubiquitin ligase. *Science* 2005;309:127–130.
- [102] Tait SWG, de Vries E, Maas C, Keller AM, D'Santos CS, Borst J. Apoptosis induction by Bid requires unconventional ubiquitination and degradation of its N-terminal fragment. *J Cell Biol* 2007;179:1453–1466.

- [103] Breitschopf K, Bengal E, Ziv T, Admon A, Ciechanover A. A novel site for ubiquitination: the N-terminal residue, and not internal lysines of MyoD, is essential for conjugation and degradation of the protein. *EMBO J* 1998;17:5964–5973.
- [104] Nucifora FC, Nucifora LG, Ng CH, Arbez N, Guo Y, Roby E, Shani V, Engelender S, Wei D, Wang XF, Li T, Moore DJ, Pletnikova O, Troncoso JC, Sawa A, Dawson TM, Smith W, Lim KL, Ross CA. Ubiquitination via K27 and K29 chains signals aggregation and neuronal protection of LRRK2 by WSB1. *Nat Commun* 2016;7:11792.
- [105] Prakash S, Inobe T, Hatch AJ, Matouschek A. Substrate selection by the proteasome during degradation of protein complexes. *Nat Chem Biol* 2009;5:29–36.
- [106] Wei J, Zanker D, Di Carluccio AR, Smelkinson MG, Takeda K, Seedhom MO, Dersh D, Gibbs JS, Yang N, Jadhav A, Chen W, Yewdell JW. Varied Role of Ubiquitylation in Generating MHC Class I Peptide Ligands. *J Immunol* 2017;198:3835–3845.
- [107] Fiebiger BM, Pfister H, Behrends U, Mautner J. Polyubiquitination of lysine-48 is an essential but indirect signal for MHC class I antigen processing. *Eur J Immunol* 2015;45:716–727.
- [108] Ebstein F, Lehmann A, Kloetzel PM. The FAT10- and ubiquitin-dependent degradation machineries exhibit common and distinct requirements for MHC class I antigen presentation. *Cell Mol Life Sci* 2012;69:2443–2454.
- [109] Michalek MT, Grant EP, Gramm C, Goldberg AL, Rock KL. A role for the ubiquitin-dependent proteolytic pathway in MHC class I-restricted antigen presentation. *Nature* 1993;363:552–554.
- [110] Huang L, Marvin JM, Tatsis N, Eisenlohr LC. Cutting Edge: Selective role of ubiquitin in MHC class I antigen presentation. *J Immunol* 2011;186:1904–1908.
- [111] Michalek MT, Grant EP, Rock KL. Chemical denaturation and modification of ovalbumin alters its dependence on ubiquitin conjugation for class I antigen presentation. *J Immunol* 1996;157:617–624.
- [112] Guillaudeux T, Gomez E, Onno M, Drénou B, Segretain D, Alberti S, Lejeune H, Fauchet R, Jégou B, Le Bouteiller P. Expression of HLA class I genes in meiotic and post-meiotic human spermatogenic cells. *Biol Reprod* 1996;55:99–110.
- [113] Gnjjatic S, Nishikawa H, Jungbluth AA, Güre AO, Ritter G, Jäger E, Knuth A, Chen YT, Old LJ. NY-ESO-1: review of an immunogenic tumor antigen. *Adv Cancer Res* 2006;95:1–30.
- [114] Aarnoudse CA, van den Doel PB, Heemskerk B, Schrier PI. Interleukin-2-induced, melanoma-specific T cells recognize CAMEL, an unexpected translation product of LAGE-1. *Int J Cancer* 1999;82:442–448.
- [115] Jäger E, Chen YT, Drijfhout JW, Karbach J, Ringhoffer M, Jäger D, Arand M, Wada H, Noguchi Y, Stockert E, Old LJ, Knuth A. Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *J Exp Med* 1998;187:265–270.
- [116] Chen JL, Dunbar PR, Gileadi U, Jäger E, Gnjjatic S, Nagata Y, Stockert E, Panicali DL, Chen YT, Knuth A, Old LJ, Cerundolo V. Identification of NY-ESO-1 peptide analogues capable of improved stimulation of tumor-reactive CTL. *J Immunol* 2000;165:948–955.

- [117] Batchu RB, Moreno AM, Szmania SM, Bennett G, Spagnoli GC, Ponnazhagan S, Barlogie B, Tricot G, van Rhee F. Protein transduction of dendritic cells for NY-ESO-1-based immunotherapy of myeloma. *Cancer Res* 2005;65:10041–10049.
- [118] Gotter J, Brors B, Hergenbahn M, Kyewski B. Medullary epithelial cells of the human thymus express a highly diverse selection of tissue-specific genes colocalized in chromosomal clusters. *J Exp Med* 2004;199:155–166.
- [119] Rapoport AP, Stadtmauer EA, Binder-Scholl GK, Goloubeva O, Vogl DT, Lacey SF, Badros AZ, Garfall A, Weiss B, Finklestein J, Kulikovskaya I, Sinha SK, Kronsberg S, Gupta M, Bond S, Melchiori L, Brewer JE, Bennett AD, Gerry AB, Pumphrey NJ, Williams D, Tayton-Martin HK, Ribeiro L, Holdich T, Yanovich S, Hardy N, Yared J, Kerr N, Philip S, Westphal S, Siegel DL, Levine BL, Jakobsen BK, Kalos M, June CH. NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma. *Nat Med* 2015;21:914–921.
- [120] Robbins PF, Morgan RA, Feldman SA, Yang JC, Sherry RM, Dudley ME, Wunderlich JR, Nahvi AV, Helman LJ, Mackall CL, Kammula US, Hughes MS, Restifo NP, Raffeld M, Lee CCR, Levy CL, Li YF, El-Gamil M, Schwarz SL, Laurencot C, Rosenberg SA. Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *J Clin Oncol* 2011;29:917–924.
- [121] Ebstein F, Keller M, Paschen A, Walden P, Seeger M, Bürger E, Krüger E, Schadendorf D, Kloetzel PM, Seifert U. Exposure to Melan-A/MART-126-35 tumor epitope specific CD8(+)T cells reveals immune escape by affecting the ubiquitin-proteasome system (UPS). *Sci Rep* 2016;6:25208.
- [122] Urban S, Textoris-Taube K, Reimann B, Janek K, Dannenberg T, Ebstein F, Seifert C, Zhao F, Kessler JH, Halenius A, Henklein P, Paschke J, Cadel S, Bernhard H, Ossendorf F, Foulon T, Schadendorf D, Paschen A, Seifert U. The Efficiency of Human Cytomegalovirus pp65495-503 CD8+ T Cell Epitope Generation Is Determined by the Balanced Activities of Cytosolic and Endoplasmic Reticulum-Resident Peptidases. *J Immunol* 2012;189:529–538.
- [123] Röllinghoff M, Warner NL. Specificity of in vivo tumor rejection assessed by mixing immune spleen cells with target and unrelated tumor cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 1973;144:813–818.
- [124] Fonteneau JF, Larsson M, Somersan S, Sanders C, Münz C, Kwok WW, Bhardwaj N, Jote-reau F. Generation of high quantities of viral and tumor-specific human CD4+ and CD8+ T-cell clones using peptide pulsed mature dendritic cells. *J Immunol Methods* 2001;258:111–126.
- [125] Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 1990;96:23–28.
- [126] Golnik R, Lehmann A, Kloetzel PM, Ebstein F. Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I Processing of the NY-ESO-1 Antigen Is Regulated by Rpn10 and Rpn13 Proteins and Immunoproteasomes following Non-lysine Ubiquitination. *J Biol Chem* 2016;291:8805–8815.
- [127] Cesaratto F, Burrone OR, Petris G. Tobacco Etch Virus protease: A shortcut across biotechnologies. *J Biotechnol* 2016;231:239–249.

- [128] Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767–811.
- [129] Liu X, Chen H, Patel DJ. Solution structure of actinomycin-DNA complexes: drug intercalation at isolated G-C sites. *J Biomol NMR* 1991;1:323–347.
- [130] Hirano N, Butler MO, Xia Z, Ansén S, von Bergwelt-Baildon MS, Neuberg D, Freeman GJ, Nadler LM. Engagement of CD83 ligand induces prolonged expansion of CD8+ T cells and preferential enrichment for antigen specificity. *Blood* 2006;107:1528–1536.
- [131] Johnson LA, Jackson DG. Control of dendritic cell trafficking in lymphatics by chemokines. *Angiogenesis* 2014;17:335–345.
- [132] English L, Chemali M, Duron J, Rondeau C, Laplante A, Gingras D, Alexander D, Leib D, Norbury C, Lippé R, Desjardins M. Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection. *Nat Immunol* 2009;10:480–487.
- [133] Won JH, Parekattil SJ, Davidson SD, Luddy JS, Choudhury MS, Mallouh C, Tazaki H, Konno S. Ammonium-chloride-induced prostatic hypertrophy in vitro: urinary ammonia as a potential risk factor for benign prostatic hyperplasia. *Urol Res* 1999;27:376–381.
- [134] Bellavista E, Andreoli F, Parenti MD, Martucci M, Santoro A, Salvioli S, Capri M, Baruzzi A, Del Rio A, Franceschi C, Mishto M. Immunoproteasome in cancer and neuropathologies: a new therapeutic target? *Curr Pharm Des* 2013;19:702–718.
- [135] Myung J, Kim KB, Lindsten K, Dantuma NP, Crews CM. Lack of proteasome active site allosterity as revealed by subunit-specific inhibitors. *Mol Cell* 2001;7:411–420.
- [136] Kisselev AF, Callard A, Goldberg AL. Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. *J Biol Chem* 2006;281:8582–8590.
- [137] Shimizu Y, Okuda-Shimizu Y, Hendershot LM. Ubiquitylation of an ERAD Substrate Occurs on Multiple Types of Amino Acids. *Mol Cell* 2010;40:917–926.
- [138] Kirkpatrick DS, Weldon SF, Tsaprailis G, Liebler DC, Gandolfi AJ. Proteomic identification of ubiquitinated proteins from human cells expressing His-tagged ubiquitin. *Proteomics* 2005;5:2104–2111.
- [139] Beaudette P, Popp O, Dittmar G. Proteomic techniques to probe the ubiquitin landscape. *Proteomics* 2016;16:273–287.
- [140] Clay TM, Hobeika AC, Mosca PJ, Lysterly HK, Morse MA. Assays for monitoring cellular immune responses to active immunotherapy of cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:1127–1135.
- [141] Hesse MD, Karulin AY, Boehm BO, Lehmann PV, Tary-Lehmann M. A T cell clone's avidity is a function of its activation state. *J Immunol* 2001;167:1353–1361.
- [142] Hendil KB, Uerkevitz W. The human multicatalytic proteinase: affinity purification using a monoclonal antibody. *J Biochem Biophys Methods* 1991;22:159–165.
- [143] Basler M, Lauer C, Moebius J, Weber R, Przybylski M, Kisselev AF, Tsu C, Groettrup M. Why the structure but not the activity of the immunoproteasome subunit low molecular mass polypeptide 2 rescues antigen presentation. *J Immunol* 2012;189:1868–1877.

- [144] Huber EM, Basler M, Schwab R, Heinemeyer W, Kirk CJ, Groettrup M, Groll M. Immuno- and Constitutive Proteasome Crystal Structures Reveal Differences in Substrate and Inhibitor Specificity. *Cell* 2012;148:727–738.
- [145] Soong RS, Anchoori RK, Yang B, Yang A, Tseng SH, He L, Tsai YC, Roden RBS, Hung CF. RPN13/ADRM1 inhibitor reverses immunosuppression by myeloid-derived suppressor cells. *Oncotarget* 2016;7:68489–68502.
- [146] Livneh I, Kravtsova-Ivantsiv Y, Braten O, Kwon YT, Ciechanover A. Monoubiquitination joins polyubiquitination as an esteemed proteasomal targeting signal. *Bioessays* 2017;39.
- [147] Andersson HA, Passeri MF, Barry MA. Rad23 as a reciprocal agent for stimulating or repressing immune responses. *Hum Gene Ther* 2005;16:634–641.
- [148] Jäger E, Gnjatic S, Nagata Y, Stockert E, Jäger D, Karbach J, Neumann A, Rieckenberg J, Chen YT, Ritter G, Hoffman E, Arand M, Old LJ, Knuth A. Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8+ T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1+ cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:12198–12203.
- [149] Kiefel V, Mueller-Eckhardt C, eds. *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2011. DOI: 10.1007/978-3-642-12765-6.
- [150] Hosoi A, Takeda Y, Sakuta K, Ueha S, Kurachi M, Kimura K, Maekawa R, Kakimi K. Dendritic cell vaccine with mRNA targeted to the proteasome by polyubiquitination. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;371:242–246.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Richard Golnik, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Charakterisierung der Ubiquitinierung des Tumorantigens NY-ESO-1 und deren Einfluss auf die MHC Klasse I Antigenpräsentation“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Richard Golnik hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Golnik R, Lehmann A, Kloetzel PM, Ebstein F. Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I Processing of the NY-ESO-1 Antigen Is Regulated by Rpn10 and Rpn13 Proteins and Immunoproteasomes following Non-lysine Ubiquitination. Journal of Biological Chemistry 2016;291:8805–8815.

Richard Golnik hat in eigenverantwortlicher Arbeit alle in der Publikation verwendeten NY-ESO-1 Konstrukte kloniert und die RG39 T-Zellen generiert. Zudem führte er die Experimente für die in den Abbildungen 1-5A und 7-9 gezeigten Daten allein sowie die in den Abbildungen 5B und 6 gezeigten Daten der Veröffentlichung mit Hilfe von Andrea Lehman durch, analysierte die Daten und fasste sie mit Hilfe von Frédéric Ebstein (Abb. 7A, 8A und 10) in den einzelnen Grafiken zusammen. Er war an der Verfassung des Manuskripts beteiligt, das von Dr. Frédéric Ebstein und Prof. Dr. Peter-Michael Kloetzel, aufgrund ihrer umfassenden Erfahrung im Publikationsprozess und zahlreicher Revisionen des Manuskripts, in die endgültige Version umgeschrieben wurde.

Publikation 2: Ebstein F, Textoris-Taube K, Keller C, Golnik R, Vigneron N, Van den Eynde BJ, Schuler- Thurner B, Schadendorf D, Lorenz FKM, Uckert W, Urban S, Lehmann A, Albrecht-Koepke N, Janek K, Henklein P, Niewianda A, Kloetzel PM, Mishto M. Proteasomes generate spliced epitopes by two different mechanisms and as efficiently as non-spliced epitopes. Sci Rep 2016;6:24032.

Richard Golnik stellte die NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ spezifischen RG39 T-Zellen für Abbildung 6B zur Verfügung.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

- Golnik R, Lehmann A, Kloetzel PM, Ebstein F. Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I Processing of the NY-ESO-1 Antigen Is Regulated by Rpn10 and Rpn13 Proteins and Immunoproteasomes following Non-lysine Ubiquitination. *J Biol Chem* 2016;291:8805-8815.
- Ebstein F, Textoris-Taube K, Keller C, Golnik R, Vigneron N, Van den Eynde BJ, Schuler-Thurner B, Schadendorf D, Lorenz FKM, Uckert W, Urban S, Lehmann A, Albrecht-Koepke N, Janek K, Henklein P, Niewianda A, Kloetzel PM, Mishto M. Proteasomes generate spliced epitopes by two different mechanisms and as efficiently as non-spliced epitopes. *Sci Rep* 2016;6:24032.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Peter-Michael Kloetzel danken, an dessen Institut ich mein Promotionvorhaben unter seiner Leitung und Betreuung umsetzen konnte. Zudem danke ich ihm für sein kritisches Gutachten, der Hilfe beim Verfassen der Veröffentlichung sowie für seine Geduld bezüglich der Dauer der Promotion, die meinem parallelen Studium geschuldet war.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Frédéric Ebstein und Andrea Lehmann für die hervorragende Betreuung der experimentellen Arbeit. Des Weiteren danke ich den beiden für die vielen nützlichen Hinweise und Korrekturen zum Verfassen dieser Dissertation sowie den ausführlichen Erklärungen auf meine zahlreichen immunologischen, biochemischen und technischen Fragen. Frédéric Ebstein danke ich zudem für die Zusammenarbeit beim Verfassen der Veröffentlichung.

Ein besonders großes Dankeschön geht zudem an Herrn Prof. Dr. Burkhardt Dahmann für das konstruktive und kritische Gutachten meiner Dissertation sowie die zahlreichen Situationen in denen er mir mit kompetentem Rat und gutem Kaffee zur Seite stand.

Ein weiterer Dank gilt Ellen Hilgenberg, die mir beim Bestrahlen der Feederzellen geholfen hat. Darüber hinaus bedanke ich mich bei meinen Doktorandenkollegen Felicitas Kirschner, Carolin Schächterle, Franziska Sotzny sowie den Postdoktoranden Nadja Schubert, Karolin Nowak, Karin Schmitt, Anja Brehm sowie den Gruppenleitern Michael Seeger und Ulrike Kuckelkorn für die vielen Diskussionen über fachliche und organisatorische Sachverhalte.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Carolin Albers für das kritische Korrekturlesen der Arbeit sowie ihre bedingungslose Unterstützung. Ein weiterer Dank gilt meinen Eltern für ihre Hilfe in unterschiedlichsten Situationen sowie meinem Bruder Christian Golnik, der mir sehr oft mit seiner wissenschaftlichen Kompetenz zur Seite stand.

Abschließend möchte ich auch Andreas Kühn für eine Vielzahl von Gesprächen zum Thema Statistik sowie Juliane Buttkus für ihren kritischen Blick auf meine Arbeit danken.