

# 1 Einleitung

## 1.1 Chronische myeloische Leukämie

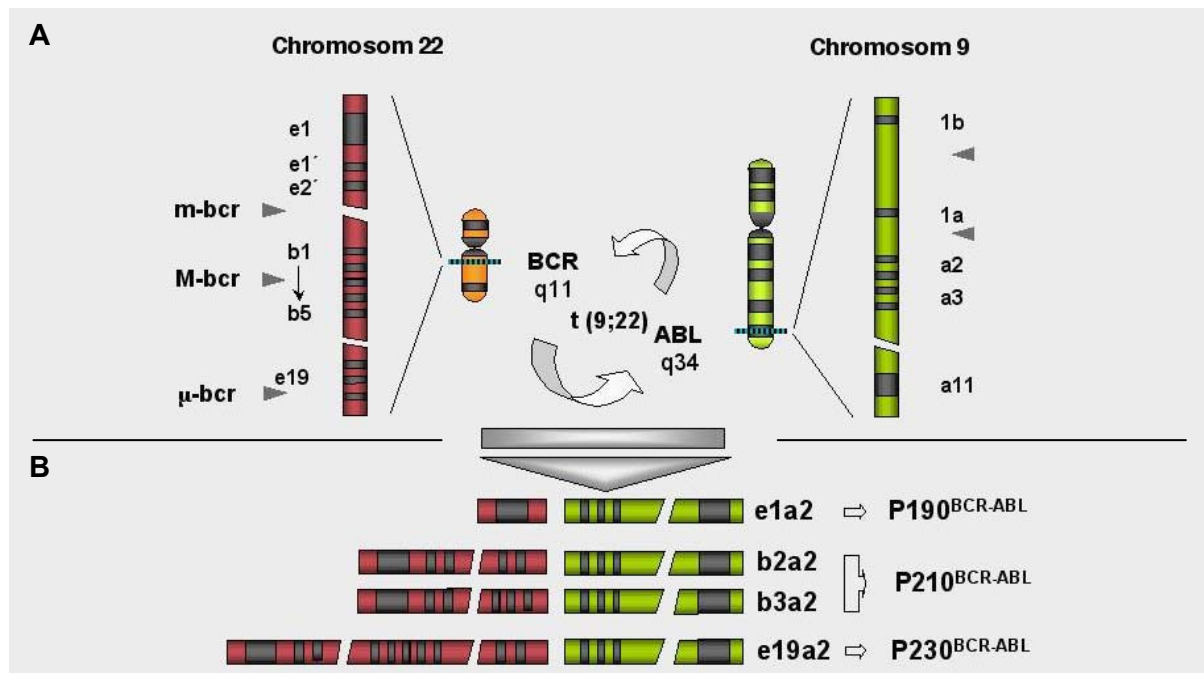
**CML**, die chronische myeloische Leukämie, ist eine Erkrankung der pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen. Bei dieser Erkrankung kommt es zu einer Vermehrung aller granulozytären Vorstufen im peripheren Blut (1). Bereits 1845 beschrieben Virchow (2) und Bennett (3) unabhängig voneinander dieses Krankheitsbild erstmals als *Weisses Blut* (Leukämie). Durch Nowell und Hungerford (4; 5) begann 1960 die Aufklärung des pathogenetischen Mechanismus, welcher auf ein verkürztes Chromosom 22, das so genannte *Philadelphia*-Chromosom, zurückgeführt werden konnte. Das *Philadelphia*-Chromosom dient als zytogenetischer Marker der CML und kann in mehr als 95% aller CML-Patienten nachgewiesen werden. Die CML kommt in allen Altersgruppen vor, tritt jedoch im Median zwischen dem 45. bis 55. Lebensjahr auf. Etwa 15% aller Leukämien sind CML-Fälle. Mit einer jährlichen Inzidenz von 1-2/100 000 stellt die CML die häufigste Erkrankung in der Gruppe der so genannten myeloproliferativen Erkrankungen dar (6).

Der dreiphasige Krankheitsverlauf beginnt mit der chronischen Phase. Sie ist charakterisiert durch eine reiche proliferative Aktivität der Stammzellen, die zwar weiter bis hin zu Granulozyten ausdifferenzieren können, sich jedoch der normalen Wachstumskontrolle entzogen haben und sich unkontrolliert vermehren. Im Durchschnitt dauert die chronische Phase vier bis fünf Jahre an und ist therapeutisch beispielsweise durch eine Immuntherapie mit Interferon- $\alpha$  oder durch die Gabe des Tyrosinkinase-Inhibitors STI 571 (Imatinib) gut zu beeinflussen (siehe 1.1.3). Danach folgt der Übergang zur akzelerierten Phase, in der häufig eine Resistenz auf die Initialtherapie zu beobachten ist. Die Leukozytenzahl ist in dieser Phase bereits erhöht. Gegen Ende der akzelerierten Phase sind bei etwa 70% der CML-Patienten zusätzliche Chromosomenanomalien nachweisbar. Zuletzt schreitet die Erkrankung in die Blastenkrise fort. Die Anzahl transformierter, undifferenzierter Vorläuferzellen im Knochenmark und im peripheren Blut steigt drastisch an. Die Blastenkrise dauert häufig nur 3-6 Monate und endet trotz Behandlung in den meisten Fällen mit dem Tod des Patienten (7).

Für Patienten, die unter Therapie mit Interferon- $\alpha$  oder Imatinib keine Heilung erfahren, stellt nach wie vor die allogene Knochenmark- bzw. Stammzelltransplantation die derzeit einzige Heilungsmöglichkeit dar. Allerdings ist diese Therapie häufig von Komplikationen mit potentiell tödlichem Ausgang begleitet (8). Deshalb ist die Suche nach neuen Therapie- und Heilungsmöglichkeiten für CML-Patienten weiterhin Gegenstand intensiver Forschung. Ein möglicher Ansatz könnte eine Peptid-Vakzinierung mit tumorspezifischen oder tumorassoziierten Antigenen sein.

### 1.1.1 Zytogenetische und molekularbiologische Grundlagen der CML

Das charakteristische zytogenetische Merkmal der CML ist ein verkürztes Chromosom 22, das so genannte *Philadelphia*-Chromosom (5). Es resultiert aus einer reziproken Chromosomentranslokation  $t(9;22)(q34;q11)$  zwischen den langen Armen der Chromosomen 9 und 22 (9). Dabei wird ein Teil von Chromosom 9 an das Chromosom-Bruchende von Chromosom 22 fusioniert (siehe Abb. 1A). Auf molekularer Ebene sind zwei Gene unmittelbar betroffen: das auf Chromosom 9 lokalisierte Protoonkogen *c-ABL* (10), welches eine Tyrosinkinase kodiert, und das *BCR* (*breakpoint cluster region*)-Gen auf Chromosom 22 (11; 12), aus denen nach Translokation das *BCR-ABL*-Fusionsgen resultiert (13). Während der Bruchpunkt auf Chromosom 9 immer oberhalb von *ABL*-Exon a2 liegt (14; 15), variiert die Lage des Chromosomenbruchs auf Chromosom 22. Bei zirka 40% der CML-Patienten befindet sich der Bruchpunkt zwischen den *BCR*-Exons b2 und b3, bei zirka 55% der Fälle zwischen den Exons b3 und b4 (16). Die korrespondierenden *BCR-ABL*-mRNAs werden auch als b2a2 oder b3a2 bezeichnet. Vereinzelt sind CML-Patienten auch positiv für beide Hybride. In seltenen Fällen treten zusätzliche Bruchpunkte auf, woraus die Hybride e1a2 (17) oder e19a2 (18; 19) resultieren (Abb. 1B). Jedoch unabhängig von der Lage des Bruchpunktes bilden die Gene *BCR* und *c-ABL* nach Chromosomentranslokation immer eine transkriptionelle Einheit, die durch den *BCR*-Promotor reguliert wird (20; 21). Das Ergebnis der Translation der b2a2- oder b3a2-8,5-Kb-mRNA ist immer ein chimäres 210-kDa-*BCR-ABL*-Fusionsprotein ( $P^{210}$ *BCR-ABL*) mit dysregulierter Tyrosinkinaseaktivität (22; 23). Als Folge der Verknüpfung der *BCR*-Exons b2 bzw. b3 mit *ABL*-Exon a2 wird an der Fusionsregion eine neue Aminosäure kodiert, welche bei beiden Fusionsproteinen unterschiedlich ist: Glutaminsäure bei der Variante b2a2 und Lysin bei der Variante b3a2 (24; 16). Es ist anzunehmen, dass Peptide aus der Fusionsregion beider Proteine potentiell ideale tumorspezifische Antigene darstellen, da die Fusionsregion tumorspezifische Determinanten repräsentiert, die bei gesunden Menschen normalerweise nicht exprimiert sind.



**Abb. 1: Schema der BCR-ABL-Translokation, modifiziert nach (6).** **A)** Durch Chromosomenbrüche im Bereich der langen Arme der Chromosomen 9 (Bande q34) und 22 (Bande q11) erfolgt eine reziproke Translokation der telomeren Fragmente, woraus das BCR-ABL-Fusionsgen auf Chromosom 22 resultiert. Die Pfeilspitzen zeigen die Lage der möglichen Bruchpunkte an den Chromosomen 9 und 22 an. Während der Bruchpunkt auf Chromosom 9 meist oberhalb von ABL-Exon a2 liegt (a2 bis a11 der 11 ABL-Exons), variiert die Lage des Bruchpunktes auf Chromosom 22 meistens zwischen den BCR-Exons b2 bzw. b3 im Bereich der M-bcr Region (*major breakpoint cluster region*). Die Regionen m-bcr (*minor breakpoint cluster region*) und μ-bcr (eine dritte Bruchpunktregion unterhalb von M-bcr) spielen dagegen bei der CML nur eine untergeordnete Rolle. Je nach Lage dieser Bruchpunkte werden unterschiedlich lange Segmente des BCR-Gens an die 3' Sequenz des ABL-Gens fusioniert. **B)** Der untere Teil der Abbildung zeigt die Struktur der resultierenden mRNAs: b2a2 und b3a2 kodieren für das <sup>P210</sup>BCR-ABL-Protein, das bei den allermeisten CML-Patienten gefunden wird; e1a2 kodiert für das vorwiegend ALL-typische <sup>P190</sup>BCR-ABL-Protein und e19a2 für das <sup>P230</sup>BCR-ABL-Protein, typisch für die chronische Neutrophilen-Leukämie.

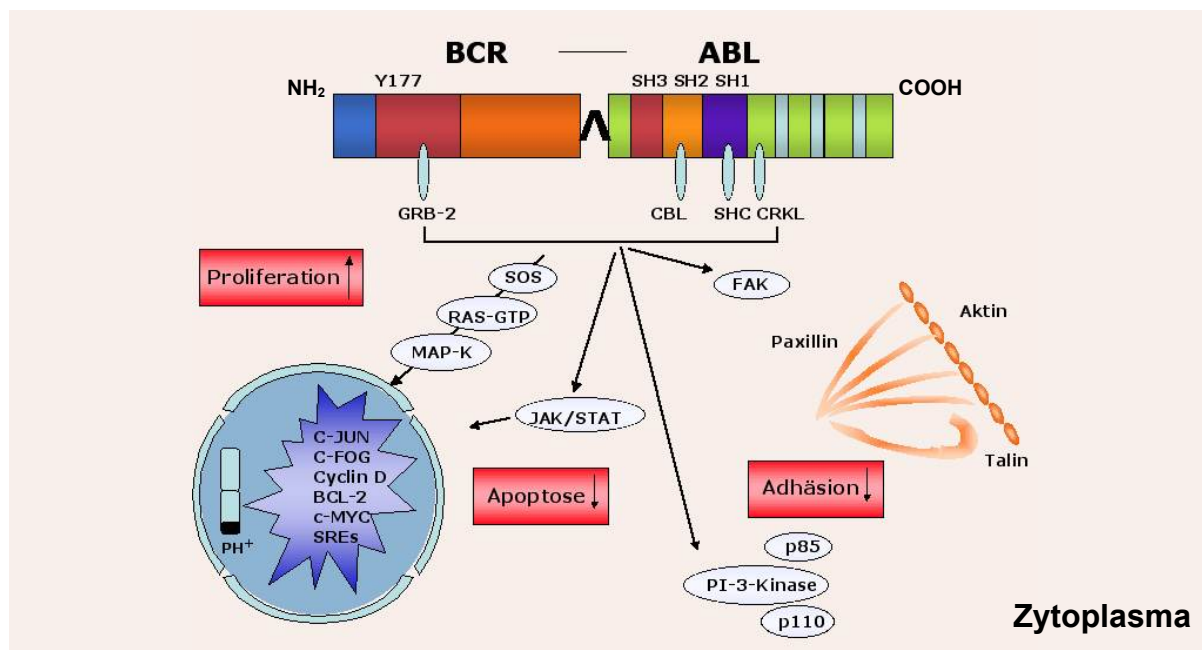
### 1.1.2 Mechanismen der malignen Transformation in BCR-ABL-positiven Zellen

Die Pathophysiologie des chimären BCR-ABL-Proteins sowie die physiologischen Funktionen der in gesunden Zellen exprimierten Gene BCR und ABL sind außerordentlich komplex und zum Teil noch nicht vollständig aufgeklärt.

Das Protoonkogen c-ABL ist das humane Homolog von v-ABL, eines Bestandteils eines Anfang der siebziger Jahre erstmalig von Abelson (25) beschriebenen murinen Leukämievirus (MuLV). Das humane c-ABL-Gen kodiert eine 145 kDa Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase mit subzellulärer Lokalisation im Zytosol und Zellkern (26; 27). Die Funktion der normalen ABL-Tyrosinkinase ist bis heute nur teilweise erforscht. Anhand der strukturellen Domänen des c-ABL-Proteins lassen sich jedoch einige biologische Funktionen erkennen. Von besonderer Bedeutung sind die SRC-Homologie-Domänen (SH1, SH2 und SH3; siehe Abb. 2). SH1 trägt die Tyrosinkinasefunktion; SH2 (Phosphotyrosin-bindende Domäne) und SH3

(Domäne zur Bindung an prolinreiche Sequenzen) verleihen dem Protein seine regulatorische Funktion und erlauben die Interaktion mit anderen Proteinen (28; 29). C-terminal befinden sich die Domänen, die die Bindung an Aktin und DNA erlauben. *In vitro* Studien legen den Schluss nahe, dass ABL eine wichtige Rolle bei der Reparatur von DNA-Schäden durch ionisierende Strahlung spielt (30-32) und an der Signaltransduktion über die zelluläre Umgebung über Integrin-Signale beteiligt ist (33). Darüber hinaus zeigten Arbeiten von Sawyers et. al. (34), dass die SH2 Domäne dem nukleären c-ABL eine Funktion als negativen Regulator des Zellzyklus verleiht.

Die c-ABL-Tyrosinkinaseaktivität wird unter physiologischen Bedingungen in engen Grenzen reguliert. An dieser Regulation scheinen sowohl trans- als auch cis-agierende Faktoren über die Interaktion der c-ABL SH3-Domäne beteiligt zu sein (35-37). Durch die BCR-ABL-Translokation kommt es in BCR-ABL-positiven Zellen zu einer Dysregulation der Tyrosinkinaseaktivität. Als Konsequenz der erhöhten Tyrosinkinaseaktivität sind, wie in Abbildung 2 dargestellt, mehrere, zum Teil redundante Signalwege an der transformierenden Aktivität von BCR-ABL beteiligt. Diese führen zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die Gene aktivieren, welche für Veränderungen im Zellphänotyp, Zellwachstum und der Zelldifferenzierung maßgeblich sind oder Zielgene aktivieren, die die Struktur des Zytoskeletts beeinflussen. Die Folgen sind eine veränderte Adhäsion der BCR-ABL-positiven Zellen an Stroma und extrazelluläre Matrix, verminderte Apoptose und Aktivierung mitogener Signale (38).



**Abb. 2: Signalübertragungswege in BCR-ABL-positiven Zellen, modifiziert nach (39).** Bestimmte Domänen des chimären BCR-ABL-Proteins sind essentiell für die maligne Transformation. Sie binden Adaptormoleküle, die die Aktivierung mitogener Kaskaden und anti-apoptotischer Signale vermitteln. Darüber hinaus findet durch BCR-ABL die Tyrosinphosphorylierung zahlreicher Proteine statt, die für die Organisation der Zellmembran und des Zytoskeletts bedeutsam sind.

### 1.1.2.1 Aktivierung mitogener Kaskaden und anti-apoptotischer Signale

Die Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Progenitorzellen wird durch Zytokine und Wachstumsfaktoren reguliert. Im Gegensatz zu normalen Zellen proliferieren CML-Progenitorzellen auch unter Bedingungen des partiellen Zytokin-Entzugs (40). Dieser biologischen Eigenschaft scheint biochemisch die Aktivierung einer Reihe unterschiedlicher Signaltransduktionswege mit mitogenem und anti-apoptotischem Potenzial durch das BCR-ABL-Protein zu Grunde zu liegen. Zu den drei Wesentlichen zählen der p21Ras-Signaltransduktionsweg (41), der PI-3-Kinase-Akt-Weg (42) und der STAT5-Weg (43-45). Diese äußerst komplexen Signalkaskaden üben verschiedene, sich teilweise überschneidende Interaktionen mit zahlreichen Substraten und assoziierten Molekülen aus.

Die Aktivierung des mitogenen Ras (*rat sarcoma viral oncogene homolog*)-Signaltransduktionsweges durch BCR-ABL erfolgt über das Tyrosin an Position Y177 innerhalb des ersten BCR-Exons, das in seiner autophosphorylierten Form das Adaptormolekül GRB2 (*growth-factor-receptor binding protein*) binden kann und mit SOS (*son of sevenless*) Komplexe bildet (41; 46). Letzteres stellt einen Nukleotid-Austauschfaktor für Ras dar. BCR-ABL-GRB2-Interaktionen aktivieren Ras, das infolgedessen die MAP-Kinase (*mitogene-activated protein kinase*) phosphoryliert und aktiviert, worüber die Aktivierung mitogener Signale in BCR-ABL transformierten Zellen erfolgt.

Ebenso ist eine Aktivierung von Ras über die Adaptormoleküle SHC (*SRC homology domain-containing*) und CRKL (*v-crk avian sarcoma virus CT10 oncogene homolog-like*), beide Substrate von BCR-ABL, bekannt. CRKL aktiviert sowohl RAS als auch den PI3 (Phosphatidyl-Inositol-3)-Kinase-Signalweg (47; 48).

Die Signaltransduktion durch die PI3-Kinase führt zur Aktivierung einer Reihe von *downstream* Effektormolekülen, worüber die Inaktivierung der anti-apoptotischen Proteine der BCL-2 Familie aufgehoben wird. Daraus resultiert eine verminderte Apoptose und eine Stimulation des Zellwachstums (48-50).

Ferner kann BCR-ABL, ähnlich wie ein Zytokinrezeptor, JAK (Janus-Kinasen)- und STAT (*signal transducers and activators of transcription*)-Proteine aktivieren. Der JAK/STAT-Signalweg bildet die unmittelbare Verbindung zwischen Wachstumsfaktor-Rezeptoren und der Gentranskription (51). Insbesondere die Aktivierung von STAT5, das neben STAT1 das vorwiegend durch BCR-ABL phosphorylierte STAT-Protein darstellt (43; 52), trägt zur Überlebensfähigkeit und dem Zellwachstum von BCR-ABL transformierten Zellen bei (53). Zusammengefaßt aktiviert BCR-ABL eine Reihe von kritischen Signaltransduktionswegen, die essentiell für die Proliferation, Hemmung der Apoptose sowie die Expression kritischer Effektormoleküle in CML Zellen sind, wodurch BCR-ABL-positiven Zellen ein Proliferationsvorteil erwächst.

### 1.1.2.2 Veränderungen des Zytoskeletts und der Adhäsion durch BCR-ABL

BCR-ABL-positive Zellen weisen starke Veränderungen in der Funktion und Struktur des Zytoskeletts auf (54). Modifikationen des Aktin-Zytoskeletts und assoziierter Proteine sind einige der zentralen Ereignisse der BCR-ABL-Leukämogenese, die auf die dysregulierte BCR-ABL-Tyrosinkinaseaktivität zurückzuführen sind.

Im Gegensatz zu normalen hämatopoetischen Vorläuferzellen zeigen BCR-ABL-positive Progenitorzellen eine verminderte Adhäsion an das Knochenmarkstroma, wodurch sie unreif ins periphere Blut ausgeschwemmt werden und in extrazellulären Lokalisationen wie Milz und Lymphknoten proliferieren können (6). Die veränderte Adhäsion BCR-ABL-positiver Zellen an das Knochenmarkstroma und die extrazelluläre Matrix wird in engem kausalen Zusammenhang mit der Tatsache gesehen, dass das BCR-ABL-Protein zu 70% gebunden an Aktin mit einigen der meist prominenten Adhäsionsproteine wie Tensin, Talin, Paxillin und Vinkulin im Zytoskelett colokalisiert und diese tyrosinphosphoryliert sowie Adaptorproteine wie CRKL modifiziert, die die Zellmotilität und die Zelladhäsion regulieren (51). Darüber hinaus scheint die Phosphorylierung von  $\beta 1$ -Integrin durch  $P^{210}$ BCR-ABL für den Adhäsionsdefekt der CML Vorläuferzellen von zentraler Bedeutung zu sein (55). Integrine verbinden das Zytoskelett mit der extrazellulären Matrix und sind als Transmembranrezeptorproteine essentiell für die Signaltransduktion zwischen Zellinnerem und der extrazellulären Matrix (56). Durch die verminderte Adhäsion sind BCR-ABL-positive Zellen den Integrin-vermittelten Adhäsionssignalen, welche die normale Hämatopoese regulieren, nicht in physiologischem Maß unterworfen, wodurch BCR-ABL-positiven Zellen ein Proliferationsvorteil erwächst (55).

### 1.1.3 Therapieansätze bei CML

Heute stehen zahlreiche Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung. Bis vor kurzem stellte eine Chemotherapie, meist mit Hydroxyurea, die Initialtherapie dar. Hydroxyurea hemmt aufgrund seiner anti-proliferativen Wirkung das Wachstum der malignen Zellen, wodurch eine Verbesserung der Überlebensrate erzielt werden konnte. Allerdings gelingt es in der Regel nicht, durch eine solche Chemotherapie den krankheitsverursachenden BCR-ABL-positiven Klon direkt zu beseitigen. Effektivere Therapieansätze bieten eine medikamentöse Therapie mit Interferon- $\alpha$ , die Verabreichung von Tyrosinkinase-Inhibitoren oder die Durchführung einer allogenen Stammzell- bzw. Knochenmarktransplantation (38; 57).

### 1.1.3.1 Interferon- $\alpha$ -Therapie

Seit 1986 hat Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) erhebliche Bedeutung für die CML-Therapie gewonnen (58). IFN- $\alpha$  ist ein physiologisches Glykoprotein mit antiviralen und antiproliferativen Eigenschaften, das heute rekombinant hergestellt werden kann. Der genaue Wirkmechanismus von IFN- $\alpha$  ist nicht bekannt. Es normalisiert die Adhäsion der CML-Zellen an das Stroma und ist unter anderem an der interzellulären Kommunikation, Signaltransduktion und an immunologischen Kontrollmechanismen beteiligt (59; 60). IFN- $\alpha$  zählte bis vor zwei Jahren zur Standardtherapie der CML, da es bei den allermeisten CML-Patienten eine stabile hämatologische Remission\* und darüber hinaus in 10-38% der Fälle auch eine komplette zytogenetische Remission\*\* induzieren konnte (61). Der Erfolg einer IFN- $\alpha$ -Therapie ist jedoch stark vom Krankheitsstadium abhängig und verliert in fortgeschrittenen Stadien der CML an Gewicht. Generell führt die Therapie mit IFN- $\alpha$  zu einer deutlichen Verbesserung der Lebensqualität und Verlängerung der Lebenserwartung. Eine Heilung der Erkrankung ist jedoch mit IFN- $\alpha$  kaum möglich, wenngleich vereinzelte Patienten jahrelang anhaltende komplette Remissionen aufweisen.

\* Der hämatologische Remissionszustand wird bei Leukämiepatienten anhand der mikroskopischen Untersuchung von Blutbild und Knochenmark beurteilt und bezieht sich auf den Rückgang oder das Verschwinden klinischer Symptome und der Normalisierung des Blutbildes.

\*\* Die komplette zytogenetische Remission ist gegeben, wenn in der Chromosomenanalyse aus dem Knochenmark eines CML-Patienten kein *Philadelphia*-Chromosom mehr nachgewiesen werden kann.

### 1.1.3.2 STI 571-Therapie

Basierend auf der Erkenntnis, dass das BCR-ABL-Protein eine zentrale Rolle in der Pathogenese der CML spielt, wurde Ende der 90er Jahre mit der Entwicklung von STI 571 (Imatinib) ein Wirkstoff konzipiert, der spezifisch die Tyrosinkinaseaktivität hemmt (62).

Imatinib ist ein 2-Phenylaminopyrimidinderivat, das an die ATP-Bindungsstelle der Tyrosinkinase-Domäne des BCR-ABL-Proteins spezifisch und irreversibel bindet, wodurch diese in einem Kinase-inaktiven Zustand stabilisiert wird (63). Infolgedessen wird die Phosphorylierung von Substraten durch BCR-ABL gehemmt und der Prozess der malignen Transformation unterbrochen. Dies führt dazu, dass das durch BCR-ABL unterhaltene komplexe Netzwerk von Kaskaden auf einer sehr frühen Stufe unterbunden wird (64).

Die Behandlung mit Imatinib in chronischer Phase führt bei >95% der Patienten zu einer kompletten hämatologischen sowie bei etwa 70% zu einer kompletten zytogenetischen Remission, die bei einem Teil der Patienten sogar in eine molekulare Remission mündete\*\*\*. Verbesserte Ergebnisse können durch eine höhere Dosierung des Imatinibs erreicht werden.

Da diese Ergebnisse erst in jüngster Zeit beschrieben wurden, ist eine definitive Aussage über die Qualität und Dauer der molekularen Remission unter Imatinib jedoch noch nicht möglich: eine rasche Abnahme der BCR-ABL-Tumorlast anhand einer quantitativen PCR-Messung (>3log Reduktion) scheint mit einer langfristig anhaltenden Remission einherzugehen. Auch in fortgeschrittenen Phasen der CML können noch klinische Erfolge durch die Therapie mit Imatinib erzielt werden. Allerdings zeigen nur noch 69% (akzelerierte Phase) bzw. 29% (Blastenkrise) der CML-Patienten eine hämatologische Remission und nur 7% der Patienten in Blastenkrise auch eine komplette zytogenetische Remission (65). Darüber hinaus ist die Dauer dieses Ansprechens in der Regel nur kurz.

Somit stellt die Behandlung mit Imatinib vor allem in der frühen Phase der CML eine attraktive und wirksame Behandlungsmöglichkeit dar. Der aktuelle Erkenntnisstand erlaubt jedoch nicht die Schlussfolgerung, dass durch Imatinib eine medikamentöse Heilung der CML möglich sein wird. Auch die bei einigen Patienten beobachtete Entwicklung einer Imatinib-Resistenz erfordert alternative CML-Therapieformen (66; 67).

\*\*\* Der molekulargenetische Remissionszustand ist erreicht, wenn auch über den Nachweis mittels PCR keine BCR-ABL Transkripte mehr nachgewiesen werden können.

### 1.1.3.3 Knochenmark- und Stammzelltransplantation

Für viele Patienten stellt nach wie vor eine allogene Knochenmark- bzw. Stammzelltransplantation die derzeit einzige Heilungsmöglichkeit dar. Hierbei wird das Knochenmark des Patienten durch eine intensive Chemotherapie zerstört und durch das gesunde Mark/ gesunde Stammzellen eines geeigneten Spenders ersetzt. Dies führt bei einigen Patienten jedoch zur so genannte *Graft-versus-Host-Reaktion* (GvHD), bei der die vom Spender übertragenen Lymphozyten eine Immunreaktion auslösen können, wodurch gesunde Zellen des Empfängers (am häufigsten in der Haut, an den Schleimhäuten des Gastrointestinaltraktes und in der Leber) zerstört werden (68; 69). Auch wenn durch einen positiven Nebeneffekt, dem so genannten *Graft-versus-Leukämie-Effekt* (GvL), ebenfalls eine Vernichtung der Tumorzellen miteinhergeht (70; 71), stellt die GvHD eine ernsthafte Komplikation der Knochenmarktransplantation mit möglichem tödlichen Ausgang dar. Das Risiko einer GvHD-Erkrankung erhöht sich, wenn nicht das Knochenmark/ die Stammzellen eines engen Verwandten verwendet werden, sondern die eines HLA-kompatiblen Spenders. Aufgrund der hohen Risiken, die mit zunehmendem Alter dramatisch steigen und der Verfügbarkeit geeigneter Spender, ist deshalb eine allogene Knochenmarktransplantation nur etwa bei der Hälfte der CML-Patienten durchführbar (72). Die Suche nach alternativen Therapiemöglichkeiten für CML-Patienten ist daher weiterhin Gegenstand intensiver



Forschung. Eine Möglichkeit könnte die peptidbasierende spezifische Immuntherapie mit Leukämie-assoziierten Peptiden darstellen. Mit dieser Möglichkeit beschäftigt sich die Tumorimmunologie. Die CML scheint von allen Erkrankungen am besten geeignet für einen immuntherapeutischen Ansatz: die Infusion von Spenderlymphozyten bei einem Rezidiv der CML nach Knochenmark-Transplantation kann über den oben erwähnten *Graft-versus-Leukämie-Effekt* zu einer kompletten Rückbildung der Leukämie führen. Da teilweise größere Tumormassen durch diese Adoptive Immuntherapie eliminiert werden, ist die CML zu einem Paradebeispiel für das große Potenzial des Immunsystems in der Tumorthherapie geworden.

## 1.2 Antigenprozessierung und -präsentation über MHC-Klasse-I-Moleküle

Neben den vielfältigen Schutzmechanismen des Immunsystems stellt die so genannte zelluläre Immunität einen der Schlüsselmechanismen der Immunüberwachung dar. Sie dient der Eliminierung von virusinfizierten Zellen und unter gewissen Voraussetzungen auch von Tumorzellen. Zu den wichtigsten Effektorzellen des zellulären Immunsystems zählen die zytotoxischen T-Lymphozyten (CD8-positive T-Zellen). 1974 konnten Zinkernagel und Doherty (73) zeigen, dass im Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) kodierte Klasse-I-Moleküle ein wesentlicher Bestandteil dieses Prozesses sind. Ihre Aufgabe ist es, die aus zytosolischen Proteinen prozessierten Peptide zu binden und für die Erkennung durch T-Lymphozyten zu präsentieren (74; 75). CD8-positive T-Zellen können nur dann Antigene über ihren T-Zell-Rezeptor erkennen, wenn diese in Assoziation mit MHC-Molekülen präsentiert werden (MHC-Restriktion).

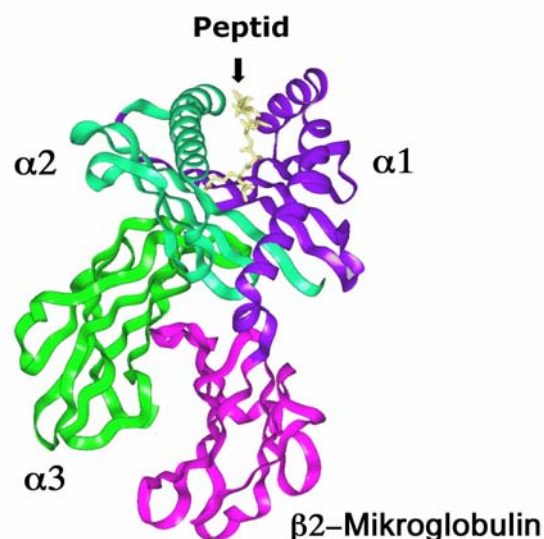
### 1.2.1 MHC-Klasse-I-Moleküle

MHC-Klasse-I-Moleküle sind membranständige Glykoproteine, bestehend aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Polypeptidkette, die auf nahezu allen zellkernhaltigen Zellen von Vertebraten exprimiert werden. Die  $\alpha$ -Ketten von MHC-Klasse-I-Molekülen werden beim Menschen als *Human Leucocyte Antigens* (HLA) bezeichnet, welche von den Genen des *Major Histocompatibility Complex* (MHC) kodiert werden. Dieser ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 lokalisiert (76). Dort befinden sich je drei Loci für MHC-Klasse-I- $\alpha$ -Ketten: HLA-A, HLA-B und HLA-C. Diese Gene zeichnen sich durch einen außergewöhnlich hohen Polymorphismus aus. Mittlerweile sind 303 HLA-A-Allele, 559 HLA-B-Allele und 150 HLA-C-Allele bekannt (IMGT/HLA *Database release 2.4* Stand 16.01.2004; <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html>). Bei jedem einzelnen Individuum ist diese Zahl jedoch niedriger. Jeder

Mensch erbt einen Satz codominant exprimierter HLA Gene. Dieser Haplotyp besteht aus drei HLA-Klasse-I-kodierenden Genen für die HLA-A, -B und -C Varianten der  $\alpha$ -Kette. Im Gegensatz dazu ist das für die  $\beta$ -Kette kodierende Gen auf Chromosom 15 nicht polymorph (77).

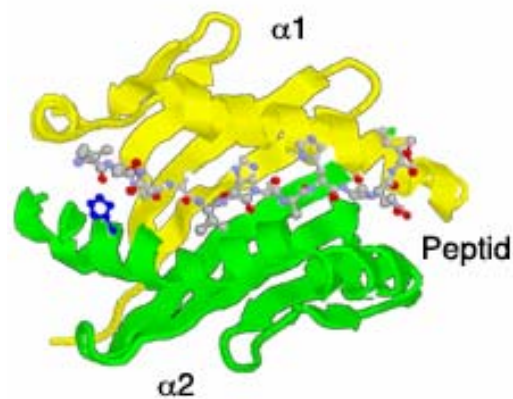
### 1.2.1.1 Aufbau von MHC-Klasse-I-Molekülen

MHC-Klasse-I-Moleküle bestehen aus zwei Polypeptidketten, einer 45 kDa  $\alpha$ -Kette, die auch als schwere Kette bezeichnet wird, und einer so genannten leichten Kette von 12 kDa, dem  $\beta$ 2-Mikroglobulin. Die  $\alpha$ -Kette gliedert sich in 5 Domänen: eine kurze zytosolische Domäne, eine Transmembranregion und drei extrazelluläre Immunglobulin-ähnliche Domänen ( $\alpha$ 1-3). Das extrazelluläre  $\beta$ 2-Mikroglobulin ist nichtkovalent an die  $\alpha$ 3-Domäne der schweren Kette assoziiert (74) (Abb. 3).



**Abb. 3: Banddiagramm eines humanen MHC-Klasse-I-Moleküls im Komplex mit einem Peptidliganden,** modifiziert nach (78). Dargestellt sind die drei extrazellulären Immunglobulin-ähnlichen Domänen  $\alpha$ 1-3 in Assoziation mit  $\beta$ 2-Mikroglobulin und einem gebundenen Peptidliganden.

Die zwei membranfernten Domänen  $\alpha$ 1 und  $\alpha$ 2 bilden die so genannte Peptidbindungsgrube, deren Boden von einer  $\beta$ -Faltblattstruktur gebildet wird, welche seitlich von zwei  $\alpha$ -helikalen Bereichen begrenzt ist (79). In dieser Peptidbindungsgrube werden Peptide von 8 bis 11 AA über nichtkovalente Kräfte gebunden (Abb. 4).



**Abb. 4: Aufsicht auf die Peptidbindungsgrube eines MHC-Klasse-I-Moleküls mit einem gebundenen Peptidliganden** (Banddiagramm modifiziert nach: [http://people.musc.edu/~beesonc/pages/research\\_\\_peptide-mhc.htm](http://people.musc.edu/~beesonc/pages/research__peptide-mhc.htm)).

#### 1.2.1.2 Bindungsspezifität zwischen MHC- und Peptidligand

Die Peptidbindungsgrube ist der Bereich, in dem sich die verschiedenen MHC-Klasse-I-Allelprodukte am stärksten unterscheiden (80). Jedes Allelprodukt weist in diesem Bereich eine jeweils charakteristische Aminosäuresequenz auf, wodurch Peptide, die an ein bestimmtes Allelprodukt binden, strukturelle Gemeinsamkeiten besitzen. Daraus ergibt sich für jedes Allel ein so genanntes Peptidmotiv das die Länge und Besetzung der bindungsentscheidenden Positionen (Ankeraminosäuren) eines idealen Liganden beschreibt (81). Die Ankeraminosäuren befinden sich in der Regel N-terminal an Position zwei und an Position 9 des C-Terminus des entsprechenden Peptids. Über chemische, nicht kovalente Wechselwirkungen werden die Seitenketten der Ankeraminosäuren in den allelspezifischen Taschen des MHCs gebunden. Abhängig vom jeweiligen MHC-Klasse-I-Molekül werden sowohl in ihrer Länge als auch in ihrer Sequenz unterschiedliche Peptide präferentiell gebunden. Dabei kann die Bindungsaffinität zwischen MHC und Peptid stark variieren. Diese ist entscheidend für die Dissoziationsrate des Peptidliganden von dem MHC-Molekül und somit für die Dauer der Peptidpräsentation an der Zelloberfläche (82).

### 1.2.2 Antigenprozessierung

Die Erzeugung von Peptidliganden für den MHC-Klasse-I-Präsentationsweg (Abb. 5) erfolgt durch intrazelluläre Proteolyse von Proteinen. Die Proteine sind in erster Linie zytosolischen Ursprungs. MHC-Klasse-I-Moleküle von gesunden Zellen reflektieren somit auf der Zelloberfläche den Proteinbestand der regulären zytosolischen Selbstproteine. Auf malignen Zellen können daher auch Tumorantigene präsentiert werden, welche ebenfalls intrazellulär synthetisiert und prozessiert werden.

Die wichtigste zytosolische Protease, welche Peptide für die MHC-Klasse-I-Präsentation erzeugt, ist das Proteasom (83). Es ist ein großer Proteasekomplex, der sich frei im Zytosol und Zellkern einer jeden Säugerzelle befindet. Im Zentrum des selektiven Abbaus der meisten zellulären Proteine steht das 20S Proteasom, das *in vivo* zumindest teilweise in Komplex mit dem 19S-Aktivator als so genanntes 26S-Proteasom vorliegt. Das 20S Proteasom ist ein multikatalytischer Proteasekomplex, der sich aus vier Ringen von je sieben Untereinheiten zusammensetzt. Den Zugang zum Lumen des 20S Proteasoms kontrollieren die beiden äußeren Ringe, welche aus je sieben  $\alpha$ -Untereinheiten zusammengesetzt sind. Sie sind auch an der Steuerung der Proteolyse beteiligt. Die zentrale Kammer des Proteasoms bilden die beiden inneren Ringe. Sie werden aus Untereinheiten vom  $\beta$ -Typ aufgebaut. Dabei stellen die drei konstitutiv exprimierten  $\beta$ -Untereinheiten  $\beta$ 1/ $\beta$ 2/ $\beta$ 5 die katalytisch aktiven Zentren dar, an denen die Spaltung der Peptidbindungen erfolgt (84). Diese machen das so genannte konstitutive Proteasom aus (c20S). Das konstitutive Proteasom besitzt eine chymotryptische (Spaltung nach langen, hydrophoben Aminosäuren), tryptische (Spaltung nach basischen Aminosäuren) und peptidyl-glutamyl-peptidyl-spezifische (Spaltung nach sauren Aminosäuren) Aktivität (85). Durch Interferon- $\gamma$ , z.B. im Zusammenhang mit einer viralen Infektion, kann die Expression der für das Immunoproteasom charakteristischen  $\beta$ -Untereinheiten LMP2, LMP7 und MECL1 induziert werden (86; 87). Dies führt zu einer posttranskriptionellen Repression der konstitutiv exprimierten  $\beta$ -Untereinheiten (88; 89). Das Immunoproteasom spaltet Proteine vermehrt nach hydrophoben und basischen Aminosäuren (90). Da die Mehrzahl der bekannten Peptidmotive für humane MHC-Klasse-I-Moleküle C-terminal hydrophobe oder basische Aminosäuren fordern, entstehen so vermehrt potentielle MHC-Klasse-I-Liganden.

Welche Proteine für die proteasomale Degradation designiert sind, wird über das Ubiquitinsystem vermittelt. Ubiquitin ist ein kleines Protein, das von einer Enzymkaskade an die jeweiligen Substratproteine geheftet wird (91). Ubiquitylierte Proteine werden von dem 19S-Aktivator des Proteasoms erkannt, wodurch auch die Degradation des Proteins durch seine Entfaltung eingeleitet wird. Ubiquitin selbst wird recycelt.

### 1.2.3 MHC-Klasse-I-Peptidbeladung und -präsentation

Die entstandenen Peptidfragmente werden nach proteasomaler Degradation im Zytosol freigesetzt und gelangen über das heterodimere Transportprotein TAP (*Transporter associated with Antigen Processing*) in das endoplasmatische Retikulum (ER). Dort werden unbeladene MHC-Klasse-I-Moleküle in einem partiell gefalteten Zustand zurückgehalten. Neusynthetisierte MHC-Klasse-I- $\alpha$ -Ketten binden zunächst an das molekulare Chaperon Calnexin (auch p88 oder IP90) (92), ein nicht glykosiliertes, membrangebundenes Protein, das die Faltung der MHC-Klasse-I schweren Kette und die Ausbildung der Disulfidbrücken zwischen MHC-Klasse-I schwerer Kette und  $\beta$ 2-Mikroglobulin ( $\beta$ 2M) ermöglicht (93). Nach Assoziation mit  $\beta$ 2-Mikroglobulin löst sich das  $\alpha$ : $\beta$ 2-Mikroglobulin Heterodimer von Calnexin ab und bindet an die TAP-1-Untereinheit des TAP-Transporters, indem es mit einem Molekül des TAP-assoziierten Proteins, Tapasin, und dem Chaperon Calretikulिन in Wechselwirkung tritt (94; 95). Die Bindung eines Peptids stabilisiert das  $\alpha$ : $\beta$ 2-Mikroglobulin Heterodimer und löst dieses vom TAP-Komplex ab. Der trimere Komplex aus Peptid, schwerer Kette und  $\beta$ 2-Mikroglobulin gelangt anschließend auf dem Exocytoseweg über den Golgi-Komplex und exozytotische Vesikel an die Zelloberfläche, wo der Komplex das gebundene Peptidantigen zur Präsentation für T-Zellen bereithält (Abb. 5).

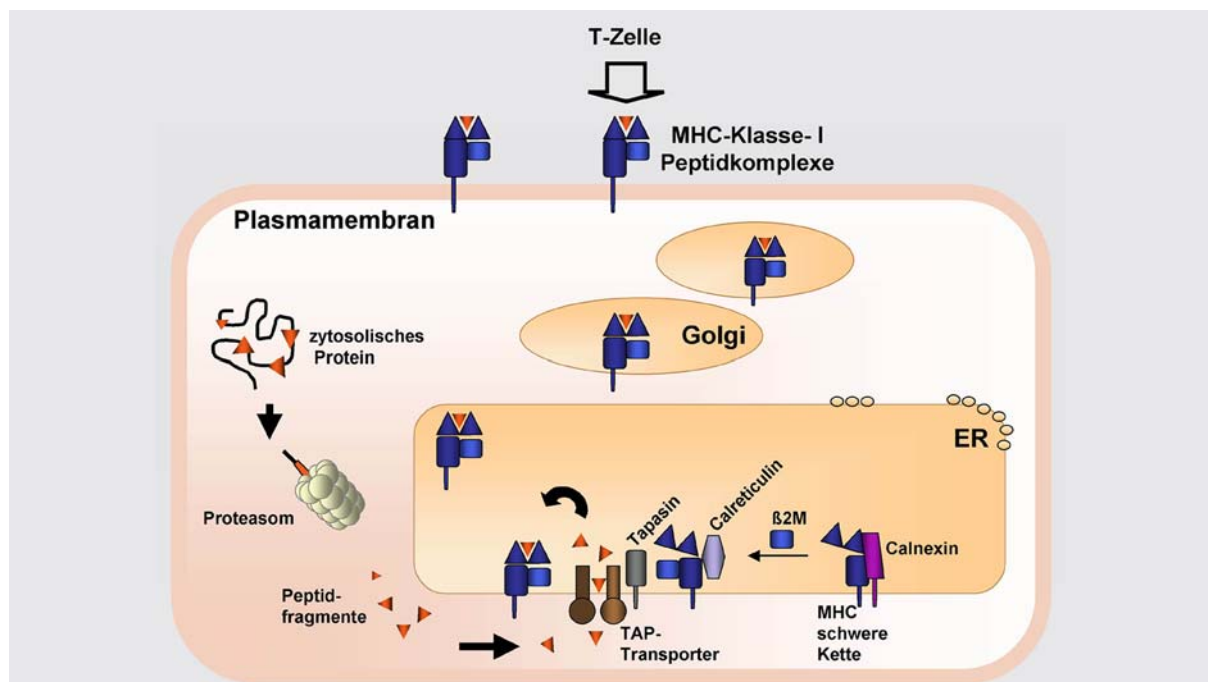


Abb. 5: Antigenprozessierung und -präsentation durch MHC-Klasse-I-Moleküle. Details siehe im Text.

### 1.3 MHC-Klasse-I-Moleküle und T-Zellantwort

Die Erkennung MHC-Klasse-I-präsentierter Peptidliganden erfolgt durch CD8-positive zytotoxische T-Lymphozyten (CTL). Diese entwickeln sich aus unreifen Thymozyten, die während einer Reifungsphase im Thymus die Prozesse der positiven und negativen Selektion durchlaufen. Diese Prozesse stellen sicher, dass nur solche T-Zellen selektiert werden, die Peptide im Kontext der selbst-MHC-Moleküle erkennen (positive Selektion) und T-Zellen der Apoptose unterworfen werden, die Peptide erkennen, welche auch auf gesunden Körperzellen präsentiert werden (negative Selektion) (96). Bis zur Erkennung eines Peptid-MHC-Komplexes zirkulieren naive T-Zellen anschließend im Körper und passieren dabei die lymphatischen Gewebe wie z.B. die Lymphknoten. Dort herrscht eine hohe Dichte an spezialisierten Antigen-präsentierenden Zellen (APC), die neben dem Peptid-MHC-Komplex auch die für die Initiation einer effektiven Immunantwort erforderlichen costimulatorischen Moleküle B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) mit CD28 Rezeptormolekülen exprimieren (97). Die Erkennung eines körperfremden MHC-Klasse-I-präsentierten Peptidantigens durch den T-Zell-Rezeptor (TCR) führt nur dann zur Aktivierung der T-Zelle, wenn dieselbe Zelle dem TCR das spezifische Antigen und gleichzeitig die costimulatorischen Moleküle präsentiert. Wohingegen eine Antigenbindung an den TCR ohne Costimulation (beispielsweise in der Peripherie) naive T-Zellen inaktiviert und zur T-Zell-Toleranz führt (Anergie) (98). Die aktivierte T-Zelle produziert das Zytokin IL-2, das dann ihre Proliferation und Differenzierung zur zytotoxischen T-Zelle steuert. Danach verläßt sie den Lymphknoten durch die efferenten Lymphgefäße und ist in der Lage, durch sekretorische und Rezeptor-vermittelte zytotoxische Mechanismen krankhaft veränderte Zielzellen, die ein für den TCR der zytotoxischen T-Zelle spezifischen Peptid:MHC-Komplex präsentieren, unabhängig von einer Costimulation zu zerstören.

### 1.4 Identifizierung und Bedeutung von Tumorantigenen

Basierend auf der im Tiermodell beobachteten spezifischen Abstoßung transplantierten Tumorgewebes (99; 100) und dem von Burnet (101) 1970 aufgestellten Konzept der Immunüberwachung von Tumoren reifte die Vorstellung, dass sich Tumorzellen durch die Expression neuer, tumorspezifischer Antigene von gesunden Zellen unterscheiden und vom Immunsystem als *fremd* erkannt werden. Dies ermutigte Wissenschaftler zu der Idee, die Induktion einer Immunantwort zur gezielten Zerstörung der malignen Zellen als Therapieansatz bei Krebserkrankungen auszunutzen.

Zwar ist die Existenz von Immunantworten gegen Tumorantigene und die Rolle von T-Zellen bei der Vermittlung solcher Reaktionen in Einzelfällen bekannt (102), doch scheinen die meisten Tumore nicht unter immunologischer Kontrolle zu stehen. In der Tat kommt es bei Patienten mit schweren Immundefekten nicht zu einer wesentlich erhöhten Inzidenz der häufigsten Tumorarten (Brust-, Darm- oder Lungenkrebs), sondern nur zu einer hohen Inzidenz von Virus-assoziierten Tumoren, entsprechend der Unfähigkeit dieser Patienten, virale Infektionen zu bekämpfen. Vermutlich fehlen manchen Tumoren spezifische Peptidantigene, die zum Auslösen einer T-Zell-Antwort notwendig sind. Selbst wenn initial eine Immunreaktion ausgelöst wird, kann der Verlust der MHC-Klasse-I-Moleküle oder der immunogenen Antigene durch Mutation und die Produktion immunsuppressiver Zytokine (wie TGF- $\beta$ ) durch den Tumor zu einer Verminderung der Immunabwehr bzw. zur Toleranz führen (103). Deshalb besteht das Ziel einer spezifischen Immuntherapie darin, die Immuntoleranz zu durchbrechen und eine dauerhafte T-Zell-Antwort gegen Tumorantigene zu induzieren.

Einer der diversen immuntherapeutischen Ansätze, die zur Zeit in der Erprobungsphase sind, ist die antigenspezifische Vakzinierung mit definierten, tumorspezifischen oder tumorassoziierten Antigenen. Durch eine Immunisierung mit individuell auf den Tumor und gegebenenfalls sogar auf den Patienten angepaßten Peptidgemischen hofft man, den Mechanismus der Immuntoleranz zu durchbrechen oder zumindest verringern zu können (104).

Den ersten Schritt für diesen immuntherapeutischen Ansatz stellt die Identifizierung von tumorassoziierten, im Idealfall tumorspezifischen, Antigenen dar. Als tumorassoziierte Antigene werden solche gemeint, die zwar in den Tumorzellen überexprimiert sind, aber auch in normalen Zellen möglicherweise während der foetalen Entwicklung oder in bestimmten Organen exprimiert werden. Aufgrund des Risikos einer Autoimmunreaktion stellen daher für einen immuntherapeutischen Ansatz tumorspezifische Antigene die bevorzugten Kandidaten dar.

Die Entstehung von Tumorantigenen kann vielfältiger Natur sein. Hierzu können Mutationen und Chromosomentranslokationen, irreguläre Transkriptions-, *Splicing*- und Translationsereignisse, posttranslationale Modifikationen oder die Expression viraler Onkogene beitragen. Darüber hinaus kann eine genetische Modifikation zur Überexpression von Proteinen führen, die dadurch für eine tumorspezifische Immunantwort relevant werden (105).

Die Mehrzahl der bislang bekannten Tumorantigene wurde über T-Zell-basierende Methoden identifiziert. Insbesondere die Entdeckung, dass Lymphozyten solide Tumore wie Melanome und Nierenzellkarzinome infiltrieren und diese relativ einfach in Einzellellsuspensionen zum Wachstum gebracht werden können, führte zu Beginn der neunziger Jahre zu einem

Durchbruch in der Detektion von MHC-Klasse-I-restringierten Tumorantigenen. Die Identifizierung der Liganden erfolgte dabei durch Lyse mit genomischer DNA- oder cDNA-Banken transfizierter Zellen durch *in vitro* expandierte Klone tumorinfiltrierender Lymphozyten (TIL). Da tumorspezifische CD8-positive T-Zellen und Tumor-Zelllinien relativ einfach von Patienten mit Melanomen zu etablieren sind, waren daher die meisten identifizierten MHC-Klasse-I-Tumorantigene Melanomantigene wie MAGE1, gp100 oder MART1 (106).

Obwohl die Immunogenität dieser Antigene durch eine ganze Reihe verschiedener therapeutischer Ansätze in Krebspatienten belegt werden konnte, wurden über TIL identifizierte MHC-Klasse-I-Liganden insgesamt nur bescheidene klinische Erfolge erzielt. Die geringe immuntherapeutische Relevanz dieser Antigene lag in erster Linie darin begründet, dass sie vermutlich keine echten Abstoßungsantigene darstellten und in bezug auf den onkogenen Prozess eine zu untergeordnete Rolle spielten oder es sich um Mutationsantigene - also patientenspezifische Epitope – handelte, die somit nur bei wenigen Tumoren exprimiert werden und keine breite klinische Anwendung erlauben.

Mit den in den letzten Jahren neu beschriebenen Technologien wie subtraktive Hybridisierung, *Microarray*-Analysen, *Screening* von Genbanken mit Antikörpern oder vergleichenden Proteomanalysen wurden umfangreiche Datensätze gewonnen, die den Vergleich des Expressionsprofils zwischen Tumorgewebe und Normalgewebe erlaubten. Somit konnten neue Gene beschrieben werden, die eine Überexpression in Tumoren aufwiesen. Für solche differentiell exprimierten Gene ist es über mittlerweile im *world wide web* zur Verfügung stehende Computeralgorithmen möglich, auch Epitope vorherzusagen, die an definierte MHC-Klasse-I-Moleküle binden (107).

Daher wurde in den vergangenen Jahren ein T-Zell-unabhängiges Verfahren - die so genannte *Reverse Immunologie* - zu einer bedeutenden Strategie zur Identifizierung von tumorspezifischen und tumorassoziierten Antigenen. Dabei werden Peptide nach ihrer natürlichen Prozessierung und Präsentation direkt von Tumorzellen eluiert und über biochemische Methoden untersucht. Dieser biochemische Ansatz basiert auf einer Auftrennung der von Tumorzellen eluierten Peptide entsprechend ihrer Hydrophobizität über eine reverse-Phase-Säule (*reversed phase* HPLC-Auftrennung) und anschließender massenspektrometrischer Analyse (LC/MS) (108). Die gezielte Suche nach vorhergesagten Tumorantigenen, wie beispielsweise von Peptiden aus der BCR-ABL-Fusionsregion, wird dabei durch das so genannte *Predict-Calibrate-Detect* Verfahren unterstützt. Durch Kalibrierung des Analysesystems mit synthetischen Peptiden werden bereits im Vorfeld Informationen über die Retentionszeit, dem des gesuchten Liganden charakteristischen Fragmentspektrums und dessen bevorzugten Ladungszustands ermittelt. Dies erlaubt eine Fokussierung auf eine überschaubare Anzahl von Peptiden bei der späteren Analyse von sehr



komplexen Peptidgemischen, die von Tumorzellen eluiert werden (109; 110). Neben der Fokussierung auf bereits theoretisch vorhergesagte, potentiell immunogene Liganden bietet der Ansatz der *Reversen Immunologie* darüber hinaus die Chance, neue, bislang unbeschriebene krankheitsassoziierte Antigene zu identifizieren. Mit diesem Ansatz erhofft man sich, eine neue Generation von Tumorantigenen zu identifizieren, die es sogar ermöglichen, eine individuell an den Patienten angepaßte Peptidvaccine aus mehreren relevanten, Krebs assoziierten Peptiden zusammenzustellen, um die bislang bekannten Hürden für eine erfolgreiche klinische Anwendung zu überwinden (104).

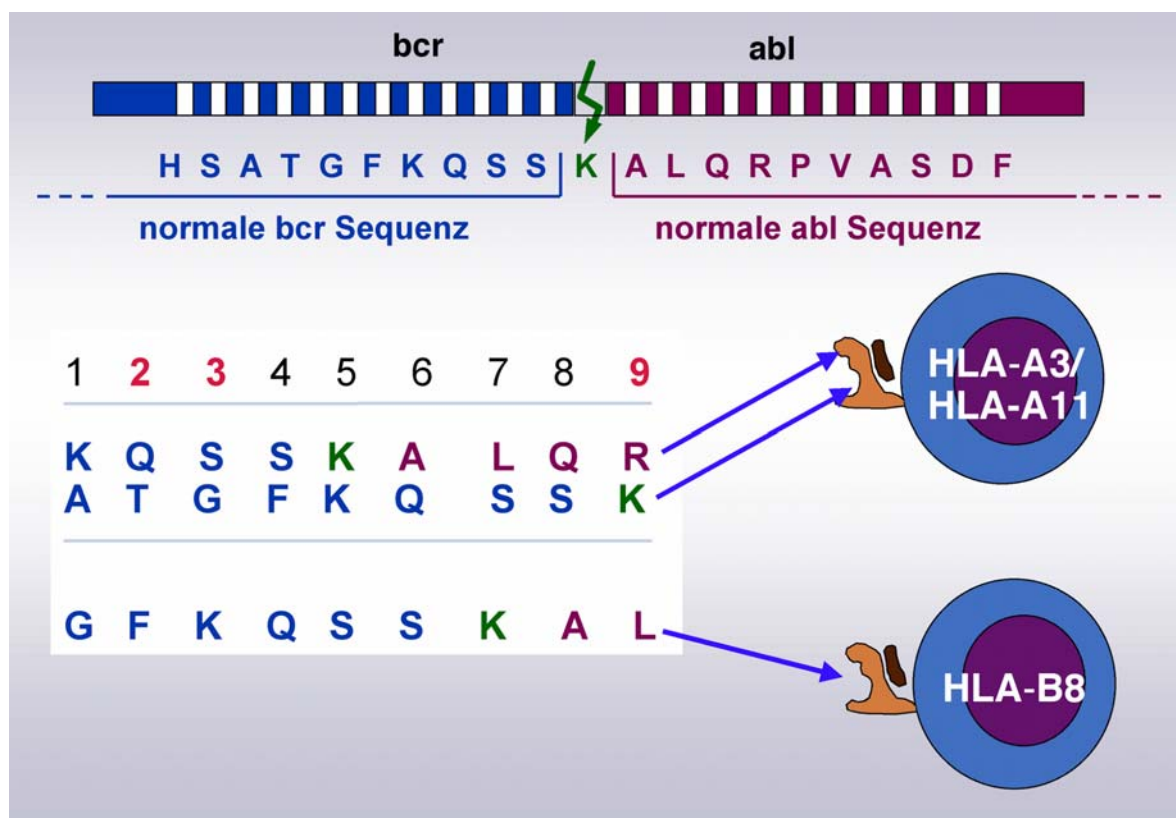
### **1.5 Therapeutisches Potenzial MHC-Klasse-I-präsentierter Peptide bei CML**

Das charakteristische Merkmal der Zellen von Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie ist die Präsenz der BCR-ABL-Translokation. Durch diese Translokation entsteht ein BCR-ABL-Fusionsgen, das in eine 8,5 Kb Fusions-mRNA transkribiert und - je nach Lage des Bruchpunktes - in eines von zwei möglichen chimären <sup>P210</sup>BCR-ABL-Proteinen translatiert wird. Es ist anzunehmen, dass Peptide aus der Fusionsregion beider chimärer <sup>P210</sup>BCR-ABL-Proteine, b2a2 oder b3a2, potentiell ideale tumorspezifische Antigene darstellen, da die Fusionsregion tumorspezifische Determinanten repräsentiert, die bei gesunden Menschen normalerweise nicht auf den Proteinen BCR oder ABL exprimiert sind (111; 16).

Das BCR-ABL-Protein ist im Zytoplasma lokalisiert und sollte daher über den MHC-Klasse-I-Weg prozessiert und präsentiert werden. Mit Hilfe prädiktiver Computerprogramme und *in vitro* Bindungsstudien konnte durch Bocchia et al. (112) bereits gezeigt werden, dass insgesamt acht von 8, 9 oder 10 AA langen Peptiden aus der Fusionsregion der b2a2- oder b3a2-BCR-ABL-Proteine in der Lage sind, an MHC-Klasse-I-Moleküle zu binden. Sechs davon stammten aus dem b3a2 Fusionsprotein, wobei insbesondere die Nonamere GFKQSSKAL, ATGFKQSSK und KQSSKALQR eine mittlere bis hohe Bindungsaffinität für die relativ häufigen HLA-Allele HLA-A3, HLA-A11 und HLA-B8 aufwiesen (siehe Abb. 6). Darüber hinaus wurde in einigen Arbeiten gezeigt, dass diese drei Fusionsregionspeptide spezifische CTL-Antworten induzieren können (113-115), was auch als indirekter Hinweis auf eine endogene Prozessierung und Präsentation dieser BCR-ABL-Fusionsregionspeptide gewertet wurde. Ferner wurde ein HLA-A2-restringiertes Peptid, gegen das ebenfalls CTL-Antworten gefunden werden konnten, von Yotnda et al. beschrieben (116).

Die Hypothese, dass eine gegen BCR-ABL gerichtete Immunität klinisch relevant sein könnte, wird durch die Ergebnisse einer epidemiologischen Studie unterstützt. Diese Studie

belegte, dass HLA-A3- und insbesondere HLA-B8-positive Individuen ein verringertes relatives Risiko haben, an einer CML zu erkranken (117). Weiterhin wurde gezeigt, dass dendritische Zellen von CML-Patienten positiv für das Fusionsprotein BCR-ABL waren (118). Somit stellt die CML eine einzigartige Situation in der Tumorimmunologie dar: die Tumorzelle kann bis zur Antigen-präsentierenden Zelle (APC) ausreifen. Durch die Besonderheit, dass bei der CML einige Tumorzellen gleichzeitig spezialisierte Antigen-präsentierende Zellen sind und daher tumorspezifische Peptide in immunogener Art präsentieren können, könnte eine spontane Immunität gegen BCR-ABL begünstigt werden. BCR-ABL exprimierende, dendritische Zellen sind daher benutzt worden, um *in vitro* eine Leukämie-spezifische Immunität zu induzieren (119). Vakzinierungsprotokolle mit dendritischen Zellen sind bereits in der klinischen Erprobung, einschließlich einer in unserer Arbeitsgruppe laufenden Vakzinierungsstudie (120). Ein vollständiger Beweis, dass BCR-ABL-Peptide in CML-Zellen natürlich prozessiert und präsentiert werden, ist allerdings noch nicht erbracht worden.



**Abb. 6: MHC-Klasse-I-Peptidliganden aus der Fusionsregion des BCR-ABL-b3a2-Proteins, die von Bocchia et al. (112) über *in vitro* Bindungsstudien identifiziert wurden.** Im oberen Teil der Abbildung ist die Aminosäuresequenz dargestellt, die die Fusionsregion des BCR-ABL-b3a2-Proteins umspannt. Der Pfeil markiert die Verknüpfungsstelle von BCR-Exon b3 mit ABL-Exon a2. Als Folge der Verknüpfung des b3-BCR-Exons mit ABL-Exon a2 wird an der Fusionsregion eine neue Aminosäure (Lysin) kodiert. Der untere Teil der Abbildung zeigt die aus der BCR-ABL-Fusionsregion abgeleiteten Peptide, die *in vitro* mit mittlerer bis hoher Affinität an MHC-Klasse-I-Moleküle binden. KQSSKALQR und ATGFKQSSK weisen sowohl eine Bindungsspezifität für HLA-A3 als auch für HLA-A11 auf. Für GFKQSSKAL wurde eine Bindungsspezifität für HLA-B8 belegt.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Identifizierung potentiell immunologisch relevanter Peptide auf Zellen der chronischen myeloischen Leukämie erfolgen. Von besonderem Interesse war der Nachweis einer endogenen Prozessierung und Präsentation von Peptiden aus der Fusionsregion des BCR-ABL-Proteins b3a2.

Zur Isolierung MHC-Klasse-I-präsentierter Peptide sollte eine Methode in unserem Labor etabliert und – im Hinblick auf die späteren Anforderungen der massenspektrometrischen Analyse – optimiert werden, die eine direkte Analyse des endogen präsentierten Peptidpools von Tumorzellen erlaubt. Die Analyse der isolierten MHC-Liganden sollte über ein kombiniertes Verfahren von Nanokapillar-HPLC mit Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (CapLC-MS) oder Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) erfolgen. Dabei sollte die Suche nach endogen präsentierten BCR-ABL-Fusionsregionspeptiden in den gereinigten komplexen Peptidpools durch Kalibrierung des Analysesystems mit synthetischen BCR-ABL-Referenzpeptiden erleichtert werden (*Predict-Calibrate-Detect-Ansatz*).

Zunächst sollte ein Zellmodellsystem mit der MHC-Klasse-I-negativen und BCR-ABL-positiven Zelllinie K562 etabliert werden, das die selektive Analyse von HLA-A3- und HLA-B8-assoziierten Peptidliganden erlaubt. Die entsprechenden MHC-Klasse-I-kodierenden cDNAs sollten hierzu in Transfektionsvektoren kloniert, die Integrität der Konstrukte durch Sequenzanalyse verifiziert und anschließend K562-Zellen damit transfiziert werden. Mittels durchflusszytometrischer Analyse sollten dann Klone mit einer hohen HLA-A3- bzw. HLA-B8-Expression ausgewählt werden.

Danach sollte durch eine Analyse des MHC-Klasse-I-Peptidpools von expandierten, genmodifizierten K562-Zellen die endogene Präsentation von BCR-ABL-Fusionsregionspeptiden untersucht werden. Parallel hierzu sollte die Proteasomschnittspezifität für BCR-ABL-Fusionsregionspeptide bestimmt werden. Die gewonnenen Daten aus diesen experimentellen Ansätzen sollten durch Analyse von CML-Patientenmaterial bestätigt werden.

Neben der gezielten Suche nach den theoretisch vorhergesagten BCR-ABL-Fusionsregionspeptiden sollten weitere auf CML-Zellen präsentierte immuntherapeutisch relevante MHC-Klasse-I-Peptide identifiziert werden. Um eine auf die malignen Zellen beschränkte Präsentation potentieller Kandidatenpeptide belegen zu können, sollte ebenfalls das Peptidrepertoire gesunder Leukozyten (aus Milzen) gereinigt und massenspektrometrisch analysiert werden.