
5 Diskussion

Im Zentrum dieser Arbeit stand die Identifizierung von CML-assoziierten Peptiden über den Ansatz der so genannten *Reversen Immunologie* – einem T-Zell-unabhängigen Verfahren, bei dem Peptide nach ihrer natürlichen Prozessierung und Präsentation direkt von Tumorzellen eluiert und über biochemische Methoden untersucht werden. Mit dieser Vorgehensweise wird sowohl eine Fokussierung auf theoretisch vorhergesagte potentiell immunogene Peptide - wie den Fusionsregionspeptiden des BCR-ABL Onkoproteins – ermöglicht als auch die Identifizierung bislang unbeschriebener tumorassoziierter MHC-Klasse-I-Liganden.

5.1 Prozessierung und Präsentation von BCR-ABL-Fusionsregionspeptiden

Kennzeichnend für die chronische myeloische Leukämie (CML) ist die Präsenz des BCR-ABL-Fusionsproteins, das bei über 95% der erkrankten Leukämiepatienten nachweisbar ist. Eine der gegenwärtig untersuchten Strategien zur Behandlung von CML-Patienten ist die Vakzinierung mit Peptiden aus der Fusionsregion des BCR-ABL-Proteins, da innerhalb dieser Region neue Aminosäuresequenzen enthalten sind, die ideale tumorspezifische Determinanten darstellen, welche nicht in den endogenen Proteinen BCR oder ABL vorhanden sind. Eine auf BCR-ABL peptidbasierende Immuntherapie kann aber nur dann zum Erfolg führen, wenn zwei grundlegende biologische Voraussetzungen erfüllt sind. Erstens: Peptide aus der Fusionsregion des BCR-ABL-Proteins müssen über den proteasomalen Abbau entstehen, und sie müssen, zweitens, auf der Zelloberfläche gebunden an MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert werden, um von T-Zellen erkannt zu werden.

Obwohl bereits seit Beginn der Neunziger Jahre die MHC-Klasse-I-restringierte Präsentation von BCR-ABL-Fusionsregionspeptiden Gegenstand intensiver Forschung ist, waren bis zu Beginn dieser Arbeit nur Daten über *in vitro* Bindungsstudien und T-Zell-Reaktivität bekannt. Mit Hilfe prädiktiver Computerprogramme und *in vitro* Bindungsstudien konnte Bocchia et al. (112) zeigen, dass die Nonamere GFKQSSKAL, ATGFKQSSK und KQSSKALQR eine mittlere bis hohe Bindungsaffinität für die relativ häufigen HLA-Allele HLA-A3, HLA-A11 und HLA-B8 aufweisen und die Induktion einer spezifischen T-Zellreaktivität gegen diese Liganden möglich ist (113-115). Ein weiteres HLA-A2-restringiertes BCR-ABL-Fusionsregionspeptid (SSKALQRPV), gegen das ebenfalls CTL-Antworten gefunden werden konnten, wurde von Yotnda et al. (116) beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die endogene Prozessierung und Präsentation der von Bocchia et al. und Yotnda et al. beschriebenen BCR-ABL-Fusionsregionspeptide für CML-Zellen untersucht.

5.1.1 Einfluß der Proteasom-Spezies auf die Prozessierung von BCR-ABL-Fusionsregionspeptiden

Die erste Hürde für die erfolgreiche Präsentation eines Tumorantigens an der Zelloberfläche ist dessen intrazelluläre Prozessierung. Nach Rock und Goldberg (167) ist das 20S Proteasom der wichtigste intrazelluläre Proteasekomplex zur Erzeugung von MHC-Klasse-I-Liganden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb die Möglichkeit geprüft, ob durch proteasomale Degradation die von Yotnda et al. (116) und Bocchia et al. (112) beschriebenen BCR-ABL-Fusionsregionspeptide entstehen können. Hierfür wurde aus den lymphoblastoiden Zelllinien LCL721 und LCL721.174 konstitutives- und Immunoproteasom gereinigt und ein synthetisches 26mer-Peptid, das die BCR-ABL-Fusionsregion umspannt, *in vitro* verdaut. Weder für konstitutives- noch für Immunoproteasom konnte eine Prozessierung des nach Yotnda et al. (116) HLA-A2-restringierten Liganden SSKALQRPV belegt werden. Dieses Resultat läßt zwei Rückschlüsse zu. Entweder der von Yotnda et al. (116) erbrachte Nachweis der SSKALQRPV-spezifischen T-Zellreaktivität ist anzuzweifeln oder SSKALQRPV wird durch alternative Prozessierungswege erzeugt. So wird nach Saveanu et al. (168) in Erwägung gezogen, dass unter anderem die zytosolische Tripeptidyl-Peptidase (TTP II) möglicherweise einige der Funktionen ausführen kann, die normalerweise dem Proteasom zugeschrieben werden. Auch die proteolytische Aktivität des sekretorischen Stoffwechselweges könnte an der Bereitstellung einiger MHC-Klasse-I-Liganden beteiligt sein. Diskutiert in diesem Zusammenhang wird insbesondere die zusätzliche Produktion potentieller MHC-Klasse-I-Liganden durch die Aktivität einiger Proteasen in endolysosomalen Partikeln. Allerdings besteht die Schwierigkeit bei der Untersuchung solcher alternativen Prozessierungswege darin, dass sie unter Inhibition des Proteasomkomplexes durchgeführt werden müssen. Da jedoch eine hundertprozentige Hemmung des Proteasomkomplexes experimentell niemals erzielt werden konnte, werden die oben diskutierten alternativen Prozessierungswege für MHC-Klasse-I-Peptide auch immer wieder durch eine nicht auszuschließende Restaktivität des Proteasoms in Frage gestellt (168; 169). Zweifel an der endogenen Präsentation von SSKALQRPV werden auch durch die Tatsache unterstützt, dass dieses Nonamer nicht das klassische HLA-A2-Motiv aufweist, das für die Ankeraminosäure in Position 2 ein Leucin vorsieht. Innerhalb der Peptidsequenz von SSKALQRPV entspricht lediglich Valin in Position 9 dem HLA-A2-Bindungsmotiv (<http://www.syfpeithi.bmi-heidelberg.com/scripts/MHCserver.dII/FindYourMotif.htm>), wodurch dieser Ligand eine sehr geringe Bindungsaffinität für HLA-A2 aufweist. Entsprechend stark liegt die Vermutung nahe, dass dieser Ligand nicht endogen präsentiert wird und es sich bei der von Yotnda et al. (116) detektierten T-Zell-Reaktivität um einen technischen Artefakt handeln muß oder diese auf einen *in vitro priming*-Effekt zurückzuführen ist.

Anders stellte sich die Situation für die von Bocchia et al. beschriebenen HLA-A3- und HLA-B8-assoziierten Liganden KQSSKALQR, ATGFKQSSK und GFKQSSKAL dar. Das im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte *in vitro* Experiment belegt eindeutig eine Schnittspezifität des konstitutiven Proteasoms (c20S) für die Peptide KQSSKALQR, ATGFKQSSK und GFKQSSKAL. Von besonderer Bedeutung war jedoch die Feststellung, dass das Immunoproteasom (i20S) keine Schnittspezifität für die Prozessierung der Liganden ATGFKQSSK und GFKQSSKAL aufweist, sondern nur KQSSKALQR-Peptidfragmente erzeugen kann. Dieses Ergebnis war überraschend, da nach allgemeiner Ansicht das Immunoproteasom die effizientere Protease zur Erzeugung antigener Liganden darstellt. Ausnahmen von dieser generellen Regel, die sich hauptsächlich auf *in vitro* Verdaudaten mit fluorochromen-markierten Referenzpeptiden stützt, sind allerdings in der Literatur weitreichend beschrieben (169). Interessanterweise wurde in diesem Kontext auch von Morel et al. (170) beobachtet, dass das Immunoproteasom - im Gegensatz zum konstitutiven Proteasom - beispielsweise keine Schnittspezifität zur Prozessierung des Melanoma-Differenzierungsantigens Melan-A26-35/HLA-A2 besitzt, welches gegenwärtig Einsatz in der Antitumorvakzinierung findet. Sowohl in diesem Fall als auch insbesondere für die oben genannten BCR-ABL-Fusionsregionspeptide ist ein solches Resultat von entscheidender Bedeutung für geplante Vakzinierungsexperimente mit dendritischen Zellen, da diese Zellen im reifen Zustand ausschließlich Immunoproteasom exprimieren (171).

Basierend auf der *in vitro* gewonnenen Erkenntnis, dass bei der Frage nach endogener Prozessierung der BCR-ABL-Fusionsregionspeptide die Expression der Proteasom-Spezies eine zentrale Rolle spielt, wurde anschließend untersucht, welche der beiden Proteasomen in Leukämiezellen exprimiert werden.

Hierfür wurde eine Western-Blot Analyse mit Proteingesamtextrakten durchgeführt, die aus der BCR-ABL-positiven erythromyeloischen Zelllinie K562 und aus CML-Patientenzellen von unterschiedlichen Krankheitsstadien gewonnen worden waren. Dabei stellte sich heraus, dass K562-Zellen ausschließlich die für konstitutives Proteasom charakteristischen Untereinheiten exprimieren. Wie die Untersuchung der HLA-B8- und HLA-A3-transfizierten K562-Zellen zeigte, hatte die Transfektion dieser Zellen mit MHC-Klasse-I kodierenden cDNAs keinen Einfluß auf dieses Resultat. Im Gegensatz hierzu wurden bei der Analyse der CML-Patientenzellen aus unterschiedlichen Krankheitsstadien starke Unterschiede in der Expression der für die Schnittspezifität entscheidenden Proteasom-Untereinheiten festgestellt.

Während in Zellen aus chronischer Phase CML sowohl die konstitutive β 1-Untereinheit als auch die immuno-Untereinheit LMP7 detektiert wurde, zeichneten sich die Zellen aus Blastenkrise von unbehandelten CML-Patienten durch eine nahezu ausschließliche

Expression der immuno-LMP7-Untereinheit aus. Ein Patient (CP/AP), dessen Zellen vermutlich während der chronischen Phase gewonnen worden waren, wies ebenfalls eine nahezu exklusive Expression von LMP7 auf.

Der auffällige Expressionsrückgang der konstitutiven β 1-Untereinheit in Zellen von Patienten in Blastenkrise legt die Vermutung nahe, dass eine Korrelation zwischen Expression der Proteasom-Spezies und dem CML-Krankheitsverlauf besteht. Eine Ausdehnung der Untersuchungen auf ein größeres CML-Patientenkollektiv wäre daher sehr interessant.

Um die Hypothese der krankheitsphasenabhängigen Expression der Proteasom-Spezies zu erhärten, wäre es in diesem Kontext auch wichtig, den weiteren Krankheitsverlauf des Patienten CP/AP zu klären. Es wäre denkbar, dass sich zum Zeitpunkt der Probenentnahme bereits ein Übergang der CML-Erkrankung in die akzelerierte Krankheitsphase abzeichnete. Die Unterschiede in der Expression der Proteasom-Spezies sind von weitreichender Bedeutung für einen immuntherapeutischen Ansatz mit BCR-ABL-Fusionsregionspeptiden, da die endogene Prozessierung von BCR-ABL-Fusionsregionspeptiden bei exklusiver Expression des Immunoproteasoms auf den HLA-A3-restringierten Liganden KQSSKALQR reduziert sein wird.

Von Interesse war auch die Beobachtung, dass im Gegensatz zur CML-Zelllinie K562, Patientenzellen aus chronischer Phase (Therapiestatus nicht bekannt) nicht nur konstitutives Proteasom exprimieren, sondern auch eine Expression des Immunoproteasoms aufweisen. Wie weitreichend in der Literatur bekannt ist, erfolgt durch Interferon- γ die Induktion der für Immunoproteasom-spezifischen Untereinheiten LMP2, LMP7 und MECL1. Es wäre daher denkbar, dass auch Interferon- α , dessen Verabreichung insbesondere in der chronischen Phase zur CML-Therapie zählt (siehe 1.1.3.1), eine ähnliche Wirkungsweise wie Interferon- γ auf die Induktion der Immunoproteasom-spezifischen Untereinheiten zeigt. Ob dies tatsächlich der Fall ist, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt der aktuellen Literatur nicht zu entnehmen und wurde auch bislang nicht von Forschern untersucht (persönliche Mitteilung Prof. R. Huber, MPI für Biochemie, Martinsried, D; Dr. H.J. Schild, Institut für Zellbiologie, Tübingen, D; R. González-Duarte, Departament de Genètica, Universitat de Barcelona, E)

5.1.2 Strategie zur Untersuchung der endogenen Präsentation von BCR-ABL-Fusionsregionspeptiden

Um den direkten Nachweis einer endogenen Präsentation der BCR-ABL-Fusionsregionspeptide GFKQSSKAL, ATGFKQSSK und KQSSKALQR zu erbringen, wurde der Peptidpool von CML-Zellen nach 3.3.7 gereinigt. Anschließend erfolgte die Identifizierung definierter

Peptidliganden über den so genannte *Predict-Calibrate-Detect*-Ansatz (siehe 1.4). Weder auf MHC-Klasse-I-transfizierten K562-Zellen noch auf Zellen von CML-Patienten gelang ein direkter Nachweis der gesuchten BCR-ABL-Fusionsregionspeptide. Dieses Ergebnis läßt zwei zentrale Rückschlüsse zu. Entweder die gewählte Nachweisstrategie (K562-Zellmodellsystem oder die Sensitivität der Methode) bedingt dieses negative Resultat oder aber die gesuchten BCR-ABL-Fusionsregionspeptide gelangen nach proteasomaler Degradation nicht an die Zelloberfläche zur endogenen Präsentation auf den untersuchten CML-Zellen. Beide Möglichkeiten werden im Folgenden näher diskutiert.

5.1.2.1 Der Predict-Calibrate-Detect-Ansatz

Der von mir gewählte *Predict-Calibrate-Detect* -Ansatz wurde bereits erfolgreich in anderen Laboratorien zur Identifizierung theoretisch vorhergesagter MHC-Klasse-I-Liganden angewandt. Brockman et al. (172) beschrieb 1999 diesen neuen technischen Ansatz zur Identifizierung von MHC-Klasse-I-Liganden, mit dem er unabhängig von *Bioassays* erfolgreich die endogene Prozessierung und Präsentation zweier aus *Trypanosoma cruzi* vorhergesagter MHC-Klasse-I-Liganden nachweisen konnte. Schirle et al. (108) konnte zeigen, dass mit diesem Verfahren der Nachweis von vorhergesagten HLA-A2-assoziierten Liganden aus Wildtyp p53 und dem *Carcinoembryonic* Antigen (CEA) bis zu einem unteren Schwellenwert von acht Kopien eines Liganden pro Zelle möglich ist. Auch bei der Analyse des endogen präsentierten Peptidpools von CML-Zellen war davon auszugehen, dass die gesuchten BCR-ABL-Fusionsregionspeptide in einer sehr geringen Kopienzahl vorliegen. Ausgehend von der Zellmenge von 10^{10} - 10^{11} Zellen, die maximal für eine Analyse zur Verfügung stand, wurde mit einer Peptidkonzentration für einen individuellen Liganden im mittleren bis unteren femtomolaren Bereich gerechnet. Um ein individuelles Peptid in diesem Konzentrationsbereich mit massenspektrometrischen Methoden nachzuweisen, sind verschiedene technische Lösungen denkbar. Nach Lemmel et al. (173) stellt jedoch die von uns gewählte direkte Kopplung einer Mikrokapillar-HPLC an das Massenspektrometer für die erfolgreiche Sequenzierung von einzelnen Peptidliganden im subnanomolaren Bereich aus komplexen Peptidgemischen die Methode der Wahl dar. Wir konnten zeigen, dass mit diesem System der Nachweis synthetischer BCR-ABL Referenzpeptide bei Stoffmengen von 100 fmol noch klar erkennbare Signale in den korrespondierenden Massen-Chromatogrammen ergaben. Bei einer Präparation von 10^{10} Zellen würde dies - ohne Berücksichtigung reinigungsbedingter Verluste - einer Nachweisgrenze von 6 Molekülen eines definierten Peptidliganden pro Zelle entsprechen. Dies würde dafür sprechen, dass die

gesuchten BCR-ABL-Fusionsregionspeptide nicht auf den untersuchten Zellen endogen präsentiert werden oder die endogene Präsentation unter dieser Nachweisgrenze liegt.

5.1.2.2 Das K562-Zellmodellsystem

Auf der technischen Seite besteht die größte Anforderung bei der Analyse endogen präsentierter Liganden darin, auch dann noch ein eindeutiges Massen-Chromatogramm zu erhalten, wenn der gesuchte Ligand nicht isoliert, sondern in einem komplexen Peptidgemisch in der Analytprobe vorliegt. Nach Rammensee (174) präsentiert eine normale Zelle auf ihren ca. 10^5 bis 10^6 MHC-Klasse-I-Molekülen etwa 10 000 verschiedene Peptide mit individuellen Kopienzahlen zwischen 1 und mehr als 10 000. Zur Vereinfachung der massenspektrometrischen Analyse endogen präsentierter MHC-Klasse-I-Liganden wurde daher nach einem geeigneten Selektionskriterium gesucht, das eine Reduzierung der Komplexität des Peptidpools erlaubt. Da der Haplotyp eines humanen Individuums aus je drei codominant exprimierten Genen - kodierend für jeweils zwei HLA-A, HLA-B und HLA-C MHC-Klasse-I-Moleküle der schweren Kette - besteht, stellte die Analyse einer BCR-ABL-positiven Tumor-Zelllinie mit exklusiver Expression der für dieses Projekt relevanten MHC-Klasse-I-Moleküle (HLA-A3 bzw. HLA-B8) ein geeignetes Auswahlkriterium dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde von mir ein solches Tumormodellsystem durch selektive Transfektion der BCR-ABL-positiven Zelllinie K562 mit entsprechenden HLA-A3- bzw. HLA-B8- kodierenden cDNAs etabliert. K562-Zellen sind für ein solches Vorhaben optimal geeignet, da diese Zellen keine endogene Expression von HLA-A, -B oder -C an der Zelloberfläche aufweisen (138-142) und - wie aus den oben diskutierten Proteasomexperimenten ersichtlich wurde - alle drei zur Frage stehenden BCR-ABL-Fusionsregionspeptide über proteasomalen Abbau entstehen können.

Wie die Analyse des Peptidpools der HLA-B8- oder HLA-A3-transfizierten K562-Zellen zeigte, konnten zahlreiche endogen präsentierte Peptidliganden identifiziert werden. Die BCR-ABL-Peptide GFKQSSKAL, ATGFKQSSK und KQSSKALQR befanden sich jedoch nicht darunter. Dennoch bestätigten Kontrollexperimente eindeutig eine Expression des BCR-ABL-Proteins in den K562-Transfektanten, durchflusszytometrische Analysen die Expression der transgenen MHC-Moleküle und eine Western-Blot Analyse der einzelnen Reinigungsschritte die erfolgreiche Isolierung der endogen präsentierten MHC-Komplexe.

Es gibt mehrere mögliche Erklärungen, weshalb die gesuchten BCR-ABL-Fusionsregionspeptide nicht endogen präsentiert nachgewiesen werden konnten. Zum einen könnte die Expressionsstärke des Transgens (HLA-B8 oder HLA-A3) eine zu geringe oder ausbleibende Präsentation der BCR-ABL-Peptide an der Zelloberfläche bedingen, zum anderen könnten

post-proteasomale Faktoren innerhalb des MHC-Klasse-I-Präsentationsweges und die Menge der endogen prozessierten BCR-ABL-Peptide dazu führen, dass keine oder nur eine unter der Nachweisgrenze liegende Präsentation von GFKQSSKAL, ATGFKQSSK und KQSSKALQR auf den transgenen K562-Zellen stattfindet.

Wie über quantitative Western-Blot Analyse gereinigter MHC-Klasse-I-Komplexe aus HLA-A3-transfizierten Zellen (KA3.2) ersichtlich wurde, konnten aus einer Präparation von ca. 10^{11} Zellen $1,9 \times 10^4$ Peptid/MHC-Komplexe/Zelle eluiert werden. Ausgehend von einem verlustfreien System würde in diesem Fall die MHC-Expressionsstärke der Transfektanten im Vergleich zur endogenen Situation (bei Betrachtung eines MHC-Lokus) um den Faktor vier niedriger liegen. Dieses Resultat muß jedoch stark relativiert werden, da bei der Reinigung von MHC-Klasse-I-Komplexen von präparativen Verlusten von 50 bis 70% ausgegangen wird.

Verschiedene experimentelle Ansätze, die Expressionsstärke des Transgens zu erhöhen, zeigten (nachgewiesen über durchflusszytometrische Analysen) jeweils nur einen zeitlich limitierten Erfolg, und die anfangs erzielte Expressionsstärke lies sich nicht über den Zeitraum, der für die Anzucht von 10^{10} bis 10^{11} Zellen erforderlich ist, auf dem ursprünglich hohen Expressionsniveau halten. Die Beobachtung, dass sich anfänglich stark positive K562-Transfektanten einige Zeit später auf ein niedrigeres MHC-Klasse-I-Expressionsniveau einpendeln, wurde auch von einer anderen Arbeitsgruppen gemacht (persönliche Mitteilung Prof. J.H.F Falkenburg, University Medical Center, Leiden, N). Dies deutete auf eine *Gegenregulation* der MHC-Klasse-I-Expression an der Zelloberfläche durch endogene Mechanismen hin. Einige Zeit nach Durchführung der hier diskutierten Experimente erschien eine Arbeit von Yoon et al. (175) mit dem Hinweis, dass K562-Zellen einen TAP-Defekt aufweisen. Es könnte daher sein, dass in den transfizierten K562-Zellen eine gute intrazelluläre transgene Expression der HLA-A3- bzw. HLA-B8-schweren Kette vorlag, die limitierte Peptidzufuhr in das ER jedoch dann die Anzahl stabiler peptidbeladener MHC-Komplexe an der Zelloberfläche einschränkte. Diese Vermutung wird durch Studien an TAP1-defizienten Mäusen unterstützt, die belegen, dass Deletionen oder Mutationen in den für TAP1-kodierenden Genen zu einer stark reduzierten Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen führt (176). In einem solchen TAP-defizienten System ist es daher fraglich, ob überhaupt ein Transport der gesuchten BCR-ABL-Fusionsregionspeptide in das endoplasmatische Redikulum stattgefunden hat, berücksichtigt man auch die starke Konkurrenz zwischen den BCR-ABL-Fusionsregionspeptiden und der imensen Menge an Liganden aus Selbstproteinen beim Transport vom Zytosol in das ER. Die reduzierte Zahl von Peptidliganden, die wir von den genmodifizierten K562-Zellen isolieren konnten, steht mit einem nicht vollständigen Defekt des TAP-Transportersystems in Einklang. Dass trotz der partiellen

TAP-Defizienz von K562-Zellen der Ligand KIADRIFFLY aus dem Onkoprotein LMO4 auf KA3.2 endogen präsentiert nachgewiesen werden konnte, erschien in diesem Kontext um so bedeutender.

Generell stellt die Betrachtung der Menge an endogen prozessierten BCR-ABL-Peptidliganden, sowohl in K562-Transfektanten als auch in CML-Patientenzellen, einen zentralen Diskussionspunkt dar. Alleine schon die intrazelluläre Konzentration an GFKQSSKAL, ATGFKQSSK und KQSSKALQR könnte möglicherweise nicht ausreichend für eine erfolgreiche Peptidpräsentation an der Zelloberfläche sein. Unterstützt wird diese Hypothese durch die *in vitro* gewonnenen, quantitativen Daten durch Verdau des synthetischen BCR-ABL 26mer-Fusionsregionspeptids mit konstitutivem- und Immuno-proteasom. Wie insbesondere für ATGFKQSSK und GFKQSSKAL gezeigt wurde, liegt der Anteil der entstandenen Peptidfragmente, bezogen auf die Menge des ausgangs eingesetzten 26mer BCR-ABL-Peptids, bei nur 1 bzw. 2%. Nach Berechnungen von Yewdell et al. (177) resultiert der Abbau von 10^4 Proteinen in die Beladung eines einzigen Peptid/MHC-Komplexes. Dagegen wird die überwiegende Mehrzahl der nach proteasomaler Degradation in das Zytosol freigesetzten Peptide sehr rasch durch weitere zytosolische Proteasen vollständig zu einzelnen Aminosäuren abgebaut (167). Daher besteht die Gefahr, dass viele, insbesondere in geringer Kopienzahl vorliegende Peptide verloren gehen, noch bevor sie mit TAP assoziieren können. Darüber hinaus entscheidet nicht zuletzt die Substratspezifität des TAP-Transporters selbst, sondern auch die Bindungsaffinität des Liganden für einen entsprechenden MHC, ob ein Peptid erfolgreich an der Zelloberfläche präsentiert wird. Wie Bocchia et al. (112) zeigte, binden ATGFKQSSK und GFKQSSKAL nur mit mittlerer Bindungsaffinität an die entsprechenden MHC-Moleküle. Eine Verdrängung dieser Peptide durch Peptide mit höherer Affinität bei der Konkurrenz um freie MHC-Komplexe im ER ist daher nicht auszuschließen. Aber gerade Peptide, die aufgrund geringerer Bindungsaffinitäten nicht schnell genug mit einem unbeladenen MHC-Molekül assoziieren sind besonders gefährdet, dem sehr effizienten Peptidexport über den Sec61p Kanal in das Zytosol zu unterliegen, wo sie dann erneut der Gefahr der kompletten Degradation durch zytosolische Proteasen ausgesetzt sind (178).

5.1.3 Analyse der BCR-ABL Peptidpräsentation auf CML-Patientenzellen

Obwohl es selten der Fall ist, von HLA-A3- oder HLA-B8-positiven CML-Patienten Zellen aus der therapeutischen Leukapherese für Forschungszwecke zu erhalten, gelang es durch eine Kooperation mit mehreren Unikliniken, von drei HLA-A3- und einem HLA-B8-positiven Patienten Leukämiezellen zur Verfügung gestellt zu bekommen. Günstig für die Untersuchung war auch, dass sich diese Patienten in unterschiedlichen Krankheitsphasen befanden. Dies ermöglichte den endogen präsentierten Peptidpool sowohl in chronischer Phase als auch in Blastenkrise zu untersuchen. Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit nahezu 100 endogen präsentierte Peptidliganden auf CML-Zellen über die angewandte massenspektrometrische Analysestrategie identifiziert. Einige dieser Liganden erschienen im Kontext der CML interessante Antigene zu sein, die unter 5.2 und 5.3 noch näher diskutiert werden. Ein Nachweis der endogenen Präsentation von GFKQSSKAL, ATGFKQSSK und KQSSKALQR gelang jedoch auch auf CML-Patientenzellen nicht. Neben den bereits unter 5.1.2.2 diskutierten Faktoren, die an einer endogenen Präsentation der BCR-ABL-Peptide starke Zweifel implizieren, kann dennoch die Existenz einer Peptidpräsentation unterhalb der Nachweisgrenze nicht ausgeschlossen werden. Nach gegenwärtigem Stand der Technik ist es möglich, von einer Tumorprobe zirka 10% des endogen präsentierten Ligandoms zu erfassen (104). Somit entspricht die Anzahl der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Peptidliganden einem Niveau, das in vielen Fällen auch von anderen auf diesem Gebiet arbeitenden Gruppen erreicht wird. Sie erlaubt jedoch keine absolute Aussage über die endogene Präsentation eines nicht-identifizierten Liganden zu treffen. Ein Grund hierfür ist, dass reinigungsbedingte Kontaminationen mit PEG (Polyethylenglykol) aus den verwendeten Plastikgefäßen, dem zur Zellyse eingesetzten Detergenz und die hohe Komplexität des Peptidgemisches dazu führen, dass bei der massenspektrometrischen Analyse die Signale mancher Peptide supprimiert werden. Zum anderen bedingt alleine die Vielzahl der Reinigungsschritte einen dramatisch hohen Peptidverlust von 50 bis 70%. Ein alternatives Elutionsverfahren wie es nach Storkus et al. (179) beschrieben wurde, könnte diese Verluste minimieren. Dieses Elutionsverfahren basiert auf einer milden Säuredestabilisierung der nicht kovalenten Bindung zwischen schwerer Kette und β_2 -Mikroglobulin des MHC auf vitalen Zellen. Dabei werden die gebundenen Liganden in den umgebenden Citratphosphatpuffer freigesetzt und können anschließend über chromatographische Methoden direkt aufgetrennt und massenspektrometrisch analysiert werden. Allerdings ist dieses Verfahren sehr umstritten. Während die von mir durchgeführte Immunpräzipitation von intakten MHC-Klasse-I-Molekülen den Nachweis ausschließlich auf der Zelloberfläche präsentierte Liganden garantiert, muß bei der Methode nach Storkus et al. (179) davon ausgegangen werden, dass auch andere Oberflächenmoleküle destabilisiert werden sowie zytosolische Peptide aus Zellfragmenten und über Proteasen abgebaute Peptide den eluierten Peptidpool

kontaminieren. Diese Vermutung legten auch nach dieser Methode durchgeführte Vorversuche nahe, die ich mit untransfizierten und HLA-A3-transfizierten K562-Zellen vorgenommen hatte (Daten nicht gezeigt). Auch in einer anderen Arbeitsgruppe (AG Prof. Rammensee, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, D) mit jahrelanger Erfahrung in der Elution und Analyse MHC-Klasse-I restringierter Liganden, gelang nach dieser Elutionsmethode keine sichere Identifizierung endogen präsentierter MHC-Liganden. Erstaunlicherweise wurden von dieser Gruppe aber Peptidfragmente und Polypeptide aus Zytosol und Nukleus identifiziert (persönliche Mitteilung Dr. Stevanovic, AG Prof. Rammensee). Die von mir durchgeführte Immunpräzipitation der intakten MHC-Klasse-I-Komplexe stellt dagegen sicher, dass nur endogen präsentierte Peptide nachgewiesen werden. Dennoch erschien, noch während im Rahmen dieser Arbeit versucht wurde, BCR-ABL-Fusionsregionspeptide auf CML-Zellen nachzuweisen, von einer konkurrierenden Arbeitsgruppe eine Publikation, in der unter Verwendung der Methode nach Storkus et al. (179) der Nachweis einer endogenen Präsentation des BCR-ABL-Peptidliganden KQSSKALQR auf CML-Patientenzellen und HLA-A3-transfizierten K562-Zellen erbracht wurde (180). Ob mit dieser Methode tatsächlich der direkte Nachweis einer endogenen Präsentation von KQSSKALQR gelang, bleibt meines Erachtens unter den oben diskutierten Aspekten offen. Was letzten Endes von der endogenen Präsentation des Liganden KQSSKALQR überzeugt, sind weniger die Peptidelutionsdaten von Clark et al. (180), sondern vielmehr unsere Proteasomdaten (20% Peptidanteil an der Menge insgesamt prozessierter Liganden aus dem synthetischen BCR-ABL 26mer-Peptid) in Verbindung mit den von zahlreichen Autoren nachgewiesenen KQSSKALQR-restringierten T-Zellantworten, einschließlich der von Clark et al. (180) gezeigten Tetramerfärbungen für KQSSKALQR spezifische T-Zellen. Dies sind jedoch nach wie vor nur indirekte Hinweise auf eine mögliche Präsentation, da T-Zellen auch über eine so genannte *Cross*-Präsentation durch Antigen-präsentierende Zellen generiert werden können.

5.2 Identifizierung CML-assoziiertes, potentiell immuntherapeutisch relevanter MHC-Klasse-I-Peptidliganden

Während aufgrund der eben diskutierten Einschränkungen die gezielte Suche nach vorhergesagten Peptiden nicht immer zum gewünschten Erfolg führt, eignet sich die im Rahmen dieser Arbeit gewählte Analysestrategie jedoch sehr gut, neue, potentiell immuntherapeutisch relevante Peptide zu identifizieren.

Die vorliegende Arbeit beinhaltet die erste umfangreiche Liste endogen präsentierter HLA-A3-restringierter Peptidliganden auf Zellen der chronischen myeloischen Leukämie und gesunder Zellen.

Für eine Auswahl potentiell immuntherapeutisch relevanter Peptide aus dem Kreis der identifizierten Liganden wurden verschiedene Auswahlkriterien angewandt. Entscheidend hierfür war es, die Krankheitsassoziation und das immunogene Potenzial des jeweiligen Liganden festzustellen.

Zunächst wurde über eine intensive Literaturrecherche geklärt, welche Bedeutung dem Protein, aus dem der Ligand abgeleitet wurde, im Kontext der CML sowie in einem sehr weit gefaßten Rahmen von Krebserkrankungen im Allgemeinen zukommt. Sofern bereits in der aktuellen Literatur vorhanden, stellten Informationen über Gen- und Proteinexpression ein weiteres erstes Selektionskriterium dar. Mitentscheidend für die Aufnahme des identifizierten Liganden in die engere Auswahl war eine möglichst auf die Tumorzelle beschränkte Expression des Proteins, aus dem der Ligand identifiziert wurde.

Da einige sehr viel versprechende Liganden in dieser Arbeit auf Proteine zurückgeführt wurden, die erst kürzlich in der Literatur Erwähnung fanden, mußte über eigene Analysen dieser Fragestellung nachgegangen werden. Aus Gründen des Kosten- und Zeitfaktors und der Nichtverfügbarkeit kommerzieller Antikörper wurden deshalb erste Analysen auf RNA Ebene vorgenommen. Dies geschah zum einen über die Durchführung einer konventionellen Northern-Blot Analyse, zum anderen konnte insbesondere mit Hilfe der RNA-Gen-Chip Technik (*Microarrays*) ein breites Spektrum an Genexpressionsdaten erhalten werden. Hierüber gelang es, eine erste Einschätzung der Genexpressionsstärke für maligne und gesunde Zellen vorzunehmen. Da die Expressionsstärke vieler Proteine jedoch durch posttranslationale Modifikationen reguliert wird, konnten aus diesen Experimenten nur sehr bedingt auch Rückschlüsse auf die Proteinexpression gezogen werden. Die Frage nach der endogenen Präsentation blieb mit dieser Analysemethode gänzlich unbeantwortet.

Daher wurde von mir in weiteren Experimenten auch untersucht, ob eine möglichst auf die maligne Zelle beschränkte Präsentation des zur Frage stehenden Liganden stattfindet. Analog der Identifizierung von endogen präsentierten Peptiden auf CML-Zellen wurde ebenfalls eine Analyse des Peptidpools von gesunden HLA-A3- und HLA-B8-positiven

Leukozyten durchgeführt. Optimal für eine solche Untersuchung wären Zellen von CML-Patienten in Remission. Diese stehen allerdings für Versuchszwecke nicht zur Verfügung. Eine sehr gute Alternative würden mononukleäre Zellen von HLA-identischen Knochenmarkspendern darstellen. Wie jedoch Vorversuche an kryokonservierten Stammzellpräparaten von gesunden HLA-identischen Spendern zeigten, liegt die Anzahl der in solchen Präparaten isolierten Leukozyten weit unter der für unsere Versuchszwecke erforderlichen Zellmenge, und die wenigen identifizierten Liganden waren folglich nicht aussagekräftig für die angestrebte vergleichende Analyse (Daten nicht gezeigt). Für die Überprüfung der Peptidpräsentation auf gesunden Leukozyten stellten daher Milzen von HLA-A3- und HLA-B8-positiven Spendern das am besten verfügbare Kontrollgewebe dar, da dieses Organ eine sehr hohe Dichte an Leukozyten aufweist. Dabei war die Anzahl der identifizierten Liganden von vier Milzen vergleichbar mit der Anzahl der Peptide, die aus CML-Zellen identifiziert werden konnten. Auffällig bei den Milzzellpräparationen war die Häufigkeit der aus Hämoglobin präsentierten Liganden. Dies könnte auf die besondere Funktion der Milz beim Abbau roter Blutzellen zurückzuführen sein. Neben Hämoglobin resultierte die überwiegende Mehrzahl der identifizierten Peptide aus Proteinen, die von *hauskeeping* Genen kodiert wurden. Einige dieser Liganden waren identisch mit denen, die auch auf CML-Zellen endogen präsentiert wurden wie etwa Peptide aus β -Aktin, Histon H4, DEAD-box Protein p68, Bax-Inhibitor1, Pleckstrin und einigen 40S ribosomalen Proteinen. Solche Peptide waren deshalb im Vorfeld als Kandidaten für eine Immuntherapie auszuschließen.

Welche der auf CML-Zellen identifizierten Liganden potentielle Kandidaten für eine Immuntherapie darstellen, wird nun im Folgenden diskutiert.

5.2.1 Identifizierung krankheitsassoziierter Peptidliganden

BCR-ABL-positive Zellen weisen starke Veränderungen in der Struktur und Funktion des Zytoskeletts auf. Die veränderte Adhäsion von BCR-ABL-positiven Zellen an Stroma und extrazelluläre Matrix, verminderte Apoptose und die Aktivierung mitogener Signale stellen die zentralen Ereignisse der BCR-ABL-Leukämogenese dar (38). Zahlreiche Liganden wurden endogen präsentiert auf CML-Zellen nachgewiesen, die aus Proteinen prozessiert wurden, welche mittelbar oder unmittelbar mit der BCR-ABL-Leukämogenese in Verbindung stehen. Neben vielen Peptidliganden aus Proteinen des Zytoskeletts und mit ihm assoziierter Proteine wie beispielsweise β -Catenin, das insbesondere bei leukämischen Zellen eine kritische Rolle in der Regulation der Zelladhäsion und Proliferation spielt (181), wurde auch ein Ligand aus hnRNPA1 identifiziert. Dieses Ribonucleoprotein fördert aufgrund erhöhter

Proteinspiegel in CML-Patientenzellen vermutlich den Kernexport von mRNAs, die für die leukämische Aktivität von BCR-ABL verantwortlich sind, wie unter anderem dem anti-apoptotischen Protein BCL-X_L (155). Da Proteine des Zytoskeletts und die mit ihm assoziierten Proteine jedoch eine nahezu ubiquitäre Expression aufweisen, sind die daraus abgeleiteten Liganden für einen immuntherapeutischen Ansatz weniger geeignet.

Dies gilt auch für die identifizierten Liganden aus den Proteinen Gelsolin, Profilin und Transgelin. Wie die Genexpressionsanalyse allerdings zeigte, weisen Gelsolin und Profilin in CML-Zellen eine verringerte Expression auf. Da bereits im Kontext anderer Krebserkrankungen (insbesondere bei Mammakarzinom) verringerte Expressionsniveaus dieser Gene in Verbindung mit der Krankheitspathogenese gesehen werden, könnte dieses Ergebnis daher einen interessanten Ansatzpunkt für andere Therapieformen darstellen.

5.2.2 Krankheitsassoziierte Peptide mit potentiell immuntherapeutischer Relevanz

Anders stellt sich die Situation für den aus Cathepsin-G identifizierten HLA-A3 assoziierten Ligand FLPWIRTTM dar. Cathepsin-G ist ein Zelllinien- und Differenzierungsstadium-spezifisches Mitglied der neutralen Serin-Protease-Familie. Nach Grisolano et al. (182) ist die Expression von Cathepsin-G auf das promyelozytäre Stadium der myeloischen Zelldifferenzierung und auf Mastzellen beschränkt. Ein endogen auf CML-Patientenzellen präsentierter Ligand aus Cathepsin-G mit HLA-A2 Restriktion (FLLPTGAEA) wurde bereits durch Papadopoulos et al. (183) nachgewiesen und als Kandidat für eine peptidbasierende Immuntherapie diskutiert. Arbeiten von Papadopoulos et al. belegten ferner eine Beschränkung der Cathepsin-G mRNA-Expression auf CD34-positive CML-Blasten, während CD34-positive Zellen von gesunden Spendern negativ für Cathepsin-G mRNA-Transkripte waren. Daher könnten aus Cathepsin-G prozessierte Peptide potentielle Kandidatenantigene für eine Peptid-Vakzinierung darstellen.

Interessante Kandidaten könnten auch die HLA-A3 assoziierten Liganden SVSNNVVITK und ILKEMTHSW aus den Proteinen Eps15 und AF4 sein. Beide stellen Fusionspartner des MLL-Gens (*Mixed Lineage Leukemia*) dar. Die transkriptionelle Aktivierung dieser Onkogene in Leukämiezellen resultiert typischerweise aus chromosomalen Rearrangements, die sie in die Nähe von hoch aktiven cis-agierenden transkriptionsregulatorischen Elementen platzieren, was häufig zu deren Überexpression führt (184). Rekombinationen des MLL-Gens finden sowohl bei akuten lymphoblastischen als auch bei akuten myeloischen Leukämien statt, wobei AF4 einen der meist prominentesten Fusionspartner des MLL-Gens darstellt (185). Ob bei den untersuchten CML-Patienten chromosomale Rearrangements dieser Gene

mit MLL vorlagen, ist nicht bekannt. Da aber besonders im fortgeschrittenen Stadium der CML häufig zusätzliche Chromosomentranslokationen auftreten, ist dies sehr wohl möglich. Alternativ könnte eine Dysregulation des Gens über minimale Veränderungen am Chromosom, wie z.B. Inversionen kleiner Chromosomsegmente involviert sein. Diesbezüglich ist zu vermerken, dass bei Leukämien die relativ grobe zytogenetische Analyse nur in etwa 50% der Fälle sichtbare Veränderungen zeigt. Wie hingegen Daten aus Untersuchungen belegen, die mittels Gensonden (*Flourescence in situ* Hybridisierung) durchgeführt wurden, können jedoch auch Deletionen, Inversionen und Duplikationen kleiner Chromosomsegmente zur Genaktivierung führen.

Gleiches könnte für den aus dem Protoonkogen Lyl1 identifizierten Liganden LRPPLLQL mit HLA-A3-Restriktion zutreffen. Lyl1 zählt zur Familie der basischen Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktoren, denen eine Funktion in der Kontrolle der Zellproliferation und Zelldifferenzierung obliegt (162). Bei einigen akuten lymphoblastischen Leukämien (T-ALL) tritt eine Chromosomentranslokation auf, die Lyl1 in die T-Zell-Rezeptor-C- β -Genregion transloziert (161). Welche Rolle Lyl1 bei CML spielt, ist nach gegenwärtigem Forschungsstand noch völlig unbekannt. Daher stellen die über Gen-Chip Expressionsanalyse gewonnenen Daten hier eine wichtige Ergänzung zur Peptidanalyse dar. Leider konnte aus den Zellen des Patienten, aus dem Lyl1-LRPPLLQL isoliert wurde, keine intakte RNA gewonnen werden. Über eine Untersuchung der Lyl1-Transkripte bei Patient BK1 konnte allerdings eine erhöhte Lyl1-Expression zum ersten Mal auch für CML belegt werden. Im Vergleich zu normalen Leukozyten war die Lyl1-Transkriptmenge über das Fünffache erhöht. Ferner konnten durch bereits in unserem Labor begonnene immunologische Untersuchungen Lyl1-LRPPLLQ-spezifische T-Zellen im Blut von CML-Patienten nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sowie die Tatsache, dass auf allen bislang untersuchten Zellen von Milzen gesunder Spender dieser Ligand nicht endogen präsentiert vorgefunden wurde, lassen Lyl1-LRPPLLQ als viel versprechendes Peptid für eine Immuntherapie erscheinen. Weitere Analysen an größeren Patientengruppen müssen nun folgen, um die immuntherapeutische Relevanz von Lyl1-LRPPLLQ bei CML zu untermauern. Ergänzend hierzu könnten auch LRPPLLQ-spezifische T-Zellklone generiert werden, die anschließend gegen CML-Zellen getestet werden könnten. Sollte sich über diese Analysen ergeben, dass sich ein immuntherapeutischer Einsatz von Lyl1 abgeleiteter Peptide als Erfolg versprechend erweist, könnte durch die Identifizierung weiterer Lyl1 abgeleiteter Liganden mit HLA-A2-Restriktion auch ein größeres Patientenkollektiv angesprochen werden. Hierfür konnten im Rahmen dieser Arbeit bereits Lyl1 abgeleitete Peptide identifiziert werden, die *in vitro* an HLA-A2 binden (näher diskutiert bei 5.3).

Der interessanteste HLA-A3-präsentierte Peptidligand, der im Rahmen dieser Arbeit endogen auf CML-Zellen nachgewiesen werden konnte, ist KIADRFLLY aus LMO4, dem jüngsten Mitglied der *LIM only*-Transkriptionsfaktoren. LMO4 weist eine sehr GC-reiche 5'Region auf, die charakteristisch für Gene ist, die onkogene Proteine, Transkriptionsfaktoren und andere regulatorische Proteine mit geringer Translationsrate kodieren (165). Humanes LMO4, das synonym auch als Brusttumorautoantigen bezeichnet wird, wurde erst 1999 durch Racevskis et al. (165) identifiziert. Relativ wenig ist demnach über seine Bedeutung bei CML bekannt. Aufgrund der Sequenzhomologie zu anderen LMO-Genen (LMO1-3) (165; 186) könnte jedoch eine Beteiligung von LMO4 an der BCR-ABL-Leukämogenese vermutet werden. Proteine der LMO-Familie spielen, wie im Mausmodell gezeigt wurde, eine essentielle Rolle sowohl für Lymphopoese als auch Myelopoese, fungieren als Schlüsselmoleküle der Tumorangio-genese bei soliden Tumoren und tragen beim Menschen zur Bildung von akuten lymphoblastischen Leukämien vom T-Zell-Typ (T-ALL) bei (146; 187; 188). Besonderes Interesse hat LMO2 geweckt, als im Rahmen einer Genterapiestudie festgestellt wurde, dass bei Kindern mit Immundefekten (SCID-X1: *severe combined immunodeficiency*) akute Leukämien (T-ALL) auftraten, nachdem sie mit retroviral transfizierten autologen hämatopoetischen Stammzellen behandelt wurden (147). Bei diesen Kindern erwuchs die T-ALL in Zellen, in denen die retrovirale Integrationsstelle in der Nähe oder innerhalb des T-Zell-Onkogens LMO2 lag. Diese verstärkte Genaktivierung kann als eine Art Mimikry der Mechanismen betrachtet werden, die zur Entwicklung der T-ALL führen, also der chromosomalen Translokationen, bei denen unter anderem eine Fusion des LMO2-Gens mit dem T-Zellrezeptor- β - oder T-Zellrezeptor- δ -Gen beteiligt sind und diese eine verstärkte Expression von LMO2 nach sich ziehen (148).

Die Bedeutung des bei CML identifizierten LMO4-Peptids wird insbesondere durch den Befund unterstrichen, dass wir es bislang nicht endogen präsentiert auf Milzzellen gesunder Spender nachweisen konnten. Zwar erlaubt die von uns angewandte Methode - aufgrund der hohen reinigungsbedingten Verluste - keine sichere Aussage über die Nicht-Präsentation eines Liganden, aber gerade deshalb erschien der durchgängige Nachweis von KIADRFLLY auf allen untersuchten CML-Patientenzellen und auch auf HLA-A3-transfizierten K562-Zellen so bemerkenswert.

Durch Arbeiten von Visvader et al. (145) wurde eine starke LMO4-Überexpression bei mehr als 50% von humanen Brusttumoren und Brustkrebs-Zelllinien belegt. Anhand einer Northern-Blot Analyse konnte ich zeigen, dass LMO4 auch bei Magen-, Nieren- und Uterustumor ähnlich starke Expressionsspiegel zu Brusttumorgewebe aufweist und sogar noch stärker bei Eierstocktumoren exprimiert ist. Dieses Ergebnis warf die Frage auf, ob die starke Frequenz der KIADRFLLY-Präsentation bei CML in Zusammenhang einer LMO4-Überexpression steht. In der Tat konnte eine für Patient BK1 durchgeführte Gen-Chip

Expressionsanalyse eine nahezu sechsfache LMO4-Überexpression gegenüber gesunden Leukozyten belegen, die auch über konventionelle Northern-Blot Technik bestätigt werden konnte. In weiteren Experimenten wurde daher die Expression von LMO4 an einem größeren Patientenkollektiv untersucht.

5.3 Charakterisierung von LMO4 im Kontext der CML

Zur genaueren Charakterisierung von LMO4 im Kontext der CML wurde auf Proben weiterer CML-Patienten, bei denen eine Peptidanalyse aufgrund zu geringer Zellmengen nicht möglich gewesen war, zurückgegriffen. Generell auffällig bei allen Northern-Blot Experimenten war die Detektion einer Doppelbande für LMO4-spezifische Signale. Nach Racevskis et al. (165) stellt die kleinere der beiden Banden vermutlich eine Variante des LMO4-Gens mit einer 112 Basenpaare umspannenden Deletion in der 5'Region dar. Diese Deletion verändert vermutlich einige offene Leseramen in der 5'untranslatierten Region, wobei die Folgen dieser Deletion für die Expression des LMO4-Proteins noch ungeklärt sind (165).

Zunächst wurde die Expression von LMO4 an einer CML-Patientengruppe untersucht, zu der keine weiteren Angaben über Therapie und Krankheitsstadium bekannt waren (vorwiegend ältere Proben von CML-Patienten, welche im Rahmen von Routine-Durchflusszytometrie-Untersuchungen des peripheren Blutes vor Jahren in Stickstoff gelagert waren). Diese Untersuchungen zeigten eine starke Heterogenität der LMO4-Expression mit Expressionsniveaus, die bei einigen Patienten sogar unter den mRNA-Niveaus von zwei untersuchten gesunden Spendern lagen (Daten nicht gezeigt). Daher wurde eine genauere Analyse der LMO4-Expression in Zellen von gesunden Spendern durchgeführt. Sowohl für humane PBMCs aus Milzzellen als auch für aus Vollblut gereinigte Zellen konnte eine nahezu homogene LMO4-Expression gezeigt werden. Es bestand daher die Vermutung, dass die beobachteten Schwankungen der LMO4-Expression in CML-Patientenproben möglicherweise auf therapeutische Maßnahmen zurückzuführen sind, wie etwa die Verabreichung des Tyrosinkinase-Inhibitors STI 571. Um diese Hypothese zu testen und damit gleichzeitig auch eine Beteiligung von LMO4 an der BCR-ABL-Leukämogenese zu untersuchen, wurden Zellen von STI 571 therapierten CML-Patienten im Vergleich zu nicht (oder alternativ) therapierten Patienten untersucht. Ebenso wurde der Einfluß von STI 571 auf die Expression von LMO4 in K562-Zellen analysiert.

In K562-Zellen konnte zunächst in den ersten Stunden nach Applikation von STI 571 ein leichter Anstieg der LMO4-Transkriptmenge verzeichnet werden, der über den Zeitraum von

24 h jedoch wieder rückläufig war. Diese transkriptionellen Schwankungen waren allerdings unabhängig von einer STI 571 Applikation. Auch in weiteren Experimenten (im Rahmen einer unter meiner Anleitung durchgeführten Diplomarbeit von Tuan Duc Nguyen (189)) an anderen CML-Zelllinien wurde diese Beobachtung bestätigt. Ebenso zeigte der Vergleich der mRNA-Transkripte in den Zellen einer Gruppe von STI 571-therapierten CML-Patienten und einer untherapierten Patientengruppe keinen Einfluß von STI 571 auf die Expression von LMO4. Für die unterschiedliche Expression des LMO4-Gens in CML-Patientenzellen müssen daher andere Mechanismen verantwortlich sein. Das Auftreten von starken Expressionsschwankungen protoonkogener Transkriptionsfaktoren, wie etwa Lyl1, LMO1, LMO2, HOX11 und TAL1/SCL, ist bei akuten Formen der Leukämie bereits durch zahlreiche Untersuchungen belegt (184). Die transkriptionelle Aktivierung dieser Onkogene in Leukämiezellen resultiert typischerweise aus chromosomalen Rearrangements. In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Ferrando et al. (184) wird als mögliche Erklärung solcher Expressionsschwankungen der Verlust von ursprünglich vorgeschalteten regulatorischen Elementen in Betracht gezogen, die normalerweise die Expression solcher Onkogene herunterregulieren. Transloziert in Regionen hoch aktiver cis-agierender transkriptionsregulatorischer Elemente, können diese Onkogene dann überexprimiert werden. Da bei einer CML, insbesondere im späten Verlauf der Erkrankung, häufig zusätzliche Chromosomentranslokationen auftreten, könnte daher die in einigen CML-Proben beobachtete erhöhte LMO4-Expression ein Hinweis darauf sein, dass auch LMO4 zu den LIM-Domäne Transkriptionsfaktoren zählt, die an chromosomalen Rearrangements beteiligt sind. In Analogie zu den für LMO2 bereits bekannten Auswirkungen einer solchen Translokation (wie unter 5.2.2 diskutiert), könnte dies einen unmittelbaren Zusammenhang zur CML-Leukämogenese darstellen.

Welche Rolle LMO4 auf molekularbiologischer Ebene in CML-Zellen spielt, ist noch weitgehend unerforscht. Wie die Versuche mit STI 571 zeigten, ist auf mRNA-Ebene kein Einfluß der BCR-ABL-Tyrosinkinase auf die Expression von LMO4 zu erkennen. Dennoch ist eine mögliche Beteiligung von LMO4 an der BCR-ABL-Leukämogenese nicht auszuschließen. LMO4 ist ein Nicht-DNA bindender Transkriptionsregulator, der auf der Ebene von Protein-Protein-Interaktionen agiert. Eines dieser LMO4-assoziierten Proteine ist der Tumorsuppressor BRCA1, für den bei Brustkrebs gezeigt wurde, dass die Interaktion mit LMO4 zur Abschwächung dessen Tumorsuppressor-Wirkung führt (190). Ein Zusammenspiel von BRCA1 und LMO4 wäre auch in CML-Zellen denkbar. In einer von Deutsch et al. (191) durchgeführten Arbeit wird die Progression der CML zur Blastenkrise in Verbindung mit einer reduzierten BRCA1-Expression in CML-Zellen diskutiert. BRCA1 spielt eine essentielle Rolle bei DNA-Reparaturprozessen. Daher könnten reduzierte BRCA1-Proteinspiegel die genetische Instabilität von CML-Zellen fördern. Wie die Experimente von

Deutsch et al. (191) belegen, geht mit zunehmenden BCR-ABL-Proteinspiegeln eine Reduktion der BRCA1-Proteinmenge einher und dies, obwohl auf mRNA-Ebene keine signifikanten Expressionsunterschiede nachgewiesen werden konnten. Interessanterweise konnte in derselben Arbeit durch Inhibition der proteasomalen Degradation ein Anstieg der BRCA1-Proteinspiegel gezeigt werden, welche wiederum nach längerfristiger Inhibition der Proteasomaktivität zu einer signifikanten Reduktion der BCR-ABL-Proteinspiegel führte. Es wäre daher vorstellbar, dass LMO4 zusätzlich oder im Zusammenspiel mit P^{210} BCR-ABL, die Proteinspiegel von BRCA1 herunterreguliert. Eine gleichzeitige Analyse der P^{210} BCR-ABL-, BRCA1- und LMO4-Proteinspiegel auch unter Einbeziehung des Tyrosinkinase-Inhibitors STI 571 wären daher sehr aufschlussreich. Zur Realisierung einer solchen Untersuchung sowie einer generellen Analyse von LMO4-Proteinspiegeln in CML-Zellen habe ich bereits mit der Herstellung eines LMO4-spezifischen Antikörpers begonnen.

Eine interessante Frage ist, ob die durchgängig auf CML-Zellen beobachtete Präsentation von LMO4-KIADRFLLY auf einer Überexpression des Proteins beruht oder andere Mechanismen dafür in Betracht zu ziehen sind. So wurde nachgewiesen, dass ein genereller Mechanismus der Transkriptionsregulation von LIM-Proteinen über den Ubiquitin-Proteasomweg besteht. Diese Regulation erfolgt über die Assoziation der Ubiquitin-Ligase RLIM mit LIM-HD (*homeodomain*)- Transkriptionsfaktoren und ist sowohl für LMO2 als auch für LMO4 belegt (192). Es ist daher vorstellbar, dass auf der Ebene dieser Mechanismen in CML-Zellen eine erhöhte Ubiquitinierung von LMO4 stattfindet, wodurch die Prozessierung des LMO4-KIADRFLLY-Peptidliganden begünstigt wird. Gerade die konstante Identifizierung von LMO4-KIADRFLLY auf CML-Zellen könnte möglicherweise mit einer besonders starken proteasomalen Degradation in den untersuchten Leukämiezellen - verglichen mit der nicht nachweisbaren Präsentation auf gesunden Zellen - gut erklärt werden können. In diesem Zusammenhang könnte auch die erhöhte Zellteilungsrate von leukämischen Zellen gegenüber Zellen gesunder Gewebe eine entscheidende Rolle spielen.

Unterschiede in der Schnittspezifität zwischen konstitutivem- und Immunoproteasom können allerdings bereits jetzt ausgeschlossen werden, da sowohl Zellen mit ausschließlicher Expression des konstitutiven Proteasoms (wie K562) als auch Zellen mit ausschließlicher Expression des Immunoproteasoms (Patient BK1) in der Lage sind, den Liganden KIADRFLLY zu erzeugen.

Zur Evaluierung von LMO4-KIADRFLLY als mögliches Tumorstoff wurde eine Analyse der LMO4-mRNA-Expression in verschiedenen gesunden humanen Geweben durchgeführt. Dabei zeigten Proben aus Gehirn und Skelettmuskel eine vorwiegend starke LMO4-Expression. Schwächere Signale konnten auch für Herz und Plazenta detektiert werden. Zunächst scheint die Expression von LMO4 auch in gesunden Geweben die Attraktivität

LMO4-abgeleiteter Peptide als Vakzine zu schmälern. Da aber gerade die Organe mit den stärksten LMO4-Transkriptsignalen, wie Gehirn, Skelettmuskel und auch Herz kaum MHC-Klasse-I-Moleküle exprimieren (193; 194), dürfte eine endogene Präsentation von LMO4-KIADRFLLY - und daher eine Erkennung durch die Zellen des Immunsystems - sehr unwahrscheinlich sein. Zudem geben mRNA-Expressionsniveaus nur bedingt Auskunft über die tatsächlich in der Zelle vorhandenen LMO4-Proteinmengen und besagen nichts über die Degradation daraus abgeleiteter Liganden für die MHC-Klasse-I-Präsentation. In Untersuchungen von Racevskis et al. (165) wurde (ebenfalls unter Verwendung eines kommerziellen Northern-Blots von gesunden humanen Geweben) eine LMO4-mRNA-Expression in Thymusgewebe nachgewiesen. In unserer Arbeitsgruppe konnte allerdings gezeigt werden, dass die Induktion einer spezifischen T-Zell-Antwort bei zwei von drei untersuchten CML-Patienten nachweisbar ist (Daten nicht gezeigt). Für diese Analyse wurden die T-Zellen der Patienten nur über Nacht mit LMO4-KIADRFLLY inkubiert, bevor sie anschließend einer ELISPOT-Analyse bzw. einem Zytokinfreisetzungstest (*CBA-Assay*) unterzogen wurden. Daher können in diesem Test nur zirkulierende antigenspezifische T-Zellen nachgewiesen werden. Der Nachteil einer Über-Nacht-Inkubation besteht allerdings in einer relativ geringen Sensitivität: T-Zellen, welche nur in sehr geringer Frequenz vorhanden sind, können nicht detektiert werden. Daher ist jetzt geplant, die Nachweisgrenze zu erhöhen, indem eine Vorkultur der Patienten T-Zellen mit dem Peptid *in vitro* über 8 bis 10 Tage durchgeführt wird. Um so signifikanter sind die bereits jetzt vorliegenden Ergebnisse zu werten. Diese sprechen eindeutig gegen eine KIADRFLLY Peptidpräsentation im Thymus, da eine solche Antigenpräsentation möglicherweise zur Deletion von KIADRFLLY-spezifischen T-Zellen im Thymus führen würde.

Zweifel an einer endogenen Präsentation von KIADRFLLY in gesunden Geweben werden auch durch den Vergleich von Peptidelutionsdaten der Arbeitsgruppe von Prof. Rammensee (Eberhard-Karls-Universität Tübingen, D), welche auf eine extrem hohe Zahl von massenspektrometrischen Peptiduntersuchungen von Tumor- und Normalgewebe zurückgreifen kann, unterstützt. Nach persönliche Mitteilung von Dr. Stevanovic (AG Prof. Rammensee) wurde bislang das LMO4-Peptid nur in zwei Nierentumoren gefunden, noch nie aber aus Proben gesunder Gewebe isoliert oder auf Zellen anderer Karzinome endogen präsentiert nachgewiesen (CML Proben hat diese Gruppe bisher nicht untersucht). Die Tatsache, dass weder in dieser Arbeit noch durch andere Arbeitsgruppen LMO4-KIADRFLLY auf gesundem Gewebe gefunden wurde sowie der Nachweis KIADRFLLY spezifischer T-Zellen unterstreicht die immunogene Relevanz dieses Liganden. Bereits laufende ELISPOT-, *CBA*- und MHC-Tetramer-Analysen an einer größeren HLA-A3 positiven CML-Patientengruppe werden vermutlich in nächster Zeit noch dazu beitragen können, die Eignung von KIADRFLLY als Peptidvakzine zu bekräftigen. Weiterhin ist die Etablierung

spezifischer T-Zell-Klone und die Untersuchung deren Fähigkeit, Leukämiezellen oder normale Zellen zu lysieren, notwendig und geplant.

Da HLA-A2 der in der kaukasischen Bevölkerung am stärksten vertretene Gen-A Haplotyp ist, wurde analog zu Lyl1 bereits untersucht, ob Peptidliganden mit einer möglichen HLA-A2 Restriktion aus LMO4 abgeleitet werden können. Dies würde die Möglichkeit eröffnen, eine größere Patientengruppe von einer eventuellen LMO4-Immuntherapie profitieren zu lassen. Zur Identifizierung solcher LMO4/HLA-A2 Liganden wurden zunächst 10 Peptide, die bei der Epitopvorhersage am besten bewertet worden waren, synthetisch hergestellt und anschließend in einem MHC-Stabilisierungssassay mit der TAP-defizienten Zelllinie 174 x CEM T2 (T2) auf exogene HLA-A2-Bindung untersucht. Bei dieser Analyse gingen die Peptide LMO4-IADRFLLYA, LMO4-MILCRNDYI und LMO4-RAQGNVYHL als Liganden mit höchster HLA-A2-Affinität hervor. Da dieses Experiment keine Aussage über die intrazelluläre Prozessierung des getesteten Liganden erlaubt, wird gegenwärtig in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Rammensee (Eberhard-Karls-Universität Tübingen, D) die Proteasomschnittspezifität für insgesamt fünf der exogen am besten bindenden Liganden überprüft.

5.4 Identifizierung endogen präsentierter Liganden bei AML

Einige CML-Patienten zeigen zum Zeitpunkt der Diagnose bereits die klinischen Merkmale eines akuten Blastenschubes, was klinisch nicht immer einfach vom Krankheitsbild einer akuten myeloischen Leukämie zu unterscheiden ist. Erst der Nachweis der BCR-ABL-Translokation kann bei solchen Patienten klären, ob es sich um die blastische Transformation einer CML handelt oder ob eine *de-novo* akute Leukämie vorliegt. Wir hatten daher die Möglichkeit, Leukaphereseprodukte zu untersuchen, die zum therapeutischen Zweck bei einigen Patienten mit extrem erhöhten Leukozytenzahlen durchgeführt worden waren, wobei die Differentialdiagnose CML versus AML zum Zeitpunkt der Leukapherese noch offen war. In einem solchen Fall lies sich später anhand der zytogenetischen Diagnostik ausschließen, dass es sich um eine CML-Transformation handelte; es lag vielmehr eine akute myeloische Leukämie (AML) vor. Um zu überprüfen, inwiefern sich das Peptidspektrum einer AML mit dem einer CML unterscheidet und ob eine Präsentation leukämiespezifischer Liganden auf AML-Zellen stattfindet, entschlossen wir uns dennoch, eine Analyse des endogen präsentierten Peptidpools vorzunehmen. Wie zu erwarten, wurden einige Liganden identifiziert, die mit den auf CML- und auch auf Milzzellen endogen präsentierten Peptiden übereinstimmten. Von besonderem Interesse war ein Peptid, das

ausschließlich auf AML-Zellen nachgewiesen wurde. Dieser Ligand, das Peptid DYSSILQKF, wurde auf das Protein FBP17 zurückgeführt, welches - analog zu den bei CML diskutierten Genen AF4 und Eps15 - einen potentiellen Fusionspartner des MLL-Gens darstellt. Wie ABL ist FBP17 auf Chromosom 9, Bande q34 lokalisiert, der Region, die insbesondere bei AML am stärksten von Deletionen oder Chromosomentranslokationen betroffen ist (195). FBP17 könnte daher möglicherweise im Kontext der akuten myeloischen Leukämie ein Kandidat für eine Vakzinierung sein.

Generell muß berücksichtigt werden, dass für AML-Patienten aufgrund des rasch fortschreitenden Krankheitsbildes eine Peptid-Vakzinierung nur im Rahmen einer post-Chemotherapie-Intervention zur Stabilisierung des Krankheitsbildes und möglicherweise zur Eradikation von *minimal residual disease* in Frage kommt, d. h. zur Zerstörung einzelner, im Körper des Patienten trotz der intensiven Chemotherapie persistierenden Leukämiezellen, welche Ausgangspunkt für ein Rezidiv der Erkrankung sein können.