

1 Einleitung

1.1 Krebs

Der Begriff Krebs umfaßt eine Vielzahl verwandter Krankheiten, bei denen Körperzellen unkontrolliert wachsen, sich teilen und gesundes Gewebe verdrängen und zerstören können.

Durch diese unkontrolliert wachsenden Zellen wird dann ein Tumor gebildet. Tumore können sowohl benigne als auch maligne sein. Benigne Tumore zeichnen sich durch ein lokal begrenztes Wachstum aus. Zellen maligner Tumore hingegen sind in der Lage, sich aus dem Zellverband des Tumors zu lösen und durch den Blutstrom oder das lymphatische System in andere Teile des Körpers zu gelangen und dort Metastasen zu bilden. In diesem Phänomen liegt die tödliche Potenz des Krebses begründet, da etwa 90% der Patienten nicht an dem Primärtumor, sondern an dessen Metastasen und sekundären Effekten, wie Organversagen sterben.

Soweit bekannt kann Krebsentstehung verschiedenste Ursachen haben, wie z.B. genetische Prädisposition, Zelltransformation durch virale Infektionen, Mutagenese durch Strahlung und Chemikalien sowie Tumorpromotoren.

Krebs kann nahezu jedes Gewebe des Körpers betreffen und verursacht das Sterben von etwa 7,6 Millionen Menschen jährlich, dies entspricht 13 % der Todesfälle weltweit (WHO, Stand 2005).

1.1.1 Das maligne Melanom

Das maligne Melanom ist eine sehr ernste Form des Hautkrebses. Es geht aus den Pigmentbildenden Zellen der Haut, den Melanozyten hervor. Entsteht das Melanom in der Haut wird es als kutanes Melanom bezeichnet, es kann aber auch in seltenen Fällen in anderen Bereichen des Körpers, wie den Hirnhäuten, der Aderhaut und den Schleimhäuten entstehen. Die Gefährlichkeit des Melanoms liegt in seinem hohen Metastasierungspotential. Am häufigsten sind Metastasen in den Lymphknoten, der Leber, der Lunge, der Haut und im Gehirn (Erbar, 2000). Dies erklärt daß, obwohl nur etwa 4% der Hauttumoren Melanome sind, das Melanom die meisten hautkrebsabhängigen Todesfälle verursacht.

Oftmals entwickelt sich ein Melanom aus bereits bestehenden Muttermalen, welche sich im Aussehen verändern. Die Ursachen der Melanomenstehung sind nicht bekannt, allerdings gelten eine bereits vorhandene große Zahl an Muttermalen und dysplastischen Nävi (abnormale Muttermale), helle Haut, schwere Sonnenbrände, vor allem in der Kindheit, familiäre Vorbelastung, ein geschwächtes Immunsystem und UV- Bestrahlung als Faktoren, die

förderlich für eine Melanomentstehung sind. Es gibt vier Grundtypen des malignen Melanoms, die sich in der Häufigkeit des Auftretens, Verlauf und Invasivität unterscheiden: das superfiziell spreitende Melanom (SSM), das noduläre Melanom (NM), das Lentigo-maligna Melanom (LMM) und das akrolentiginöse Melanom (ALM).

Die Invasionstiefe des Melanoms in die Gewebeschichten der Haut wird nach Clark in fünf verschiedene Stadien (Clark level) eingeteilt. Bei Level I befindet sich die infiltrierenden Tumorzellen nur innerhalb der Epidermis, bei Level V ist die Infiltration bis in die Subkutis vorgedrungen (Erbar, 2000).

1.1.2 Krebs und Polyomaviren

Im Zusammenhang mit Tumorentstehung werden unter anderem auch Virusinfektionen diskutiert. So trägt beispielsweise das humane Papillomavirus zur Entstehung des Zervixkarzinoms bei (zur Hausen, 2000).

Die Beteiligung von Polyomaviren wie BKV, JCV und *simian virus* (SV) 40 an der Entstehung verschiedener Tumore wird allerdings kontrovers diskutiert.

Polyomaviren gehören zur Gattung der nicht behüllten DNA-Viren. Sie besitzen ein icosahedrales Capsid, welches ein doppelsträngiges DNA-Genom enthält.

Die Infektion der Zellen durch ein Polyomavirus erfolgt über Bindung des Virions an einen Rezeptor auf der Zellmembran. Für SV40 wurden die MHC-Klasse-I-Moleküle als Rezeptoren identifiziert (Norkin, 1999). Da MHC-Klasse-I-Moleküle auf nahezu jeder Zelle exprimiert werden, wird angenommen, daß SV40 nahezu jeden Zelltyp infizieren kann. Für BKV und JCV ist der Infektionsmechanismus noch nicht aufgeklärt. Für JCV wird vermutet, daß die Infektion über Bindung an Oligosaccharide erfolgt (Wei *et al.*, 2000).

Das Genom der Polyomaviren kodiert nicht für Replikationsproteine, so daß eine Virusreplikation nur möglich ist, wenn sich die infizierte Zelle in der S-Phase des Zellzyklus befindet und die zelleigenen Replikationsproteine verwendet werden können. Ein Weg wie das Virus in der Lage ist, die Zelle in die S-Phase zu treiben ist die Aktivierung zweier Onkoproteine, dem kleinen Tumorantigen (small T-Antigen, tag) und dem großen Tumorantigen (large T -Antigen, Tag) (Simmons, 2000; Rundell and Parakati, 2001).

Tumorgenese durch Tag findet durch die Inaktivierung zentraler Proteine des Zellzykluses, dem Tumorsuppressor p53 und der pRb Proteinfamilie (Pipas and Levine, 2001; Saenz-Robles *et al.*, 2001) statt. tag hingegen bindet an die Serin-Threonin Proteinphosphatase PP2A, durch die Bindung wird diese inhibiert, was zu einer konstitutiven Aktivierung des Wnt-Signalweges (Cadigan and Nusse, 1997), fehlender Inaktivierung von β -Catenin und somit zu einer

dauerhaften Stimulation der Zellproliferation führt (Ikeda *et al.*, 2000). Hierdurch kann es zu einer onkogenen Transformation der Wirtszelle kommen.

JCV ist weitverbreitet in der Bevölkerung, in etwa 80% der Erwachsenen findet man Antikörper. Die Infektion findet meist in früher Kindheit statt und verläuft subklinisch.

Unter immunsupprimierenden Bedingungen, wie z.B. AIDS kann die latente Virusinfektion allerdings progressive multifokale Leukoencephalopathie auslösen (Berger, 2003; Safak and Khalili, 2003). JCV DNA-Sequenzen wurden in unterschiedlichen Tumoren des Zentralen Nervensystems, wie z.B. Medulloblastomen, aber auch in Kolonkarzinomproben identifiziert (Del Valle *et al.*, 2001).

Auch für BKV findet man mit etwa 63% seropositiver Individuen eine weite Verbreitung in der Bevölkerung. Wie bei JCV findet die Infektion in früher Kindheit statt und unter immunsupprimierenden Bedingungen kann es zu Krankheiten wie Nephritis und hämorrhagischer und nicht hämorrhagischer Zystitis kommen. BKV findet sich sowohl in benignen als auch malignen Oligodendrogliomen, Meningiomen und Schwannomen (Corallini, 2001).

Aber auch SV40, ein Virus welches hauptsächlich in Rhesusaffen und Grünen Meerkatzen vorkommt und möglicherweise zwischen 1955 und 1963 durch kontaminierte, in Affennierenzellen hergestellte Poliovakzine auf den Menschen übertragen wurde (Carbone *et al.*, 1997), wird im Zusammenhang mit Tumorentstehung diskutiert. Es gibt allerdings auch zahlreiche Berichte, die diesen Beobachtungen widersprechen. So kamen beispielsweise zwei Multizenterstudien zu jeweilig unterschiedlichen Ergebnissen im Hinblick auf die Expression von SV40 in Mesotheliomen (Testa *et al.*, 1998; Strickler, 2001). Andere Untersuchungen deuten jedoch auf eine Assoziation von SV40 mit einer Vielzahl humaner Tumore wie Mesotheliomen und Non-Hodgkin Lymphomen hin, so daß die Diskussion um die Beteiligung von SV40 an maligner Transformation weiterhin kontrovers bleibt.

Nachdem das Vorhandensein von Polyomaviren in unterschiedlichen Tumoren nachgewiesen wurde, ist möglicherweise wichtiger als die Frage, ob diese Viren die Tumore auslösen, die Frage ob die viralen Onkogene Tag und tag, die tumorassoziierte Antigene darstellen, als Ziele für therapeutische Eingriffe, wie Immuntherapie genutzt werden können.

1.2 Das Immunsystem

Das humane Immunsystem ist eine komplexe Maschinerie aus Zellen und Molekülen, die die Aufgabe hat, den Körper vor Infektionen und Krankheiten zu schützen. Man unterscheidet zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem. Das angeborene Immunsystem

ist in der Lage, Krankheitserreger zu bekämpfen, ohne daß der Körper bereits vorher Kontakt mit diesen Erregern hatte. Die Funktionsweise des angeborenen Immunsystems ist bis auf die Fremderkennung als unspezifisch anzusehen, sie beruht auf der Erkennung bestimmter Strukturmerkmale der Infektionserreger. Die Effektoren des angeborenen Immunsystems sind auf der zellulären Seite Granulozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen, Epithelzellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen), desweiteren sind Zytokine und das Komplementsystem, bestehend aus Plasmaproteinen und lytischen Enzymen, an der angeborenen Immunität beteiligt.

Das adaptive Immunsystem hingegen ist hochspezifisch, bedarf allerdings einer Anpassung an den Erreger. Hierzu sind Wechselwirkungen zwischen Zellen des angeborenen Immunsystems (dendritische Zellen und Makrophagen) und den Effektorzellen des adaptiven Immunsystems nötig. Die Effektorzellen des adaptiven Immunsystems sind die Lymphozyten, wobei zwischen B- und T-Lymphozyten unterschieden wird. Die B-Zellen sind in der Lage, Antigen-spezifische Antikörper zu bilden und zu sezernieren. Bei den T-Zellen unterscheidet man zwischen zwei Hauptgruppen, den $CD4^+$ T-Helferzellen und den $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen. Während $CD4^+$ T-Zellen mit den B-Zellen und $CD8^+$ T-Zellen interagieren und deren Funktionen über die Ausschüttung von Zytokinen beeinflussen, sind die $CD8^+$ T-Zellen die Haupteffektoren des adaptiven Immunsystems. Sie sind in der Lage z.B. virusinfizierte Zellen über an der Oberfläche präsentierte Peptide direkt zu erkennen und zu lysieren. Desweiteren spielen tumorspezifische $CD8^+$ T-Zellen die zentrale Rolle bei der Immunität gegen Tumore.

1.2.1 Der T-Zellrezeptor und seine Diversität

T-Zellen erkennen ihr Antigen mit Hilfe ihres T-Zellrezeptors (TCR). Der TCR ist ein heterodimerer Rezeptor, welcher bei einem Großteil der T-Zellen aus einer α - und einer β -Kette besteht. Der extrazelluläre Teil jeder Kette des $\alpha\beta$ -TCRs besteht aus zwei Domänen, die Homologie zu den variablen bzw. konstanten Domänen der Immunglobuline aufweisen. Beide Ketten sind glykosyliert und über eine Disulfidbrücke verbunden. Sowohl die α -, als auch die β -Kette durchdringt die Lipiddoppelschicht mit einer hydrophoben Transmembrandomäne, welche positiv geladene basische Aminosäurereste enthält (Campbell *et al.*, 1994). Die α -Kette besitzt zwei solcher Reste, die β -Kette einen. Diese positiven Reste spielen eine wichtige Rolle bei der Assoziation mit einem nicht-polymorphen membrangebundenen Proteinkomplex, dem sogenannten CD3 Komplex (Abb. 1). Dieser ist, da die beiden TCR-Ketten nur kurze cytoplasmatische Domänen besitzen, für die Signaltransduktion in die Zelle verantwortlich. In den cytoplasmatischen Domänen der CD3-Proteine befinden sich sogenannte ITAMs (engl.:

bezeichnet. Die CDR3 Loops hingegen können, da hier der Einbau der N-Nukleotide erfolgt, vielfältig variieren und sind hauptverantwortlich für die Spezifität des TCR.

T-Zellen erkennen ihr Antigen als einen Komplex bestehend aus dem sogenannten humanen Leukozytenantigen (HLA) und dem daran gebundenen antigenen Peptid. Bei der Antigenerkennung binden die CDR1 und 2 Regionen des TCR an die helikalen Reste des HLA, während die somatisch rekombinierte CDR3 Region hauptsächlich mit dem gebundenen Peptid interagiert. Die Spezifität des TCR muß sich nicht auf ein definiertes Peptid beschränken, Kreuzerkennung von Peptiden mit verschiedenen Sequenzen gehören zu den generellen Eigenschaften der T-Zell-Antigenerkennung (Sparbier and Walden, 1999; Wucherpfennig, 2004). So wurde beschrieben, daß ein einzelner TCR bis zu 10^6 HLA-Peptid-Komplexe erkennen kann (Udaka *et al.*, 1995a; Mason *et al.*, 1998). Hierbei müssen nicht alle Komplexe die gleiche T-Zellreaktion auslösen, so kann sich die Bandbreite der T-Zellaktivierung, hierzu gehören Proliferation, Zytokinsekretion und Zytotoxizität, deutlich unterscheiden (Vidal *et al.*, 1996; Kessler *et al.*, 1998).

T-Lymphozyten durchlaufen während ihrer Entwicklung im Thymus verschiedene Differenzierungsstadien. Hierbei werden sie phänotypisch und funktionell selektioniert.

Diese Selektion soll sicher stellen, daß die T-Zellen mit selbst-HLA-Molekülen interagieren und zwischen Selbst- und Fremd-Antigen unterscheiden können (Sebzda *et al.*, 1999). T-Zellen, die nicht in der Lage sind, selbst-HLA Moleküle zu erkennen sterben durch *death by neglect* (Surh and Sprent, 1994). Die Selektionsvorgänge im Thymus sind abhängig von der Affinität mit welcher die T-Zellen die HLA-Peptid-Komplexe erkennen, so konnte gezeigt werden, daß T-Zellen, die diese Komplexe mit niedriger Affinität erkennen positiv selektioniert werden, wohingegen Erkennung mit hoher Affinität zu negativer Selektion führen (Alam *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 1999).

Da in der Peripherie allerdings auch autoreaktive T-Zellen gefunden werden, sind wohl einige T-Zellen in der Lage, diesen Selektionsprozessen zu entgehen. Es wird angenommen, daß die Antigene, für die diese Zellen spezifisch sind, im Thymus in zu geringer Konzentration exprimiert werden und daß diese Selbst-spezifischen T-Zellen schwache Affinität für ihr Antigen aufweisen (De Visser *et al.*, 2003).

1.2.2 Effektormechanismen zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen

Die Aktivierung naiver T-Zellen bedarf einer Stimulation über den TCR, sowie co-stimulatorischer Signale. Nur professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APC) wie Dendritische Zellen, B-Zellen und Makrophagen exprimieren sowohl HLA-, als auch co-

stimulatorische Moleküle. Durch die Interaktion mit diesen Molekülen werden naive T-Zellen zur klonalen Expansion und Differenzierung zur Effektor-T-Zelle angeregt. Um diese Reaktion deutlich von den Antworten bereits aktivierter Effektor-T-Zellen gegenüber ihrem Antigen abzuheben wird diese erste Aktivierung und Expansion naiver T-Zellen auch als *priming* bezeichnet. Die am besten charakterisierten costimulatorischen Moleküle sind B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), sie werden nur auf der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen nachgewiesen. Der Rezeptor für die B7-Moleküle auf der T-Zelle ist CD28 (Gonzalo *et al.*, 2001). Die Interaktion des costimulatorischen Moleküls B7 mit CD28 führt zur Aktivierung der T-Zellen und zur Expression von CTLA-4 auf den klonal expandierten Zellen. CTLA-4 bindet ebenfalls an B7, führt aber dazu daß die Proliferation und auch die Produktion von proliferationsfördernden Zytokinen wie IL-2 reduziert wird.

Nach dem *priming* der T-Zellen, nach etwa 4-5 Tagen intensiver Proliferation, sind diese zu funktionellen Effektorzellen gereift, welche für ihre weitere Funktion keines Costimulus mehr bedürfen und in der Lage sind, alle Effektormoleküle, die sie für ihre Funktion als zytotoxische T-Zellen brauchen zu synthetisieren.

Die Effektormoleküle, die von zytotoxischen T-Zellen synthetisiert werden, lassen sich in zwei Klassen einteilen, zum einen Zytotoxine, hierzu gehören Perforin, Granzyme und auch der membranständige FAS-Ligand, zum anderen Zytokine (Squier and Cohen, 1994). Ein Zytokin, welches von CD8⁺ T-Zellen nach Aktivierung gebildet und ausgeschüttet wird, ist IFN- γ . Daher kann IFN- γ in T-Zellassays, wie dem in dieser Arbeit verwendeten ELISpot, als Indikator für T-Zellaktivierung und spezifische Antigenerkennung dienen.

Die Zytotoxine Perforin und Granzym werden in speziellen, sogenannten lytischen Granula der CD8⁺ T-Zelle bis zu ihrem Einsatz gespeichert. Die Freisetzung dieser Zytotoxine erfolgt nach spezifischer Antigenerkennung auf der Zielzelle. Hierzu werden die lytischen Granula innerhalb der T-Zelle fokussiert zur Stelle des Zell-Zellkontaktes transportiert, da einmal freigesetzt, diese Moleküle nicht spezifisch wirken. Das freigesetzte Perforin kann polymerisieren und transmembrane Poren in der Zielzelle bilden, wodurch deren Ionenhaushalt aus dem Gleichgewicht gerät. Durch diese Poren wird es außerdem den gleichzeitig freigesetzten Granzymen ermöglicht, in die Zielzelle einzudringen und dort über ihre Proteasefunktion zum induzierten Zelltod der Zielzelle zu führen. Doch nicht nur durch Bildung dieser Poren wird es den Granzymen ermöglicht in die Zielzelle einzudringen, auch andere Mechanismen wie Mannose-6-Phosphat-Rezeptor vermittelte oder *fluid phase* Endozytose werden für die Aufnahme der Granulainhalte in die Zielzelle diskutiert. Allerdings

wird auch bei diesen Mechanismen das Perforin benötigt, um die Granzyme aus den Endosomen freizusetzen (Waterhouse *et al.*, 2004).

Ein anderer Mechanismus über welchen zytotoxische T-Zellzellen zur Apoptose ihrer Zielzellen führen können, ist die Interaktion von FAS-Ligand mit seinem Rezeptor auf der Zielzelle. Diese Interaktion löst die Bildung eines *death inducing signaling complex (DISC)* aus, hierdurch werden Caspasen aktiviert, was zum programmierten Zelltod der Zielzelle führt (Kischkel *et al.*, 1995).

1.2.3 Der Haupthistokompatibilitätskomplex

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: *Major Histocompatibility Complex*, MHC) ist ein beim Menschen auf dem kurzen Arm des Chromosom 6 lokalisierter Genkomplex, welcher mehr als 200 Gene beinhaltet. Die hier codierten Proteinen werden beim Menschen als humane Leukozytenantigene (HLA) bezeichnet. Die Aufgabe dieser membranständigen Glykoproteine ist es, Peptide aus degradierten Proteinen aus dem Zytosol oder aus dem extrazellulären Raum für die Erkennung durch T-Zellen zugänglich zu machen, zusätzlich haben sie Adapterfunktion für CD4- und CD8-Moleküle.

HLA-Moleküle lassen sich je nach Struktur und Funktion in HLA Klasse I- und Klasse II unterteilen. HLA-Klasse I Moleküle bestehen aus zwei unabhängigen Polypeptidketten, der schweren, im HLA-Lokus kodierten α -Kette und der nicht-kovalent assoziierten leichten Kette, dem β_2 -Mikroglobulin. Das komplette Molekül besteht aus vier extrazellulären Domänen von denen drei (α_1 , α_2 und α_3) von der α -Kette und eine vom β_2 -Mikroglobulin gebildet wird.

HLA-Klasse II Moleküle sind Heterodimere, bestehend aus einer α - und einer β -Kette, die nicht-kovalent assoziiert sind. Beide Ketten besitzen je zwei extrazelluläre Domänen (α_1 und α_2 , bzw. β_1 und β_2), eine Transmembran- und eine zytosolische Domäne. Es gibt drei Hauptklassen von α -Ketten-Genen für HLA-Klasse I, HLA-A, -B und -C, sowie drei Hauptpaare von HLA-Klasse II α - und β -Ketten, HLA-DR, -DP und -DQ.

Die beiden Molekülklassen unterscheiden sich in ihrer Struktur und ihrer Verteilung auf den Zellen. Die Gene der HLAs sind hoch polymorph mit bislang 429 beschriebenen Allelen für HLA-A, 748 Allelen für HLA-B und 217 Allelen für HLA-C. Für HLA-DR sind bislang 514 Allele bekannt, für HLA-DQ 101 und für HLA-DP 144 Allele. (www.anthonynolan.com/HIG). $CD4^+$ T-Zellen erkennen ihr Antigen im Kontext von HLA-Klasse II, $CD8^+$ T-Zellen im Kontext von HLA Klasse I Molekülen.

1.2.4 Peptidbindungseigenschaften von HLA-Molekülen

HLA-Moleküle binden Peptide in einer Bindungsgrube, die im Fall von HLA Klasse I an den Enden geschlossen, im Fall von HLA Klasse II an den Enden offen ist. Durch diese Unterschiede kommt es dazu, daß in den beiden HLA-Klassen Peptide verschiedener Länge binden. Die Bindung erfolgt über die N-terminalen Domänen der schweren Ketten des HLA-Moleküls, d.h. über die α_1 - und α_2 -Domäne im Fall von HLA-Klasse I und über die α_1 und β_1 -Domäne im Fall von HLA-Klasse II. Die von HLA-Klasse I Molekülen gebundenen Peptide haben in der Regel eine Länge von 8-10 Aminosäuren (York *et al.*, 1999; Rock *et al.*, 2002). An der Bindung eines Peptides an einen HLA, die nicht-kovalent erfolgt, sind eine große Anzahl an Wasserstoffbrücken, ionische Wechselwirkungen und hydrophobe Interaktionen beteiligt (Fremont *et al.*, 1992). Die Bindung entsteht hauptsächlich über starke Wechselwirkungen des Peptidrückgrats mit dem HLA und ein Netzwerk aus Wasserstoffbrücken an den beiden Enden der Bindungsgrube. Die über ionische Wechselwirkungen vermittelte Bindung des Peptides sowohl am Amino-, als auch am Carboxiterminus spielt energetisch die wichtigste Rolle, außerdem wird hierüber die Orientierung des Peptides in der Bindungsgrube festgelegt (Bouvier and Wiley, 1994). Innerhalb der Bindungsgrube befinden sich noch verschiedene Taschen, die je nach HLA-Allel unterschiedliche chemische Eigenschaften und verschiedene Tiefen bzw. Größen besitzen, wodurch allotyp-spezifische Wechselwirkungen mit den Seitenketten der Aminosäuren des gebundenen Peptids ermöglicht werden. Hieraus ergibt sich, daß je nach HLA-Allel unterschiedliche Aminosäuren in diese Taschen und somit unterschiedliche Peptide binden können. Auch die Lage dieser Taschen in den Bindungsgruben der einzelnen HLA-Allele kann sich unterscheiden. Diese Taschen werden auch als Ankerpositionen bezeichnet, wobei zwischen Haupt- und Nebenankern, je nach Beitrag zur Bindung des Peptides, unterschieden wird. Auf Seiten des Peptides spricht man dementsprechend von Ankeramino-säuren. Hauptankeramino-säuren finden sich bei Nonapeptiden meist nahe des Amino- und am Carboxiterminus. Je nach HLA-Allel werden Hauptankeramino-säuren an Position 2 und 9 (Abb.2), 3 und 9; 3, 5 und 9 oder auch nur an Position 9 in der Peptidsequenz bevorzugt. An anderen Positionen im Peptid finden sich noch sogenannte Neben- oder Hilfsanker, die für eine zusätzliche Stabilisierung des Peptides im HLA sorgen, aber nicht so viel zur Bindung beitragen wie die Hauptankeramino-säuren (Matsumura *et al.*, 1992). Auch eingelagerte Wassermoleküle spielen eine Rolle bei der Bindung eines Peptides an das HLA, hierdurch können Lücken zwischen Peptid und HLA gefüllt und Wasserstoffbrücken zwischen Peptid und hydrophilen Resten am HLA gebildet werden (Petroni and Garcia, 2004).

An Hand der Kristallstruktur von HLA-A2 mit Peptid gp100₂₀₉ ist die Verankerung eines Peptides im HLA verdeutlicht (Abb. 2).

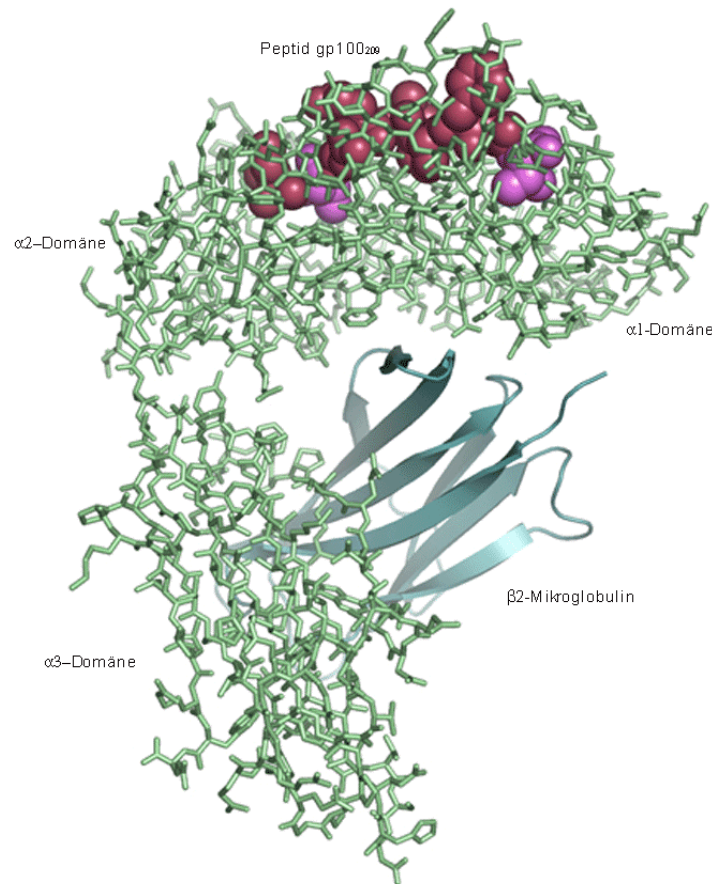


Abbildung 2: Kristallstruktur der Bindung des Peptides gp100₂₀₉ an HLA-A2.

Die Verankerung der Aminosäuren an Position 2 und 9 des Peptides in die Bindungstaschen des HLA ist deutlich zu erkennen (violett hervorgehoben). Mit PyMOL verändert nach O.Y. Borbulevych and B.M. Baker.

Durch Poolsequenzierung von Peptiden die von HLA-Molekülen eluiert wurden, wurde festgestellt, daß von gleichen HLA-Allelen eluierte Peptide, chemisch verwandte Aminosäuren in bestimmten Positionen ihrer Sequenz besitzen. Diese Entdeckung ermöglichte es, für viele HLA-Allele ein bestimmtes Peptidmotiv zu definieren (Falk *et al.*, 1991). Hierzu wurden die HLA-Moleküle mit Detergenz von der Zelloberfläche entfernt und immunopräzipitiert, die Peptide wurden aus den HLA extrahiert und mittels Reversphasen-HPLC (engl.: *high performance liquid chromatographie*) aufgetrennt. Die hierbei erhaltenen Fraktionen wurden vereinigt und als komplexes Gemisch mittels Edmandegradierung sequenziert (Falk *et al.*, 1991). Hierbei wurde unter anderem gezeigt, daß sich für das HLA-Allel A*0201 dominante Aminosäuren an Position 2 und 9 des gebundenen Peptides befinden, wobei sich für Position 2 ein dominantes Signal für Leucin und ein intermediäres für Methionin findet und an Position 9

ein dominantes Signal für Valin und Leucin gefunden wird. Daraus wurde der Rückschluß gezogen, daß es sich bei den Aminosäuren in diesen Positionen um Hauptankeraminosäuren handelt. Ein Nachteil der Methode der Poolsequenzierung ist allerdings, daß hierbei nicht die Gesamtsequenz des jeweiligen Peptids dargestellt werden kann, sondern sich nur die Häufigkeiten bestimmter Aminosäuren an bestimmten Positionen im Peptid widerspiegeln. Deshalb werden auch HLA-gebundene Peptide identifiziert, die nicht in die Motive passen (Bredenbeck *et al.*, 2005). Trotzdem sind diese Motive allgemein anerkannt und liefern die Grundlage für die Entwicklung von Vorhersagealgorithmen für Peptidbindung und T-Zellepitope (siehe Abschnitt 1.4).

Das Motiv von an HLA-A2 bindenden Peptiden ist hier beispielhaft dargestellt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Sequenzmotiv für HLA-A*0201 bindende Peptide (nach SYFPEITHI)

Position im Nonamer	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Hauptanker- und	-	L	-	-	-	<u>V</u>	-	-	V
Hilfsankeraminosäuren	-	M	-	-	-	-	-	-	L
Bevorzugte AS	-	-	-	E	-	-	-	K	-
	-	-	-	K	-	-	-	-	-

Manche Allele besitzen ähnliche Bindungsmotive, sie werden daher zu sogenannten Supertypen zusammengefaßt und ihnen kann damit auch ein Supermotiv für die bindenden Peptide zugeordnet werden. Zum HLA-A2-Supertyp gehören die Allele HLA-A*0201, *0202, *0203, *0206 und *6802, zum A3-Supertyp die Allele HLA-A*0301, *1101, *3101, *3301 und *6801, zum B7-Supertyp lassen sich die Allele HLA-B*0702, *3501, *5101, *5301 und *5401 zusammenfassen (del Guercio *et al.*, 1995; Sidney *et al.*, 1996a; Sidney *et al.*, 1996b).

An zum HLA-A3 Supertyp gehörende Allele binden beispielsweise bevorzugt Peptide, die ein Lysin, eine andere basische Aminosäure oder eine aromatische Aminosäure am C-Terminus besitzen (DiBrino *et al.*, 1993; Kubo *et al.*, 1994). Weitere in dieser Arbeit erwähnten Bindungsmotive sind in Anhang I dargestellt.

Die von HLA-Klasse II gebundenen Peptide sind mindestens 11 Aminosäuren lang, können aber auch weit länger sein und werden nicht an N- und C-Terminus im HLA verankert. Die Bindungstaschen von HLA-Klasse II Molekülen stellen nicht so definierte Anforderungen an die bindenden Peptide wie im Fall von Klasse I, was es schwieriger macht, für Klasse II Ankerpositionen zu identifizieren. Durch den Vergleich von bekanntermaßen bindenden Peptiden ist es aber auch hier meist möglich, bestimmte Muster an erlaubten Aminosäuren an

bestimmten Positionen für verschiedene HLA-Klasse II Moleküle zu definieren (Rudensky *et al.*, 1991; Rammensee, 1995).

1.2.5 Antigenprozessierung durch das Proteasom und Aminopeptidasen

Die Generierung von Peptiden aus intrazellulären Proteinen, welche dann an der Zelloberfläche über HLA-Klasse I Moleküle präsentiert werden können, ist ein essentieller Teil der Immunüberwachung. Diese Komplexe aus HLA mit gebundenem Peptid werden durch den T-Zellrezeptor von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen erkannt, wodurch eine Unterscheidung zwischen intrazellulären Selbstantigenen und zellulären Pathogen stattfinden kann.

Das proteolytische System der Zelle ist in der Lage, sehr unterschiedliche Peptide herzustellen, die dann von den verschiedenen HLA-Klasse I Allelen einer Zelle präsentiert werden können (Ortmann *et al.*, 1997).

Ein Großteil der zytosolischen Proteindegradierung findet über das Ubiquitin-Proteasomen-System und Aminopeptidasen statt. Vor der Degradierung durch das Proteasom werden die Proteine durch Ubiquitylierung markiert. Diese markierten Proteine werden dann selektiv durch das 26S Proteasom abgebaut.

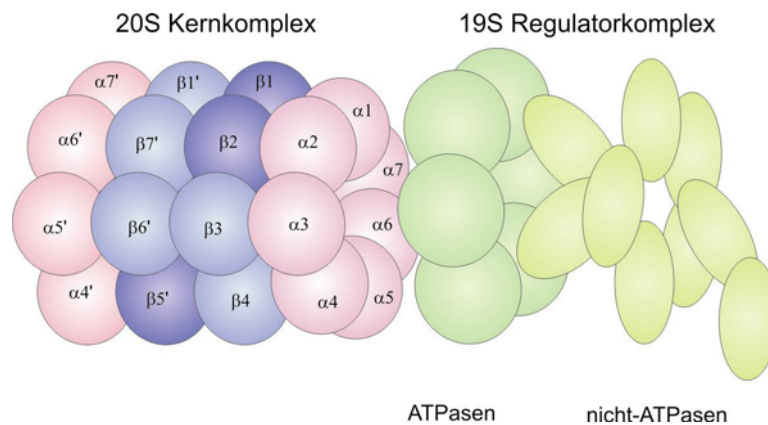


Abbildung 3: Schematische Darstellung des konstitutiven 26S Proteasoms.

Das 26S Proteasom besteht aus dem 20S Kernkomplex, welcher die proteolytisch aktiven Untereinheiten enthält und dem 19S Regulatorkomplex, dieser ist für die Bindung und Auseinanderfaltung der Substrate verantwortlich.

Der proteolytisch aktive Teil des Proteasoms wird durch die β_1 -, β_2 - und β_5 - Untereinheiten gebildet (Groll *et al.*, 1997; Groll *et al.*, 2000), welche sich in ihrer Aktivität unterscheiden. So gibt es die Chymotrysin-ähnliche Aktivität (Spaltung hinter hydrophoben Aminosäuren), die Trypsin-ähnliche Aktivität (Spaltung hinter basischen Aminosäuren) und die Caspase-ähnliche

Aktivität (Spaltung nach sauren Aminosäuren) (Orlowski *et al.*, 1993; Eleuteri *et al.*, 1997). Durch diese Präferenzen werden die C-Termini der HLA-bindenden Peptide meist bereits korrekt, d.h. ohne nachfolgende Modifikationen generiert (Eggers *et al.*, 1995; Sijts *et al.*, 2000). Der N-Terminus hingegen wird meist, aber nicht immer, erst durch Abspaltung von Aminosäuren durch Aminopeptidasen gebildet (Rock *et al.*, 2004). Hierzu gehören zytoplasmatische Aminopeptidasen wie die Tripeptidyl-Aminopeptidase II (TPPII), aber auch im Endoplasmatischen Retikulum (ER) angesiedelte Aminopeptidasen wie ERAP I (Geier *et al.*, 1999; Kloetzel, 2001; Serwold *et al.*, 2002; Seifert *et al.*, 2003).

Im Falle einer Immunreaktion wird durch Expression von IFN- γ durch T-Zellen die Synthese sogenannter Immuno-Untereinheiten des Proteasoms ausgelöst. Diese fakultativen Untereinheiten $\beta 1i$ (auch LMP2), $\beta 5i$ (auch LMP7) und $\beta 2i$ (auch MECL1) ersetzen jeweils ihr konstitutiv exprimiertes Pendant (Groettrup *et al.*, 1997; Griffin *et al.*, 1998). Es wird angenommen, daß durch die Expression von Immunoproteasomen die Bildung antigener Peptide und somit eine effektive Immunantwort verstärkt wird. Dies konnte bisher zumindest für einige virale Antigene gezeigt werden (Cerundolo *et al.*, 1995; Sibille *et al.*, 1995; Sijts *et al.*, 2000). Dagegen spricht allerdings, daß auch demonstriert werden konnte, daß manche Epitope, z.B. aus den tumorassoziierten Antigenen gp100 und Tyrosinase nicht durch das Immunoproteasom generiert werden (Chapiro *et al.*, 2006).

Nach Prozessierung im Zytosol gelangen die Peptide über den Transporter assoziiert mit Antigenprozessierung (TAP) in das ER. TAP transportiert bevorzugt Peptide von 7 bis 20 Aminosäuren Länge, das heißt es können sowohl reife Epitope, als auch Vorläufer durch TAP ins ER gelangen. Nach abgeschlossener Generierung der Epitope entweder bereits im Zytosol oder im ER binden diese an die HLA-Moleküle.

1.2.6 Peptidbeladung von HLA-Klasse I Molekülen

Die Bindung eines Peptides ist ein wichtiger Schritt bei der Zusammensetzung eines stabilen HLA-Moleküls. HLA-Klasse I Moleküle werden im Normalfall nur im mit Peptid beladenen Zustand an die Zelloberfläche gebracht. Die Faltung und Zusammensetzung eines kompletten HLA-Moleküls bedarf zuerst der Assoziation der HLA-Klasse I α -Kette mit β_2 Mikroglobulin, gefolgt von der Bindung des Peptides. An diesem Prozess sind verschiedene Chaperone beteiligt. Gelangt eine neu synthetisierte HLA-Klasse I α -Kette in das ER bindet sie an Calnexin, durch Bindung von β_2 -Mikroglobulin an die α -Kette dissoziiert dieses partiell gefaltete α : β_2 -Mikroglobulin Heterodimer vom Calnexin ab und bindet an einen Komplex aus drei Proteinen, Calretikulin, Tapasin und Erp57. Tapasin ermöglicht die Anlagerung an TAP

und stabilisiert zusammen mit den anderen Proteinen das Heterodimer bis zur Beladung mit Peptid. Das komplett gefaltete, mit Peptid beladene und somit stabilisierte HLA-Molekül wird über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert.

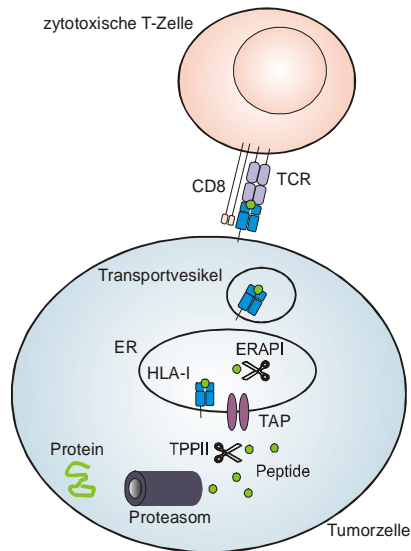


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Antigenprozessierung und Präsentation durch HLA-Klasse I Moleküle, sowie der Antigenerkennung durch $CD8^+$ T-Zellen.

Peptide werden nach Ubiquitinylierung durch das Proteasom in Peptide unterschiedlicher Länge degradiert, diese werden im Zytosol durch Aminopeptidasen wie TPPII weiter verkürzt und über TAP ins ER transportiert, wo weitere Degradierung und Bindung an den HLA erfolgt. Die beladenen HLA-Moleküle werden an die Zelloberfläche transportiert, wo sie von $CD8^+$ T-Zellen erkannt werden können

1.3 Tumorimmunologie

Als einer der ersten formulierte Paul Ehrlich die These, daß das Immunsystem an der Repression von Tumoren beteiligt sein kann (Ehrlich, 1909). Die daraus entwickelte, von Burnet und Thomas postulierte Theorie der Immunüberwachung geht davon aus, daß genetische Veränderungen im Rahmen der Entstehung eines malignen Tumors zur Expression von veränderten Proteinen und somit Peptiden führt, die dann vom Immunsystem, insbesondere von T-Zellen, als fremd erkannt werden können (Burnet, 1957; Thomas, 1959; Burnet, 1970). Der Nachweis solcher tumorspezifischer Antigene ist bislang nur sporadisch gelungen, eine Reihe von tumorassoziierten Antigenen wurde allerdings bereits identifiziert. Gegen derartige tumorassoziierte Antigene ist das Immunsystem in der Lage, sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunantwort zu entwickeln (Wang *et al.*, 2004; Filaci *et al.*, 2006; Watanabe *et al.*, 2006). So lassen sich bei Patienten zytotoxische T-Zellen und in selteneren Fällen auch Antikörper nachweisen, die *in vitro* gegen autologe Tumorzellen reagieren. Trotz dieser Fähigkeit scheint das Immunsystem in der klinischen Situation häufig zu versagen. Hierfür gibt es verschiedene Erklärungsversuche, wie z.B. die Suppression der Effektorzellen durch

regulatorische T-Zellen (Chen *et al.*, 2005) oder das Fehlen von kostimulatorischen Molekülen (Koyama *et al.*, 1998), die für die klonale Expansion der zytotoxischen T-Zellen nötig ist. Aber auch der Verlust oder das Fehlen der Expression von HLA-Klasse I Molekülen oder des Antigens durch die Tumorzellen (Garrido *et al.*, 1997), wodurch sie kein Ziel mehr für zytotoxische T-Zellen darstellen, ist eine Möglichkeit, wie der Tumor der Immunüberwachung entgehen kann.

1.3.1 Tumorantigene

Im Allgemeinen wird bei Tumorantigenen zwischen tumorassoziierten und tumorspezifischen Antigenen unterschieden. Desweiteren kann eine Klassifizierung nach folgenden Kategorien vorgenommen werden:

Differenzierungsantigene: Diese Antigene werden sowohl im Tumor, als auch im normalen Gewebe, aus welchem der Tumor entstanden ist exprimiert. Die meisten von ihnen wurden im Melanom und normalen Melanozyten identifiziert (Anichini *et al.*, 1993). Einige von ihnen, wie z.B. Tyrosinase und die *tyrosinase related* Proteine TRP-1 und -2, sind an der Melaninbiosynthese beteiligt. Es finden sich aber nicht nur Melanom-assoziierte Differenzierungsantigene, sondern z.B. auch das *prostate specific antigen* (PSA) und das embryonale *carcinoembryonic antigen* (CEA) zählen zu den Differenzierungsantigenen.

überexprimierte Antigene: Tumorassoziierte Antigene (TAA) können im Vergleich zu gesundem Gewebe im Tumor verändert exprimiert werden, d.h. normale und maligne Zellen des gleichen histologischen Ursprungs können quantitative Unterschiede in der Expression dieser Antigene zeigen. So gehören ubiquitär schwach exprimierte Proteine, die in Tumoren verschiedenen histologischen Ursprungs überexprimiert werden, zu den überexprimierten Antigenen. Es wird vermutet, daß der Grad ihrer normalen Expression unter der Grenze dessen liegt, was für eine Erkennung durch T-Zellen notwendig ist, ihre Überexpression im Tumor kann allerdings zu einer Immunreaktion führen (Novellino *et al.*, 2005). Zu Vertretern dieser Gruppe von TAA gehören Proteine wie Her2/neu, hTert, MUC1, p53, survivin und WT1.

virale Antigene: Auch onkovirale Proteine werden mit Krebsentstehung in Verbindung gebracht. So ist z.B. ein Zusammenhang zwischen dem humanen Papillomavirus und dem Cervixkarzinom beschrieben oder auch zwischen dem Epstein-Barr Virus (EBV) und Burkitt Lymphom. Auch die Beteiligung von Polyomaviren an der Krebsentstehung wird diskutiert (siehe Abschnitt 1.1.2).

cancer/testis Antigene: Diese Gruppe an Antigenen wird ausschließlich in Tumor- und Testisgewebe, in manchen Fällen auch in Placenta oder dem Trophoblast, exprimiert. Ihre

Expression in Testis- und Placentagewebe führt nicht zu einer Autoimmunreaktion, da dort keine HLA- Klasse I und II Moleküle exprimiert werden (Jassim *et al.*, 1989). Wegen ihrer ausschließlichen Expression in den genannten Geweben stellen sie besonders gute Ziele für eine Immuntherapie dar. Obwohl die cancer/testis Antigene zu den am besten charakterisierten TAA gehören, ist ihre Funktion bislang weitgehend unklar. Wichtige Vertreter dieser Gruppe von Antigenen sind die Mitglieder der MAGE-, BAGE und GAGE-Familie, sowie LAGE und NY-ESO.

Neoantigene: Die einzigen wirklich tumorspezifischen Antigene sind die Neoantigene.

Diese entstehen durch Mutationen von normalen Genen, so z.B. beschrieben für *cdk4* (Wolfel *et al.*, 1995). Ein Nachteil dieser Antigene ist, daß sie ausschließlich auf den Tumor und auf den Patient beschränkt bleiben, in dem sie identifiziert wurden.

1.3.2 Identifizierung von TAA und tumorassoziierten T-Zellepitopen (TATE)

Es ist mittlerweile allgemein akzeptiert, daß anti-Tumor-Vakzine möglichst viele verschiedene T-Zellepitope enthalten sollten, um das Risiko, daß der Tumor einer Immunantwort entgeht, zu minimieren und um so viele verschiedene Tumor-spezifische T-Zellen wie möglich zu aktivieren. Konsequenterweise wurde die Suche nach neuen TAA und TATE ausgeweitet.

Eine erfolgversprechende Methode zur Identifizierung ist die Analyse von cDNA Bibliotheken, welche aus Tumorgewebe gewonnen werden. Diese Bibliotheken werden anschließend in Zielzellen mit definierter HLA-Expression transfiziert, mittels tumorspezifischer T-Zelllinien können dann Tumorantigen-kodierende Gene identifiziert werden. Diese Methode hat den Vorteil, daß wenig Tumormaterial benötigt wird, allerdings sind einige Selektionsschritte notwendig um letztendlich das Tumorantigen zu identifizieren. So wurde auch *MAGE-A1*, das erste Gen, welches für ein humanes Tumorantigen kodiert, das von T-Zellen erkannt werden kann, kloniert (van der Bruggen *et al.*, 1991).

Desweiteren finden biochemische Methoden Anwendung, hierbei werden vom Tumor exprimierte Peptide aus den HLA-Molekülen der Tumorzellen eluiert und mit Hilfe von Chromatographie und Massenspektrometrie analysiert (Castelli *et al.*, 1995; Flad *et al.*, 1998). Bei dieser Methode ist im Nachhinein keine Verifizierung der natürlichen Prozessierung der Peptide notwendig und auch der für die Präsentation in Frage kommende HLA ist eingeschränkt. Nachteil dieser Methode ist allerdings, daß hierbei große Mengen an Tumormaterial benötigt werden, die in der Regel nicht so leicht gewonnen werden können. Auch die Verwendung von DNA Microarrays, bei der Tumorgewebe mit Normalgewebe verglichen wird, hilft bei der Identifizierung neuer TAA (Polyak and Riggins, 2001). Weitere

Möglichkeiten bietet die SEREX-Technologie (engl.: *serologic analysis of recombinant cDNA expression libraries*), hier werden IgG Antikörperantworten im Serum von Patienten dazu genutzt, Antigene zu identifizieren (Krackhardt *et al.*, 2002; Theinert *et al.*, 2005). Hierbei handelt es sich allerdings hauptsächlich um Antigene der humoralen Immunität.

Auch randomisierte kombinatorische Peptidbibliotheken werden zur Analyse von T-Zellspezifitäten und zur Identifizierung von TATE eingesetzt (Linnemann *et al.*, 1998; Sherev *et al.*, 2003). Hiermit ist es möglich eine Vielzahl von Peptiden, die von einem T-Zellrezeptor erkannt werden kann, zu identifizieren und so Mimotope für natürliche Peptide zu designen.

Eine weit verbreitete Strategie zur Identifizierung von T-Zellepitopen ist die sogenannte "reverse Immunologie". Hierbei werden bioinformatische Algorithmen dazu genutzt, aus der Proteinsequenz eines TAA Peptide vorherzusagen, welche an ein bestimmtes HLA-Molekül binden und möglicherweise ein potentes T-Zellepitop darstellen können.

1.4 Bioinformatik

Ein Durchbruch bei der Identifizierung von T-Zellepitopen war die Entdeckung, daß Liganden bestimmter HLA-Moleküle chemisch verwandte Aminosäuren in bestimmten Positionen ihrer Sequenz besitzen, was es ermöglicht, für viele HLA-Allel ein bestimmtes Peptidmotiv zu definieren. Auf dieser Grundlage ist es möglich, Vorhersagen zu Peptidbindungseigenschaften zu entwickeln.

Ein Algorithmus, der sich diese Ergebnisse zunutze macht, ist der von Rammensee *et al.* entwickelte SYFPEITHI-Algorithmus (www.SYFPEITHI.de, (Rammensee *et al.*, 1999)). Dieser auf positionsspezifischen Bewertungsmatrizen (engl.: *position specific scoring matrices*, PSSM) basierende Algorithmus beruht auf Motiven, die mit Hilfe der Poolsequenzierungen natürlicher Liganden gewonnen wurden und auf Publikationen zu T-Zellepitopen und HLA-Liganden. Bei diesen Vorhersagen werden die Aminosäuren in den Ankerpositionen und den Hilfsankern, sowie andere häufige Aminosäuren besonders in Betracht gezogen. Der Wert einer Vorhersage eines Peptides wird anhand der folgenden Regeln berechnet: Einzelne Aminosäuren bekommen, abhängig davon, ob sie Anker-, Hilfsanker oder bevorzugt in bestimmten Positionen sind, unterschiedliche Bewertungen. Ideale Ankeramino-säuren werden mit 10 Punkten, Nebenanker mit 6-8 Punkten, Hilfsanker mit 4-6 Punkten und bevorzugte Aminosäuren mit 1-4 Punkten bewertet. Aminosäuren, von denen angenommen wird, daß sie einen negativen Effekt auf die Bindung haben könnten, bekommen Werte zwischen -1 und -3 zugeteilt. Aus der Summe der Werte der einzelnen Aminosäuren ergibt sich dann die Gesamtsumme für das Peptid. Da die meisten HLA-Allele zwei dominante Ankerpositionen

besitzen, wird bei diesem Algorithmus üblicherweise ein Wert von 20 Punkten (jeweils 10 für einen idealen Anker) als Schwellenwert für ein gut bindendes Epitop verwendet.

Ein weiterer, häufig für Epitopvorhersagen verwendeter Algorithmus ist der von Parker et al. entwickelte BIMAS-Algorithmus www.bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/ (Parker *et al.*, 1994)

Diesem Algorithmus liegen Untersuchungen zu Bindungseigenschaften verschiedener HLA-Moleküle, die mit Hilfe von synthetischen Peptiden aus antigenen Proteinen in Bindungsassays untersucht wurden, zugrunde (Ruppert *et al.*, 1993; Hammer *et al.*, 1994; Parker *et al.*, 1994).

BIMAS bewertet potentiell HLA-bindende Peptide anhand der vorhergesagten Halbwertszeit für die Dissoziation des HLA-Peptid-Komplexes. Hinter dieser Vorhersage steht die Annahme, daß jede Aminosäure unabhängig von der Gesamtpeptidsequenz zur Bindung an den HLA beiträgt. Die Bewertung der Peptide ist nicht sonderlich exakt. Dominante Ankeraminosäuren, die hauptverantwortlich für die Bindung an HLA sind bekommen einen Wert zugeordnet, der signifikant über 1 liegt. Bevorzugte Aminosäuren bekommen einen Wert über 1 und un favorisier te Aminosäuren einen Wert kleiner als 1. Neutrale Aminosäuren, von denen nicht bekannt ist, ob ihr Vorhandensein an einer bestimmten Position vorteilhaft ist, oder nicht bekommen einen Wert von genau 1 zugeordnet.

Weitere im Internet zugängliche Algorithmen sind von Flower zusammengefaßt (Flower, 2003).

Doch nicht nur HLA-Bindung, sondern auch die Antigenprozessierung durch das Proteasom wird mit Hilfe von Bioinformatik vorhergesagt. Einer der hierfür verwendeten Algorithmen ist PAPRoC (www.paproc.de, (Nussbaum *et al.*, 2001)). Diesem evolutionären Algorithmus liegen experimentelle *in vitro* Daten aus dem Verdau des Hefeproteins Enolase 1 durch aufgereinigte 20S Proteasomen der Hefe und des Menschen zugrunde (Nussbaum *et al.*, 1998; Kuttler *et al.*, 2000). Die hierbei gewonnenen Enolasefragmente wurden mit biochemischen Methoden identifiziert und führten zu einer „Schnittstellenkarte“ in der alle detektierten Schnittstellen verzeichnet sind. Dabei wurde beobachtet, daß eine bestimmte Sequenzumgebung zur eigentlichen Schnittstelle wichtig für die Spaltung durch das Proteasom ist, so daß der Algorithmus nicht nur die Schnittstelle selbst, sondern auch die Umgebung für die Vorhersage der Spaltungswahrscheinlichkeit in Betracht zieht.

Ein weitere Algorithmus, NetChop (www.cbs.dtu.dk/services/NetChop), entwickelt von Kesmir et al. ist ein artifizielles neuronales Netz, trainiert mit den Daten von 1260 bekannter HLA-Liganden, wobei in der Annahme, daß bei der Proteinspaltung durch das Proteasom bereits der korrekte C-Terminus generiert wird, nur die C-terminale Schnittstelle berücksichtigt

wurde (Kesmir *et al.*, 2002). Bei diesem Algorithmus liegen durch die Verwendung bekannter HLA-Liganden sowohl Daten aus der Prozessierung durch das konstitutiv exprimierte Proteasom, als auch des Immunoproteasoms zugrunde.

1.5 Immuntherapie

Nachdem die Immuntherapie erfolgreich zur Behandlung von z.B. chronischen Entzündungserkrankungen und Diabetes eingesetzt wird, findet sie neben den traditionellen Tumorthérapien, wie operative Entfernung des Tumors und Chemo- oder Strahlentherapie, auch immer mehr Einsatz bei der Behandlung von Tumoren.

Der Begriff der Immuntherapie ist weit gefaßt und beinhaltet verschiedene Therapieansätze.

Ein verbreiteter Ansatz ist die Applikation von Zytokinen zur Aktivierung des Immunsystems. Hier kommen z.B. TNF- α , IFN- α und - β , sowie IL-2 zum Einsatz. Gerade beim therapeutischen Einsatz von IL-2 wurden durchaus kleine Erfolge erzielt (Atkins *et al.*, 1999; Angelini *et al.*, 2006), allerdings kommt es auch zu kontraproduktiven Effekten, wie z.B. Auslösung des Aktivierungs-induzierten Zelltods (engl.: *activation induced cell death*, AICD) wodurch es zu einer Eliminierung von tumorreaktiven CD8⁺ T-Zellen kommt (Lenardo, 1996). Auch therapeutische Antikörper, die spezifisch für tumorassoziierte Antigene sind, spielen eine Rolle bei der Immuntherapie von Tumoren. Durch die Entwicklung der Hybridomatechnik durch Köhler und Milstein im Jahre 1975 ist es möglich geworden, monoklonale Antikörper (mAK) in großem Maßstab zu produzieren. Der Wirkmechanismus einzelner mAk ist noch nicht im Detail geklärt. Diskutiert werden immunabhängige Mechanismen wie komplementvermittelte Zytotoxizität (engl.: *complement dependent cytotoxicity*, CDC; (Gura, 2002)) und antikörpervermittelte zelluläre Zytotoxizität (engl.: *antibody dependent cellular cytotoxicity*, ADCC). In klinischen Studien werden mAk z.B. gegen den Signalrezeptorliganden Her2 in Brustkrebspatientinnen eingesetzt (Piccart-Gebhart *et al.*, 2005). Auch T-Zellen können Ziele für mAk sein. Der Einsatz mAk gegen das von T-Zellen exprimierte Oberflächenprotein CTLA-4, welches für die Suppression von T-Zellantworten verantwortlich ist, zeigte vielversprechende Resultate (Peggs *et al.*, 2006). Therapeutische Antikörper können aber auch genutzt werden, um zytotoxische oder radioaktive Substanzen selektiv zu den Tumorzellen zu transportieren (Kaminski *et al.*, 2000).

Ziel der adoptiven Immuntherapie ist die Identifizierung, Isolierung, Expansion und anschließende Rückübertragung von Immunzellen mit spezifischer anti-Tumorreaktivität. Hierbei werden tumorspezifische T-Zellen aus dem peripheren Blut oder Tumor-infiltrierende

Lymphozyten (TIL) des Patienten *in vitro* expandiert und zusammen mit Zytokinen zurück in den Patienten übertragen (Dudley *et al.*, 2002).

Die Tatsache, daß das Immunsystem in der Lage ist, spezifische Reaktionen gegen den Tumor zu bilden, macht man sich auch bei der therapeutischen Vakzinierung zu Nutze. Auch hier kommen verschiedene Ansätze zum Einsatz. Zur Aktivierung der angeborenen Immunität können DNA-Vakzine, welche CpG Motive enthalten eingesetzt werden. Durch diese CpG Motive können über *Toll-like* Rezeptoren z.B B-Zellen und natürliche Killerzellen angeregt und Dendritische Zellen zur Reifung gebracht werden. Dies führt zur Produktion von Antikörpern und auch zur Aktivierung von Zell-vermittelten Immunantworten (Krieg, 2000; Warren *et al.*, 2000) Für die Aktivierung tumorspezifischer CD8⁺ T-Zellen wurden zum Beispiel bereits bestrahlte Tumorzellen oder Tumorzelllysate in Vakzinierungsstudien eingesetzt. Weitere Möglichkeiten bietet der Einsatz Dendritischer Zellen, die entweder *ex-vivo* mit über Peptid beladenen (Turner *et al.*, 1999), mit rekombinanten Viren transduziert oder mit RNA welche für ein Tumorantigen kodiert transfiziert werden können (Heiser *et al.*, 2001). Auch können Dendritische Zellen als Antigen-präsentierende Zellen mit autologen Tumorzellen fusioniert (Hybridzellvakzinierung) und diese dann dem Patienten appliziert werden, um *in vivo* tumorspezifische T-Zellen zu expandieren (Trefzer *et al.*, 2004).

Aber auch Vakzinierung mit T-Zellepitopen aus verschiedenen tumorassoziierten Antigenen wie z.B. Tyrosinase , gp100 und Melan/MART-1 (Schaed *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2003; Lienard *et al.*, 2004) wird genutzt, um *in vivo* tumorspezifische T-Zellen zu expandieren. In diesen Studien konnten zwar tumorspezifische T-Zellen induziert, die Tumore allerdings meist nicht eliminiert werden. Ein möglicher Grund hierfür ist eine durch die Therapie herbeigeführte Selektion auf die Tumorzellen hin, welche das Zielantigen der Therapie nicht mehr exprimieren. Dies bedeutet, daß die Strategie der Vakzinierungstherapien weiter überdacht werden muß. Ein Schritt in diese Richtung ist die Identifizierung möglichst vieler T-Zellepitope aus verschiedenen Zielproteinen. Hierbei sollten Proteine als Ziel der Therapie dienen, deren Expression unverzichtbar für die Tumorzelle ist.

Die hier vorliegende Arbeit soll dabei helfen, neue T-Zellepitope aus einer Vielzahl verschiedener als tumorassoziiert beschriebener Proteine und für möglichst viele verschiedene HLA-Allele zu identifizieren. Diese T-Zellepitope können dann in Vakzinierungstherapien für Patienten mit unterschiedlichem HLA-Typ und Tumoren mit unterschiedlicher Antigenexpression eingesetzt werden.

1.6 Zielsetzung

Die hier durchgeführte Arbeit soll dazu dienen, neue tumorassoziierte T-Zellepitope für mögliche Tumorstoffe zu identifizieren.

Die hier identifizierten Epitope sollen:

- eine möglichst große Anzahl an HLA abdecken
- aus Antigenen stammen, die in einer Vielzahl von Tumoren exprimiert werden und die die Antigenität des Tumors möglichst gut abdecken

Hierbei sollen verschiedene, neu entwickelte Algorithmen für die Vorhersage möglicher Epitope zum Einsatz kommen, die in der Lage sind, Peptide nicht nach dem Vorhandensein bestimmter Aminosäuren in den Ankerpositionen, sondern nach dem Gesamtsequenzkontext zu bewerten. Die aus diesen Vorhersagen resultierenden Epitope sollen im Vergleich mit Epitopen, die aus Vorhersagen mit bereits bekannten Algorithmen stammen getestet werden.

Dazu sind folgende Schritte notwendig:

- Untersuchung einer großen Zahl bioinformatisch als potentielle T-Zellepitope vorhergesagter Peptide auf ihre Fähigkeit CD8⁺ T-Zellen zu stimulieren
- Bestimmung des HLA-Kontext in dem die Präsentation der Peptide stattgefunden hat
- Analyse der Frequenzen von T-Zellen mit Spezifität für die neuen Epitope in Melanompatienten

Die bioinformatischen Vorhersagen wurden von Kooperationspartnern am Institut für Biochemie und Bioinformatik durchgeführt. Die in den hier durchgeführten Versuchen gewonnenen Daten sollen mit diesen Vorhersagen verglichen werden und unserem Kooperationspartner wichtige Informationen für die Bewertung und Verbesserung der Algorithmen liefern.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse sollen außerdem dazu dienen, die Anforderungen, sowohl von HLA, als auch von T-Zellen an Epitope besser zu verstehen und die Anzahl an Epitopen, die für Vakzinierungen eingesetzt werden können zu vergrößern.

Desweiteren soll mittels PCR-Analyse die Expression der für die Epitopvorhersagen verwendeten Proteine in Tumoren gezeigt werden.