

# **Massenspektrometrische Identifizierung und biologische Charakterisierung des HLA-Peptidoms bei Melanomen**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Saulius Jarmalavicius  
aus Zarasai / Litauen

Juli 2012



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Juni 2002 bis Juli 2012 an der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, in der Klinischen Forschergruppe „Tumorimmunologie“ der Charité-Universitätsmedizin Berlin unter Leitung von Prof. Dr. Peter Walden durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Peter Walden
2. Gutachter: Prof. Dr. Maria Kristina Parr

Disputation am: 11 Dezember 2012



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Peter Walden für die Möglichkeit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit in seiner Arbeitsgruppe und seine wissenschaftliche Betreuung bedanken.

Frau Prof. Dr. Maria Kristina Parr danke ich für die Übernahme der Betreuung an der Freien Universität Berlin im Fachbereich, Biologie, Chemie und Pharmazie.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Florian Losch und Anja Freier für die Hilfe bei der Konstruktion der Expressionsvektoren und für die Unterstützung bei der Durchführung von molekularbiologischen Arbeiten.

Bei meinen Kolleginnen Rebecca Hugel und Melanie Selka möchte ich mich gern für ihr unermüdliches Korrekturlesen meiner Doktorarbeit und ihre Verbesserungsvorschläge bedanken.

Stefanie Groß danke ich für die zur Verfügung gestellten Melanomzelllinien und tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten und PD Dr. med. Uwe Trefzer für die Bereitstellung der PBMC von Melanompatienten.

Bei Yvonne Welte vom Institut für Pathologie möchte ich mich für die Bereitstellung der Transkriptomdaten bedanken.

Ebenfalls gilt mein Dank unseren technischen Assistenten Ulrike Fritz und Arthur O'Connor für ihre technische Unterstützung bei der Durchführung der experimentellen Arbeiten.

Schließlich danke ich meinen Eltern für ihre langjährige Geduld, Unterstützung und ihr Verständnis. Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle meinem Bruder Dalius für seine Hilfe bei meinen Fragen zur deutschen Grammatik und Rechtschreibung sowie für seine Unterstützung in jeder Situation.



---

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Antigenprozessierung und -präsentation .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	MHC-Moleküle .....	1
1.1.2	Peptidbindung an MHC-Klasse-I-Moleküle .....	2
1.1.3	Prozessierung MHC-Klasse-I-gebundener Peptide.....	3
1.1.4	Hauptquellen MHC-gebundener Peptide .....	5
<b>1.2</b>	<b>Tumorimmunologie.....</b>	<b>7</b>
1.2.1	Krebs .....	7
1.2.2	Das maligne Melanom .....	8
1.2.3	Interaktion des Immunsystems mit dem Tumor.....	8
1.2.4	T-Lymphozyten.....	9
1.2.5	Klassifizierung tumorassoziierter Antigene.....	10
1.2.6	Identifizierung tumorassoziierter T-Zellantigene.....	11
<b>1.3</b>	<b>Massenspektrometrie für die Identifizierung von Biomolekülen .....</b>	<b>13</b>
1.3.1	Ionisierungsprinzip bei einem ESI-Massenspektrometer.....	14
1.3.2	Ionisierungsprinzip beim MALDI-Massenspektrometer .....	14
1.3.3	Das Messprinzip bei einem MALDI-TOF-Massenspektrometer.....	15
1.3.4	MALDI-TOF-PSD-Analyse.....	16
1.3.5	Fragmentierungsmechanismen.....	17
1.3.6	Peptidsequenzbestimmung .....	20
<b>1.4</b>	<b>Ziele für die Doktorarbeit.....</b>	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>MATERIALIEN UND METHODEN .....</b>	<b>25</b>
<b>2.1</b>	<b>Materialien .....</b>	<b>25</b>
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien.....	25
2.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	26
2.1.3	Instrumente und Zubehör .....	26
2.1.4	Antikörper .....	27
2.1.5	Proteine und Enzyme .....	28
2.1.6	Reagenziensets .....	28
2.1.7	Vektoren.....	28
2.1.8	Peptide.....	28
2.1.9	Oligonukleotidprimer .....	28
<b>2.2</b>	<b>Medien und Puffer .....</b>	<b>29</b>
2.2.1	Medien.....	29
2.2.2	Puffer.....	29
<b>2.3</b>	<b>Zellbiologische Methoden .....</b>	<b>30</b>
2.3.1	Cryopräservierung und Auftauen von Zellen.....	30
2.3.2	Kultivierung von Melanomzelllinien .....	31
2.3.3	Kompetitiver Bindungsassay.....	31
2.3.4	Isolierung von PBMC aus dem Vollblut.....	32
2.3.5	Anreicherung von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus PBMC .....	32
2.3.6	Überprüfung der CD8 <sup>+</sup> T-Zellanreicherung.....	33
2.3.7	<i>In vitro</i> Priming von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen mit den synthetischen Peptiden .....	33

2.3.8	Die Stimulation von Tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) mit den autologen Melanomzellen .....	33
2.3.9	ELISpot .....	34
2.3.10	<sup>51</sup> Cr-Freisetzungssassay .....	35
<b>2.4</b>	<b>Proteinchemische Methoden .....</b>	<b>35</b>
2.4.1	Antikörperproduktion für die Isolierung von MHC-Molekülen .....	35
2.4.2	Säulenvorbereitung für die Affinitätschromatographie.....	36
2.4.3	Peptidisolierung von MHC-Molekülen.....	36
2.4.4	Zweidimensionale HPLC .....	36
2.4.5	Probenpräparation für die MALDI-TOF Massenspektrometrie.....	37
2.4.6	Aufnahme und Auswertung von MALDI-TOF-MS und MALDI-TOF-PSD Spektren.....	37
2.4.7	Aufnahme der MS-Spektren und Fragmentierung von Peptiden mittels ESI-qTOF Massenspektrometrie.....	38
2.4.8	Melanom-Zell-Lyse: Fraktionierung nach Kern und cytoplasmischen Fraktionen.	39
2.4.9	<i>In vitro</i> GPS-2-Methylierung. ....	40
2.4.10	Isolierung des <i>in vitro</i> methylierten GPS-2Proteins.....	40
2.4.11	SDS-PAGE.....	40
2.4.12	Visualisierung der mit Tritium radiomarkierten Proteine .....	41
2.4.13	<i>In vitro</i> Methylierung der GPS-2 Peptide .....	41
2.4.14	Peptidmarkierung mit Fluorescein .....	41
2.4.15	Transkriptomanalysen .....	42
2.4.16	Analyse der Proteom- und HLA-Peptidomdaten .....	42
<b>2.5</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>43</b>
2.5.1	Polymerase-Kettenreaktion für die Expressionsklonierung.....	43
2.5.2	Die Agarose-Gelelektrophorese .....	44
2.5.3	TOPO-Klonierung und Transformation von <i>E. coli</i> Bakterien .....	44
2.5.4	Kolonie-PCR .....	44
2.5.5	DNA-Restriktionsverdau.....	45
2.5.6	Ligation .....	45
2.5.7	Plasmidisolierung .....	45
2.5.8	Vorbereitung der M15 kompetenten Zellen .....	46
2.5.9	Klonierung des GPS2-Inserts in den prokaryotischen Expressionsvektor pQE-30 und Transformation kompetenter M15-Zellen.....	46
2.5.10	Expression His-getaggtten Proteine in <i>E.coli</i> .....	47
2.5.11	Isolierung des His-getaggtten Proteins aus <i>E.coli</i> .....	47
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>49</b>
<b>3.1</b>	<b>Charakterisierung der HLA-Peptidome .....</b>	<b>49</b>
3.1.1	Vergleich der HLA-Peptidome von vier Melanomzelllinien.....	49
3.1.2	Identifizierung HLA-gebundener Peptide .....	51
3.1.3	Klassifizierung der Quellproteine bezüglich subzellulärer Lokalisation und biologischer Funktion.....	58
3.1.4	mRNA-Expression der identifizierten HLA-Liganden .....	60
3.1.5	Zellulärer Umsatz der Quellproteine.....	63
3.1.6	HLA-Bindungsspezifitäten der identifizierten Peptide .....	64
<b>3.2</b>	<b>T-Zellassays.....</b>	<b>69</b>
3.2.1	<i>Ex vivo</i> Reaktivität von T-Zellen aus PBMC .....	69
3.2.2	<i>Ex vivo</i> Reaktivität tumorinfiltrierender T-Zellen.....	73

---

3.2.3	Identifizierung Histon-4-spezifischer CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in Melanompatienten und gesunden Spendern.....	75
<b>3.3</b>	<b>GPS2 Methylierung.....</b>	<b>79</b>
3.3.1	Identifizierung der modifizierten HLA-gebundenen Peptide.....	79
3.3.2	Einfluss der Methylierung auf die Stabilität der Seitenketten von Arginin.....	83
3.3.3	Die GPS2-Methylierung in verschiedenen Melanomzelllinien.....	84
3.3.4	HLA-Bindungsassay von GPS2-Peptiden an das HLA-A11 Molekül.....	86
3.3.5	Immunogenität der GPS2-Peptide.....	88
3.3.6	<i>In vitro</i> GPS2-Proteinmethylierung.....	89
3.3.7	Charakterisierung der Methylierungsseite des GPS2-Proteins.....	90
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>93</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>109</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>110</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>111</b>
<b>8</b>	<b>EIGENE PUBLIKATIONEN.....</b>	<b>123</b>
<b>9</b>	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>124</b>
<b>10</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>125</b>
10.1	Anhang I. HLA der verwendeten Melanomzelllinien.....	125
10.2	Anhang II. Kanonische Peptidbindungsmotive der untersuchten HLA.....	126
10.3	Anhang III. Anzahl an überlappenden HLA-Liganden bei den Melanomzellen.....	127
10.4	Anhang IV. Die indentifizierten HLA-Liganden.....	129
10.5	Anhang V. Quellproteine mit mehreren identifizierten HLA Liganden.....	158
10.6	Anhang VI. Die in PSD-Spektren natürlicher GPS2-Peptide detektierten sequenzspezifischen Fragmentmassen.....	161
10.7	Anhang VII. PSD-Spektren synthetischer GPS2-Peptide.....	162
10.8	Anhang VIII. Histon-4-spezifische T-Zellen.....	163
10.9	Anhang IX. Tumorrelevanz identifizierter Quellproteine.....	165
10.10	Anhang X. Abkürzungsverzeichnis.....	167
10.11	Anhang XI. Abbildungsverzeichnis.....	171
10.12	Anhang XII. Tabellenverzeichnis.....	173



# 1 Einleitung

## 1.1 Antigenprozessierung und -präsentation

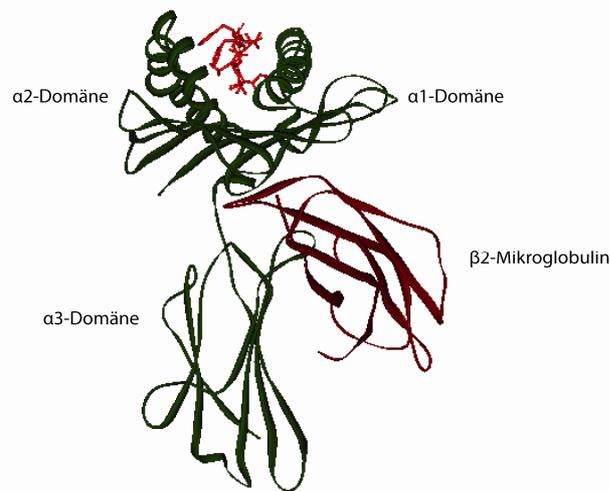
### 1.1.1 MHC-Moleküle

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. *major histocompatibility complex*, MHC) ist ein beim Menschen auf dem Chromosom 6 lokalisierter Genkomplex. Dieser Komplex kodiert mehr als 200 Gene, unter anderem die MHC-Moleküle, die beim Menschen als *human leucocyte antigen* (HLA) bezeichnet werden. Man unterscheidet zwei Klassen von MHC-Molekülen: Klasse-I und Klasse-II. Die beiden Klassen unterscheiden sich in ihrer Struktur und sind auf verschiedenen Zelltypen exprimiert. MHC-Moleküle sind Peptidrezeptoren, die proteolytische Fragmente von Proteinen in Zellen binden, an die Zelloberflächen transportieren und dort den T-Zellen präsentieren. Diese Funktion wird Antigenpräsentation genannt.

MHC-Klasse-II-Moleküle bestehen aus zwei nichtkovalent miteinander gebundenen Ketten  $\alpha$  und  $\beta$ . Beide Ketten sind in der äußeren Zellmembran verankert. Die MHC-Klasse-II-Moleküle präsentieren die Peptidfragmente von externen Proteinen, die von den Zellen durch Endozytose aufgenommen wurden. Diese Proteine werden im Lysosom degradiert, die entstandenen Peptide an MHC-Klasse-II-Moleküle gebunden und an die Zelloberfläche transportiert, wo sie  $CD4^+$ -T-Lymphozyten präsentiert werden. Die MHC-Klasse-II-Moleküle werden hauptsächlich auf den Zellen mit phagozytischen Eigenschaften wie Makrophagen oder dendritische Zellen exprimiert.

MHC-Klasse-I-Moleküle präsentieren Antigene, die durch proteolytischen Abbau intrazellulärer Proteine entstanden sind. Sie werden auf fast allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Je nach Zelltyp können  $10^5$ - $10^6$  MHC-Moleküle auf den Zelloberflächen präsentiert werden [1]. MHC-Klasse-I-Moleküle bestehen auch aus zwei Polypeptiden, ein größeres (45 kDa)  $\alpha$ -Polypeptid, das in der Membran verankert ist, und ein kleineres (12 kDa), nichtkovalent mit dem größeren, assoziierten  $\beta_2$ -Mikroglobulin. Die  $\alpha$ -Kette der MHC-Klasse-I-Moleküle ist durch drei verschiedene Gene A, B und C auf dem Chromosom 6 kodiert. Da die meisten Menschen für diese Regionen heterozygot sind, können bis zu sechs unterschiedliche HLA-Klasse-I-Moleküle exprimiert werden. Außerdem sind die HLA Gene hochpolymorph, wodurch eine hohe Diversität der Moleküle entsteht. Bisher konnten 1729 HLA-A-, 2329 HLA-B- und 1291 HLA-C-Allele identifiziert werden (siehe <http://hla.alleles.org>). HLA können zum Teil entsprechend ihrer Peptidbindungsspezifitäten in Supertypen eingeteilt werden [2].

Das MHC-Klasse-I-Molekül lässt sich in vier Domänen unterteilen. Die schwere Kette besteht aus drei Domänen  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ , und  $\alpha_3$ . Die vierte Domäne wird von der leichten Kette  $\beta_2$ -Mikroglobulin gebildet (Abbildung 1).



**Abbildung 1. Kristallstruktur des humanen MHC-Peptidkomplexes dargestellt als Flat-Ribbon-Model.** Die  $\alpha$ -Untereinheit ist in grün und das mit dem Molekül nichtkovalent assoziierte  $\beta_2$ m-Mikroglobulin in dunkelrot angefärbt. Das in der Bindungsgrube des MHC-Moleküls lokalisierte Influenza MP<sub>58-66</sub> Peptid GILGFVFTL ist rot dargestellt. Für die Visualisierung wurde das PDB File 1OGA [3] verwendet. Die Darstellung der Kristallstruktur wurde mit der Accelrys DS Visualizer (San Diego, USA) Software ausgeführt.

Die Domänen  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  bilden die Peptidbindungsgrube. Die Bindungsgrube ist auf beiden Seiten geschlossen, so können nur Peptide mit einer bestimmten Länge (8-12 Aminosäuren (AS)) an das Molekül binden. Im Gegensatz dazu ist die Peptidbindungstasche der MHC-Klasse-II-Moleküle geöffnet, was die Bindung längerer Peptide (13-17 AS) ermöglicht.

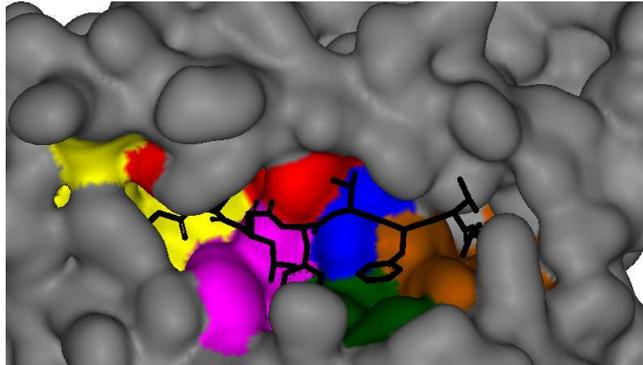
### 1.1.2 Peptidbindung an MHC-Klasse-I-Moleküle

Die Peptidbindung an MHC-Klasse-I-Moleküle unterscheidet sich von anderen Ligand-Rezeptor-Bindungen durch seine Diversität. Die MHC-Moleküle können mehrere verschiedene Peptide binden, wogegen andere Rezeptoren nur einzelne Liganden binden. Analysen mit isolierten MHC-Peptiden haben gezeigt, dass, abhängig vom Zelltyp, über 10.000 verschiedene Peptide von einem MHC-Allomorph gebunden werden und in unterschiedlichen Anzahlen (1 – 4.000 Kopien) auf der Zelloberfläche vorkommen können [4, 5].

Die MHC-gebundenen Peptide sind für die Stabilität des MHC-Moleküls essentiell. In Abwesenheit des Peptids ist ein MHC-Molekül instabil und zerfällt in die schwere und die leichte Kette [6].

Die Bindung der Peptide an die MHC-Moleküle erfolgt hauptsächlich durch die Interaktion der N-terminalen Aminogruppe und der C-terminalen Carboxygruppe des Peptids mit an den Enden der Peptidbindungsgrube konservierten Aminosäuren (AS) des MHC-Moleküls. Diese

Wechselwirkungen haben den größten Einfluss auf die Stabilität der Peptidbindung an das MHC-Molekül [7]. Außerdem bildet die Bindungsgrube des MHC-Klasse-I-Moleküls sechs Bindungstaschen, die mit den Buchstaben A bis F bezeichnet werden (Abbildung 2) [8]. Diese Bindungstaschen können aufgrund des ausgeprägten Polymorphismus der HLA-Moleküle sehr stark in Größe oder physikochemische Eigenschaften variieren. Dies führt dazu, dass Peptide mit AS, die komplementär zur Struktur und zu den chemischen Eigenschaften der Bindungstaschen sind, für die Bindung an bestimmte HLA bevorzugt werden. Diese AS des Peptids werden als Ankeramino­säuren bezeichnet.



**Abbildung 2. Die Oberfläche der Bindungsgrube des HLA-A2-Moleküls.** Die Bindungstaschen A, B, C, D, E und F sind in gelb, rot, blau, rosa, grün und braun dargestellt. Das virale Influenza MP<sub>58-66</sub> GILGFVFTL Peptid ist in der Bindungsgrube schwarz angefärbt. Für die Abbildung wurde das PDB-Datei 1OGA [3] verwendet. Die MHC-Bindungsgrube wurde mit der Accelrys DS Visualizer (San Diego, USA) Software dargestellt.

Durch Isolierung der MHC-Peptidkomplexe mittels Affinitätschromatographie und anschließender Abtrennung der MHC-Polypeptidketten mittels Ultrafiltration und Edman-Abbau-basierter Sequenzierung der gesamten Peptidgemische (sog. *pool sequencing*) wurde festgestellt, dass die Peptide hauptsächlich Nonapeptide sind und ein mit dem jeweiligen MHC-Allel korreliertes Bindungsmotiv besitzen. Für die Bindung an ein HLA-A2.1-Molekül werden z.B. Peptide mit Leucin (Leu) oder Methionin (Met) in Position 2 der Aminosäuresequenz und Valin (Val) bzw. Leu in Position 9 bevorzugt [9]. In anderen Versuchen konnten die Bindungsmotive weiterer MHC-Moleküle identifiziert werden [10], was zur Entwicklung von Vorhersagealgorithmen für die Peptidbindung an MHC-Moleküle verwendet wird [11].

### 1.1.3 Prozessierung MHC-Klasse-I-gebundener Peptide

Die Generierung der MHC-I-Peptide findet im Cytosol statt. Intrazelluläre Proteine werden mittels eines multikatalytischen Proteasekomplexes, dem Proteasom, abgebaut. Das Proteasom ist ein für den Abbau zellulärer Proteine zentrales proteolytisches System, das eine wichtige Rolle bei der MHC-I-Antigenprozessierung spielt [12].

Der Abbau vieler Proteine durch das Proteasom startet mit der Kopplung von Ubiquitin. Ubiquitin ist ein 76 AS langes Polypeptid im Cytoplasma und im Nukleus. Für die Kopplung von Ubiquitin an das Zielprotein ist die Ubiquitin-Ligase E3 verantwortlich. Die Kopplung erfolgt zwischen dem C-terminalen Glycin des Ubiquitins und der  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysins in dem Zielprotein [13]. Es gibt mehr als 100 verschiedenen E3-Ligasen, die spezifische Proteinsequenzen, posttranslationale Modifikationen oder Veränderungen in der Proteinkonformation erkennen.

Das 26S- (konstitutive) Proteasom besteht aus dem 20S-Kern (Core) und zwei regulatorischen 19S-Untereinheiten, den sogenannten Kappen. Der 20S-Kern hat drei katalytisch aktive Untereinheiten  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\beta_5$ , die direkt in die Hydrolyse der Peptidbindung involviert sind [14]. Durch die Blockierung mit spezifischen Proteaseinhibitoren und nachfolgender Analyse der Verdauungsprodukte wurde festgestellt, dass das Proteasom unterschiedliche Aktivitäten besitzt [15]: eine Chemotrypsin-ähnliche Aktivität, die nach großen hydrophoben AS wie Leucin, Phenylalanin oder Tyrosin spaltet, eine Trypsin-ähnliche Aktivität, die nach positiv geladenen AS (Lysin, Arginin) spaltet, und eine Glutamyl-Exopeptidase-Aktivität, die nach C-terminalen negativ-geladenen AS von Polypeptiden spaltet.

Durch Stimulation der Zellen mit Interferon-gamma ( $\text{INF-}\gamma$ ) kann die Aktivität des Proteasoms verändert werden, indem die aktiven Untereinheiten durch ihre  $\text{INF-}\gamma$ -induzierten Homologe ersetzt werden ( $\beta_1 \rightarrow \beta_{1i}$ ,  $\beta_2 \rightarrow \beta_{2i}$ ,  $\beta_5 \rightarrow \beta_{5i}$ ) [16]. Dadurch kann die Antigenprozessierung und -präsentation verstärkt werden [17]. *In vitro* Experimente mit Proteasomen und mit der  $\text{INF-}\gamma$ -induzierten Form (Immunoproteasom) und Ovalbumin als Substrat haben gezeigt, dass beide Formen ähnliche Mengen des immundominanten Peptids SIINFEKL produzieren. Der Unterschied ist, dass das  $\text{INF-}\gamma$ -induzierte Immunoproteasom mehr von einer am N-Terminus verlängerten Peptidvariante produziert [18], die nach zusätzlicher Spaltung durch Aminopeptidasen im Cytosol und im endoplasmatischen Reticulum (ER) für die Antigenpräsentierung durch MHC-Moleküle geeignet ist [19]. Dadurch wird die Gesamtmenge des Antigens, welches direkt mittels Proteasom und indirekt aus den verlängerten Varianten des Peptides mittels Aminoproteasen generiert wird, erhöht, was zu einer effizienteren Präsentation des Antigens führt.

Die Abbauprodukte des Proteasoms können in der Länge sehr variieren (2-25 AS) [20]. *In vitro* Studien zeigen, dass mehr als 70 % aller von Proteasomen generierten Peptide kleiner als 8 AS und daher zu klein sind, um an MHC-Moleküle zu binden. Eine kleine Fraktion von 15 % hat die richtige Länge für die MHC-Bindung [21]. Andere sind am N-Terminus verlängert und müssen deshalb von Aminopeptidasen weiter abgebaut werden. Zu diesen Aminopeptidasen zählt unter anderem die Tripeptidyl-Peptidase II (TPPII). Dieses Enzym ist

im Cytosol lokalisiert und hat eine starke Präferenz für Substrate, die länger als 15 AS sind [22].

Nach der Prozessierung im Cytosol werden die Peptide ins ER transportiert. Für den Transport durch die Membran ist der TAP (*transporter associated with antigen processing*) verantwortlich, der ein Heterodimer aus TAP1 und TAP2 ist. Für die Bindung an TAP und den Transport ins ER werden Peptide mit einer Länge von 8-16 AS bevorzugt [23]. Im ER werden die Peptide, die länger als 10 AS sind, schnell von Aminopeptidasen wie ERAAP (*endoplasmic reticulum amino peptidase associated with antigen processing*) abgebaut. Die Kinetik des Abbaus kürzerer Peptide verläuft wesentlich langsamer, was bedeutet, dass die Substraterkennung abhängig von der Sequenzlänge ist [24]. In Abwesenheit des Enzyms werden längere Peptide von HLA-Molekülen präsentiert, allerdings sind solche MHC-Peptid-Komplexe instabil [25].

Für die Stabilisierung der MHC-Moleküle im ER und deren effektive Beladung mit dem Peptid sind Proteine mit Chaperoneigenschaften verantwortlich. Es wurde gezeigt, dass Tapasin, Calnexin, Calreticulin und ERp57 am Zusammenbau und an der Stabilisierung der MHC-Moleküle beteiligt sind [26]. Das komplett gefaltete mit dem Peptid beladene MHC-Molekül wird dann über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert.

Den Proteinabbau kann man als stochastischen Prozess sehen. *In vitro* Versuche haben gezeigt, dass beim Abbau von Ovalbumin durch Proteasomen in mehr als 90 % aller Fälle das immundominante T-Zell-Epitop SIINFEKL zerstört wird [18]. Das wiederum zeigt, dass, obwohl das Proteasom für die Antigenprozessierung notwendig ist, durch den Einsatz des Proteasoms deutlich mehr mögliche Epitope abgebaut als generiert werden.

#### 1.1.4 Hauptquellen MHC-gebundener Peptide

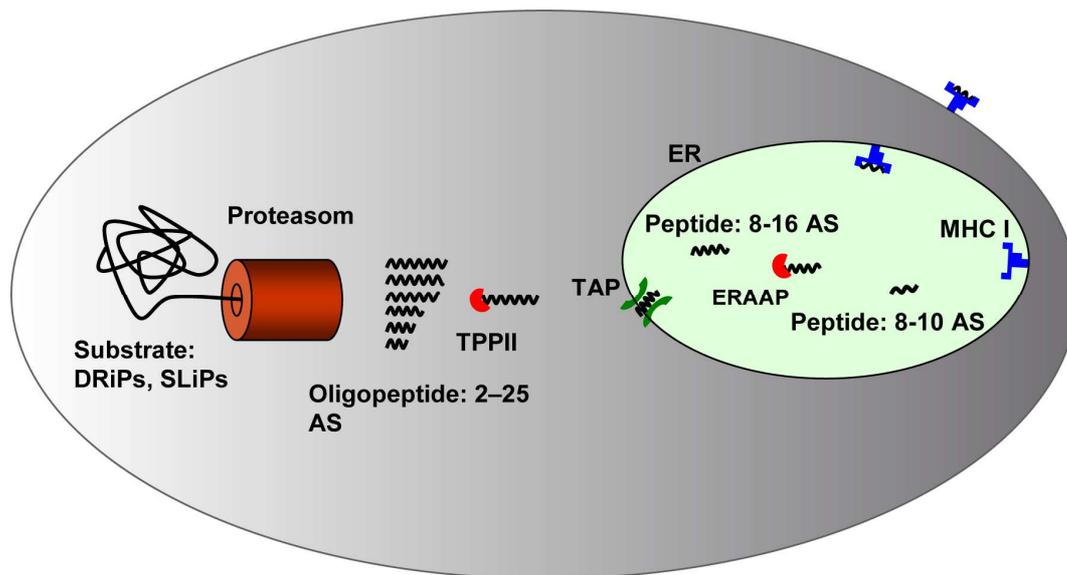
In Experimenten zur Quantifizierung der Proteinsynthese und MHC-Klasse-I-Antigenprozessierung konnte gezeigt werden, dass eine Zelle etwa  $2 \times 10^9$  Einzelmoleküle von rund 30.000 verschiedenen Proteinen (die Berechnung basiert auf dem Durchschnittswert der Proteinelänge von 466 AS) enthält. Da jede Zelle im Durchschnitt 200.000 MHC-Moleküle an der Oberfläche exprimiert, kann nur ein geringer Anteil des zellulären Proteoms von MHC-Molekülen präsentiert werden. Das Antigenprozessierungsschema deutet darauf hin, dass es eine Korrelation zwischen der metabolischen Stabilität der Proteine und der Antigenpräsentation gibt.

Einer der Faktoren, der die intrazelluläre Stabilität der Proteine beeinflusst, ist die N-terminale AS des Proteins. In Versuchen mit eukaryotischen Hefezellen und  $\beta$ -Galaktosidase als Modelprotein wurde festgestellt, dass die basischen AS (Lysin, Arginin)

oder die großen hydrophoben AS (Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, Leucin, Isoleucin) am N-Terminus zu einem schnelleren Abbau des Proteins führten [27]. In Experimenten mit Zelllysaten von Säugetieren konnte diese sogenannte „N-End Rule“ bestätigt werden [28]. Nach Entdeckung der neuen Ubiquitin-Ligase Doa10, die spezifisch am N-Terminus des Proteins acetyliertes Alanin, Valin, Serin, Threonin oder Cystein erkennt, wurde die „N-End-Rule“ erweitert [29].

Durch den schnellen Abbau der Proteine kann die Präsentation von Antigenen verstärkt werden. In *in vivo* Versuchen mit murinen Tumorzellen, die mit dem HIV1 nef Protein transfiziert wurden, konnte gezeigt werden, dass die Einführung destabilisierender AS am N-Terminus entsprechend der „N-End Rule“ zu einer effektiveren Generierung von T-Zell-Epitopen führt [30]. Das bedeutet, dass Peptide, die von kurzlebigen Proteinen (engl. *short lived proteins, SLIPs*) stammen, eine größere Chance haben, von MHC-Molekülen präsentiert zu werden.

Die Antigenprozessierung und -präsentation ist allerdings nicht nur von der Lebensdauer des Proteins in der Zelle abhängig. In Versuchen mit dem nach der „N-End Rule“ metabolisch stabilem Nucleoprotein (NP) vom Influenzavirus infizierten Maus RMA-Zellen wurde gezeigt, dass die MHC-Peptidkomplexe in weniger als einer Stunde (h) auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Die infizierten Zellen werden von CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten erkannt und eliminiert [31]. In weiteren Versuchen mit HeLa-Tumorzellen, die mit Inhibitoren der Proteinsynthese inkubiert worden waren, konnte gezeigt werden, dass ca. 30 % der Antigene direkt nach ihrer Synthese ubiquitinyliert und abgebaut werden [32]. Als eine Erklärung dafür ist die sogenannte DRiPs- (engl. *defective ribosomal products*) Hypothese vorgeschlagen worden. Sie besagt, dass nicht nur kurzlebige Proteine, sondern auch langlebige Proteine, die ihre native Faltung nicht erreicht haben (Fehler in Proteinbiosynthese, Überschuss an Einheiten für die Bildung von Proteinkomplexen), schnell abgebaut werden und dann als Quelle für Peptide für die Antigenpräsentation dienen [33].



**Abbildung 3 Antigenprozessierung und -präsentation durch MHC-Klasse-I-Moleküle.** Die ubiquitinylierten Proteine, die hauptsächlich aus kurzlebigen Proteinen (SLiPs) und defekten ribosomalen Produkten (DRiPs) bestehen, werden mittels Proteasomen abgebaut. Der weitere Abbau vom N-Terminus der Oligopeptide erfolgt mittels cytosolischer Aminopeptidasen wie TPPII (engl. *tripeptidyl peptidase II*). Peptide, die 8-16 AS lang sind, werden über TAP ins ER transportiert. Dort werden die Peptide, die länger als 10 AS sind, weiter von ERAAP und anderen Exopeptidasen abgebaut. Peptide, die eine Aminosäurenlänge von 8-10 besitzen, werden von MHC-Klasse-I-Molekülen gebunden und an die Zelloberfläche transportiert.

## 1.2 Tumormimmunologie

### 1.2.1 Krebs

Krebs ist eine durch komplexe genetische Veränderungen bedingte Krankheit. Die Krankheit kann durch Infektionen mit onkogenen Viren [34], spontane oder umweltbedingte multiple DNA-Mutationen induziert werden, die mit der Aktivierung von Onkogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, negative Regulatoren der Karzinogenese, einhergehen [35].

Eine der Haupteigenschaften der Tumorzelle ist die Deregulierung der normalen Zellzyklusmechanismen, welche ein unkontrolliertes Wachstum der Zelle verursacht. Mit der Zeit kann die Tumorzelle neue Eigenschaften entwickeln, welche zur Migrationsfähigkeit, Apoptoseresistenz oder Resistenz gegenüber klinischen Medikamenten führen können. Eine maligne Zelle lässt sich durch sieben Kernpunkte charakterisieren [36]:

- 1) Selbstversorgung: Die Zelle produziert selbst verschiedene Wachstumsfaktoren, die das Wachstum der Zelle stimulieren.
- 2) Resistenz gegen Apoptose durch die Inaktivierung programmierter natürlicher Todesmechanismen.

- 3) Angiogenese (Bildung neuer Blutgefäße): Um die Versorgung mit Nährstoffen bei schnell wachsenden Zellen zu sichern, produzieren die Tumorzellen lösliche Substanzen, die die Bildung neuer Blutgefäße verursachen und damit die Lieferung der Nährstoffe erleichtern.
- 4) Gewebeinvasion und Metastasierung: Wenn der Tumor eine kritische Masse erreicht, verlassen manche Zellen ihre Ursprungsposition und wandern durch das Blut. So können die Zellen entfernte Plätze des Körpers erreichen, wo sie neue Kolonien bilden können. Die Metastasierung ist für mehr als 90 % aller krebsassoziierten Todesfälle verantwortlich [37].
- 5) Unbegrenztes Replikationspotential durch Telomeraseexpression: Die Telomerase ist ein Enzym, das die Verkürzung der Telomere und damit den natürlichen Tod der Zelle verhindert.
- 6) Unempfindlichkeit gegen anti-Wachstumssignale durch die Inaktivierung der Regulatoren von Zellproliferation (z.B. Retinoblastoma Protein (Rb), Proteine p107 und p130).
- 7) *Immune escape* durch Inaktivierung von T-Zellfunktionen z.B. durch Sekretion immunsuppressiver Substanzen wie TGF- $\beta$  (engl. *transforming growth factor-beta*) oder Interleukin-10 (IL-10) oder durch Veränderung der Antigenität z.B. durch Herabregulation von HLA oder Veränderung der Antigenprozessierung.

### 1.2.2 Das maligne Melanom

Es gibt mehr als 100 verschiedene Arten von Krebs, die nach den genetischen Veränderungen und nach dem Ursprung des Gewebes klassifiziert werden können. Eine von diesen ist das maligne Melanom. Es geht aus den pigmentbildenden Zellen, den Melanozyten, hervor und ist die gefährlichste Gruppe der Hauttumore. Jährlich werden mehr als 15.000 neue Melanomfälle in Westeuropa registriert [38]. Wenn der Tumor in einem frühen Entwicklungsstadium diagnostiziert wird, kann er durch chirurgische Intervention entfernt werden. Das metastasierte Melanom zeigt allerdings Resistenz gegen alle Therapieformen (Chemotherapie, Bestrahlungstherapie etc.). Die Lebensdauer bei Patienten mit metastasiertem Melanom beträgt in Durchschnitt nur sechs Monate. Die Fünf-Jahre-Überlebensrate liegt bei weniger als 5 % der Patienten [39]. Deshalb ist die Entwicklung neuer Therapien für die Bekämpfung des Melanoms notwendig.

### 1.2.3 Interaktion des Immunsystems mit dem Tumor

Experimentell wurde nachgewiesen, dass das Immunsystem virusinfizierte Zellen eliminieren kann. Die zytotoxischen T-Lymphozyten spielen dabei eine entscheidende Rolle. In Versuchen mit virusspezifischen T-Lymphozyten wurde gezeigt, dass die Erkennung und Eliminierung virusinfizierter Zellen MHC-abhängig ist [40]. T-Zellen erkennen die Antigene, welche mit MHC assoziiert sind [41].

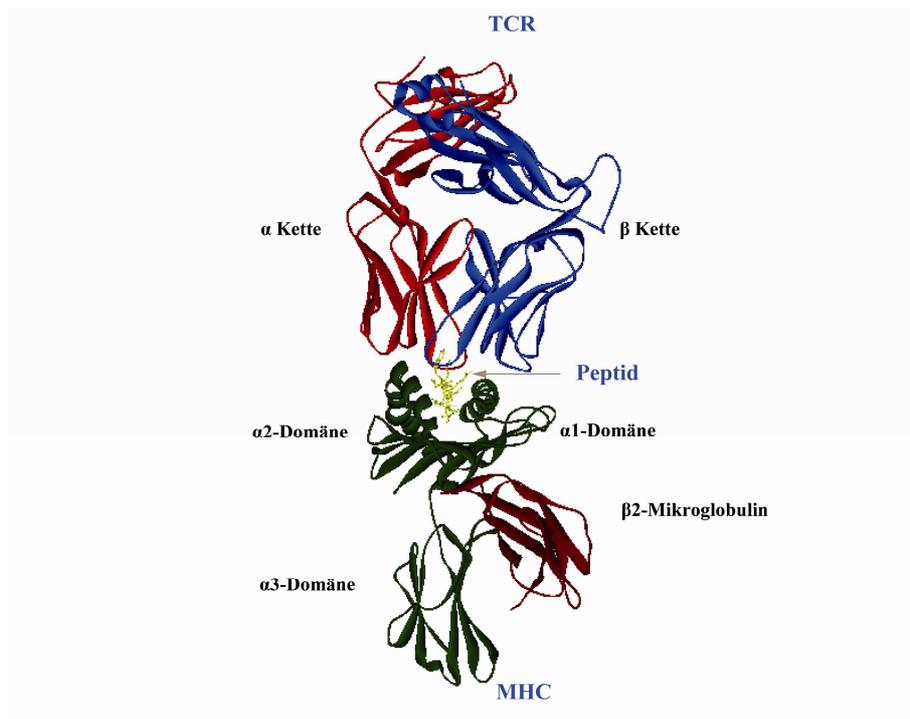
*In vitro* Studien mit aus Melanompatien isolierten T-Zellen haben gezeigt, dass auch die spezifische Erkennung und Eliminierung der Tumorzellen durch das Immunsystem möglich ist [42]. Tumorregression wurde auch in manchen Fällen beobachtet, in denen die T-Lymphozyten nach *in vitro* Expansion wieder in die Melanompatien injiziert wurden [43]. Das zeigte, dass die Tumoren Antigene exprimieren, die von T-Zellen erkannt werden. Die identifizierten Antigene können als Targets für die Krebsimmuntherapie verwendet werden.

#### 1.2.4 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten können in zwei Hauptklassen unterteilt werden. Beide zeichnen sich durch unterschiedliche Funktionen aus. Das Hauptunterscheidungsmerkmal ist die Expression der Oberflächenproteine CD4 und CD8. CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten reagieren auf Antigene, die durch MHC-Klasse-II-Moleküle präsentiert werden, und sind für die Aktivierung von B-Zellen und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten verantwortlich. CD8<sup>+</sup>-T-Zellen reagieren auf Antigene, die durch MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert werden, und sind für die Eliminierung von infizierten Zellen und Tumorzellen verantwortlich. Der Oberflächenmarker CD8 bindet an MHC-Klasse-I-Moleküle und ist für die Stabilisierung des T-Zell-Rezeptor-MHC-Peptidkomplexes verantwortlich [44]. Die Erkennung des Antigens, das von dem MHC-Molekül präsentiert wird, und die daraus resultierende Aktivierung der T-Zelle, erfolgt durch den T-Zell-Rezeptor (engl. *T cell receptor*, TCR). Der TCR ist ein Heterodimer aus  $\alpha$ - und  $\beta$ - Ketten (Abbildung 4) und weist eine Immunglobulinähnliche Struktur auf. Jede Kette besteht aus einer variablen (V) und einer konstanten (C) Region sowie einer Transmembranregion und einer kurzen cytosolischen Sequenz. Die für die  $\alpha$ -Kette des TCR kodierenden Gene sind auf dem Chromosom 14 lokalisiert. Die variable Region der  $\alpha$ -Kette wird aus aus 70-80 verschiedenen variablen ( $V_\alpha$ ) und verschiedenen 61 sogenannten joining ( $J_\alpha$ ) Gensegmenten durch somatische Rekombination generiert. Die Gene, die für die  $\beta$ -Kette des TCR kodieren, sind auf dem Chromosom 7 lokalisiert. Die variable  $\beta$ -Region wird aus 52 verschiedenen  $V\beta$ , 2 diversity ( $D\beta$ ) und 13 joining ( $J\beta$ ) Genfragmenten kombiniert. Durch die somatische V(D)J-Rekombination einzelner Gensegmente und zusätzliche Einführung von Nukleotiden können diverse T-Zell-Rezeptoren (rechnerisch circa  $1 \times 10^{15}$ ) mit unterschiedlichen Antigenespezifitäten entstehen [45].

Nach der T-Zell-Rezeptor-Rekombination werden die T-Zellen im Thymus phänotypisch und funktionell selektioniert. Es können nur die T-Zellen den Thymus verlassen, die gegen die von MHC-Molekülen präsentierten Selbstantigene tolerant sind, aber gleichzeitig das Potenzial für die Erkennung fremder Antigene (virale oder krankheitsassoziierte Peptide)

besitzen. Nach der Erkennung solcher fremden Antigene proliferieren die T-Zellen und differenzieren anschließend zu Effektorzellen, die in der Lage sind, die fremdantigenpräsentierenden Zellen zu eliminieren. Dabei werden die zytotoxischen Substanzen wie Granzym und Perforin freigesetzt, die die erkrankte Zelle zerstören. Nebenbei werden auch Zytokine wie  $\text{INF-}\gamma$  produziert und ausgeschüttet, die andere, nicht zytolytische Wirkung auf die Zielzellen haben.



**Abbildung 4 Kristallstruktur eines TCR/MHC-Peptidkomplexes.** Die Abbildung zeigt die Erkennung des tumorassoziierten Antigens NY-ESO-1<sub>157-165</sub> (SLLMWITQV) (gelb) durch den TCR. Die  $\alpha$ -Kette des TCR ist in rot, die  $\beta$ -Kette in blau dargestellt. Das MHC-Molekül wird durch grün (schwere Kette) und dunkelrot (leichte Kette) hervorgehoben. Das Peptid wird von einem MHC-Klasse-I-Molekül (HLA-A2) präsentiert (PDB File 2BNQ) [46]. Für die Darstellung der Struktur wurde die Accelrys DS Visualiser Software (San Diego, USA) verwendet.

### 1.2.5 Klassifizierung tumorassoziierter Antigene

Tumorassoziierte Antigene können in zwei Hauptgruppen unterteilt werden. Zu der ersten Kategorie gehören die Antigene, die nur in Tumorzellen, aber nicht in normalen Zellen exprimiert werden. Diese Gruppe wird als tumorspezifische Antigene bezeichnet. Zu ihr gehören Antigene, die durch Mutationen oder onkovirale Infektionen entstanden sind. Die mutierten Antigene, auch Neoantigene genannt, können als effektive Targets für eine Immuntherapie verwendet werden [47]. Jedoch sind sie patientenspezifisch, weshalb sie nur für eine individuelle Immuntherapie eingesetzt werden können.

Eine Expression viraler Antigene kann in einer relativ kleinen Fraktion der Tumore, die durch virale Infektionen entstanden sind, beobachtet werden. Bestes Beispiel ist das E7-Onkoprotein des humanen Papillomavirus, welches in 95 % aller Fälle des humanen Gebärmutterhalskrebs

vorhanden ist [48]. Virale Antigene kann man als Fremdartige bezeichnen, die als Targets in Tumoren mit viraler Genese therapeutisch genutzt werden können.

Zu der zweiten Kategorie gehören tumorassoziierte Antigene, die sowohl in Tumor- als auch in normalen Zellen nachweisbar sind. Diese Gruppe ist häufig in Tumorzellen überexprimiert. Antigene in dieser Kategorie werden in weitere Untergruppen gegliedert:

Differenzierungsantigene: Diese Antigene werden sowohl im Tumor als auch in normalem Gewebe exprimiert. Beispiele hierfür sind MART-1 (engl. *melanoma antigen recognized by T cells*), gp100 und Tyrosinase [49-51]. Sehr viele solcher Antigene sind für das Melanom und Melanozyten bekannt.

Cancer-Testis-Antigene (ektopisch exprimierte Antigene): Diese Antigene sind nur im Tumor und im Testisgewebe zu finden. Da das Testisgewebe immunprivilegiert ist, sind diese Antigene für die Immuntherapie besonders gut geeignet. Bekannte Beispiele für Cancer-Testis-Antigene sind MAGE-1 und NY-ESO [52, 53].

Überexprimierte Antigene: Die Expression dieser Antigene ist weit verbreitet. Sie können sowohl im normalen Gewebe als auch im Tumor vorkommen, sind aber im Vergleich zu normalen Zellen im Krebs überexprimiert. Ein Beispiel für diese Gruppe ist die katalytische Untereinheit der Telomerase [54], ein Enzym, das häufig in Tumoren überexprimiert ist.

Die HLA-gebundenen Peptide, die von tumorassoziierten Antigenen prozessiert und von den T-Zellen erkannt wurden, werden für die Herstellung der peptidbasierten Vakzine verwendet. Das Ziel der Vakzinierung ist, die Vermehrung antigenspezifischer T-Zellen zu induzieren, die anschließend die antigenexprimierenden Tumorzellen eliminieren sollen.

### **1.2.6 Identifizierung tumorassoziierter T-Zellantigene**

Für die Identifizierung tumorassoziierter Antigene werden unterschiedliche Methoden verwendet, die aber in drei Hauptgruppen unterteilt werden können.

Molekulargenetischer Ansatz: Diese Strategie beruht auf der mRNA-Extraktion von Tumorzellen und der Konstruktion von cDNA-Expressionsbibliotheken, die in einen eukaryotischen Expressionsvektor kloniert werden. Für die Expression der Tumor-DNA-Fragmente werden leicht transfizierbare eukaryotische Zellen verwendet. Ein Plasmid mit einem humanen HLA-Molekül wird zusammen mit Vektoren, die die cDNA-Expressionsbibliotheken der Tumorzellen enthalten, transfiziert. Damit ist es möglich, die Expression des Antigens und deren Präsentation auf dem HLA-Molekül zu untersuchen. Die transfizierten Zellen wurden mit autologen T-Zellen, die aus demselben Patienten, aus dem der Tumor stammte, isoliert worden waren, auf die Auslösung von Immunreaktionen getestet.

Mit dieser Technologie konnte der größte Teil der Cancer-Testis-Antigene identifiziert werden [55].

Bioinformatischer Ansatz (*reverse immunologie* Ansatz): Er basiert auf der Verwendung bioinformatischer Algorithmen für die Vorhersage möglicher T-Zell-Epitope aus tumorrelevanten Proteinen. Die vorhergesagten Antigene können dann in T-Zell-Assays mit den tumorspezifischen T-Zellen als T-Zell-Epitope verifiziert werden.

Obwohl Vorhersagealgorithmen für die wichtigen Schritte bei der Antigenprozessierung, wie dem Verdau der Antigene durch Proteasomen [56, 57] und dem Transport der Peptide in das ER [58], entwickelt wurden, ist die Antigenbindung an das MHC-Molekül essentieller Schritt für die Induktion der T-Zellen. Deshalb sind die meisten bioinformatischen Algorithmen auf die Peptidbindungsvorhersagen an MHC-Moleküle fokussiert. Sie basieren auf den bekannten HLA-Bindungsmotiven, auf Sequenzen identifizierter HLA-Peptide [11] oder auf experimentellen Peptidbindungsdaten für spezifische HLA-Moleküle [59]. Die dem Bindungsmotiv zugrunde liegenden Methoden beruhen auf der Annahme, dass in der Peptidsequenz die einzelnen AS ihren Beitrag auf Bindung an MHC unabhängig voneinander liefern. Jedoch wurden auch neue Vorhersageprogramme wie artifizielle neuronale Netze (engl. *artificial neuronal networks*, ANN) oder Support-Vektor-Maschinenalgorithmen (SVM) entwickelt, die den Beitrag zur Bindung der AS an einer bestimmten Position im Zusammenhang mit den restlichen AS des Peptids bewerten. Solche Algorithmen bieten bessere Vorhersagegenauigkeiten als die auf Bindungsmotiven basierenden Methoden [60].

Eine positive Reaktion der T-Zellen auf einen vorhergesagten MHC-Ligand bedeutet aber, dass es sich um ein T-Zell-Antigen handeln kann, das nicht notwendigerweise auch natürlich prozessiert wird. Deshalb sind weitere Analysen, wie *in vitro* Transfektion der Tumorzellen oder Standardzelllinien wie COS, 293T oder K562 mit Antigengen und nachfolgenden Tests mit antigenspezifischen T-Zellen, notwendig, um die Antigenpräsentation nachzuweisen [61].

Biochemische Identifizierung: Mit der Entwicklung der Massenspektrometrie für die Analyse von Biopolymeren wurde die direkte Isolierung und Identifizierung von MHC-gebundenen Peptiden möglich [62]. Eine solche Analyse umfasst die Lyse der Tumorzellen, die Isolierung der MHC-Peptidkomplexe mit den MHC-spezifischen Antikörpern, die Abtrennung der Peptide von den MHC-Molekülen durch Ultrafiltration sowie die Auftrennung der komplexen Peptidgemische mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) und danach folgende Analyse mittels Massenspektrometrie. Die durch solche Analysen erworbenen Daten liefern wichtige Informationen über die Antigenprozessierung und -präsentation, die für die Entwicklung und Verbesserung der Epitop-Vorhersage-Algorithmen verwendet werden

können. Die Kombination von Sequenzierung und Identifizierung von HLA-Liganden mit T-Zell-Assays kann für die Identifizierung neuer tumorassoziierter Antigene verwendet werden [63]. Es wurden auf diese Weise auch tumorspezifische Antigene, die durch Mutation entstanden sind, identifiziert [64].

Die direkte Isolierung und Sequenzierung HLA-gebundener Peptide bleibt der einzige Weg für die Identifizierung HLA-gebundener Peptiden mit posttranslationalen Modifikationen. Es gibt einzelne Fälle, in denen Peptide mit Methylierung am Arginin, Modifikationen am Cystein oder Acetylierung am N-Terminus als HLA-Liganden nachgewiesen wurden [65]. Durch Verwendung der Metallaffinitätschromatographie konnten auch phosphorylierte HLA-Liganden angereichert und identifiziert werden [66].

Eine direkte Isolierung und Identifizierung der HLA-gebundenen Peptide ist technisch sehr anspruchsvoll, deshalb wurden bisher nur wenige systematische HLA-Peptidomanalysen durchgeführt und veröffentlicht. Die Zahlen der bei diesen Analysen identifizierten Peptide liegen zwischen 30 und 250 [67, 68]. Die geringen Ausbeuten an identifizierten Peptiden sind mit dem hohen technischen Aufwand und häufig sehr gering verfügbaren Ausgangsmengen an Zellmaterial zu erklären. Für derartige Analysen werden typischerweise  $1 \times 10^9$ - $1 \times 10^{11}$  Zellen verwendet, um die Peptide, die in wenigen Kopien auf der Oberfläche präsentiert werden, zu identifizieren und sequenzieren. Außerdem werden für die Zellyse Detergenzien eingesetzt, die nicht mit der Massenspektrometrie kompatibel sind. Deshalb sind zusätzliche Waschschrte notwendig, um die Kontaminanten zu entfernen, was zum Verlust schwach an die MHC-Moleküle gebundener Peptide führen kann. Um diese Probleme zu umgehen, wurde eine Methode entwickelt, mit der verschiedene Standardzelllinien mit den Genen löslicher HLA-Moleküle transfiziert wurden. Das ermöglicht die Isolierung der HLA-gebundenen Peptide direkt aus dem Kulturmedium. Die Prozedur kann mehrmals wiederholt werden, um die Menge der HLA-gebundenen Peptide für die weiteren Peptidanalysen zu erhöhen [69]. Jedoch ist diese Methode nur für im Labor etablierte Zelllinien verwendbar. Außerdem unterliegen die Plasmide mit den HLA-kodierenden Genen einem starken CMV-Promotor, was nach der Transfektion der Zellen zu Veränderungen bei der Antigenpräsentation führen kann [70].

### 1.3 Massenspektrometrie für die Identifizierung von Biomolekülen

Zwei Ionisierungstechniken werden für die Charakterisierung und Identifizierung von Biomolekülen verwendet: Elektrospray Ionisation (ESI) [71] und Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI) [72]. Die beiden Techniken unterscheiden sich in der Probenvorbereitung und in ihren Ionisierungsprinzipien.

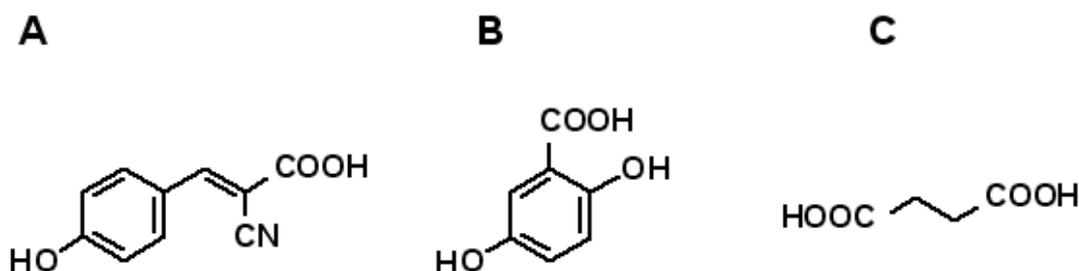
### 1.3.1 Ionisierungsprinzip bei einem ESI-Massenspektrometer

Bei der ESI befinden sich die Analyten in Lösung. Deshalb wird die Probe durch direkte Probeninjektion mittels Spritzenpumpe oder durch die Kopplung mit Mikro- oder Nano-HPLC dem Nanoelektrospray zugeführt. Die durch die dünne Kapillare eingespritzte Lösung wird im elektrischen Feld abhängig von der an der Kapillarspitze angelegten Spannung elektrisch geladen. So entstehen mehrfach geladene Tröpfchen. Durch Verdunstung des Lösungsmittels werden die mehrfach geladenen Analytionen freigesetzt, die anschließend in einem Massenanalysator aufgetrennt und detektiert werden können. Eine ESI-Ionenquelle wird sehr oft mit einem Quadrupol-Massenanalysator kombiniert. Eine Anordnung dieser Art ist ein Triple-Quadrupol-Analysator, der aus drei Grundbausteinen besteht, den Quadrupolen Q1, Q2 und Q3, wobei Q1 und Q3 für die Massenabtrennung und -analyse verwendet werden und Q2 als Kollisionszelle für die Peptidfragmentierung. Durch Austausch von Q3 durch einen TOF-Massenanalysator wird die Auflösung und Selektivität verbessert. Es werden auch andere Massenanalysatoren wie Quadrupol-Ionenfallen (engl. *quadrupol ion trap*, QIT) oder Fourier-Transform-Ionencyclotron-Resonanz- (FT-ICR) Systeme verwendet.

### 1.3.2 Ionisierungsprinzip beim MALDI-Massenspektrometer

Die charakteristische Eigenschaft eines MALDI-Massenspektrometers ist, dass einfach geladene Ionen dominant sind, wogegen beim ESI auch mehrfach geladene Ionen, abhängig von Molekülgröße meistens zweifach oder dreifach geladen, registriert werden.

Für die MALDI-Messung werden die Analyten zusammen mit einer Matrix im molaren Verhältnis 1:1000 auf dem MALDI-Target kokristallisiert [73]. Die Probenvorbereitung spielt dabei eine sehr große Rolle. Es wurde gezeigt, dass die Zusammensetzung der Analyt-Matrix-Lösung, der pH-Wert und die Größe der Matrixkristalle stark die Sensitivität der Messung beeinflussen können [74]. Für die Analyse der Biomoleküle werden als Matrix schwach organische Säuren, häufig mit einem aromatischen Ring in der Struktur, verwendet (Abbildung 5).



**Abbildung 5** Häufig für die Analyse von Proteinen und Peptiden verwendete MALDI-Matrixsubstanzen. A)  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxyzimtsäure (4HCCA). B) 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB). C) Sinapinsäure (SA).

Die Matrix dient der Absorption von Laserenergie und der effektiven Energieübertragung an die Analyten. Darüber hinaus findet die Desorption und Ionisierung der Analyten statt. Das genaue Ionengenerierungsprinzip ist allerdings noch nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, dass durch ein sogenanntes *energy pooling* von mehreren angeregten Matrixmolekülen die Desorption einzelner Analyte und Matrixmoleküle bzw. von Clustern aus Matrix und Analytmolekülen, die später in der Gas-Phase dissoziieren, induziert wird [75]. Die Ladungsübertragung von der Matrix auf die Analytmoleküle findet entweder innerhalb der Cluster [76] oder durch Stöße der desorbierten vereinzelt neutralen Moleküle mit geladenen Matrix-Ionen in die Gasphase statt [77]. Für die Ionisierung in Clustern spricht, dass das in MALDI-Spektren oft beobachtete chemische Rauschen, hauptsächlich aus positiv geladenen Matrix Clustern besteht [78]. Die Dominanz einfach geladener Ionen und die Suppression von Matrixsignalen bei höheren Analytkonzentrationen kann durch die Ionisierung einzelner Moleküle in der Gasphase erklärt werden [77].

Ein anderes Modell für die Ionisierung nimmt an, dass bereits vorgeformte Ionen (engl. *preformed ions*) in der Probe vorliegen. Durch die als Matrix verwendeten organischen Säuren, wird die Gesamtmischung angesäuert, so dass die Analytmoleküle, die eine hohe Protonenaffinität haben, bereits in pre-protonierter Form vorliegen. Dieser Effekt senkt die Barriere für die Ionisierung der Peptide, besonders für die, die basische AS in der Sequenz beinhalten [79]. Mit diesem Modell kann man die Dominanz der tryptischen Fragmente mit Arginin über diejenigen mit der weniger basischen AS Lysin in MS-Spektren erklären [80].

### 1.3.3 Das Messprinzip bei einem MALDI-TOF-Massenspektrometer

Bei einem MALDI-TOF-Massenspektrometer ist die MALDI-Ionenquelle mit einem Flugzeitmassenanalysator (engl. *time of flight*, TOF) gekoppelt. Nach der Ionisierung werden die positiv geladenen Ionen von den neutralen oder negativ geladenen Ionen im elektrischen Feld getrennt und in Richtung Detektor beschleunigt. Die Massenbestimmung erfolgt durch die Messung der Flugzeit, die zwischen dem Start der Ionen in der Probe und dem Ankommen am Detektor vergeht. Da die Ionen mit den unterschiedlichen Massen bei gleicher kinetischer Energie unterschiedliche Geschwindigkeiten haben, werden sie entsprechend ihrer Masse zu verschiedenen Zeitpunkten im Detektor registriert. Es gibt zwei Ausführungen von TOF-Detektoren: Linear-Modus und Reflektor-Modus. Durch den Einbau des Reflektors (Ionenspiegel, *ion mirror*) wird die Flugstrecke der Ionen verlängert, wodurch die Auflösung erhöht wird. Doch nicht nur die Wegverlängerung macht die Auflösung besser. Eine weitere Auflösungsverbesserung wird durch die Ionenfokussierung im Reflektor erreicht. Die Ionen mit unterschiedlicher kinetischer Energie dringen unterschiedlich tief in den Reflektor ein,

wodurch die Geschwindigkeitsverteilungen der Ionen gleicher Masse kompensiert werden. Durch die Einführung des Reflektors wurden auch die Aufnahmen von PSD (*post source decay*)-Analysen und damit die Strukturanalyse von Peptiden ermöglicht.

MALDI-Massenspektrometer können auch mit HPLC gekoppelt werden, wobei hier in der Regel nicht direkt gekoppelt wird, sondern die Proben auf dem MALDI-Target gesammelt werden [81].

#### 1.3.4 MALDI-TOF-PSD-Analyse

Durch multiple Kollisionen der Analytionen mit Matrixmolekülen in der Ionenquelle oder mit den Gasen in der feldfreien Drift-Region des Detektors wird der Ionenzerfall in kleinere Fragmente induziert [82, 83]. Der Prozess findet zwischen Ionenquelle und Detektor statt und wird *post source decay* (PSD) genannt. Die Entdeckung des PSD-Prozesses machte die Strukturanalyse von Peptiden mit dem MALDI-TOF-Massenspektrometer möglich [84]. Hierbei wird in einem ersten Schritt, das zu analysierende Peptid massenspektrometrisch isoliert, dann fragmentiert und die Fragmente massenspektrometrisch analysiert. Bei der Strukturaufklärung mittels Massenspektrometrie werden also zwei (oder ggf. mehr) aufeinanderfolgende Massenanalysen kombiniert. Solche Verfahren werden daher als Tandem- oder MS/MS-Analysen bezeichnet.

Für die Isolierung des Vorläuferions wird ein gepulstes elektrostatisches Ablenkkfeld („ion-gate“) verwendet. Dieses erlaubt, Peptidionen einer Masse von anderen abzutrennen. Dadurch kann ein Peptid aus einer Peptidmischung analysiert werden. Die Fragmente und die Vorläuferionen haben die gleiche Geschwindigkeit, aber wegen geringerer Masse besitzen die Fragmente eine geringere kinetische Energie, deshalb dringen sie in den Reflektor unterschiedlich tief ein. Die kleineren Ionen dringen aufgrund ihrer geringeren kinetischen Energie weniger die größeren tiefer in den Reflektor ein. Dadurch entstehen Unterschiede in der Flugstrecke, was die Abtrennung der Fragmente möglich macht. Im normalen Modus kann der Reflektor Ionen abtrennen, die nicht kleiner als 70 % der Größe des Vorläuferions sind. Die Auftrennung kleinerer Fragmente und die Aufnahme eines kompletten Spektrums werden durch die Anpassung der Reflektorspannung erreicht. In Abhängigkeit von der Größe des Vorläuferions wird ein komplettes Spektrum in 10-15 Spannungs-Senkungs-Schritten (Segmenten) erfasst.

Solche sehr zeitaufwendigen Analysen können durch die Einführung eines weiteren TOF-Massendetektors vereinfacht werden. Der erste TOF-Massenanalysator dient der Isolierung der Vorläuferionen und Fragmente. Durch zusätzliche Beschleunigung werden die Fragmente

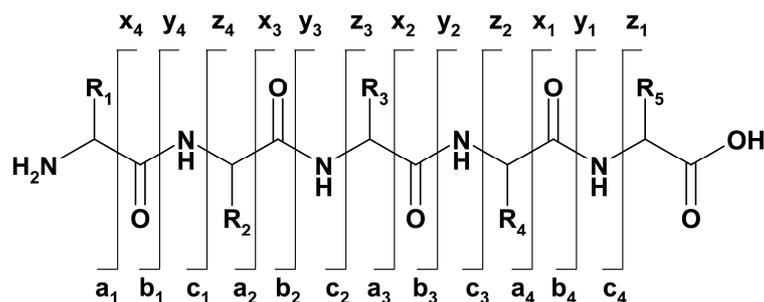
wieder im elektrischen Feld beschleunigt und nach ihren unterschiedlichen Massen aufgetrennt. Alle Fragmentmassen werden am zweiten Detektor registriert.[85].

Es wurden weitere Variationen von MALDI-Massenspektrometern (MALDI-qTOF, MALDI-FTMS, MALDI-qIT) entwickelt, die allerdings nicht so verbreitet sind.

PSD ist ein spontaner Prozess. Reicht dieser spontane Ionenzerfall nicht aus, kann die Fragmentierung durch Stöße mit einem Inertgas induziert werden. In diesem Fall spricht man von kollisionsinduzierter Dissoziation (engl. *collision induced dissociation*, CID). CID wird in der Regel mit ESI in Quadrupol-Geräten verwendet, es gibt jedoch auch einige Anwendungen für MALDI-TOF [86] und andere Konfigurationen von MALDI-Massenspektrometern mit qTOF [87] oder TOF-TOF-Massenanalytoren [88]. Die Rate der CID-Fragmentierung ist von der kinetischen Energie des Peptids abhängig. Fragmentierungen bei einer Stoßenergie bis etwa 100 eV werden als *low-energy* CID, bei Stoßenergien über 1 keV als *high-energy* CID bezeichnet [89]. Im direkten Vergleich von PSD versus *low-energy* CID wurde festgestellt, dass die Energieübertragung auf die Vorläuferionen bei beiden Methoden vergleichbar ist [73]. Sie liefern auch die gleichen Fragmentierungsmuster [90].

### 1.3.5 Fragmentierungsmechanismen

Unter *low-energy* Kollisionsbedingungen findet die Fragmentierung der Peptide grundsätzlich in der Hauptkette des Peptids statt [91]. Dadurch kann aufgrund der Fragmentmassen die Peptidsequenz berechnet werden. Nach der Fragmentnomenklatur werden die N-terminalen Fragmente mit a, b und c und die C-terminalen Fragmente mit x, y und z benannt (Abbildung 6) [92].

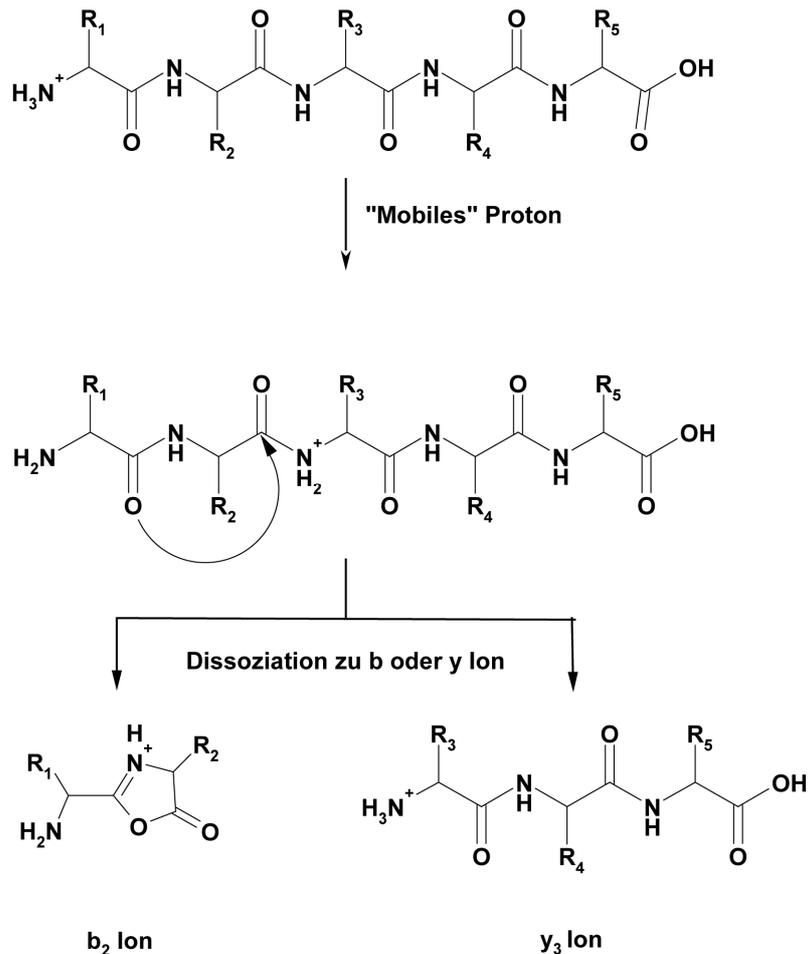


**Abbildung 6. Fragmentnomenklatur.** Die Fragmente werden entsprechend ihrer Bruchstellen nach der Notation von Bieman [92] mit einem Buchstaben für die Art des Bruchs und einem Index für Anzahl der AS in dem Fragment gekennzeichnet. R1-R5 stellen die Seitenketten der AS dar.

Die Fragmentierungseffizienz ist von der Peptidlänge, der Sequenz, den basischen Eigenschaften des Peptids und der Ladung abhängig.

Es wurden verschiedene Fragmentierungsmodelle vorgeschlagen. Je nachdem, ob ein Proton die Fragmentierung induziert oder keinen Einfluss auf die Fragmentierung hat, spricht man von „*charge directed*“- oder „*charge remote*“-Fragmentierung.

Nach dem „charge directed“ Modell ist für die effektive Fragmentierung entlang der Hauptkette des Peptids das Vorhandensein „mobiler“ Protonen notwendig. Die Fragmentierung wird durch die Übertragung von Protonen basischer Peptidpositionen (Aminoterminus der Hauptkette, Seitenketten basischer AS) auf Stickstoff in der Peptidbindung initiiert [93, 94]. Durch die Protonenbindung wird der nukleophile Angriff von Stickstoff am stärker positiv polarisierten Kohlenstoff ermöglicht, was zur Bindungsdissoziation führt (Abbildung 7).



**Abbildung 7. Fragmentierung nach dem „charge directed“ Modell.** Die Fragmentierung wird durch die Protonenübertragung auf Stickstoff der Hauptkette induziert. Die nukleophile Attacke von Stickstoff auf Kohlenstoff in der bereits protonierten Peptidbindung führt zur Bindungsdissoziation und abhängig davon, an welchem N- oder C-Terminus des Fragments das Proton lokalisiert ist, zur Bildung entweder eines b- oder y-Ions [95].

Die Energieanforderung für die Bindungsdissoziation der Peptide mit basischen AS ist deutlich höher als für die Peptide, die keine basischen AS enthalten [96]. Die Differenz entspricht der Energie, die für die „Protonenmobilisierung“ von den basischen AS auf die Peptidbindung notwendig ist.

Mit dem „charge directed“ Modell kann der Einfluss bestimmter AS, wie Aspartat [97] und Histidin [94], auf die Fragmentierung der Peptide und die Entstehung der dominanten

Fragmente erklärt werden. Das Fragmentierungsmodell mit „*mobile hydrogen*“ basiert hauptsächlich auf den Analysen mit ESI-Massenspektrometern. Die sequenzabhängige Fragmentierung wurde aber auch mit dem MALDI-qTOF-Massenspektrometer beobachtet. [98].

Die „*charge directed*“ Fragmentierungsmuster sind für die *low-energy* CID charakteristisch, das „*charge remote*“ Fragmentierungsmodell dominiert in *high-energy* CID-Spektren. Fragmentierungsanalysen mit MALDI-PSD haben gezeigt, dass sowohl „*charge directed*“ Fragmentierungen [99] als auch „*charge remote*“ Fragmentierungen möglich sind. [100].

Im Gegensatz zur *high-energy* Fragmentierung werden weder Fragmente der x-, z- und c-Ionenserien, noch Fragmente zwischen  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kohlenstoffen von den Seitenketten, welche für die Diskriminierung zwischen Isoleucin und Leucin wichtig sind, detektiert. Im Vergleich zu *low-energy* CID werden in MALDI-PSD-Spektren stärker die Immoniumionen und die internen Fragmente (Ionen ohne N- oder C-Terminus der Peptide), jedoch schwächer die y-Ionen generiert [73]. Neben den a-, b- und y-Ionen (Abbildung 8) wird auch eine charakteristische Ammoniumabspaltung (-17) von den Seitenketten von Arginin, Lysin, Glutamin oder Asparagin beobachtet. Der Verlust von Wasser (-18) kommt bei Peptiden häufig vor, die Serin, Threonin, Glutamat oder Aspartat in der Sequenz enthalten [101].

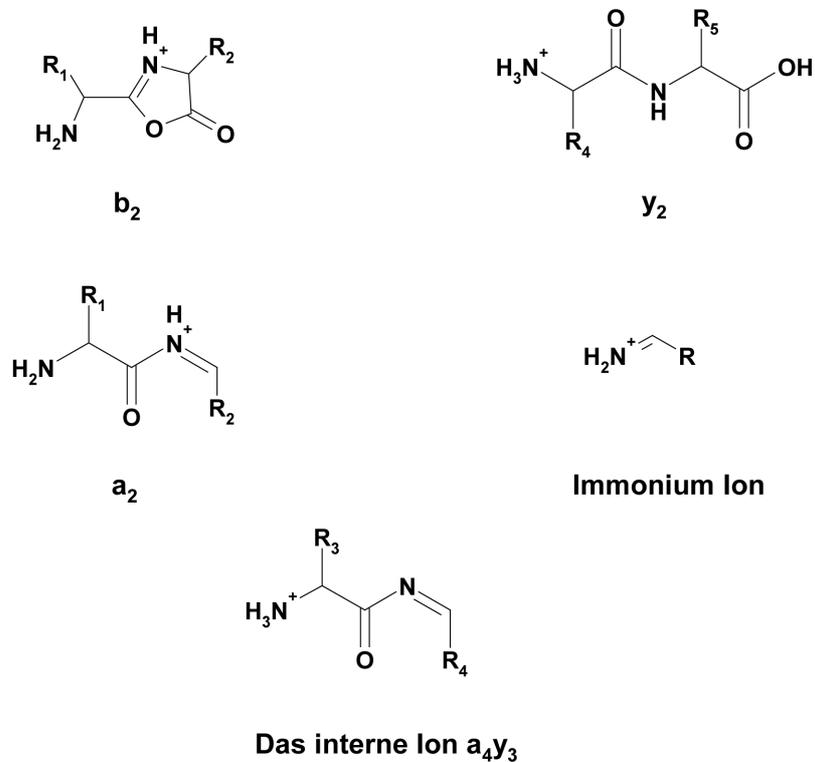


Abbildung 8. Struktur von MS/MS-Fragmenten [102]

### 1.3.6 Peptidsequenzbestimmung

Die direkte Interpretation der MS/MS-Spektren und die Bestimmung einer Peptidsequenz sind wegen der Komplexität der Spektren und oft fehlender Fragmente in den Ionenserien sehr aufwendig. Deshalb wurden Programme entwickelt, die MS/MS-Spektren mit den theoretischen Spektren der Kandidaten aus Datenbanken vergleichen [103-105]. Alle auf Datenbanken basierenden Programme beziehen die Peptidmasse ein. Im ersten Schritt werden alle Peptide aus der Datenbank ausgewählt, die die gleiche Masse aufweisen, wie das mittels MS analysierte Peptid. Die Peptide werden dann theoretisch anhand bekannter Zerfallsregeln fragmentiert und mit dem experimentellen Spektrum verglichen. Die Kandidaten, die die besten Übereinstimmungen zwischen den theoretischen und den experimentellen Spektren liefern, werden am höchsten bewertet. Solche Methoden basieren nicht direkt auf den experimentellen Daten. Die Ergebnisse sind von den verwendeten Bewertungsalgorithmen abhängig, was manchmal unterschiedliche Ergebnisse [106] liefern kann und zur Identifizierung falsch-positiver Sequenzen führt [107].

Da die Peptidmasse als Filter für die Zusammenstellung der Listen von Kandidatensequenzen verwendet wird, bleiben Mutationen oder sehr oft auch posttranslationale Modifikationen unentdeckt.

Bei der anderen Klasse von Algorithmen, auch *de novo sequencing* genannt, werden die Kandidatensequenzen direkt auf den MS/MS-Spektren basierend berechnet, d.h. unabhängig von den Sequenzen in den Datenbanken. Die Listen mit den Sequenzen können für die Suche in der Datenbank verwendet werden, um die Übereinstimmung oder Unterschiede zwischen den berechneten und in der Datenbank vorhandenen Sequenzen zu bestätigen. Mit dieser Methode können die Proteine von noch nicht sequenzierten Organismen, die aber Sequenzhomologie zu Einträgen in der Datenbank haben [108], die Mutationen oder neue posttranslationale Modifikationen aufweisen [109, 110], identifiziert werden. Außerdem können die Ergebnisse, die mit datenbankbasierten Algorithmen generiert wurden, mit *de novo sequencing* Programmen validiert werden [111].

Es wurden verschiedene *de novo sequencing* Programme für die automatische Interpretation der MS/MS-Spektren entwickelt [111-113], die allerdings für die Sequenzierung von MALDI-PSD-Spektren aufgrund der Komplexität der PSD-Spektren (interne Fragmentierung, häufige Dominanz der a- und b-Ionenserien) nicht geeignet sind. Vor kurzer Zeit wurde eine *de novo sequencing* Software Sequit! entwickelt, die auch die Identifizierung der Peptide und Proteine direkt von MALDI-PSD-Spektren ermöglicht [114]. Dieses Programm wurde in dieser Doktorarbeit für die Berechnung von Peptidsequenzen verwendet.

Für die Sequenzberechnung ist weiterhin die Qualität der Spektren (die Vollständigkeit der Ionenserien und die Messgenauigkeit) wichtig. Die sehr oft in den Ionenserien fehlenden Signale und die Komplexität der Fragmentierungsspektren, welche durch die Bildung interner Fragmente verursacht wird, erschweren die Interpretation der Spektren. Auch neutrale Abspaltungen, z.B. H<sub>2</sub>O oder NH<sub>3</sub>, aus den Seitenketten bestimmter AS können dazu führen, dass Signale von der Sequenzierungssoftware, sowohl von datenbankbasierten als auch von datenbankunabhängigen Algorithmen, als Fragmente der Ionenserie angenommen werden. Das kann wiederum zur Identifizierung falsch-positiver Sequenzen führen. Ein häufiges Merkmal solcher falsch identifizierten Sequenzen sind intensive Fragmente, die der Sequenz nicht zugeordnet werden können [115]. Deshalb sollten experimentelle Spektren zusätzlich manuell untersucht und in fraglichen Fällen mit den Spektren synthetischer Analoga abgeglichen werden, um unzulässige Identifizierungen auszuschließen und eine Peptidsequenz zu validieren.



## 1.4 Ziele für die Doktorarbeit

Das primäre Ziel dieser Doktorarbeit war die Aufklärung der HLA-Peptidome von Melanomen.

Mit den identifizierten HLA-Epitopen sollten dann die in der Literatur diskutierten Hypothesen bezüglich der Zusammensetzung des Peptidoms

HLA-gebundene Peptide stammen primär von

- hochexprimierten Proteinen
- kurzlebigen Proteinen (SLIPs-Hypothese)
- von Hochumsatzproteinen
- instabilen Proteinen (DRIPs-Hypothese)

und der Immunogenität von Tumorzellen

tumorassoziierte T-Zellepitope

- sind mutierte Epitope
- stammen aus überexprimierten Proteinen oder
- stammen aus ektopisch exprimierten Proteinen.

getestet werden.

Außerdem sollten mit den Daten aus vergleichenden Peptidomanalysen von unterschiedlichen Melanomzelllinien der Grad übereinstimmender (public) versus individualisierter (privat) Antigenität abgeschätzt werden.

Als Beitrag für die Entwicklung von Vorhersageprogrammen für HLA-Epitope sollten die Sequenzen der identifizierten HLA-gebundenen Peptide bezüglich HLA-allelspezifischer Bindungsmotive untersucht werden.



## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Bezugsquelle
30% Acrylamid/Bisacrylamid Lösung (29:1)	Biorad, München
<sup>51</sup> Cr-Natriumchromatlösung (Aktivitätskonzentration 1 mCi/ml)	PerkinElmer, Rodgau
Acetonitril	JT baker, USA
aktivierte CH-Sepharose 4B	Amersham Bioscience, Freiburg
Ammoniummonophosphat	Sigma Steinheim
BCIP/NBT (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat / Nitroblau-Tetrazoliumsalsz)	Moss, USA
CaCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
CHAPS	Roth, Karlsruhe
DHB (2,5-Dihydroxybenzoesäure)	Sigma, Steinheim
DMSO	Thermo Scientific, Bonn
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Merck, Darmstadt
Ethanol	Sigma, Steinheim
Fluorescein-5-maleimid	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Glycerol	Roth, Karlsruhe
HCCA ( $\alpha$ -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure)	Bruker Daltonics, Bremen
Imidazol	Qiagen, Hilden
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid)	Qiagen, Hilden
Merkaptoethanol	Sigma, Steinheim
MnCl <sub>2</sub>	Merk
MOPS (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid)	Merck, Darmstadt
NaCl	Sigma, Steinheim
NP-40 (10%)	Thermo Scientific, Bonn
Pefabloc	Roche, Mannheim
Peptid-Kalibrierungsmischung II	Bruker Daltonics
Proteaseinhibitorcocktail	Sigma, Steinheim
RBCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
S-adenosyl-L-[methyl- <sup>3</sup> H] Methionin (SAM) (spezifische Aktivität von 81 Ci/mmol)	(Amersham Biosciences, Freiburg)
Saponin	Sigma, Steinheim
SDS ( <i>Sodium dodecyl sulfate</i> )	Sigma, Steinheim
Streptavidin-AP-Konjugat	Roche, Mannheim
TFA	Sigma, Steinheim

Tris (Trishydroxymethylaminomethan)	Sigma, Steinheim
Triton X-100 (10%)	Thermo Scientific, Bonn
$\beta$ -Octylglukosid	Roche, Mannheim

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Bezugsquelle
6 Well Zellkulturplatten	Sarstedt, Nymbrecht
96 Well U-Bodenplatten	Nunc Nunc, Wiesbaden
96 Well V-Bodenplatten	Nunc Nunc, Wiesbaden
96 Well Zellkulturplatten	TPP, Trasadingen, Schweiz
96 Well-ELISPOT-Platten	Millipore, Schwalbach
96 Well-Filterplatten	Millipore, Schwalbach
96 Well-Luma-Platten	Packard biosciences, Niederlande
Centricon Ultrafiltrationseinheiten YM-3	Millipore, Schwalbach
Combitips Plus 5 ml steril	Eppendorf, Hamburg
Combitips Plus 5 ml unsteril	Eppendorf, Hamburg
Cryos 2 ml steril	Greiner bio-one, Frickenhausen
Einmal 0,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Einmal 1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Einmal 2,0 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Einmal Pipettenspitzen 2 $\mu$ l, 200 $\mu$ l, 1000 $\mu$ l steril	Gilson, Limburg
Macs-Säulen MS	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Nunclon Trippel Flaschen	Nunc, Wiesbaden
Pipetten 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml steril	Costar, New York, USA
Zellkulturflaschen 25, 75, 175 cm <sup>2</sup>	Nunc, Wiesbaden

### 2.1.3 Instrumente und Zubehör

Produkt	Bezugsquelle
5ml Protein G-Sepharose Säule	Amersham Bioscience, Freiburg
600/384 TM AnchorChip MALDI Target	Bruker Daltonics, Bremen
Acurate <sup>TM</sup> Microflow-Prozessor	LC Packings, Niederlande
Bestrahlungsgerät IBL 437C	CIS bio international, Berlin
Beta-Counter	Packard Biosciences, Niederlande
Brutschrank Hera Cell 240	Heraeus, Hanau
ELISpot Bio-Reader 3000	Biosys, Karben
ESI- MicroTOF-Q I Massenspektrometer	Bruker Daltonics, Bremen
FACS-Calibur Durchflusszytometer	Becton Dickinson, Heidelberg
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Fluorescent Image Analyser FLA-2000	Fuji Film Japan
Flusssplitter	LC Packings, Niederlande

<b>Produkt</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Fuji LAS1000 Luminescent Image Analyser	Fuji Film Japan
Mini Protean Electrophoresis System	Biorad, München
MR 700 Microplate Reader	Dynatech Laboratories, USA
Nano-HPLC Ultimate 3000	Dionex, Darmstadt
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Königshofen
Optischer Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen
PepMap Nano-HPLC Säule, C <sub>18</sub> (75µm × 15cm)	LC Packings, Niederlande
Probot Fractionsammler	LC Packings, Niederlande
Reflex IV Massenspektrometer	Bruker Daltonics, Bremen
Rotationsschüttler Innova 4000	New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen
Slide-A-Lyzer Dialyse-Kammer (7000 Da Auslußgrenze)	Thermo Scientific-Pierce, Bonn
Solvent delivery system	ABI, Lauertal
Tischzentrifuge Eppendorf 5417	Eppendorf, Hamburg
TopCount TM Lumineszenzzähler	Packard Biosciences, Niederlande
Ultrachallbad Sonorex RK 510	Bandelin, Berlin
Ultrazentrifuge LE-80K	Beckman, Krefeld
Umkehrphase-Säule µRPC SC 2.1/10, C2/C18 (2.1×100mm)	Amersham Bioscience, Freiburg
Vakuumentrifuge (Speed Vac)	Thermo Savant, Sant Jose, USA
Zentrifuge Avanti J-25	Beckman, Krefeld
Zentrifuge CS-6KR	Beckman, Krefeld

#### 2.1.4 Antikörper

<b>Produkt</b>	<b>Konjugat</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Anwendung</b>
Maus-anti-Human CD3	PerCP	1:50	BD, Heidelberg	DFZ
Maus-anti-Human CD4	FITC	1:50	Dako, Hamburg	DFZ
Maus-anti-Human CD8	APC	1:50	BD, Heidelberg	DFZ
Maus-anti-Human INF-γ	-	1:500	Pierce Endogen, Bonn	ELISpot
Maus-anti-Human-INF-γ	Biotin	1:250	Pierce Endogen, Bonn	ELISpot
Maus-anti-MHCII (Tü39)	-	-	Eigene Herstellung	AC
Maus-anti-MHCI (W6/32)	-	1:5	Roche	CrR
Maus-anti-MHCI (W6/32)	-	-	Eigene Herstellung	AC

AC, Affinitätschromatographie; APC, Allophycocyanin; CrR, 51Cr-Freisetungsassay (51Cr-release assay); DFZ, Durchflußzytometrie; FITC, Fluoreszeinisothiocyanat; PerCP (Peridinin-chlorophyl-protein complex); WB, Westernblot,

### 2.1.5 Proteine und Enzyme

Produkt	Bezugsquelle
BSA (Bovine serum albumin)	Sigma, Steinheim
Histone 4	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Lysozym	Sigma, Steinheim
PRMT1 (Protein-Arginin-Methyltransferase)	Millipore, Schwalbach
rhIL-2 (rekombinantes humanes Interleukin-2)	Chiron, München
$\beta_2$ -Mikroglobulin	Sigma, Steinheim

### 2.1.6 Reagenziensets

Produkt	Bezugsquelle
BCA (Bicinchonic acid) protein Assay Reagent Kit	Thermo Scientific-Pierce, Bonn
Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (NE-PER)	Thermo Scientific-Pierce, Bonn
Qiafilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Qiaprep spin Miniprep	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraktion Kit	Qiagen, Hilden
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen GmbH, Darmstadt

### 2.1.7 Vektoren

Bezeichnung	Resistenzmarker	Bezugsquelle
pCR.2.1	Ampicilin	Invitrogen GmbH, Darmstadt
pQE-30	Ampicilin	Qiagen, Hilden

### 2.1.8 Peptide

Alle in dieser Arbeit verwendeten synthetischen Peptide wurden von der EMC Microcollections (Tübingen) hergestellt. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Peptide ad 20 mg/ml in DMSO unter Stickstoff-Atmosphäre gelöst.

### 2.1.9 Oligonukleotidprimer

Alle Primer wurden nach eigenem Design von der Firma Biotex Berlin-Buch GmbH (Berlin) synthetisiert.

Primer gegen den GPS2 Sequenzfragment (539bp):

TTGGCTCTACAGGAAGAGAAGC (for),  $T_m=55^\circ\text{C}$

ATCTGCTTTTGCAAGGACAGGG (rev),  $T_m=55^\circ\text{C}$

Primer für die GPS2 Klonierung in den pQE-30 Vektor (ohne Start Kodon):CATCAGGATCCCCCGCACTCCTGGAGCG (for),  $T_m=68^\circ\text{C}$ CATGCGGTACCTCACTTGTGGTAGAATCGGGTT (rev),  $T_m=68^\circ\text{C}$ 

## 2.2 Medien und Puffer

### 2.2.1 Medien

- Agar (MP Biomedicals, Hessen) 1,5 %ig für die Herstellung von Agar-Platten
- DMEM (Gibco-BRL, Karlsruhe) mit 5 % hitzeinaktiviertem FCS (Biochrom, Berlin), 5% hitzeinaktiviertem NCS (Gibco), 100 U/ml Streptomycin-Amphotericin(Gibco), 50  $\mu\text{M}$  Merkcaptoethanol (Gibco-BRL).
- Einfriermedium: 90 % hitzeinaktiviertes FCS, 10 % DMSO (Roth).
- *Ex vivo* Medium (BioWhittaker, Viewers, Belgien).
- LB-Medium: 10 g/l Tryptone (Sigma), 5g/l Hefenextrakt (Sigma), 10 g/l NaCl
- RPMI (Gibco) mit 10 % FCS, Antibiotika und Merkcaptoethanol.

### 2.2.2 Puffer

- PBS ohne Calcium und Magnesium pH 7.2 (Gibco)
- Tris-Puffer für die Isolierung der MHC-Peptid-Komplexe: 20 mM Tris, 145 mM NaCl, pH 7,4
- MACS Puffer: 2 mM EDTA, 0,5 % BSA in PBS
- 10  $\times$  TBE Puffer: 0,5 M Tris (), 0,01 M EDTA, 0,5 M Borsäure
- Laufpuffer für die Agarose-Gelelektrophorese: 1  $\times$  TBE Puffer
- Probenpuffer für Agarosegele: 0.01 M Tris-HCl, 0,1 % (w/v) Orange G, 20 % (v/v) Ficoll Plus (Amersham Biosciences)
- Laufpuffer für die SDS-PAGE Elektrophorese: 0,192 M Glycin, 0,1 % SDS, 0,025 M Tris, pH 8,3
- 6 $\times$ Proben Puffer für SDS-PAGE (10ml): 7 ml 0,25 M Tris-Cl/SDS pH=6.8, 3 ml (30 % v/v) Glycerol, 1g (10 % w/v) SDS, 1,2 mg Bromphenol Blau. Dazu wurde  $\beta$ -Merkaptoethanol frisch in einer Konzentration von 2 % eingesetzt.

Zusammensetzung der Lösungen für SDS-PAGE:

- Trenngel (12%)
- 12 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid

- 0,2 % (w/v) SDS
- 0,38 M Tris pH 8,8
- 0,06 % (w/v) Ammoniumpersulfat
- 0,01 % (v/v) TEMED
  
- Sammelgel (4%)
- 4 % (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid
- 0,2 % (w/v) SDS
- 0,125 M Tris pH 6,8
- 0,06 % (w/v) Ammoniumpersulfat
- 0,01 % (v/v) TEMED
  
- Coomassie-Färberlösung
- 0,5 % (w/v) Coomassie Blue
- 50 % (v/v) Methanol
- 10 % (v/v) Essigsäure
  
- Entfärberlösung
- 40 % (v/v) Methanol
- 10 % (v/v) Essigsäure
- 50% bidest. Wasser

## 2.3 Zellbiologische Methoden

### 2.3.1 Cryopräservation und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden eukaryotischen Zellen mit PBS gewaschen und bei  $300 \times g$  für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet suspendiert und in kaltem Einfriermedium aufgenommen und die Zelldichte auf  $2 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt und in Aliquots von 1 ml in Einfrierröhrchen in einem  $-80^\circ\text{C}$  Gefrierschrank mit einer Abkühlungsrate von  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  eingefroren. Nach einer Nacht bei  $-80^\circ\text{C}$  wurden die Röhrchen für die Langzeitlagerung in eine  $-140^\circ\text{C}$  Tiefgefriertruhe überführt.

Nach schnellem Auftauen wurden die Zellen in 10 ml auf Raumtemperatur vorgewärmtes PBS aufgenommen und bei  $300 \times g$  für 10 min abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in Kulturmedium resuspendiert und die Zellen bei  $37^\circ\text{C}$  und 8 %  $\text{CO}_2$  kultiviert.

Zur Konservierung von Bakterien wurden in die Bakterienkulturmedium gezüchtete Zellen mit gleichem Volumen von 40 % Glycerol gemischt und bei -80 C eingefroren und gelagert. Das Auftauen der Zellen erfolgte auf Eis.

### 2.3.2 Kultivierung von Melanomzelllinien

Insgesamt wurden vier Melanomzelllinien (ChaMel 41, ChaMel 84, ChaMel 100 und ChaMel 105) kultiviert, die aus Tumormetastasen von vier HLA-typisierten Melanopatienten etabliert worden waren. Die Zellen wurden in Tripel-Flaschen in DMEM Medium bei 37°C und 8 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Melanomzellen wachsen adhärent. Daher wurden die Zellen zum Ablösen vom Flaschenboden einmal mit PBS gewaschen, in 3 mM EDTA in PBS inkubiert und bei 300 × g für 10 min abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen entweder durch Zugabe von frischem Medium weiter kultiviert oder als Pellet in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 C aufbewahrt.

### 2.3.3 Kompetitiver Bindungsassay

Um die relativen Bindungsaffinitäten der Peptide an den HLA-A11 Molekülen zu bestimmen, wurde ein Kompetition-basierter HLA-Peptidbindungsassay durchgeführt [116]. Dafür wurde die EBV-transformierte, HLA-A11<sup>+</sup> B-lymphoblastoide Zelllinie und das mit Fluorescein gekoppelte Referenzpeptid (siehe Abschnitt 2.4.14) verwendet.

Die Zellen wurden nach dem Auftauen für mindestens eine Woche in DMEM-Medium kultiviert. Vor dem Assay wurden die Zellen bei geringer Geschwindigkeit (228×g) 5 min abzentrifugiert, um die toten Zellen und Membranvesikel zu entfernen. Das Zellpellet wurde 5 min auf Eis gestellt, in 2 ml gekühlten Citratpuffer pH 3,1 (0,263 M Zitronensäure, 0,123 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1/1 (v/v) resuspendiert und 90 sek auf Eis inkubiert. Der niedrige pH-Wert des Puffers verursacht die Dissoziation der leichten Kette des β<sub>2</sub>-Mikroglobulin von der schweren Kette des MHC-Moleküls, wodurch gleichzeitig das an das MHC-Molekül gebundene endogene Peptid freigesetzt wird. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 2×12 ml DMEM/0,5 % BSA gewaschen und 3 min bei 450 × g bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in einer Dichte von 7×10<sup>5</sup> Zellen/ml in DMEM/0,5 % BSA mit 2 µg/ml rekombinanten β<sub>2</sub>-Mikroglobulin gemischt. Die Testpeptide (Kompetitorpeptide) wurden in einer 96 Well Platte in seriellen Verdünnungsreihen (Verdünnungsfaktor 2,5) in Konzentrationen von 600 µM bis 0,15 µM vorbereitet und mit dem gleichen Volumen an Fluorescein gekoppeltem Referenzpeptid (10 µM) gemischt. Davon wurden 50 µl auf eine neue 96 Well Platte übertragen. Für jede Peptidkonzentration wurden Triplikate vorbereitet. Anschließend wurden 100 µl Zellsuspension (7×10<sup>4</sup> Zellen/well) dazupipettiert und die Platte

für die Bildung neuer HLA-Peptid Komplexe in einem Brutschrank für 4 h bei 26°C unter feuchter Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS/0,1 % BSA gewaschen, 5 min bei  $500 \times g$  bei 4°C abzentrifugiert, in 100  $\mu$ l PBS/0,1 % BSA aufgenommen und die Fluoreszenz mittels Durchflusszytometrie vermessen. Als Positivkontrolle dienten dabei Zellen, die nur mit dem Fluorescein gekoppelten Referenzpeptid inkubiert wurden. Als Negativkontrolle wurden Zellen ohne Peptid verwendet.

Für die Berechnung der Inhibition der Bindung des Referenzpeptides wurde folgende Formel verwendet:

$$[1 - (\text{MF}_{\text{Testpeptid}} - \text{MF}_{\text{Negativkontrolle}}) \div (\text{MF}_{\text{Referenzpeptid}} - \text{MF}_{\text{Negativkontrolle}})] \times 100 = \% \text{ Inhibition}$$

$\text{MF}_{\text{Referenz/Testpeptid}}$  = mittlere Fluoreszenz der Zellen in Gegenwart des Kompetitorpeptides

$\text{MF}_{\text{Negativkontrolle}}$  = mittlere Fluoreszenz der Zellen ohne Peptid

$\text{MF}_{\text{Referenzpeptid}}$  = mittlere Fluoreszenz der Zellen mit Referenzpeptid (maximale Bindung des Referenzpeptids an HLA-A11).

Mittlere inhibitorische Konzentration ( $\text{IC}_{50}$ ) wurde mit Hilfe der SigmaPlot Software (SPS Inc., München) als Konzentration an Inhibitor, die für halbmaximale Reduktion der Bindung erforderlich ist, berechnet.

### 2.3.4 Isolierung von PBMC aus dem Vollblut

Die PBMC Isolierung aus dem Vollblut der Patienten oder gesunder Spender erfolgte mittels einer Dichtegradientenzentrifugation über Ficoll. Dabei wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen 1/3 des Gesamtvolumens an Ficoll vorgelegt und mit 2/3 des Gesamtvolumens Blut überschichtet. Die Zellen wurden bei  $913 \times g$  für 20 min bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. In der Interphase lagerten sich die mononukleären Blutzellen in einem sichtbar weißen Ring an. Der Lymphozytenring wurde mit einer Transferpipette abgesaugt, in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und für 10 min bei  $350 \times g$  zentrifugiert. Anschließend wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl pro ml bestimmt. Die Zellen wurden bei  $350 \times g$  für 10 min. erneut zentrifugiert und das Pellet dann in Einfrier- oder in Zellkulturmedium resuspendiert.

### 2.3.5 Anreicherung von $\text{CD8}^+$ T-Zellen aus PBMC

Aus dem Vollblut isolierte PBMC wurden in MACS-Puffer resuspendiert und entsprechend der Herstelleranweisungen mit den magnetischen anti- $\text{CD8}^+$  Beads (Miltenyi Biotech) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit MACS-Puffer gewaschen und bei  $350 \times g$  für 10 min zentrifugiert. Währenddessen wurden MS-MACS-Säulen (Miltenyi) in einem

Magneten positioniert und mit 500 µl MACS-Puffer äquilibriert. Die Zellen wurden in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert und auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde dreimal mit 500 µl MACS-Puffer gewaschen. Der Durchfluss, der die CD8<sup>-</sup>-T-Zellfraktion enthält, wurde gesammelt und nach Bestrahlung mit 33 Gray in einem Gamma-Bestrahlungsgerät als antigenpräsentierende Zellen (*antigen presenting cell*, APC) verwendet. Anschließend wurde die Säule aus dem Magneten entfernt und die CD8<sup>+</sup> T-Zellen in 1 ml MACS Puffer eluiert. Die Reinheit der beiden Fraktionen wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt.

### **2.3.6 Überprüfung der CD8<sup>+</sup> T-Zellanreicherung**

Um die prozentuelle Zusammensetzung der mittels MACS angereicherten Lymphozyten in den Proben zu bestimmen, wurden diese mittels Durchflusszytometrie analysiert. Ungefähr  $1 \times 10^5$  Zellen wurden in FACS-Röhrchen überführt, mit PBS gewaschen und 10 min bei  $350 \times g$  zentrifugiert. Danach wurden die Zellen mit je 2 µl anti CD3<sup>+</sup> PerCP, anti CD4<sup>+</sup> FITC sowie anti CD8<sup>+</sup> APC Antikörpern und 100 µl PBS für 20 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nichtgebundene Antikörper wurden durch Waschen mit PBS und anschließendes Abzentrifugieren entfernt. Die Zellen wurden erneut in PBS resuspendiert. Die Fluoreszenz wurde mit dem Durchflusszytometer FACS-Calibur (BD) vermessen. Für die Auswertung wurde die Cellquest Pro Software (BD) verwendet.

### **2.3.7 *In vitro* Priming von CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit den synthetischen Peptiden**

Für das *in vitro* Priming wurden die mittels MACS isolierten PBMC (Abschnitt 2.3.3.2) verwendet. Die bestrahlte CD8<sup>-</sup>-Fraktion wurde als APC verwendet. Die APC wurden mit 10 µg/ml synthetischen Peptiden für 1 h bei Raumtemperatur in X-Vivo 15 Medium (BioWhittaker, Verviers, Belgien) gepulst. Die nichtgebundenen Peptide wurden durch Waschen mit 10 ml PBS und darauf folgendes Abzentrifugieren entfernt. Die mit Peptid beladenen Zellen wurden mit den CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Verhältnis 1:1 gemischt und mindestens 14 Tage unter Zugabe von rekombinantem humanem IL-2 (Chiron, München) (100 U/ml) an jedem dritten Tag bei 37°C und 8 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Antigenpezifität der T-Zellen wurde im ELISpot- (*Enzyme Linked Immuno Spot*) Assay getestet.

### **2.3.8 Die Stimulation von Tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) mit den autologen Melanomzellen**

Die aus Tumoren isolierten und mit CD3/CD28-Beads stimulierten TIL wurden von Fr. Steffani Gross zur Verfügung gestellt. Weitere Expansion der Zellen wurden durch die Stimulation mit der autologen Melanomzelllinie ChaMel 84 ausgeführt. Dafür wurden die Zellen in einem Verhältnis 1:1 auf eine 6 Wellplatte gemischt und kurzfristig für 16-24 h im

RPMI-Medium bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die nicht adhärenen Zellen, die überwiegend aus den T-Lymphozyten bestehen, wurden mit einer Pasteurpipette abgenommen. Die Platte wurde vorsichtig einmal mit PBS gewaschen, um verbliebene T-Zellen aufzunehmen. Die Zellen wurden 10 min bei  $300 \times g$  abzentrifugiert und weiter im RPMI Medium unter Zugabe von IL-2 mindestens 14 Tage kultiviert.

### 2.3.9 ELISpot

Mittels ELISpot-Analyse wurde die antigenspezifische INF- $\gamma$ -Produktion der T-Zellen bestimmt. Hierzu wurden entweder mit Peptid-stimulierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen oder komplette PBMC verwendet.

Bei Verwendung der kompletten PBMC wurde die Anzahl der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den PBMC vorher mittels Durchflusszytometrie (Abschnitt 2.3.6) bestimmt. 100.000 bis 500.000 PBMC wurden direkt auf einer mit anti-humanem INF- $\gamma$ -Antikörper (Pierce Endogen) beschichteten MultiScreen IP 96 well Platte (Millipore) ausplattiert und mit 10  $\mu\text{g/ml}$  synthetischem Peptid gepulst.

Zur Bestimmung der Antigenpezifität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach *in vitro* Priming wurden zunächst 100.000 APC je 100  $\mu\text{l}$  X vivo Medium mit 10  $\mu\text{g/ml}$  Peptid in einer separaten Rundboden-96-Wellplatte für 30 min bei RT inkubiert. Die CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden inzwischen mit PBS gewaschen und in einer Konzentration von  $3,5 \times 10^4$  Zellen/Well auf eine mit anti-humanem INF- $\gamma$  Antikörper beschichteten MultiScreen IP 96 Wellplatte aufgetragen. Anschließend wurden die mit dem Peptid beladenen APC dazugegeben. Als Negativkontrollen wurden CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit ungeladenen APC, T-Zellen ohne Peptid und APC, sowie APC alleine verwendet. Als Positivkontrolle wurden mit 3  $\mu\text{g/ml}$  PHA behandelte CD8<sup>+</sup> T-Zellen verwendet.

Anschließend wurden die Zellen bei 37°C und 8 % CO<sub>2</sub> für 16-24 h im Brutschrank inkubiert. Die Platte wurde dreimal mit PBS gewaschen. Es folgte die Zugabe von 50  $\mu\text{l/well}$  des biotinylierten anti-humanen INF- $\gamma$  Antikörpers in einer Konzentration von 5,01  $\mu\text{g/ml}$ . Der Antikörper wurde in 4 % BSA in PBS verdünnt. Die Platte wurde bei RT in einer feuchten Kammer für 1,5 h inkubiert. Die Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen und nach Zugabe von 50  $\mu\text{l/well}$  0,5 U/ml Streptavidin-AP-Konjugat für eine weitere Stunde in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Platte wurde dann dreimal mit PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden 50  $\mu\text{l/well}$  NBT/BCIP Substrat zugegeben und die Platte bei 37 °C inkubiert bis die Spots sichtbar wurden. Die Farbreaktion wurde durch Waschen mit Wasser gestoppt. Die Anzahl der Spots wurden mit einem ELISpot-Reader ermittelt.

### 2.3.10 $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungssassay

Die zytolytischen T-Zellfunktionen wurden in  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungssassays untersucht. Dafür wurden 500.000 autologen Melanomzellen in 100  $\mu\text{l}$  DMEM-Medium suspendiert und mit radioaktiven  $^{51}\text{Cr}$ -Lösung (250  $\mu\text{Ci}$ ) für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Der Überschuss an Chrom wurde durch fünfmaligem Waschen der Zellen mit Medium entfernt und die Zellen mit 3000 Zellen/Well in eine 96 Well-Rundboden-Platte ausplattiert und mit 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  synthetisches Peptid und oder ohne 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  anti-HLA W6/32 Antikörper für 30 Min. bei R.T. gepulst. Anschließend wurden die  $\text{CD8}^+$ -T-Zellen in einem Verhältnis 20:1 zu den Melanomzellen zugegeben und die Platte für vier Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Das Gesamtvolumen pro Well betrug dabei 200  $\mu\text{l}$ . Als Kontrollen wurden 6 Wells mit Detergenz-Saponin behandelten Zielzellen für die Bestimmung der maximalen  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung oder die Zellen in Medium für die Bestimmung der spontanen  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung von den Zellen verwendet. Nach vierstündiger Inkubation wurden die Zellen bei  $300 \times g$  für 5 min abzentrifugiert, 100  $\mu\text{l}$  der Überstände in Messröhrchen überführt und anschließend das freigesetzte Chrom mit Hilfe eines  $\gamma$ -Counters (Packard, Dreieich) vermessen.

Für die Berechnung der spezifischen  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung wurde folgende Formel verwendet:  
[(experimentelle  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung – spontane  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung)  $\div$  (maximale  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung – spontane  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung)]  $\times 100 = \% \text{ Lyse}$

## 2.4 Proteinchemische Methoden

### 2.4.1 Antikörperproduktion für die Isolierung von MHC-Molekülen

Die Hybridomazelllinien, die für die Antikörperproduktion verwendet wurden, wurden in DMEM-Medium mit 5 % NCS in Rollerflaschen kultiviert. Danach wurden die Zellen bei  $2.969 \times g$  für 30 min. bei 4°C abzentrifugiert und die Überstände für die Antikörperisolierung verwendet. Dazu wurden die Proteine durch Zugabe von  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  bis zu einer Endkonzentration von 50 % bei 4°C über Nacht (ü.N.) präzipitiert und bei  $11.878 \times g$  für 30 min. bei 4°C abzentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Proteinpellet in einem kleinen Volumen von 34 mM Acetatpuffer (pH 4,75) gelöst und auf eine 5 ml Protein G-Sepharose-Affinitätsäule aufgetragen. Die Säule wurde mit 5 Säulenvolumen Acetatpuffer gewaschen. Durch Zugabe von 100 mM Glycin, pH=2,5 wurden die an Protein G gebundenen Antikörper von der Säule eluiert. Die Eluate wurden in 1 M Tris, pH=8 gesammelt und die Proteine durch Zugabe einer gesättigten  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  Lösung (1:1) bei 4°C ü.N. gefällt. Die präzipitierte Proteine wurden bei  $7.728 \times g$  für 30 min. bei 4°C abzentrifugiert und das Proteinpellet in bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst. Die Reinheit der Antikörper wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Danach wurden die Antikörper bei 4°C gegen PBS dialysiert, um verbliebenen

Ammonium zu entfernen. Die Antikörper wurden in 50 % Glycerol in 10 mg Aliquots bei -80°C gelagert.

#### **2.4.2 Säulenvorbereitung für die Affinitätschromatographie**

Für die Affinitätssäulen wurde CNBr-aktivierte-Sepharose 4B als Matrix verwendet. Die Antikörper wurden zur Kopplung per Dialyse im Kopplungspuffer (0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 M NaCl, pH 8,0) ü.N. umgepuffert. Die Kopplung wurde nach dem Standardprotokoll des Herstellers durchgeführt. Für eine 5 ml Säule wurden 10 mg Antikörper eingesetzt. Es wurden drei Säulen vorbereitet. Eine Säule wurde mit W6/32 monoklonalem Maus Antikörper gekoppelt und für die Isolierung der MHC-I-Peptid-Komplexe verwendet. Für die Isolierung der MHC-Klasse-II-Moleküle wurde eine mit Tü39 Antikörper gekoppelte Säule eingesetzt. Eine mit dem Antikörper 19.1-178 gekoppelte Säule diente als Vorsäule.

#### **2.4.3 Peptidisolierung von MHC-Molekülen**

Für die direkte Isolierung der MHC-gebundenen Peptide wurde die folgende beschriebene Methode verwendet [117, 118]. Die Tumorzellen wurden in Lysepuffer (Tris-Puffer, pH 7,4, mit 0,3 % CHAPS, 0,2 % NP-40, 1 mM EDTA und 1 mM Pefabloc) aufgenommen und unter Rotieren bei 4 °C für 30 min lysiert. Das Lysat wurde bei 500 × g für 15 min zentrifugiert, um die unlösliche Membranfraktionen oder nicht vollständig lysierte Zellen von den gelösten Proteinen abzutrennen. Die Zelllyse wurde dreimal wiederholt. Die Effizienz der Lyse wurde optisch mittels Mikroskopie geprüft. Im Fall einer großen Anzahl intakter Zellen wurde die Lyse noch einmal wiederholt. Zelluläre Bruchstücke wurden durch Ultrazentrifugation bei 100.000 × g für 1 h beseitigt. Die Isolierung der MHC-Peptid-Komplexe erfolgte mittels Affinitätschromatographie (zur Säulenvorbereitung siehe 2.3.3). Nach dem Auftragen des Zelllysats wurden die Säulen nacheinander mit Tris-Puffer (pH 7,4), Waschpuffer 1 (Tris-Puffer, pH 7,4 mit 0,3 % CHAPS), Waschpuffer 2 (Tris-Puffer + 0,3% β-Octylglykozid) und abschließend mit ultrareinem Wasser gewaschen. Die an der Säule gebundenen MHC-Peptid Komplexe wurden mit einer 0,7 % TFA Lösung eluiert und in einer Vakuumzentrifuge (Speed Vac) getrocknet. Danach wurde das Lyophilisat in 5 % Acetonitril mit 0,1 % TFA gelöst. Die Peptide wurden durch Ultrafiltration mit einem Centricon zentrifugalen Filter (Ausschlußgrenze von 3 kDa) von hochmolekularen Komponenten abgetrennt.

#### **2.4.4 Zweidimensionale HPLC**

Nach der Ultrafiltration wurden die Peptidextrakte mittels zweidimensionaler HPLC aufgetrennt: Mikro-HPLC in der ersten und nano-HPLC in zweiten Dimension. Die Fraktionierung der Mikro-HPLC-Fraktionen trug dazu bei, die Komplexität der Proben zu

reduzieren und damit solchen bei den massenspektrometrischen Analysen der komplexen Peptidgemischen sehr oft beobachteten Effekt wie die Signalsuppression der Analytionen[77] zu minimieren. Die Mikro-HPLC wurde mit dem Smart System durchgeführt, welches mit der Umkehrphasen-Säule  $\mu$ RPC SC 2.1/10, C2/C18 ausgestattet war. Dazu wurde ein Acetonitrilgradient von 5 % bis 90 % von B (Eluent A: 0,1 % TFA in ultrareinem Wasser; Eluent B: 90 % Acetonitril, 0,1 % TFA und 10 % ultrareines Wasser) verwendet. 45 Fraktionen je 200  $\mu$ l wurden bei einer Fließgeschwindigkeit von 100  $\mu$ l/min gesammelt.

Das nano-HPLC System besteht aus dem Solvent Delivery System, welches mit dem Acurate<sup>TM</sup> microflow Processor, einem Flussplitter und mit einer 5  $\mu$ l Probenschleife ausgestattet ist. 20 - 40  $\mu$ l der Fraktionen aus der ersten Dimension wurden nahezu vollständig lyophilisiert. Die Peptidmischung wurde mit 5 % Acetonitril, 0,1 % TFA bis 5  $\mu$ l verdünnt und nach kurzer Sonifikation im Ultraschallbad bei einer Flussrate von 300 nl/min auf die Nano-C<sub>18</sub>-HPLC-Säule aufgetragen. Die Auftrennung der Peptide erfolgte mittels eines linearen Gradienten von 0 bis 80 % Eluent B (Eluent A: 5 % Acetonitril, 0,1 % TFA in ultrareinem Wasser, Eluent B: 90 % Acetonitril, 0,1 % TFA in 10 % ultrareinem Wasser) in 30 min bei einer Fließgeschwindigkeit von 200 nl/min. Fraktionen wurden alle 30 sek direkt auf einem mit der Matrix beladenen AnchorChip MALDI-Target (siehe 2.4.5) gesammelt. Dafür wurde der Probot-Fraktionssammler verwendet.

#### **2.4.5 Probenpräparation für die MALDI-TOF Massenspektrometrie**

Für die Analyse der HLA-Peptide wurde HCCA ( $\alpha$ -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure) als Matrix verwendet. Zur Herstellung der Matrixlösung wurde kristallines HCCA zu einer Endkonzentration von 4 mg/ml in Ethanol-Acetonitril-Wasser (60:30:10 v/v/v) + 0,1 % TFA gelöst. Um die Sensitivität der Peptiddetektion zu verbessern und die Bildung der Matrix-Cluster zu unterdrücken, wurde ein Überschuss an NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich) zur Matrixlösung gegeben und im Ultraschallbad 5 min sonifiziert. Das Auftragen der Matrixlösung auf die MALDI-Targets erfolgte durch das Eintauchen der GELoader Pipettenspitze in die Lösung, wobei durch Kapillarkräfte die Flüssigkeit in die Spritze eingezogen wird, und darauffolgendes Antippen der Probenposition auf dem Target mit der Pipettenspitze.

#### **2.4.6 Aufnahme und Auswertung von MALDI-TOF-MS und MALDI-TOF-PSD Spektren**

Die nano-HPLC-Fractionen oder synthetische Peptide wurden mit einem Massenspektrometer MALDI-TOF Reflex IV analysiert. Zur Kalibrierung des Massenspektrometers wurde die Peptid-Kalibrierungsmischung II (Bruker Daltonics) eingesetzt. Die Aufnahme der MALDI-

TOF-MS- und MALDI-TOF-PSD-Spektren erfolgte im positiven Reflektormodus unter Verwendung der Standardeinstellungen. Die Aufnahme der MS- und PSD-Spektren der MHC-Peptide wurde manuell mit justierter Stärke der Laserenergie und/oder Anzahl der Schüsse pro Spektrum oder PSD-Segment durchgeführt. Die Aufnahme der PSD-Spektren synthetischer Peptide erfolgte im automatischen Modus.

Für die Auswertung der Spektren wurde die FlexAnalysis Software 2.0 (Bruker Daltonics) verwendet. Die Annotierung der MS-Spektren erfolgte mit Hilfe der in der Software vorhandenen Standardmethode. Die Annotierung der PSD-Spektren wurde dagegen manuell durchgeführt.

Für die Peptidsequenzanalysen wurde sowohl die Peptid *de novo* sequencing Software Sequit! [114] als auch die datenbankbasierte Suchmaschine MASCOT [103] verwendet. Bei der Berechnung der Sequenzen sowie bei der Datenbanksuche wurde die Massentoleranz von 0,1 Da für das Vorläuferion und 0,5 Da für die Fragmentmassen eingegeben.

#### **2.4.7 Aufnahme der MS-Spektren und Fragmentierung von Peptiden mittels ESI-qTOF Massenspektrometrie**

Ein Teil der mit Mikro-HPLC aufgetrennten HLA-Peptide wurden mittels direkt mit Nano-HPLC-Anlage gekoppelten Electrospray-Quadrupol-Time-of-Flight-Massenspektrometers (ESI-qTOF-MS) analysiert. Die Probenpräparation zur Nano-HPLC-ESI-qTOF-MS-Analyse erfolgte wie Abschnitt 2.4.4 beschrieben, nur mit dem Unterschied, dass die Proben nach dem Zentrifugieren mit Vakuumzentrifuge in 10 µl 5% Acetonitril, 0,1 % TFA aufgenommen wurden. Die Probeninjektion wurde mittels Autosamplers ausgeführt. Die Peptide wurden zuerst auf eine C<sub>18</sub>-Vorsäule bei einer Flussrate von 20 µl/min aufgetragen. Die anschließende Auftrennung der Peptide erfolgte über eine C<sub>18</sub>-Nanosäule bei einer Flussrate von 220nl/min. Für die Elution der Peptide wurde folgender Gradient verwendet:

- 5-60 % B (0-60 min)
- 60-90 % B (60-65 min)
- 90 % B (68 min)
- % B (70 min)
- 2 % B (80 min)
- (Eluent A: 1 % Acetonitril, 0,1 % FA in ultrareinem Wasser, Eluent B: 100 % Acetonitril, 0,1 % FA).

Die Vermessung der MS- und MS/MS-Spektren wurde im vollautomatischen Modus und in einem Massenbereich von m/z 50 bis 2500 ausgeführt. Nach der Aufnahme des MS-Spektrums für 1 sec folgte die Fragmentierung der fünf intensivsten Ionen für 5 s. Als Kollisionsgas wurde Argon verwendet. Die Kollisionsenergien wurden für die MS/MS-

Analysen der HLA-Peptide angepasst und je nach Grösse und Ladungszustand des Peptids von 8 bis 50 keV variiert.

Um die erneute Fragmentierung der hoch abundanten Ionen zu verhindern und damit auch die Fragmentierung der weniger dominanten Peptide zu ermöglichen, wurden Ausschlusskriterien eingesetzt, sodass die Peptide, die bereits zweimal für die MS/MS-Analyse ausgewählt wurden, für 1 min. nicht mehr fragmentiert wurden.

Für die Auswertung der Spektren wurde die Data Analysis 3.1 Software (Bruker Daltonics) verwendet. Die datenbankabhängige Identifizierung der Peptide erfolgte über BioTools 3.0 Software (Bruker Daltonics) und der Mascot Server 2.0 (Matrix, Science, UK). Die Suche in der Swissprot-Datenbank wurde mit einer Massentoleranz von 200 ppm für das Vorläuferion und 0,2 Da für die Fragmentmassen durchgeführt: Dabei wurde die Oxidation am Methionin und die Deamidierung der AS Glutamin oder Asparagin als möglichen Modifikationen der Peptide eingegeben.

#### **2.4.8 Melanom-Zell-Lyse: Fraktionierung nach Kern und cytoplasmischen Fraktionen.**

Ca. 250 mg Tumorzellen wurden mit dem NE-PER-Kit (Thermo Scientific) lysiert und Proteinextrakte cytoplasmatischer und nukleärer Fraktionen erzeugt. Dabei wurden die Reagenzien zur Extraktion der cytoplasmischen (CER-I-Lösung) und nukleären (NER-Lösung) Proteine frisch mit Proteaseinhibitorcocktail (Sigma-Aldrich) versetzt. Zu den Zellen wurde zuerst 500 µl CER-I-Lösung und nach der intensiven Vortexen 27,5 µl CER-II-Reagenz hinzugefügt. Die Zellen wurden auf Eis für 10 min. inkubiert, um die Zellmembran aufzuschließen. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand (cytoplasmische Fraktion) in ein neues Röhrchen überführt. Das Pellet wurde in 250 µl NER resuspendiert und 40 Min. auf Eis inkubiert, um die nukleären Proteine zu extrahieren. Die Proteinkonzentrationsbestimmung in den Extrakten wurde mittels BCA (*bicinchonic acid*) Protein Assay Reagent Kit (Thermo Scientific) nach den Eingaben des Herstellers in einer 96-well Mikrotiterplatte ausgeführt. Kit enthält die Lösung A (BCA) und Lösung B ( $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ). Die Proteine reduzieren in einem alkalischen pH Bereich die  $\text{Cu}^{2+}$  Ionen zu monovalenten  $\text{Cu}^+$  Ionen, die dann die farbigen Komplexe mit BCA bilden. Zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurde auf eine 96 Wellplatte 10 µl Probe mit 200 µl Reagenzlösung, die aus 50 Teilen Lösung A und einem Teil Lösung B zusammengesetzt wurde, gemischt und für 30 Min bei 37 C inkubiert. Die Extinktion wurde mit einem ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)-Reader bei 550 nm gemessen. Anhand einer Eichreihe aus BSA (*bovine serum albumin*) bekannter Konzentrationen konnte die Proteinkonzentration der Probe bestimmt werden.

### **2.4.9 *In vitro* GPS-2-Methylierung.**

Für die *in vitro* Methylierung von GPS-2 wurden 100 µg nukleäres oder cytoplasmisches Proteinextrakt als Methyltransferasedonor, 20 µg rekombinantes His-getaggtetes GPS-2 Protein (siehe 2.5.11) sowie 64 µCi mit Tritium radioaktivmarkiertes S-Adenosylmethionin (SAM) (Amersham Biosciences) als Methylendonor verwendet. Um zu überprüfen, ob das Enzym PRMT1 für die Methylierung von GPS-2 verantwortlich ist, wurden 2 µg PRMT1 (Upstate Signaling, USA) anstelle des Proteinextraktes eingesetzt. Das Gesamtvolumen aller Reaktionsansätze betrug 120 µl. Die Methylierung erfolgte in 80 mM Tris-HCl pH 8,0 für 8 h. Als Positivkontrolle wurde anstelle von GPS-2 das Protein Histon 4, das als Substrat für PRMT1 beschrieben wurde, verwendet. Dazu wurden 5 µg Histon 4 mit 2 µg PRMT1, 76 µg nukleärem oder 100 µg cytoplasmatischem Proteinextrakt (siehe 2.4.8) und 16 µCi radioaktivmarkiertem SAM in einem Volumen von 40 µl inkubiert. 30 µl des Reaktionsansatzes wurde für die weitere Analyse mittels SDS-PAGE verwendet.

### **2.4.10 Isolierung des *in vitro* methylierten GPS-2Proteins**

Zur Isolierung des *in vitro* methylierten His-getaggteten GPS-2 Proteins wurden 20 µl Ni-Agarose-Beads (Qiagen, Deutschland) mit einer Bindungskapazität von 5-10 mg/ml verwendet. Diese Beads wurden durch zweimaliges Waschen mit dem Methylierungspuffer äquilibriert und dem Reaktionsansatz mit dem His-getaggteten GPS-2 Protein zugesetzt (siehe 2.3.30). Die Isolierung des Proteins erfolgte für 1 h bei RT unter ständiger Rotation. Anschließend wurden die Beads bei 1000 x g für 1 min abzentrifugiert, 5 × mit Waschpuffer (80 mM Tris; 20 mM Imidazol pH 8.0) gewaschen und in 20 µl 2 x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Proteine wurden 5 min bei 95°C denaturiert und mittels SDS-PAGE (12 %) aufgetrennt.

### **2.4.11 SDS-PAGE**

Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Masse erfolgte in denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Die Acrylamid Konzentration des Sammelgels betrug 4 % (Vernetzungsgrad 3,3 %) und des Trenngels 12 % (Vernetzungsgrad 3,3 %). Die Proben wurden im Verhältnis 5:1 mit 6x Probenpuffer gemischt, bei 95°C für 5 min denaturiert und auf das Gel geladen. Die Anreicherung der Probe im Sammelgel erfolgte bei einer Stromstärke von 10 mA, die Auftrennung der Proteine im Trenngel bei 15 mA. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit Coomassie gefärbt, um die Proteine sichtbar zu machen. Dafür wurde das Gel ca. 20-30 min in Färberlösung und anschließend in Entfärberlösung

inkubiert, bis die proteinfreie Gel-Matrix entfärbt wurde und die Proteinbanden sichtbar wurden.

#### **2.4.12 Visualisierung der mit Tritium radiomarkierten Proteine**

Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel in Fixierlösung (20 % Methanol, 10 % Essigsäure in Wasser) für 1 h inkubiert. Danach wurde das Gel mit Wasser gewaschen, auf Filterpapier gelegt und mit dem Vakuumtrockner Gel Dryer SE1160 (Hoeffer, USA) für 40 min getrocknet. Das getrocknete Gel wurde auf eine BAS TR2040 Imaging Platte (Fuji Film, Japan) gelegt und 4 Tage bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Visualisierung der radioaktiven Proteinbanden erfolgte mit einem Fluorescent Image Analysers FLA-2000 (Fuji Film, Japan).

#### **2.4.13 *In vitro* Methylierung der GPS-2 Peptide**

Zur *in vitro* Methylierung wurden synthetisches GPS-2-Peptide verwendet, in denen jeweils eine Aminosäure in der Peptidsequenz SQNPRFYHK durch Alanin ersetzt wurde. Zusätzlich besaßen die Peptide am N-Terminus einen His<sub>6</sub>-Tag, der zur Isolierung der Peptide aus dem Reaktionsgemisch mittels Metalchelchromatographie verwendet wurde.

Für die *in vitro* Methylierung wurden 100 µg cytoplasmatisches Proteinextrakt als Methyltransferasedonor, 1 nmol Peptid sowie 4 µCi radioaktivmarkiertes SAM als Methyl donor eingesetzt und der Reaktionsansatz in Methylierungspuffer (80 mM Tris, pH 8,0) bei 36°C für 4 h inkubiert. Als Positivkontrolle wurde 0,5 nmol rekombinantes His<sub>6</sub>-getaggt GPS2-Protein verwendet. Um die His-getaggt Konstrukte zu isolieren, wurden die Reaktionsgemische auf eine 96 Well-Filterplatte übertragen und zusammen mit 20 µl Ni-Agarose-Beads 1,5 h bei RT im Schüttler inkubiert. Der Überstand wurde durch Zentrifugation bei 2000 × g für 5 min entfernt. Um die an den Beads unspezifisch gebundenen Proteine zu entfernen, wurde die Platte dreimal mit 250 µl Waschpuffer (80 mM Tris pH 8,0, 0,01 % NP-40, 20 mM Imidazol) gewaschen. Die Elution erfolgte bei intensivem Schütteln für 1h bei RT in Elutionspuffer (80 mM Tris pH 8,0, 0,01 % NP-40, 250 mM Imidazol). Die Eluate wurden durch Zentrifugation auf eine bereits mit Szintillator beschichtete Luma Platte gesammelt und bei 50°C getrocknet. Der Elutionschritt wurde noch einmal wiederholt. Die Eluate wurden auf derselben Platte gesammelt und bei 50°C über Nacht getrocknet. Die Lumineszenz der Proben wurde am nächsten Tag mit einem Top Count Lumineszenzzähler gemessen.

#### **2.4.14 Peptidmarkierung mit Fluorescein**

Für die Herstellung chemisch modifizierten Peptides wurde Fluorescein-5-maleimid als Reagenz verwendet. Die Kopplung an die freien Thiolgruppe eines Cysteins wurde in

Kopplungspuffer (20 mM Natriumphosphat, pH 7,2), der vor der Anwendung entgast wurde, durchgeführt. Das in DMSO gelöste Fluorescein-5-maleimid wurde in 5-fachem Überschuss tropfenweise zur Peptidlösung zugegeben. Danach wurde die Mischung unter ständigem Rühren im Dunkeln bei RT ü.N. inkubiert.

Das mit Fluorescein gekoppelte Peptid wurde aus dem Reaktionsansatz mittels Reversed-Phase-HPLC gereinigt. Für die Aufreinigung wurde eine  $\mu$ RPC SC 2.1/10, C2/C18 Säule verwendet. Das Peptid wurde bei einem Gradient von 15-50 % Eluent B (Eluent A: 100 % H<sub>2</sub>O/0,1 % TFA; Eluent B: 90 % Acetonitril/10% H<sub>2</sub>O/0,1 % TFA) eluiert. Die Fraktionen wurden manuell gesammelt und die Reinheit des Peptides mittels Massenspektrometrie überprüft. Die HPLC-Fraktionen wurden im Lyophilisator getrocknet und in DMSO aufgenommen. Die Peptidkonzentration wurde mittels BCA Protein Assay bestimmt.

#### **2.4.15 Transkriptomanalysen**

Die mRNA-Expressionsdaten von Melanomzelllinien ChaMel 47, ChaMel 84 ChaMel 105 und Melanozyten wurden von Fr. Yvonne Welte zur Verfügung gestellt. Dabei wurde die genomweite mRNA-Expressionanalyse mittels HumanWG-6 v3.0 Expression BeadChip-Array (Illumina, Niederlande) ausgeführt. Die Expressionsdaten wurden mit Illumina BeadStudio Software normalisiert und ausgewertet. Der maximale Signalwert für die Expression lag bei 36.819 AU (engl. *arbitrary units*). Um die zwei Populationen (das gesamte Transkriptom vs. Transkripte von identifizierten HLA-Liganden) direkt miteinander zu vergleichen, wurden einzelne Werte auf die gesamte Anzahl der Einträge in jeweiligen Population normalisiert und für eine grafische Darstellung in einem Balkendiagramm oder für die Berechnung der kumulativen Summe von Datenwerten und somit für eine Darstellung zweier Datensätze im Form der kumulativen Verteilungskurven verwendet. Für eine statistische Auswertung der Daten wurde die Origin 8.6 Software benutzt.

#### **2.4.16 Analyse der Proteom- und HLA-Peptidomdaten**

Alle Information (Gene ID, Gensymbol, Proteinsequenz) für die Analyse auf Proteinebene wurde aus der NCBI-Datenbank verwendet. Die Klassifizierung bezüglich biologischer Funktion und subzellulärer Lokalisation der Proteine wurde anhand der in der HPRD-Datenbank (Human Protein Reference Database) vorhandenen Information durchgeführt. Für eine Zuordnung der HLA- Peptide zu den kanonischen HLA-Motiven wurde die Information in der SYFPEITHI-Datenbank verwendet. Für die Klassifizierung der Proteine nach ihren Umsatzraten wurden veröffentlichte Proteomdaten zur Bestimmung der

Geschwindigkeitskonstanten des Proteinabbau  $k_{\text{deg}}$  verwendet [119]. Die Halbwertszeiten ( $t_{1/2}$ ) des Proteinabbaus wurden nach folgender Formel berechnet:

$$(t_{1/2}) = \text{Ln}2/k_{\text{deg}}$$

Eine Vergleichsanalyse zweier Populationen wurden wie im Abschnitt 2.4.15 beschrieben, durchgeführt.

## 2.5 Molekularbiologische Methoden

### 2.5.1 Polymerase-Kettenreaktion für die Expressionsklonierung

Für die Vervielfältigung einzelner Gene mittels Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurde cDNA der aus den Melanomzelllinien isolierten mRNA als DNA-Template verwendet. Die Amplifikation der Gene wird durch die Anlagerung genspezifischer Oligonukleotide (sog. Primer) an die denaturierte cDNA mit nachfolgender DNA-Synthese durch eine thermostabile Polymerase erreicht. Die Primer wurden so designed, dass sie neben komplementären Sequenzen für die Zielgene Schnittstellen für die Restriktionsenzyme, die für die Klonierung der Gene in die Expressionsvektoren erforderlich sind enthalten. Die DNA-Konzentration wurde mit einem Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt.

Die PCR wurden wie folgt in einem Gesamtvolumen von 25  $\mu\text{l}$  angesetzt:

2,5 $\mu\text{l}$	10XHigh Fidelity PCR Puffer (Invitrogen, Karlsruhe)
2 $\mu\text{l}$	2,5 mM dNTP
1 $\mu\text{l}$	50 mM $\text{MgSO}_4$
0,5 $\mu\text{l}$	forward Primer
0,5 $\mu\text{l}$	reverse Primer
17,4 $\mu\text{l}$	$\text{H}_2\text{O}$
0,1 $\mu\text{l}$	High Fidelity Taq DNA Polymerase (Invitrogen)
1 $\mu\text{l}$	cDNA

Die PCR wurden mit folgendem Programm durchgeführt:

2 min	94°C	Initiale Denaturierung	} 29 Zyklen
40 s	94°C	DNA-Denaturierung	
50 s	58°C	Primer-Anlagerung an die Einzelstrang-DNA	
60 s	68°C	DNA-Synthese	
10 min	68°C		
$\infty$	4°C		

Die amplifizierte DNA wurde zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

### 2.5.2 Die Agarose-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung und Aufreinigung der PCR-Produkte bzw. Verdauansätze wurden Agarosegele mit 1-1,5% Agarose in 1×TBE Puffer mit 0,006 % Ethidiumbromid verwendet. Die Proben wurden mit Probenpuffer im Verhältnis 1:5 gemischt und auf das Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung der DNA wurde bei einer Spannung von 80V durchgeführt. Die aufgetrennten Genfragmente wurden anhand der durch Bindung von Ethiumbromid an die DNA bei UV-Anregung bei einer Wellenlänge von 254nm sichtbare Fluoreszenz detektiert. Die DNA wurde aus ausgeschnittenen Gelstücken mit den gewünschten Banden mit dem QIAquick Gel Extraktion Kit nach Herstellerangaben extrahiert.

### 2.5.3 TOPO-Klonierung und Transformation von *E. coli* Bakterien

Für die weitere Amplifikation der PCR-Produkte wurde die DNA mit dem TOPO TA Cloning Kit in den pCR2.1 TOPO Vektor kloniert. Die Klonierung und anschließende Transformation der *E.coli* Bakterien erfolgte nach Herstellerangaben (Invitrogen) unter Verwendung der im TOPO TA Cloning Kit vorhandenen Reagenzien und kompetenten TOP10F Zellen. Für die Ligation wurde 1 µl Salzlösung mit 4 µl DNA und 1 µl pCR2.1 Vektor gemischt. Der Ligationsansatz wurde bei RT für 5 min inkubiert. Zur Transformation der kompetenten TOP10F' Zellen wurde der Ligationsansatz zu den Zellen gegeben, 30 min auf Eis und nach einem Hitzeschock bei 42°C für 30 sec eine weitere Stunde unter Schütteln bei 37°C inkubiert. 30 µl des Transformationsansatzes wurde anschließend auf eine Agar-Platte mit LB-Medium und 200 µg/ml Ampicilin zur Selektion ausplattiert und ü.N. bei 37°C inkubiert.

### 2.5.4 Kolonie-PCR

Zur Identifizierung von Bakterienklonen, die das Plasmid mit dem richtigen Insert enthalten wurden Kolonie-PCR durchgeführt. Ausgewählten Klone wurden mit einem sterilen Zahnstochers von der Agar-Platte in mit 50 µl bidest. H<sub>2</sub>O gefüllten PCR-Reaktionsgefäße überführt. Die Bakterien wurden für 2 min bei 94°C im PCR-Thermocycler erhitzt und die dabei freigesetzte DNA als Template für die PCR verwendet.

Die PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 25 µl wie folgt angesetzt:

2,5 µl	10X PCR Puffer (Fermentas)
2 µl	dNTPs (2,5 mM)
0,5 µl	genspezifischer <i>forward</i> Primer (50pmol)

0,5 µl	genspezifischer <i>reverse</i> Primer (50pmol)
0,125 µl	Dream Taq DNA Polymerase (Fermentas)
18,375 µl	bidest. H <sub>2</sub> O
1 µl	DNA Template

Das verwendete PCR-Programm war wie folgt:

2 min	94°C	Initiale Denaturierung	} 29 Zyklen
40 s	94°C	DNA-Denaturierung	
40 s	X°C	Primer-Anlagerung an die Einzelstrang-DNA	
60 s	72°C	DNA-Synthese	
10 min	72°C		
∞	4°C		

X°C: primerspezifische Anlagerungstemperatur.

Die PCR-Ansätze wurden direkt auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen, um die PCR-Produkte nachzuweisen. Die ausgewählten insertpositiven Bakterienklone wurden dann expandiert, um größere Mengen an Plasmid-DNA für weitere, Analysen und Sequenzierungen sowie Subklonierung der Inserts in Expressionsvektoren herzustellen.

### 2.5.5 DNA-Restriktionsverdau

DNA-Restriktionsverdaue erfolgten in 20 µl Gesamtvolumen nach Herstellerangaben. Für den Verdau von 1 µg DNA wurde 1/20 des Gesamtvolumens an Enzym eingesetzt. Der Verdau wurde bei 37 °C für 10 min bzw. 1 h entsprechend Angaben der Herstellerfirma durchgeführt. Die Abtrennung der Restriktionsfragmente aus der Reaktionsmischung erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Die Banden der gewünschten Verdauprodukte wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraktion Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt.

### 2.5.6 Ligation

Für die Ligation klonierter DNA in Vektoren wurde ein 4 - 7 molarer Überschuss der Inserts im Verhältnis zum Plasmid eingesetzt, 400 U T4 DNA-Ligase und Ligase Puffer (New England Biolabs, USA) zugegeben und der Ansatz bei RT für 1 h inkubiert.

### 2.5.7 Plasmidisolierung

Für die Plasmidpräparation wurde der QIAprep Spin Miniprep Kit oder Qiagen Plasmid Midi Kit entsprechend Herstellerangaben verwendet. Für die Minipräparation wurden einzelne

Klone von der Agar-Platte gepickt und in 3 ml LB Medium plus Selektionsmarker ü.N. bei 37°C und 170 rpm im einem Rotationsschüttler inkubiert. Davon wurden 2 ml direkt für die Plasmidisolierung eingesetzt. Eine 200 ml Übernachtkultur wurde für eine Midipräparation verwendet, um größeren Mengen an DNA-Plasmid zu gewinnen.

### 2.5.8 Vorbereitung der M15 kompetenten Zellen

*E. coli* M15[pREP4] Zellen wurden für die Expression des rekombinanten GPS2-Proteins verwendet. Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden die Bakterien auf einer Agar Platte (LB Medium mit 15 g/l Agar plus 25 µg/ml Kanamycin) ausgestrichen und ü.N. bei 37°C inkubiert. Kolonien, die von den Agarplatten gepickt wurden, wurden 10ml LB Medium ü.N. expandiert. 1ml der Übernachtkultur wurde in 100 ml frischem LB-Medium plus 25 µg Kanamycin verdünnt und bis zur OD<sub>600</sub> von ~0,5 kultiviert. Die Zellen wurden bei 4000×g für 5 min abzentrifugiert und in Transformationslösung I (s.u.) für 90 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 4000 × g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 4 ml Transformationslösung II (s.u.) aufgenommen und in 200 µl Aliquots bei -80°C aufbewahrt.

<u>Transformationslösung I</u>	<u>Transformationslösung II</u>
100 mM RbCl	10 mM MOPS
50 mM MnCl <sub>2</sub>	10 mM RbCl
30 mM CH <sub>3</sub> COOK	75 mM CaCl <sub>2</sub>
10 mM CaCl <sub>2</sub>	15 % Glycerol
15 % Glycerol	pH 6,8
pH 5,8	

### 2.5.9 Klonierung des GPS2-Inserts in den prokaryotischen Expressionsvektor pQE-30 und Transformation kompetenter M15-Zellen

Der prokaryotische Expressionsvektor pQE-30 besitzt eine His<sub>6</sub>-tag-kodierende Nukleotidsequenz zur Generierung His<sub>6</sub>-getaggtter Konstrukte. Die GPS2-Nukleotidsequenz wurde aus dem pCR2.1 Vektor (siehe 2.5.3) mit den Restriktionsenzymen BamHI und KpnI ausgeschnitten und unter gleichen Bedingungen wie in Abschnitt 2.5.6 beschrieben, in pQE-30 ligiert. 10 µl des Ligationsansatzes wurden mit 100 µl auf Eis aufgetauten kompetenter M15-Zellen gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Die Transformation der Zellen erfolgte mittels Hitzeschock für 90 sek bei 42°C. Nach Zugabe von 500 µl Psi Broth-Medium und zusätzlicher Inkubation für 60 min bei 37°C wurden 100 µl Zellsuspension auf eine Agar-Platte mit LB Medium und entsprechendem Selektionsantibiotikum ausgestrichen und ü.N. bei 37°C inkubiert.

### 2.5.10 Expression His-getaggten Proteine in *E.coli*

Bakterienklone mit dem GPS2-Insert im pQE-30 Vektor (Qiagen) wurden von der Agar Platte in 10 ml LB Medium mit 100 µg/ml Ampicilin und 25 µg/ml Kanamycin überführt und ü.N. bei 37°C inkubiert. Von der Übernachtskultur wurden 5 ml in 100 ml LB Medium aufgenommen und bis zu einer  $OD_{600}=0,6$  inkubiert. Die Proteinexpression wurde durch die Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG, Qiagen) in einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Die Zellen wurden für weitere 4 h. inkubiert, für 20 min bei  $4000 \times g$  abzentrifugiert und für weitere Analysen bei -80°C gelagert.

### 2.5.11 Isolierung des His-getaggten Proteins aus *E.coli*

Ca. 1 g des Bakterienzellpellets wurde in 4 ml Lysepuffer (50 mM  $NaH_2PO_4$ , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0) aufgenommen. Nach Zugabe des Lysozyms in einer Konzentration von 1 mg/ml wurden die Zellen für 30 min auf Eis gestellt. Die lösliche Fraktion wurde durch Zentrifugation für 20 min bei  $10.000 \times g$  abgetrennt. Die unlösliche Fraktion, die das rekombinante Protein enthält, wurde im zweiten Lysepuffer (100 mM  $NaH_2PO_4$ , 10 mM Tris-Cl, 8 M Harnstoff, pH 8,0) aufgeschlossen und für 60 min bei RT inkubiert. Das Lysat wurde für 20 min bei  $10.000 \times g$  zentrifugiert und für die Aufreinigung des rekombinanten Proteins weiter verwendet.

Für die Aufreinigung des Proteins wurde 1 ml Ni-Agarose Beads Suspension (Qiagen,) mit 4 ml Zelllysat gemischt, die Mischung für 1 h bei Raumtemperatur rotiert und anschließend in eine Leersäule überführt. Der Durchlauf aufgefangen und nicht gebundene Proteine mit  $5 \times 1$  ml Waschpuffer (100 mM  $NaH_2PO_4$ , 10 mM Tris-Cl, 8 M Harnstoff, pH 6,3) von der Säule gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden mit Elutionspuffer (2 ml 100 mM  $NaH_2PO_4$ , 10 mM Tris-Cl, 8 M Harnstoff, pH 4,5 Puffer) eluiert und in vier Fraktionen je 0,5 ml aufgefangen. 10 µl jeder Fraktion wurden zur Analyse per Gelelektrophorese und Massenspektrometrie verwendet. Um die Konzentration an Harnstoff zu reduzieren, wurden die Fraktionen mit dem GPS2 Protein in die *Slide A Lysar* Dialysekammer (Pierce) mit einem Cut-off von 7000 Dalton (Da) überführt und gegen Dialyse-Puffer (100 mM  $NaH_2PO_4$ , 10 mM Tris-Cl, 2 M Harnstoff, pH 7,2) für 48 h bei 4°C dialysiert. Der Dialyse-Puffer wurde zwischenzeitlich zweimal gewechselt. Nach Dialyse folgte die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Protein-Assay. Reinheit der Proben wurde mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) untersucht.



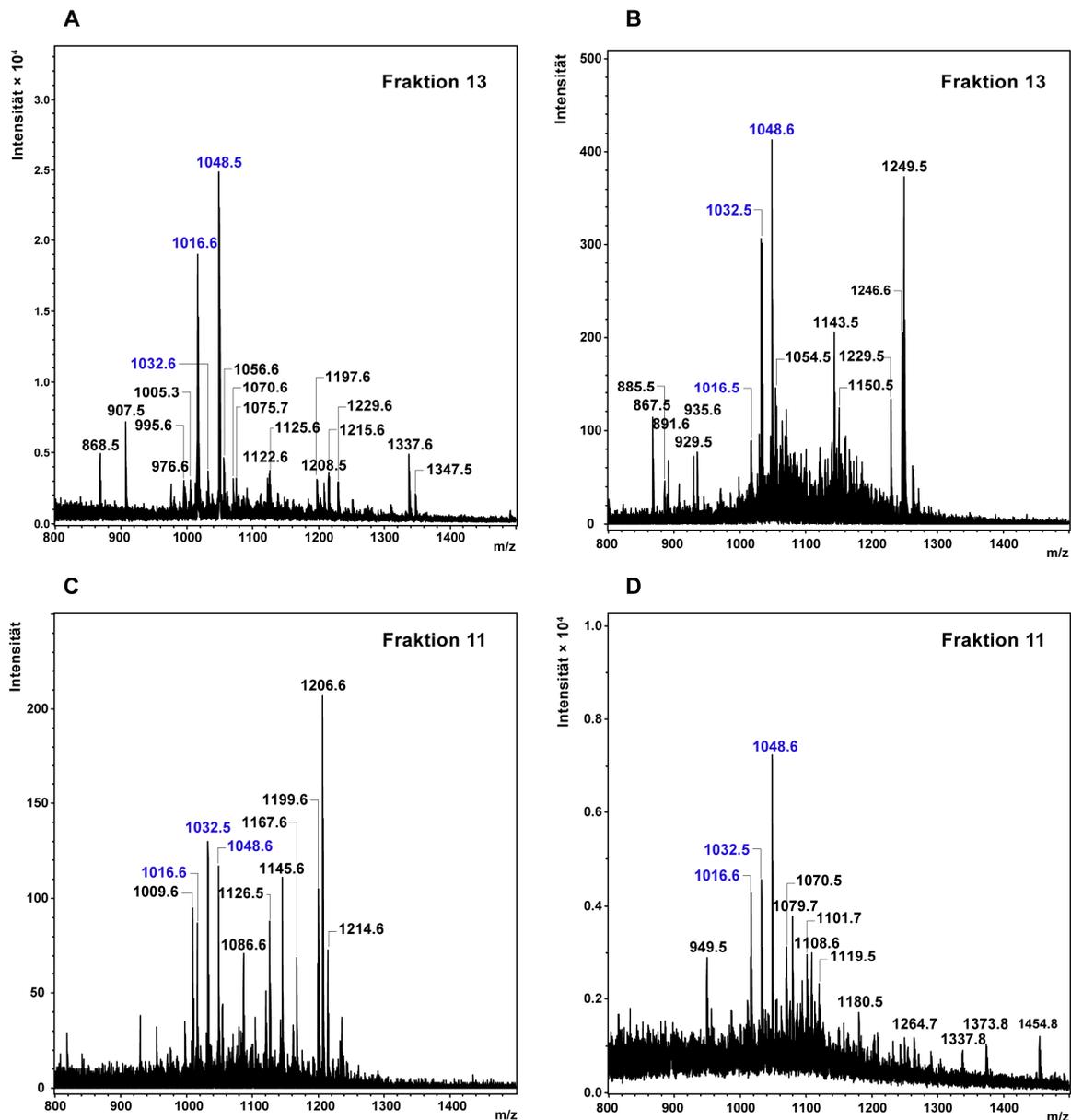
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Charakterisierung der HLA-Peptidome

#### 3.1.1 Vergleich der HLA-Peptidome von vier Melanomzelllinien

Die HLA-I einer Zelle präsentieren eine Vielzahl verschiedener Peptide, in ihrer Gesamtheit Peptidome genannt, die von unterschiedlichen Proteinen der Zelle stammen und Informationen zu den in der Zelle exprimierten Proteinen und ihren Umsatz tragen. Um den Grad der Übereinstimmung von Peptiden in den Peptidomen verschiedener Tumorzelllinien derselben Tumorart zu bestimmen, wurden die HLA-gebundenen Peptide von den vier Melanomzelllinien ChaMel 41, ChaMel 84, ChaMel 100 und ChaMel 105 extrahiert, per HPLC und Massenspektrometrie analysiert und identische Peptide anhand gleicher Retentionszeiten und identischer Masse identifiziert. Bei unterschiedlichen HLA ist von unterschiedlichen Präferenzen für Peptide auszugehen. Daher wurden die Zahlen der übereinstimmenden HLA einschließlich der HLA, die zwar verschieden sind, aber ähnliche Peptide binden können, bestimmt und anhand der je Zelllinie detektierten Peptide berechnet, wie viele übereinstimmende Peptide erwartet werden könnten. Alle vier Melanomzelllinien exprimieren HLA-A11, drei Zelllinien -B35 und -Cw4 und zwei -B51 (siehe Anhang I). Darüber hinaus haben nach den veröffentlichten Bindungsmotiven für HLA-gebundene Peptide die Liganden von vier oder fünf der je sechs HLA paarweise verglichener Melanomzelllinien gleiche oder sehr ähnliche Bindungsmotive.

Die HLA-Peptide wurden mittels Mikro- oder Nano-HPLC und anschließender MALDI-TOF- oder ESI-QTOF-Massenspektrometrie analysiert, um die identischen Peptide in den HLA-Peptidomen der vier analysierten Melanomzelllinien zu detektieren (als Beispiel siehe Abbildung 9). Zur Kalibrierung der Retentionszeiten wurden 19 sequenzierte Peptide, die in allen vier Melanomzelllinien identifiziert worden waren, als interne Standards verwendet (siehe Anhang IV). Insgesamt wurden 3203 Peptide von den vier Melanomzelllinien detektiert, 827 Peptide von ChaMel 41, 1054 von ChaMel 84, 557 von ChaMel 100 und 765 von ChaMel 105.

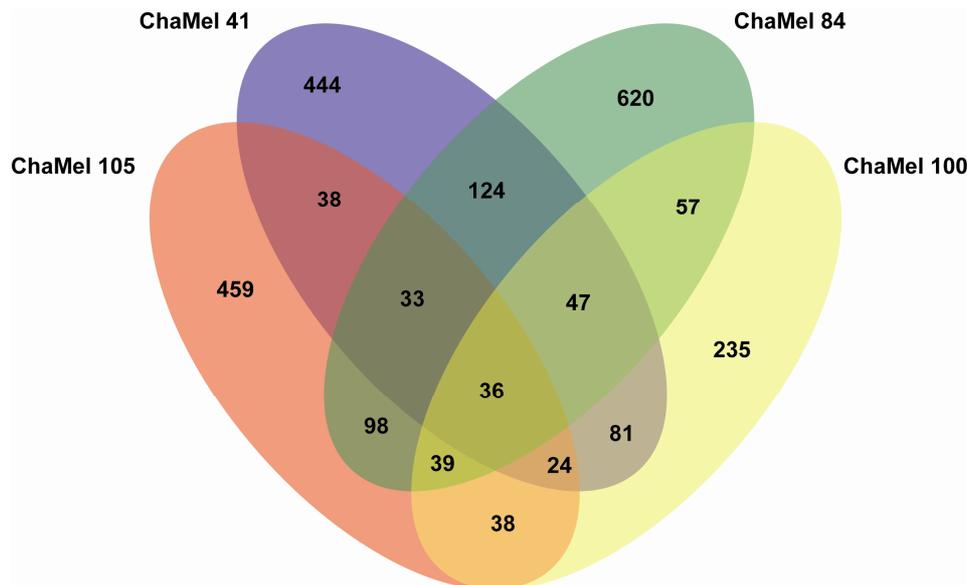


**Abbildung 9. Identische Peptide in den HPLC-Fractionen der Melanomzelllinien.** A) Melanomzelllinie ChaMel 100; B) ChaMel 41, C) ChaMel 84 und D) ChaMel 105. Die in allen vier HPLC-Fractionen detektierten Massen der identischen Peptide sind blau dargestellt.

Die Zahlen bei dieser Vergleichsanalyse der identifizierten identischen Massen waren sehr unterschiedlich. Dabei wurden zwischen 38 und 124 in jeweils zwei Melanomzelllinien, zwischen 24 und 47 in drei und 36 in allen vier detektiert. Die größte Überlappung wurde zwischen den Melanomzelllinien ChaMel 84 und ChaMel 41 registriert. Dabei wurden 124 identische HLA-Liganden detektiert (Abbildung 10). 1758 Massen waren einmalig, d.h. sie wurden im Peptidom jeweils nur einer Zelllinie gefunden.

Unter Berücksichtigung der HLA mit identischen oder ähnlichen Bindungsmotiven wurden die zwischen jeweils zwei, drei oder allen vier Melanomzelllinien erwartete Zahl identischer Peptide berechnet (Anhang III). Davon wurden zwischen 6 % und 18 % bei paarweisen

Vergleichen zweier Melanomzelllinien, zwischen 5 % und 13 % bei drei und 10 % bei allen vier Zelllinien tatsächlich nachgewiesen.



**Abbildung 10. Die Überlappung der HLA-Peptidome der vier Melanomzelllinien.** Die Zahl der detektierten Peptide und die Übereinstimmung in den HLA-Peptidomen wurden im Venn-Diagramm angezeigt.

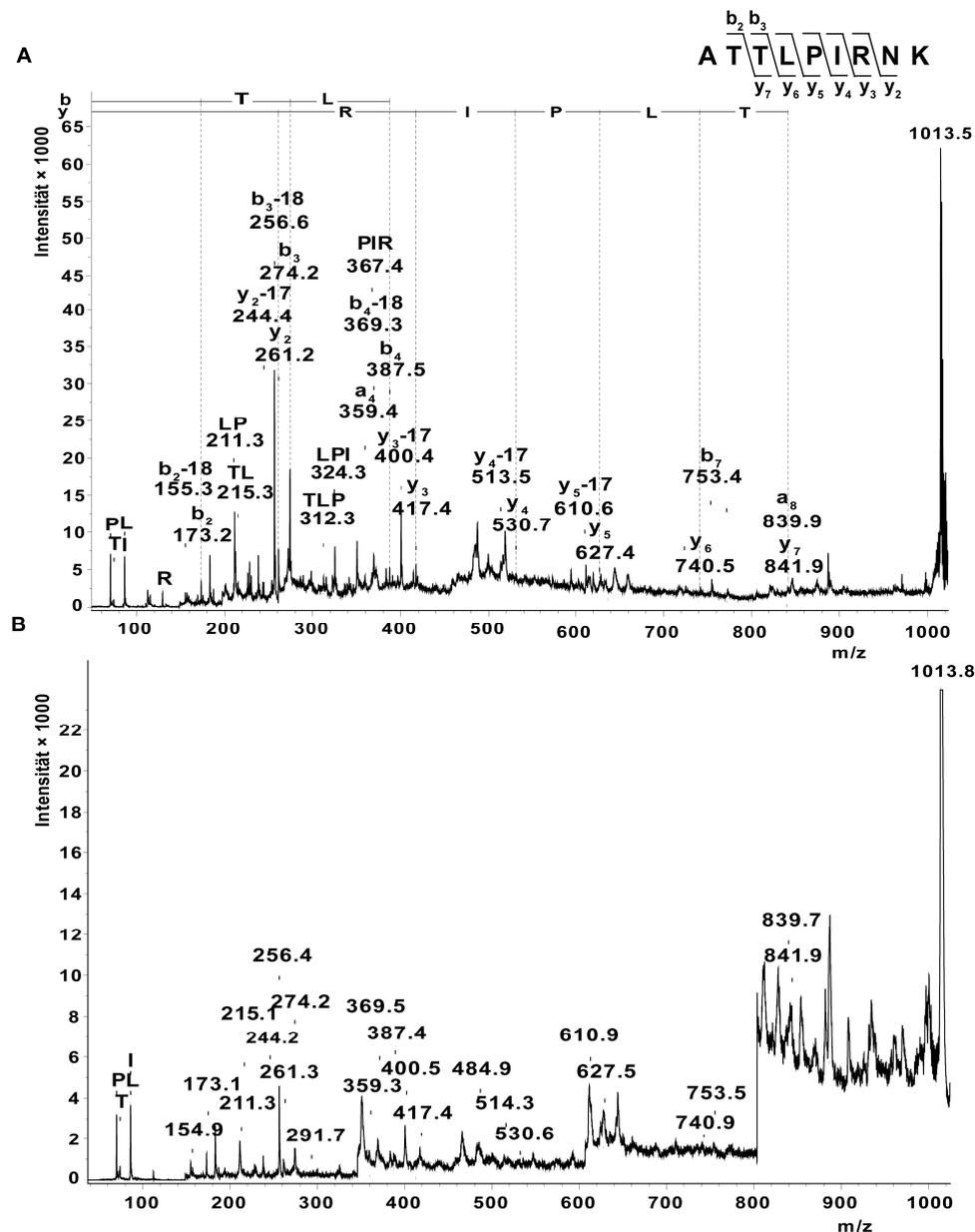
Dieses Ergebnis zeigt, dass es nur geringe Überlappung zwischen den HLA-Peptidomen von Melanomzelllinien gibt. Zur Bestätigung dieses Ergebnisses wurde der Grad der Übereinstimmung der HLA-Peptidome anhand der identifizierten Peptide untersucht.

### 3.1.2 Identifizierung HLA-gebundener Peptide

Um die Sequenzen der von vier Melanomzelllinien isolierten und mittels zweidimensionaler HPLC aufgetrennten HLA-Liganden aufzuklären, wurden die Peptide mit den MALDI-TOF- bzw. ESI-Q-TOF-Massenspektrometern fragmentiert und die Fragmentmassen bestimmt. Zur Sequenzbestimmung anhand der Fragmentierungsspektren wurden sowohl der datenbankbasierte Algorithmus MASCOT als auch die datenbankunabhängige *de novo* Sequenzierungssoftware Sequit! eingesetzt. Die Anwendung der *de novo* Sequenzierungssoftware ermöglicht Mutationen oder posttranslationale Modifikationen aufzudecken. Bei der MALDI-TOF-PSD-Analyse wurden die einzelnen Peptide aus dem relativ komplexen Peptidgemisch mit Hilfe eines Ionenselektors manuell isoliert, um das PSD-Spektrum aufzunehmen. Da der Ionenselektor eine relativ niedrige Auflösung von  $M/\Delta M \approx 100$  besitzt müssen Peptide bei einer Masse des Vorläuferions von 1000 Da einen Abstand von ca. 10 Da haben, um die Überlagerung zweier PSD-Spektren oder den Verlust von Signalintensitäten zu vermeiden. Es war daher nur möglich, einen Teil der HLA-Peptidome zu analysieren.

Bei der Sequenzberechnung anhand der PSD-Spektren mit dem datenbankbasierten Verfahren konnten die Sequenzen für 107 Peptide nicht eindeutig bestimmt werden. Aufgrund fehlender Informationen in den Spektren, wie unvollständige C- und N-terminale Ionenserien, wurden die Kandidatensequenzen von MASCOT mit niedrigen MASCOT-Werten von  $\leq 35$  bewertet. Zur Validierung der MASCOT-Ergebnisse wurde die *de novo* Sequenzierungssoftware Sequit! eingesetzt. Eine 100 %ige Übereinstimmung mit den MASCOT-Ergebnissen wurde in allen analysierten Fällen festgestellt (siehe Anhang IV). Die Daten, die mit beiden Algorithmen generiert wurden, wurden zusätzlich manuell analysiert, um die Identifizierung falsch-positiver Sequenzen zu vermeiden. Bei der manuellen Analyse wurde besonders auf die Qualität der Spektren geachtet. Für 86 lückenhafte PSD-Spektren, bei denen sich nur eine geringe Überlappung von  $\leq 3$  AS zwischen N- und C-terminalen Ionenserien ergab, wurden die PSD-Spektren synthetischer Analoga der möglichen HLA-Peptide aufgenommen und die Fragmentierungsmuster mit den Spektren der natürlichen Peptide verglichen, um die Sequenzen zu validieren.

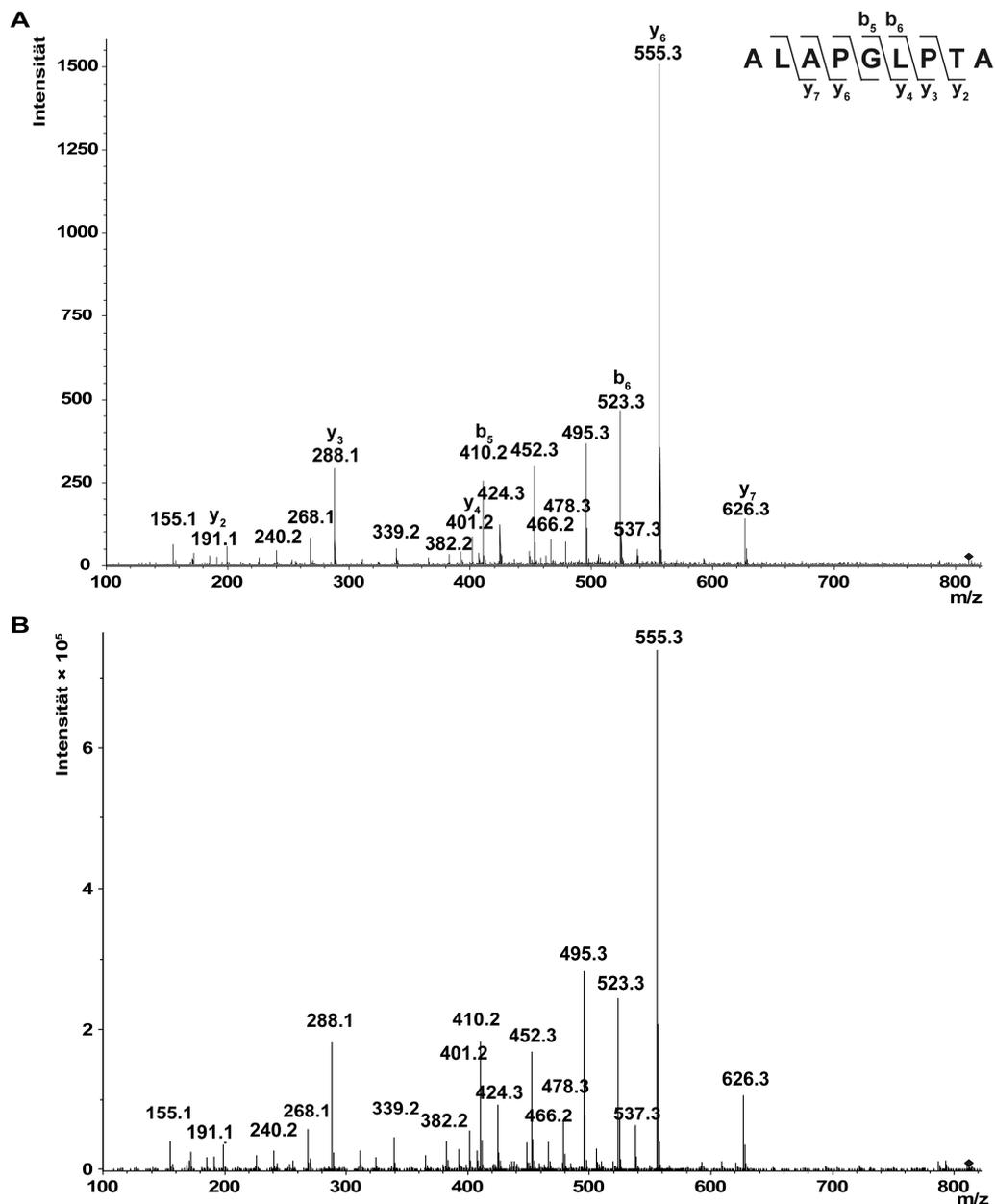
Die Abbildung 11 zeigt das PSD-Spektrum eines Peptids mit  $m/z=1016.63$ , das von der Melanomzelllinie ChaMel 84 isoliert und mit dem MALDI-TOF-Massenspektrometer fragmentiert wurde. Die Sequenz ATTLPIR NK wurde sowohl von MASCOT als auch von Sequit! vorgeschlagen und durch den Vergleich mit dem Spektrum des synthetischen Peptids bestätigt. Durch die Anwendung der Sequenzierungssoftware und in fraglichen Fällen auch durch den Vergleich der MALDI-TOF-PSD-Spektren der Kandidatensequenzen mit den Spektren der natürlichen Peptide wurden 192 HLA-Liganden bei den vier analysierten Melanomzelllinien identifiziert. Davon konnten fünf Sequenzen allerdings nur mit Hilfe der *de novo* Sequenzierungssoftware Sequit! identifiziert werden. Es gab dabei Peptide, die eine Methylierung der Argininreste in der Sequenz aufwiesen. Diese posttranslationale Modifikation führte zu einer Veränderung der Peptidmasse, so dass die Identifizierung mit MASCOT nicht möglich war. Die Sequenzbestimmung und weitere Charakterisierung dieser methylierten HLA-Peptide ist im Kapitel 3.3 beschrieben. Sechzehn der 192 mit dem MALDI-TOF-Massenspektrometer fragmentierten Peptide wurden ausschließlich durch den direkten Vergleich der Retentionszeiten und der Fragmentierungsmuster der natürlichen mit den Retentionszeiten und Spektren synthetischer Peptide bestimmt.



**Abbildung 11. Die experimentelle Bestätigung der Peptidsequenz eines von der Zelllinie ChaMel 84 isolierten HLA-Liganden.** Die der Sequenz ATTLPIR NK zugeordneten Massen der b- und y- Ionenserie oder der internen Fragmente sind im PSD-Spektrum eines natürlichen HLA-Peptids (A) annotiert. Die Massendifferenzen der benachbarten Fragmente einer Ionenserie entsprechen genau den AS und werden im Spektrum dargestellt. Die Bezeichnung der N- und C-terminalen Fragmente wurde nach der von Biemann vorgeschlagenen Nomenklatur ausgeführt [92]. Die Immoniumionen und internen Fragmente sind mit dem Ein-Buchstaben-Code der AS gekennzeichnet. Die gleichen Massen wurden im Spektrum des synthetischen Peptids detektiert (B). Dadurch konnte die Sequenz des HLA-Liganden bestätigt werden. Die Peptidsequenz und die identifizierten b- und y-Fragmente sind oberhalb der Spektren angegeben.

Da durch die Anwendung zweier komplementärer Techniken MALDI und ESI mehr Peptide identifiziert werden können, als durch den Einsatz nur einer der Technologien, wurden die Sequenzanalysen der HLA-Peptide mit Hilfe eines direkt mit Nano-HPLC gekoppelten ESI-QTOF-Massenspektrometers fortgesetzt. Zur Peptidsequenzidentifizierung anhand der ESI-MS/MS-Spektren wurde auch in diesem Fall sowohl das datenbankabhängige Verfahren Mascot als auch die *de novo* Sequenzierungssoftware Sequit! verwendet. Dabei wurden vier Sequenzen durch den direkten Vergleich der Fragmentierungsspektren der HLA-Peptide mit

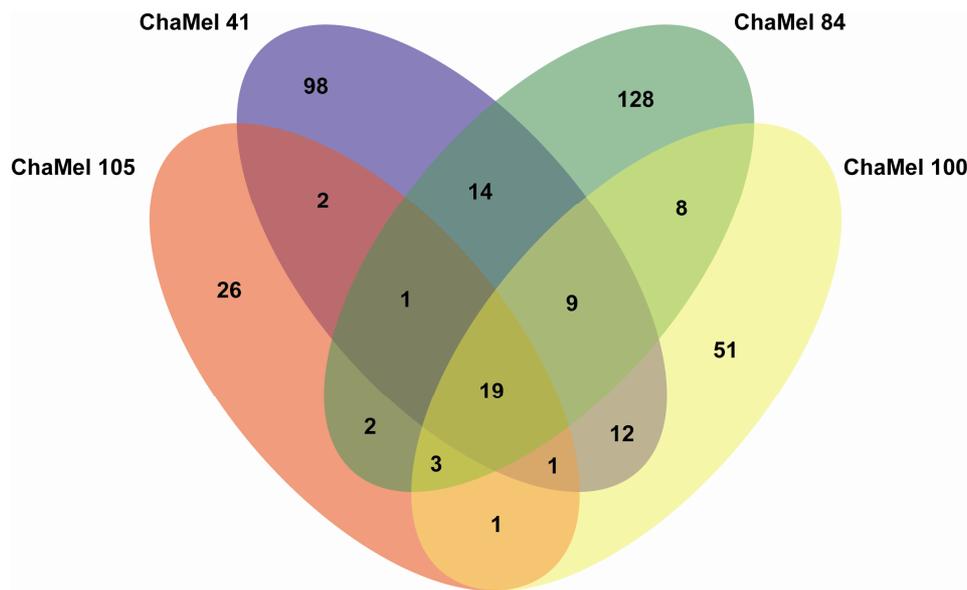
den Spektren synthetischer Peptide validiert (als Beispiel siehe Abbildung 12). Durch die Anwendung eines ESI-QTOF-Massenspektrometers wurden insgesamt 395 Peptide identifiziert. 88 dieser Sequenzen wurden auch durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie identifiziert (siehe Anhang IV). Somit konnten eine Reihe Peptide aus den MALDI-TOF-Experimenten mit Hilfe der ESI-QTOF-Technologie bestätigt werden.



**Abbildung 12. MS/MS-Spektrum eines einfach geladenen Ions mit  $m/z=810,43$  zur Bestimmung der Peptidsequenz (A).** Das Peptid wurde aus der Melanomzelllinie ChaMel 105 isoliert und mittels eines ESI-QTOF-Massenspektrometers fragmentiert. Die Fragmente wurden der Sequenz ALAPGLPTA des Neudesin neurotrophic factors zugeordnet. Die Sequenz wurde mit Mascot (Mascot-Score 9) sowie mit der *de novo* Sequenzierungssoftware Sequit! berechnet und durch den direkten Vergleich mit dem Spektrum des synthetischen Peptids (B) bestätigt. Die detektierten sequenzspezifischen b- und y-Ionen sind im Spektrum des natürlichen Peptids dargestellt.

Mit den beiden Technologien MALDI und ESI wurden insgesamt 499 HLA-Liganden von den vier analysierten Melanomzelllinien identifiziert. 19 Peptide wurden in allen vier

Zelllinien, 14 in drei und 37 in zwei der Zelllinien identifiziert. 303 Peptide wurden jeweils nur in einer der Zelllinien nachgewiesen (Abbildung 13).



**Abbildung 13. Überlappung der identifizierten HLA-Peptide von vier analysierten Melanomzelllinien.** Die Übereinstimmungen zwischen den HLA-Peptidomen wurden im Venn-Diagramm angezeigt. Die Sequenzen aller Peptide sowie ihre Zuordnung der Ursprungsproteine ist im Anhang zusammengefasst (siehe Anhang IV)

Die 499 Peptide enthalten mit Überlappungen zwischen den HLA-Peptidomen verschiedener Zelllinien 375 nicht redundante Peptide (siehe Abbildung 13), die 306 Quellproteinen zugeordnet werden konnten. (siehe Anhang IV). 86 Peptidsequenzen aus dieser Liste waren in der Literatur bereits als HLA-gebundene Peptide beschrieben worden (siehe Anhang IV). Die restlichen 289 Peptide sind neue, bisher nicht beschriebene HLA-Liganden.

Die analysierten HLA-Peptidome enthalten mehrere Peptidsequenzen, die von ein und demselben Protein prozessiert wurden. Dabei wurden 105 HLA-Liganden aus 40 Quellproteinen registriert (siehe Anhang V), wobei die höchste Anzahl an HLA-Liganden von hochabundanten Proteinen wie Vimentin oder den Elongation Faktor 1 alpha 1 stammten (Tabelle 1).

**Tabelle 1. Quellproteine mit mehreren identifizierten HLA Liganden.** In der Tabelle sind die Quellproteine, von denen mehr als zwei HLA-Peptide prozessiert wurden, zusammengefasst.

Peptidsequenz	Protein	HLA-Typ	Zelllinie, ChaMel
ETDLLDIRSEY	Annexin A11	A02	41
RSNEHIREL		?	84
TDLLDIRSEY		A01	41
ATAGIIGVNR	Clathrin heavy chain 1	A11	41,84,100
ATAGIIGVNRK		A11	84,105
EYLTKVDKL		A24	84
KSTTTGHLIYK	Elongation factor 1-alpha 1	A11	41
SGKSTTTGHLIYK		A11	41, 84
STEPPYSQK		A11	100

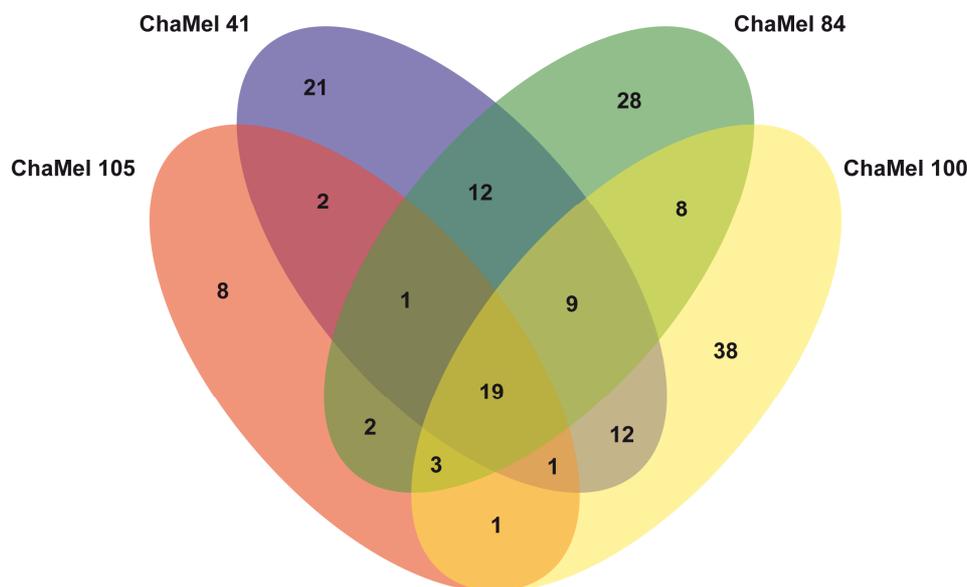
Peptidsequenz	Protein	HLA-Typ	Zelllinie, ChaMel
STTTGHLIYK		A11	41
TTGHLIYK		A11	41
TTTGHLIYK		A11	41
ILTDITKGV	Elongation factor 2	A02	105
LTDITKGVQY		A01	41
RYFDPANGKF		A24	84
AASVPVYVY		B35	41
YYIDCIRQV		B35	41
TFDDIVHSF	Fatty acid synthase	A01	41
SQNPdmRFYHK <sup>1</sup>	G protein pathway suppressor 2	A11	41, 84, 100, 105
SQNPmmRFYHK <sup>2</sup>		A11	105, 84
SQNPRFYHK		A11	41, 84, 100, 105
DALRLYLI	Isoleucine-tRNA synthetase	B51	84
GTIKDIVTR		A11	84, 41, 100
PVSIIQKY		B35	41
RSDTPLIYK		A11	84
FAFIHKI	Histone demethylase JARID1B	B51	84
PFAFIHKI		A24	84
DPFAFIHKI		B51	84
ALLDRIVSV	Nuclear pore complex protein Nup205	A02	105
LLIGHLERV		A02	105
SSLYIILKK		A11	105
ATAGDGLIELRK	Prohibitin	A11	41, 100, 84, 105
DGLIELRK		A11	100
TAGDGLIELRK		A11	100
RYIDRIHIF	PRP8 pre-mRNA processing factor	A24	84
RYIDRIHIF		A24	84
TYQRWQFTL		A24	84
AKIRIFDL	60S ribosomal protein L10	B08	84
DAKIRIFDL		B08	84
RIFDLGRKK		A11	100, 84
NVADVVIKF	Ribophorin II	B35	41
RVTYPAKAK		A11	84
RYIANTVEL		A24	84
KLLEGEESRISL	Vimentin	A02	105
NYIDKVR		A11	41
NYIDKVR		Cw4	41
NYIDKVRFL		Cw4, A24	41, 84
RFLEQQNKI		A24	84
RISLPLPNF		A24	84
SLPLVDTHSK		A11	41
SSVPGVRL		B35	41
YASSPGGVY		B35	41
YIDKVRFL		Cw4, A24	84, 41

<sup>1</sup> mmR, Sequenz mit dem monomethylierten Arginin,

<sup>2</sup> dmR, Sequenz mit dem dimethylierten Arginin

Auf der Basis der identifizierten Peptide wurde die Überlappung der HLA-Peptidome bezüglich der Peptide, die HLA-A11 zugeordnet werden können, untersucht. Für die Bindung

an HLA-A11 werden Peptide mit den basischen AS Arginin oder Lysin am C-Terminus bevorzugt. Dabei wurden 287 Peptide mit C-terminalen Arginin oder Lysin HLA-A11 zugeordnet und für diese Analyse verwendet. Davon waren 77 Peptide von ChaMel 41, 82 von ChaMel 84, 91 von ChaMel 100 und 37 von ChaMel 105 isoliert und identifiziert worden. Die geringste Zahl an HLA-A11 Peptiden wurde von der Zelllinie ChaMel 105 identifiziert. Das HLA-A11-Peptidom dieser Melanomzelllinie wies auch die geringste Überlappung mit den Peptidomen der anderen drei Zelllinien auf (Abbildung 14). 19 der von Zelllinie ChaMel 105 isolierten und identifizierten Peptide wurden in allen vier Melanomzelllinien identifiziert, was ca. 51 % der erwarteten entspricht und wiederum auf die Heterogenität der HLA-A11-Peptidome der analysierten Zelllinien verweist.

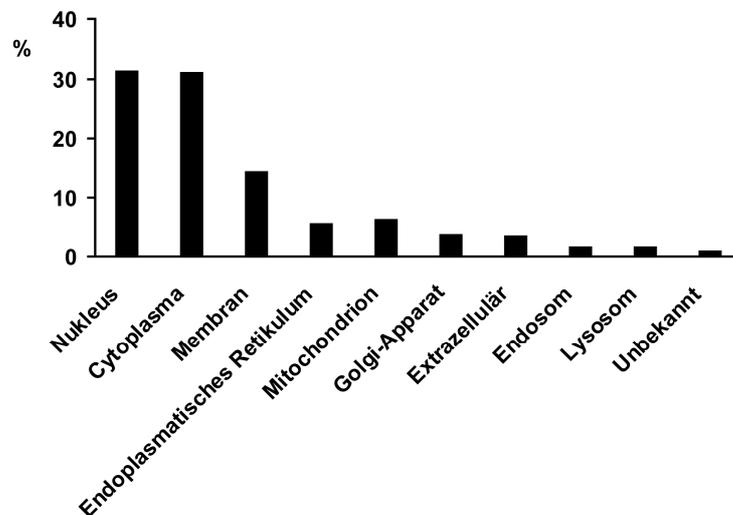


**Abbildung 14.** Überlappung der HLA-A11-Peptidome der vier analysierten Melanomzelllinien ChaMel 41, ChaMel 84, ChaMel 100 und ChaMel 105.

Fasst man die Ergebnisse zusammen, wurden durch die Anwendung der datenbankbasierten Suchmaschine Mascot und der *de novo* Sequenzierungssoftware Sequit! 375 nicht redundante Peptide identifiziert, wovon 289 nicht zuvor in der Literatur als HLA-Liganden beschrieben worden waren. Dabei wurden modifizierte HLA-Liganden, aber keine mutierten Antigene gefunden. Außerdem wurden anhand der Sequenzanalysen der HLA-Liganden der vier Melanomzelllinien die im Kapitel 3.1.1 beschriebene Heterogenität zwischen den HLA-Peptidomen bestätigt. Für etwa 13 % aller Quellproteine der HLA-Peptide wurden mehrere HLA-Liganden identifiziert. Dabei wurde die höchste Anzahl an Peptiden von hochabundanten Proteinen detektiert, was darauf hindeutet, dass die Proteinabundanz sich in der Repräsentanz der Epitope in den HLA-Peptidomen der Zellen widerspiegelt.

### 3.1.3 Klassifizierung der Quellproteine bezüglich subzellulärer Lokalisation und biologischer Funktion

Die Proteine, von denen die identifizierten HLA-Liganden stammten, wurden entsprechend ihrer subzellulären Lokalisation und biologischen Funktion klassifiziert, um zu bestimmen, in welchem zellulären Kompartiment sich die Quellproteine befinden bzw. zu welcher Proteingruppe sie gehören. Die Information zur subzellulären Lokalisation der Quellproteine wurde der humanen Proteomdatenbank HPRD (engl. *Human Protein Reference Database*) entnommen. Die Klassifizierung der identifizierten 306 Quellproteine hinsichtlich der subzellulären Lokalisation zeigte, dass sie mehrheitlich in zwei zellulären Fraktionen vorkommen: Nukleus (ca. 31,3 %) und Cytoplasma (31,1 %) (Abbildung 15). Darüber hinaus waren Proteine der Zellmembran (14,3 %), der Mitochondrien (6,3 %), des endoplasmatischen Retikulums (5,6 %), des Golgi-Apparats (3,6 %), der Endosomen (1,7 %) und der Lysosomen (1,7 %) vertreten. Die Zuordnung der Proteine zu ihren subzellulären Lokalisationen zeigte, dass die absolute Mehrheit der Proteine intrazellulär ist. Es gab aber auch Proteine die extrazellulären Kompartimenten (3,4 %) oder keinem zellulären Kompartiment (1 %) zugeteilt werden konnten.

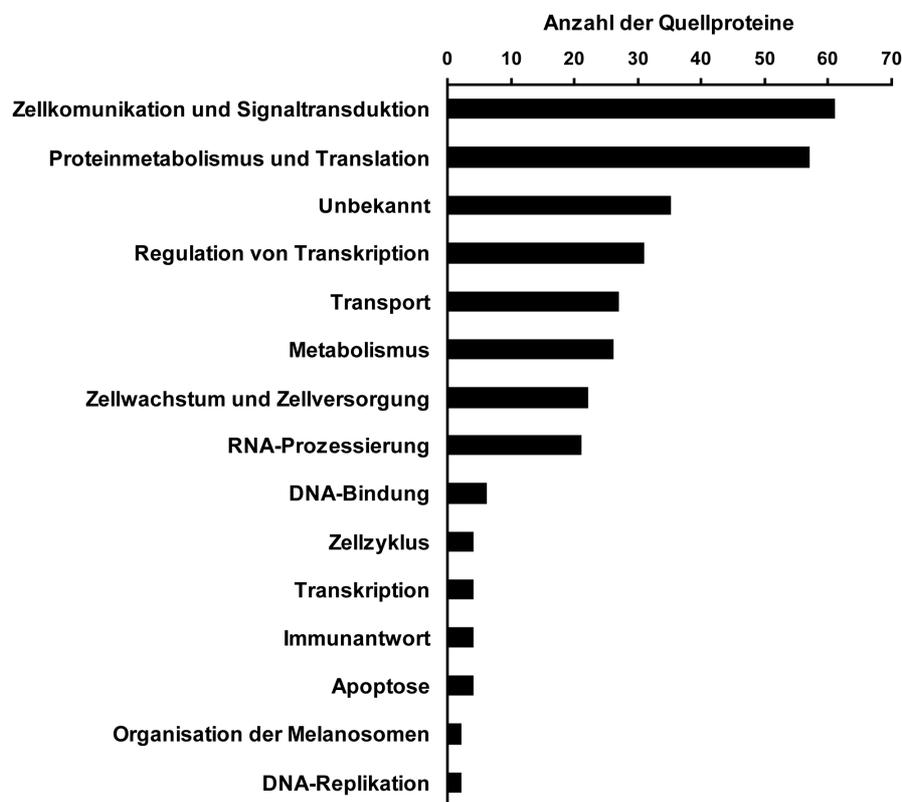


**Abbildung 15. Klassifizierung der Quellproteine der identifizierten HLA-Liganden hinsichtlich ihrer subzellulären Lokalisation.** Im Diagramm ist die Verteilung der Quellproteine in den zellulären Kompartimenten dargestellt.

Diese Analyse der Quellproteine der identifizierten HLA-Liganden zeigte, dass die Hauptquellen für die HLA-Antigenprozessierung und –präsentation nukleäre und cytoplasmatische Proteine sind. Zugleich können HLA-Peptide nahezu jedes zelluläre Kompartiment vertreten.

Die in der HPRD-Datenbank vorhandene Annotierung der Proteine bezüglich ihrer biologischer Funktion wurde als Basis für die entsprechende Klassifizierung der

Quellproteine verwendet. Die Analyse ergab, dass die Quellproteine in unterschiedliche zelluläre Prozesse involviert sind (Abbildung 16). Die Mehrheit der Proteine ist an metabolischen Prozessen, wie Proteinmetabolismus (57 Quellproteine), Zellwachstum (22), Zellmetabolismus (26), RNA-Prozessierung (21) oder Transport (27), beteiligt. Daneben finden sich auch Proteine mit regulatorischen Eigenschaften, die in Signaltransduktion (61), Transkription (4) und Regulation der Transkription (31) sowie Zellzyklus (4) involviert oder an solchen biologischen Prozessen wie Apoptose (4), DNA-Bindung (6) und DNA-Replikation (2) beteiligt sind. 27 Quellproteine konnten keiner Kategorie zugeordnet werden. Die Funktion dieser Proteine ist bisher unbekannt. Weitergehende Literaturanalysen ergaben, dass 20 der Quellproteine als tumorrelevant beschrieben worden waren und an onkogenen Prozessen der Zellproliferation, Metastasierung und Angiogenese beteiligt sind oder als Tumorsuppressoren beschrieben wurden (siehe Anhang IX).



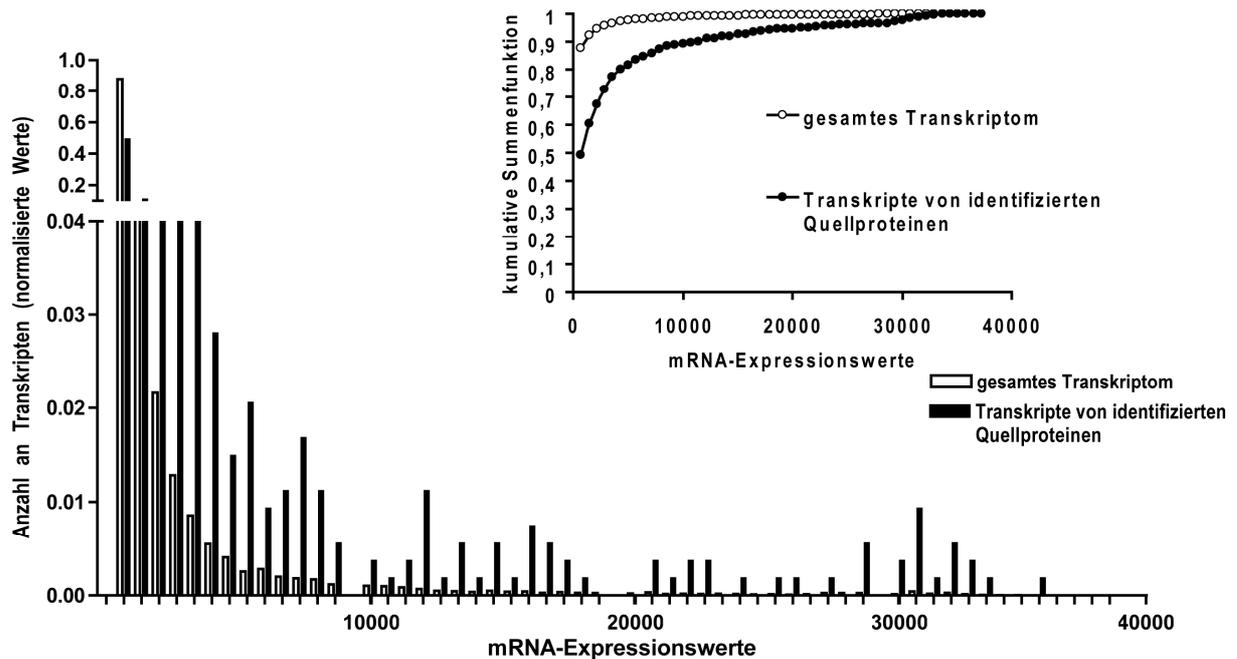
**Abbildung 16. Klassifizierung der 306 Quellproteine nach biologischen Funktionen.**

Die Daten zeigten, dass die Ursprungproteine der HLA-Liganden in ein breites Spektrum biologischer Prozesse involviert sind. Neben Proteinen, die für die Ausführung allgemeiner zelltypunabhängiger Funktionen zuständig sind, wurden auch Proteine identifiziert, die wichtige zelluläre Prozesse über Signaltransduktionsnetzwerke oder die Expression von Genen regulieren.

### 3.1.4 mRNA-Expression der identifizierten HLA-Liganden

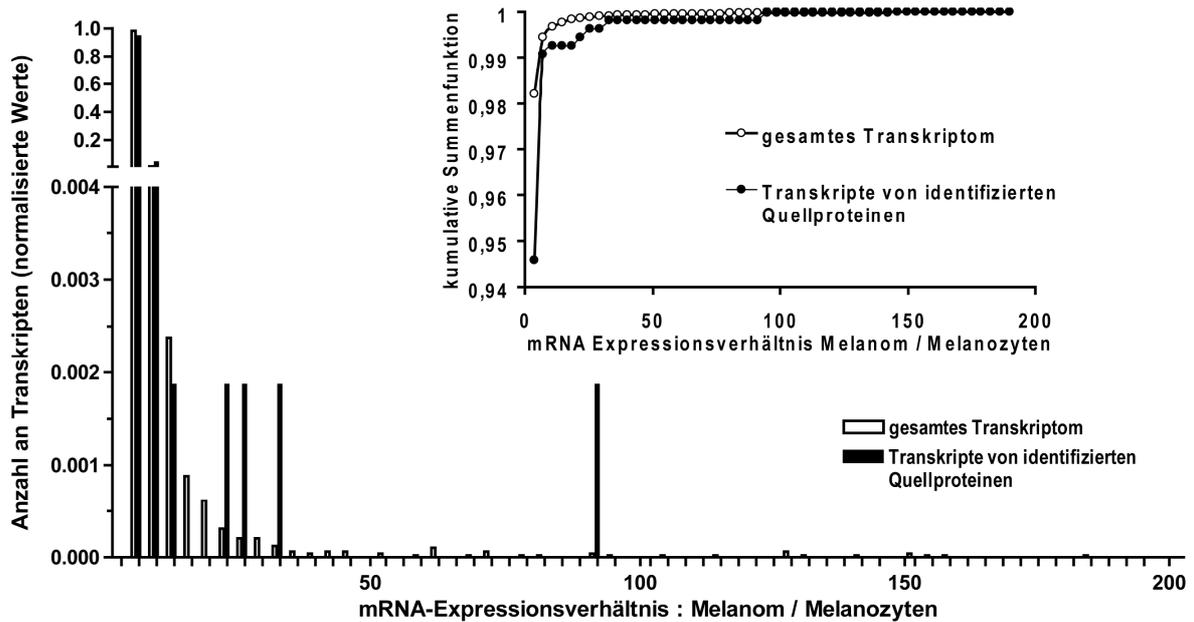
Für die Transkriptomanalyse wurden die vorhandenen Illumina WG-6 Chip Array-Daten einer genomweiten mRNA-Expressionsanalyse (48.803 Transkripte) von den Melanomzelllinien ChaMel 84, ChaMel 105 und ChaMel 47 verwendet. Zur Detektion der mRNA-Expression mancher Gene werden mehrere unterschiedliche Oligonukleotide verwendet, sodass Expressionswerte für 535 Transkripte der 306 Quellproteine ermittelt werden konnten. Die Expressionsdaten von Melanozyten wurden ebenso benutzt, um eine mögliche Überexpression der Proteine im Melanom zu untersuchen und tumorrelevante Quellproteine identifizierter HLA-Liganden zu detektieren.

Für eine statistische Expressionsanalyse der Transkriptomdaten wurden das gesamte Transkriptom sowie die Transkripte von Quellproteinen nach ihrer mRNA-Expressionsstärke in 52 Gruppen eingeteilt. Um die beiden Datensätze, Gesamttranskriptom vs. Quellproteinttranskriptom, direkt miteinander zu vergleichen, wurden die Werte normiert und die Anzahl der Transkripte in jeder Gruppe durch die Gesamtzahl der Transkripte im jeweiligen Datensatz geteilt und so als normalisiertes Histogramm dargestellt (Abbildung 17). Für einen statistischen Vergleich der beiden Datensätze wurde ein Smirnow-Kolmogorow-Test für zwei Populationen durchgeführt. Dafür wurden die normalisierten Expressionswerte der Transkripte in kumulative Verteilungskurven umgesetzt (siehe Abbildung 17, Einlage) und die maximale Differenz (D) zwischen den beiden Populationen mit p-Wert der Statistik berechnet. Diese Berechnung zeigte, dass die Abweichung zwischen den beiden Datensätzen bei einem D-Wert von 0,61 statistisch signifikant ist ( $p=1,61 \times 10^{-9}$ ). Etwa 90 % aller Transkripte des Transkriptom wurden der Kategorie der niedrig exprimierten Proteine zugeordnet, das sind Proteine mit Expressionswerten bis zu 716. Für die Quellproteine des HLA-Peptidoms umfasste diese Kategorie nur etwa 49 % der Transkripte. Die Quellproteine der HLA-Peptidome fallen in die Kategorien der Proteine mit niedrigen bis mittleren Expressionswerten (478 Transkripte mit den Expressionswerten bis zu 10.000). Weiterhin gibt es eine Gruppe von Proteinen, 21 Transkripte bzw. 3,9 % aller Quellproteinttranskripte, die sehr hohe Expressionswerte von über 25.000 hatten. Im Vergleich zum gesamten Transkriptom mit 123 bzw. 0,25 % hochexprimierten Proteinen sind hochexprimierte Proteine im HLA-Peptidom überrepräsentiert.



**Abbildung 17. Vergleichsanalyse der mRNA-Expression von Quellproteinen von HLA-Liganden mit genomweiten Transkriptomen von Melanomzellen.** Für diese Analyse wurden die Mittelwerte der Expressionsdaten von den drei mit einem Illumina Chip analysierten Melanomzelllinien ChaMel 47, ChaMel 84 und ChaMel 105 verwendet. Die gesamte Anzahl an Transkripten (48.803) und 214 Transkripte von den Quellproteinen von HLA-Liganden wurden nach ihrer Expressionsstärke (AU) in 52 Gruppen geteilt und nach der Normalisierung mit einander verglichen. Die kumulativen Verteilungskurven, welche für eine Berechnung des maximalen D-Wertes und damit für die Bestimmung der Differenzen zwischen den beiden Datensätzen verwendet wurden, sind in der Einlage dargestellt. Die Berechnung der maximalen Distanz (D-Wert) zwischen den Verteilungskurven und der statistischen Signifikanz (p-Wert) wurde mit der Origin 8.5 Software durchgeführt.

In einer weiteren Analyse wurde die mögliche Überexpression der Quellproteine HLA-gebundener Peptide im Melanom analysiert. Dafür wurden die Transkriptomdaten von Melanomzellen mit denen von Melanozyten verglichen. Alle Transkripte (48.803 Einträge) und diejenigen der Quellproteine wurden nach ihrem Überexpressionsgrad in 52 Gruppen eingeteilt und wie vorher beschrieben analysiert. Auch in diesem Fall wurden hochsignifikante Unterschiede in der Verteilung zweier Populationen beobachtet ( $D=0,46$ ,  $p=2,26 \times 10^{-5}$ ). Diese Vergleichsanalyse der mRNA-Überexpression zeigte, dass, bis auf wenige Ausnahmen, HLA-Peptide von normal oder leicht überexprimierten (bis zu 3,5-fach) Proteinen prozessiert wurden (Abbildung 18). Hohe Überexpression wurde bei fünf Quellproteinen beobachtet, die in der Tabelle 2 zusammengefasst sind.



**Abbildung 18. Überexpression von Quellproteinen von HLA-Liganden im Melanom.** Für die Berechnung des Expressionsverhältnisses (Melanom vs. Melanozyten) wurden das Verhältnis der mRNA-Expressionswerte der Quellproteine und des gesamten Transkriptoms berechnet und nach einer Einteilung der resultierenden Überexpressionswerte in 52 Gruppen im Histogramm dargestellt. Die grafische Darstellung der kumulativen Verteilungskurven der beiden Datensätze wurde als Einlage eingefügt. Die Berechnung des D-Wertes und der Signifikanz (p-Wert) wurde mit der Origin 8.5 Software durchgeführt.

Zu den überexprimierten Quellproteinen gehört MAGE A1, das als melanomassoziiertes Antigen bereits bekannt ist [120]. Es gehört zu der Gruppe der sogenannten Cancer-Testis Antigene, die ausschließlich im Testisgewebe und im Tumor überexprimiert sind.

**Tabelle 2. Die in Melanomzellen überexprimierten Transkripte von den Quellproteinen identifizierter HLA-Liganden.** Expressionsstärke ist in *arbitrary units* (AU) dargestellt. CM-Abkürzung für ChaMel.

Protein	Expressionswerte, AU				Melanozyten	Expressionsverhältnis
	CM 47	CM 84	CM 105	CM, Mittelwert		
VGF nerve growth factor inducible	27142	3260	3987	11463	123	93
Matrix Gla protein	58	370	4940	1790	67	27
Melanoma-associated antigen 1 (MAGE-A1)	1872	865	70	936	67	14
Lysyl oxidase homolog 3	577	2098	882	1186	113	11
Annexin A1	4065	18034	9442	10514	1609	7

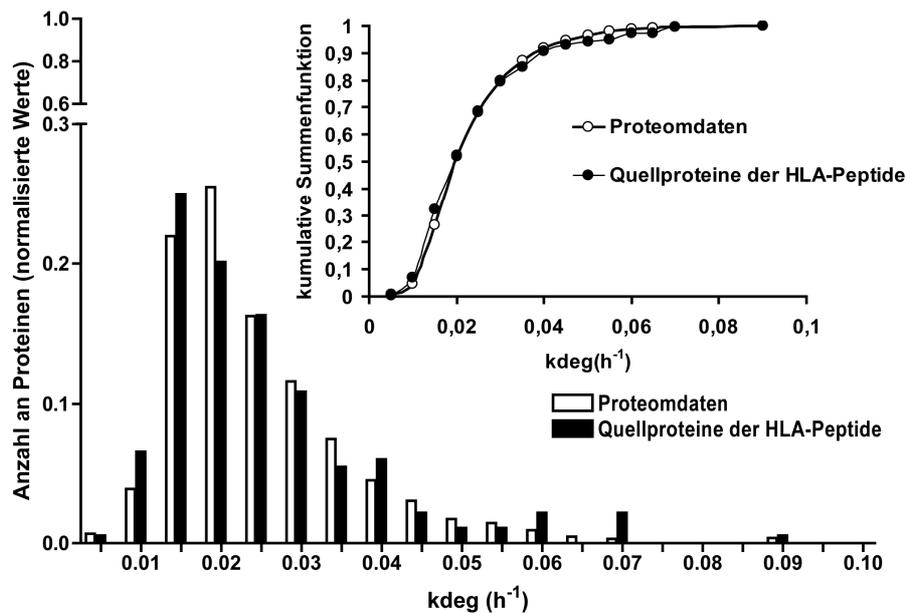
Weiter wurde eine genauere Analyse der Korrelation zwischen der HLA-Peptidpräsentation und der tumorspezifischen Überexpression der Quellproteine für die mRNA-Expressionswerte von Melanomzelllinien ChaMel 84 und ChaMel 105 im Vergleich zu Melanozyten durchgeführt. Es wurden dabei sechs Quellproteine gefunden, die in den Melanomzelllinien überexprimiert sind (Tabelle 3). Von den sechs sind drei Quellproteine ausschließlich in der Melanomzelllinie ChaMel 105 überexprimiert.

**Tabelle 3. Die in den Melanomzelllinien ChaMel 84 und ChaMel 105 überexprimierten Transkripte von den Quellproteinen der HLA-Liganden.** Expressionsstärke ist in *arbitrary units* (AU) dargestellt.

Quellprotein	Zelllinie ChaMel	mRNA Expressionswerte, AU		Expressions- verhältnis
		Melanom	Melanozyten	
Lysyl oxidase homolog 3	84	2098	113	19
Annexin A1	84	18034	1609	11
Matrix Gla protein	105	5657	67	85
Membrane-associated transporter protein	105	2870	481	7
Nuclear pore complex protein Nup205	105	6360	1016	6
THO complex 4	105	3072	586	5

### 3.1.5 Zellulärer Umsatz der Quellproteine

Es wird generell angenommen, dass das HLA-Peptidom primär das Protein-Degradom, weniger als das zelluläre Proteom repräsentiert [121]. Dies würde bedeuten, dass die Peptide von Proteinen mit höheren Umsatzraten im HLA-Peptidom angereichert sein sollten. Zur Klassifizierung der Quellproteine entsprechend ihren Umsatzraten wurden vor kurzem veröffentlichte Proteomdaten zur Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten des Abbaus von Proteinen in sich nicht teilenden HeLa Zellen verwendet [119]. Aus diesen Daten wurden die Umsatzraten für 184 Quellproteine der HLA-Liganden mit den Umsatzraten des gesamten Satzes an untersuchten Proteinen (4106 Einträge) verglichen. Dabei wurden die Proteine anhand ihrer Umsatzraten in 15 Gruppen geteilt. Die Anzahl der Proteine in beiden Datensätzen wurde normalisiert und als Histogramm und als kumulative Verteilungskurve dargestellt (Abbildung 19). Aus der Berechnung der maximalen Abweichung zwischen den beiden Datensätzen ergibt sich, dass die Unterschiede in den Verteilungen sehr gering und als statistisch nicht signifikant zu bewerten sind ( $D=0,13$ ,  $p=0,99$ ).



**Abbildung 19. Die Analyse der Quellproteine nach ihren Umsatzraten.** Zur Analyse wurden Abbaugeschwindigkeitskonstanten ( $k_{deg}$ ) von 4106 Proteinen der HeLa Zellen verwendet [119]. Die Proteine wurden anhand der  $k_{deg}$  in 15 Kategorien eingeteilt. Die Anzahl der Proteine wurde in jeder Kategorie normalisiert und miteinander verglichen. Die kumulativen Verteilungskurven sind in die Einlage eingefügt. Die Berechnung des D-Wertes und der Signifikanz (p-Wert) wurde mit der Origin 8.5 Software durchgeführt.

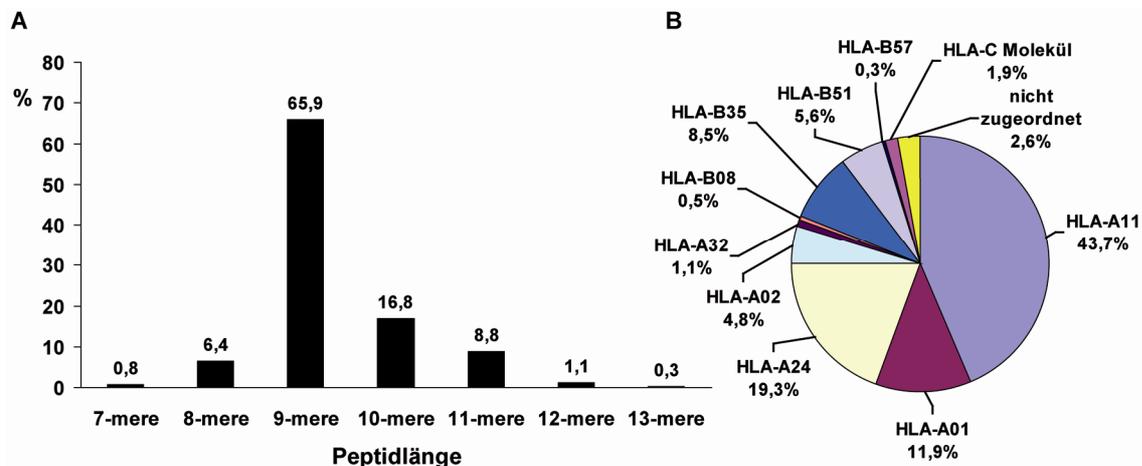
Die Vergleichsanalyse beider Datensätze zeigte, dass sich die Verteilungskurven der beiden Datensätze überlagern, was darauf hindeutet, dass das HLA-Peptidom die Verteilung der Umsatzraten der zellulären Proteine relativ genau widerspiegelt. Die berechneten Halbwertszeiten der Quellproteine variieren zwischen 8,8 und 138 h. Demnach können die Proteine als lang- bis mittellebig klassifiziert werden. Es ist keine Anreicherung von Peptiden von Hochumsatzproteinen im HLA-Peptidom zu erkennen.

### 3.1.6 HLA-Bindungsspezifitäten der identifizierten Peptide

Die identifizierten, nicht redundanten 375 HLA-Liganden wurden nach ihren Sequenzlängen gruppiert und anhand der Sequenz den HLA zugeordnet, die von den Melanomzelllinien exprimiert werden, von denen sie isoliert wurden. Die Verteilung der identifizierten HLA-Liganden nach der Peptidlänge zeigte, dass die Mehrheit der Peptide (65,9 %) Nonapeptide sind (Abbildung 20A). Okta-, Dekka- und Undekapeptide sind im Peptidpool mit jeweils 6,4 %, 16,8 % und 8,8 % vertreten. In wenigen Fällen wurden auch die kürzeren (Heptapeptide: 0,8 %) und längeren Peptide (Dodekapeptide: 1,1 % und Tridekapeptide: 0,3 %) gefunden. Damit passen die identifizierten HLA-Liganden in das typische Muster der Peptidlängenverteilung von HLA-Klasse-I-Liganden.

Da für die Isolierung der HLA-Moleküle der Antikörper W6/32 verwendet wurde, der alle A, B und C Moleküle der HLA-Klasse-I erkennt, wurden die Peptide anhand der in der

SYFPEITHI-Datenbank gelisteten Bindungsmotive für die HLA der analysierten Melanomzelllinien klassifiziert (siehe Anhang II) und dem entsprechenden HLA zugeordnet (Abbildung 20B und Anhang IV).



**Abbildung 20. Die Peptidlängenverteilung (A) und Klassifizierung der identifizierten HLA-Liganden nach HLA-Bindungsmotiven (B).**

165 Peptide, 43,8 % aller identifizierten Peptide, die die basischen AS Lysin oder Arginin am C-Terminus des Peptids aufwiesen, wurden entsprechend dem Motiv aus der SYFPEITHI-Datenbank als HLA-A11-Liganden klassifiziert. Drei Peptide aus diesem Pool haben eine identische Sequenz, kommen aber in drei Formen vor und zwar nichtmethyliert, monomethyliert und dimethyliert an der AS Arginin (s. Abschnitt 3.3). Für die Bindung der Peptide an HLA-A24-Moleküle werden die Epitope mit den aromatischen AS Phenylalanin oder Tyrosin an zweiter Position und große hydrophobe AS wie Leucin und Isoleucin oder die aromatische AS Phenylalanin am C-Terminus des Peptids bevorzugt. 73 Peptide (19,3 %) konnten dem HLA-A24-Bindungsmotiv zugeordnet werden. 45 HLA-Liganden (11,9 %) konnten als HLA-A01- und 18 Peptide (4,8 %) als A02-Liganden klassifiziert werden. Die bevorzugten AS für die Bindung an das A01-Molekül sind Glutamat oder Aspartat in Position 3 und die aromatischen AS Phenylalanin oder Tyrosin am C-Terminus des Peptids. Für die Bindung an HLA-A02 werden hydrophobe, aliphatische AS in der Position 2 und am C-Terminus des Peptids bevorzugt. 21 HLA-Peptide (5,6 %) konnten aufgrund der charakteristischen AS Alanin, Glycin und Prolin in der Position 2 und den großen hydrophoben AS Leucin, Isoleucin und Valin am C-Terminus des Peptids als HLA-B51-Liganden klassifiziert werden. 32 HLA-Peptide (8,5 %), welche zum größten Teil aus der HLA-B35<sup>+</sup>-Melanomzelllinie ChaMel 41 isoliert wurden, wurden als HLA-B35-Liganden klassifiziert. Für neun dieser Sequenzen wurde eine vollständige Übereinstimmung mit dem Bindungsmotiv aus der SYFPEITHI-Datenbank beobachtet (Siehe Anhang II und Anhang IV). Die restlichen Peptide besitzen kein kanonisches Prolin in der Position 2. Stattdessen

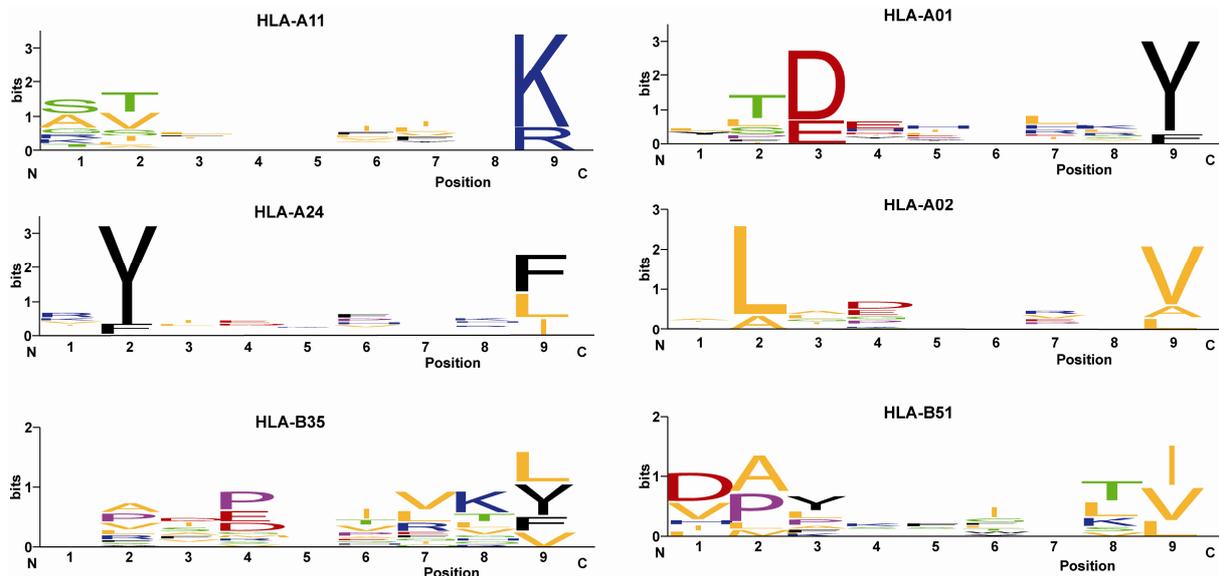
wurden die AS Serin, Arginin, Leucin Valin oder Alanin an dieser Position detektiert, welche auch in der Literatur für manche HLA-B35-Liganden beschrieben wurden (siehe SYFPEITHI-Datenbank). Die dort gelisteten Beispiele zeigen, dass auch andere Sequenzen für die Bindung an HLA-B35 neben Peptiden mit dem kanonischen Bindungsmotiv möglich sind.

Vier HLA-Peptide wurden aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeiten mit einem Peptid, welches als T-Zellepitop und HLA-A32-Binder beschrieben worden war [122], dem HLA-A32-Molekül zugewiesen. Sieben HLA-Liganden wurden HLA-C-Molekülen zugeordnet. Davon wurden zwei Sequenzen NYIDKVRFL und YIDKVRFL in den zwei Melanomzelllinien ChaMel 41 und ChaMel 84 identifiziert. Da die Bindungsmotive für HLA-A24 und HLA-Cw4 sehr ähnlich sind (siehe Anhang II), wurden für beide sowohl HLA-A24 als auch die HLA-Cw4 als Rezeptoren angenommen. Zehn HLA-Liganden (2,6 %), konnten keinem Bindungsmotiv zugeordnet werden. Eins davon, NLKLLKLSF, war in der Literatur als HLA-B08-Binder beschrieben worden [123]. Da die Melanomzelllinie ChaMel 41, von der das Peptid isoliert worden war, aber kein HLA-B08 exprimiert, muss das Peptid an ein anderes HLA binden, um auf der Zelloberfläche präsentiert zu werden.

Mit den obigen Zuordnungen der identifizierten HLA-Liganden zu einzelnen HLA konnten die Bindungsmotive für die Liganden verfeinert werden. Die Statistik der einzelnen AS in den neun Sequenzpositionen und die daraus resultierenden verfeinerten Bindungsmotive sind in Abbildung 17 für verschiedene HLA als Logos dargestellt, in denen die Häufigkeiten der AS durch die Höhe ihrer jeweiligen Symbole angezeigt sind. Für die Berechnung der Logos wurde das Sequenz-Logo-Programm [124] verwendet. Die Darstellung in diesem Format ermöglicht die Sequenzen gleicher Länge miteinander zu vergleichen. Da eine Mehrheit der identifizierten HLA-Peptide neun AS lang ist, wurden ausschließlich Nonapeptide eingesetzt. Für die Darstellung des HLA-A11-Bindungsmotives wurden die 109 Nonapeptide benutzt, die diesem HLA zugeordnet wurden, außer den zwei an Arginin modifizierten HLA-Liganden (Abschnitt 3.3.1). Für die Visualisierung der Bindung an A01 und B35 HLA-Molekülen wurden 19 bzw. 18 HLA-Liganden verwendet. Für HLA-A24 standen 57 Nonapeptide, für HLA-A02 14 und für HLA-B51 11 Nonapeptide für die Berechnung der Bindungsmotive zur Verfügung.

Die Ergebnisse zeigen gute Übereinstimmungen mit den bereits bekannten Motiven für HLA-A01-, A02-, A24- und B51-Moleküle (Abbildung 21). Die HLA-B35 zugeordneten Peptide zeigten allerdings eine hohe Variabilität im N-terminalen Sequenzbereich und es konnte keine klare Präferenz für die Besetzung der Ankerposition 2 festgelegt werden. Dieses Ergebnis zeigte, dass für die Bindung an HLA außer den Ankeramino-säuren auch AS in anderen

Positionen von Bedeutung sind. Auch die HLA-A11 zugeordneten Sequenzen weisen eine hohe Heterogenität im N-terminalen Bereich auf. Trotzdem konnte außer den positiv geladenen Ankeramino­säuren Arginin und Lysin am C-Terminus des Peptids eine Präferenz für kleine hydrophile AS wie Threonin und aliphatische AS wie Valin in der Position 2 und ähnlich für Serin und Alanin in der Position 1 festgestellt werden.



**Abbildung 21.** Die Sequenzmotive, die für die Bindung an die hier untersuchten HLA aus den Sequenzen der identifizierten HLA-Liganden abgeleitet wurden. Hydrophobe AS werden gelb, basische blau, aromatische schwarz, saure rot, neutrale polare AS grün und Prolin und Glycin purpur dargestellt. Die relative Höhe des Buchstabens zeigt die Frequenz der AS an der jeweiligen Position des Peptids an. Für die Visualisierung der Bindungsmotive wurde ein im Internet zugängliches Programm verwendet (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>).

Die Klassifizierung der identifizierten HLA-Liganden nach Bindungsmotive zeigte in vielen Fällen eine Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Motiven. Allerdings zeigen die mittels HLA-Peptidomanalyse identifizierten Peptide, die nur partielle Übereinstimmung mit bekannten Bindungsmotiven aufweisen, oder diejenigen, die keinem bekannten Bindungsmotiv für die HLA, von denen sie isoliert worden waren, zugeordnet werden konnten, dass Variationen in der Peptidsequenz und Abweichungen von den kanonischen Motiven erlaubt sind und dass die Bindung von Peptiden durch HLA weniger restriktiv ist, als allgemein angenommen wird. Die hier zugeordneten HLA-Restriktionen der Peptide wurden bei der Durchführung der T-Zellassays, in denen die identifizierten HLA-Liganden als potentielle T-Zellantigene untersucht wurden, berücksichtigt.



## 3.2 T-Zellassays

### 3.2.1 *Ex vivo* Reaktivität von T-Zellen aus PBMC

Die Immunogenität der identifizierten HLA-Peptide wurde in T-Zellassays getestet und untersucht, ob T-Zellen gegen die von den Tumorzellen isolierten HLA-Peptide im peripheren Blut der Melanompatienten vorhanden sind. Dazu wurden *ex vivo* INF- $\gamma$ -Elispot-Assays (Abschnitt 2.3.9) mit PBMC von Melanompatienten durchgeführt. Vor der Analyse wurde die Prozentzahl der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im Zellgemisch mittels Durchflusszytometrie bestimmt, um anhand der in ELISpot detektierten Spots die *spots forming units* pro  $1 \times 10^6$  CD8<sup>+</sup> berechnen zu können. Im nachfolgend beschriebenen Assay wurden PBMC von acht HLA-A11<sup>+</sup> Patienten getestet. Wegen der begrenzten Menge des biologischen Materials wurden für die Analysen 29 zufällig ausgewählte HLA-A11-restringierte Peptide verwendet (Tabelle 4). Als schwache T-Zellantwort wurden die T-Zellreaktionen bewertet, bei denen die Anzahl der detektierten Spots zumindest dem doppelten Wert des Hintergrundes (PBMC ohne Peptid) entsprach. Fünffach höhere Frequenzen der peptidspezifischen T-Zellen im Vergleich zum Hintergrund wurden als starke Antwort gewertet.

Gegen 21 der 29 Peptide (72 %) wurden T-Zell-Reaktionen unterschiedlicher Stärke bei mindestens einem von acht Patienten beobachtet. Bei allen getesteten Patienten wurden reaktive T-Zellen detektiert, die je nach Patient gegen 2 bis 15 Peptide reagierten. Die T-Zellen aller acht getesteten Patienten reagierten stark auf die monomethylierte Form des GPS2-Peptids, dessen immunologische Relevanz weiter in Kapitel 3.3.5 untersucht wird. Bei fünf der acht Patienten wurden T-Zellreaktionen gegen das Peptid ATAGIIGVNR aus der schweren Kette 1 von Clathrin nachgewiesen. Schwache T-Zell-Reaktionen gegen die HLA-Liganden ATAGDGLIELRK aus Prohibitin und AVYGQKEIHRK aus G3BP1 wurden in PBMC von vier Melanompatienten registriert. In Kontrollexperimenten mit PBMC von vier HLA-A11<sup>+</sup> gesunden Spendern wurden peptidspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegen 11 Peptide von 29 getesteten Peptiden gefunden. Die T-Zellreaktionen gegen neun Peptide wurden in PBMC sowohl bei gesunden Spendern als auch bei Melanompatienten beobachtet, wobei gegen ATFSTGERK aus dem Exosome-4-Protein und GTYVSSVPR aus HLA-DOA gerichteten CD8<sup>+</sup> T-Zellen nur bei gesunden Spendern nachgewiesen wurden. Im Gegensatz zu den Patienten wurde bei den vier getesteten Spendern keine starke T-Zellreaktion gegen die monomethylierte Form des GPS2 Proteins registriert.



Tabelle 4. *Ex vivo* ELISpot mit PBMCs von Melanompatienten und gesunden Spendern. Die Zahlen in der Tabelle sind Stimulationsindizes und geben an, um das wie Vielfache die T-Zellreaktion stärker als der Hintergrund waren. Die fett gedruckten Zahlen repräsentieren die T-Zellantwort, die zumindest doppelt so hoch wie der Hintergrund waren. Fünffach höhere Frequenzen als die Hintergrundwerte wurden als starke Reaktion bewertet und sind in der Tabelle blau gekennzeichnet.

Peptide	Protein	Melanompatienten								Zahl der Antworten	Gesunde Spender				Zahl der Antworten
		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	
ALYSGVHKK	SASH1	<b>2,3</b>	<b>2,0</b>	<b>2,0</b>	0,0	1,0	0,8	0,6	0,8	3	0,7	0,0	1,0	0,2	0
ASFDKAKLK	thymosin $\beta$ -10	<b>3,8</b>	0,7	<b>3,0</b>	1,1	1,0	0,3	0,6	1,6	2	0,0	<b>2,0</b>	0,5	1,3	1
ATAGDGLIELRK	prohibitin	1,5	1,7	<b>2,0</b>	<b>2,6</b>	<b>2,7</b>	1,8	0,7	<b>2,2</b>	4	1,0	<b>2,0</b>	0,5	0,9	1
ATAGIIGVNR	clathrin HC 1	0,8	<b>2,3</b>	<b>7,0</b>	<b>2,6</b>	<b>2,7</b>	1,5	1,1	<b>4,1</b>	5	1,0	1,0	1,5	1,3	0
ATFSTGERK	exosome component 4	0,0	1,7	0,0	1,9	1,3	0,3	0,4	0,8	0	0,7	<b>3,0</b>	1,0	1,5	1
AVYGQKEIHRK	G3BP1	<b>4,5</b>	0,3	<b>2,0</b>	0,8	<b>2,0</b>	1,0	0,4	<b>2,2</b>	4	1,0	0,0	0,0	1,3	0
GSSDVIHR	PHRF1	1,5	0,7	<b>7,0</b>	0,4	1,0	<b>2,5</b>	1,4	<b>2,2</b>	3	1,0	<b>4,0</b>	0,5	1,5	1
GTADVHFER	THO complex 4	<b>7,5</b>	<b>3,3</b>	1,0	1,1	0,7	0,0	0,6	<b>2,2</b>	3	1,0	0,0	1,5	1,7	0
GTSSVLVSR	FBXW11	<b>3,8</b>	<b>2,0</b>	<b>2,0</b>	1,1	1,0	1,3	0,6	0,5	3	<b>3,3</b>	0,0	0,0	1,7	1
GTYVSSVPR	HLA DOA	0,8	0,0	1,0	1,1	1,0	0,5	0,3	0,5	0	0,0	<b>2,0</b>	1,0	1,3	1
HVYDGKFLAR	Butyrylcholinesterase	<b>2,3</b>	0,7	1,0	0,4	1,3	1,0	0,0	1,4	1	0,3	<b>3,0</b>	1,0	<b>2,1</b>	2
NYIDKVR	Vimentin	<b>9,0</b>	1,7	0,0	1,1	1,7	1,5	1,4	1,9	1	0,7	0,0	1,0	0,4	0
RASHPIVQK	MDN1	<b>2,3</b>	0,7	<b>3,0</b>	1,1	0,7	0,3	0,1	<b>2,2</b>	3	0,0	0,0	1,0	0,9	0
RLFVGSIPK	hnRNP Q2	<b>2,3</b>	1,0	1,0	1,1	<b>2,7</b>	0,0	<b>2,0</b>	1,1	3	1,3	1,0	1,5	0,9	0
RTIAPIGR	CDC5	0,8	0,7	1,0	1,9	<b>2,3</b>	1,3	1,6	1,1	1	0,7	1,0	<b>2,5</b>	1,1	1
RTNWPNTGK	RINT1	0,0	1,0	<b>3,0</b>	0,0	1,0	0,5	0,1	1,4	1	<b>3,7</b>	0,0	0,5	0,6	1
RTSEIYVHR	DDX24	0,8	1,7	1,0	1,5	1,0	0,8	0,6	0,3	0	0,3	1,0	1,5	1,7	0
RTYDREGFKK	Nudix motif 4	0,0	1,3	0,0	0,8	0,3	0,8	1,7	1,1	0	1,3	0,0	1,0	1,7	0
RVQEAVESMVK	FAM136A	<b>11,3</b>	0,0	1,0	1,9	1,7	1,5	0,4	1,1	1	0,3	0,0	0,5	<b>2,1</b>	1
RVTYPAKAK	Ribophorin II	0,8	0,7	1,0	1,1	0,7	0,8	0,7	0,5	0	1,7	0,0	0,0	1,3	0
SAGPPSLRK	zinc finger protein 262	0,0	<b>2,0</b>	<b>3,0</b>	1,1	0,3	0,5	0,6	1,6	2	1,3	1,0	1,5	1,7	0
SIFDGRVVAK	TMCO1	<b>3,0</b>	1,7	0,0	0,4	1,7	1,0	0,6	1,1	0	0,3	1,0	1,0	1,1	0
SQNPRFYHK	GPS2	1,5	0,3	1,0	0,8	0,7	0,3	0,6	1,6	0	0,0	0,0	0,5	0,6	0
SQNPmmRFYHK	mGPS2	<b>6,0</b>	<b>13,3</b>	<b>19,0</b>	<b>7,1</b>	<b>5,3</b>	<b>5,3</b>	<b>8,7</b>	<b>17,7</b>	8	0,7	1,0	1,0	0,2	0
SQNPRdmFYHK	adGPS2	<b>2,3</b>	<b>2,3</b>	<b>6,0</b>	1,1	0,3	1,5	0,3	1,6	3	0,7	0,0	0,5	0,4	0
SSFGRGFFK	liprin- $\beta$ 1	0,0	0,7	<b>3,0</b>	0,8	<b>4,3</b>	0,3	1,3	0,8	2	0,7	1,0	<b>3,0</b>	0,6	1
SVQGIYYR	ADP/ATP translocase 2	<b>2,3</b>	1,3	<b>4,0</b>	1,9	<b>2,3</b>	0,8	1,0	1,4	3	0,7	0,0	0,5	1,1	0
SVSPVVHVR	hnRNPL	0,8	1,7	<b>7,0</b>	0,8	0,7	0,3	0,7	1,6	1	0,3	0,0	0,5	0,4	0
VVDAHVREK	ARD-1	0,8	0,0	1,0	1,1	1,0	0,8	0,7	1,4	0	0,7	1,0	1,0	1,1	0
<b>Gesamtzahl der T-Zellreaktivitäten</b>		14	7	15	3	8	2	2	7		2	6	2	2	



Die *ex vivo* Versuche mit PBMC von Melanompatienten und gesunden Spendern haben gezeigt, dass auch HLA-Liganden, deren Quellproteine nicht direkt in der Verbindung mit tumorigenen Prozessen stehen oder die überexprimiert sind, von den T-Zellen erkannt werden.

### 3.2.2 *Ex vivo* Reaktivität tumorinfiltrierender T-Zellen

Da die größte Fraktion der HLA-Liganden von der Melanomzelllinie ChaMel 84 identifiziert worden war, wurden die von demselben Patienten isolierten tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) für die Testung von T-Zellreaktivitäten in INF- $\gamma$ -ELISpot-Assay verwendet. Für die Analysen wurden 96 Peptide, die zum Teil die Übereinstimmung der HLA-Bindungsmotive mit den von den TIL exprimierten HLA-Molekülen aufwiesen, zufällig ausgewählt. Es wurden 51 HLA-A11-Liganden und 24 HLA-A24-Liganden eingesetzt. Die restlichen 21 Peptide repräsentierten eine heterogene Gruppe an Peptiden mit unterschiedlichen HLA-Assoziationen. Der größere Teil dieser 21 Peptide konnte HLA-B-Molekül des B7-Supertyps (u.a. HLA-B7, B35 und B51) zugeordnet werden. Dazu wurden auch die B57-Liganden und Peptide mit nicht zuordenbaren Bindungsmotiven einbezogen, um zu testen, ob die Peptide an anderen HLA binden und in diesem Kontext eine T-Zellantwort auslösen können.

Um möglichst viele HLA-Peptide zu testen, wurden die HLA-Peptide nach HLA-Restriktion in zum Teil überlappenden Peptidpools zusammengefasst. Es waren durchschnittlich acht Peptide pro Pool. Die TIL wurden mit den Peptidpools für 24 h inkubiert und die T-Zellreaktion mittels ELISpot-Assay ausgelesen. Nur die Pools, bei denen die Anzahl der detektierten Spots zumindest dem doppelten Wert des Hintergrunds entsprachen, wurden weiter auf einzelne Peptide getestet. T-Zellreaktionen wurden gegen 13 Peptide aus den Pools mit HLA-A11 Peptiden registriert. Eine besonders starke Reaktion wurde gegen die Peptide GSSDVIIHR und STMPHSGNR beobachtet (siehe Tabelle 5).

Gegen drei HLA-A24-restringierte Peptide aus Pool Nr.4 wurde eine T-Zellreaktion detektiert, davon in einem Fall eine starke T-Zellantwort gegen das Peptid RYQQWMERF. In Pools mit den HLA-Liganden, die als HLA-B-Binder klassifiziert wurden, konnte gegen 5 Peptide eine T-Zellreaktion beobachtet werden. Davon wurde für die Peptide KALRLSASALF, YPFKPPKV und NLKLKLHSF eine mittelmäßig starke Antwort detektiert. Ursprünglich wurden die Peptide KALRLSASALF und NLKLKLHSF von der ChaMel 41 isoliert und als B57-Binder klassifiziert. T-Zellantworten in TIL von einem Melanompatienten, der dieses HLA nicht exprimiert, zeigen, dass die Peptide von einem anderen HLA gebunden und T-Zellen präsentiert werden müssen.

**Tabelle 5. T-Zellreaktionen gegen die HLA-Liganden.** Die T-Zellantworten, die zumindest doppelt so hoch wie der Hintergrund waren, wurden als positive Reaktion bewertet. Die fünffach höheren Frequenzen, d.h. Reaktivitäten, die  $\geq 5$ -fach über die Hintergrundwerte lagen, wurden als starke Reaktion bewertet und sind in der Tabelle in blau markiert. Der in der Tabelle angegebene Stimulationsfaktor (SI) zeigt, wie vielfach die T-Zellreaktion stärker als der Hintergrund ist.

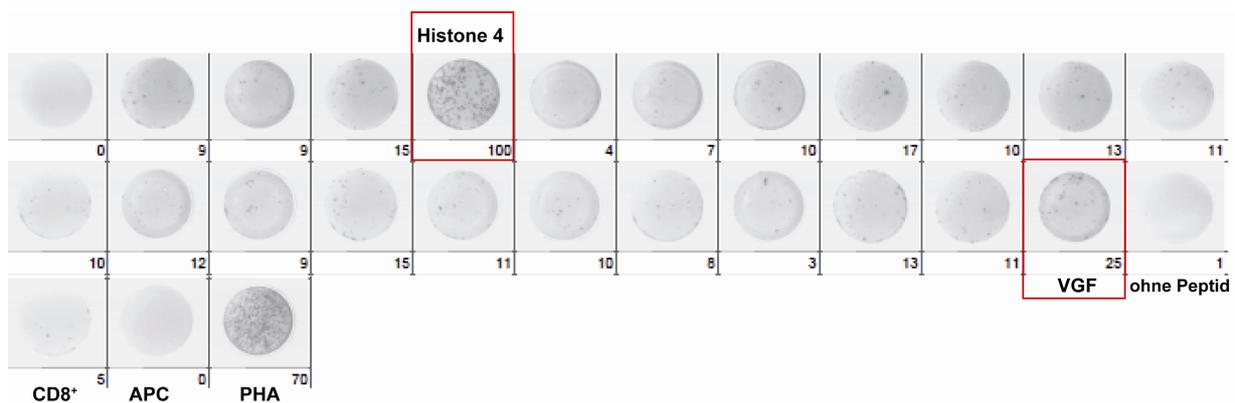
Peptide	Protein	HLA	SI
ATFSSSHRYHK	SEC31-like 1	A11	2
ATIIDLTK	Annexin A1	A11	3
AVQEFGLARFK	PRELI	A11	2
GSSDVIIHR	PHRF1	A11	5
GTSSVIVSR	F-box and WD-40 domain protein 1B	A11	2,25
RTNWPNTGK	RINT1	A11	2,25
RTYDREGFKK	Nudix motif 4	A11	3
RVTYPAKAK	Ribophorin II	A11	2,25
SIFDGRVVAK	TMCO1	A11	2
SSFGRGFFK	Liprin $\beta$ 1	A11	3
SSLSLFFRK	Retinoblastoma-like 2 (p130)	A11	2,5
STMPHTSGMNR	FOXO1	A11	5,75
SVSPVVHVR	hnRNP L	A11	3,75
RFEEKHAYF	Crn, crooked neck-like 1	A24	2,5
RYQQWMERF	elaC homolog 2 HPC2	A24	6,25
VYLDKFIRL	Guanine nucleotide binding protein-like 3	A24	2,5
GRAPQVLVL	RNA helicase 21	B35	2
SSVPGVRL	vimentin	B35	2,5
YPFKPPKV	ubiquitin-conjugating enzyme E2E3	B51	3,75
KALRLSASALF	VGF nerve growth factor inducible	B57	3,75
NLKLKLHSF	retinoblastoma binding protein 4	B57	3

Insgesamt wurden mit TIL aus einem Melanompatienten T-Zellantworten gegen 21 der 96 getesteten Peptide beobachtet, davon wurde in drei Fällen eine starke T-Zellantwort registriert. Wie auch im Fall der *ex vivo* Experimente mit PBMC von Melanompatienten sind diese aktiven HLA-Liganden von den Quellproteinen abgeleitet, welche in keinem direkten Bezug zu tumorrelevanten Funktionen stehen. Wie im Abschnitt 3.1.4 gezeigt wurde, wird *Annexin A1* und *VGF Nerve growth factor inducible Protein* auf mRNA Ebene überexprimiert. In den T-Zellassays mit TIL konnte gezeigt werden, dass auch T-Zellen gegen Peptide aus diesen Quellproteinen in Patienten durch den Tumor induziert worden waren.

### 3.2.3 Identifizierung Histon-4-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Melanompatienten und gesunden Spendern

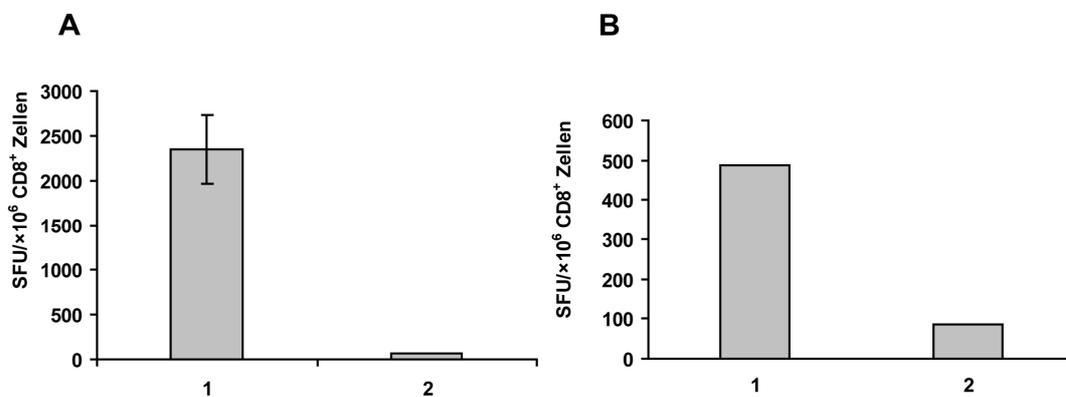
Da die von Tumorzellen präsentierten, HLA-gebundenen Peptide von den T-Zellen erkannt werden können, wurde ein Teil der von den Melanomzelllinien isolierten und identifizierten HLA-Peptide in *in vitro* Priming T-Zell-Assays eingesetzt. Während mit den in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen *ex vivo* Assays *in vivo* induzierte und expandierte T-Zellen nachgewiesen wurden, werden durch *in vitro* Priming naive T-Zellen, d.h. solche, die zuvor noch keinen Antigenkontakt hatten, induziert. Damit kann die Immunogenität der Peptide für die Induktion T-Zell-vermittelter Immunreaktionen unabhängig von natürlich erfolgten Immunreaktionen getestet werden. Dabei wurden die CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus PBMC von gesunden Spendern isoliert und mit den Peptiden stimuliert. Für die Stimulation wurden bestrahlte autologe, d.h. von demselben Spender stammende PBMC als antigenpräsentierende Zellen (APC) verwendet. Die T-Zellreaktion wurde 14 Tage nach der Stimulation bzw. Restimulation in IFN- $\gamma$ -ELISpot-Assays getestet. Mit dieser Methode konnte die durch die Zugabe des Peptids induzierte INF- $\gamma$ -Produktion der einzelnen T-Zellen detektiert werden und die Anzahl peptidspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen bestimmt werden.

Diese Assays wurden mit 23 von der Melanomzelllinie ChaMel 41 isolierten HLA-Liganden durchgeführt. Dabei wurden die T-Zellen von drei gesunden Spendern verwendet, die partiell in den HLA-Alleltypen mit der Melanomzelllinie übereinstimmten. Die T-Zellen wurden zunächst mit dem Peptidpools stimuliert und anschließend wurden die expandierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegen die einzelnen Peptide in ELISpot-Assay getestet. Bei einem HLA-B35<sup>+</sup> Spender konnten T-Zellreaktionen nach der ersten Restimulation gegen 15 von 23 getesteten Peptide detektiert werden (Anhang VIII). Besonders starke T-Zellreaktionen waren gegen das Peptid NVIRDAVTY aus Histon-4 gerichtet und die zweitstärkste Reaktion gegen das Peptid KALRLSASALF aus dem *Nerve growth factor inducible Protein* (VGF) registriert worden (Abbildung 22).



**Abbildung 22. Detektion Histone-4-spezifischer T-Zellen in INF- $\gamma$ -Elispot-Assays.** Die mit Peptidpools stimulierten CD8<sup>+</sup>-T-Zellen von dem gesunden Spender AB wurden in ELISpot-Assays auf T-Zell-Reaktionen gegen einzelne Peptide getestet. Als Kontrollen wurden die T-Zellen mit Peptid ungeladenen APC, CD8<sup>+</sup>-Zellen alleine und die APC alleine verwendet. Die unspezifische Stimulation mit Phytohemagglutinin (PHA) diente als positive Kontrolle. Anhand der detektierten Spots und der Anzahl verwendeter T-Zellen wurden die Spots forming units pro 10<sup>6</sup> CD8<sup>+</sup>-Zellen berechnet (siehe Anhang VIII). Die Wells mit den einzelnen Peptiden, gegen die die T-Zellen am stärksten reagiert hatten, sind in der Abbildung gekennzeichnet.

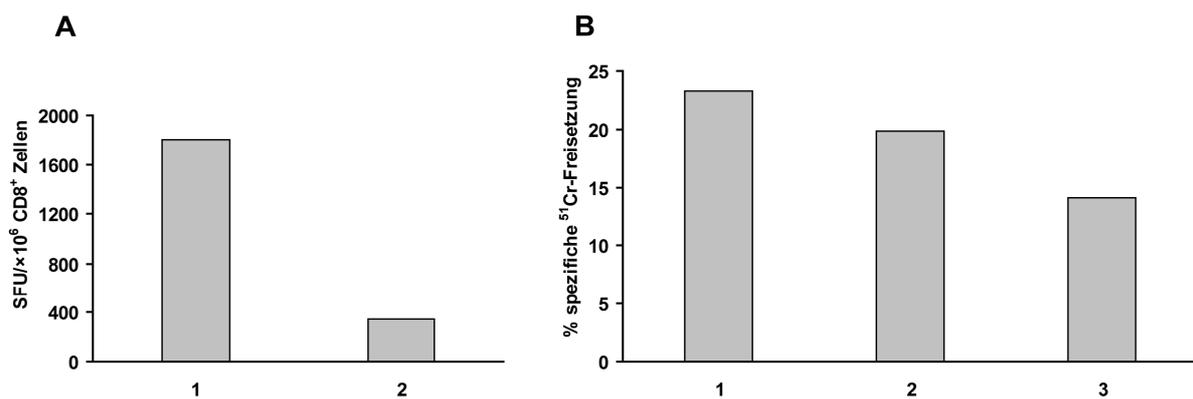
Die Versuche mit dem Histone-4-Peptid wurden fortgesetzt und das Ergebnis durch die Stimulation mit von demselben gesunden Spender isolierten T-Zellen verifiziert (Abbildung 23A). Die HLA-Restriktion des T-Zellepitops wurde im T-Zell-Assay mit den Zellen eines weiteren HLA-B35<sup>+</sup> gesunden Spenders bestätigt (Abbildung 23B). Allerdings war die Zellproliferation nach der T-Zellstimulation mit dem Histone-4 Peptid bei dem ersten gesunden Spender deutlich höher, sodass der ELISpot-Assay in Triplikaten durchgeführt werden konnte.



**Abbildung 23. ELISpot-Assay mit dem Histone-4-Peptid NVIRTDVITY und T-Zellen, die von gesunden Spendern isoliert worden waren.** Die Ergebnisse der T-Zellanalyse nach *in vitro* Priming der CD8<sup>+</sup> T-Zellen von den gesunden Spendern AB und NR sind in A bzw. B gezeigt. Balken 1 repräsentiert die T-Zellreaktion gegen das Peptid, Balken 2 die gegen T-Zellen ohne Peptid (negative Kontrolle). Abbildung A zeigt die T-Zellantwort  $\pm$  Standardabweichung. Die Ergebnisse sind als *spots forming units* pro 1 $\times$ 10<sup>6</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen dargestellt.

Als weiteres wurde untersucht, ob das Peptid auch bei Melanompatienten eine T-Zellreaktion induzieren kann. Die T-Zellen wurden aus PBMC eines HLA-B35<sup>+</sup> Melanompatienten isoliert.

Aufgrund der geringen Menge an Ausgangsmaterial wurden die T-Zellen durch die zweimalige Stimulation mit dem Histon-4-Peptid in Zellkultur expandiert. Nach der zweiten Stimulation konnte die T-Zellantwort gegen das Histon-4-Peptid mittels ELISpot-Assays ermittelt werden (Abbildung 24A). Außerdem wurde untersucht, ob die Histon-4-spezifischen Zellen in der Lage sind, die Tumorzellen zu erkennen und zu eliminieren. Dies wurde in  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungssassay getestet. Dafür wurden die Tumorzellen der Zelllinie, von der der HLA-Ligand isoliert wurde, als Target und die mit Peptid stimulierten T-Zellen von demselben Patienten als Effektorzellen verwendet. Die spezifische Zelllyse sowohl der mit Peptid gepulsten, als auch der Tumorzellen ohne Peptid wurde gegenüber der verwendeten Kontrolle (Targetzellen mit anti-HLA-Klasse-I-Antikörper) beobachtet (Abbildung 24B). Die Menge des natürlich prozessierten und präsentierten Histon-4-Peptids war ausreichend, um die maximale Antwort der T-Zellen auszulösen, sodass durch die Zugabe des Peptids die Lyse der Tumorzellen nur leicht erhöht wurde.



**Abbildung 24. INF- $\gamma$ -ELISpot-Analyse (A) und  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungssassay (B) mit den T-Zellen eines Melanompatienten.** Der ELISpot-Assay mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen vom Melanompatienten M-DIP wurde unter den gleichen Bedingungen wie bei den gesunden Spendern durchgeführt. Abbildung A zeigt die T-Zellantwort. Die peptidspezifische Lyse (B) der autologen Tumorzellen wurde mit T-Zellen des Melanompatienten am Tag 7 nach der zweiten Stimulation im  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungssassay getestet. Die CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden im Verhältnis 20:1 zu den Tumorzellen eingesetzt. Im Balken 1 ist die Prozentzahl der Lyse von mit Peptid gepulsten Tumorzellen und im Balken 2 ist die Tumorlyse ohne Zugabe des Peptids dargestellt. Als Kontrolle der spezifischen Lyse wurde der anti-HLA-Klasse-I-Antikörper W6/32 verwendet (Balken 3). Die in Abbildung B dargestellten Ergebnisse wurden in zwei weiteren unabhängigen, unter den gleichen Bedingungen durchgeführten Experimenten bestätigt.

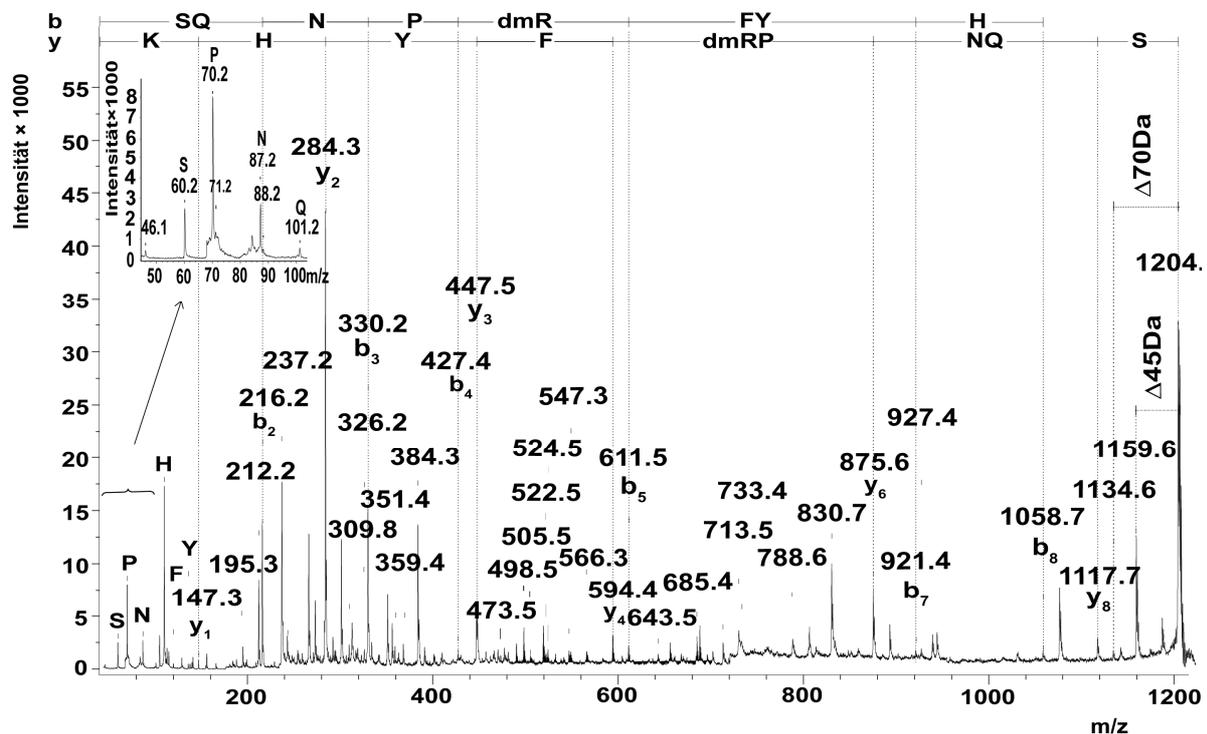
*In vitro* T-Zellanalysen zeigten, dass das Peptid abgeleitet von den ubiquitär hochexprimierten Protein Histon-4 von CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkannt wird und, dass die T-Zellen in der Lage sind, die antigenexprimierenden Melanomzellen zu eliminieren.



### 3.3 GPS2-Methylierung

#### 3.3.1 Identifizierung der modifizierten HLA-gebundenen Peptide

Im MALDI-TOF-PSD-Spektrum eines Peptids mit der Masse 1204,6 Da wurden Fragmente mit den Massendifferenzen von 45 Da und 70 Da zum Vorläuferion und zu manchen Fragmenten im Spektrum detektiert (Abbildung 25).

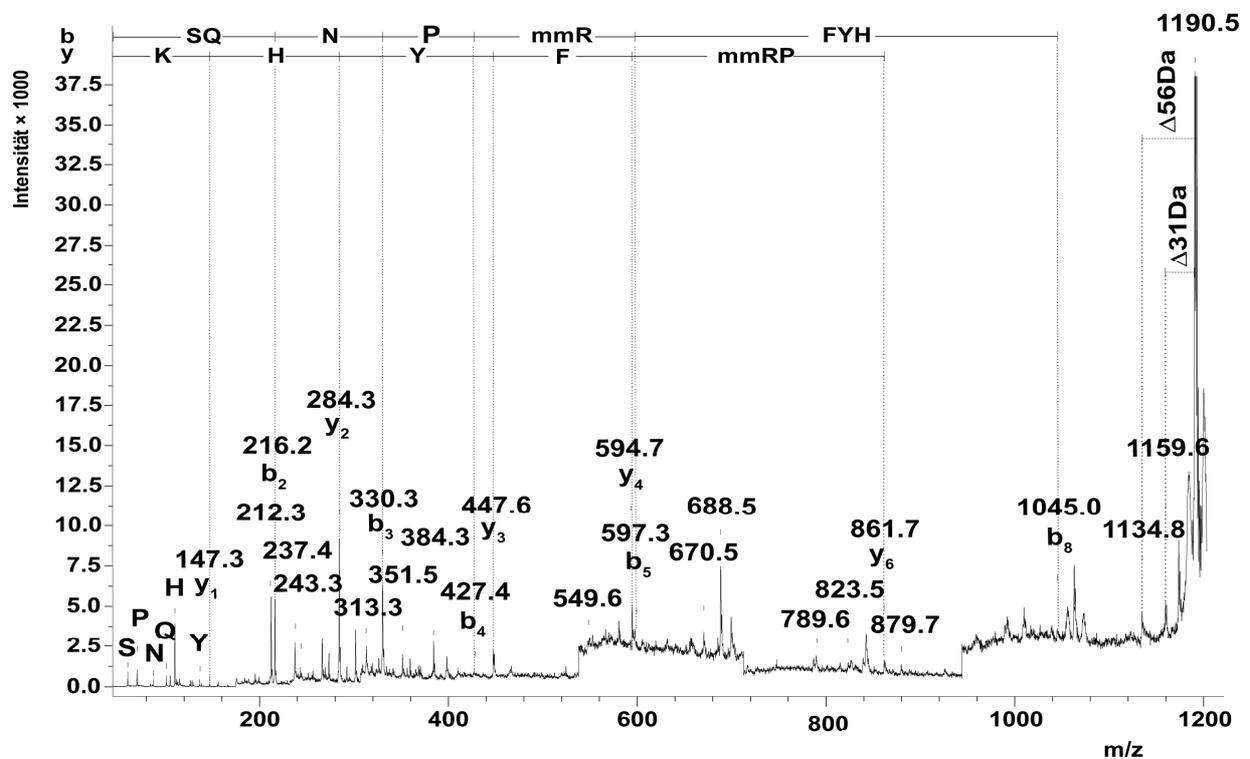


**Abbildung 25. MALDI-TOF-PSD-Spektrum des dimethylierten GPS2-Peptids.** Der HLA-Ligand wurde aus der Melanomzelllinie ChaMel 105 isoliert. Die detektierten und zu der Sequenz SQNPRFYHK zugeordneten b- und y-Ionenserien sind im Spektrum gekennzeichnet. Die Abstände zwischen den benachbarten Fragmenten einer Ionenserie entsprechen einer AS. Die Fragmentmassen, die durch die neutrale Abspaltung von Dimethylamin (-45 Da), Dimethylcarbodiimid (-70 Da) oder Dimethylguanidin (-87 Da) vom Vorläuferion, von internen Fragmenten oder von a-, b- und y-Ionen entstanden sind, bestätigten die asymmetrische Dimethylierung von Arginin. In der Einfügung ist der untere Massenbereich, in dem die Fragmente von Dimethylammonium ( $m/z = 46,1$ ), von Dimethylcarbodiimidium ( $m/z = 71,2$ ) und Dimethylguanidinium ( $m/z = 88,2$ ) identifiziert wurden, dargestellt. Alle im PSD-Spektrum detektierten, sequenzspezifischen Fragmente sind im Anhang VI zusammengefaßt

Solche Massendifferenzen können durch die Abspaltung von Dimethylamin (45 Da) und Dimethylcarbodiimid (70 Da) von dem an der Seitenkette modifizierten Arginin erklärt werden [125]. Die im kleinen Massenbereich detektierten Signale bei  $m/z = 46,1$ ,  $71,2$  und  $88,2$  deuteten entsprechend auf Dimethylammonium, Dimethylimidium, Dimethylguanidinium, die als Fragmentierungsprodukte von Dimethylarginin beschrieben wurden [126, 127]. Außerdem gibt

die neutrale Abspaltung von Dimethylamin und das Signal bei  $m/z = 46$  im unteren Massenbereich einen deutlichen Hinweis auf die asymmetrische Dimethylierung von Arginin. Aufgrund der modifizierten AS konnte die Peptidsequenz durch die Anwendung der datenbankabhängigen MASCOT-Suchmaschine nicht aufgeklärt werden. Für die weitere Sequenzberechnung wurde die *de novo* Peptid-Sequenzierungssoftware Sequit! verwendet. Für die Kalkulationen wurde Dimethylarginin als modifizierte AS benutzt. Die 500 von dem Programm vorgeschlagenen Kandidatensequenzen wurden für die BLAST-Suche in der NCBI-Datenbank verwendet. Für einen von den zwei besten Top-Kandidaten wurde die 100 %-ige Übereinstimmung mit der C-terminalen Sequenz SQNPRFYHK des *G protein pathway suppressor 2* (GPS2) festgestellt, jedoch mit dem dimethylierten Arginin in der Sequenz. GPS2 war als Mitglied des nukleären Rezeptor-Korepressor-Komplexes (engl. *nuclear receptor corepressor complex*, NCoR) beschrieben worden [128]. Der neutrale Verlust von Dimethylamin, Dimethylcarbodiimid und Dimethylguanidin bei b und y Fragmenten bestätigte die asymmetrische Dimethylierung von Arginin. Die starken Signale bei  $m/z$  195,3 und 212,2, die mit den internen Fragmenten NP und NP-17 zusammenfallen, konnten zusammen mit dem Fragment  $m/z$  237,2 durch die Abspaltung der Dimethylamin-, Dimethylcarbodiimid- und Dimethylguanidiningruppen aus dem internen Fragment PdmR geklärt werden. Die Masse 282,2 von diesem modifizierten Dipeptid wurde im Spektrum allerdings nicht detektiert. Einzelne Fragmente mit  $m/z = 309,8$ , 505,5 und 788,6 konnten den Abspaltungsprodukten der Dimethylguanidiningruppe (-87 Da) aus den internen Fragmenten NPdmR, PdmRFY und aus einem  $y_6$  Ion zugeordnet werden. Die geringe Anzahl der durch den neutralen Verlust des Dimethylguanidins entstandenen Fragmente bedeutet, dass die Dimethylguanidiningruppe gegen die Fragmentierung in der Gasphase resistent ist. Die Abspaltung des Dimethylamins (-45 Da) und Dimethylcarbodiimids (-70 Da) wurde von mehreren internen Fragmenten NPdmR, NPdmRF, PdmRF und PdmRFY detektiert, ohne dass die Massen dimethylierter Formen ( $m/z$  396,2, 543,3, 429,3 und 592,3) der Fragmente nachgewiesen werden konnten. Solche Dominanz der Abspaltungsprodukte in dem PSD-Spektrum gegen die dimethylierten Formen zeigt, dass die zwei Methylgruppen zur Destabilisierung der Seitenkette von Arginin führen und damit die Fragmentierung der Seitenkette in der Gasphase erleichtern. Der neutrale Verlust von Dimethylamin bei den N- und C-terminalen Fragmenten  $y_5$ ,  $y_6$ ,  $y_7$ ,  $a_6$ ,  $b_6$  oder von Dimethylcarbodiimid bei Ionen  $b_6-17$  und  $a_6-17$  bestätigte die Lokalisation des modifizierten Arginins in der Peptidsequenz.

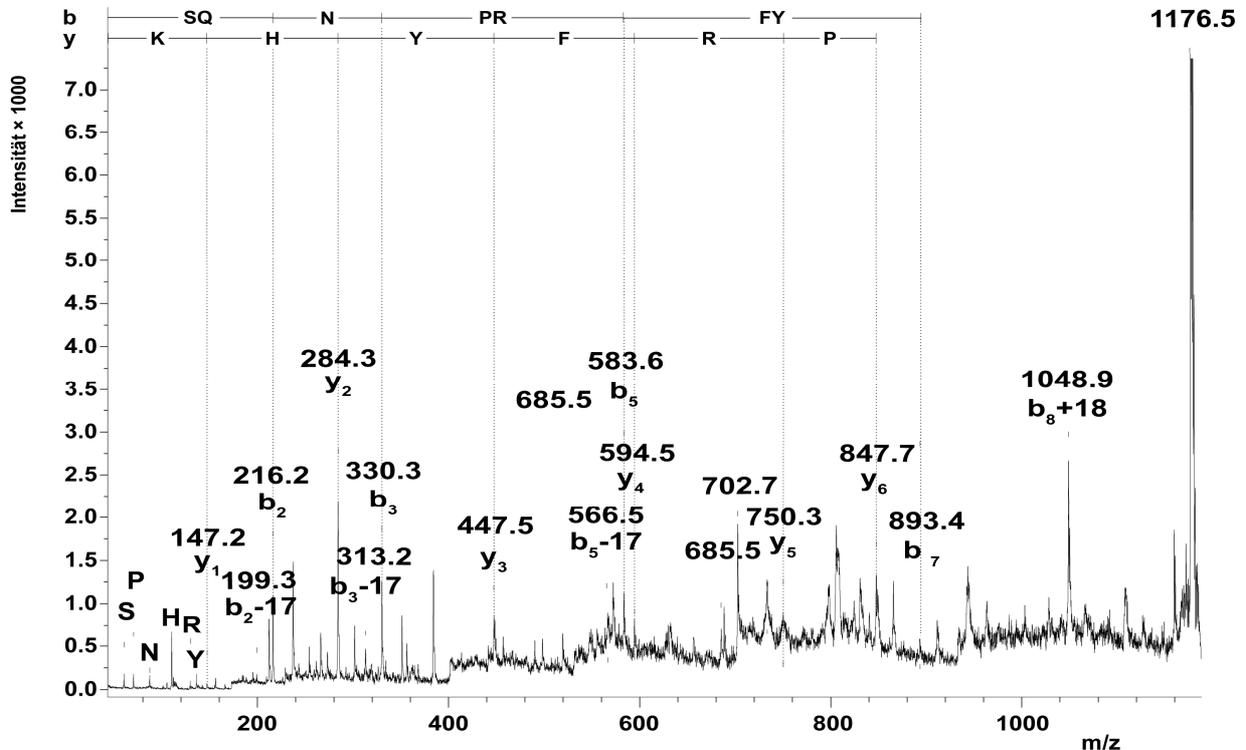
Die neutrale Abspaltung von Methylamin (-31 Da) und Monomethylcarbodiimid (-56 Da) aus dem Vorläuferion mit  $m/z$  1190,5 in einem anderen PSD Spektrum (Abbildung 26) deutete auf eine Monomethylierung von Arginin hin. Für die Sequenzberechnung mit Sequit! wurde Arginin als monomethylierte AS eingesetzt. Es wurde dieselbe Sequenz wie für das Peptid mit  $m/z$  1204,6 berechnet, nur mit dem monomethyliertem Arginin. Bei der weiteren manuellen Sequenzauswertung wurde der neutrale Verlust von Monomethylamin (-31 Da) von den internen Fragmenten festgestellt, ohne die entsprechenden Vorläuferionen dieser Fragmente zu detektieren (Abbildung 26 und Anhang VI). Das deutete wiederum auf eine effektive Fragmentierung der Seitenkette des monomethylierten Arginin hin. Die neutrale Abspaltung von Monomethyldiimid (-56 Da) wurde an den Ionen  $a_7$ ,  $b_8$   $b_8-18$  und aus internem Fragment NP detektiert.



**Abbildung 26. MALDI-TOF-PSD-Spektrum des monomethylierten GPS2-Peptids.** Das Peptid wurde von der Zelllinie ChaMel 84 isoliert. Die detektierten und zu der Sequenz SQNPRFYHK zugeordneten b- und y-Ionenserien sind im Spektrum gekennzeichnet. Die neutrale Abspaltung des Monomethylamins (-31 Da) und Monomethylcarbodiimid (-56 Da), die als Indikator für die Monomethylierung dienen, wird im Spektrum angezeigt. Die Iminiumionen einzelner AS sind mit Ein-Buchstaben-Symbol der jeweiligen AS gekennzeichnet.

Die Identifizierung der relativ geringen Anzahl der de-monomethylierten Produkte im PSD-Spektrum bedeutet, dass die Fragmentierung der monomethylierten Seitenkette von Arginin in der Gasphase im Vergleich zur dimethylierten Form energetisch ungünstig ist.

Ein drittes Peptid mit  $m/z = 1176,5$  wurde als nicht methylierte Variante der beiden vorherigen identifiziert (Abbildung 27). Die Sequenz wurde mit Hilfe der *de novo* Sequenzierungssoftware Sequit! berechnet und mit der datenbankabhängigen Suchmaschine MASCOT bestätigt.



**Abbildung 27. MALDI-TOF-PSD-Spektrum des nicht modifizierten GPS2-Peptids.** Die der SQNPRFYHK Sequenz zugeordneten Massen der b- und y-Ionenserie sind im PSD-Spektrum eingezeichnet. Die Immoniumionen einzelner AS sind mit Ein-Buchstaben-Symbol der jeweiligen AS gekennzeichnet.

Zur Validierung der Ergebnisse wurden die PSD-Spektren synthetischer Analoga der Peptide aufgenommen und mit den Spektren der natürlichen HLA-Liganden verglichen. Wie im PSD-Spektrum des natürlichen HLA-Peptids wurden die gleichen Abspaltungsmuster des Dimethylamins, Dimethylcarbodiimids oder Dimethylguanidins aus Vorläuferion, internen Fragmenten oder a, b, y-Ionenserien auch im PSD-Spektrum des synthetischen Peptids mit dem Dimethylarginin in der Sequenz beobachtet (Anhang VII). Die vollständige Übereinstimmung der N- und C-terminalen Fragmente zwischen den beiden Spektren bestätigte die angenommene Sequenz SQNPRFYHK mit dem dimethylierten Arginin.

Der neutrale Verlust des Monomethylamins (-31 Da) bei  $m/z = 1159,4$ , des Monomethyldiimids (-56 Da) bei  $m/z = 1134,5$  vom Vorläuferion  $m/z = 1190,4$  und von Fragmenten, die das monomethylierte Arginin enthielten, wurde im PSD-Spektrum des synthetischen Peptids detektiert (siehe Anhang VII) und bestätigte zusammen mit den b- und y-Serien die methylierte Form des natürlichen HLA-Epitops.

Die Sequenzvalidierung des unmodifizierten Peptids wurde durch Vergleich des PSD-Spektrums des vom HLA isolierten Peptids mit dem synthetischen Analogon (siehe Anhang VII) erreicht. Die Sequenz wurde durch die Präsenz der b2, b3, b5, b7 Ionen bei m/z 216, 330, 583, 893, y1-y6 Ionen bei m/z 147, 284, 447, 594.5, 750 und 847 in beiden Spektren bestätigt.

### 3.3.2 Einfluss der Methylierung auf die Stabilität der Seitenketten von Arginin

Die PSD-Spektren der synthetischen Peptide wurden weiter für die Untersuchung des Effekts der Methylierung auf die Stabilität der Guanidiniumgruppe von Arginin genutzt. Die in Spektren der modifizierten und nichtmodifizierten Peptide detektierten unterschiedlichen Anzahlen an durch die Abspaltung von der Seitenkette des Arginins entstandenen Fragmenten bestätigte die destabilisierende Wirkung der Methylgruppe (Tabelle 6). Dabei wurden 44 solcher Abspaltungsprodukte im Spektrum der dimethylierten Peptide detektiert. 19 davon sind durch den neutralen Verlust von Dimethylamin (-45 Da), 13 durch die Abspaltung von Dimethylcarbodiimid (-70 Da) und 12 durch die von Dimethylguanidinium (-87 Da) entstanden. Wesentlich weniger analoge Produkte wurden im Spektrum des monomethylierten Peptids registriert. Dabei wurde in jeweils 13 Fällen die Abspaltung von Monomethylamin (-31 Da) und Monomethylcarbodiimid (-56 Da) und in 5 Fällen der neutrale Verlust von Monomethylguanidinium (-73 Da) detektiert.

Im Spektrum des nicht methylierten Peptids wurde der neutrale Verlust von Carbodiimid (-42 Da) in 8 Fällen und die Abspaltung der Guanidiniumgruppe (-59 Da) in 4 Fällen registriert. Die neutrale Abspaltung von Ammoniak wurde nicht zur Auswertung herangezogen, da solche Fragmente auch durch die Abspaltung von den Seitenketten anderer AS (Asparagin und Glutamin oder Lysin) entstehen könnten.

**Tabelle 6. Die in PSD-Spektren synthetischer Peptide detektierten neutralen Abspaltungen von der Seitenkette von Arginin.**

Fragmente	Dimethyliertes GPS			Monomethyliertes GPS			Nichtmethyliertes GPS	
	-45, m/z <sup>1</sup>	-70 m/z <sup>2</sup>	-87 m/z <sup>3</sup>	-31 m/z <sup>4</sup>	-56 m/z <sup>5</sup>	-73 m/z <sup>6</sup>	-42 m/z <sup>7</sup>	-59 m/z <sup>8</sup>
PR	237,2	212,2	195,3	237,3	212,2	195,2	212,2	195,3
NPR	351,3	326,2	309,9	351,4	326,3	309,2	326,2	309,1
PRF	384,3	359,4	342,3	384,3	359,4		359,3	
NPRF	498,4	473,5		498,4	473,4		473,4	
a5	538,6							
PRFY	547,4	522,5	505,4	547,5	522,5			
b5-17	549,2	524,4	507,3	549,4	524,5		524,5	507,3

Fragmente	Dimethyliertes GPS			Monomethyliertes GPS			Nichtmethyliertes GPS	
	-45, m/z <sup>1</sup>	-70 m/z <sup>2</sup>	-87 m/z <sup>3</sup>	-31 m/z <sup>4</sup>	-56 m/z <sup>5</sup>	-73 m/z <sup>6</sup>	-42 m/z <sup>7</sup>	-59 m/z <sup>8</sup>
b5	566,3	541,6	524,4	566,5	541,5	524,5	541,4	524,5
NPRFY	661,4							
a6-17	668,4	643,5						
a6	685,4		643,5	685,5				
b6-18		670,5			670,4			
b6-17	696,4							
b6	713,5	688,4			688,4		688,4	
y5-17			674,4	716,6				
y5				733,6				
QNPRFY				788,8		747,7		
NPRFYH							773,6	
y6-17	813,7	788,6		813,4				
y6	830,7		788,6	830,8	805,9			
a7-17		806,6						
a7	848,6		806,6		823,8			
b7-17	859,5	834,6						
b7		851,6	834,6		851,7			
y7-17	927,4	902,4	885,7		902,3			
y7	944,5		902,4			902,3		
b8-17		971,7						

<sup>1</sup> –Masse von Dimethylamin

<sup>2</sup> –Masse von Dimethylcarbodiimid

<sup>3</sup> –Masse von Dimethylguanidin

<sup>4</sup> –Masse von Methylamin

<sup>5</sup> –Masse von Monomethylcarbodiimid

<sup>6</sup> –Masse von Monomethylguanidin

<sup>7</sup> –Masse von Carbodiimid

<sup>8</sup> –Masse von Guanidin

Die experimentellen Daten zeigen, dass mit der Zunahme der Methylierung die Anzahl der Abspaltungseignisse steigt. Das bestätigt den in den Spektren natürlicher Peptide beobachteten Destabilisierungseffekt dieser Modifikation, wodurch die meisten Abspaltungsprodukte im Spektrum des dimethylierten Peptids registriert wurden.

### 3.3.3 Die GPS2-Methylierung in verschiedenen Melanomzelllinien

Die unmethylierten und dimethylierten Formen des GPS2 HLA-Liganden wurden durch die PSD-Analyse in allen vier Melanomzelllinien nachgewiesen. Die Sequenz der monomethylierten Form konnte dagegen nur in ChaMel 84 und ChaMel 105 bestätigt werden (Tabelle 7). Ein schwaches Signal, das der Masse des monomethylierten HLA-Ligand entspricht, wurde in einer

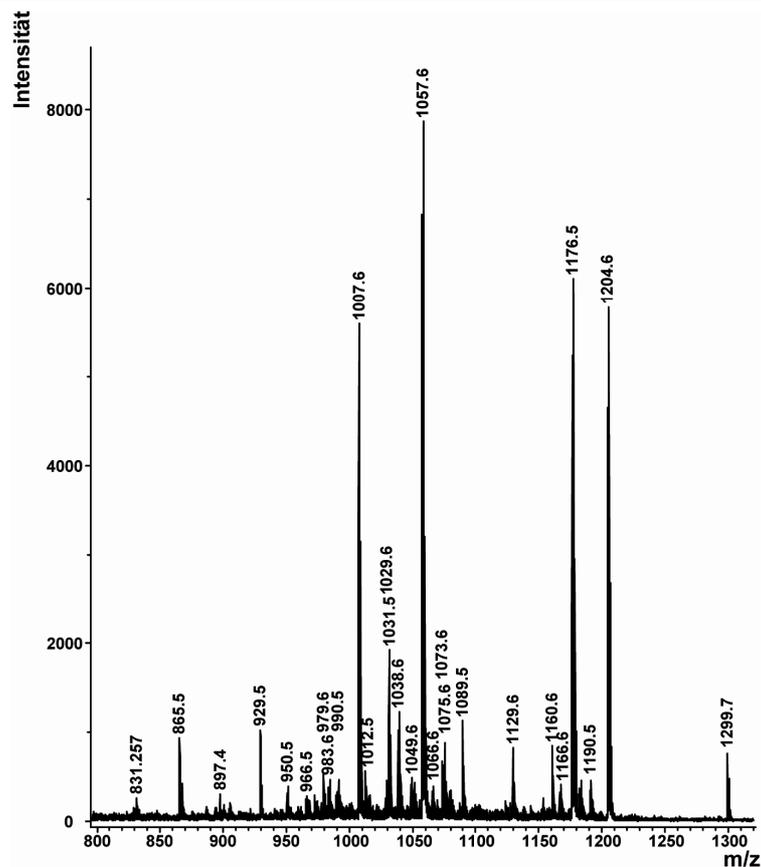
2D-HPLC-Fraktion aus der Zelllinie ChaMel 100 detektiert, aber aufgrund der geringen Menge an Peptid konnte die Sequenz nicht bestätigt werden.

**Tabelle 7. Die in den analysierten Zelllinien detektierten Formen der GPS2-Peptide.**

Zelllinie	Nicht modifiziertes Peptid	Monomethyliertes Peptid	Dimethyliertes Peptid
ChaMel 41	+	-	+
ChaMel 84	+	+	+
ChaMel 100	+	schwach	+
ChaMel 105	+	+	+

Da die im MALDI-Massenspektrometer gemessene Signalintensität der Ionen direkt proportional zur Peptidmenge ist, wurde diese Eigenschaft für die Abschätzung der relativen Mengen der drei Formen von GPS2 HLA-Liganden benutzt. Die Analyse der 1D-HPLC-Fraktionen von der ChaMel 84 Zelllinie zeigte, dass die Methylierung einen Einfluss auf die Retentionszeiten der GPS2-Peptide hatte. Die methylierten und monomethylierten Peptide wurden in derselben Fraktion Nr.6 detektiert, wogegen die dimethylierte Form in der späteren Fraktion Nr.7 eluiert und detektiert wurde (Anhang IV). Für den direkten Vergleich aller drei Formen von GPS2-Peptiden wurde eine kleine Menge von je 2 µl der jeweiligen Fraktionen direkt auf einem MALDI-Target vermischt und nach der Kokristallisation mit der Matrix per MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert.

Ein 14-facher Unterschied in den Signalintensitäten wurde zwischen der nicht modifizierten und der monomethylierten Form des Peptids beobachtet (relative Intensitäten von 1 versus 0,07) (Abbildung 28). Eine leichte Dominanz der nichtmethylierten gegenüber der dimethylierten Form konnte durch den Vergleich der entsprechenden Signale festgestellt werden (relative Intensitäten von 1 versus 0,92).



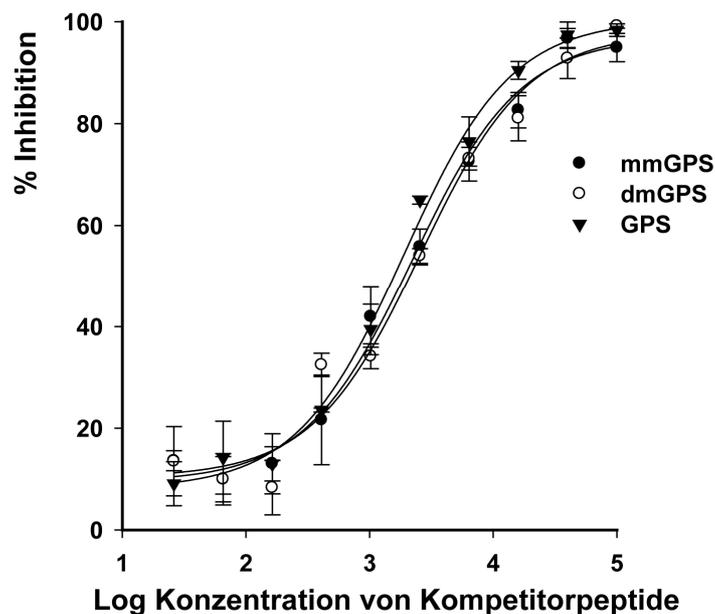
**Abbildung 28. MALDI-TOF-MS-Spektrum zur Abschätzung der relativen Mengen an GPS2-Peptiden.** MS-Spektrum der gepoolten HPLC-Fractionen 6 und 7, in dem die Masse der nichtmethylierten ( $m/z = 1176,5$ ), von monomethylierten ( $m/z = 1190,5$ ) und dimethylierten ( $m/z = 1204,6$ ) HLA-Liganden detektiert wurde.

Diese Vergleichsanalyse zeigte, dass die monomethylierte Form in deutlich geringeren Mengen gegenüber den zwei anderen Formen des GPS2-Peptids in den HLA-Peptidomen vorkommt.

### 3.3.4 HLA-Bindungsassay von GPS2-Peptiden an das HLA-A11 Molekül

Als nächstes wurde untersucht, welchen Einfluss die Methylierung der GPS2-Peptide auf die Bindung an HLA-A11 hat. Die Bindung der di-, mono- und nichtmethylierten Formen des Peptids an HLA-A11 Moleküle wurden in einem kompetitiven Bindungsassays untersucht. Da die modifizierten GPS2-Peptide aufgrund ihrer an Position 9 lokalisierten basischen Ankeraminosäure Lysin HLA-A11 zugeordnet werden konnten, wurde für die Analyse der Bindung die HLA-A11<sup>+</sup> Zelllinie CB-EBV verwendet. Als Referenz- oder Indikatorpeptid diente der mit Fluoreszein markierte HLA-A11-Ligand KVFCALINK. Die Zellen wurden mit variierten Konzentrationen der jeweiligen GPS2-Peptide und einer konstanten Konzentration des Referenzpeptids inkubiert und die Fluoreszenz mittels Durchflusszytometrie gemessen. Aus den

Fluoreszenzdaten wurde die Bindungsinhibition berechnet und gegen die logarithmisch aufgetragene Konzentration der Inhibitorpeptide geplottet (Abbildung 29). Die Inhibitionskurven für die drei Varianten des GPS2-Peptids und die aus den Kurven berechnete mittlere inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) von 2.5, 2.2 und 1.9  $\mu\text{M}$  für das di-, mono- und nichtmethylierte GPS2-Peptid zeigten, dass es keinen signifikanten Unterschied in den Bindungseigenschaften der getesteten Peptide für HLA-A11 gibt.

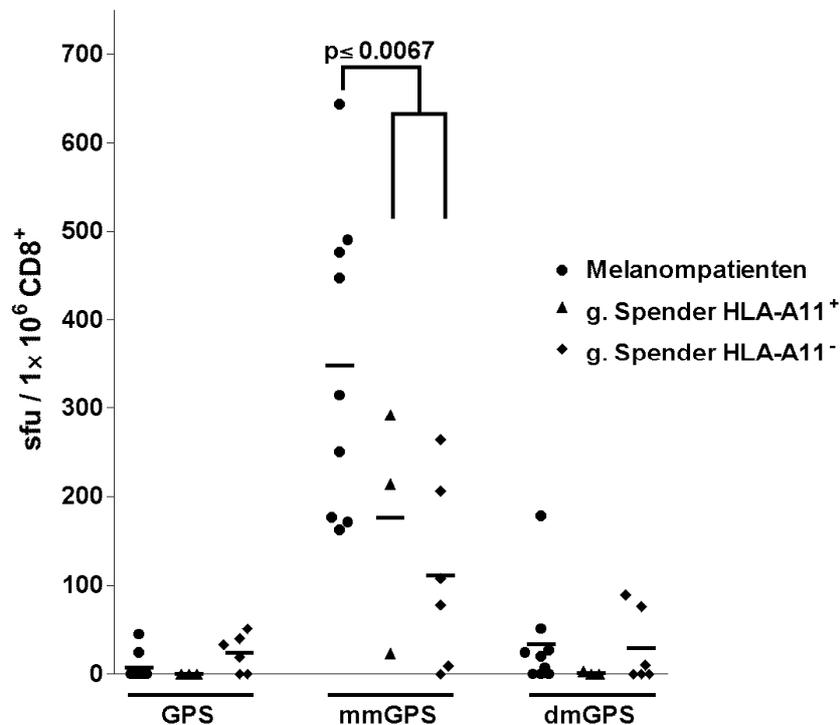


**Abbildung 29. Die Bindung der di-, mono- und nichtmethylierten GPS2-Peptide an HLA-A11.** Für die Bindungsexperimente, die als Wettbewerbsassays ausgeführt wurden, wurde das mit Fluoreszein-markierte Peptid KVFPICALINK als Referenzpeptid und die HLA-A11<sup>+</sup> Zelllinie CB-EBV als Träger der HLA eingesetzt. Die drei Varianten des GPS2-Epitops wurden als Kompetitorpeptide getestet. Die Peptide wurden in 10 Verdünnungsschritten in Konzentrationen von 100 bis 0,026  $\mu\text{M}$  titriert und zusammen mit 1,7  $\mu\text{M}$  des Referenzpeptids eingesetzt. Die mit den Zellen assoziierte Fluoreszenz wurde nach 4-stündiger Inkubation bei 26°C mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Für die Darstellung der Inhibitionskurven abhängig von der Peptidkonzentration und die Berechnung der  $IC_{50}$ -Werte wurde die Funktion „sigmoidal dose-response“ der SigmaPlot 8.0 Software verwendet. Die Assays wurden in Triplikaten ausgeführt und Mittelwerte mit Standardabweichungen aufgetragen.

Das Ergebnis zeigt, dass alle drei Varianten vergleichbar gut an HLA-A11 binden und dass die deutlich geringere Menge an monomethyliertem GPS2-Peptid in den HLA-Peptidomen (siehe 3.1.1) nicht durch Differenzen in den Bindungsaffinitäten der Peptide erklärt werden kann. Vielmehr muss angenommen werden, dass dies auf Methylierungsunterschiede des Proteins GPS2 zurückzuführen ist.

### 3.3.5 Immunogenität der GPS2-Peptide

Die aus den Tumorzelllinien isolierten und identifizierten GPS2-Peptide wurden in INF- $\gamma$ -ELISpot-Assays zum Nachweis T-Zell-vermittelter Immunantworten getestet. Die *ex vivo* ELISpot-Versuche mit den aus Vollblut von Melanompatienten und gesunden Spendern isolierten PBMC zeigten, dass die monomethylierte Form des Peptids T-Zellreaktionen bei allen neun getesteten Patienten induziert hatte (Abbildung 30). Keine T-Zell-vermittelte Immunantwort wurde gegen die nichtmethylierte Form und nur eine schwache Reaktion gegen das dimethylierte Peptid in der Gruppe der Patienten detektiert. In den Kontrollgruppen mit gesunden Spendern konnte hingegen eine nur vergleichsweise schwache T-Zellreaktion gegen das monomethylierte Peptid gezeigt werden.

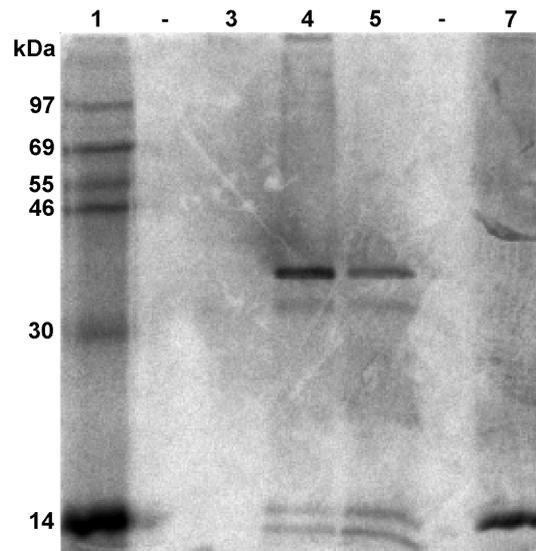


**Abbildung 30.** *Ex vivo* ELISpot-Analyse der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort gegen die GPS2-Epitope. Die PBMC von HLA-A11<sup>+</sup> Melanompatienten und von HLA-A11<sup>+</sup> und HLA-A11<sup>-</sup> gesunden Spendern wurden mit nichtmethyliertem (GPS), monomethyliertem (mmGPS) und dimethyliertem (dmGPS) GPS2-Peptiden inkubiert und die Anzahl der INF- $\gamma$ -produzierenden T-Zellen im ELISpot-Assay detektiert und quantifiziert. Der Anteil der in den PBMC vorhandenen CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde per Durchflusszytometrie bestimmt und für die Berechnung der Frequenz peptidspezifischer T-Zellen als Spot forming Units pro 1 Mio. CD8<sup>+</sup> T-Zellen verwendet. Für die graphische Darstellung wurden die Hintergrundwerte (Zellen ohne Peptid) abgezogen. Die p-Werte wurde mit der Software Graph Pad Prism 4 berechnet

Die signifikante Differenz ( $p \geq 0,0067$ ) in der Immunantwort zwischen den Melanompatienten und den Kontrollgruppen von gesunden Spendern deutet auf einen krankheitsspezifischen Charakter der Monomethylierung des Arginins in GPS2 hin.

### 3.3.6 *In vitro* GPS2-Proteinmethylierung

Um die Methylierung von GPS2 auf Proteinebene zu untersuchen, wurde ein *in vitro* Assay mit rekombinantem Protein durchgeführt. Dafür wurde das in *E. coli* Zellen überexprimierte, mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigte His<sub>6</sub>-getaggte GPS2-Protein verwendet. Die Methylierung von Arginin wird durch die Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs) katalysiert. Da diese Modifikation für GPS2 noch nicht beschrieben wurde, ist es auch unklar welche PRMTs dafür verantwortlich sind. Aus diesem Grund wurden die nukleären und cytoplasmatischen Fraktionen der bei der HLA-Peptidomanalyse untersuchten Zelllinie ChaMel 84 als Enzymquelle für die GPS2-Methylierung verwendet. Von allen bisher bekannten PRMTs, die für die Mono- und asymmetrische Dimethylierung der Seitenkette von Arginin verantwortlich sind, wird die meiste Methyltransferaseaktivität in humanen Zellen der Protein-Arginin-Methyltransferase 1 (PRMT1) zugeordnet. Deshalb wurde auch die mögliche Beteiligung der PRMT1 an der GPS2-Methylierung untersucht. Für die Radiomarkierungsexperimente wurde Histon-4-Protein, welches als Substrat für die PRMT1 beschrieben wurde, als Kontrolle verwendet. Als Methyl donor und Cosubstrat wurde an der Methylgruppe titriertes S-Adenosyl-Methionin verwendet. Die Banden mit radiomarkiertem GPS2 (38 kDa) wurden nach der Inkubation mit nukleären und cytoplasmatischen Proteinextrakten bzw. PRMT1 als Quellen für Methyltransferasen im SDS-PAGE-Gel nachgewiesen (Abbildung 31, Bahnen 4 und 5). Die fehlende Bande des Proteins im Reaktionsgemisch mit PRMT1 (Bahnen 3) zeigte, dass dieses Enzym für die Methylierung des GPS2 nicht verantwortlich ist. Da die Bande des radiomarkierten Histon-4-Proteins (11,2 kDa) nach der Inkubation mit PRMT1 nachgewiesen wurde, konnte das negative Ergebnis für GPS2 Protein nicht durch eine fehlende Aktivität des Enzyms erklärt werden.



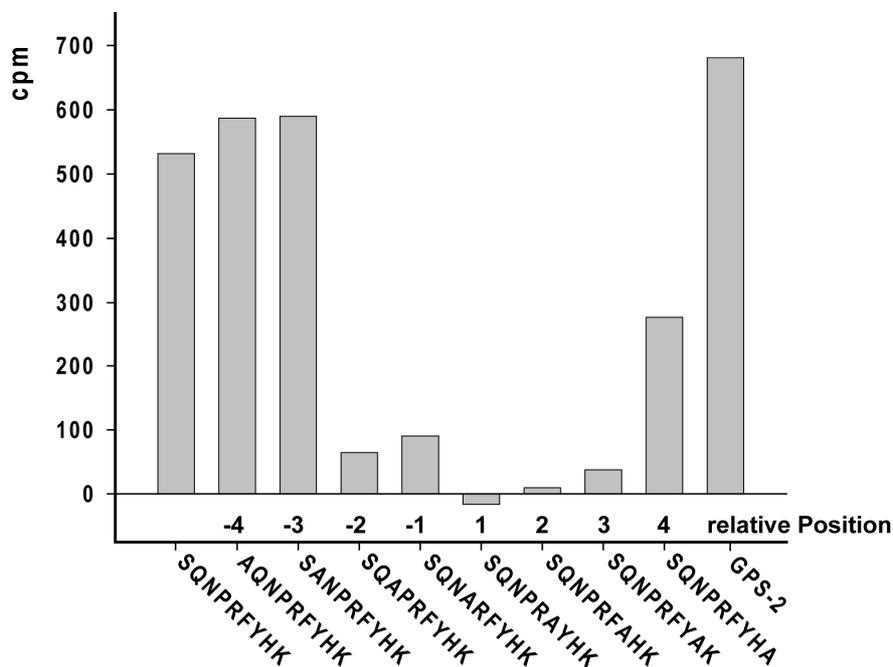
**Abbildung 31. *In vitro* Methylierung des GPS2-Proteins.** Die Banden des aus der nukleären und cytoplasmatischen Fraktion isolierten und methylierten GPS2-Proteins wurden in den Bahnen 4 und 5 detektiert. Für den Methyltransferase-Assay wurde an der Methylgruppe mit Tritium markiertes S-Adenosyl-L-[Methyl-<sup>3</sup>H] Methionin als Methyl donor eingesetzt. Nach der enzymatischen Reaktion wurde His-getagtes GPS2 aus dem Reaktionsgemisch mit Hilfe der Ni-Agarose-Beads isoliert und mittels 12 % SDS-PAGE analysiert. Danach wurde das Gel getrocknet und für 96 h Exposition auf eine Imaging-Platte gegeben. Die Exposition erfolgte im Dunkeln und unter Bleiabschirmung. Die Imaging-Platte wurde mit einem Phosphorimager ausgelesen. Kein Methylierungsprodukt konnte nach der Inkubation des GPS2 mit PRMT1 nachgewiesen werden (Bahn 3). Die Methylierung des Histon-4-Proteins durch PRMT1 ist in Bahn 7 erkennbar. Der radiomarkierte Proteinstandard wurde in der ersten Geltasche aufgetragen. Die leeren Bahnen sind mit Minus (-) gekennzeichnet.

Die *in vitro* Radiomarkierungsversuche bestätigten die Methylierung des GPS2-Proteins. Das Experiment mit dem rekombinanten Enzym zeigte, dass PRMT1 nicht für diese Modifikation des GPS2 verantwortlich ist.

### 3.3.7 Charakterisierung der Methylierungsseite des GPS2-Proteins

Um die genaue Sequenz, die für die Bindung der PRMTs und damit für die Methylierung von GPS2 am C-Terminus notwendig ist, zu ermitteln, wurde auf Basis des identifizierten HLA-Ligands SQNPRFYHK eine Peptidbibliothek hergestellt, bei der einzelne AS (außer Arginin) in der Sequenz durch die neutrale AS Alanin ausgetauscht wurden. Die Peptide wurden mit N-terminalem His<sub>6</sub>-Tag synthetisiert, um die Peptide aus dem Reaktionsgemisch isolieren zu können. Die Methylierung der Peptide wurde durch den Einbau der radiomarkierten Methylgruppe ins Peptid erfasst. Dabei wurde das cytoplasmatische Proteinextrakt der Melanomzelllinie ChaMel 84 als Quelle für Methyltransferasen verwendet. Die radiomarkierten Peptide wurden mit Hilfe der Ni-Agarose-Partikel aus dem Reaktionsgemisch isoliert und der Einbau der radioaktiven Methylgruppe mit Hilfe eines Szintillationszählers vermessen.

Der Austausch der AS Glutamin (Q) und Serin (S) gegen Alanin an den Positionen -4 und -3 ausgehend von Arginin hatte keine negative Wirkung auf die Methylierung (Abbildung 32). Der Ersatz der für die Methylierung wichtigen AS durch Alanin an der Position -2 und -1 reduzierte dagegen den Einbau der Methylgruppe um ~ 90 %. Durch den Austausch von Phenylalanin (F) und Tyrosin (Y) an den entsprechenden Positionen +1 und +2 wurde die Methylierung komplett inhibiert. Der negative Effekt wurde auch bei dem Ersatz der AS Histidin (H) an der Position +3 beobachtet, wodurch der Einbau der Methylgruppen fast um 100 % reduziert wurde. Der Austausch von Lysin (K) an der Position +4 hatte partiellen Einfluss auf die Methylierung. Der Einbau von mit Tritium markierter Methylgruppe war um 59 % reduziert.



**Abbildung 32. Untersuchung der Sequenzspezifität der Protein-Arginin-Methyltransferase für die Methylierung des GPS2 HLA-Epitops.** Die Signalwerte der in dem Radiomarkierungsassay untersuchten Peptide und GPS2-Proteins sind nach dem Abzug der Hintergrundwerte, Reaktionsmischung ohne Peptid oder Protein, dargestellt. Als positive Kontrolle wurde rekombinantes His-getagtes GPS2-Protein verwendet.

Der Methylierungsversuch mit den synthetischen Peptiden zeigte, dass die Sequenz der fünf AS langen Sequenz NPRFY mit einer partiellen Beteiligung des C-terminalen Lysin für die Sequenzerkennung durch die Methyltransferase und damit auch für die Methylierung des GPS2 Proteins wichtig ist. Diese Sequenz passt nicht zu den bekannten Sequenzmotiven für Proteinmethylierungen und ist als eine neuartige Erkennungssequenz zu sehen.



## 4 Diskussion

Durch die direkte Isolierung und Identifizierung HLA-gebundener Peptide können Informationen in zwei Richtungen gewonnen werden: Einerseits kann die Analyse der HLA-Liganden, die als Abbauprodukte der intrazellulären Proteine an der Zelloberfläche präsentiert werden, Einblicke in das Proteom einer Tumorzelle geben. Da die HLA-Peptide erst mit dem Proteinabbau generiert werden, können durch die Analyse des HLA-Peptidoms auch Proteine detektiert werden, die nach der Proteinsynthese schnell abgebaut werden und dadurch beim Einsatz anderer Technologien unentdeckt blieben. Andererseits werden durch die Interaktion der HLA-Peptidkomplexe mit dem T-Zellrezeptor krankheitsassoziierte Antigene erkannt. Damit kann die durch die HLA-Peptidomanalyse gewonnene Information zur Entwicklung neuer Formen von Immuntherapien verwendet werden. Darüber hinaus kann die detaillierte Information zu den HLA-Peptidomen helfen, die Bindung der Peptide an die HLA-Moleküle und die Mechanismen der Antigenprozessierung und -präsentation besser zu verstehen, und damit die Basis für die Weiterentwicklung von Vorhersagealgorithmen für die Bindung von Peptiden an HLA schaffen.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden die HLA-Peptidome von den vier Melanomzelllinien ChaMel 41, ChaMel 84, ChaMel 100 und ChaMel 105 analysiert. Die Peptide wurden von den HLA-Molekülen isoliert, mittels HPLC aufgetrennt und massenspektrometrisch analysiert. Da bei der Isolierung der HLA-Peptidkomplexe Detergenzien verwendet wurden, die mit der massenspektrometrischen Analyse inkompatibel sind, beinhaltet die Aufreinigungsprozedur Waschschrte, die zum Verlust schwach an die HLA gebundener Peptide führen kann. Somit repräsentieren die in den HPLC-Fraktionen detektierten 3203 Peptide vor allem starke HLA-Binder. Als Hauptparameter für die Detektion identischer Peptide wurden deren Elutionszeit und Masse verwendet. Die Analyse zeigte, dass neben den für die Melanomzelllinie spezifischen 1758 Peptiden eine signifikante Fraktion der Peptide (1445 oder ca. 45 %) in mehr als einer Tumorzelllinie vorkommt, also *shared antigens* sind. Allerdings ergaben die vergleichenden Peptidomanalysen der unterschiedlichen Melanomzelllinien vor allem, dass die HLA-Peptidome sehr heterogen sind. Die Überlappung der Peptidome der vier analysierten Melanomzelllinien lag beim Vergleich von zwei, drei und allen vier Zelllinien zwischen 5 und 18 %. Die Heterogenität wurde auch anhand der identifizierten HLA-A11-gebundenen Peptide bestätigt. Dabei lag die Überlappung bei 51 %. Diese Ergebnisse zeigen, dass es starke individuelle Unterschiede in den HLA-Peptidomen der Melanomzelllinien gibt und viele Epitope nur in einer Zelllinie präsentiert

werden. Andererseits aber überlappen die Peptidome als ganzes in starkem Maße. Dies bedeutet, dass nicht jedes Antigen, welches allen Anforderungen zur Bindung an ein HLA-Molekül entspricht, von den Zellen prozessiert und präsentiert wird. Deshalb müssen peptidbasierte Vakzine mehrere tumorassoziierte T-Zellantigene beinhalten, um die fehlende Präsentation eines Antigens durch die mögliche Prozessierung und Präsentation anderer Antigene zu kompensieren.

Sequenzierungen der HLA-gebundenen Peptide wurden bislang fast ausschließlich mit der ESI-Technologie durchgeführt. Es ist nur ein Fall in der Literatur bekannt, in dem die MALDI-Technologie eingesetzt wurde [67]. In keinem Fall wurden beide Technologien verglichen. In der vorliegenden Doktorarbeit wurden erstmals dieselben HLA-Peptidome mit den beiden Technologien MALDI und ESI analysiert. Nur ein Teil der Peptide wurde mit beiden Techniken identifiziert. Die Mehrheit wurde entweder nur mit MALDI-TOF- oder nur mit ESI-QTOF-Massenspektrometrie detektiert. Dieses Ergebnis kann mit den Unterschieden in den Ionisierungsprozessen sowie den Mechanismen der Peptidfragmentierungen zwischen den beiden Technologien erklärt werden [129]. Die Ergebnisse zeigen dabei, dass für umfangreiche Peptidomanalysen beide Technologien eingesetzt werden müssen.

In dieser Doktorarbeit wurden sowohl datenbankabhängige Verfahren als auch die datenbankunabhängige *de novo* Sequenzierungsmethode zur Identifizierung der Peptidsequenzen anhand MALDI-TOF-PSD und ESI-MS/MS Spektren verwendet. Die Anwendung der *de novo* Sequenzierungssoftware Sequit! ermöglicht nicht nur die Sequenzierungsergebnisse zu validieren, sondern auch die Peptide, die nicht in der Datenbank aufgelistet sind (z.B. mutierte Antigene) zu entdecken. Laut neuester Zusammenfassung von Tumorantigenen gibt es 13 tumorassoziierte HLA-Klasse-I-restringierte Antigene, die eine Punktmutation aufweisen (siehe [www.cancerimmunity.org](http://www.cancerimmunity.org)). Diese wurden meist durch die Anwendung eines molekulargenetischen Ansatzes (siehe Abschnitt 1.2.6) entdeckt. Fakt ist aber, dass die in der vorliegenden Doktorarbeit 375 identifizierten HLA-Peptide exakt den Datenbanksequenzen entsprechen, also keine Mutationen aufwiesen. Dies zeigt, dass mutierte HLA-Liganden zwar vorkommen [47], aber selten sind. Und im Gegensatz zu der allgemeinen Annahme sind mutierte Selbstproteine nicht als sogenannte Neoantigene dominante Ziele tumorspezifischer T-Zellreaktionen.

Eine Klassifizierung der Quellproteine der identifizierten HLA-Liganden anhand ihrer biologischen Funktionen und ihrer subzellulären Lokalisation zeigte, dass HLA-Liganden fast jedes zelluläre Kompartiment repräsentieren und die Quellproteine in diversen zellbiologischen

Prozessen involviert sind. Dabei findet man Quellproteine, die an wichtigen zellregulatorischen Prozessen wie Zellzykluskontrolle, Transkriptionsregulation, DNA-Replikation oder Signaltransduktion beteiligt sind. Eine genauere Literaturrecherche hat ergeben, dass ein Teil der Quellproteine der identifizierten HLA-Liganden auch tumorrelevante Funktionen besitzen. Dabei findet man Proteine, die in Zellproliferation und Tumorgenese involviert sind und damit direkt zur Tumorentwicklung beitragen können (siehe Anhang IX). Es wurden aber auch Quellproteine mit proapoptischen und antiproliferativen Eigenschaften identifiziert, die der Bildung des Tumors entgegenstehen sollten. Da der Proteinabbau und die Antigenprozessierung über das Proteasom sehr streng reguliert werden, um den Abbau essentieller Proteine zu vermeiden, könnte die Deregulierung dieses Prozesses zu einem verstärkten Abbau von Tumorsuppressoren oder ineffektiven Abbau von Onkoproteinen führen, was zur Proliferation und zum Überleben der Tumorzellen beitragen würde [130]. Deshalb ist es auch durchaus denkbar, dass die Präsenz tumorrelevanter Antigene im HLA-Peptidom von Melanomzellen durch krankheitsassoziierte Veränderungen im Umsatz der Proteine mit erhöhter Expression von Proteinen mit tumorprogressiven Eigenschaften und schnellem Abbau von Proteinen mit tumorsuppressiven Eigenschaften bedingt ist. Allerdings sind weitere Untersuchungen und Korrelationen der Ergebnisse mit tumorspezifischen Änderungen in der Ubiquitinierung und im Abbau von Tumorsuppressorproteinen bei den Melanomzellen erforderlich, um diese Annahme zu bestätigen.

Die Sequenzierung und Identifizierung der direkt von den Tumorzellen isolierten HLA-Liganden kann auch wichtige Informationen zur Antigenprozessierung liefern. Es wird häufig angenommen, dass metabolisch instabile, kurzlebige Proteine höhere Chancen haben als HLA-Antigene prozessiert auf der Zelloberfläche präsentiert zu werden, da sie schnell abgebaut werden. Außerdem werden die Peptide durch die Bindung an HLA vor weiterem Abbau im ER geschützt, sodass niedrig exprimierte Proteine im HLA-Peptidom angereichert und dadurch zu effektiven Targets für T-Zellen werden können. Bei Studien zur Regulation des Umsatzes zellulärer Proteine hatten Varshavsky und Kollegen eine Korrelation der N-terminalen AS mit den Halbwertszeiten der Proteine in Zellen festgestellt [131]. Nach festgelegten Regeln, die sog. N-End-Rule, kann die N-terminale AS entweder eine stabilisierende oder destabilisierende Wirkung auf die Proteine haben. Da aber der Abbau der Proteine in der Zelle nicht nur von den physikochemischen Eigenschaften der jeweiligen N-terminalen AS abhängig ist, sondern auch durch andere Faktoren, wie umweltbedingter Stress, beeinflusst wird [132], wurde für diese

Arbeit zur Bestimmung der Umsatzraten der Quellproteine der HLA-Liganden die kürzlich von Cambridge und Kollegen veröffentlichten Proteomdaten zur Quantifizierung der Proteindynamik in den humanen HeLa-Tumorzellen herangezogen. Anhand dieser Daten konnten 184 der 306 identifizierten Quellproteine die Abbaugeschwindigkeitskonstanten zugeordnet werden. Es konnte gezeigt werden, dass das HLA-Peptidom generell den Umsatz des Proteoms widerspiegelt. Dabei wurde keine Überrepräsentanz kurzlebiger Proteine oder von Quellproteinen mit hohen Umsatzraten im HLA-Peptidom festgestellt. Damit konnte die Hypothese, dass eine Mehrheit der HLA-Liganden von metabolisch instabilen Proteinen prozessiert wird, die damit Hauptquelle für die Antigenpräsentation wären, mit den vorliegenden Daten widerlegt werden.

In früheren in der Literatur berichteten Arbeiten wurde gezeigt, dass es keine direkte Korrelation zwischen der mRNA-Expression und der Präsentation einzelner Antigene gibt [133]. Eine umfassende Analyse der Transkriptom der Quellproteine von HLA-Liganden im Hinblick auf die oben eingeführten in der Fachliteratur diskutierten Hypothesen zu den zellbiologischen Grundlagen der Antigenpräsentation wurde bislang aber nicht durchgeführt. In der vorliegenden Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass nahezu 90 % der HLA-Liganden aus niedrig bis intermediär exprimierten Proteinen stammten. Damit konnte die Hypothese, dass die HLA-gebundenen Peptide primär von hochabundanten Proteinen prozessiert wurden, widerlegt werden. Dennoch wurde ein kleiner Anteil an Transkripten der HLA-Liganden (ca. 3,9 %) mit hohen Expressionswerten detektiert. Ein Gesamtvergleich der zellulären Transkriptom mit dem Transkriptom der Quellproteine der HLA-Liganden zeigte, dass im HLA-Peptidom Quellproteine mit leicht höheren mRNA-Expressionswerten etwas überrepräsentiert sind.

Beim Vergleich der Expression der Quellproteine auf der mRNA-Ebene in den Melanomzellen und in normalen Melanozyten wurden fünf Proteine identifiziert, die im Melanom überexprimiert waren. Eines der Proteine (MAGE-A1) war bereits als melanomassoziiertes Antigen beschrieben worden. Dagegen ist keine Information über die Assoziation von Annexin A1 (ANXA1), Matrix Gla Protein (MGP) oder Nerve growth factor inducible (VGF) Protein mit dem Melanom bekannt. ANXA1 wurde in der Literatur als Metastasierungsmarker im Lungenadenokarzinom beschrieben [134], dabei wurde die Expression des ANXA1 mit schlechter Überlebensprognose der Krebspatienten korreliert, was auf eine tumorrelevante Funktion des Proteins bei der Tumorentwicklung deutet. Die Überexpression des Ca<sup>2+</sup> Transporters MGP wurde im Glioblastom (Hirntumor) nachgewiesen [135]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen der Hochregulation der MGP-Expression und der Zellmigration bzw. Metastasierung besteht. Die biologische Funktion des VGF Proteins ist bislang unbekannt. Dieses

Protein wird normalerweise in Nervenzellen exprimiert, wobei vor kurzer Zeit die Proteinexpression auch in Lungentumoren gezeigt wurde [136]. Da Nervenzellen sich wie die Melanozyten während der Embryonalentwicklung aus der Neuralleiste entwickeln (engl. *neural crest stem cells*, NCSC), ist die Frage nach der biologischen Funktion und Tumorrelevanz von VGF im Melanom besonders spannend. Das ebenfalls in den analysierten Melanomzelllinien überexprimierte *Lysyl amino oxidase homolog 3* (LOXL3) gehört zur Familie der kupferabhängigen Enzyme, die für die Vernetzung des Kollagens oder Elastins und damit für die Regulierung der Elastizität der Gewebe verantwortlich sind [137]. Es wurde in der Literatur gezeigt, dass die Enzyme LOXL2 und LOXL3 an der Aktivierung des Snail Transkriptionsfaktors beteiligt sind, welcher in Tumorprogression und Metastasierung direkt involviert ist [138]. Dies deutet an, dass LOXL3 bei der Tumorentwicklung eine wichtige regulatorische Rolle spielt und sich damit als immunologisch relevantes Target für die Krebstherapie anbietet.

Drei weitere Quellproteine werden ausschließlich in der Melanomzelllinie ChaMel 105 überexprimiert. Eines davon, das membranassoziierte Transporterprotein oder auch *solute carrier family 45 member 2* genannt, ist am Transport von Melanin beteiligt und wurde bereits in der Literatur als melanomassoziiertes Antigen beschrieben [139]. Bei zwei weiteren Proteinen, dem *Nuclear pore complex protein 205* und *THO complex 4*, wurde bislang keine tumorrelevante Funktion nachgewiesen.

Die direkte Isolierung und Sequenzierung der HLA-Liganden mittels Massenspektrometrie hat sich als eine wichtige Strategie zur Identifizierung HLA-gebundener Peptide mit unkonventionellen Peptidlängen oder Bindungsmotiven erwiesen. Obwohl die Verteilung der Peptidlänge in den HLA-Peptidomen relativ homogen war und etwa 70 % aller identifizierten HLA-Liganden Nonapeptide waren, was als Standardlänge für die Bindung an HLA vorgegeben ist, wurden auch Peptide mit der Länge von 7 bis 13 AS detektiert, was für die Bindungsflexibilität der HLA spricht. Durch Abgleich der Sequenzen der mit dieser Arbeit identifizierten HLA-gebundenen Peptide mit den in der SYPFEITHI-Datenbank gelisteten Bindungsmotiven wurde eine Abweichung von den beschriebenen, allgemein anerkannten Bindungsmotiven für zehn der 499 identifizierten Peptide festgestellt. Das wiederum zeigt, dass auch Peptide mit anderen AS in den Ankerpositionen an die HLA-Moleküle binden und an der Zelloberfläche präsentiert werden können. Die Klassifizierung der HLA-Liganden nach Bindungsmotiven hat ergeben, dass der größte Teil (etwa 45 %) der von den HLA eluierten

Peptide das HLA-A11 Bindungsmotiv mit den basischen AS Arginin oder Lysin am C-Terminus der Sequenz aufweist. Dieses Übergewicht an HLA-A11-Liganden in HLA-Peptidomen bedeutet nicht notwendigerweise, dass dieses Allel im Vergleich zu anderen HLA bei den analysierten Melanomzelllinien überexprimiert ist, sondern dass es eher an den chemischen Eigenschaften der für das HLA-A11-Bindungsmotiv charakteristischen, basischen AS liegt. Da bei der Ionisierung der Biomoleküle im Massenspektrometer die Basizität der Analyten eine wichtige Rolle spielt, werden Lysin oder Arginin enthaltene Peptide oder auch die entsprechenden MS/MS-Fragmente empfindlicher detektiert als diejenigen ohne basische AS. Damit kann die Anreicherung der HLA-A11-gebundenen Peptide in den Peptidomen der vier Melanomzelllinien erklärt werden. Die HLA-A11-Liganden zeigten hohe Diversitäten in den Sequenzpositionen, die für die Bindung an das HLA wichtig sind. Außer der starken Präferenz für Peptide mit C-terminalen, basischen AS wurde eine schwache Präferenz für hydrophobe oder kleine hydrophile AS an den Positionen 1 und 2 der Peptidsequenz beobachtet, was generell auch mit den Daten von Peptidbindungs- und MHC-Stabilisierungsanalysen übereinstimmt [140]. Bei den Strukturanalysen von HLA-A11 im Komplex mit den immundominanten HIV-1 Epitopen AIFQSSMTK aus der Reversen Transkriptase und QVPLRPMTYK aus dem Nef Protein wurden zusätzliche, sekundäre Ankerpositionen in der Mitte des Peptids vorhergesagt [141]. Dabei wurden die Präferenzen für die kleinen oder aliphatischen AS in der Position 6 des Nonapeptids oder der Position 7 des Dekapeptids bestimmt. Solche Präferenzen konnten allerdings mit den hier vorliegenden Analysen nicht bestätigt werden, was zeigt, dass für die Bindung an HLA-A11 die vorgeschlagenen sekundären Ankeraminoacids nur eine geringe Rolle spielen.

Es wurde außerdem eine Abweichung von dem in der SYFPEITHI-Datenbank beschriebenen, kanonischen Bindungsmotiv für HLA-B35 gefunden. Es wurden bereits in der Literatur Beispiele für die Bindung von Dodekapeptiden an HLA-B35 beschrieben [142, 143], was auf eine Flexibilität dieses HLA-Moleküls für die Bindung von Peptiden deutet. Da in der hier vorliegenden Arbeit nur 19 HLA-Liganden HLA-B35 zugeordnet wurden, ist eine weitere Identifizierung der HLA-B35-Peptide erforderlich, um die Diversität der Peptide für die Bindung an dieses HLA zu bestätigen.

Zur Untersuchung der Immunogenität der isolierten HLA-gebundenen Peptide wurden PBMC von acht Melanompatienten sowie tumorinfiltrierende Lymphozyten von einem HLA-A11<sup>+</sup> Melanompatienten, von dem auch die Melanomzelllinie ChaMel 84 etabliert und deren HLA-Peptidom analysiert wurde, mit *ex vivo* Testsystemen untersucht. Der Unterschied bei den T-Zellen, die aus diesen beiden Kompartimenten isoliert wurden, liegt im Wesentlichen darin,

dass die tumorassoziierten T-Zellen in PBMC der Melanompatienten nur in sehr geringen Frequenzen vorhanden sind, wogegen sie in TIL angereichert und damit in deutlich höheren Frequenzen vertreten sein sollten. In Versuchen mit 29 zufällig ausgewählten HLA-A11-restringierten Peptiden und mit den aus peripherem Blut isolierten PBMC von Melanompatienten wurden die T-Zellreaktionen gegen 22 HLA-Liganden beobachtet. Die T-Zellreaktionen in PBMC gesunder Spender waren dagegen deutlich schwächer, wobei peptidspezifische T-Zellen gegen acht Antigene detektiert wurden. Bei allen acht getesteten Patienten wurden starke T-Zellreaktionen gegen die auf Arginin modifizierte (monomethylierte) Variante eines GPS2-Epitops beobachtet (Die Tumorrelevanz dieser Modifikation wird ausführlicher in nachfolgenden Abschnitten diskutiert). Ein Peptid des Transporterproteins Clathrin hat sich als zweitbesten Stimulator erwiesen. Hierbei wurden Reaktionen von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in PBMC von fünf Patienten detektiert. Diese T-Zellassays mit PBMC von Melanompatienten zeigten, dass T-Zellen in der Lage sind, auf Peptide zu reagieren, die von Quellproteinen stammen, die an normalen, zellulären Prozessen, wie Transport (z.B. Clathrin Protein), Zellkommunikation und Signaltransduktion (Prohibitin), RNA-Prozessierung (heterogenes nukleares Ribonukleoprotein Q3), Zellzyklusregulation (cell division cycle 5-like, CDC5L) oder Zellmetabolismus (Butyrylcholinesterase), beteiligt sind. Die Erkennung solcher Selbstantigene wurde auch in T-Zellassays mit den TIL registriert. Dabei wurde die T-Zellreaktion gegen 21 von 96 getesteten Peptiden beobachtet. Es gibt auch in der Literatur einzelne Beispiele, in denen CD8<sup>+</sup> T-Zellen Antigene erkennen, die in Zellmetabolismus [144], Signaltransduktion, RNA-Prozessierung oder Zellzyklusregulation [145] involviert sind.

Diese Erkenntnisse zur Präsenz reaktiver T-Zellen in der Pheripherie (z.B. im Blut oder im Tumorgewebe), die auf ubiquitär exprimierte Selbstantigene reagieren, zeigen, dass Selbstantigen-spezifische T-Zellen in der Lage sind den Prozessen der Autotoleranz zu entgehen. Diese Prozesse beinhalten u.a. die als negative Selektion bezeichnete Eliminierung Selbstspezifischer T-Zellen während der Reifung der Zellen im Thymus. Es ist allerdings zu bemerken, dass der Selektionsprozess von der Affinität des T-Zellrezeptors zu dem HLA-Peptidkomplex abhängig ist. Die T-Zellen, die geringe Affinität zu Selbstantigenen aufweisen, werden positiv selektioniert und können damit den Thymus verlassen. Es wird allgemein angenommen, dass es einen Zusammenhang zwischen der Affinität des T-Zellrezeptors und der für eine Immunreaktion erforderlichen Menge an Antigen gibt. In von Sykulev und Kollegen durchgeführten Arbeiten wurde festgestellt, dass je höher die Affinität des T-Zellrezeptors zum HLA-Peptidkomplex ist, desto weniger solcher Komplexe sind notwendig, um die T-Zelle zu aktivieren und eine Zelllyse

der Targetzelle zu induzieren [146]. Das würde implizieren, dass T-Zellreaktionen durch die Veränderungen der Antigenichte auf der Zelloberfläche auch bei Lymphozyten mit geringer Affinität für ihren kognaten HLA-Peptidkomplex ausgelöst werden könnten. Solche Veränderungen könnten durch Überexpression tumorassoziierter Antigene und dadurch erhöhter Präsentation der Peptide bei den Tumorzellen hervorgerufen werden. Bei den in dieser Doktorarbeit vorgestellten mRNA-Expressionsanalysen wurde eine signifikante Überexpression der Antigene im Melanom nur für wenige Quellproteine gezeigt. Deshalb können die T-Zellreaktionen gegen die ubiquitär exprimierten Antigene nicht mit einer tumorbedingten Überexpression und Überpräsentation der Antigene geklärt werden. Die Existenz Selbstantigen-spezifischer, immunreaktiver T-Zellen in der Peripherie bedeutet, dass die T-Zellreaktionen nicht nur von der Spezifität des T-Zellrezeptors abhängig sind, sondern die Aktivierung der T-Zelle auch durch die anderen Faktoren in ihrer Umgebung reguliert wird, um Angriffe auf Selbstantigen-exprimierende, körpereigene Zellen zu vermeiden.

Ein wichtiges Ergebnis war die Detektion peptidspezifischer T-Zellen gegen die Antigene Annexin A1 (ANXA1) und *Nerve growth factor inducible* (VGF) Protein. Die Analyse der mRNA-Expressionsdaten zeigte, dass diese Proteine im Melanom überexprimiert sind, was auf eine Tumorrelevanz der Proteine deuten könnte. In den T-Zellassays mit TIL konnte gezeigt werden, dass die HLA-Liganden von diesen Quellproteinen T-Zellreaktionen auslösen und damit potentielle Targets für eine Immuntherapie sein könnten. Hier sind allerdings weitere T-Zellanalysen mit den Zellen eines breiten Spektrums an Tumorpatienten notwendig, um die Immunreaktivität dieser Kandidaten zu bestätigen.

Interessanterweise wurde das Peptid KALRLSASALF des VGF-Proteins aus der ChaMel 41 Melanomzelllinie isoliert und als Binder dem von der Zelllinie exprimierten HLA-B57 zugeordnet. In der *ex vivo* ELISpot-Analyse mit TIL eines Patienten und in einem *in vitro* priming Experiment mit T-Zellen eines gesunden Spenders, die beide dieses Allel nicht exprimieren, wurden T-Zellreaktionen beobachtet. Das bedeutet, dass dieser HLA-Ligand auch an andere HLA-Moleküle binden kann, um als Antigen für T-Zellen präsentiert zu werden. Weitere Analysen der Bindungsspezifitäten dieses Peptids würden wichtige Informationen zur weiteren Entwicklung von Algorithmen zur HLA-Epitopvorhersage liefern.

Auch gegen Peptide aus *elaC* homolog 2 und FOXO1 wurden T-Zellreaktivitäten in TIL nachgewiesen. Beide Proteine waren als Tumorsuppressorproteine im Prostatakrebs beschrieben worden [147, 148]. In den klinischen Vakzinierungsstudien mit den Peptiden des

Tumorsuppressorproteins p53 wurde die Induktion p53-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen erreicht und dadurch bei den Brustkrebspatienten eine Stabilisierung oder partielle Regression der Krankheit erzielt [149]. Diese klinische Studie lässt darauf schließen, dass HLA-Liganden von Tumorsuppressorproteinen in der Lage sind, Antitumorreaktionen von T-Zellen auszulösen und somit als T-Zellantigene in immunbasierten Therapien eingesetzt werden könnten. Damit könnten auch die HLA-Liganden der Proteine elc homolog 2 und FOXO1 potentielle Vakzinkandidaten darstellen. Es sind allerdings noch weitere Testungen zur Immunreaktivität der Peptide in Melanompatienten notwendig, bevor diese Epitope als tumorrelevante Targets für Vakzinationsstudien eingesetzt werden können.

Ein interessanter Aspekt der Arbeit war die Identifizierung Histon-4-spezifischer T-Zellen in Melanompatienten und damit der Nachweis des Quellproteins als tumorassoziiertes Antigen. Alle bisher identifizierten, tumorassoziierten Antigene in Tumoren waren Cancer-Testis-Antigene, gewebespezifische Antigene, im Tumor überexprimierte Differenzierungsantigene oder virale Antigene. Die ubiquitäre und hochabundante Expression von Histon-4 zeigt, dass Proteine, die nicht zu den genannten Kategorien gezählt werden können, sondern normal regulierte Selbstantigene sind, tumorassoziierte Antigene sein können. Es waren bereits Histon-4-reaktive T-Zellen in einem Mausmodell für Prostatakrebs beschrieben worden [150]. Die neuen Erkenntnisse, dass Histon-4-spezifische T-Zellen auch in PBMC von Melanompatienten nachweisbar sind, erweitern die vorherigen Beobachtungen. Histon-4 ist in allen Zelltypen und Geweben hoch exprimiert, was die Tumorrelevanz des Antigens in Frage stellt. T-Zellen, die gegen ubiquitär exprimierte Selbstantigene reagieren, wurden auch in einem weiteren Report von Desfrancois und Kollegen beschrieben [151]. Dabei wurden unkonventionelle CD4CD8 doppelt positive  $\alpha\beta$ -T-Zellrezeptor exprimierende T-Lymphozyten in Melanommetastasen und tumordrainierenden Lymphknoten nachgewiesen. Es konnte dabei gezeigt werden, dass die T-Zellen ein Antigen erkennen, welches sowohl von Tumorzellen als auch von normalen Zellen exprimiert wird. Obwohl die HLA-Restriktion des Antigens bestimmt werden konnte, konnte die Sequenz des Peptids nicht bestimmt werden.

Eine mögliche Erklärung für das Vorkommen von T-Zellreaktivitäten gegen solche abundant exprimierten Antigene könnte eine Veränderung der Antigenprozessierung und -präsentation in den Tumorzellen sein, die zur verstärkten und für die Induktion einer Immunreaktion ausreichenden Menge des Epitops an der Zelloberfläche führen könnte. Normalerweise wird die Menge an Histonen in der Zelle durch die Phosphorylierung mittels einer Rad53 Kinase und

gezieltem Abbau des phosphorylierten Proteins mittels Proteasom streng reguliert, um unerwünschte Ereignisse wie genomische Instabilität oder Hypersensivität der Zelle gegen DNA-schädigende Substanzen zu vermeiden [152]. Da eine Deregulierung der Ubiquitin-abhängigen Proteolyse für eine Vielfalt an Tumoren einschließlich Melanom beschrieben wurde [153], kann vermutet werden, dass auch die Prozessierung von Histon 4 verändert sein und zu einer geänderten Antigenität der Tumorzelle führen könnte. Andererseits wurden Histon-4-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen und Antikörper in Patienten mit der Autoimmunerkrankung Systematischer Lupus erythematosus detektiert [154]. Daher muss die Tumorrelevanz solcher abundant exprimierten Antigene und die Rolle spezifischer T-Zellen gegen solche Antigene weiter untersucht werden.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal eine posttranslationale Modifikation von GPS2 nachgewiesen. Bei der HLA-Peptidomanalyse der vier Melanomzelllinien wurde eine dem GPS2 Protein zugeordnete Peptidequenz mit asymmetrisch dimethyliertem, monomethyliertem und nichtmodifiziertem Arginin identifiziert. Die modifizierten Formen des HLA-Liganden konnten nur durch *de novo* Sequenzierung nachgewiesen werden. Die Identifizierung der posttranslational modifizierten Peptide ist eine zeitaufwendige Prozedur. In Spektren werden sehr oft neben den sequenzspezifischen Peptidmassen auch die Fragmente, die durch neutrale Abspaltung der modifizierten Seitenkette des Peptids entstehen, registriert. Dadurch wird die Komplexität des Spektrums deutlich erhöht, was durch falsche Zuordnung der Abspaltprodukte zu sequenzspezifischen Fragmenten und zur Identifizierung falsch positiver Sequenzen führen kann. Im MALDI-TOF-PSD Spektrum des natürlichen Peptids mit dem dimethyliertem Arginin wurden zehn neutrale Abspaltungen von Dimethylamin (-45 Da), sechs Verluste von Carbodiimid (-70 Da) und drei von Dimethylguanidin (-87 Da) registriert. Im Spektrum des monomethylierten HLA-Liganden wurden fünf Abspaltungen von Methylamin (-31 Da) und drei von Monomethylcarbodiimid detektiert. Solche erhöhten Frequenzen an Fragmenten des dimethylierten Arginins im Vergleich zu der monomethylierten Form der AS zeigen die destabilisierende Wirkung dieser Modifikation mit der daraus folgenden, veränderten Signalintensität für die Abspaltungsprodukte. Diese Information kann für eine weitere Entwicklung der Sequenzierungssoftware verwendet werden. Die Detektion methylierungsbedingter Spaltprodukte kann helfen, posttranslationale Modifikationen in der Sequenz zu lokalisieren und damit die Wahrscheinlichkeit der Ableitung falsch positiver Sequenzen zu minimieren.

Das GPS2 Protein wurde als Regulator des nukleären Rezeptor Ko-repressor-Komplexes (engl. *nuclear receptor-corepressor*, NCoR) beschrieben und ist an zellulären Prozessen wie Genexpression, Zellproliferation, Apoptose und Tumorgenese beteiligt. Der genaue Mechanismus, wie das Protein in diesen Prozessen wirkt, ist aber unklar. Das Protein wird ubiquitär exprimiert und inhibiert durch die Bindung an den Transkriptionsfaktor JNK1 das Signalnetzwerk der c-Jun Kinase [155]. GPS2 wurde auch als Interaktionspartner des Tax-Onkoproteins des humanen T-Zellen-Lymphotropen-Virus beschrieben [156]. Eine mögliche Erklärung der suppressiven Eigenschaften von GPS2 im JNK-Signalweg lieferte die Entdeckung, dass GPS2 eine wichtige Komponente des NCoR-HDAC3-Komplexes ist. Durch die Interaktion von GPS2 mit im JNK-Signalweg aktivierten DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren kann NCoR rekrutiert und damit eine Hemmung der Genexpression über Histondeacetylasen verursacht werden [128]. In einem anderen Bericht [157] wurde gezeigt, dass das onkogene E6-Protein des humanen Papillomavirus GPS2 binden und inaktivieren kann, wodurch ein Beitrag zur onkogenen Transformation der Zellen geleistet werden kann. Eine Interaktion von GPS2 mit p53 *in vivo* und *in vitro* wurde ebenfalls gezeigt. Dazu wurde berichtet, dass mit UV-Licht bestrahlte GPS2 überexprimierende Zellen eine erhöhte Neigung zur Apoptose hatten [158]. GPS2 scheint damit zelluläre Reaktionen auf UV-induzierte DNA-Schäden zu vermitteln und bei der Regulation der Aktivität des p53 Proteins eine wichtige Rolle zu spielen. In einem anderen Bericht wurde gezeigt, dass GPS2 mit dem transkriptionellen Coaktivator p300-Acetylase-Komplex assoziiert und damit direkt an der Aktivierung der Genexpression beteiligt ist. Durch die Interaktion des GPS2 und p300 mit dem Protein E2 des Papillomavirus, welches der zentrale Regulator der viralen Genexpression und DNA-Replikation ist, wird die Transkription der virusspezifischen Gene induziert [159]. Die Fähigkeit von GPS2 diverse Transkriptionsfaktoren zu binden, zeigt seine große Bedeutung bei der Genregulation. Außerdem wurde berichtet, dass die Assoziation von GPS2 mit Cyclin, das im Testisgewebe hoch exprimiert wird, für die Kontrolle des Zellzyklus und der Meiose verantwortlich ist. Die GPS2 Expression wird im Tumor des Testis im Vergleich zum normalen Testisgewebe unterdrückt [160], was für eine Rolle des GPS2 als Tumorsuppressor sprechen könnte. Außerdem wurde die Assoziation von GPS2 mit den Komponenten hMSH4 and hMSH5 des Heterokomplexes, welches für die DNA-Reparatur in der Meiosephase und für die homologe Rekombination der DNA verantwortlich ist, nachgewiesen [161]. Diese Ergebnisse zeigen, dass GPS2 in Prozessen wie Zellzyklus-Regulation und Zellteilung involviert ist. Durch die Identifizierung der Methylierung des GPS2 Proteins stellt sich die Frage, wie die Mono- und Dimethylierung von

Arginin die biologische Funktion des Proteins beeinflusst oder wie stark sie die Interaktion von GPS2 mit Interaktionspartnern verändert.

In den letzten Jahren wurden mehrere Proteine mit einer Methylierung an Arginin identifiziert. Einige von ihnen sind in Signaltransduktion, Proteintransport, Transkription, DNA-Reparatur, DNA und RNA-Bindung involviert [162, 163], was die wichtige Rolle der Argininmethylierung bei der Modulation zellulärer Prozesse belegt. In Experimenten mit einem synthetischen  $\beta$ -Hairpin-Peptid, das als Modelpeptid für Untersuchungen zu Sequenz-Struktur-Beziehungen verwendet wird, konnte gezeigt werden, dass durch die Einführung eines asymmetrisch oder symmetrisch modifizierten Arginin die Interaktion mit dem benachbarten Indol-Ringsystem von Tryptophan verstärkt und dadurch die Struktur des Peptids stabilisiert wird. Solche verstärkte Interaktion des methylierten Arginin mit Tryptophan, die in dem Modelpeptid beobachtet wurde, kann ähnliche Auswirkungen auch bei der Protein-DNA oder Protein-RNA Interaktion haben. In diesem Fall würde die methylierte Seitenkette von Arginin mit dem aromatischen Ringsystem von Guanin oder Adenin direkt interagieren können [164]. Andererseits spielt die Seitenkette von Arginin eine wichtige Rolle bei der Bildung intramolekularer Wasserstoffbrücken mit anderen AS in Proteinen oder interagiert mit Phosphatgruppen und Thymin-, Adenin- und Guaninbasen der DNA-Moleküle. Durch die Methylierung werden solche Wechselwirkungen unterbunden und dadurch die Bildung der Protein-Protein-, Protein-DNA- oder Protein-RNA-Komplexe ggf. komplett oder partiell inhibiert [165].

Im Bericht über die Assoziation des GPS2 mit NCoR-HDAC3-Komplex wurde die Bindungsstelle des Proteins an den Komplex dem N-Terminus vom GPS2 zugewiesen [128]. Die in der Doktorarbeit beschriebene Methylierung ist am C-Terminus des Proteins lokalisiert, an dem die Interaktion des GPS2 mit DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren stattfindet. Deshalb ist es durchaus denkbar, dass durch die Methylierung diese Assoziation zwischen den Proteinen beeinflusst wird und dadurch die Aktivität des NCoR-HDAC3-Komplexes verändert wird. Die in den zahlreichen Studien nachgewiesene Vielfalt möglicher Interaktionspartner von GPS2 schließt die mögliche Methylierung des Proteins auch in den anderen Proteinkomplexen nicht aus. Es ist auch möglich, dass die Methylierung des GPS2 erst nach der Bildung solcher Komplexe stattfindet. Eine andere Möglichkeit ist, dass das Protein nur temporär in der Zelle methyliert wird und nach der Ausführung seiner Funktion sofort abgebaut oder durch den Einsatz von Demethylasen demethyliert wird und somit die modifizierten Formen des GPS2 auf Proteinebene unentdeckt bleiben.

Die Protein-Arginin-Methylierung ist eine häufig in eukaryotischen Zellen vorkommende posttranslationale Modifikation, die durch Enzyme der Enzymfamilie der Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs) katalysiert wird. S-Adenosylmethionin (SAM) dient dabei als Methyl donor und wird während der enzymatischen Reaktion in S-Adenosylhomocystein (AdoHcy) konvertiert. Mono- und Dimethylierung der Guanidingruppe von Arginin wird von zwei Typen der Methyltransferase katalysiert. Typ-I-Methyltransferasen produzieren NG-Monomethylarginin,  $\omega$ -NG und NG-asymmetrisches Dimethylarginin. Typ-II-Methyltransferasen dagegen erzeugen NG-Monomethylarginin,  $\omega$ -NG und NG-symmetrisches Dimethylarginin [166]. Zurzeit sind von beiden Typen neun PRMTs bekannt. Zum Typ-I gehören PRMT1, PRMT2, PRMT3, PRMT4 (auch Koaktivator-assoziierte Argininmethylase 1 (CARM1) genannt), PRMT6 und PRMT8. PRMT5, PRMT7 und PRMT9 gehören zu den Typ-II-Methyltransferasen [163]. Von allen Methyltransferasen ist PRMT1 diejenige, die am meisten untersucht und am besten charakterisiert wurde. Sie ist für 85 % aller Methyltransferaseaktivitäten in den Zellen verantwortlich [167]. Das Enzym erkennt Glycin-Arginin-reiche (GAR) Bereiche und methyliert die Proteine mit den Sequenzen RGG oder RXR (X- in den meisten Fällen kleine Aminosäure) [168, 169]. PRMT2, PRMT3, PRMT6 und PRMT8 erkennen ebenso GAR-Motive [170-172]. Obwohl PRMT4/CARM1 hohe Homologie zu PRMT1 aufweist, methyliert es das Histon 3 Protein an Stellen außerhalb der GAR-Motive [173]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass PRMT4/CARM1 sowie PRMT5 Prolin-, Glycin- und Methionin-reiche Bereiche (PGM) methylieren können [174], die bei einer Reihe von pre-mRNA-Spleißfaktoren detektiert wurden [175]. Aufgrund der Information bezüglich der PRMTs und ihren zurzeit in der Literatur zusammengefassten Erkennungssequenzen, welche in der Sequenz des HLA-Epitops SQNPRFYHK nicht vorhanden sind, könnte geschlossen werden, dass die Methylierung des GPS2 von einer zurzeit unbekanntem PRMT oder auch bekanntem PRMT mit neuen Bindungsspezifitäten als die bisher in der Literatur beschriebenen, katalysiert wird. Durch die in dieser Doktorarbeit ausgeführten Methylierungsassays mit der auf Basis der GPS2-Peptidsequenz konstruierten Peptidbibliothek konnte gezeigt werden, dass die sechs Aminosäuren NPRFYH, und zum Teil auch das C-terminal folgende Lysin eine wichtige Rolle für die Methylierung spielen. Die Sequenz der GPS2-Methylierungsstelle ist damit eine neue und bisher noch nicht beschriebene Erkennungsstelle für Methyltransferasen.

In der vorliegenden Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass die methylierten Peptide genauso gut an das HLA binden wie die unmodifizierte Form des Peptids, was zuvor nur für die Präsentation eines dimethylierten Peptids gezeigt wurde [176]. In T-Zellassays mit den un-,

mono- und dimethylierten Formen des HLA-Liganden aus GPS2 wurde eine peptidspezifische Antwort der T-Zellen gegen die monomethylierte Variante des GPS2 Peptids nachgewiesen. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Methylierung einen Einfluss auf die Immunogenität der Peptide hat und T-Zellen in der Lage sind, Unterschiede in den Methylierungsmustern von Peptiden zu erkennen. Die T-Zellen von Melanompatienten haben fast ausschließlich gegen die monomethylierte Form des Peptids reagiert. Außerdem waren die T-Zellreaktionen gegen das monomethylierte Peptid bei den T-Zellen von Melanompatienten deutlich stärker als die von gesunden Spendern, was auf eine Tumorrelevanz dieser Modifikation des GPS2 hindeutet und das monomethylierte GPS2-Peptid als attraktives Target für tumorspezifische Immuntherapien erscheinen läßt. Es gibt nur wenige indirekte Hinweise auf eine mögliche Tumorrelevanz von Arginin-Methylierungen und den Einfluss der PRMTs auf Tumorwachstum und -progression. In einem Bericht wurde gezeigt, dass PRMT4/CARM1 im Darmkrebs überexprimiert wird und direkt an der Expression von Onkogenen aus dem Wnt- $\beta$ -Catenin Signalweg beteiligt ist [177]. In einem weiteren Report wurde berichtet, dass die Methylierung des Tumorsuppressors PDCD4 (programmed cell death 4) durch PRMT5 das Tumorwachstum fördert und mit einer schlechten Überlebensprognose bei den Brustkrebspatienten korreliert ist [178]. Die posttranslationale Modifikation von PDCD4 hat keinen Einfluss auf die Stabilität des Proteins, aber ändert seine biologische Funktion. Obwohl in Experimenten mit dem Tumorsuppressor PDCD4 die Methylierungsstelle des Proteins bestimmt werden konnte, wurde der genaue Methylierungsstatus (Mono- oder Dimethylierung) nicht untersucht. Ein Szenario, dass ein Protein spezifisch im Tumor methyliert wird, ist auch im Fall von GPS2 möglich. Das methylierte Protein wird am Ende seines Lebenszyklus abgebaut und als HLA-Ligand auf der Zelloberfläche zur T-Zellerkennung präsentiert. Das läßt aber die Frage, warum ausgerechnet die monomethylierte Form von GPS2 von den T-Zellen erkannt wird, unbeantwortet.

Studien zur Substratbindung und Katalyse durch PRMT1 mit einem Modelpeptid aus Histon 4 als Substrat zeigte, dass zu Beginn der enzymatischen Reaktion ungefähr die gleichen Mengen an mono- und dimethylierten Produkten produziert werden und nur einige Zeit später die Menge an dimethylierter Form des Peptids stetig ansteigt und die des monomethylierten Peptids sinkt, so dass zum Schluss die dimethylierte Form dominiert [179]. In weiteren Experimenten mit Histon 4 und dem Modelpeptid, welches Glycin-Arginin-reiche (GAR) Bereiche enthält, und PRMT1 und PRMT2 konnte gezeigt werden, dass das Verhältnis von monomethyliertem zu dimethyliertem Produkt vom Substrat und vom Enzym abhängig ist [180]. Nach der Methylierung der Substrate GAR-Peptid und Histon 4 durch PRMT1 wurden größere Mengen an Dimethylarginin im

Vergleich zu Monomethylarginin detektiert. Bei der Methylierung durch PRMT2 dominierte bei Histon 4 das dimethylierte Produkt aber beim GAR-Peptid das monomethylierte Produkt. Die Detektion der gegen die monomethylierte Form des GPS2 HLA-Liganden gerichteten T-Zellen könnte bedeuten, dass die Methylierungsprozesse vom Immunsystem überwacht werden. Es ist durchaus denkbar, dass durch krankheitsspezifische Veränderungen der Enzymaktivitäten der PRMTs auch das Verhältnis der dimethylierten zur monomethylierten Form der Substratproteine geändert wird. Solche Veränderungen auf der Proteinebene könnten durch die Präsentation der methylierten Produkte durch HLA von T-Zellen erkannt werden. Allerdings ist eine weitere Identifizierung von HLA-Liganden, die eine Methylierung der AS Arginin aufweisen, sowie eine Untersuchung der Interaktion solcher modifizierten Peptide mit den T-Zellen notwendig, um die Interaktion des Immunsystems mit dem Protein-Arginin-Methylom besser zu verstehen.



## 5 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war die Aufklärung des HLA-Peptidoms von Melanomen. Dazu wurden die Peptide von affinitätsgereinigten HLA vier humaner Melanomzelllinien extrahiert, mit zweidimensionaler HPLC aufgetrennt und per MALDI-TOF- und ESI-Q-TOF-Massenspektrometrie sequenziert. Die Spektren wurden mit datenbankbasierten und *de novo* Verfahren analysiert, sodass Mutationen und Modifikationen der Peptide erkannt werden konnten. Zur Untersuchung der zellbiologischen und immunologischen Grundlagen der Antigenität der Quellproteine der HLA-Liganden wurden ihre mRNA-Expressionwerte mit denen der Transkriptome der Zellen verglichen und ihre Immunogenität in Assays mit T-Zellen aus peripherem Blut von Melanompatienten und gesunden Spendern sowie Tumorinfiltraten untersucht.

Insgesamt wurden 499 HLA-gebundene Peptide von 306 verschiedenen Quellproteinen identifiziert; 289 waren bislang noch nicht beschrieben worden. Im Gegensatz zu der Hypothese, dass Tumorantigenität auf Neoantigene beruht, wurde kein einziges mutiertes Peptid gefunden. Ein Peptid aus GPS2 wurde in drei Varianten mit unmethyliertem, monomethyliertem oder asymmetrisch dimethyliertem Arginin gefunden. Die Peptidome unterschiedlicher Zelllinien erwiesen sich trotz partiell übereinstimmender HLA als hochgradig individualisiert. Im Gegensatz zu der Hypothese, dass HLA primär Peptide hochexprimierter oder kurzlebiger Proteine präsentieren, wurde gefunden, dass nahezu 90 % der Peptide in den HLA-Peptidomen aus niedrig bis intermediär exprimierten Proteinen stammen, die in den Tumoren bis auf wenige Ausnahmen nicht überexprimiert waren und deren zellulärer Umsatz der Verteilung der Umsatzraten des zellulären Proteoms entsprach. In biologischen Tests erwies sich ein hoher Anteil der HLA-Liganden als immunogen. Das monomethylierte GPS2-Epitop wurde von T-Zellen aller untersuchten Patienten erkannt und scheint ebenso wie die Epitope, die bei allen vier Tumorzelllinien nachgewiesen wurden und die aus überexprimierten Proteinen stammten, gute Kandidaten für die Entwicklung therapeutischer Vakzine zu sein.

Mit der Arbeit konnten die Peptidome von Melanomen aufgeklärt, eine Reihe weit akzeptierter Hypothesen zur Immunogenität von Tumoren widerlegt und Epitope identifiziert werden, die vielversprechende Kandidaten für die Entwicklung von Vakzinen für die Behandlung von Melanomen sind. Darüber hinaus liefern die identifizierten HLA-Epitope wertvolle Informationen für das Verständnis der Antigenität von Tumoren und für die Selektion von Peptiden durch verschiedene HLA, was für neue Vorhersagealgorithmen verwertbar ist.

## 6 Summary

The objective of the PhD thesis was the elucidation of HLA peptidomes of melanoma. To this end HLA-bound peptides were isolated from affinity-purified HLA of four melanoma cell lines. The peptides were fractionated by 2-dimensional HPLC and sequenced by MALDI-TOF and ESI-Q-TOF mass spectrometry. To identify mutations and modifications, the mass spectra were interpreted by database-dependent as well as de novo sequencing approaches. The cell-biological and immunological basis of the antigenicity of the source proteins of the peptides was investigated by comparing the mRNA expression with the transcriptomes of the cell lines and the immunogenicity of the peptides was tested in T cell assays with peripheral white blood cells of melanoma patients and healthy controls, and tumour infiltrates.

In all 499 peptides derived from 306 different source proteins were identified, 289 of these had not been reported before. The HLA peptidomes of the four cell lines were highly individualised despite partially shared HLA. In contrast to the neoantigen hypothesis for tumour antigenicity, not a single mutated peptide was found. Of an epitope of the protein GPS2 three variants were found with unmethylated, monomethylated or dimethylated arginine. Contrasting hypotheses stating that HLA primarily present peptides derived from either highly expressed or short-lived proteins, nearly 90% of the peptides were from proteins with low to medium range expression levels whose turn-over rates exactly matched the range of the turn-over rates of the cellular proteome. A large fraction of the peptides were highly immunogenic in melanoma patients, and the monomethylated GPS2 peptide had induced T cell responses in all patients tested. This peptide like the peptides shared by all four peptidomes and those from overexpressed proteins are good candidates for the development of therapeutic cancer vaccines.

With this work the peptidomes of melanoma could be elucidated, several widely accepted hypotheses that are central to tumour immunology could be disproven and a number of promising candidates for vaccine development were identified and characterised. Moreover, the data from the HLA-peptidome analyses provide valuable insights into the antigenicity of tumour cells and can be used in the development of refined prediction algorithms for T cell epitopes.

## 7 Literaturverzeichnis

1. de Jong, A., *Contribution of mass spectrometry to contemporary immunology*. Mass Spectrom Rev, 1998. **17**(5): p. 311-35.
2. Sidney, J., et al., *HLA class I supertypes: a revised and updated classification*. BMC Immunol, 2008. **9**: p. 1.
3. Stewart-Jones, G.B., et al., *A structural basis for immunodominant human T cell receptor recognition*. Nat Immunol, 2003. **4**(7): p. 657-63.
4. Hunt, D.F., et al., *Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry*. Science, 1992. **255**(5049): p. 1261-3.
5. Engelhard, V.H., A.G. Brickner, and A.L. Zarlring, *Insights into antigen processing gained by direct analysis of the naturally processed class I MHC associated peptide repertoire*. Mol Immunol, 2002. **39**(3-4): p. 127-37.
6. Parker, K.C., et al., *The beta 2-microglobulin dissociation rate is an accurate measure of the stability of MHC class I heterotrimers and depends on which peptide is bound*. J Immunol, 1992. **149**(6): p. 1896-904.
7. Bouvier, M. and D.C. Wiley, *Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of MHC class I molecules*. Science, 1994. **265**(5170): p. 398-402.
8. Saper, M.A., P.J. Bjorkman, and D.C. Wiley, *Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution*. J Mol Biol, 1991. **219**(2): p. 277-319.
9. Falk, K., et al., *Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules*. Nature, 1991. **351**(6324): p. 290-6.
10. Falk, K., et al., *Peptide motifs of HLA-A1, -A11, -A31, and -A33 molecules*. Immunogenetics, 1994. **40**(3): p. 238-41.
11. Rammensee, H., et al., *SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs*. Immunogenetics, 1999. **50**(3-4): p. 213-9.
12. Kloetzel, P.M. and F. Ossendorp, *Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation*. Curr Opin Immunol, 2004. **16**(1): p. 76-81.
13. Varshavsky, A., et al., *Felix Hoppe-Seyler Lecture 2000. The ubiquitin system and the N-end rule pathway*. Biol Chem, 2000. **381**(9-10): p. 779-89.
14. Groll, M., et al., *Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution*. Nature, 1997. **386**(6624): p. 463-71.
15. Orlowski, M., *The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system*. Biochemistry, 1990. **29**(45): p. 10289-97.
16. Rock, K.L. and A.L. Goldberg, *Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 739-79.
17. Sewell, A.K., et al., *IFN-gamma exposes a cryptic cytotoxic T lymphocyte epitope in HIV-1 reverse transcriptase*. J Immunol, 1999. **162**(12): p. 7075-9.
18. Cascio, P., et al., *26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide*. Embo J, 2001. **20**(10): p. 2357-66.
19. Craiu, A., et al., *Two distinct proteolytic processes in the generation of a major histocompatibility complex class I-presented peptide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(20): p. 10850-5.
20. Toes, R.E., et al., *Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products*. J Exp Med, 2001. **194**(1): p. 1-12.

21. Kisselev, A.F., et al., *The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation.* J Biol Chem, 1999. **274**(6): p. 3363-71.
22. Reits, E., et al., *A major role for TPPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation.* Immunity, 2004. **20**(4): p. 495-506.
23. Roelse, J., et al., *Trimming of TAP-translocated peptides in the endoplasmic reticulum and in the cytosol during recycling.* J Exp Med, 1994. **180**(5): p. 1591-7.
24. Chang, S.C., et al., *The ER aminopeptidase, ERAAP, trims precursors to lengths of MHC class I peptides by a "molecular ruler" mechanism.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(47): p. 17107-12.
25. Hammer, G.E., et al., *In the absence of aminopeptidase ERAAP, MHC class I molecules present many unstable and highly immunogenic peptides.* Nat Immunol, 2007. **8**(1): p. 101-8.
26. van Endert, P.M., *Genes regulating MHC class I processing of antigen.* Curr Opin Immunol, 1999. **11**(1): p. 82-8.
27. Bachmair, A., D. Finley, and A. Varshavsky, *In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue.* Science, 1986. **234**(4773): p. 179-86.
28. Gonda, D.K., et al., *Universality and structure of the N-end rule.* J Biol Chem, 1989. **264**(28): p. 16700-12.
29. Hwang, C.S., A. Shemorry, and A. Varshavsky, *N-Terminal Acetylation of Cellular Proteins Creates Specific Degradation Signals.* Science, 2010.
30. Tobery, T. and R.F. Siliciano, *Cutting edge: induction of enhanced CTL-dependent protective immunity in vivo by N-end rule targeting of a model tumor antigen.* J Immunol, 1999. **162**(2): p. 639-42.
31. Esquivel, F., J. Yewdell, and J. Bennink, *RMA/S cells present endogenously synthesized cytosolic proteins to class I-restricted cytotoxic T lymphocytes.* J Exp Med, 1992. **175**(1): p. 163-8.
32. Schubert, U., et al., *Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes.* Nature, 2000. **404**(6779): p. 770-4.
33. Yewdell, J.W., L.C. Anton, and J.R. Bennink, *Defective ribosomal products (DRiPs): a major source of antigenic peptides for MHC class I molecules?* J Immunol, 1996. **157**(5): p. 1823-6.
34. Bishop, J.M., *Viral oncogenes.* Cell, 1985. **42**(1): p. 23-38.
35. Knudson, A.G., Jr., *Mutation and cancer: a personal odyssey.* Adv Cancer Res, 1995. **67**: p. 1-23.
36. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation.* Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
37. Sporn, M.B., *The war on cancer.* Lancet, 1996. **347**(9012): p. 1377-81.
38. de Braud, F., et al., *Malignant melanoma.* Crit Rev Oncol Hematol, 2003. **47**(1): p. 35-63.
39. Cummins, D.L., et al., *Cutaneous malignant melanoma.* Mayo Clin Proc, 2006. **81**(4): p. 500-7.
40. Zinkernagel, R.M. and P.C. Doherty, *Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system.* Nature, 1974. **248**(450): p. 701-2.
41. Marx, J.L., *Structure of MHC protein solved.* Science, 1987. **238**(4827): p. 613-4.
42. Slingluff, C.L., Jr., et al., *Human cytotoxic T cells specific for autologous melanoma cells: successful generation from lymph node cells in seven consecutive cases.* J Natl Cancer Inst, 1988. **80**(13): p. 1016-26.

43. Rosenberg, S.A., et al., *Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report.* N Engl J Med, 1988. **319**(25): p. 1676-80.
44. Garcia, K.C., et al., *CD8 enhances formation of stable T-cell receptor/MHC class I molecule complexes.* Nature, 1996. **384**(6609): p. 577-81.
45. Davis, M.M. and P.J. Bjorkman, *T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition.* Nature, 1988. **334**(6181): p. 395-402.
46. Chen, J.L., et al., *Structural and kinetic basis for heightened immunogenicity of T cell vaccines.* J Exp Med, 2005. **201**(8): p. 1243-55.
47. Lennerz, V., et al., *The response of autologous T cells to a human melanoma is dominated by mutated neoantigens.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(44): p. 16013-8.
48. zur Hausen, H., *Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis.* J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(9): p. 690-8.
49. Kawakami, Y., et al., *Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(9): p. 3515-9.
50. Bakker, A.B., et al., *Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma-derived tumor-infiltrating lymphocytes.* J Exp Med, 1994. **179**(3): p. 1005-9.
51. Brichard, V., et al., *The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas.* J Exp Med, 1993. **178**(2): p. 489-95.
52. van der Bruggen, P., et al., *A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma.* Science, 1991. **254**(5038): p. 1643-7.
53. Wang, R.F., et al., *A breast and melanoma-shared tumor antigen: T cell responses to antigenic peptides translated from different open reading frames.* J Immunol, 1998. **161**(7): p. 3598-606.
54. Vonderheide, R.H., et al., *The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes.* Immunity, 1999. **10**(6): p. 673-9.
55. Van Der Bruggen, P., et al., *Tumor-specific shared antigenic peptides recognized by human T cells.* Immunol Rev, 2002. **188**: p. 51-64.
56. Holzhtutter, H.G., C. Frommel, and P.M. Kloetzel, *A theoretical approach towards the identification of cleavage-determining amino acid motifs of the 20 S proteasome.* J Mol Biol, 1999. **286**(4): p. 1251-65.
57. Nussbaum, A.K., et al., *PAPProC: a prediction algorithm for proteasomal cleavages available on the WWW.* Immunogenetics, 2001. **53**(2): p. 87-94.
58. Zhang, G.L., et al., *PRED(TAP): a system for prediction of peptide binding to the human transporter associated with antigen processing.* Immunome Res, 2006. **2**: p. 3.
59. Parker, K.C., M.A. Bednarek, and J.E. Coligan, *Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains.* J Immunol, 1994. **152**(1): p. 163-75.
60. Donnes, P. and A. Elofsson, *Prediction of MHC class I binding peptides, using SVMHC.* BMC Bioinformatics, 2002. **3**: p. 25.
61. Viatte, S., P.M. Alves, and P. Romero, *Reverse immunology approach for the identification of CD8 T-cell-defined antigens: advantages and hurdles.* Immunol Cell Biol, 2006. **84**(3): p. 318-30.
62. Henderson, R.A., et al., *Direct identification of an endogenous peptide recognized by multiple HLA-A2.1-specific cytotoxic T cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(21): p. 10275-9.

63. Castelli, C., et al., *Mass spectrometric identification of a naturally processed melanoma peptide recognized by CD8+ cytotoxic T lymphocytes*. J Exp Med, 1995. **181**(1): p. 363-8.
64. Hogan, K.T., et al., *The peptide recognized by HLA-A68.2-restricted, squamous cell carcinoma of the lung-specific cytotoxic T lymphocytes is derived from a mutated elongation factor 2 gene*. Cancer Res, 1998. **58**(22): p. 5144-50.
65. Engelhard, V.H., et al., *Post-translational modifications of naturally processed MHC-binding epitopes*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(1): p. 92-7.
66. Zarling, A.L., et al., *Phosphorylated peptides are naturally processed and presented by major histocompatibility complex class I molecules in vivo*. J Exp Med, 2000. **192**(12): p. 1755-62.
67. Hofmann, S., et al., *Rapid and sensitive identification of major histocompatibility complex class I-associated tumor peptides by Nano-LC MALDI MS/MS*. Mol Cell Proteomics, 2005. **4**(12): p. 1888-97.
68. Buchsbaum, S., et al., *Large-scale analysis of HLA peptides presented by HLA-Cw4*. Immunogenetics, 2003. **55**(3): p. 172-6.
69. Barnea, E., et al., *Analysis of endogenous peptides bound by soluble MHC class I molecules: a novel approach for identifying tumor-specific antigens*. Eur J Immunol, 2002. **32**(1): p. 213-22.
70. Hickman, H.D., et al., *Cutting edge: class I presentation of host peptides following HIV infection*. J Immunol, 2003. **171**(1): p. 22-6.
71. Fenn, J.B., et al., *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*. Science, 1989. **246**(4926): p. 64-71.
72. Karas, M. and F. Hillenkamp, *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons*. Anal Chem, 1988. **60**(20): p. 2299-301.
73. Rouse, J.C., W. Yu, and S.A. Martin, *A comparison of the peptide fragmentation obtained from a reflector matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight and a tandem four sector mass spectrometer*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 1995. **6**(9): p. 822-835.
74. Cohen, S.L. and B.T. Chait, *Influence of matrix solution conditions on the MALDI-MS analysis of peptides and proteins*. Anal Chem, 1996. **68**(1): p. 31-7.
75. Knochenmuss, R., *Ion formation mechanisms in UV-MALDI*. Analyst, 2006. **131**(9): p. 966-86.
76. Karas, M. and R. Kruger, *Ion formation in MALDI: the cluster ionization mechanism*. Chem Rev, 2003. **103**(2): p. 427-40.
77. Knochenmuss, R., et al., *Secondary ion-molecule reactions in matrix-assisted laser desorption/ionization*. J Mass Spectrom, 2000. **35**(11): p. 1237-45.
78. Krutchinsky, A.N. and B.T. Chait, *On the nature of the chemical noise in MALDI mass spectra*. J Am Soc Mass Spectrom, 2002. **13**(2): p. 129-34.
79. Zhu, Y.F., et al., *Revisit of MALDI for small proteins*. Rapid Commun Mass Spectrom, 1995. **9**(13): p. 1315-20.
80. Krause, E., H. Wenschuh, and P.R. Jungblut, *The dominance of arginine-containing peptides in MALDI-derived tryptic mass fingerprints of proteins*. Anal Chem, 1999. **71**(19): p. 4160-5.
81. Gobom, J., et al., *Sample purification and preparation technique based on nano-scale reversed-phase columns for the sensitive analysis of complex peptide mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. J Mass Spectrom, 1999. **34**(2): p. 105-16.

82. Bernhard Spengler, D.K.R.K.R.J.C., *Metastable decay of peptides and proteins in matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1991. **5**(4): p. 198-202.
83. Spengler, B., D. Kirsch, and R. Kaufmann, *Fundamental aspects of postsource decay in matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. 1. Residual gas effects*. The Journal of Physical Chemistry, 1992. **96**(24): p. 9678-9684.
84. Spengler, B., et al., *Peptide sequencing by matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 1992. **6**(2): p. 105-8.
85. Suckau, D., et al., *A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics*. Anal Bioanal Chem, 2003. **376**(7): p. 952-65.
86. Vinh, J., et al., *Sequencing branched peptides with CID/PSD MALDI-TOF in the low-picomole range: application to the structural study of the posttranslational polyglycylation of tubulin*. Anal Chem, 1997. **69**(19): p. 3979-85.
87. Shevchenko, A., et al., *MALDI quadrupole time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for proteomic research*. Anal Chem, 2000. **72**(9): p. 2132-41.
88. Medzihradszky, K.F., et al., *The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a high-performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer*. Anal Chem, 2000. **72**(3): p. 552-8.
89. Papayannopoulos, I.A., *The interpretation of collision-induced dissociation tandem mass spectra of peptides*. Mass Spectrometry Reviews, 1995. **14**(1): p. 49-73.
90. Cramer, R. and S. Corless, *The nature of collision-induced dissociation processes of doubly protonated peptides: comparative study for the future use of matrix-assisted laser desorption/ionization on a hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometer in proteomics*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2001. **15**(22): p. 2058-66.
91. Hunt, D.F., et al., *Protein sequencing by tandem mass spectrometry*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(17): p. 6233-7.
92. Biemann, K., *Appendix 5. Nomenclature for peptide fragment ions (positive ions)*. Methods Enzymol, 1990. **193**: p. 886-7.
93. R. S. Johnson, D.K.K.A.W., *Proton mobility within electrosprayed peptide ions*. Journal of Mass Spectrometry, 1995. **30**(2): p. 386-387.
94. Wysocki, V.H., et al., *Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation*. J Mass Spectrom, 2000. **35**(12): p. 1399-406.
95. Béla Paizs, S.S., *Fragmentation pathways of protonated peptides*. Mass Spectrometry Reviews, 2005. **24**(4): p. 508-548.
96. Dongre, A.R., et al., *Influence of Peptide Composition, Gas-Phase Basicity, and Chemical Modification on Fragmentation Efficiency: Evidence for the Mobile Proton Model*. Journal of the American Chemical Society, 1996. **118**(35): p. 8365-8374.
97. Gu, C., et al., *Selective gas-phase cleavage at the peptide bond C-terminal to aspartic acid in fixed-charge derivatives of Asp-containing peptides*. Anal Chem, 2000. **72**(23): p. 5804-13.
98. Wattenberg, A., et al., *Sequence dependent fragmentation of peptides generated by MALDI quadrupole time-of-flight (MALDI Q-TOF) mass spectrometry and its implications for protein identification*. J Am Soc Mass Spectrom, 2002. **13**(7): p. 772-83.
99. Kaufmann, R., D. Kirsch, and B. Spengler, *Sequencing of peptides in a time-of-flight mass spectrometer: evaluation of postsource decay following matrix-assisted laser desorption ionisation (MALDI)*. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, 1994. **131**: p. 355-385.

100. Spengler, B., et al., *Peptide sequencing of charged derivatives by postsources decay MALDI mass spectrometry*. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, 1997. **169-170**: p. 127-140.
101. Medzihradszky, K.F., *Peptide sequence analysis*. Methods Enzymol, 2005. **402**: p. 209-44.
102. Wysocki, V.H., et al., *Mass spectrometry of peptides and proteins*. Methods, 2005. **35**(3): p. 211-22.
103. Perkins, D.N., et al., *Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data*. Electrophoresis, 1999. **20**(18): p. 3551-67.
104. Griffin, P.R., et al., *Direct database searching with MALDI-PSD spectra of peptides*. Rapid Commun Mass Spectrom, 1995. **9**(15): p. 1546-51.
105. Geer, L.Y., et al., *Open mass spectrometry search algorithm*. J Proteome Res, 2004. **3**(5): p. 958-64.
106. Elias, J.E., et al., *Comparative evaluation of mass spectrometry platforms used in large-scale proteomics investigations*. Nat Methods, 2005. **2**(9): p. 667-75.
107. Chamrad, D.C., et al., *Evaluation of algorithms for protein identification from sequence databases using mass spectrometry data*. Proteomics, 2004. **4**(3): p. 619-28.
108. Liska, A.J., et al., *Homology-based functional proteomics by mass spectrometry: application to the Xenopus microtubule-associated proteome*. Proteomics, 2004. **4**(9): p. 2707-21.
109. Searle, B.C., et al., *High-throughput identification of proteins and unanticipated sequence modifications using a mass-based alignment algorithm for MS/MS de novo sequencing results*. Anal Chem, 2004. **76**(8): p. 2220-30.
110. Taylor, J.A. and R.S. Johnson, *Implementation and uses of automated de novo peptide sequencing by tandem mass spectrometry*. Anal Chem, 2001. **73**(11): p. 2594-604.
111. Taylor, J.A. and R.S. Johnson, *Sequence database searches via de novo peptide sequencing by tandem mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 1997. **11**(9): p. 1067-75.
112. Ma, B., et al., *PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2003. **17**(20): p. 2337-42.
113. Sunyaev, S., et al., *MultiTag: multiple error-tolerant sequence tag search for the sequence-similarity identification of proteins by mass spectrometry*. Anal Chem, 2003. **75**(6): p. 1307-15.
114. Demine, R. and P. Walden, *Sequit: software for de novo peptide sequencing by matrix-assisted laser desorption/ionization post-source decay mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2004. **18**(8): p. 907-13.
115. Chen, Y., et al., *Mascot-derived false positive peptide identifications revealed by manual analysis of tandem mass spectra*. J Proteome Res, 2009. **8**(6): p. 3141-7.
116. Kessler, J.H., et al., *Competition-based cellular peptide binding assays for 13 prevalent HLA class I alleles using fluorescein-labeled synthetic peptides*. Hum Immunol, 2003. **64**(2): p. 245-55.
117. Demine, R., T. Sherev, and P. Walden, *Biochemical determination of natural tumor-associated T-cell epitopes*. Mol Biotechnol, 2003. **25**(1): p. 71-8.
118. Demine, R. and P. Walden, *Testing the role of gp96 as peptide chaperone in antigen processing*. J Biol Chem, 2005. **280**(18): p. 17573-8.
119. Cambridge, S.B., et al., *Systems-wide Proteomic Analysis in Mammalian Cells Reveals Conserved, Functional Protein Turnover*. J Proteome Res, 2011.
120. Barrow, C., et al., *Tumor antigen expression in melanoma varies according to antigen and stage*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(3 Pt 1): p. 764-71.

121. Admon, A., E. Barnea, and T. Ziv, *Tumor antigens and proteomics from the point of view of the major histocompatibility complex peptides*. Mol Cell Proteomics, 2003. **2**(6): p. 388-98.
122. Vigneron, N., et al., *An antigenic peptide produced by peptide splicing in the proteasome*. Science, 2004. **304**(5670): p. 587-90.
123. Arnett, K.L., et al., *The Bw4/Bw6 difference between HLA-B\*0802 and HLA-B\*0801 changes the peptides endogenously bound and the stimulation of alloreactive T cells*. Immunogenetics, 1998. **48**(1): p. 56-61.
124. Schneider, T.D. and R.M. Stephens, *Sequence logos: a new way to display consensus sequences*. Nucleic Acids Res, 1990. **18**(20): p. 6097-100.
125. Zou, Y. and Y. Wang, *Tandem mass spectrometry for the examination of the posttranslational modifications of high-mobility group A1 proteins: symmetric and asymmetric dimethylation of Arg25 in HMGA1a protein*. Biochemistry, 2005. **44**(16): p. 6293-301.
126. Rappsilber, J., et al., *Detection of arginine dimethylated peptides by parallel precursor ion scanning mass spectrometry in positive ion mode*. Anal Chem, 2003. **75**(13): p. 3107-14.
127. Gehrig, P.M., et al., *Fragmentation pathways of N(G)-methylated and unmodified arginine residues in peptides studied by ESI-MS/MS and MALDI-MS*. J Am Soc Mass Spectrom, 2004. **15**(2): p. 142-9.
128. Zhang, J., et al., *The N-CoR-HDAC3 nuclear receptor corepressor complex inhibits the JNK pathway through the integral subunit GPS2*. Mol Cell, 2002. **9**(3): p. 611-23.
129. Bodnar, W.M., et al., *Exploiting the complementary nature of LC/MALDI/MS/MS and LC/ESI/MS/MS for increased proteome coverage*. J Am Soc Mass Spectrom, 2003. **14**(9): p. 971-9.
130. Fuchs, S.Y., *The role of ubiquitin-proteasome pathway in oncogenic signaling*. Cancer Biol Ther, 2002. **1**(4): p. 337-41.
131. Varshavsky, A., *The N-end rule: functions, mysteries, uses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(22): p. 12142-9.
132. Neher, S.B., R.T. Sauer, and T.A. Baker, *Distinct peptide signals in the UmuD and UmuD' subunits of UmuD/D' mediate tethering and substrate processing by the ClpXP protease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(23): p. 13219-24.
133. Weinzierl, A.O., et al., *Distorted relation between mRNA copy number and corresponding major histocompatibility complex ligand density on the cell surface*. Mol Cell Proteomics, 2007. **6**(1): p. 102-13.
134. Liu, Y.F., et al., *Identification of annexin A1 as a proinvasive and prognostic factor for lung adenocarcinoma*. Clin Exp Metastasis, 2011. **28**(5): p. 413-25.
135. Mertsch, S., et al., *Matrix gla protein (MGP): an overexpressed and migration-promoting mesenchymal component in glioblastoma*. BMC Cancer, 2009. **9**: p. 302.
136. Matsumoto, T., et al., *A new possible lung cancer marker: VGF detection from the conditioned medium of pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma-derived cells using secretome analysis*. Int J Biol Markers, 2009. **24**(4): p. 282-5.
137. Lucero, H.A. and H.M. Kagan, *Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(19-20): p. 2304-16.
138. Peinado, H., et al., *A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression*. Embo J, 2005. **24**(19): p. 3446-58.
139. Harada, M., et al., *Use of an in vitro immunoselected tumor line to identify shared melanoma antigens recognized by HLA-A\*0201-restricted T cells*. Cancer Res, 2001. **61**(3): p. 1089-94.

140. Gavioli, R., et al., *High structural side chain specificity required at the second position of immunogenic peptides to obtain stable MHC/peptide complexes*. FEBS Lett, 1998. **421**(2): p. 95-9.
141. Li, L. and M. Bouvier, *Structures of HLA-A\*1101 complexed with immunodominant nonamer and decamer HIV-1 epitopes clearly reveal the presence of a middle, secondary anchor residue*. J Immunol, 2004. **172**(10): p. 6175-84.
142. Probst-Kepper, M., et al., *Conformational restraints and flexibility of 14-meric peptides in complex with HLA-B\*3501*. J Immunol, 2004. **173**(9): p. 5610-6.
143. Green, K.J., et al., *Potent T cell response to a class I-binding 13-mer viral epitope and the influence of HLA micropolymorphism in controlling epitope length*. Eur J Immunol, 2004. **34**(9): p. 2510-9.
144. Seliger, B., et al., *Identification and characterization of human leukocyte antigen class I ligands in renal cell carcinoma cells*. Proteomics Clin Appl, 2011. **5**(9-10): p. 569.
145. Hawkins, O.E., et al., *Identification of breast cancer peptide epitopes presented by HLA-A\*0201*. J Proteome Res, 2008. **7**(4): p. 1445-57.
146. Sykulev, Y., R.J. Cohen, and H.N. Eisen, *The law of mass action governs antigen-stimulated cytolytic activity of CD8+ cytotoxic T lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(26): p. 11990-2.
147. Noda, D., et al., *ELAC2, a putative prostate cancer susceptibility gene product, potentiates TGF-beta/Smad-induced growth arrest of prostate cells*. Oncogene, 2006. **25**(41): p. 5591-600.
148. Zhang, H., et al., *FOXO1 inhibits Runx2 transcriptional activity and prostate cancer cell migration and invasion*. Cancer Res, 2011. **71**(9): p. 3257-67.
149. Svane, I.M., et al., *Vaccination with p53 peptide-pulsed dendritic cells is associated with disease stabilization in patients with p53 expressing advanced breast cancer; monitoring of serum YKL-40 and IL-6 as response biomarkers*. Cancer Immunol Immunother, 2007. **56**(9): p. 1485-99.
150. Savage, P.A., et al., *Recognition of a ubiquitous self antigen by prostate cancer-infiltrating CD8+ T lymphocytes*. Science, 2008. **319**(5860): p. 215-20.
151. Desfrancois, J., et al., *Double positive CD4CD8 alphabeta T cells: a new tumor-reactive population in human melanomas*. PLoS One, 2010. **5**(1): p. e8437.
152. Singh, R.K., et al., *Histone levels are regulated by phosphorylation and ubiquitylation-dependent proteolysis*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(8): p. 925-33.
153. Fuchs, S.Y., *De-regulation of ubiquitin-dependent proteolysis and the pathogenesis of malignant melanoma*. Cancer Metastasis Rev, 2005. **24**(2): p. 329-38.
154. Datta, S.K., *Major peptide autoepitopes for nucleosome-centered T and B cell interaction in human and murine lupus*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **987**: p. 79-90.
155. Jin, D.Y., et al., *A human suppressor of c-Jun N-terminal kinase 1 activation by tumor necrosis factor alpha*. J Biol Chem, 1997. **272**(41): p. 25816-23.
156. Chun, A.C., et al., *Coiled-coil motif as a structural basis for the interaction of HTLV type 1 Tax with cellular cofactors*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2000. **16**(16): p. 1689-94.
157. Degenhardt, Y.Y. and S.J. Silverstein, *Gps2, a protein partner for human papillomavirus E6 proteins*. J Virol, 2001. **75**(1): p. 151-60.
158. Peng, Y.C., et al., *AMF1 (GPS2) modulates p53 transactivation*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(17): p. 5913-24.
159. Peng, Y.C., et al., *AMF-1/Gps2 binds p300 and enhances its interaction with papillomavirus E2 proteins*. J Virol, 2000. **74**(13): p. 5872-9.
160. Diederichs, S., et al., *Identification of interaction partners and substrates of the cyclin A1-CDK2 complex*. J Biol Chem, 2004. **279**(32): p. 33727-41.

161. Lee, T.H., et al., *Formation of hMSH4-hMSH5 heterocomplex is a prerequisite for subsequent GPS2 recruitment*. DNA Repair (Amst), 2006. **5**(1): p. 32-42.
162. McBride, A.E. and P.A. Silver, *State of the arg: protein methylation at arginine comes of age*. Cell, 2001. **106**(1): p. 5-8.
163. Pahlich, S., R.P. Zakaryan, and H. Gehring, *Protein arginine methylation: Cellular functions and methods of analysis*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1764**(12): p. 1890-903.
164. Hughes, R.M. and M.L. Waters, *Arginine methylation in a beta-hairpin peptide: implications for Arg-pi interactions, DeltaCp degrees, and the cold denatured state*. J Am Chem Soc, 2006. **128**(39): p. 12735-42.
165. Bedford, M.T. and S.G. Clarke, *Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why*. Mol Cell, 2009. **33**(1): p. 1-13.
166. Gary, J.D. and S. Clarke, *RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1998. **61**: p. 65-131.
167. Tang, J., et al., *PRMT1 is the predominant type I protein arginine methyltransferase in mammalian cells*. J Biol Chem, 2000. **275**(11): p. 7723-30.
168. Kim, S., et al., *Identification of N(G)-methylarginine residues in human heterogeneous RNP protein A1: Phe/Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Gly-Gly/Phe is a preferred recognition motif*. Biochemistry, 1997. **36**(17): p. 5185-92.
169. Smith, J.J., et al., *Unusual sites of arginine methylation in Poly(A)-binding protein II and in vitro methylation by protein arginine methyltransferases PRMT1 and PRMT3*. J Biol Chem, 1999. **274**(19): p. 13229-34.
170. Swiercz, R., M.D. Person, and M.T. Bedford, *Ribosomal protein S2 is a substrate for mammalian PRMT3 (protein arginine methyltransferase 3)*. Biochem J, 2005. **386**(Pt 1): p. 85-91.
171. Boulanger, M.C., et al., *Methylation of Tat by PRMT6 regulates human immunodeficiency virus type 1 gene expression*. J Virol, 2005. **79**(1): p. 124-31.
172. Lee, J., et al., *PRMT8, a new membrane-bound tissue-specific member of the protein arginine methyltransferase family*. J Biol Chem, 2005. **280**(38): p. 32890-6.
173. Schurter, B.T., et al., *Methylation of histone H3 by coactivator-associated arginine methyltransferase 1*. Biochemistry, 2001. **40**(19): p. 5747-56.
174. Cheng, D., et al., *The arginine methyltransferase CARM1 regulates the coupling of transcription and mRNA processing*. Mol Cell, 2007. **25**(1): p. 71-83.
175. Bedford, M.T., R. Reed, and P. Leder, *WW domain-mediated interactions reveal a spliceosome-associated protein that binds a third class of proline-rich motif: the proline glycine and methionine-rich motif*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(18): p. 10602-7.
176. Yague, J., J. Vazquez, and J.A. Lopez de Castro, *A post-translational modification of nuclear proteins, N(G),N(G)-dimethyl-Arg, found in a natural HLA class I peptide ligand*. Protein Sci, 2000. **9**(11): p. 2210-7.
177. Ou, C.Y., et al., *A coactivator role of CARM1 in the dysregulation of beta-catenin activity in colorectal cancer cell growth and gene expression*. Mol Cancer Res, 2011. **9**(5): p. 660-70.
178. Powers, M.A., et al., *Protein arginine methyltransferase 5 accelerates tumor growth by arginine methylation of the tumor suppressor programmed cell death 4*. Cancer Res, 2011. **71**(16): p. 5579-87.
179. Osborne, T.C., et al., *Protein arginine methyltransferase 1: positively charged residues in substrate peptides distal to the site of methylation are important for substrate binding and catalysis*. Biochemistry, 2007. **46**(46): p. 13370-81.

180. Lakowski, T.M. and A. Frankel, *Kinetic analysis of human protein arginine N-methyltransferase 2: formation of monomethyl- and asymmetric dimethyl-arginine residues on histone H4*. *Biochem J*, 2009. **421**(2): p. 253-61.
181. Kruger, T., et al., *Lessons to be learned from primary renal cell carcinomas: novel tumor antigens and HLA ligands for immunotherapy*. *Cancer Immunol Immunother*, 2005. **54**(9): p. 826-36.
182. Drews, O., *Optimization of Mass Spectrometric Methods for Identification of HLA-Ligands and their Application in Clinical Research*. PhD thesis, 2011.
183. Flad, T., et al., *T cell epitope definition by differential mass spectrometry: identification of a novel, immunogenic HLA-B8 ligand directly from renal cancer tissue*. *Proteomics*, 2006. **6**(1): p. 364-74.
184. Wahl, A., et al., *HLA class I molecules reflect an altered host proteome after influenza virus infection*. *Hum Immunol*, 2010. **71**(1): p. 14-22.
185. Ben Dror, L., et al., *The HLA-B\*2705 peptidome*. *Arthritis Rheum*, 2010. **62**(2): p. 420-9.
186. Kawashima, I., et al., *Identification of gp100-derived, melanoma-specific cytotoxic T-lymphocyte epitopes restricted by HLA-A3 supertype molecules by primary in vitro immunization with peptide-pulsed dendritic cells*. *Int J Cancer*, 1998. **78**(4): p. 518-24.
187. Reynolds, S.R., et al., *Identification of HLA-A\*03, A\*11 and B\*07-restricted melanoma-associated peptides that are immunogenic in vivo by vaccine-induced immune response (VIIR) analysis*. *J Immunol Methods*, 2000. **244**(1-2): p. 59-67.
188. Stickel, J.S., et al., *HLA ligand profiles of primary renal cell carcinoma maintained in metastases*. *Cancer Immunol Immunother*, 2009.
189. Bade-Doeding, C., et al., *A single amino-acid polymorphism in pocket A of HLA-A\*6602 alters the auxiliary anchors compared with HLA-A\*6601 ligands*. *Immunogenetics*, 2004. **56**(2): p. 83-8.
190. Herberts, C.A., et al., *Autoreactivity against induced or upregulated abundant self-peptides in HLA-A\*0201 following measles virus infection*. *Hum Immunol*, 2003. **64**(1): p. 44-55.
191. Mueller, M., *Analysis of the HLA ligandome and of the expression of tumor-associated and autophagy-associated antigens in solid tumors and cell lines* PhD thesis, 2008.
192. Johnson, K.L., et al., *Discovery of naturally processed and HLA-presented class I peptides from vaccinia virus infection using mass spectrometry for vaccine development*. *Vaccine*, 2009. **28**(1): p. 38-47.
193. Escobar, H., et al., *Large scale mass spectrometric profiling of peptides eluted from HLA molecules reveals N-terminal-extended peptide motifs*. *J Immunol*, 2008. **181**(7): p. 4874-82.
194. Yang, C.W., et al., *HLA-B\*1502-bound peptides: implications for the pathogenesis of carbamazepine-induced Stevens-Johnson syndrome*. *J Allergy Clin Immunol*, 2007. **120**(4): p. 870-7.
195. Gebreselassie, D., H. Spiegel, and S. Vukmanovic, *Sampling of major histocompatibility complex class I-associated peptidome suggests relatively looser global association of HLA-B\*5101 with peptides*. *Hum Immunol*, 2006. **67**(11): p. 894-906.
196. Chauv, P., et al., *Identification of five MAGE-A1 epitopes recognized by cytolytic T lymphocytes obtained by in vitro stimulation with dendritic cells transduced with MAGE-A1*. *J Immunol*, 1999. **163**(5): p. 2928-36.
197. van der Bruggen, P., et al., *Autologous cytolytic T lymphocytes recognize a MAGE-1 nonapeptide on melanomas expressing HLA-Cw\*1601*. *Eur J Immunol*, 1994. **24**(9): p. 2134-40.

198. Weinschenk, T., et al., *Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines*. *Cancer Res*, 2002. **62**(20): p. 5818-27.
199. Kawahara, M., et al., *Identification of HLA class I-restricted tumor-associated antigens in adult T cell leukemia cells by mass spectrometric analysis*. *Exp Hematol*, 2006. **34**(11): p. 1496-504.
200. Jarmalavicius, S., U. Trefzer, and P. Walden, *Differential arginine methylation of the G-protein pathway suppressor GPS-2 recognized by tumor-specific T cells in melanoma*. *Faseb J*, 2010. **24**(3): p. 937-46.
201. Knights, A.J., et al., *A novel MHC-associated proteinase 3 peptide isolated from primary chronic myeloid leukaemia cells further supports the significance of this antigen for the immunotherapy of myeloid leukaemias*. *Leukemia*, 2006. **20**(6): p. 1067-72.
202. Yague, J., et al., *Peptide specificity of the Amerindian B\*3905 allotype: molecular insight into selection mechanisms driving HLA class I evolution in indigenous populations of the Americas*. *Tissue Antigens*, 2000. **56**(5): p. 385-91.
203. Tahara, E., Jr., et al., *GIP3, an interferon inducible gene 6-16, is expressed in gastric cancers and inhibits mitochondrial-mediated apoptosis in gastric cancer cell line TMK-1 cell*. *Cancer Immunol Immunother*, 2005. **54**(8): p. 729-40.
204. Sievers, C., et al., *Prohibitins are required for cancer cell proliferation and adhesion*. *PLoS One*, 2010. **5**(9): p. e12735.
205. Li, J., et al., *Down-regulation of pescadillo inhibits proliferation and tumorigenicity of breast cancer cells*. *Cancer Sci*, 2009. **100**(12): p. 2255-60.
206. Shih, I.M., et al., *Isolation and functional characterization of the A32 melanoma-associated antigen*. *Cancer Res*, 1994. **54**(9): p. 2514-20.
207. Hovanesian, A.G., et al., *Surface Expressed Nucleolin Is Constantly Induced in Tumor Cells to Mediate Calcium-Dependent Ligand Internalization*. *PLoS One*, 2010. **5**(12).
208. Sarras, H., S. Alizadeh Azami, and J.P. McPherson, *In search of a function for BCLAF1*. *ScientificWorldJournal*, 2010. **10**: p. 1450-61.
209. Duffy, M.J., et al., *The ADAMs family of proteases: new biomarkers and therapeutic targets for cancer?* *Clin Proteomics*, 2011. **8**(1): p. 9.
210. Chapman, E.J. and M.A. Knowles, *Necdin: a multi functional protein with potential tumor suppressor role?* *Mol Carcinog*, 2009. **48**(11): p. 975-81.
211. Niture, S.K. and A.K. Jaiswal, *Nrf2 protein up-regulates antiapoptotic protein Bcl-2 and prevents cellular apoptosis*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(13): p. 9873-86.
212. Kluge, A., et al., *Cooperative interaction between protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription-3 with epidermal growth factor receptor blockade in lung cancer*. *International Journal of Cancer*, 2009. **125**(7): p. 1728-1734.
213. Lu, X.Y., et al., *Cell cycle regulator gene CDC5L, a potential target for 6p12-p21 amplicon in osteosarcoma*. *Mol Cancer Res*, 2008. **6**(6): p. 937-46.
214. Lin, X.Q., et al., *RINT-1 serves as a tumor suppressor and maintains Golgi dynamics and centrosome integrity for cell survival*. *Molecular and Cellular Biology*, 2007. **27**(13): p. 4905-4916.
215. David, D., et al., *Prognostic significance of STAT3 and phosphorylated STAT3 in human soft tissue tumors - a clinicopathological analysis*. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2011. **30**.
216. Schaffer, B.E., et al., *Loss of p130 Accelerates Tumor Development in a Mouse Model for Human Small-Cell Lung Carcinoma*. *Cancer Research*, 2010. **70**(10): p. 3877-3883.
217. Negorev, D.G., et al., *Sp100 as a potent tumor suppressor: accelerated senescence and rapid malignant transformation of human fibroblasts through modulation of an embryonic stem cell program*. *Cancer Res*, 2010. **70**(23): p. 9991-10001.

218. Stone, B., et al., *MAGE-F1, a novel ubiquitously expressed member of the MAGE superfamily*. *Gene*, 2001. **267**(2): p. 173-82.
219. Fu, Y., et al., *RNA interference targeting CITRON can significantly inhibit the proliferation of hepatocellular carcinoma cells*. *Mol Biol Rep*, 2011. **38**(2): p. 693-702.

## 8 Eigene Publikationen

- 1 **Saulius Jarmalavicius**, Yvonne Welte und Peter Walden „**High immunogenicity of the HLA peptidomes of melanoma tumor cells**” (in Vorbereitung für die Publikation)
- 2 **Saulius Jarmalavicius**, Uwe Trefzer und Peter Walden „**Ubiquitously expressed histone H4 recognized by CD8+ T cells in human melanoma**”, (in Vorbereitung für die Publikation)
- 3 Sajal Samanta, Devawati Dutta, Angana Ghoshal, Sumi Mukhopadhyay, Bibhuti Saha, Shyam Sundar, **Saulius Jarmalavicius**, Michael Forgber, Chhabinath Mandal, Peter Walden, ChitraManda „**Glycosylation of erythrocyte spectrin and its modification in visceral leishmaniasis**”, *PLoS One*. 2011;6(12)
- 4 **Saulius Jarmalavicius**, Uwe Trefzer and Peter Walden. „**Differential arginine methylation of the G-protein pathway suppressor GPS-2 by tumor-specific T cells in melanoma**”, *The FASEB Journal*. 2010; 24:937-946
- 5 Angana Ghoshal, Sumi Mukhopadhyay nee Bandyopadhyay, Rodion Demine, Michael Forgber, **Saulius Jarmalavicius**, BBibhuti Shah, Shyam Sundar, Peter Walden, Chhabinath Mandal and Chitra Mandal (2009). „**Detection and characterization of a sialoglycosylated bacterial ABC-type phosphate transporter protein from patients with visceral leishmaniasis**”, *Glycoconj J*. 2009 Aug;26(6):675-89

### Posterpräsentationen

- 1 E. Doyle, **S. Jarmalavicius**, M. Maurer, M. Metz (2011). „**Novel method of toxicity testing in zebrafish identifies detoxification of snake venoms by human skin mast cells**”, XXXVIII. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft dermatologische Forschung (ADF (Tübingen)).
- 2 **S. Jarmalavicius**, U. Trefzer, P. Walden (2008). „**Monomethylated arginine of the G protein suppressor GPS-2 is target for tumorspecific T cells in melanoma**”, 4. Deutscher Hautkrebskongress / 18. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Oncologie (ADO) (Berlin)
- 3 **Saulius Jarmalavicius**, Uwe Trefzer und Peter Walden (2007). „**Recognition of methylated peptides by tumour-specific T cells in melanoma patients**”, *Cancer Immunotherapy (CIMT) Symposium (Würzburg)*

## **9 Lebenslauf**

Aus Datenschutzgründen entfällt der Lebenslauf in der Online-Version.

## 10 Anhang

### 10.1 Anhang I. HLA der verwendeten Melanomzelllinien

	CM41		CM84		CM100		CM105	
<b>A</b>	1	11	11	24	11	32	2	11
ähnlich zu	A32			Cw4, Cw7		A1	Cw3	
<b>B</b>	35	57	8	51	35	51	35	60
ähnlich zu	B51, Cw4	B51, Cw3		B35, B57, Cw3, Cw4	B51, Cw4	B35, B57, Cw3, Cw4	B51, Cw4	
<b>C</b>	w4	w6	w7	w7	w2	w4	w3	w4
ähnlich zu	B35, B51, Cw7	A1, A2, A24	A24, B35, B51, Cw4	A24, B35, B51, Cw4		B35, B51, Cw7	A2, B51	B35, B51, Cw7

Mögliche Übereinstimmung zwischen den HLA-Molekülen wurde aufgrund der Ähnlichkeiten in Bindungsmotiven von HLA-Molekülen (siehe Anhang II) bestimmt

## 10.2 Anhang II. Kanonische Peptidbindungsmotive der untersuchten HLA

HLA	Kanonische Bindungsmotive									Verwandte Motive
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
<b>A1</b>			D E						Y	A32
<b>A2</b>		ali							ali	Cw3
<b>A11</b>									K R	
<b>A24</b>		Y F							ali F	Cw4, Cw7
<b>A32</b>									W	A1
<b>B8</b>			K R		K R				ali F	
<b>B35</b>		P							ar ali	B51, Cw4
<b>B51</b>		APG							ar ali	B35, B57, Cw3, Cw4
<b>B57</b>		AST							ar	B51, Cw3
<b>B60</b>		E							L	
<b>Cw2</b>										
<b>Cw3</b>		ali A							ali F	A2, B51
<b>Cw4</b>		ar P							ali F	B35, B51, Cw7, A24
<b>Cw6</b>					ali F	ali			ali Y	A1, A2, A24
<b>Cw7</b>		Y P			ali ar	ali			ar L	A24, B35, B51, Cw4

ali- aliphatische Aminosäuren (Leucin, Isoleucin oder Valin); ar-aromatische Aminosäuren (Tyrosin, Phenylalanin oder Tryptophan)

### 10.3 Anhang III. Anzahl an überlappenden HLA-Liganden bei den Melanomzellen

					CM41	CM84	CM100	CM105	Anteil an überlappenden Motiven	Überlappende Peptide, erwartet	Überlappende Peptide, detektiert	% von erwartet
5	CM41	CM84			5	5			5/6	689	124	18
6	CM41		CM100		5		5		5/6	464	81	17
7	CM41			CM105	5			5	5/6	638	38	6
8		CM84	CM100			5	4		4/6	371	57	15
9		CM84		CM105		5		5	5/6	638	98	15
10			CM100	CM105			4	4	4/6	371	38	10
11	CM41	CM84	CM100		4	5	4		4/6	371	47	13
12	CM41	CM84		CM105	5	5		5	5/6	638	33	5
13	CM41		CM100	CM105	4		4	5	4/6	371	24	6
14		CM84	CM100	CM105		5	4	5	4/6	371	39	11
15	CM41	CM84	CM100	CM105	4	4	4	4	4/6	371	36	10

Anteil der überlappenden Motive wurde nach den im Anhang I aufgeführten Angaben berechnet.



## 10.4 Anhang IV. Die indentifizierten HLA-Liganden

#	Peptidsequenz	Quellprotein	Gensymbol	ChaMel	HLA	$\mu$ HPLC Fraktion	MS <sup>a</sup>	Masse [M+H] <sup>+</sup>	Sequit	Mascotwert	Zelluläre Lokalisation	Biologische Funktion
1	AALAKAIEK	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit	PRKAR1A	100	A11	9	E <sup>b</sup>	914,42	+	84	Cytoplasma	Zellkommunikation und Signaltransduktion
2	AAMLDTVVFK [181]	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit	PSMD14	84	A11	12	E	1094,50	+	65	Cytoplasma	Proteinmetabolismus und Translation
				100	A11	14	E	1095,60	+	80		
				41	A11	14	E	1110,51*	+	96		
				105	A11	12	E <sup>c</sup>	1110,59*	+	49		
3	AASVPVY	Fatty acid synthase	FASN	41	B35	11	E	805,43	+	18	Cytoplasma	Metabolismus
4	AAYNRYFRK	Matrix Gla protein	MGP	105	A11	9	M	1188,66	+	33	Extrazellulär	Transport
5	AFIEKHWF	Cysteine-rich protein 2-binding protein	CSRP2BP	84	A24	14	E	1178,59	+	38	Cytoplasma	Proteinmetabolismus und Translation
6	AIAQAESLRYK	40S ribosomal protein S3	RPS3	84	A11	8	E	1249,60	+	53	Cytoplasma	Proteinmetabolismus und Translation
7	AILDYLITK	Endoribonuclease Dicer	DICER1	84	A11	14	E	1049,60	+	41	Cytoplasma	RNA-Prozessierung
				41	A11	16	E	1049,54	+	40		
8	AKIRIFDL	ribosomal protein L10	RPL10	84	B08	14	E	987,60	+	44	Cytoplasma, Endoplasmatisches Retikulum, Nukleus	Proteinmetabolismus und Translation
9	ALAPGLPTA	Neudesin neurotrophic factor	NENF	105	A02	11	E	810,43	+	9	Extrazellulär	Unbekannt
10	ALATLIHQV	COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 7A	COPS7A	105	A02	12	E	965,58	+	43	Nukleus	Regulation von Transkription
11	ALFLTITTK	Cytochrome c oxidase subunit 2	COX2	100	A11	15	E	1007,45	+	55	Cytoplasma	Metabolismus
12	ALLDQFYEK	Sushi repeat-containing protein SRPX	SRPX	100	A11	14	E	1128,57	+	62	Membran	Unbekannt
13	ALLDRIVSV [182]	Nuclear pore complex protein Nup205	NUP205	105	A02	12	E	985,60	+	66	Nukleus	Transport
14	ALMGYATHK	Interferon alpha-inducible protein 6	IFI6	100	A11	10	E	1007,34*	+	45	Mitochondrion	Immunantwort

#	Peptidsequenz	Quellprotein	Gensymbol	ChaMel	HLA	$\mu$ HPLC Fraktion	MS <sup>a</sup>	Masse [M+H] <sup>+</sup>	Sequit	Mascotwert	Zelluläre Lokalisation	Biologische Funktion
15	ALYSGVHKK [182]	SAM and SH3 domain containing 1	SASH1	84	A11	5	M	1002,60	+	46	Nukleus	Zellkommunikation und Signaltransduktion
				105	A11	5	M	1002,58	+	49		
				41	A11	7	E	1002,48	+	55		
				100	A11	8	E	1002,41	+	39		
16	APEEHPVLL	Actin, cytoplasmic 1	ACTB	41	B35	13	E	1004,53	+	46	Cytoplasma, Golgi-Apparat, Membran, Nukleus, Extrazellulär	Zellwachstum und/oder Zellversorgung
17	AQNPSLFVK	V-type proton ATPase 21 kDa proteolipid subunit	ATP6V0B	100	A11	11	E	1004,38	+	50	Membran	Transport
18	ARGPIQIL	RNA Polymerase II, B	POLR2B	41	B35	13	M	867,55	+	24	Nukleus	Transkription
19	ASAGPPSLRK	Zinc finger protein 262	ZMYM4	105	A11	7	M	983,58	+	35	Nukleus	Regulation von Transkription
20	ASDFITKMDY	Gelsolin	GSN	41	A01	13	E	1190,54	+	35	Extrazellulär, Cytoplasma, Mitochondrion	Zellwachstum und/oder Zellversorgung
21	ASDKETYELRY	60S ribosomal protein L22-like 1	RPL22L1	41	A01	11	E	1374,65	+	76	Cytoplasma	Proteinmetabolismus und Translation
22	ASFDKAKLK [182]	Thymosin $\beta$ 10	TMSB10	41	A11	8	M	1007,56	+	51	Cytoplasma	Zellwachstum und/oder Zellversorgung
							E	1007,49	+	92		
				84	A11	6	M	1007,67	+	58		
							E	1007,51	+	35		
				100	A11	8	M	1007,56	-	-		
23	ASFDKAKLKK						E	1007,42	+	92		
				105	A11	6	M	1007,63	+	47		
							E	1007,52	+	63		
				84	A11	6	E	1135,60	+	46		
				41	A11	7	E	1135,56	+	65		
24	ASILVKDYILK	Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory ankyrin repeat subunit A	ANKRD28	41	A11	14	E	1262,67	+	70	Nukleus	Unbekannt
25	ATAGDGLIELRK [181]	Prohibitin	PHB	41	A11	11	M	1243,75	+	40	Mitochondrion, Membran, Nukleus,	Zellkommunikation und Signaltransduktion
							E	1243,68	97			

#	Peptidsequenz	Quellprotein	Gensymbol	ChaMel	HLA	µHPLC Fraktion	MS <sup>a</sup>	Masse [M+H] <sup>+</sup>	Sequit	Mascotwert	Zelluläre Lokalisation	Biologische Funktion
				84	A11	10	M E	1243,76 1243,61	+	75 87	Extrazellulär, Cytoplasma	
				100	A11	12	M E	1243,75 1243,50	+	29 97		
				105	A11	10	M E	1243,76 1243,61	- +	- 60		
26	ATAGIIGVNR	Clathrin HC 1	CLTC	41	A11	10	M	971,56	+	24	Cytoplasma, Membran, Golgi- Apparat, Endosom	Transport
				84	A11	8	M	971,55	-	-		
				100	A11	8	M E	971,55 971,40	+	37 43		
27	ATAGIIGVNRK			84	A11	8	E	1099,58	+	36		
				105	A11	8	E	1099,57	+	52		
				41	A11	9	E	1099,54	+	59		
				100	A11	10	E	1099,48	+	42		
28	ATALEYVYK	Biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 subunit 1	BLOC1S1	100	A11	12	E	1057,38	+	50	Cytoplasma, melanosome	Organisation der Melanosomen
29	ATDPNILGR	DNA-dependent protein kinase	PRKDC	84	A11	8	M	956,68	+	26	Nukleus, Cytoplasma, microsome	Zellkommunikation und Signaltransduktion
30	ATFSSSHRY	Protein transport protein Sec31A	SEC31A	100	A32	9	E	1055,33	+	55	Endoplasmatisches Retikulum, Cytoplasma, Golgi-Apparat	Transport
31	ATFSSSHRYHK	Protein transport protein Sec31A	SEC31A	105	A11	6	M	1320,71	+	37		
				41	A11	7	E	1320,54	+	50		
32	ATFSTGERK	Exosome component 4	EXOSC4	84	A11	4	M	996,53	+	20	Nukleus, Cytoplasma	RNA-Prozessierung
33	ATGDMSGLLK	Angio-associated migratory cell protein	AAMP	84	A11	9	E	992,43	+	53	Extrazellulär	Zellwachstum und/oder Zellversorgung
34	ATGSWDSFLK	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-3	GNB3	41	A11	15	E	1111,47	+	68	Cytoplasma	Zellkommunikation und Signaltransduktion

#	Peptidsequenz	Quellprotein	Gensymbol	ChaMel	HLA	µHPLC Fraktion	MS <sup>a</sup>	Masse [M+H] <sup>+</sup>	Sequit	Mascotwert	Zelluläre Lokalisation	Biologische Funktion
35	ATIEDILFK	General transcription factor IIH subunit 2-like protein	GTF2H2C	84	A11	15	E	1049,55	+	64	Nukleus	Unbekannt
36	ATIIDILTK [182]	Annexin A1	ANXA1	84	A11	14	M	987,50	+	33	Membran, Cytoplasma, Nukleus	Zellwachstum und/oder Zellversorgung
				41	A11	16	E	987,53	+	51		
37	ATILAGDVKVK	Interferon regulatory factor 2-binding protein 2	IRF2BP2	105	A11	9	E	1114,60	+	58	Nukleus	Regulation von Transkription
				41	A11	10	E	1114,56	+	40		
38	ATIQQAYAR	Tetracycline Transporter-like protein	TETRAN	84	A11	6	M E	950,51 950,43	+	23 43	Membran	Transport
39	ATLQDIIRR	Glycogen phosphorylase	PYGM	84	A11	11	M	1085,69	+	29	Endoplasmatisches Retikulum, Extrazellulär	Metabolismus
40	ATNYITRNK	Pescadillo homolog 1	PES1	84	A11	6	M	1080,60	+	27	Nukleus	Zellkommunikation und Signaltransduktion
41	ATPTSPIRVK [181]	Filamin A	FLNA	84	A11	8	M E	1069,68 1069,55	+	28 24	Cytoplasma, Nukleus, Membran	Zellwachstum und/oder Zellversorgung
42	ATQSFSTFR	Cullin-7	CUL7	84	A11	9	E	1044,45		49	Cytoplasma	Proteinmetabolismus und Translation
43	ATSPALFNR	Dynein	DNCH1	84	A11	9	M	976,51	+	23	Golgi-Apparat, Endosom, Lysosom, Mitochondrion, Membran, Nukleus	Metabolismus
				100	A11	11	M	976,52	-	-		
				105	A11	9	M	976,54	+	27		
44	ATTLPIRKNK	Ankyrin 17	ANKRD17	41	A11	9	M	1013,63	-	-	Nukleus	Unbekannt
				84	A11	7	M	1013,63	+	15		
				105	A11	7	M	1013,62	+	29		
45	ATVLTTERK	Pre-mRNA-Processing factor 19	PRPF19	105	A11	5	M	1018,62	+	23	Nukleus	RNA-Prozessierung
46	ATVLYIVKK	Vesicle transport protein SEC20	BNIP1	100	A11	12	E	1034,46	+	45	Cytoplasma	Apoptose
47	AVAIKAMAK	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1-like	EIF5AL1	84	A11	7	E	902,48	+	48	Cytoplasma	Proteinmetabolismus und Translation

#	Peptidsequenz	Quellprotein	Gensymbol	ChaMel	HLA	µHPLC Fraktion	MS <sup>a</sup>	Masse [M+H] <sup>+</sup>	Sequit	Mascotwert	Zelluläre Lokalisation	Biologische Funktion
48	AVATKRVNK	Triple functional domain protein	TRIO	100	A11	8	E	977,40	+	32	Cytoplasma	Zellkommunikation und Signaltransduktion
49	AVFPKPFVEK	Inositol hexakisphosphate and diphosphoinositol-pentakisphosphate kinase 1	PPIP5K1	100	A11	13	E	1161,47	+	36	Cytoplasma	Zellkommunikation und Signaltransduktion
50	AVLDFVKQK	Leucine-rich repeat and calponin homology domain-containing protein 3	LRCH3	84	A11	10	E	1047,55	+	53	Unbekannt	Unbekannt
				100	A11	12	E	1047,45	+	52		
				105	A11	11	E	1047,62	+	50		
51	AVLYFLYKK	Cell surface glycoprotein MUC18	MCAM	100	A11	15	E	1144,48	+	46	Membran	Zellkommunikation und Signaltransduktion
52	AVMGAYVLLK	Signal peptidase complex catalytic subunit SEC11C	SEC11C	100	A11	15	E	1080,43*	+	47	Microsome	Proteinmetabolismus und Translation
53	AVNAHSNILK	Mitochondrial inner Membran protein	IMMT	84	A11	7	E	1066,52	+	51		
				41	A11	8	E	1066,49	+	58		
54	AVQEFGLAR			41	A11	11	M	990,51	-	-		
				100	A11	11	M	990,65	+	55		
55	AVQEFGLARFK [181]	PRELI domain containing protein 1	PRELID1					991,36**	+	57	Mitochondrion	Zellwachstum und/oder Zellversorgung
				41	A11	14	M	1265,71	+	34		
							E	1265,61	+	45		
				84	A11	12	M	1265,65	+	43		
				100	A11	14	M	1265,75	+	51		
							E	1265,5	+	50		
56	AVQRTLLEK [181]	CD99	CD99					1265,70	-	19	Membran, Cytoplasma	Zellkommunikation und Signaltransduktion
				41	A11	9	M	1057,61	+	33		
				84	A11	8	M	1057,55	+	48		
							E	1057,56	+	46		
				100	A11	10	M	1057,64	+	53		
			E	1057,47	+	50						
				105	A11	8	M	1057,60	+	34		
							E	1057,56	+	51		

#	Peptidsequenz	Quellprotein	Gensymbol	ChaMel	HLA	$\mu$ HPLC Fraktion	MS <sup>a</sup>	Masse [M+H] <sup>+</sup>	Sequit	Mascotwert	Zelluläre Lokalisation	Biologische Funktion
57	AVYDFFIGR	Lamin-B receptor	LBR	41	A11	16	E	1087,47	+	50	Nukleus, Membran	Zellwachstum und/oder Zellversorgung
58	AVYGQKEIHRK	GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 1	G3BP1	84	A11	6	M	1328,80	+	42	Cytoplasma, Nukleus, Membran	Zellkommunikation und Signaltransduktion
				105	A11	6	E	1328,65	+	41		
59	AWAPKPYHKF	Mitogen-activated protein kinase kinase 4	MAP4K4	84	A24	10	E	1244,57	+	24	Cytoplasma	Zellkommunikation und Signaltransduktion
60	AYMPHTFFI	N-acetylglucosaminyltransferase 110 kDa subunit	OGT	84	A24	15	E	1125,51	+	27	Cytoplasma, Nukleus	Proteinmetabolismus und Translation
61	AYSSFRSV	Torsin A Interacting Protein 1	TOR1AIP1	84	B51	8	M	916,45	+	17	Nukleus, Endoplasmatisches Retikulum	Unbekannt
62	AYVHMVTHF	Bax inhibitor 1	TMBIM6	84	A24	11	E	1104,45	+	51	Membran	Apoptose
63	DAAEIRLV	nucleolin	NCL	84	B51	10	M	886,50	+	40	Nukleus, Cytoplasma, Membran	Transport
64	DAFRVNVV	adaptor-related protein complex 2, mu 1 subunit	AP2M1	84	B51	12	M	933,58	+	35	Membran	Transport
65	DAKIRIFDL [118, 183]	Ribosomal protein L10	RPL10	84	B08	14	M	1090,60	+	30	Cytoplasma, Endoplasmatisches Retikulum, Nukleus	Proteinmetabolismus und Translation
							E	1090,63	+	54		
66	DALDKIRLI	Endoplasmin	HSP90B1	84	B51	13	E	1056,56	+	54	Endoplasmatisches Retikulum	Proteinmetabolismus und Translation
67	DALKEKVI	S-adenosylmethionine synthase isoform type-2	MAT2A	84	B51	8	E	915,48	+	40	Mitochondrion	Apoptose
68	DALRLYLI	Isoleucine-tRNA synthetase	IARS	84	B51	15	M	976,49	+	33	Cytoplasma, Mitochondrion	Proteinmetabolismus und Translation
69	DALRSILTI	Methionine-tRNA synthetase	MARS	84	B51	14	M	1001,61	+	33	Cytoplasma, Endoplasmatisches Retikulum, Nukleus	Proteinmetabolismus und Translation
							E	1001,59	+	40		

#	Peptidsequenz	Quellprotein	Gensymbol	ChaMel	HLA	µHPLC Fraktion	MS <sup>a</sup>	Masse [M+H] <sup>+</sup>	Sequit	Mascotwert	Zelluläre Lokalisation	Biologische Funktion
70	DAYPEIEKF	Securin	PTTG1	41	B35	13	E	1111,52	+	37	Cytoplasma, Nukleus	Regulation von Transkription
71	DAYSSFRSV	Torsin A Interacting Protein 1	TOR1AIP1	84	B51	9	M E	1031,52 1031,40	+ +	31 29	Nukleus, Endoplasmatisches Retikulum	Unbekannt
72	DAYVILKTV	Gelsolin	GSN	84	B51	12	E	1021,68	+	59	Extrazellulär, Cytoplasma, Mitochondrion	Zellwachstum und/oder Zellversorgung
73	DGLIELRK	Prohibitin	PHB	100	A11	12	E	943,41	+	57	Mitochondrion, Membran, Nukleus, Extrazellulär, Cytoplasma	Zellkommunikation und Signaltransduktion
74	DPFAFIHKI	Histone demethylase JARID1B	JARID1B	84	B51	15	M E	1087,63 1087,57	+ +	57 61	Nukleus	Regulation von Transkription
75	DPYSGSTI	Plectin	PLEC	84	B51	7	E	839,31	+	47	Endoplasmatisches Retikulum	Proteinmetabolismus und Translation
76	DTDHYFLRY [181]	GPI transamidase component PIG-T	PIGT	41	A01	13	M E	1229,57 1229,55	+ +	26 41	Endoplasmatisches Retikulum	Proteinmetabolismus und Translation
77	ETDLLDIRSEY [181]	Annexin A11	ANXA11	41	A01	14	M E	1353,62 1353,57	+ +	31 55	Cytoplasma, Nukleus	Zellkommunikation und Signaltransduktion
78	ETERLTDDY	Integrin alpha-3	ITGA3	41	A01	9	E	1141,39	+	38	Membran	Zellkommunikation und Signaltransduktion
79	EYDNFFQHL	CLIP-associating protein 1	CLASP1	84	A24	15	E	1212,53	+	32	Nukleus	Unbekannt
80	EYIKFLRSI	Histone deacetylase 2	HDAC2	84	A24	14	M E	1168,68 1168,62	+	32 28	Nukleus	Regulation von Transkription
81	EYLTKVDKL	Clathrin heavy chain 1	CLTC	84	A24	10	E	1108,54	+	38	Cytoplasma, Membran, Golgi-Apparat, Endosom	Transport
82	EYMEHVYLI	Oxysterol-binding protein-related protein 2	OSBPL2	84	A24	13	E	1196,50	+	14	Cytoplasma	Zellwachstum und/oder Zellversorgung
83	EYPDRIMNTF [181]	Tubulin β3	TUBB3	84	A24	12	M E	1285,65 1285,50	+ +	22 19	Cytoplasma	Zellwachstum und/oder Zellversorgung

#	Peptidsequenz	Quellprotein	Gensymbol	ChaMel	HLA	$\mu$ HPLC Fraktion	MS <sup>a</sup>	Masse [M+H] <sup>+</sup>	Sequit	Mascotwert	Zelluläre Lokalisation	Biologische Funktion
84	FAFIHKI	Histone demethylase JARID1B	JARID1B	84	B51	15	E	875,49	+	44	Nukleus	Regulation von Transkription
85	FAGDDAPRA [184]	$\beta$ Actin	ACTB	105	?	6	M	919,48	+	49	Cytoplasma, Golgi-Apparat, Membran, Nukleus, Extrazellulär	Zellwachstum und/oder Zellversorgung
86	FLDASGAKLDY [181]	Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1	BZW1	41	A01	13	E	1199,58	+	50	Nukleus	Regulation von Transkription
87	FLDSTGSRLDY	Basic leucine zipper and W2 domains 2	BZW2	41	A01	12	E	1273,51	+	51	Nukleus	Proteinmetabolismus und Translation
88	FPKVRILRL	N-acetylgalactosaminyltransferase 1	GALNT1	41	B35	16	M	1141,75	+	9	Golgi-Apparat	Proteinmetabolismus und Translation
89	FSDHHENKY	Short transient receptor potential channel 4-associated protein	TRPC4AP	41	A01	7	E	1176,41	+	33	Cytoplasma	Zellkommunikation und Signaltransduktion
90	FTDEESRVF	Bcl2-associated transcription factor 1	BCLAF1	41	A01	12	M	1129,55	+	33	Nukleus	Regulation von Transkription
91	FTDEESRVFL			41	A01	14	M	1242,54	+	11		
							E	1242,52	+	37		
92	FTDVNSILRY [118]	Glutamyl-prolyl-tRNA synthetase	EPRS	41	A01	15	M	1227,68	+	20	Cytoplasma	Proteinmetabolismus und Translation
							E	1226,54	+	64		
93	FYDERIVVV [68]	Disco-interacting protein 2 homolog B	DIP2B	41	Cw4	14	E	1139,53	+	32	Nukleus	Unbekannt
94	FYLEGGFSKF	Actin-related protein 10	ACTR10	84	A24	15	E	1149,60	+	45	Cytoplasma	Zellwachstum und/oder Zellversorgung
95	GLDIDGIYRV	Rho GTPase-activating protein	ARHGAP12	105	A02	12	E	1120,60	+	34	Cytoplasma	Zellkommunikation und Signaltransduktion
96	GQYGNPLNK [185]	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10	ADAM10	84	A11	7	E	990,43	+	48	Membran	Proteinmetabolismus und Translation
				41	A11	8	E	990,41	+	48		
				100	A11	9	E	990,35	+	47		
97	GRAPQVLVL	RNA helicase	DDX21	41	B35	14	M	952,58	+	26	Nukleus	Metabolismus

#	Peptidsequenz	Quellprotein	Gensymbol	ChaMel	HLA	$\mu$ HPLC Fraktion	MS <sup>a</sup>	Masse [M+H] <sup>+</sup>	Sequit	Mascotwert	Zelluläre Lokalisation	Biologische Funktion
98	GSLASVYHK	AP-2 complex subunit beta	AP2B1	100	A11	9	E	961,38	+	50	Membran	Unbekannt
99	GSSDVIIHR [181]	PHD and RING finger domain-containing protein 1	PHRF1	41	A11	8	E	983,44	+	81	Nukleus	Unbekannt
				100	A11	8	E	983,37	+	82		
				84	A11	6	M	983,61	+	28		
							E	983,46	+	84		
				105	A11	7	M	983,53	+	28		
							E	983,46	+	98		
100	GTADVHFER [182]	THO complex 4	THOC4	41	A11	9	M	1031,49	+	28	Nukleus	Proteinmetabolismus und Translation
				84	A11	7	E	1031,42	+	81		
				105	A11	7	M	1031,50	+	24		
							E	1031,41	+	60		
				100	A11	9	E	1031,33	+	44		
101	GTATLRLVK [186, 187]	Melanocyte protein mel 17	SILV	100	A11	11	M E	958,66 958,45	+	25 68	Endosom, Golgi-Apparat, Cytoplasma	Metabolismus
102	GTDGHVHLY	WD repeat-containing protein 34	WDR34	41	A01	10	E	998,38	+	44	Membran	Unbekannt
103	GTIKDIVTR	Isoleucine--tRNA ligase, cytoplasmic	IARS	84	A11	8	E	1002,52	+	39	Cytoplasma, Mitochondrion	Proteinmetabolismus und Translation
				41	A11	10	E	1002,49	+	45		
				100	A11	10	E	1002,43	+	58		
104	GTLDYILQR [181]	Fatso	FTO	41	A11	14	M	1078,58	+	15	Nukleus	Unbekannt
				84	A11	12	M E	1078,55 1078,50	+	43 36		
				100	A11	12	M E	1078,58 1079,40*	+	39 61		
							*					
105	GTMTGMLYK [181]	Putative mitochondrial import inner Membran translocase subunit Tim23B	TIMM23B	100	A11	12	E	1033,30*	+	42	Mitochondrion, Membran	Proteinmetabolismus und Translation
				41	A11	11	E	1001,47	+	59		
106	GTQPGPLLKK	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H5	ITIH5	84	A11	7	E	1038,55	+	45	Extrazellulär	Proteinmetabolismus und Translation

#	Peptidsequenz	Quellprotein	Gensymbol	ChaMel	HLA	$\mu$ HPLC Fraktion	MS <sup>a</sup>	Masse [M+H] <sup>+</sup>	Sequit	Mascotwert	Zelluläre Lokalisation	Biologische Funktion
107	GTSSVIVSR	F-Box And Wd-40 Domain Protein 11	FBXW1B	41	A11	7	M	905,43	-	-	Cytoplasma	Proteinmetabolismus und Translation
				84	A11	6	M	905,50	+	21		
				100	A11	8	M	905,46	+	26		
				105	A11	6	M	905,49	+	29		
108	GTVDVTPFIKK	Bifunctional protein NCOAT	MGEA5	100	A11	12	E	1204,50	+	40	Cytoplasma	Metabolismus
109	GTVRIGVAK	Multiple PDZ domain protein	MPDZ	84	A11	6	E	900,50	+	47	Membran	Zellwachstum und/oder Zellversorgung
110	GTYVSSVPR [181]	HLA DO $\alpha$	HLA-DOA	41	A11	8	M	965,50	+	31	Membran, Lysosom, Endoplasmatisches Retikulum	Immunantwort
111	GVLKKVIRH	Tenascin	TNC	100	?	9	E	1049,51	+	45	Membran	Zellkommunikation und Signaltransduktion
112	GVMPSHFSR [10]	Ribosomal protein S19	RPS19	100	A11	10	M E	1017,51 1033,32*	+	28 46	Nukleus	Proteinmetabolismus und Translation
113	GVYSGRAHPK	Calcyphosine	CAPS	100	A11	6	M	1071,55	+	37	Cytoplasma	Zellkommunikation und Signaltransduktion
114	HPPSHWPLI	Catenin beta-1	CTNNB1	84	B51	14	E	975,59	+	41	Membran	Zellkommunikation und Signaltransduktion
115	HSEYHTLLY [188]	Histone deacetylase 5	HDAC5	41	A01	13	E	1162,55	+	34	Nukleus	Regulation von Transkription
116	HTDILKEYK	DTW domain-containing protein 1	DTWD1	41	A01	10	E	1146,50	+	41	Membran	Zellkommunikation und Signaltransduktion
117	HTLDSYRILQK	Damage-specific DNA-Binding protein 2	DDB2	84	A11	10	M	1373,79	+	31	Nukleus	DNA-Bindung
118	HTMEFALVK	Necdin	NDN	84	A11	11	E	1075,49	+	46	Nukleus	Zellzyklus
				41	A11	13	E	1075,56	+	45		
				100	A11	13	E	1075,40	+	45		
119	HTMEVTVYH	Melanocyte protein mel 17	SILV	100	?	10	E	1132,33*	+	45	Endosom, Golgi-Apparat, Cytoplasma	Metabolismus
120	HVIETLIGK	T-complex protein 1	CCT5	41	A11	11	E	1009,58	+	41	Cytoplasma	Proteinmetabolismus

#	Peptidsequenz	Quellprotein	Gensymbol	ChaMel	HLA	$\mu$ HPLC Fraktion	MS <sup>a</sup>	Masse [M+H] <sup>+</sup>	Sequit	Mascotwert	Zelluläre Lokalisation	Biologische Funktion
		subunit epsilon		100	A11	12	E	1009,44	+	34		und Translation
121	HVYDGKFLAR [189]	Butyrylcholinesterase	BCHE	84	A11	9	E	1205,56	+	48	Extrazellulär	Metabolismus
				100	A11	11	M	1205,71	+	22		
				105	A11	9	M	1205,66	+	41		
122	IADMGHLKY [188]	Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	41	B35	11	E	1047,51	+	45	Nukleus	DNA-Bindung
123	IAYKFGKTV	TransMembran protein 66	TMEM66	84	B51	10	E	1026,52	+	29	Membran	Unbekannt
124	ILDKKVEKV [190]	Putative heat shock protein HSP 90-beta-3	HSP90AB1	105	A02	7	E	1071,59	+	35	Cytoplasma	Proteinmetabolismus und Translation
125	ILTDITKGV [133]	EF 2	EEF2	105	A02	11	E	959,58	+	43	Cytoplasma, Nukleus	Proteinmetabolismus und Translation
126	IQFNPPLSEK	Lysine-specific histone demethylase 1B	KDM1B	100	A11	12	E	1173,43* *	+	43	Nukleus	Regulation von Transkription
127	ITDSAGHILY [181]	TransMembran Emp24 Domain Trafficking Protein 2	TMED2	41	A01	12	E	1089,62	+	41	Golgi-Apparat, Microsome, Membran	Transport
128	IYGYVAEQF	Signal Peptidase Complex Subunit 1	SPCS1	84	A24	10	E	1089,52	+	51	Membran	Proteinmetabolismus und Translation
129	IYIKHPHLF	Deoxynucleotidyltransferase terminal-interacting protein 1	DNTTIP1	84	A24	12	E	1167,58	+	35	Nukleus	DNA-Bindung
130	IYQRDPLKL [191]	Signal transducer and activator of transcription 6	STAT6	84	A24	11	M E	1145,63 1145,58	+	43 34	Cytoplasma, Nukleus	Zellkommunikation und Signaltransduktion
131	IYTSSVNRL [181]	Coatomer subunit beta	COPB2	84	A24	9	E	1052,49	+	60	Cytoplasma, Golgi-Apparat	Transport
132	IYVHLLTF	Vam6/Vps39-like protein	VPS39	84	A24	15	E	1119,59	+	27	Nukleus, Cytoplasma	Proteinmetabolismus und Translation
133	KAFNQGKIFK [67]	Elongation factor 1-gamma	EEF1G	84	A11	9	E	1180,59	+	50	Cytoplasma	Proteinmetabolismus und Translation
134	KAGEVFIHK	Non-POU domain-containing octamer-binding protein	NONO NONO	41	A11	9	E	1028,48	+	76	Nukleus	RNA-Prozessierung
				100	A11	9	E	1028,42	+	66		

#	Peptidsequenz	Quellprotein	Gensymbol	ChaMel	HLA	$\mu$ HPLC Fraktion	MS <sup>a</sup>	Masse [M+H] <sup>+</sup>	Sequit	Mascotwert	Zelluläre Lokalisation	Biologische Funktion
135	KALRLSASALF	VEGF nerve growth factor inducible	VEGF	41	B57	15	M	1176,75	+	39	Extrazellulär	Zellkommunikation und Signaltransduktion
136	KEIDLLKQL	Serine/threonine-protein kinase Nek7	NEK7	41	?	14	E	1099,60	+	49	Cytoplasma	Zellkommunikation und Signaltransduktion
137	KFIDTTSKF [181]	60S ribosomal protein L3	RPL3	84	A24	10	E	1086,51	+	56	Cytoplasma	Proteinmetabolismus und Translation
138	KIFSGVFK	60S ribosomal protein L7-like 1	RPL7L1	41	A11	13	E	1024,61	+	64	Cytoplasma	Proteinmetabolismus und Translation
				100	A11	13	E	1024,47	+	51		
139	KIMKDILEK	Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1	100	A11	11	E	1117,48	+	68	Cytoplasma	Proteinmetabolismus und Translation
				84	A11	9	E	1133,57*	+	55		
140	KLLEGEESRISL [192]	Vimentin	VIM	105	A02	11	E	1373,76	+	44	Nukleus, Extrazellulär, Membran, Golgi-Apparat, Endoplasmatisches Retikulum	Zellwachstum und/oder Zellversorgung
141	KMYEEFLSK	cAMP-dependent protein kinase type I-beta regulatory subunit	PRKAR1B	100	A11	12	E	1190,38*	+	55	Cytoplasma	Zellkommunikation und Signaltransduktion
142	KQALKYFNL	Protein sel-1 homolog 1	SEL1L	84	?	13	E	1124,57		41	Endoplasmatisches Retikulum	Unbekannt
143	KRGDVIYIL [191]	Src Family Associated Phosphoprotein 2	SKAP2	84	Cw7	13	M	1076,76	+	34	Cytoplasma	Zellkommunikation und Signaltransduktion
144	KSTTTGHLIYK	Elongation factor 1-alpha 1	EEF1A1	41	A11	13	E	1248,68	+	63	Cytoplasma, Nukleus,	Proteinmetabolismus und Translation
145	KTFPNTIEH	Zinc finger and BTB domain-containing protein 40	ZBTB40	100	?	9	E	1086,39	+	59	Nukleus	Regulation von Transkription
146	KTYGEIFEK [182]	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 subunit C2	NDUFC2	105	A11	10,9	E	1114,51	+	40	Mitochondrion	Metabolismus
				84	A11	9	E	1114,58	+	46		
				41	A11	11	E	1114,59	+	45		
				100	A11	11	E	1114,41	+	71		
147	KVFAGYYTK	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	PLOD2	84	A11	9	E	1076,50	+	61	Endoplasmatisches Retikulum	Metabolismus

#	Peptidsequenz	Quellprotein	Gensymbol	ChaMel	HLA	µHPLC Fraktion	MS <sup>a</sup>	Masse [M+H] <sup>+</sup>	Sequit	Mascotwert	Zelluläre Lokalisation	Biologische Funktion
148	KVFDKPSAK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like	HNRPLL	100	A11	7	E	1090,45	+	61	Nukleus	RNA-Prozessierung
149	KVFGGTVHK	GMP synthase	GMPS	84	A11	6	E	972,50	+	40	Cytoplasma, Golgi-Apparat	Transport
	41			A11	7	E	972,47	+	60			
150	KVFGGTVHKK			105	A11	5	M	1100,73	+	54		
151	KVGEVIVTK	60kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPD1	100	A11	9	E	972,43	+	51	Mitochondrion, Membran	Proteinmetabolismus und Translation
152	KVLNTVVNK	Calpain-3	CAPN3	100	A11	8	E	1014,46	+	66	Nukleus	Proteinmetabolismus und Translation
153	KVSGDIFSR	WAS protein family homolog 1	WASH1	100	A11	11	E	1008,39	+	48	Endosome	Transport
154	KYFDEHYEY [67]	Cyclin-dependent kinases regulatory subunit 2	CKS2	84	A24	10	E	1293,45	+	31	Nukleus	Zellzyklus
155	KYFHPPAHL	Muscleblind-like protein 2	MBNL2	84	A24	10	E	1109,51	+	45	Nukleus	RNA-Prozessierung
156	KYISKPENL	Calcium-binding protein 39-like	CAB39L	84	A24	8	E	1091,61	+	37	Cytoplasma	Unbekannt
157	KYLDEDTIYHL	S-adenosylmethionine synthase isoform type-2	MAT2A	84	A24	12	E	1409,59	+	48	Cytoplasma	Zellwachstum und/oder Zellversorgung
158	KYLSVQGQLF [181]	Mitochondrial carrier homolog 1	MTCH1	84	A24	13	E	1182,56	+	74	Mitochondrion	Apoptose
159	KYMDVVKERI	ATP dependent RNA helicase DDX24	DDX24	84	A24	10	M E	1280,73 1280,60	+	34 55	Nukleus	Transport
160	KYQIINEEF	Hermansky-Pudlak syndrome 3 protein	HPS3	84	A24	11	E	1183,51	+	42	Cytoplasma	Organisation der Melanosomen
161	KYTKIFNDF	Zinc finger MYND domain-containing protein 11	ZMYND11	84	A24	12	E	1175,53	+	44	Nukleus	Regulation von Transkription
162	KYTPPPHHI	NADH dehydrogenase	NDUFS5	84	A24	7	M E	1089,65 1089,50	+	47 55	Mitochondrion	Metabolismus
163	LLDEHHISY	Cytospin-A	SPECC1L	41	A01	11	E	1126,54	+	48	Cytoplasma	Zellwachstum und/oder Zellversorgung

#	Peptidsequenz	Quellprotein	Gensymbol	ChaMel	HLA	$\mu$ HPLC Fraktion	MS <sup>a</sup>	Masse [M+H] <sup>+</sup>	Sequit	Mascotwert	Zelluläre Lokalisation	Biologische Funktion
164	LLDLDEELRY	Intraflagellar transport protein 43 homolog	IFT43	41	A01	15	E	1278,56	+	65	Cytoplasma	Transport
165	LLGPPVGV [192]	Cip1-interacting zinc finger protein	CIZ1	105	A02	12	E	848,47	+	56	Nukleus	Regulation von Transkription
166	LLIGHLERV [192]	Nuclear pore complex protein Nup205	NUP205	105	A02	12	E	1049,65	+	30	Nukleus	Transport
167	LPDEIYHVY	Alpha N-terminal protein methyltransferase 1A	METTLL11A	41	A01	14	E	1148,49	+	43	Nukleus	Transport
168	LPEELARMY	Pyruvate dehydrogenase [acetyl-transferring]-phosphatase 1, mitochondrial	PDP1	41	A01	14	E	1137,49*	+	39	Mitochondrion	Zellkommunikation und Signaltransduktion;
169	LPKKFIATI	Major facilitator superfamily domain-containing protein 12	MFSD12	84	B51	12	E	1030,59	+	38	Membran	Transport
170	FYLEGGFSKF	Dual specificity protein phosphatase 6	DUSP6	84	B51	15	E	1194,55	+	49	Cytoplasma	Zellkommunikation und Signaltransduktion;
171	LPSEIEVKY	Anaphase-promoting complex subunit 7	ANAPC7	41	B35	12	E	1077,56	+	47	Cytoplasma	Zellkommunikation und Signaltransduktion;
172	LPYTGAETRI	Lysyl oxidase homolog 3	LOXL3	84	B51	10	E	1120,52	+	49	Extrazellulär	Metabolismus
173	LTDDGNKWLY	proteasome 26S subunit, non-ATPase, 2	PSMD2	41	A01	13	M E	1224,61 1224,58	+	26 33	Cytoplasma	Proteinmetabolismus und Translation
174	LTDITKGVQY	Elongation factor 2	EEF2	41	A01	11	E	1137,58	+	28	Cytoplasma, Nukleus	Proteinmetabolismus und Translation
175	LTDYDIRFY	Casein kinase II subunit alpha	CSNK2A1	41	A01	15	E	1205,50	+	49	Nukleus	Zellkommunikation und Signaltransduktion;
176	LTEVDNYHFY	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2	NFE2L2	41	A01	13	E	1300,58	+	39	Nukleus, Cytoplasma	Regulation von Transkription
177	LTGPVMPVR [181]	60S ribosomal protein L13	RPL13	41	A11	11	E	969,53	+	57	Cytoplasma	Proteinmetabolismus und Translation
178	LVIPFTIKK	Filamin-A	FLNA	41	A11	15	E	1058,62	+	48	Cytoplasma, Nukleus, Membran	Zellwachstum und/oder Zellversorgung

#	Peptidsequenz	Quellprotein	Gensymbol	ChaMel	HLA	µHPLC Fraktion	MS <sup>a</sup>	Masse [M+H] <sup>+</sup>	Sequit	Mascotwert	Zelluläre Lokalisation	Biologische Funktion
179	LYADVGGKQF	Translocon-associated protein subunit delta	SSR4	84	A24	10	E	1097,48	+	62	Endoplasmatisches Retikulum	Transport
180	LYANMFERL	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4	FKBP4	84	A24	15	E	1156,55	+	58	Nukleus, Cytoplasma	Metabolismus
181	LYTEKFEEF	Alpha-taxilin	TXLNA	84	A24	12	E	1205,47	+	21	Cytoplasma	Zellkommunikation und Signaltransduktion;
182	LYWSHPRKF	40S ribosomal protein S29	RPS29	84	A24	11	E	1233,58	+	38	Cytoplasma	Proteinmetabolismus und Translation
183	MMYSGELKF	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	IMPDH2	100	Cw3	15	E	1121,33*	+	41	Cytoplasma	Metabolismus
184	MPILISKI	Beta-2-syntrophin	SNTB2	84	B51	14	E	914,56	+	42	Cytoplasma	Zellkommunikation und Signaltransduktion;
185	MPVGPDAILRY	Large proline-rich protein BAG6	BAG6	41	B35	15	E	1231,56	+	64	Nukleus	Apoptosis
186	NLKLKLSHF [123]	retinoblastoma binding protein 4	RBBP4	41	?	17	M	1099,67	+	37	Nukleus	Regulation von Transkription
187	NTDSPLRY [118]	Ribosomal protein SA	RPSA	41	A01	10	M E	965,56 965,37	+	19 27	Cytoplasma, Nukleus	Zellkommunikation und Signaltransduktion;
188	NTEEEGLKY [182]	Bcl-2-associated transcription factor 1	BCLAF1	41	A01	9	E	1082,39	+	47	Nukleus	Regulation von Transkription
189	NVADVVIKF	Ribophorin II	RPN2	41	B35	15	E	1004,51	+	47	Endoplasmatisches Retikulum	Proteinmetabolismus und Translation
190	NVIRDAVTY [193, 194]	histone H4	HIST2H4A	41	B35	11	M E	1050,55 1050,53	+	18 44	Nukleus	DNA-Bindung
191	NYARGHYTI	Tubulin alpha-1A chain	TUBA1A	84	A24	9	E	1094,46	+	29	Cytoplasma	Zellwachstum und/oder Zellversorgung
192	NYIDKVR	Vimentin	VIM	41	A11	8	M E	907,42 907,41	+	16 25	Extrazellulär, Membran, Golgi-Apparat,	Zellwachstum und/oder Zellversorgung
193	NYIDKVRFL			41	B35	15	E	1054,50	+	24		
194	NYIDKVRFL			84	A24	13	M	1167,68	+	35	Endoplasmatisches Retikulum, Nukleus	
	NYIDKVRFL [133, 181]			41	Cw4	15	M E	1167,70 1167,58	+	28 47		

#	Peptidsequenz	Quellprotein	Gensymbol	ChaMel	HLA	µHPLC Fraktion	MS <sup>a</sup>	Masse [M+H] <sup>+</sup>	Sequit	Mascotwert	Zelluläre Lokalisation	Biologische Funktion
				84	A24, Cw4	13	M E	1167,71 1167,57	+ +	35 46		
195	PFAFIHKI	Lysine-specific demethylase 5B	JARID1B	84	A24	15	E	972,54	+	46	Nukleus	Regulation von Transkription
196	PFVDHVFTF	Ribosome biogenesis protein	BRX1	84	A24	15	E	1107,51	+	38	Lysosom	Transport
197	PVSIIQKY	Isoleucine--tRNA ligase, cytoplasmic	IARS	41	B35	15	E	947,49	+	52	Cytoplasma, Mitochondrion	Proteinmetabolismus und Translation
198	PYMAKFVVF	Ankyrin-3	ANK3	84	A24	15	E	1101,58	+	40	Cytoplasma, Golgi-Apparat	Zellwachstum und/oder Zellversorgung
199	PYRLIFEKF	DNA-dependent protein kinase	PRKDC	84	A24	15	E	1212,63	+	39	Nukleus, Cytoplasma, microsome	Zellkommunikation und Signaltransduktion
200	PYSGSTI	Plectin	PLEC	84	A24; B51	7	E	724,30	+	34	Cytoplasma	Zellwachstum und/oder Zellversorgung
201	RASHPIVQK	Midasin homolog	MDN1	100	A11	6	M	1035,54	+	45	Nukleus	Proteinmetabolismus und Translation
202	RFEEAHFTF	Protein inhibitor of activated STAT3	PIAS3	84	A24	13	M E	1183,64 1183,50	+ +	20 46	Nukleus, Cytoplasma	Regulation von Transkription
203	RFEEKHAYF	Crn, crooked neck-like 1 protein	CRNKL1	84	A24	10	M	1226,61	+	32	Nukleus, Cytoplasma	RNA-Prozessierung
204	RFLEQQNKI	Vimentin	VIM	84	A24	9	M	1175,72	+	36	Extrazellulär, Membran, Golgi-Apparat, Endoplasmatisches Retikulum, Nukleus	Zellwachstum und/oder Zellversorgung
205	RFLPHGQLLF	Protein C20orf29	C20orf29	84	A24	15	E	1227,65	+	51	Nukleus	DNA-Bindung
206	RFYDRRFLK	NADH dehydrogenase	NDUFB5	100	A11	12	M	1300,75	+	14	Mitochondrion	Metabolismus
207	RIFAPNHVAK [67, 195]	Ribosomal protein L18a	RPL18A	100	A11	10	M	1251,69	+	36	Cytoplasma, Nukleus	Proteinmetabolismus und Translation
208	RIFDLGRKK	Ribosomal protein L10	RPL10	100	A11	11	M	1132,71	+	26	Cytoplasma, Endoplasmatisches Retikulum, Nukleus	Proteinmetabolismus und Translation
				84	A11	9	E	1132,61	+	40		

#	Peptidsequenz	Quellprotein	Gensymbol	ChaMel	HLA	µHPLC Fraktion	MS <sup>a</sup>	Masse [M+H] <sup>+</sup>	Sequit	Mascotwert	Zelluläre Lokalisation	Biologische Funktion
209	RILFFNTPK [181]	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8	PSMD8	100	A11	15	E	1135,48	+	41	Cytoplasma	Proteinmetabolismus und Translation
210	RIQEHFNKK	DEAD (Asp-Glu-Ala-As) box polypeptide 19	DDX19B	84	A11	5	M	1199,71	+	24	Nukleus, Endoplasmatisches Retikulum	Unbekannt
				100	A11	8	M	1199,65	+	22		
211	RISLPLPNF	Vimentin	VIM	84	A24	15	M	1056,51	+	33	Extrazellulär, Membran, Golgi-Apparat, Endoplasmatisches Retikulum, Nukleus	Zellwachstum und/oder Zellversorgung
212	RLFGTTVTF	lysosomal H <sup>+</sup> transporting ATPase	ATP6AP1	100	B35	15	M	1041,56	+	35	Endoplasmatisches Retikulum	Transport
213	RLFVGSIPK [181]	NS1 associated protein 1	SYNCRIP	41	A11	12	M	1016,51	-	-	Cytoplasma, Nukleus, Endoplasmatisches Retikulum	RNA-Prozessierung
				84	A11	11	M	1016,65	+	38		
				100	A11	13	M	1016,55	+	37		
214	RLLGTEFQV	Membran-associated transporter protein	SLC45A2	105	A02	12	E	1062,53	+	54	Membran	Transport
215	RSDTPLIYK	Isoleucine--tRNA ligase, cytoplasmic	IARS	84	A11	8	E	1092,53	+	31	Cytoplasma, Mitochondrion	Proteinmetabolismus und Translation
216	RSGQVLEV	lysosomal H <sup>+</sup> transporting ATPase	ATP6V1B1	84	?	8	M	887,55	+	44	Lysosom, Membran, Cytoplasma, Golgi-Apparat, Endosome, Endoplasmatisches Retikulum	Transport
217	RSNEHIREL	Annexin A11	ANXA11	84	?	7	E	1153,52	+	34	Cytoplasma, Nukleus	Zellkommunikation und Signaltransduktion
218	RTDYGQVFTY	Myosin 10	MYO10	41	A01	13	M	1249,70	+	34	Cytoplasma, Membran	Zellwachstum und/oder Zellversorgung
							E	1249,58	+	37		
219	RTIAPIIGR	CDC5-like protein	CDC5L	41	A11	11	M	996,63	-	-	Nukleus, Cytoplasma	Zellzyklus
				100	A11	11	M	996,63	+	25		

#	Peptidsequenz	Quellprotein	Gensymbol	ChaMel	HLA	$\mu$ HPLC Fraktion	MS <sup>a</sup>	Masse [M+H] <sup>+</sup>	Sequit	Mascotwert	Zelluläre Lokalisation	Biologische Funktion
				105	A11	10	M E	996,66 996,56	+ +	34 40		
220	RTIATALEY	Biogenesis of lysosome-related organelles complex-1, subunit 1	BLOC1S1	100	A32	12	M	1037,55	+	34	Cytoplasma, melanosome	Organisation der Melanosomen
221	RTNWPNTGK	Rad50-interacting protein 1	RINT1	100	A11	8	M	1073,43	+	35	Endoplasmatisches Retikulum, Cytoplasma	Zellkommunikation und Signaltransduktion
222	RTQNVLGEK	40S ribosomal protein S3	RPS3	41	A11	7	E	1045,46	+	60	Cytoplasma	Proteinmetabolismus und Translation
223	RTSEIYVHR	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 24	DDX24	84,	A11	7	M	1160,65	+	59	Nukleus	Transport
				100	A11	9	M E	1160,64 1160,43	+ +	46 50		
224	RTSPHSFAF	Sialidase-4	NEU4	100	A32	13	E	1049,36	+	45	Lysosom	Proteinmetabolismus und Translation
225	RTYDGDGYKK	Diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase	NUDT3	84	A11	4	M	1202,69	+	61	Cytoplasma	Metabolismus
				100	A11	6	M	1202,59	-	-		
226	RTYDREGFKK	Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 4	NUDT4	41	A11	7	M	1299,57	-	-	Cytoplasma	Unbekannt
				84	A11	6	M	1299,68	+	31		
				100	A11	8	M	1299,57	+	35		
				105	A11	6	M	1299,61	+	27		
227	RVAPAHGLFLK	tRNA pseudouridine synthase-like 1	PUSL1	100	A11	13	E	1208,53	+	73	Mitochondrion, Cytoplasma	RNA-Prozessierung
228	RVFEGPYKEY	Semaphorin-4C	SEMA4C	100	B35	12	E	1287,43	+	50	Membran	Zellkommunikation und Signaltransduktion
229	RVFPDKGYSF	Nucleolysin TIA-1	TIA1	100	B35	13	E	1215,43	+	38	Cytoplasma	RNA-Prozessierung
230	RVFPEKGYSF	Nucleolysin TIAR	TIAL1	100	B35	13	E	1229,43	+	36	Nukleus	RNA-Prozessierung
231	RVQEAVESMVK [181]	family with sequence similarity 136, member A	FAM136A	41	A11	10	M	1275,72	+	42	Nukleus, Cytoplasma	Unbekannt
				84	A11	9	E	1275,58	+	61		
				100	A11	10	M E	1275,68 1292,44*, **	+ +	36 67		
232	RVTYPAKAK	Ribophorin II	RPN2	84	A11	4	M	1033,64	+	45	Endoplasmatisches Retikulum	Proteinmetabolismus und Translation

#	Peptidsequenz	Quellprotein	Gensymbol	ChaMel	HLA	$\mu$ HPLC Fraktion	MS <sup>a</sup>	Masse [M+H] <sup>+</sup>	Sequit	Mascotwert	Zelluläre Lokalisation	Biologische Funktion
233	RYFDPANGKF	Eukaryotic translation elongation factor 2	EEF2	84	A24	11	M E	1214,62 1214,51	+ +	39 43	Cytoplasma, Nukleus	Proteinmetabolismus und Translation
234	RYFDVGLHNF	Protein-cysteine N-palmitoyltransferase HHAT	HHAT	84	A24	13	E	1267,53	+	34	Endoplasmatisches Retikulum	Metabolismus
235	RYIANTVEL	Ribophorin II	RPN2	84	A24	10	M	1078,61	+	45	Endoplasmatisches Retikulum	Proteinmetabolismus und Translation
236	RYIDRIHIF	pre-mRNA-processing factor 8	PRP8	84	A24	13	M	1232,74	+	20	Nukleus, Cytoplasma	RNA-Prozessierung
237	RYIDRIHIFF			84	A24	15	M	1379,65	+	32		
238	RYLEKPMEI [191]	STAT3 protein	STAT3	84	A24	10	M E	1178,59 1178,54	+ +	40 31	Nukleus, Cytoplasma, Mitochondrion, Membran	Zellkommunikation und Signaltransduktion
239	RYLEQLHQL [191]			84	A24	11	M E	1199,65 1199,56	+ +	32 34		
240	RYLTVATVF			$\beta$ Tubulin	TUBB3	84	A24	13	M	1069,60		
241	RYPDRITLI	protein phosphatase 4 catalytic subunit	PPP4C	84	A24	12	M	1146,64	+	16	Nukleus, Cytoplasma	Zellkommunikation und Signaltransduktion
242	RYQQWMERF	elaC 2 protein	ELAC2	84	A24	13	M	1343,50	+	27	Nukleus	RNA-Prozessierung
243	RYSRKGFLF	Suppressor of Ty 5 homolog (S, cerevisiae)	SUPT5H	84	A24	13	M	1173,72	+	12	Nukleus	Regulation von Transkription
244	RYSVFFQSL	Proteasome 26S subunit 6	PSMD6	84	A24	15	M	1146,53	+	36	Cytoplasma	Proteinmetabolismus und Translation
245	SAAFPGASL [192]	DAZ-associated protein 2	DAZAP2	105	A02	11	E	820,37	+	48	Nukleus, Cytoplasma	Regulation von Transkription
246	SAGPPSLRK	Zinc finger protein 262	ZMYM4	84 41	A11 A11	6 7	M E	912,47 912,44	+ +	54 58	Nukleus	Regulation von Transkription
247	SAVDFIRTL	Serine/threonine-protein kinase 17A	STK17A	41	B35	15	E	1021,49	+	60	Nukleus	Zellkommunikation und Signaltransduktion
248	SAYGEPRKL [196, 197]	Melanoma-associated antigen 1	MAGE 1	41	C	9	M	1020,48	+	22	Cytoplasma, Nukleus	Unbekannt
249	SGKSTTTGHLIYK	Elongation factor 1-alpha 1	EEF1A1	84 41	A11 A11	11 13	E E	1392,65 1392,74	+ +	64 105	Cytoplasma, Nukleus	Proteinmetabolismus und Translation
250	SIFDGRVVAK [181, 198, 199]	TransMembran and Coiled-Coil Domains 1	TMCO1	41	A11	11	M E	1091,63 1091,60	+ +	34 45	Endoplasmatisches Retikulum, Golgi-	Unbekannt

#	Peptidsequenz	Quellprotein	Gensymbol	ChaMel	HLA	$\mu$ HPLC Fraktion	MS <sup>a</sup>	Masse [M+H] <sup>+</sup>	Sequit	Mascotwert	Zelluläre Lokalisation	Biologische Funktion	
				84	A11	9	M	1091,64	+	38	Apparat,		
				100	A11	11	E	1091,53	+	40			
				105	A11	8	M	1091,58	+	26			
251	SIFKQPVTK [181]	Methyl-CpG-binding domain protein 2	MBD2	84	A11	8	E	1047,54	+	43	Nukleus	DNA-Bindung	
				84	A11	8	E	1047,54	+	52			
				41	A11	10	E	1047,51	+	35			
				100	A11	10	E	1047,45	+	57			
				100	A11	10	E	1047,45	+	57			
252	SILPAIFQK	TransMembran protein 41B	TMEM41B	84	A11	14	M	1016,56	+	28	Membran	Unbekannt	
							E	1016,60	+	31			
253	SITSVFITK [182]	Transformation/transcription domain-associated protein	TRRAP	41	A11	13	E	995,56	+	37	Nukleus	DNA-Bindung	
254	SLAEILLKK [181]	Importin-8	IPO8	100	A11	15	E	1014,49	+	56	Nukleus	Transport	
255	SLGQDVVSV [198]	TSC22 domain family protein 3	TSC22D3	105	A02	12	E	945,53	+	49	Nukleus	Regulation von Transkription	
256	SLMHSFILK [181]	Dynein light chain roadblock-type 1	DYNLRB1	84	A11	13	E	1075,52	+	50	Cytoplasma	Transport	
				41	A11	15	E	1075,52	+	41			
				100	A11	13, 15	E	1075,43	+	46			
257	SLPLVDTHSK	Vimentin	VIM	41	A11	10	E	1096,48	+	54	Extrazellulär, Membran, Golgi-Apparat, Endoplasmatisches Retikulum, Nukleus	Zellwachstum und/oder Zellversorgung	
258	SLSEKTVLL [133]	CD59	CD59	105	A02	11	E	989,59	+	43	Membran	Immunantwort	
259	SQNPdmRFYHK [200]	G protein pathway suppressor 2	GPS2	41	A11	8	M	1204,66	-	-	Nukleus	Zellkommunikation und Signaltransduktion	
				84	A11	6	M	1204,59	+	-			
							E	1204,53	+	-			
				100	A11	8	M	1204,54	+	-			
				105	A11	7	M	1204,61	+	-			
260	SQNPmmRFYHK [200]			84	A11	6	M	1190,67	+	-			
				105	A11	7	M	1190,67	+	-			
261	SQNPmRFYHK [200]			41	A11	8	M	1176,60	-	-			
				84	A11	6	M	1176,55	+	18			
							E	1176,51	+	33			
				100	A11		M	1176,61	+	39			

#	Peptidsequenz	Quellprotein	Gensymbol	ChaMel	HLA	$\mu$ HPLC Fraktion	MS <sup>a</sup>	Masse [M+H] <sup>+</sup>	Sequit	Mascotwert	Zelluläre Lokalisation	Biologische Funktion
				105	A11	6	M	1176,62	+	27		
262	SSFGRGFFK	Liprin beta 1	PPFIBP1	41	A11	13	M	1032,55	+	32	Membran, Cytoplasma	Zellkommunikation und Signaltransduktion
							E	1032,52	+	52		
				84	A11	11	M	1032,51	-	-		
							E	1032,46	+	48		
263	SSLNHIVEK	Integrator complex subunit 3	INTS3	84	A11	7	E	1026,48	+	46	Nukleus	RNA-Prozessierung
				100	A11	9	E	1026,40	+	65		
264	SSLPTQLFK [181]	Insulin-like growth factor I	IGF1	100	A11	14	E	1022,57* *	+	49	Extrazellulär	Zellkommunikation und Signaltransduktion
265	SSLSLFFRK	Retinoblastoma-like 2 (p130)	RBL2	84	A11	14	M	1084,68	+	27	Cytoplasma, Nukleus	Regulation von Transkription
							E	1084,60	+	40		
266	SSLYIILKK <sup>#</sup>	Nuclear pore complex protein Nup205	NUP205	105	A11	12	E	1064,67	+	13	Nukleus	Transport
267	SSRGPLPVK	RNA-binding motif protein, X chromosome	RBMX	41	A11	8	E	940,47	+	38	Nukleus	Transkription
268	SSVPGVRL	Vimentin	VIM	41	B35	14	M	927,49	+	19	Extrazellulär, Membran, Golgi-Apparat, Endoplasmatisches Retikulum, Nukleus	Zellwachstum und/oder Zellversorgung
269	STDHIPLY	Glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1	GFPT1	41	A11	14	E	1058,48	+	46	Cytoplasma	Metabolismus
270	STELNHLGY	Mitochondrial Rho GTPase 2	RHOT2	41	A01	11	E	1033,48	+	46	Mitochondrion	Zellkommunikation und Signaltransduktion
271	STEPYSQK	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	EEF1A1	100	A11	6	M	1036,43	+	24	Cytoplasma, Nukleus	Proteinmetabolismus und Translation
272	STFRESFKK	Nuclear antigen Sp100	SP100	105	A11	7	M	1129,64	+	26	Nukleus, Cytoplasma	Regulation von Transkription
273	STFSEIFKK	Transketolase	TKT	84	A11	12	E	1086,51	+	50	Cytoplasma	Metabolismus
				41	A11	14	E	1086,51	+	39		
274	STFSGLAHKH	Zinc finger protein SNAI2	SNAI2	84	A11	7	E	1075,51	+	73	Nukleus	Regulation von Transkription

#	Peptidsequenz	Quellprotein	Gensymbol	ChaMel	HLA	µHPLC Fraktion	MS <sup>a</sup>	Masse [M+H] <sup>+</sup>	Sequit	Mascotwert	Zelluläre Lokalisation	Biologische Funktion
275	STGHVGFIFK	Syntenin-1	SDCBP	84	A11	12	E	1092,50	+	69	Nukleus, Membran	Cell communication ; Signal transduction
276	STIEYVIQR [189, 198]	Protein transport protein Sec23B	SEC23B	100	A11	12	E	1109,40	+	66	Endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat, Cytoplasma	Transport
				105	A11	10	E	1108,54	+	54		
				41	A11	11	E	1110,56*	+	66		
				84	A11	10	M E	1108,58 1108,52	+	33 59		
277	STIGPEGVHQQ [182]	Paralemmen-2	PALM2	41	A11	7	E	1152,49	+	45	Membran	Zellwachstum und/oder Zellversorgung
278	STMPHTSGMNR	Foxo1A	FOXO1	84	A11	6	M E	1218,60 1218,45	+	38 59	Nukleus, Cytoplasma	Regulation von Transkription
279	STNPFRRPQK	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 5	GNG5	41	A11	9	M	1074,58	-	-	Membran	Zellkommunikation und Signaltransduktion
				100	A11	9	M	1074,63	+	20		
280	STPFKPLALK	Mitochondrial fission factor	MFF	41	A11	13	E	1101,66	+	39	Membran, Mitochondrion	Unbekannt
281	STSQTFIYK	Lysine-specific histone demethylase 1A	KDM1A	84	A11	8	E	1074,48	+	44	Nukleus	Regulation von Transkription
282	STTTGHLIYK	Elongation factor 1-alpha 1	EEF1A1	41	A11	13	E	1120,59	+	61	Nukleus, Cytoplasma	Proteinmetabolismus und Translation
283	STVGAGAYAYK	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	AIFM1	100	A11	9	E	1087,37	+	47	Mitochondrion	Zellkommunikation und Signaltransduktion
284	STYPRPHEY	Cathepsin Z	CTSZ	100	A32	9	E	1149,36	+	44	Lysosom	Proteinmetabolismus und Translation
285	STYYGSFVTR	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H	EIF3H	41	A11	12	E	1180,56	+	30	Cytoplasma	Proteinmetabolismus und Translation
				100	A11	12	E	1180,38	+	46		
286	SVDKIVIQK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	HNRNPA1	100	A11	10	E	1030,44*	+	59	Nukleus	RNA-Prozessierung
287	SVEEISTLVQK [181]	Mitochondrial ribosomal protein L43	MRPL43	41	A11	12	E	1234,65*	+	-	Mitochondrion	Proteinmetabolismus und Translation
				84	A11	10	E	1232,58	+	68		
				100	A11	12	E	1232,47	+	68		
				105	A11	11	E	1232,67	+	74		

#	Peptidsequenz	Quellprotein	Gensymbol	ChaMel	HLA	µHPLC Fraktion	MS <sup>a</sup>	Masse [M+H] <sup>+</sup>	Sequit	Mascotwert	Zelluläre Lokalisation	Biologische Funktion
288	SVFQQGMKNK [182]	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	ATP1A1	84	A11	7	E	1166,51	+	54	Membran	Transport
				41	A11	9	E	1166,48	+	47		
289	SVFVATFLR	Stearoyl-CoA desaturase	SCD	84	A11	15	M	1039,57	+	24	Endoplasmatisches Retikulum, Nukleus, Mitochondrion	Metabolismus
290	SVILPILKK	SEC14 domain and spectrin repeat-containing protein 1	SESTD1	84	A11	12	E	1010,63	+	46	Membran	Zellwachstum und/oder Zellversorgung
				41	A11	14	E	1010,63	+	44		
291	SVINKVTEK	Serine/threonine-protein kinase RIO1	RIOK1	84	A11	7	E	1017,52	+	53	Cytoplasma	Unbekannt
292	SVLDYFSER	Mediator of RNA polymerase II Transkription, subunit 6	MED6	41	A11	14	M	1115,52	-	-	Nukleus	Transkription
				100	A11	14	M	1115,63	+	39		
293	SVLNLVIVKK	40S ribosomal protein S6	RPS6	41	A11	14	E	1112,63	+	41	Cytoplasma, Nukleus	Proteinmetabolismus und Translation
294	SVLQGLLKK	Zinc finger MIZ domain-containing protein 1	ZMIZ1	41	A11	14	E	985,57	+	42	Nukleus	Regulation von Transkription
295	SVNGKVLSK	Nodal Modulator 1	NOMO1	105	A11	5	M	931,57	+	59	Endoplasmatisches Retikulum	Zellkommunikation und Signaltransduktion
				100	A11	7	E	932,39**	+	39		
296	SVPEFPLSPPK [201]	Stathmin	STMN1	41	A11	14	E	1197,56	+	50	Cytoplasma	Zellkommunikation und Signaltransduktion
				100	A11	13, 14	E	1198,66	+	66		
297	SVQEYFVRK [182]	Topoisomerase II binding protein	TOPBP1	105	A11	10	M	1155,65	+	27	Nukleus	DNA-Replikation
298	SVQGIIIYR	ADP/ATP translocase 1	SLC25A4	41	A11	13	M	1048,64	+	32	Mitochondrion, Nukleus	Transport
				100	A11	13	M	1048,64	+	36		
299	SVSNVVITK	Epidermal growth factor receptor substrate 15	EPS15	41	A11	8	E	946,45	+	49	Membran	Zellkommunikation und Signaltransduktion
				100	A11	9	E	946,39	+	47		
300	SVSPVVHVR [182]	hn Ribonucleoprotein L-like	HNRPLL	41	A11	9	M	979,61	+	29	Nukleus	RNA-Prozessierung
							E	979,47	+	53		

#	Peptidsequenz	Quellprotein	Gensymbol	ChaMel	HLA	µHPLC Fraktion	MS <sup>a</sup>	Masse [M+H] <sup>+</sup>	Sequit	Mascotwert	Zelluläre Lokalisation	Biologische Funktion
				84	A11	7	M E	979,53 979,49	+ +	47 61		
				100	A11	9	M E	979,64 979,41	+ +	46 76		
				105	A11	9	M E	979,65 979,48	+ +	27 54		
301	SVVGLFLRH	Anaphase-promoting complex subunit 5	ANAPC5	84	?	14	E	1027,59	+	49	Nukleus	Zellkommunikation und Signaltransduktion
302	SVYSGIRHK	Inositol polyphosphate-5-phosphatase	INPP5A	105	A11	6	M	1046,52	+	22	Membran, Cytoplasma	Zellkommunikation und Signaltransduktion
303	SYIEHIFEI [181]	Phosphoprotein enriched in astrocytes 15	PEA15	84	A24	15	M E	1150,50 1150,55	+ +	68 41	Cytoplasma, Nukleus	Zellkommunikation und Signaltransduktion
304	SYISRTNQL	transcription factor ELYS	AHCTF1	84	A24	8	M	1081,57	+	37	Nukleus	Regulation von Transkription
305	SYLKEFIHI	Actin-related protein 10	ACTR10	84	A24	15	E	1149,63	+	45	Membran	Zellkommunikation und Signaltransduktion
306	SYMGHFDLL	Splicing factor 3B subunit 5	SF3B5	84	A24	14	E	1082,49	+	32	Nukleus	RNA-Prozessierung
307	TAGDGLIELRK	Prohibitin	PHB	100	A11	12	E	1172,47	+	62	Mitochondrion, Membran, Nukleus, Extrazellulär, Cytoplasma	Zellkommunikation und Signaltransduktion
308	TDLLDIRSEY	Annexin A11	ANXA11	41	A01	14	E	1224,53	+	52	Cytoplasma, Nukleus	Zellkommunikation und Signaltransduktion
309	TFDDIVHSF	Fatty acid synthase	FASN	41	A01	15	E	1080,43	+	40	Cytoplasma	Metabolismus
310	TIAPALVSK	Alpha-enolase	ENO1	100	A11	10	E	899,41	+	38	Cytoplasma	Metabolismus
311	TIFGKIIRK	Histidine triad nucleotide-binding protein 1	HINT1	84	A11	11	E	1075,62	+	50	Cytoplasma	Zellkommunikation und Signaltransduktion
				100	A11	13	E	1075,53	+	55		
312	TIQSGEQPYK	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 5	NDUFS5	41	A01	7	E	1150,47	+	49	Mitochondrion	Metabolismus
313	TLEEPKQASVTY	Syndecan-3	SDC3	41	A01	10	E	1365,55	+	37	Membran	Zellkommunikation und Signaltransduktion

#	Peptidsequenz	Quellprotein	Gensymbol	ChaMel	HLA	$\mu$ HPLC Fraktion	MS <sup>a</sup>	Masse [M+H] <sup>+</sup>	Sequit	Mascotwert	Zelluläre Lokalisation	Biologische Funktion
314	TLLEDGTFKV	NmrA-like family domain-containing protein 1	NMRAL1	105	A02	12	E	1122,60	+	48	Cytoplasma, Nukleus	Unbekannt
315	TLYEAVREV [182]	60S ribosomal protein L10a	RPL10A	105	A02	11	E	1079,57	+	54	Cytoplasma	Proteinmetabolismus und Translation
316	TPSRQPPLPHR	KH Domain containing, RNA binding, signal transduction associated 1	KHDRBS1	41	A11	9	M	1285,68	+	29	Nukleus, Cytoplasma	RNA-Prozessierung
317	TRIPKIQKL [202]	Heat shock 70	HSPA8	41	B35	8	M E	1096,76 1096,70	+	26 37	Cytoplasma, Nukleus	Proteinmetabolismus und Translation
318	TSALPIIQK [181]	Perilipin-2	PLIN2	84	A11	10	E	970,52	+	44	Endoplasmatisches Retikulum	Transport
				41	A11	11	E	970,57	+	58		
				100	A11	11	E	970,42	+	52		
				105	A11	10	E	970,59	+	54		
319	TSDHFETIMKY	Bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase	EPRS	41	A01	13	E	1371,62	+	50	Cytoplasma	Proteinmetabolismus und Translation
320	TSETPDYLLKY	RNA polymerase II elongation factor ELL	ELL	41	A01	14	E	1329,57	+	55	Nukleus	Regulation von Transkription
321	TSLDKFYRK	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 3	MAP2K3	84	A11	8	E	1157,54	+	44	Nukleus	Zellkommunikation und Signaltransduktion
				100	A11	10	E	1157,43	+	40		
322	TTDFPGNYSY	RNA Polymerase I	POLR1C	41	A01	12	E	1221,74	+	46	Nukleus	Transcription
323	TTDLFGRDLSY	hn ribonucleoprotein F	HNRPF	41	A01	14	M E	1287,71 1287,54	+	28 40	Nukleus, Cytoplasma	RNA-Prozessierung
324	TTGHLIYK	Elongation factor 1-alpha 1	EEF1A1	41	A11	13	E	932,51	+	41	Cytoplasma, Nukleus	Proteinmetabolismus und Translation
325	TTTGHLIYK			41	A11	13	E	1033,56	+	35		
326	TTVDIFHKK	MIT domain-containing protein 1	MITD1	41	A11	10	E	1088,49	+	37	Endosom	Unbekannt
				100	A11	11	E	1088,44	+	67		
327	TTYNYAVLK [182]	Neuronal Membran glycoprotein M6-b	GPM6B	84	A11	9	E	1072,49	+	38	Membran	Unbekannt
328	TVFEHTFHV	Glycine--tRNA ligase	GARS	100	B35	14	E	1117,56	+	35	Cytoplasma	Proteinmetabolismus und Translation
329	TVIHFNNPK	Transcription factor BTF3 homolog 4	BTF3L4	84	A11	9	E	1069,50	+	42	Unbekannt	Unbekannt
				41	A11	10	E	1069,47	+	30		

#	Peptidsequenz	Quellprotein	Gensymbol	ChaMel	HLA	$\mu$ HPLC Fraktion	MS <sup>a</sup>	Masse [M+H] <sup>+</sup>	Sequit	Mascotwert	Zelluläre Lokalisation	Biologische Funktion
330	TYDNVHQQF	Rho GTPase-activating protein 24	ARHGAP24	84	A24	8	E	1151,43	+	31	Membran	Zellkommunikation und Signaltransduktion
331	TYGEIFEKF [198]	NADH dehydrogenase 1 $\alpha$	NDUFC2	84	A24	14	M E	1133,63 1133,53	+ +	36 55	Mitochondrion	Metabolismus
332	TYLEKAIKI	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7	USP7	84	A24	11	E	1078,57	+	36	Nukleus	Proteinmetabolismus und Translation
333	TYQRWQFTL	pre-mRNA- processing factor 8	PRP8	84	A24	14	M	1242,61	+	20	Nukleus, Cytoplasma	RNA-Prozessierung
334	VFDPVPVGV	ATP-dependent RNA helicase A	DHX9	41	B35?	14	E	928,45	+	58	Nukleus	Regulation von Transkription
335	VLDPYLLKY	28S ribosomal protein S17	MRPS17	41	B35	16	E	1123,54	+	47	Mitochondrion	Proteinmetabolismus und Translation
336	VLIDYQRNV [133]	Exportin-1	XPO1	105	A02	11	E	1119,55	+	63	Nukleus	Transport
337	VLPKLYVKL	40S ribosomal protein S26	RPS26	84	B51	14	E	1072,70	+	41	Cytoplasma	Proteinmetabolismus und Translation
338	VMAPRLLLL [181]	HLA class I histocompatibility antigen, A-3, 11 alpha chain	HLA-A	84	B51	14	E	1013,60	+	35	Membran	Immunantwort
339	VPDSSGPERIL	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRNPK	41	B35	11	E	1169,59	+	43	Nukleus	Proteinmetabolismus und Translation
340	VPEEGGATHVY	A-kinase-interacting protein 1	AKIP1	41	B35	9	E	1158,43	+	33	Nukleus	Unbekannt
341	VPYLVGQVV	Uroporphyrinogen decarboxylase	UROD	84	B51	13	M E	973,61 973,49	+ +	54 46	Cytoplasma	Metabolismus
342	VQPSKYHFL	melanoma-associated antigen F1	MAGE-F1	84	?	11	E	1118,52	+	25	Unbekannt	Unbekannt
343	VSMLNVYLK	Cytochrome c oxidase subunit 6A1, mitochondrial	COX6A1	100	A11	15	E	1082,41*	+	57	Mitochondrion	Metabolismus
344	VTDISDLIRDSY	TBC1 domain family member 8	TBC1D8	41	A01	15	E	1396,59	+	44	Membran	Unbekannt
345	VVDAHVREK	ADP-ribosylation factor domain protein 1	ARFD1	100	A11	6	M	1052,58	+	38	Golgi-Apparat, Lysosom, Cytoplasma	Zellkommunikation und Signaltransduktion

#	Peptidsequenz	Quellprotein	Gensymbol	ChaMel	HLA	µHPLC Fraktion	MS <sup>a</sup>	Masse [M+H] <sup>+</sup>	Sequit	Mascotwert	Zelluläre Lokalisation	Biologische Funktion
346	VVSEKQFSK	60S ribosomal protein L22-like 1	RPL22L1	84	A11	6	E	1051,50	+	37	Cytoplasma	Proteinmetabolismus und Translation
347	VYGPLPQSF	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial	COX4I1	84	A24	12	E	1007,44	+	36	Mitochondrion	Metabolismus
348	VYIDRVRSL	Prelamin-A/C	LMNA	84	A24	10	E	1120,55	+	25	Nukleus	Zellwachstum und/oder Zellversorgung
349	VYIKHPVSL	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8	PSMD8	84	A24	10	E	1055,55	+	44	Cytoplasma	Proteinmetabolismus und Translation
350	VYISEHEHF [181]	Cleft lip and palate associated transMembran protein 1	CLPTM1	84	A24	10	M E	1160,56 1160,46	+ +	62 37	Membran	Unbekannt
351	VYLDKFIRL	Guanine nucleotide binding protein-like 3	GNL3L	84	A24	15	M E	1166,69 1166,65	+ +	54 58	Nukleus	RNA-Prozessierung
352	VYMDWYEKF	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	SNRNP200	84	A24	15	E	1280,53	+	47	Nukleus	Proteinmetabolismus und Translation
353	VYNSEYYHF	Inactive tyrosine-protein kinase 7	PTK7	84	A24	11	E	1221,44	+	43	Membran	Zellkommunikation und Signaltransduktion
354	YAQDEHLITF	snRNP200 protein	SNRNP200	41	B35	14	E	1237,50* *	+	29	Nukleus	Proteinmetabolismus und Translation
355	YASSPGGVY	Vimentin	VIM	41	B35	9	E	900,32	+	25	Nukleus, Extrazellulär, Membran, Golgi-Apparat, Endoplasmatisches Retikulum	Zellwachstum und/oder Zellversorgung
356	YFDEPVEL	ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 3	ARFGAP3	41	B35	14	E	1011,40	+	40	Cytoplasma	Proteinmetabolismus und Translation
357	YIDEQFERY [181]	Septin 2	SEPT 2	41	A01	12	M E	1262,63 1263,54	+ +	27 58	Cytoplasma, Membran, Nukleus	Zellzyklus

#	Peptidsequenz	Quellprotein	Gensymbol	ChaMel	HLA	µHPLC Fraktion	MS <sup>a</sup>	Masse [M+H] <sup>+</sup>	Sequit	Mascotwert	Zelluläre Lokalisation	Biologische Funktion
358	YIDKVRFL	Vimentin	VIM	84	A24, Cw4	12	E	1053,53	+	29	Nukleus, Extrazellulär, Membran, Golgi-Apparat, Endoplasmatisches Retikulum	Zellwachstum und/oder Zellversorgung
				41	Cw4	14	E	1053,54	+	40		
359	YLDDPDLKY	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1	DNMT1	41	A01	12	E	1141,55	+	54	Nukleus	Regulation von Transkription
360	YLDIPNPRY	citron rho-interacting, serine/threonine kinase 21	CIT	41	A01	13	M E	1150,66 1150,57	+	25 36	Cytoplasma	Zellkommunikation und Signaltransduktion
361	YLLEKSRV [133]	Myosin	MYH10	105	A02	9	M E	1078,66 1078,55	+	24 39	Cytoplasma	Zellwachstum und/oder Zellversorgung
362	YPFKPPKV	Ubiquitin-conjugating enzyme E2E 3	UBE2E3	84	B51	11	M E	975,53 975,49	+	33 33	Nukleus	Proteinmetabolismus und Translation
363	YPFKPPKVA	Ubiquitin-conjugating enzyme E2	UBE2D2	41	B35	15	E	1193,58	+	40	Cytoplasma	Proteinmetabolismus und Translation
364	YPFKPPKVTF	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 E1	UBE2E1	41	B35	15	E	1223,60	+	43	Nukleus	Proteinmetabolismus und Translation
365	YPSETTVKY	Laminin subunit gamma-1	LAMC1	41	B35	10	E	1087,42	+	36	Extrazellulär	Zellwachstum und/oder Zellversorgung
366	YSDFPFHEDY	Dimethylaniline monooxygenase [N-oxide-forming] 4	FMO4	41	A01	14	E	1319,44	+	33	Endoplasmatisches Retikulum	Metabolismus
367	YSDHPSGGSY	RNA-binding motif protein, X chromosome	RBMX	41	A01	7	E	1069,33	+	44	Nukleus	Transkription
368	YSDKYGLGY	Serine/threonine-protein kinase PLK1	PLK1	41	A01	11	E	1065,48	+	37	Nukleus	Zellkommunikation und Signaltransduktion
369	YTDFDGTRVY	Serine/threonine-protein kinase pim-1	PIM1	41	A01	12	E	1236,55	+	49	Membran	Zellkommunikation und Signaltransduktion
370	YTDKIDRY [181]	Tetraspanin 4	TSPAN4	41	A01	9	M	1073,55	+	36	Membran	Unbekannt
371	YTDVSTRY	Thioredoxin domain containing 14	TXNDC14	41	A01	8	M	1004,47	+	21	Membran	Unbekannt

#	Peptidsequenz	Quellprotein	Gensymbol	ChaMel	HLA	µHPLC Fraktion	MS <sup>a</sup>	Masse [M+H] <sup>+</sup>	Sequit	Mascotwert	Zelluläre Lokalisation	Biologische Funktion
372	YYEHVKARF	Melanophilin	MLPH	84	A24	9	M E	1212,63 1212,54	+ +	45 53	Endosom	Transport
373	YYFEGIKQTF	Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1	AHSA1	84	A24	13	E	1295,54	+	33	Cytoplasma	Proteinmetabolismus und Translation
374	YYIDCIRQV	Fatty acid synthase	FASN	41	B35	14	M	1172,57	+	30	Cytoplasma	Metabolismus
375	YYLNDLERI	Guanine nucleotide-binding protein G(z) subunit alpha	GNAZ	84	A24	13	E	1198,52	+	58	Membran	Zellkommunikation und Signaltransduktion

<sup>a</sup>- verwendete Abkürzung für die Massenspektrometer

<sup>b</sup>- Peptid wurde durch die Anwendung eines ESI-Massenspektrometers identifiziert

<sup>c</sup>- Peptid wurde durch die Anwendung eines MALDI-Massenspektrometers identifiziert

\* - Peptidmasse mit der oxidierten AS Methionin in der Sequenz

\*\* - Peptidmasse mit der hydrolysierten AS Glutamin oder Asparagin in der Sequenz (Q→E oder N→D Konversion)

### 10.5 Anhang V. Quellproteine mit mehreren identifizierten HLA Liganden

Peptidsequenz	Protein	HLA-Typ	Zelllinie, ChaMel
APEEHPVLL	Actin beta	B35	41
FAGDDAPRA		A02	105
ETDLLDIRSEY	Annexin A11	A02	41
RSNEHIREL		-	84
TDLLDIRSEY		A01	41
ATALEYVYK	Biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 subunit 1	A11	100
RTIATALEY		A32	100
ATAGIIGVNR	Clathrin heavy chain 1	A11	41,84,100
ATAGIIGVNRK		A11	84,105
EYLTKVDKL		A24	84
KYMDVVKERI	ATP-dependent RNA helicase DDX24	A24	84
RTSEIYVHR		A11	100, 84
KSTTTGHLYK	Elongation factor 1-alpha 1	A11	41
SGKSTTTGHLYK		A11	41, 84
STEPPYSQK		A11	100
STTTGHLYK		A11	41
TTGHLYK		A11	41
TTTGHLYK		A11	41
ILTDITKGV		Elongation factor 2	A02
LTDITKGVQY	A01		41
RYFDPANGKF	A24		84
FTDVNSILRY	glutamyl-prolyl-tRNA synthetase	A01	41
TSDHFETIMKY		A01	41
AASVPVVY	Fatty acid synthase	B35	41
YYIDCIRQV		B35	41
TFDDIVHSF		A01	41
ATPTSPIRVK	Filamin-A	A11	84
LVIPFTIKK		A11	41
KVFGGTVHK	guanine monphosphate synthetase	A11	84, 41
KVFGGTVHKK		GMPS	105
SQNPmmRFYHK	G protein pathway suppressor 2	A11	41, 84, 100, 105
SQNPdmRFYHK		A11	105, 84
SQNPmRFYHK		A11	41, 84, 100, 105
ASDFITKMDY	Gelsolin	A01	41
DAYVILKTV		B51	84
DALRLYLI	isoleucine-tRNA synthetase	B51	84
GTIKDIVTR		A11	84, 41, 100
PVSIIQKY		B35	41
RSDTPLIYK		A11	84

Peptidsequenz	Protein	HLA-Typ	Zelllinie, ChaMel
KVFDKPSAK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like	A11	100
SVSPVVHVR		A11	41, 100, 105, 84
FAFIHKI	Histone demethylase JARID1B	B51	84
PFAFIHKI		A24	84
DPFAFIHKI		B51	84
DALKEKVI	S-adenosylmethionine synthase isoform type-2	B51	84
KYLDEDTIYHL		A24	84
KTYGEIFEK	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 subunit C2	A11	41, 84, 100, 105
TYGEIFEKF		A24	84
KYTPPPHHI	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 5	A24	84
TIQSGEQPYK		A11	41
ALLDRIVSV	Nuclear pore complex protein Nup205	A02	105
LLIGHLERV		A02	105
SSLYIILKK		A11	105
ATAGDGLIELRK	Prohibitin	A11	41, 100, 84, 105
DGLIELRK		A11	100
TAGDGLIELRK		A11	100
DPYSGSTI	Plectin	B51	84
PYSGSTI		A24, B51	84
AVQEFGGLAR	PRELI domain containing protein	A11	100, 41
AVQEFGGLARFK		A11	41, 84, 100, 105
ATDPNILGR	DNA -dependent protein kinase	A11	84
AYMPHTFFI		A24	84
RYIDRIHIF	PRP8 pre-mRNA processing factor	A24	84
RYIDRIHIF		A24	84
TYQRWQFTL		A24	84
SSRGPLPVK	RNA binding motif protein, X-linked-like-1	A11	41
YSDHPSGGSY		A01	41
AKIRIFDL	60S ribosomal protein L10	B08	84
DAKIRIFDL		B08	84
RIFDLGRKK		A11	100, 84
ASDKETYELRY	60S ribosomal protein L22-like 1	A01	41
VVSEKQFSK		A11	84
NVADVVIKF	Ribophorin II	B35	41
RVTYPAKAK		A11	84
RYIANTVEL		A24	84
AIAQAESLRYK	40S ribosomal protein S3	A11	84
RTQNVLGEK		A11	41
RILFFNTPK	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8	A11	100
VYIKHPVSL		A24	84
ATFSSSHRY	Protein transport protein	A32	100

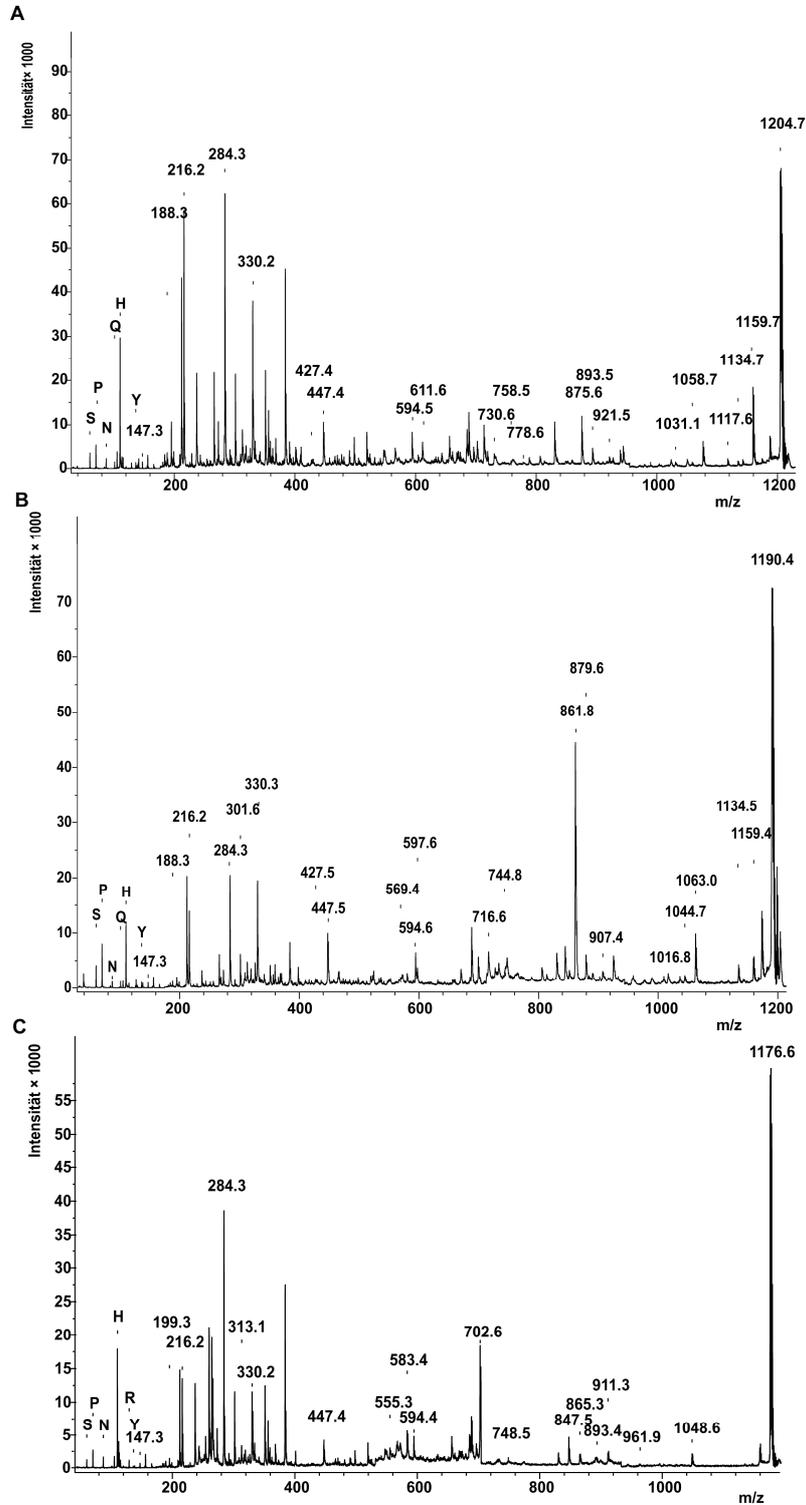
Peptidsequenz	Protein	HLA-Typ	Zelllinie, ChaMel	
ATFSSSHRYHK	Sec31A	A11	105, 41	
GTATLRLVK	melanocyte protein Pmel17	A11	100	
HTMoxEVTVYH		?	100	
VYMDWYEKF	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa	A24	84	
YAQDEHLTF		B35	41	
RYLEKPMEI	signal transducer and activator of transcription 3	A24	84	
RYLEQLHQL		A24	84	
ASFDKAKLK	Thymosin beta-10	A11	41, 84, 100, 105	
ASFDKAKLKK		A11	84, 41	
AYSSFRSV	Torsin A Interacting Protein 1	A24	84	
DAYSSFRSV		B51	84	
EYPDRIMNTF	Tubulin, beta	A24	84	
RYLTVATVF		A24	84	
KLLEGEESRISL		A02	105	
NYIDKVR	Vimentin	A11	41	
NYIDKVRF		Cw4	41	
NYIDKVRFL		Cw4, A24	41, 84	
RFLEQQNKI		A24	84	
RISLPLPNF		A24	84	
SLPLVDTHSK		A11	41	
SSVPGVRLL		B35	41	
YASSPGGVY		B35	41	
YIDKVRFL		Cw4, A24	84, 41	
ASAGPPSLRK		zinc finger protein 262	A11	105
SAGPPSLRK			A11	84

### 10.6 Anhang VI. Die in PSD-Spektren natürlicher GPS2-Peptide detektierten sequenzspezifischen Fragmentmassen.

Fragmente	Dimethyliertes GPS2				Monomethyliertes GPS2			Nichtmethyliertes GPS2-
	m/z	-45 m/z <sup>1</sup>	-70 m/z <sup>2</sup>	-87 m/z <sup>3</sup>	m/z	-31 m/z <sup>4</sup>	-56 m/z <sup>5</sup>	
b <sub>2</sub> -17	199.3				199.4			199.3
b <sub>2</sub>	216.2				216.2			216.2
b <sub>3</sub> -17	313.1				313.1			313.2
b <sub>3</sub>	330.2				330.3			330.3
b <sub>4</sub>	427.4				427.4			
b <sub>5</sub>	611.5	566.3			597.3			583.6
b <sub>5</sub> -17	594.4	549.5	524.5		580.7	549.5		566.5
b <sub>6</sub>							688.5	
b <sub>6</sub> -18							670.5	
b <sub>7</sub>	921.4							893.4
b <sub>8</sub> +18								1048.9
b <sub>8</sub>	1058.7				1045.0			
y <sub>1</sub>	147.3				147.3			147.2
y <sub>2</sub>	284.3				284.3			284.3
y <sub>3</sub>	447.5				447.6			447.5
y <sub>4</sub>	594.4							
y <sub>6</sub>	875.6	830.7						847.7
y <sub>7</sub>		927.4						
y <sub>8</sub>	1117.7							
a <sub>2</sub>					188.3			188.3
a <sub>6</sub> -17	713.5							685.5
a <sub>6</sub>	730.5	685.5						702.7
a <sub>7</sub>					879.7		823.5	865.5
QN	243.3				243.3			243.2
NP	212.2				212.2			212.3
PR		237.2	212.2	195.3		237.4		254.3
NPR		351.4	326.2	309.8		351.5		368.2
PRF		384.3	359.4			384.3		
NPRF		498.5	473.5					
PRFY		547.3	522.5	505.5				
QNPRFY						789.6		

<sup>1</sup> Masse von Dimethylamin, <sup>2</sup> Masse von Dimethylcarbodiimid, <sup>3</sup> Masse von Dimethylguanidin, <sup>4</sup> Masse von Methylamin, <sup>5</sup> Masse von Monomethylcarbodiimid

### 10.7 Anhang VII. PSD-Spektren synthetischer GPS2-Peptide. Spektrum von dimethyliertem (A), monomethyliertem (B) und nicht modifiziertem Peptid (C).



**10.8 Anhang VIII. Histon-4-spezifische T-Zellen.**

Sequenz	Protein	HLA	Spots forming units/10 <sup>6</sup> T-Zellen
ARGPIQIL	DNA-directed RNA polymerase II 140 kDa polypeptide	B35	<b>750</b>
DTDHYFLRY	CGI-06 protein	A01	<b>550</b>
ETDLLDIRSEY	annexin A11	A01	<b>650</b>
FPKVRILRL	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 5	B35	<b>500</b>
FTDEESRVF	BCLAF1 protein	A01	200
FTDEESRVFL	Bcl-2-associated transcription factor	A01	400
FTDVNSILRY	glutamyl-prolyl tRNA synthetase	A01	<b>500</b>
GRAPQVLVL	RNA helicase Gu, DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 21	B35	450
KALRLSASALF	Neurosecretory protein VGF	B57	<b>1250</b>
LTDDGNKWLY	Proteasome 26S non-ATPase subunit 2	A01	<b>550</b>
NLKLKLSHF	Retinoblastoma binding protein 4	B57	<b>850</b>
NTDSPLRY	Ribosomal protein SA ,laminin-binding	A01	450
NVIRDAVTY	histone H4	B35	<b>5000</b>
NYIDKVRFL	Vimentin	A24, Cw4	350
RLFGTTVTF	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal accessory protein 1	B35	<b>750</b>
RTDYGQVFTY	Myosin-10 (Myosin X)	A01	150
SSVPGVRL	Vimentin	B35	<b>650</b>
TRIPKIQKL	Heat shock 70kDa protein 8, isoform 1	B35	<b>600</b>
TTDLFGRDLSY	HNRPF	A01	<b>550</b>
YIDEQFERY	Septin 2	A01	<b>500</b>
YLDIPNPRY	rho/rac-interacting citron kinase	A01	<b>500</b>
YTDKIDRY	tetraspanin 4 isoform	A01	0
YTDVSTRY	My009 protein	A01	450
Hintergrund			250



### 10.9 Anhang IX. Tumorrelevanz identifizierter Quellproteine

Sequenz	Protein	Gensymbol	Funktion (HPRD Datenbank)	Tumorrelevante Funktion
ALMGYATHK	Interferon alpha-inducible protein 6	IFI6	Immunantwort	Apoptoseregulation [203]
ATAGDGLIELRK	Prohibitin	PHB	Zellkommunikation und Signaltransduktion	Zellproliferation, Tumorigenese [204]
ATNYITRHK	Pescadillo homolog 1	PES1	Zellkommunikation und Signaltransduktion	Zellproliferation, Tumorigenese [205]
AVLYFLYKK	Cell surface glycoprotein MUC18	MCAM	Zellkommunikation und Signaltransduktion	Tumorinvasion, Metastasierung [206]
DAAEIRLV	Nucleolin	NCL	Transport	Tumorigenese und Angiogenese [207]
FTDEESRVF, FTDEESRVFL	BCL2-associated transcription factor 1	BCLAF1	Regulation von Transkription	Apoptose [208]
GQYGNPLNK	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10	ADAM10	Proteinmetabolismus und Translation	Tumorprogression [209]
HTMEFALVK	Necdin	NDN	Zellzyklus	Tumorsuppression [210]
LTEVDNYHFY	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2	NFE2L2	Regulation von Transkription	Apoptoseregulation [211]
RFEEAHFTF	Protein inhibitor of activated STAT 3	PIAS3	Regulation von Transkription	Regulation von Proliferation [212]
RLLGTEFQV	Membran-assoziiertes Transporterprotein	SLC45A2	Transport	Immunantwort, melanomassoziiertes Antigen [139]

<b>Sequenz</b>	<b>Protein</b>	<b>Gensymbol</b>	<b>Funktion (HPRD Datenbank)</b>	<b>Tumorrelevante Funktion</b>
RTIAPIIGR	CDC5 cell division cycle 5-like	CDC5L	Zellzyklus	Regulation von Proliferation [213]
RTNWPNTGK	Rad50-interacting protein 1	RINT1	Zellkommunikation und Signaltransduktion	Tumorsuppression [214]
RYLEKPMEI, RYLEQLHQL	Signal transducer and activator of transcription 3	STAT3	Zellkommunikation und Signaltransduktion	Zellproliferation, Tumorprogression [215]
RYQQWMERF	elaC homolog 2	ELAC2	RNA-Prozessierung	Tumorsuppression [147]
SSLSLFFRK	Retinoblastoma-like 2 (p130)	RPL2	Regulation von Transkription	Tumorsuppression [216]
STFRESFKK	Nuclear antigen Sp100	SP100	Regulation von Transkription	Tumorsuppression [217]
STMPHTSGMNR	Forkhead box O1A	FOXO1	Regulation von Transkription	Tumorsuppression [148]
VQPSKYHFL	melanoma-associated antigen F1	MAGEF1	Unbekannt	Immunantwort, Melanomassoziiertes Antigen [218]
YLDIPNPRY	Citron (rho-interacting, serine/threonine kinase 21)	CIT	Zellkommunikation und Signaltransduktion	Regulation von Proliferation [219]

**10.10 Anhang X. Abkürzungsverzeichnis**

AC	Affinitätschromatographie
AS	Aminosäure
BCA	Bicinchoninsäure
Bidest.	Bi-distilliertes
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
CD	Diferenzierungscluster ( <i>Cluster of Diferentiation</i> )
CHAPS	(3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat)
Ci	Curie
CrR	Cr-Freisetzungssassay ( <i>Cr release assay</i> )
Da	Dalton
DFZ	Durchflusszytometrie
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
dm	dimethyl
D-MEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DRiPs	<i>defective ribosomal products</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAAP	<i>Endoplasmatic retikulum amino peptidase associated with antigen processing</i>
ESI	Electrospray-Ionisation
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FT-ICR	Fourier-Transform-Ionencyclotron-Resonanz
FTMS	Fourier-Transform-Massenspektrometer

---

HCCA	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure ( <i><math>\alpha</math>- cyano-4-hydroxycinnamic acid</i> )
HDAC	Histon Deacetylase
HLA	Humanes Leukozytenantigen ( <i>human leucocyte antigen</i> )
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ( <i>High performance liquid chromatography</i> )
IC	<i>Inhibitory concentration</i>
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
m/z	Masse- zu-Ladung-Verhältnis ( <i>mass-to-charge ratio</i> )
MACS	Magnetic-activated cell sorting
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation ( <i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization</i> )
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>Major histocompatibility complex</i> )
min	Minute
mm	monomethyl
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
mRNA	Boten Ribonukleinsäure ( <i>messenger ribonuclein acid</i> )
MS	Massenspektrometer
MS/MS	Tandem Massenspektrometrie
NCoR	<i>nuclear receptor corepressor complex</i>
NCS	Kälberserum von Neugeborenen ( <i>new born calf serum</i> )
NP-40	nonyl phenoxyethoxyethanol-40
OD	Optische Dichte ( <i>optical density</i> )
PAGE	Polyakrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	mononukleäre Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes ( <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
PBS	phosphate buffered saline

---

PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PHA	Phytohämagglutinin
PRMT	Protein Arginine methyltransferaseMethyltransferase
QIT	Quadrupol-Ionenfalle, engl. <i>quadrupol ion trap</i>
rhIL	Rekombinantes humanes Interleukin
s	Sekunde
SA	Sinapin Säure
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
<i>SLIPs</i>	<i>short lived proteins</i>
SVM	Support-Vektor-Maschinenalgorithmen
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor, (t cell receptor)
TIL	Tumorerfiltrierende Lymphozyten
TOF	<i>Time of flight</i>
TPPII	Tripeptidyl-Peptidase II
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
WB	Westernblot

**Internationale Abkürzungen der Aminosäuren**

Ala	A	Alanin
Arg	R	Arginin
Asn	N	Asparagin
Asp	D	Asparaginsäure
Cys	C	Cystein
Gln	Q	Glutamin
Glu	E	Glutaminsäure

Gly	G	Glycin
His	H	Histidin
Ile	I	Isoleucin
Leu	L	Leucin
Lys	K	Lysin
Met	M	Methionin
Phe	F	Phenylalanin
Pro	P	Prolin
Ser	S	Serin
Thr	T	Threonin
Trp	W	Tryptophan
Tyr	Y	Tyrosin
Val	V	Valin

**Internationale Abkürzungen der Nukleotide**

A	Adenosin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

## 10.11 Anhang XI. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Kristallstruktur des humanen MHC-Peptidkomplexes dargestellt als <i>Flat-Ribbon</i> -Modell. ....	2
Abbildung 2. Die Oberfläche der Bindungsgrube des HLA-A2-Moleküls. ....	3
Abbildung 3 Antigenprozessierung und -präsentation durch MHC-Klasse-I-Moleküle. ....	7
Abbildung 4 Kristallstruktur eines TCR/MHC-Peptidkomplexes. ....	10
Abbildung 5 Häufig für die Analyse von Proteinen und Peptiden verwendete MALDI-Matrixsubstanzen. ....	14
Abbildung 6. Fragmentnomenklatur. ....	17
Abbildung 7. Fragmentierung nach dem „charge directed“ Modell. ....	18
Abbildung 8. Struktur von MS/MS-Fragmenten [102]. ....	19
Abbildung 9. Identische Peptide in den HPLC-Fractionen der Melanomzelllinien. ....	50
Abbildung 10. Die Überlappung der HLA-Peptidome der vier Melanomzelllinien. ....	51
Abbildung 11. Die experimentelle Bestätigung der Peptidsequenz eines von der Zelllinie ChaMel 84 isolierten HLA-Liganden. ....	53
Abbildung 12. MS/MS-Spektrum eines einfach geladenen Ions mit $m/z=810,43$ zur Bestimmung der Peptidsequenz. ....	54
Abbildung 13. Überlappung der identifizierten HLA-Peptide von vier analysierten Melanomzelllinien. ....	55
Abbildung 14. Überlappung der HLA-A11-Peptidome der vier analysierten Melanomzelllinien. ....	57
Abbildung 15. Klassifizierung der Quellproteine der identifizierten HLA-Liganden. ....	58
Abbildung 16. Klassifizierung der 306 Quellproteine nach biologischen Funktionen. ....	59
Abbildung 17. Vergleichsanalyse der mRNA-Expression von Quellproteinen von HLA-Liganden mit genomweiten Transkriptomen von Melanomzellen. ....	61
Abbildung 18. Überexpression von Quellproteine von HLA-Liganden im Melanom. ....	62
Abbildung 19. Die Analyse der Quellproteine nach ihren Umsatzraten. ....	64
Abbildung 20. Die Peptidlängeverteilung (A) und Klassifizierung der identifizierten HLA-Liganden nach HLA-Bindungsmotiven (B). ....	65
Abbildung 21. Die Sequenzmotive, die für die Bindung an die hier untersuchten HLA. ....	67
Abbildung 22. Detektion von Histon-4-spezifischen T-Zellen in INF- $\gamma$ -Elispot-Assays. ....	76
Abbildung 23. EIISpot-Assay mit den Histone-4-Peptid NVIRTDAVTY und T-Zellen, die von gesunden Spendern isoliert worden waren. ....	76

---

Abbildung 24. INF- $\gamma$ -EliSpot-Analyse (A) und die $^{51}$ Chromfreisetzungssassay (B) mit den T-Zellen eines Melanompatienten. ....	77
Abbildung 25. MALDI-TOF-PSD-Spektrum vom dimethyliertem GPS2-Peptid. ....	79
Abbildung 26. MALDI-TOF-PSD-Spektrum von monomethyliertem GPS2 Peptid. Ein-.	81
Abbildung 27. MALDI-TOF-PSD-Spektrum des nicht modifizierten GPS2-Peptids.....	82
Abbildung 28. MALDI-TOF-MS-Spektrum zur Abschätzung der relativen Mengen an GPS2-Peptiden.....	86
Abbildung 29. Die Bindung der di-, mono- und nichtmethylierten GPS2-Peptide an HLA-A11.....	87
Abbildung 30. <i>Ex vivo</i> Elispot-Analyse der CD8 <sup>+</sup> T-Zell Antwort gegen die GPS2-Epitope. ....	88
Abbildung 31. <i>In vitro</i> Methylierung des GPS2.. ....	90
Abbildung 32. Untersuchung der Sequenzspezifität der Protein-Arginin-Methyltransferase für die Methylierung des GPS2 HLA-Epitops.....	91

**10.12 Anhang XII. Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1. Quellproteine mit mehreren identifizierten HLA Liganden..	55
Tabelle 2. Die in Melanomzellen überexprimierten Transkripte von den Quellproteinen identifizierter HLA-Liganden.	62
Tabelle 3. Die in den Melanomzelllinien ChaMel 84 und ChaMel 105 überexprimierten Transkripte von der Quellproteinen der HLA-Liganden.	63
Tabelle 4. <i>Ex vivo</i> ELISpot mit PBMCs von Melanompatienten und gesunden Spender	71
Tabelle 5. T-Zellreaktionen gegen die HLA-Liganden..	74
Tabelle 6. Die in PSD-Spektren von synthetischen Peptiden detektierten neutralen Abspaltungen von der Seitenkette von Arginin.	83
Tabelle 7. Die in den analysierten Zelllinien detektierten Formen der GPS-2-Peptide.....	85