

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung der Proteasomschnittspezifität für BCR-ABL-Fusionsregionspeptide

Die BCR-ABL-Fusionsregionspeptide ATGFKQSSK, GFKQSSKAL, KQSSKALQR und SSKALQRPV stellen die interessantesten Kandidatenantigene für eine gegen CML-gerichtete Immuntherapie dar. Ein solcher immuntherapeutischer Ansatz führt jedoch nur dann zum Erfolg, wenn diese Peptide durch proteasomale Degradation intrazellulär prozessiert und auf CML-Zellen endogen präsentiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die Schnittspezifität des 20S Proteasomkomplexes für die Erzeugung von BCR-ABL-Fusionsregionspeptiden untersucht. Hierfür wurde ein synthetisches 26mer Peptid hergestellt, das die gesamte Fusionsregion des BCR-ABL-Proteins der b3a2-Variante umspannt. Dieses wurde *in vitro* sowohl mit konstitutivem- (c20S) als auch mit Immunoproteasom (i20S) verdaut. Über eine quantitative Analyse der entstandenen Peptidfragmente wurde anschließend untersucht, ob das 20S Proteasom eine Schnittspezifität zur Prozessierung der oben beschriebenen BCR-ABL-Fusionsregionspeptide besitzt.

4.1.1 Ermittlung des Zeitoptimums für den proteasomalen Abbau

In jeweils getrennten Ansätzen wurde das BCR-ABL 26mer-Peptid *in vitro* mit konstitutivem- oder Immunoproteasom verdaut. Um eine Reprozessierung des eingesetzten Peptids ausschließen zu können, wurde die optimale Inkubationszeit von Proteasom mit Peptid ermittelt. Hierfür wurde der gleiche Versuchsansatz über verschiedene Zeitintervalle mit c20s oder i20S inkubiert und anschließend chromatographisch aufgetrennt. Das Zeitoptimum war erreicht, wenn zirka 50% der ursprünglich eingesetzten Peptidmenge verdaut vorlag (Abb. 9).

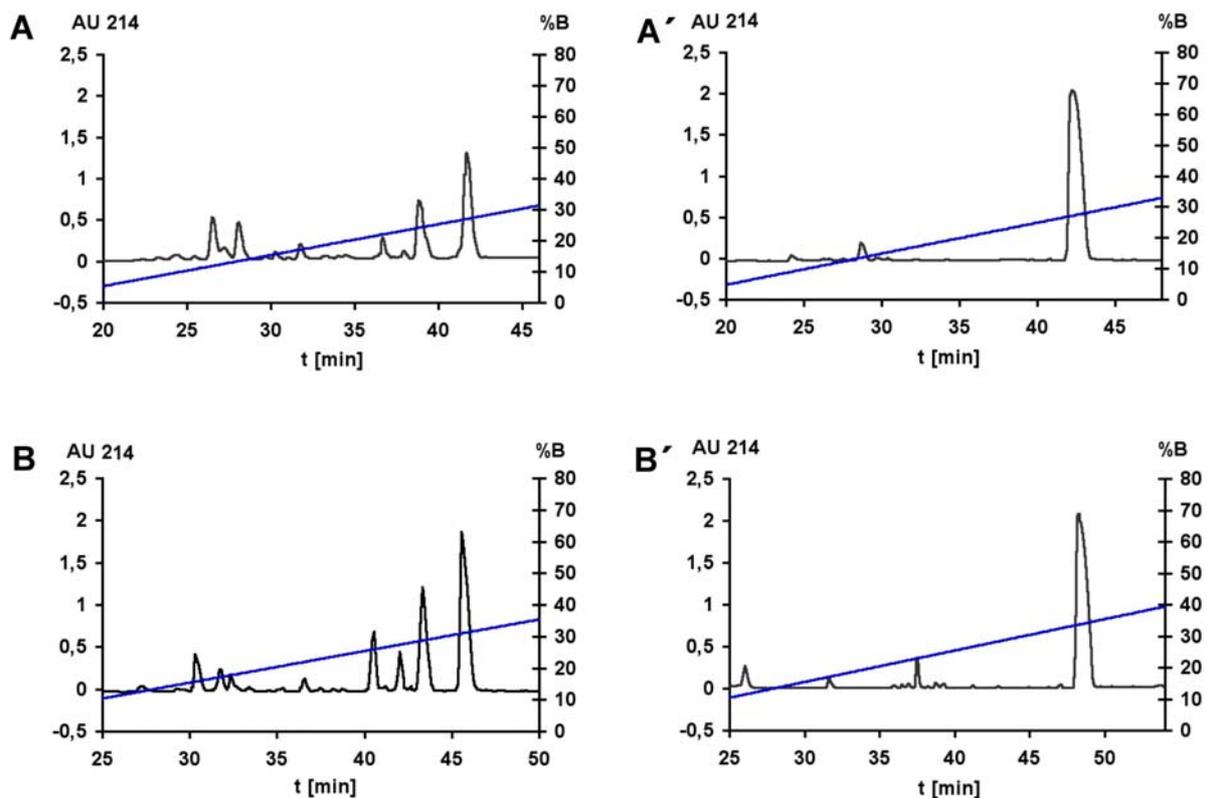


Abb. 9: Reverse-Phase-HPLC-Auftrennung prozessierter Peptidfragmente aus BCR-ABL nach Verdau mit 20S Proteasom. Proteasomen wurden frisch aus der lymphoblastoiden Zelllinie LCL721 (i20S) und LCL721.174 (c20S) isoliert. Je 25 µg BCR-ABL 26mer-Peptid (NVIVHSATGFKQSSKALQRPVASDFE) wurden **A**) 6 h mit 2 µg konstitutivem Proteasom oder **B**) 3 h mit 2 µg Immunoproteasom (in einem äquimolaren Peptid:Proteasom Verhältnis von 3500:1) bei 37°C verdaut und chromatographisch auf einer RP-C2/C18-Säule über einen TFA/ACN-Gradienten (Eluent A: 0,1% TFA; Eluent B: 0,081% TFA in 80% ACN) aufgetrennt. Die Chromatogramme **A**) und **B**) zeigen die HPLC-Profile der Kontrollansätze ohne Proteasom. Die UV-Detektion erfolgte bei 214 nm. Fraktionen wurden durch *Peak-Fraktionierung* bei einer Flußrate von 150 µl/min zu einem Maximalvolumen von 500 µl gesammelt.

Wie anhand der Peakgröße des unverdauten BCR-ABL 26mer-Peptids (Abb. 9A') im Vergleich zur verdauten Probe (Abb. 9A) zu erkennen ist, war nach 6 h Inkubation mit konstitutivem Proteasom zirka 50% der eingesetzten Peptidmenge abgebaut. Für das Immunoproteasom lag das Zeitoptimum bei 3 h (Abb. 9B und B'). Nach Inkubationszeiten über den Optimalbereich hinaus war deutlich mehr als die Hälfte des BCR-ABL 26mer-Peptids verdaut, so dass eine Reprozessierung nicht auszuschließen war (Daten nicht gezeigt). Daher wurden die Proben des 3 h i20S-Ansatzes und 6 h c20S-Ansatzes zur weiteren Charakterisierung der prozessierten Peptidfragmente ausgewählt.

Die Analyse der Spaltprodukte mit Immunoproteasom ergab dagegen ein deutlich anderes Bild (Tabelle 5). Nur 3 Aminosäuren wurden als Schnittstellen innerhalb des BCR-ABL 26mers erkannt. Obwohl jede dieser Aminosäuren auch für das konstitutive Proteasom eine Schnittstelle darstellte, zeigten sich deutliche Unterschiede in der Schnittfrequenz. Bezogen auf die Gesamtmenge prozessierter Peptide wurden alleine über Histidin an Position 5 58,7% der insgesamt durch Verdau mit i20S entstandenen Peptidfragmente erzeugt, während über dieselbe Schnittstelle durch Verdau mit konstitutivem Proteasom dies weniger als 3% waren. Das Immunoproteasom zeigte ebenfalls eine deutlich erhöhte Schnittfrequenz nach Phenylalanin an Position 10. Es konnten 27,5% der insgesamt prozessierten Peptidfragmente auf eine Prozessierung des BCR-ABL 26mers nach Phenylalanin an Position 10 zurückgeführt werden. Dagegen betrug der Gesamtanteil der Peptidfragmente, die durch Spaltung des konstitutiven Proteasoms an dieser Stelle detektiert wurden, weniger als 0,5%. Nur über die Arginin-Schnittstelle an Position 19 wurden durch Verdau mit c20S mehr Peptidfragmente prozessiert (20,6%) als bei Verdau mit c20S (13,8%).

Tabelle 5: Quantitative Analyse (Edman-Abbau) der Spaltprodukte für 10 nmol BCR-ABL 26mer mit i20S:

AA Pos.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
AA	N	V	I	V	H	S	A	T	G	F	K	Q	S	S	K	A	L	Q	R	P	V	A	S	D	F	E
pmol	0	0	0	0	320	0	0	0	0	150	0	0	0	0	0	0	0	0	75	0	0	0	0	0	0	0
Schnitt					xxx					xxx									xx							

x: schwache Schnittstelle (1-29 pmol), xx mittelstarke Schnittstelle (30-99 pmol), xxx: starke Schnittstelle (>100 pmol). Die Klassifizierung der Schnittstelle erfolgte anhand der detektierten Menge der Peptidfragmente. Die Angabe der AA Position ist auf die Länge des synthetischen BCR-ABL-Fusionsregionspeptids bezogen. Fett gedruckt sind die Aminosäuren, die die zur Prozessierung der Liganden ATGFKQSSK, GFKQSSKAL, KQSSKALQR und SSKALQRPV relevanten C-terminalen Schnittstellen darstellen.

4.1.3 Schnittkarte für das BCR-ABL-Fusionsregionspeptid

Welche der immuntherapeutisch interessanten BCR-ABL-Fusionsregionspeptide über proteasomale Degradation generiert werden, wird durch eine Zusammenfassung der Ergebnisse in einer Schnittkarte (Abb. 10) ersichtlich. Wie die Markierungen in der Karte zeigen, stellen innerhalb der Sequenz des BCR-ABL 26mers 13 AA eine Schnittstelle für das konstitutive Proteasom und 3 AA für das Immunoproteasom dar. Die darüber prozessierten Peptidfragmente wiesen dabei eine Länge von 5-22 AA auf.

Einzig entscheidend für die Prozessierung der späteren MHC-Liganden durch das Proteasom ist die C-terminale Erkennung einer Aminosäure als Schnittstelle. Die

erforderliche optimale Länge von 9-11 AA für die Bindung an das MHC-Klasse-I-Molekül erfolgt *in vivo* über späteres *Trimming* durch zytosolische Proteasen außerhalb des Proteasomkomplexes.

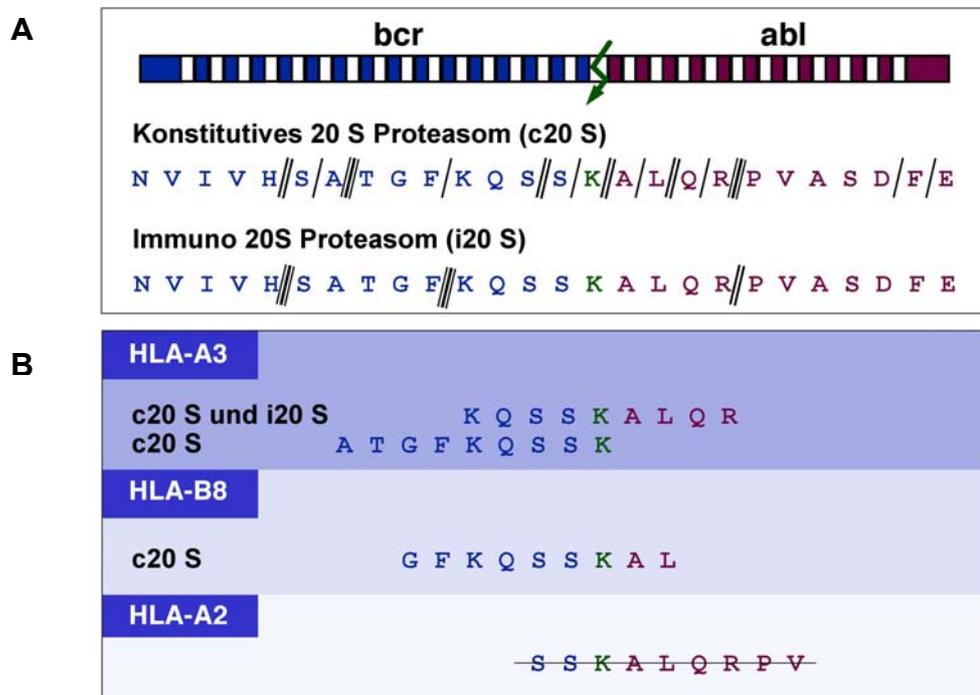


Abb. 10: Schnittkarte für den Verdau eines synthetischen BCR-ABL 26mer-Peptids mit c20S und i20S. **A)** Dargestellt ist die Aminosäuresequenz des zum Verdau eingesetzten synthetischen 26mer-Peptids, welches die Fusionsregion der BCR-ABL-b3a2-Proteinvariante umspannt. Die Schrägstriche innerhalb der Sequenz kennzeichnen die jeweils C-terminal als Schnittstelle erkannte AA nach Verdau mit c20S oder i20S. Die Klassifizierung der Schnittstelle erfolgte anhand der detektierten Menge an Peptidfragmenten (/ schwache, // mittelstarke, /// starke Schnittstelle). **B)** Zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse für die BCR-ABL-Fusionsregionspeptide, für die bereits *in vitro* eine MHC-Klasse-I-Bindungsaffinität gezeigt wurde (112; 116). Sowohl i20S als auch c20S weisen *in vitro* eine zur Prozessierung des HLA-A3-restringierten Peptids KQSSKALQR erforderliche Schnittspezifität auf. Auch für die Peptide ATGFKQSSK (HLA-A3-restringiert) und GFKQSSKAL (HLA-B8-restringiert) konnte eine Schnittspezifität für c20S nachgewiesen werden, nicht jedoch für das Immunoproteasom. Für das nach Yotnda et al. (116) HLA-A2-restringierte Peptid SSKALQRPV konnte weder durch Verdau mit c20S noch mit i20S eine Prozessierung belegt werden.

Für die Prozessierung des Peptids KQSSKALQR (HLA-A3) ist, wie der Versuch mit c20S gezeigt hat, diese C-terminale Schnittstelle vorhanden. Das innerhalb des BCR-ABL Testpeptids an Position 19 gelegene Arginin wurde relativ stark als Schnittstelle erkannt. Der Anteil der über diese Spaltung resultierenden Peptidfragmente am Gesamtpeptidpool betrug 20,6%. Auch ATGFKQSSK (HLA-A3) kann über die von c20S frequentierte Lysin-Schnittstelle an Position 15 entstehen. Allerdings ist die Menge der über Lysin an Position 15 prozessierten Peptidfragmente mit rund 1% sehr gering. Ähnlich geringe Mengen wurden durch Spaltung des BCR-ABL-Testpeptids an Leucin (Position 17) erzielt, über die das HLA-B8 bindende Peptid GFKQSSKAL entstehen kann. Hier betrug der prozessierte Anteil an Peptiden 2% bezogen auf den erhaltenen Gesamtpeptidpool.

Auch das Immunoproteasom besitzt eine Schnittspezifität zur Erzeugung des Liganden KQSSKALQR. Über die C-terminale Lysin-Schnittstelle an Position 19 wurden 13,8% der insgesamt entstandenen Peptidfragmente prozessiert. KQSSKALQR ist das einzige der relevanten BCR-ABL-Fusionsregionspeptide, dass über den Verdau mit Immunoproteasom nachgewiesen werden konnte. ATGFKQSSK und GFKQSSKAL (Vorläufer-) Peptidfragmente konnten dagegen nicht detektiert werden. Wie aus der Schnittkarte ersichtlich wird, stellen Lysin an Position 15 und Leucin an Position 17 keine Schnittstellen für das Immunoproteasom dar, wohl aber für Arginin an Position 19.

Interessanterweise konnten weder durch Verdau mit c20S noch mit i20S Fragmente detektiert werden, die Rückschlüsse auf eine Prozessierung des laut Yotnda et al. (116) HLA-A2-restringierten BCR-ABL-Peptids SSKALQRPV erlaubten.

4.1.4 Analyse der Proteasomexpression in BCR-ABL-positiven Zellen

Wie aus den oben dargestellten Ergebnissen deutlich wurde, ist die Prozessierung der BCR-ABL-Fusionsregionspeptide wesentlich von der Proteasom-Spezies abhängig. Daher wurde in einer Western-Blot Analyse untersucht, welche der für die Schnittspezifität relevanten Proteasom-Untereinheiten in BCR-ABL-positiven Zellen exprimiert werden (Abb. 11). Hierzu wurden sowohl Gesamtproteinpräparationen aus Zellen von Leukämiepatienten in chronischer Phase und Blastenkrise analysiert sowie auch Gesamtproteinpräparationen einer BCR-ABL-positiven, MHC-Klasse-I-negativen Tumorzelllinie (K562) und die daraus abgeleiteten HLA-A3- und HLA-B8-positiven Transfektanten (KA3.2 und KB8.15).

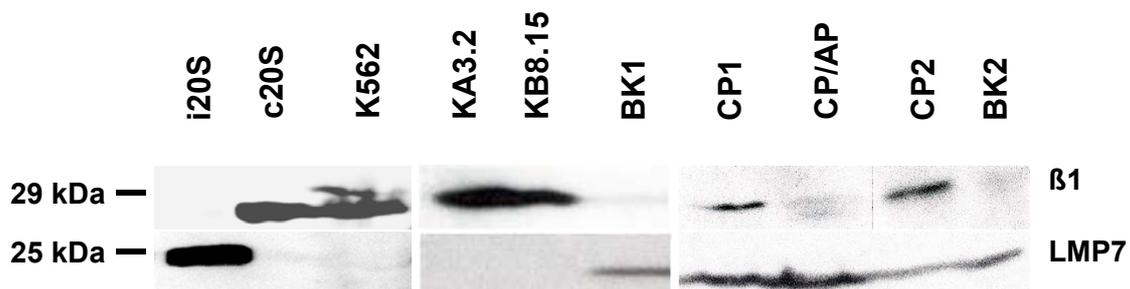


Abb. 11: Proteasomexpression in K562-Zellen und CML-Patientenzellen in unterschiedlichen Krankheitsphasen. Gesamtproteinextrakte aus CML-Zellen wurden auf einem 12% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und in einem Western-Blot analysiert. Der Nachweis der exprimierten Proteasom-Spezies erfolgte mit den Antikörpern Anti- β 1 und Anti-LMP7, spezifisch für die β 1-Untereinheit des konstitutiven Proteasoms bzw. der LMP7-Untereinheit des Immunoproteasoms. Die Detektion erfolgte mit dem ECL-System nach Inkubation mit einem Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper. Zur Kontrolle wurden je 0,5 μ g gereinigtes Immuno- bzw. konstitutives Proteasom aufgetragen (Spur 1-2). **BK:** Blastenkrise, **CP:** chronische Phase, **CP/AP:** chronische Phase mit Verdacht auf Übergang zur akzelerierten Phase. K562-Zellen exprimieren ausschließlich die konstitutive β 1-Untereinheit. Im Gegensatz zu CML-Patientenzellen aus chronischer Phase wird in Zellen aus Blastenkrise ausschließlich die immuno-Untereinheit LMP7 exprimiert.

Wie Abbildung 11 zeigt, konnte in K562-Zellen die für konstitutives Proteasom spezifische β 1-Untereinheiten detektiert werden. Dieses Resultat war unabhängig davon, ob die Zellen mit MHC-kodierenden cDNAs transfiziert oder MHC-Klasse-I negativ waren. Eine endogene Prozessierung der BCR-ABL-Fusionsregionspeptide ATGFKQSSK, GFKQSSKAL und KQSSKALQR sollte daher in K562-Zellen möglich sein.

Deutliche Unterschiede in der Expression der Proteasom-Spezies lassen sich bei den analysierten CML-Patientenzellen feststellen. Während in Zellen aus chronischer Phase-CML (Patient CP1 und CP2) sowohl die immuno-Untereinheit LMP7 als auch die konstitutive Untereinheit β 1 detektiert wurde, zeichneten sich die Zellen aus Blastenkrise von unbehandelten CML-Patienten (Patient BK1 und BK2) durch eine nahezu ausschließliche Expression der immuno-Untereinheit LMP7 aus. Ein Patient (CP/AP), bei dem nicht ausgeschlossen werden konnte, dass zum Zeitpunkt der Zellentnahme möglicherweise bereits ein Fortschreiten der Erkrankung in die akzelerierte Phase (AP) vorlag, wies ebenfalls eine nahezu exklusive Expression der LMP-7-Untereinheit auf.

Eine endogene Prozessierung der Liganden ATGFKQSSK, GFKQSSKAL und KQSSKALQR scheint daher grundsätzlich auch in Zellen von CML-Patienten möglich. Die Resultate legen jedoch die Vermutung nahe, dass die Prozessierung der BCR-ABL-Fusionsregionspeptide wesentlich vom Krankheitsverlauf abhängt und (aufgrund der reduzierten Expression von c20S in Blasenkrise) für einige Peptide wahrscheinlich auf das frühe Krankheitsstadium der CML beschränkt ist.

4.2 Versuche zum Nachweis der endogenen Präsentation von BCR-ABL Fusionsregionspeptiden

Zum Nachweis der MHC-Klasse-I-restringierten Präsentation von BCR-ABL-Fusionsregionspeptiden auf leukämischen Zellen wurde ein CTL-unabhängiger Ansatz gewählt. Dieser Ansatz basiert auf einer Immunpräzipitation von MHC-Klasse-I-Molekülen aus Zelllysaten von Leukämiezellen und anschließender massenspektrometrischer Analyse des eluierten Gesamtpeptidpools. Man geht davon aus, dass der Gesamtpeptidpool einer Zelle ein Gemisch aus zirka 10^4 verschiedenen Peptiden darstellt und die Repräsentation jedes einzelnen Peptids dabei höchst variable Werte von einer bis zu 1 000 Kopien betragen kann. Um aus den etwa 10^4 verschiedenen Peptiden nach einem spezifischen tumorassoziierten Peptid zu suchen, das möglicherweise in geringer Kopienzahl vertreten ist, wurde nach einem geeigneten Selektionskriterium gesucht, das eine Reduzierung der Komplexität des Peptidpools erlaubt.

Anhand einer großangelegten epidemiologischen Studie war zu Beginn dieser Arbeit bereits bekannt, dass beim gesunden Menschen die Expression von HLA-A3, insbesondere wenn HLA-A3 und HLA-B8 coexprimiert werden, zu einem verringerten relativen Risiko führt, an CML zu erkranken (117). Vor diesem Hintergrund bot sich eine selektive Analyse von HLA-A3 und HLA-B8 Peptidliganden auf Zellen der chronischen myeloischen Leukämie als geeignetes Auswahlkriterium an. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit der humanen erythromyeloischen Zelllinie K562 ein Modellsystem etabliert, das die selektive Analyse von HLA-A3- und HLA-B8-Peptidliganden ermöglichte. K562-Zellen sind positiv für die BCR-ABL-Translokation und MHC-Klasse-I defizient (138-142). Durch Transfektion mit entsprechenden MHC-Klasse-I-kodierenden cDNAs waren diese Zellen daher optimal für eine selektive Expression von HLA-A3 und HLA-B8 und anschließender Analyse der HLA-A3- und HLA-B8-restringierten Peptidpräsentation geeignet.

4.2.1 Kontrolle der BCR-ABL-Expression und MHC-Klasse-I-Präsentation in K562-Zellen

Vor Transfektion von K562-Zellen mit HLA-Klasse-I-kodierenden cDNAs wurden die Zellen auf ihre charakteristischen Eigenschaften überprüft. Zum Nachweis der BCR-ABL-Translokation wurde eine Western-Blot Analyse durchgeführt. Hierfür wurde ein Antikörper eingesetzt, der spezifisch für das ubiquitär exprimierte BCR-Protein von 160 kDa ist. Sind Zellen positiv für die b3a2-BCR-ABL-Translokation (Fusion zwischen den Exons b3 von BCR und a2 von ABL), wird zusätzlich ein Protein von 210 kDa detektiert, das dem Fusionsprotein entspricht. Diese Situation konnte in K562-Zellen bestätigt werden (Abb. 12).

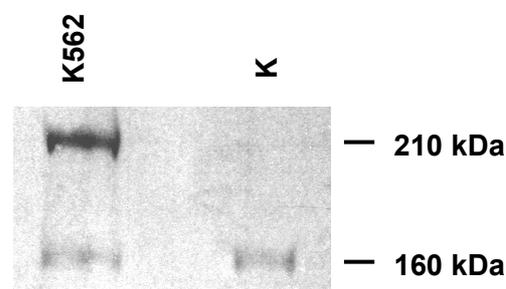


Abb. 12: Nachweis der BCR-ABL-Translokation in K562-Zellen. Gesamtproteinextrakte wurden auf einem 7,5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und in einem Western-Blot mit einem Anti-BCR Antikörper, spezifisch für das ubiquitär exprimierte BCR-Protein (160 kDa) und das CML-charakteristische BCR-ABL-Fusionsprotein (210 kDa) geprobt. Zur Kontrolle wurde Gesamtproteinlysate der Zelllinie JA2/k^b geladen. Die Detektion erfolgte mit dem ECL-System nach Inkubation mit einem Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper. Die für ^{P210}BCR-ABL charakteristische Bande von 210 kDa konnte nur in K562-Zellen detektiert werden.

Darüber hinaus wurde mittels Durchflusszytometrie sichergestellt, dass die zur Transfektion ausgewählten K562-Zellen MHC-Klasse-I negativ sind. Wie in Abbildung 13 zu erkennen ist, findet auf K562-Zellen keine MHC-Klasse-I-Präsentation an der Zelloberfläche statt. Somit erfüllen K562-Zellen die grundlegenden Voraussetzungen zur Etablierung des oben beschriebenen Zellmodellsystems.

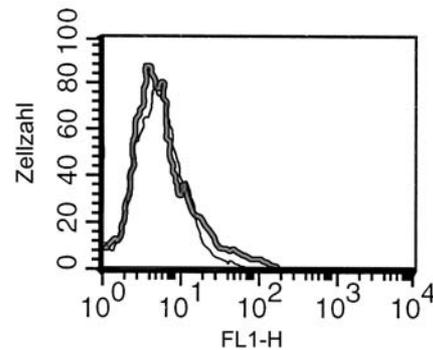


Abb. 13: Durchflusszytometrische Analyse der MHC-Klasse-I-Expression in K562-Zellen. K562 Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie nach Färbung mit dem pan-HLA-Klasse-I-spezifischen Antikörper W6/32 (Anti-HLA-A,B,C) und einem FITC-markierten Sekundärantikörper analysiert. In der Abbildung sind die Histogramme von gefärbten (dicke Linie) und ungefärbten (dünne Linie) K562-Zellen überlappend dargestellt. Im Diagramm aufgetragen ist die relative Fluoreszenzintensität (FL-1) gegen die Zellzahl. Je Ansatz wurden 50 000 Zellen gefärbt und 10 000 Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel aus mindestens 3 Experimenten. Die Analyse bestätigt die fehlende MHC-Klasse-I-Präsentation auf K562-Zellen.

4.2.2 Herstellung von HLA-B8- und HLA-A3-transfizierten K562-Zellen

Zur stabilen Integration von HLA-B8 und HLA-A3 in das Genom von K562 wurde die entsprechende MHC-kodierende cDNA in den linearisierten Vektor pCDNA3 ligiert und anschließend über Elektroporation in K562-Zellen transferiert. Eine erste durchflusszytometrische Analyse der in 96-Lochplatten klonierten Transfektanten zeigte eine noch stark heterogene Population aus MHC-exprimierenden und MHC-negativen Zellen (nicht gezeigt). Durch entsprechende Subklonierung konnte jeweils ein Zellklon mit stabiler HLA-A3- bzw. HLA-B8-Expression erhalten werden (siehe Abb. 14). Die HLA-B8-exprimierenden Zellen erhielten die Bezeichnung KB8.15, die HLA-A3-Transfektanten wurden KA3.2 genannt.

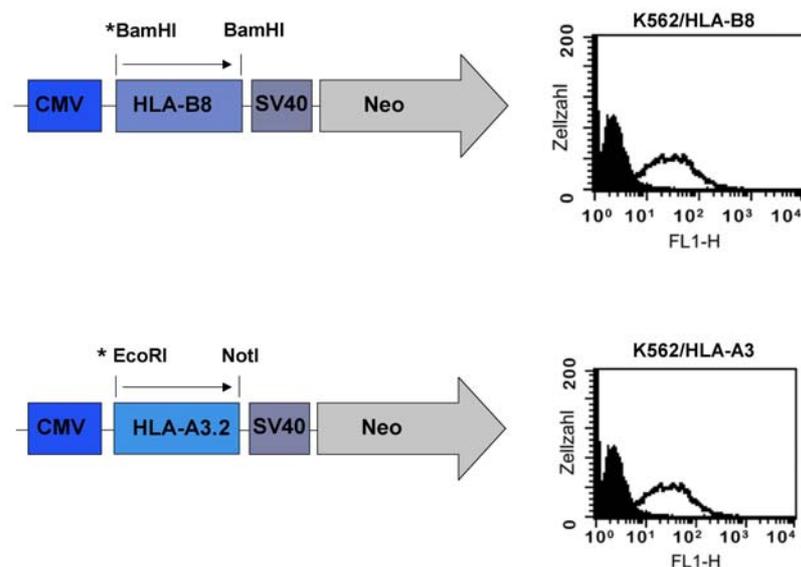


Abb. 14: Expression von HLA-A3 und HLA-B8 nach Transfektion der MHC-Klasse-I-defizienten Zelllinie K562 mit den Vektoren pCDNA3/HLA-B8 und pCDNA3/HLA-A3.

Linke Bildhälfte: pCDNA3/HLA-B8 und pCDNA3/HLA-A3 Vektorkassette unter der Kontrolle des CMV Promotors. * Ligationsstelle des inserierten HLA-A3 Fragments in die EcoRI/NotI geöffnete pCDNA3-Vektorkassette bzw. des HLA-B8 Fragments über die geglättete BamHI Schnittstelle des pCDNA3-Vektors. Der Pfeil gibt die 5'-3'-Richtung der inserierten cDNA an. NEO: Neomycinresistenzgen unter der Kontrolle des SV40 Promotors.

Rechte Bildhälfte: Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse von K562-Zellen nach Transfektion und Subklonierung. Zum Nachweis der transgen exprimierten MHC-Moleküle wurden die Zellen mit einem Anti-HLA-B8-spezifischen Antikörper bzw. mit dem Anti-HLA-A3-spezifischen-Antikörper GAP-A3 und einem FITC-markierten Sekundärantikörper gefärbt (weiß gefüllte Histogramme). Die schwarz gefüllten Kurven repräsentieren die entsprechenden Histogramme der K562/HLA-B8- bzw. K562/HLA-A3-Transfektanten, die nur mit Sekundärantikörper inkubiert worden waren. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel aus mindestens 3 Experimenten. Sowohl für HLA-B8 als auch für HLA-A3 konnte eine stabile transgene Expression in K562-Zellen nachgewiesen werden.

Im Bestreben, eine stärkere MHC-Klasse-I-Expression nach Transfektion mit HLA-A3- oder HLA-B8- kodierenden cDNAs zu erzielen, wurde die oben beschriebene Strategie modifiziert. Anstelle einer Subklonierung wurden MHC-Klasse-I-positive Zellen durch Auftrennung der Transfektanten über eine MACS-Säule (siehe 3.1.12) angereichert und von MHC-Klasse-I-negativen Zellen getrennt. Wie für HLA-B8 transfizierte K562-Zellen in Abb. 15A gezeigt, führte diese Strategie vorerst zu einem deutlich verbesserten Resultat. Wurden die Zellen jedoch für einige Wochen in Selektionsmedium kultiviert, zeigte sich eine Abnahme in der Expression des Transgens (Abb. 15B) auf vergleichbare Werte wie sie auch für subklonierte Transfektanten erhalten wurden (Abb. 14). Diese Beobachtung wurde auch bei K562/HLA-A3-Transfektanten gemacht (Ergebnis nicht gezeigt).

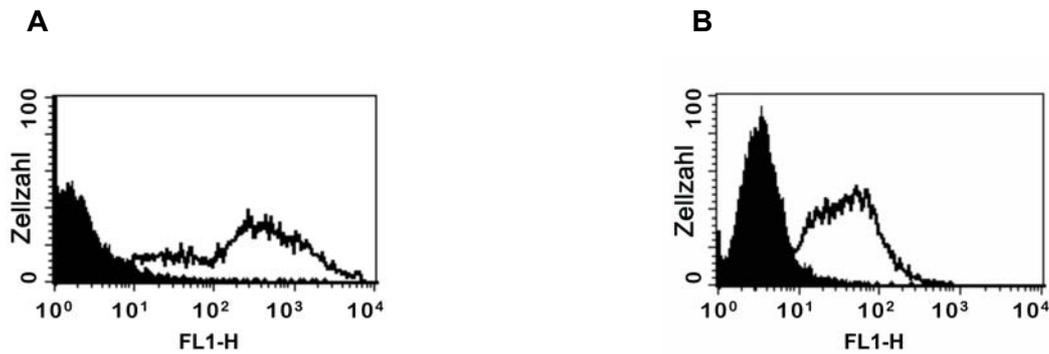


Abb. 15: Durchflusszytometrische Analyse der MHC-Klasse-I-Expression in K562-Zellen nach Transfektion der Zellen mit pCDNA3/HLA-B8 und anschließender Selektion über eine MACS-Säule. Zum Nachweis der HLA-B8-Expression wurden die Zellen mit 2 µg eines Anti-HLA-B8 spezifischen Antikörpers inkubiert (weiß gefüllte Histogramme). Zur Färbung wurde jeweils ein FITC-markierter Sekundärantikörper eingesetzt. Schwarz gefüllte Histogramme repräsentieren das Ergebnis für ungefärbte Zellen. **A)** HLA-B8-Expression der Transfektanten unmittelbar nach MACS-Selektion und **B)** 4 Wochen danach. Es wurde ein deutlicher Rückgang der HLA-B8-Expression in den transfizierten K562-Zellen 4 Wochen nach MACS-Selektion beobachtet.

Weitere Versuche, expressionsrückläufige Transfektanten durch nochmalige Selektion über eine MACS-Säule zu optimieren, schlugen ebenso fehl, wie der Ansatz, durch Aussetzen der G418-Gabe über zwei Passagen und anschließend erneut einsetzendem Selektionsdruck die Population der MHC-Klasse-I-exprimierenden Zellen zu optimieren (Daten nicht gezeigt). Alle nachfolgend beschriebenen Experimente wurden deshalb mit KB8.15- und KA3.2-Zellen durchgeführt, deren HLA-B8- oder HLA-A3-Expression den in Abb. 14 dargestellten Niveaus entsprachen.

4.2.3 Analyse des endogen präsentierten Peptidpools von KB8.15-Zellen

KB8.15-Transfektanten wurden im *large scale*-Verfahren kultiviert, bis 10^{11} Zellen zur Verfügung standen. Zur Solubilisierung der MHC-Klasse-I-Moleküle wurde eine Detergenz-Lyse durchgeführt. Wie eine vergleichende Western-Blot Analyse (Abb. 16A) und Silberfärbung (Abb. 17) von Lysaten HLA-B8-transfizierter und nicht-transfizierter Zellen belegen, lassen sich alle aus den Zellmembranen isolierten MHC-Moleküle auf die transgene Expression des HLA-B8-Gens zurückführen.

Kontrollexperimente bestätigten ferner die erfolgreiche Reinigung der auf KB8.15 präsentierten MHC-Komplexe nach Vorreinigung des Zellysats und der immunpräzipitierten MHC-Komplexe nach Elution von einer Protein-A-Sepharosesäule (Abb. 16B).

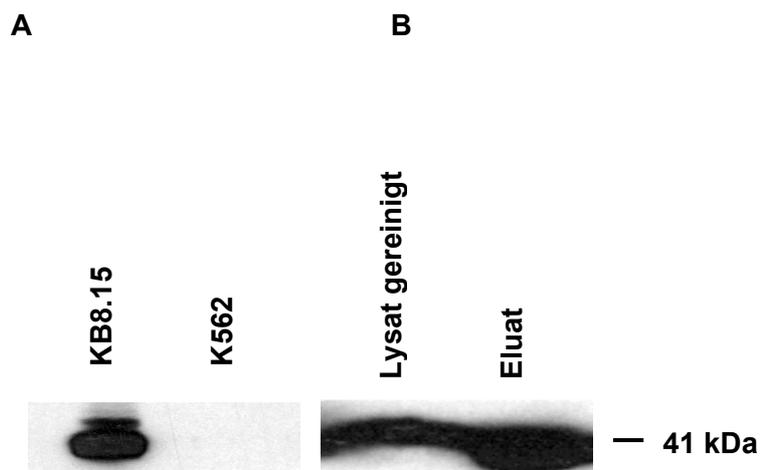


Abb. 16: Nachweis der MHC-Klasse-I schweren Kette A) in K562- und KB8.15-Zellrohlysaten sowie B) in vorgereinigtem KB8.15-Lysat vor Immunpräzipitation und nach Elution von einer Protein-A-Sepharose-säule. Die Reinigung der MHC-Klasse-I-Moleküle erfolgte wie unter 3.3.7 beschrieben. Zur Durchführung der Western-Blot Analyse wurden die Proben auf einem 10% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit einem Anti-MHC-Klasse-I schwere Kette-spezifischen Antikörper (HC10) analysiert. Die Detektion erfolgte mit dem ECL-System nach Inkubation mit einem Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper. Repräsentativ gezeigt ist ein Beispiel der bei allen MHC-Klasse-I-Peptidreinigungen durchgeführten Western-Blot Analyse, die zur Kontrolle der MHC-Reinigungs-schritte vorgenommen wurde.

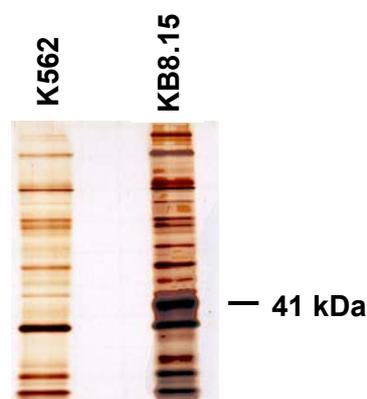


Abb. 17: Silberfärbung elektrophoretisch aufgetrennter (10% SDS-PAGE) Eluate aus KB8.15- und K562-Zellen. Der Pfeil markiert die Größe von 41 kDa, die der MHC-Klasse-I schweren Kette entspricht. Nur im Eluat der HLA-B8-transfizierten Zellen ist eine Bande dieser Größe zu detektieren.

Der aus KB8.15-Zellen isolierte Peptidpool wurde (nach Ultrafiltration und Entsalzung) anschließend massenspektrometrisch über ein analytisches System, bestehend aus einem Q-Tof Massenspektrometer und einer vorgeschalteten 75 μm ID Nanokapillar-RP-HPLC analysiert. Wie die Kalibrierung dieses Analysesystems mit einem Gemisch synthetischer Referenzpeptide zeigte, ist mit diesem technischen Ansatz ein Nachweis bis zu einer unteren Grenze von 100 fmol des gesuchten HLA-B8-restringierten BCR-ABL-Fusionsregionspeptids GFKQSSKAL möglich (Abb. 18).

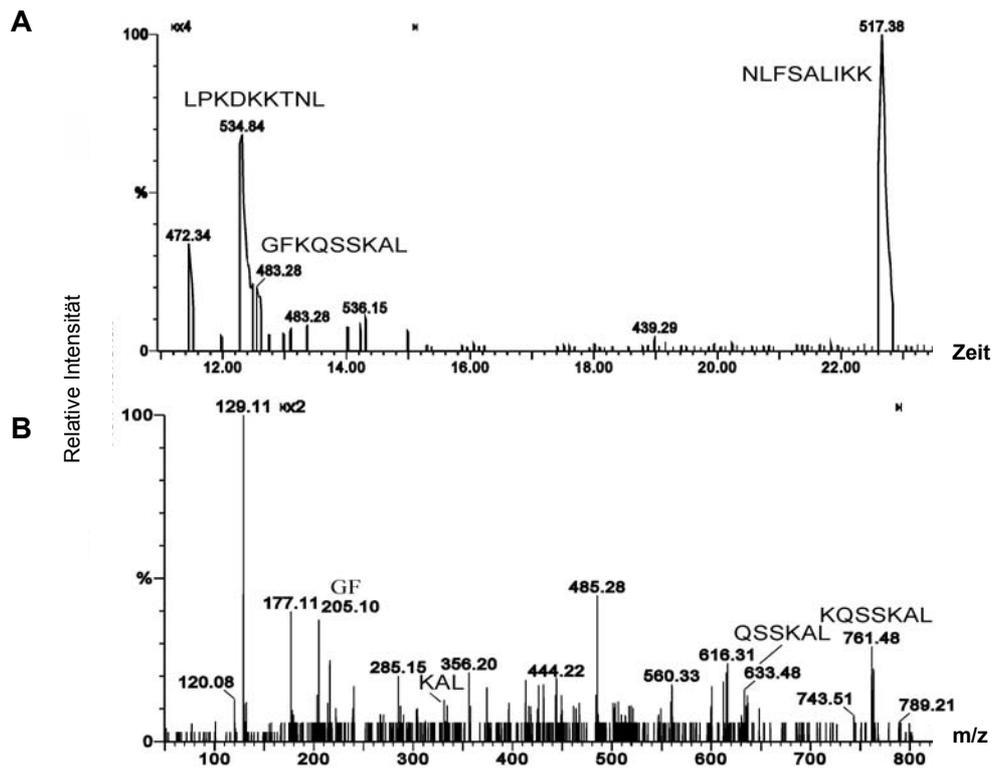


Abb. 18: Bestimmung der Sensitivität des analytischen Systems, bestehend aus einem Q-ToF Massenspektrometer und einer vorgeschalteten 75 μ m ID Nanokapillar RP-HPLC. A) zeigt das CapLC Chromatogramm für eine Mischung aus 9 synthetischen Peptiden (100 fmol/Peptid), zusammengesetzt aus den drei BCR-ABL-Fusionsregionspeptiden GFKQSSKAL (HLA-B8), ATGFKQSSK (HLA-A3) und KQSSKALQR (HLA-A3) sowie 6 Peptiden aus dem humanen c-ABL Protoonkogen (GINGSFLVR, AA144-152; NLFSALIKK, AA 598-606; KLYVSSSR, AA 183-191; GAKTKATSL, AA 939-947; GCPEKVYEL, AA 463-471; LPKDKKTNL 591-599). In **B)** dargestellt ist das Fragmentspektrum des HLA-B8-restringierten synthetischen BCR-ABL-Fusionsregionspeptids GFKQSSKAL. Die Sensitivität des analytischen Systems ermöglicht die Detektion von synthetischen GFKQSSKAL-Peptiden bis zu einem unteren Schwellenwert von 100 fmol.

Wie die massenspektrometrische Analyse des eluierten Gesamtpeptidpools von KB8.15-Zellen zeigte, war es mit diesem analytischen System möglich, die Sequenz einiger endogen präsentierter Liganden eindeutig zu identifizieren und über eine Recherche in Proteindatenbanken auch auf die entsprechenden Proteine zurückzuführen. Das HLA-B8-restringierte BCR-ABL-Fusionsregionspeptid GFKQSSKAL konnte jedoch nicht detektiert werden. Die identifizierten Liganden sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Endogen präsentierte Liganden mit HLA-B8-Restriktion, die aus einer Präparation von 10^{11} KB8.15 Zellen identifiziert wurden:

Swiss-Prot <i>accession</i> <i>number</i>	Protein (AA Position)	Masse (theor.)	Sequenz
Q00534	Cell division protein kinase 6 (164-172)	1072.57	FGLARIYSF

Q61877	Envelope protein (600-608)	1061.62	FVKDRISVV
P52597	hnRNP F (196-204)	1032.53	DPPLKFMSV
Q9H9I2	Hypothetical protein (468-475)	896.47	LPMPTEPL
P05107	Integrin beta-2 [Precursor] (008-017)	1010.68	LLALVGLLSL
Q7YQ88	MHC class I antigen (003-011)	998.59	VMAPRTVLL
P49458	Signal recognition particle 9 kDa protein (020-028)	1027.58	DPMKARVVL
P43308	Signal sequence receptor beta subunit (001-009)	1094.56	MPTMRLLSF
P20226	TATA box binding protein (295-303)	1081.70	MIKPRIVLL
Q12788	Transducin beta-like 3 protein (060-068)	1029.56	DAAIRVWSL
Q9Y4A5	Transformation/transcription domain-associated protein (1367-1375)	826.49	IAALNALAA
P27635	60S ribosomal protein L10 (027-035)	1089.62	DAKIRIFDL
P39026	60S ribosomal protein L11 (085-093)	1105.61	GLKVREYEL

Das vorliegende Ergebnis stellt den ersten direkten Nachweis von endogen auf HLA-B8-präsentierten Peptidliganden auf CML-Zellen dar. Daher ist jeder der identifizierten Liganden potentiell von Interesse. So wurde unter anderem gezeigt, dass aus der Cyclin abhängigen Kinase CDK6, die zu den Schlüsselenzymen der Zellzyklusregulation zählt, ein HLA-B8-restringiertes Peptid, FGLARIYSF (AA 164-172) (Abb. 19) endogen präsentiert wird. Ebenfalls von Interesse war der Nachweis des Liganden LLALVGLLSL (AA 479-487) aus Integrin β -2, das in weiten Bereichen der Leukozyten-Adhäsion von Bedeutung ist oder DAKIRIFDL (AA 27-35) aus dem 60S ribosomalen Protein L10 (synonym auch als Tumor-Suppressor QM bezeichnet). Letzteres stellt einen potentiellen Regulator für Signaltransduktionswege dar, an denen Proteine beteiligt sind, die eine SH3-Domäne aufweisen (143).

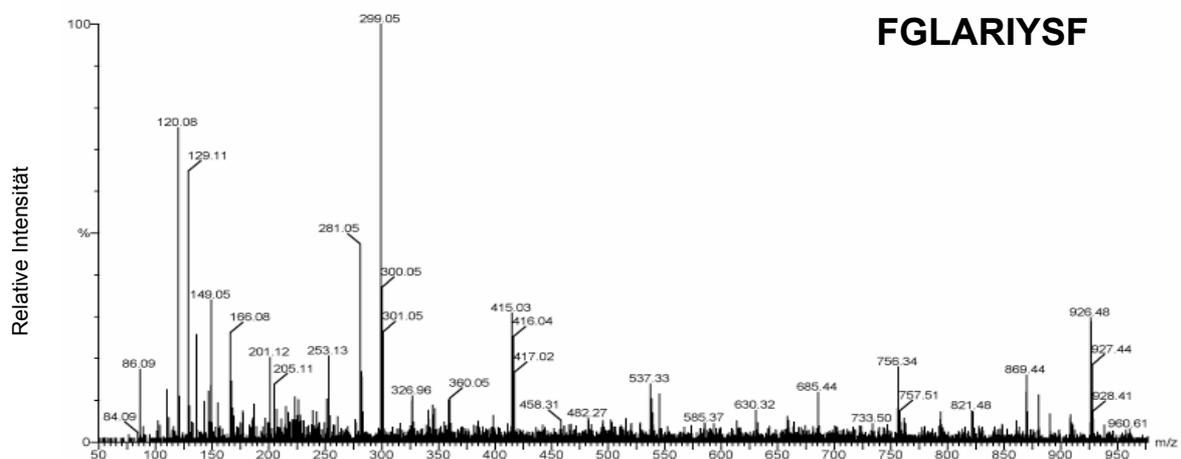


Abb.19: MS/MS-Fragmentspektrum des Peptidliganden FGLARIYSF aus CDK6, identifiziert aus dem endogen präsentierten Peptidpool von KB8.15 Zellen.

4.2.4 Analyse des endogen präsentierten Peptidpools von KA3.2-Zellen

Der endogen präsentierte Peptidpool von KA3.2-Zellen wurde wie unter 3.3.7 isoliert und analysiert. Die Reinigungsschritte wurden analog zu den bei KB8.15-Zellen dargestellten Untersuchungen mittels Western-Blot kontrolliert (nicht gezeigt). Darüber hinaus wurde die Menge der nach Immunpräzipitation gereinigten MHC-Moleküle anhand eines MHC-Tetramerstandards in einem Western-Blot untersucht (Abb. 20).

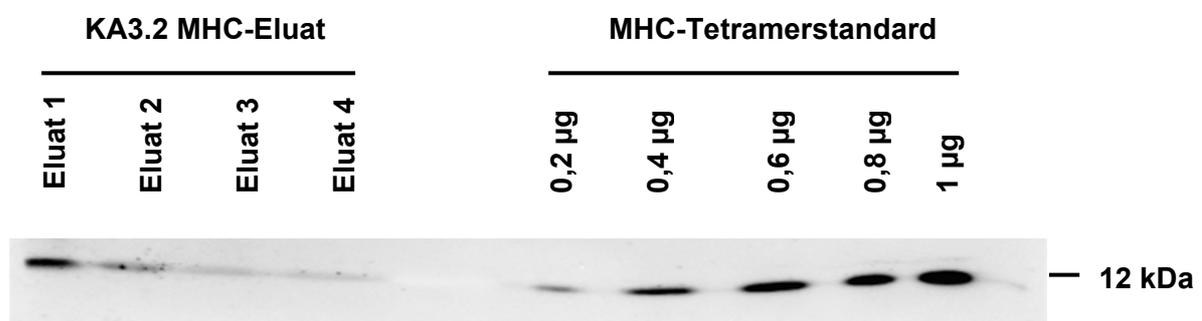


Abb. 20: Quantifizierung der MHC-Klasse-I leichten Kette (12 kDa) in MHC-Eluaten aus einer Präparation von 10^{11} KA3.2-Zellen anhand eines MHC-Tetramerstandards (0,2-1 µg). MHC-Klasse-I-Moleküle wurden aus KA3.2-Zellen isoliert und immunpräzipitiert (siehe 3.3.7). Zur Kontrolle der Elutionseffizienz wurden abweichend zu der unter 3.3.7.2 beschriebenen Vorgehensweise zusätzlich die Fraktionen 3 und 4 zu je 3,5 ml eluiert. Von jeder Fraktion wurden 20 µl Eluat auf ein 12% SDS-Polyacrylamidgel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit einem Anti-β2-Mikroglobulin Antikörper analysiert. Die Detektion erfolgte mit dem ECL-System nach Inkubation mit einem Peroxidasegekoppelten Zweitantikörper, die quantitative Auswertung mit einem optischen Analysesystem. Die Ausbeute gereinigter MHC-Klasse-I-Moleküle aus 10^{11} präparierten KA3.2-Zellen betrug 173 nmol. Diese Menge ist gleichzusetzen mit einer Anzahl von annähernd 72 000 endogen auf HLA-A3 präsentierten Peptiden pro transfizierter Zelle.

Die Ausbeute der gereinigten MHC-Klasse-I-Moleküle aus den ursprünglich 10^{11} eingesetzten Zellen betrug 173 nmol. Diese Menge ist gleichzusetzen mit einer Anzahl von annähernd 72 000 endogen auf HLA-A3 präsentierten Peptiden pro transfizierter Zelle. Aus diesem Peptidpool konnten in der massenspektrometrischen Analyse die in Tabelle 7 aufgeführten Liganden eindeutig identifiziert und auf bereits bekannte Proteine zurückgeführt werden.

Tabelle 7: Endogen präsentierte Liganden mit HLA-A3 Restriktion, die aus einer Präparation von 10¹¹ KA3.2 Zellen identifiziert wurden:

Swiss-Prot <i>accession number</i>	Protein (Position)	Masse (theor.)	Sequenz
Q14437	Glycoprotein 25L2 [Precursor] (109-117)	950.55	SLFAGGMLR
Q96LC2	hnRNP Q2 (244-252)	1016.68	RLFVGSIPK
Q8WWS6	KIAA0266 protein (683-691)	1129.60	RVLPYPPTH
Q96C01	Hypothetical protein (008-018)	1274.74	RVQEAVESMVK
Q96SN2	Hypothetical protein (190-197)	1012.66	KVLLLLWK
P61968	LIM domain transcription factor LMO4 (029-037)	1137.65	KIADRFLLY
Q96KC3	Hypothetical protein (002-011)	1195.75	ALPSRILLWK

Die gesuchten HLA-A3-restringierten BCR-ABL-Fusionsregionspeptide ATGFKQSSK und KQSSKALQR konnten nicht unter den identifizierten Peptiden detektiert werden. Allerdings ist der Nachweis eines anderen, sehr viel versprechenden Liganden gelungen. Abbildung 21 zeigt das charakteristische Fragmentspektrum dieses Liganden, das zur Ermittlung der Peptidsequenz herangezogen wurde und eines sequenzidentischen synthetischen Peptids. Die anhand des Fragmentspektrums abgeleitete Sequenz, KIADRFLLY (AA 29-37), wurde auf den protoonkogenen Transkriptionsfaktor LMO4 zurückgeführt. Dieses Protein steht bereits im Verdacht, bei der Pathogenese von Brust- und Prostatakrebs eine zentrale Rolle zu spielen (144; 145), und auch im Kontext von leukämischen Erkrankungen wird Proteinen der LMO-Genfamilie eine große Bedeutung zugemessen (146-148). Besonders bemerkenswert im Rahmen dieser Arbeit war der Befund (wie in den nachfolgenden Ergebnissen noch gezeigt wird), dass dieses LMO4 abgeleitete Peptid ebenfalls auf allen untersuchten Zellen von HLA-A3-positiven CML-Patienten endogen präsentiert nachgewiesen werden konnte (4.3).

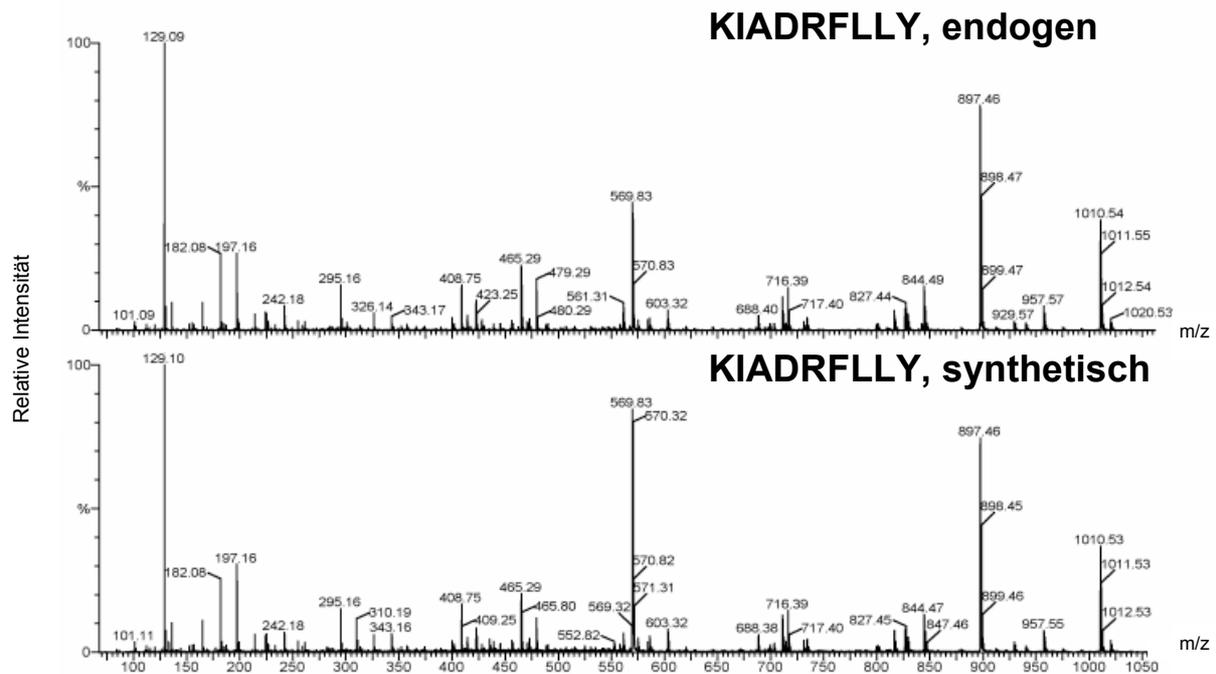


Abb. 21: MS/MS-Fragmentspektrum des Peptidliganden KIADRFLLY aus LMO4, identifiziert aus dem endogen präsentierten Peptidpool von KA3.2 Zellen (im Bild oben) und eines synthetischen Peptids gleicher Sequenz (im Bild unten).

4.3 Identifizierung von MHC-Klasse-I-Liganden auf CML-Patientenzellen

Neben den zuvor dargestellten Ansätzen zur gezielten Suche nach krankheitsassoziierten MHC-Liganden, diente der Ansatz *der Reversen Immunologie* auch als Strategie zur Identifizierung von bislang unbeschriebenen leukämieassoziierten Peptiden. Der Vorteil dieses Vorgehens besteht darin, dass keine Beschränkung auf ein einziges ausgewähltes Protein gegeben ist und auch Liganden aus Proteinen mit noch unbekannter Funktion oder aus ESTs (*expressed sequence tags*) identifiziert werden können. Neben dem hohen Zeitaufwand liegt die Hauptanforderung eines solchen Vorgehens darin, aus einer sehr großen Menge Selbstliganden die Peptide zu erkennen, die tatsächlich leukämierelevant sind.

Auf der analytischen Seite setzt dieser Ansatz zwei Schwerpunkte. Zum einen besteht das Ziel darin, aus einem eluierten Peptidpool so viele MHC-Liganden wie möglich eindeutig zu identifizieren, zum anderen liegt die Bestrebung darin, auch Peptide zu erfassen, die in sehr geringer Kopienzahl vertreten sind, wie es möglicherweise für tumorassoziierte Peptide zu erwarten ist. Deshalb wurden für die massenspektrometrische Analyse von MHC-Klasse-I-Peptideluaten zwei unterschiedliche Strategien gewählt: der eluierte Peptidpool wurde entweder über das SMART HPLC-System vorfraktioniert und anschließend mit der so genannten *off-line* Technik über Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) weiter untersucht oder

direkt (*on-line* Technik) einer Nanoelektrospray-ESI-MS/MS Analyse unterzogen. Während der *on-line* Technik durch Aufkonzentration und Trennung der Peptide auf der Nanokapillar-HPLC-Säule in der Regel eine höhere Sensitivität zugeschrieben wird und dadurch die Wahrscheinlichkeit erhöht wird, auch in geringer Kopienzahl präsentierte Peptidliganden zu detektieren, ermöglicht die *off-line* Technik durch die vorherige Auftrennung des Peptidpools in mehrere Fraktionen meist ein größeres Repertoire an Peptiden zu identifizieren.

4.3.1 Reinigung und Analyse endogen präsentierte Peptide aus CML-Patientenzellen

Zur Identifizierung von CML-assoziierten Peptidliganden wurde der natürlich präsentierte Peptidpool von 4 Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie analysiert (Patient BK1, Patient CP1, Patient CP/AP und Patient CP3). Drei der vier Patienten stimmten im MHC-Lokus für HLA-A3 überein, der vierte Patient (CP3) war HLA-B8-positiv. Die Zellen dieser Patienten, welche durch therapeutische Leukapherese (zur Reduktion der massiv erhöhten Leukozyten und damit Verhinderung der Störung der Mikrozirkulation) gewonnen worden waren, wurden analog der in den Abschnitten 3.3.7 und 4.2.3 beschriebenen Vorgehensweise einer MHC-Klasse-I-Reinigung unterzogen. Da von Patient BK1 aufgrund des bereits fortgeschrittenen Krankheitsstadiums eine besonders große Menge an Zellmaterial zur Verfügung stand, war es möglich, beide Analysestrategien anzuwenden. Der eluierte Peptidpool wurde geteilt und sowohl über eine reverse-Phase-Säule vorfraktioniert und über die *off-line* Technik massenspektrometrisch analysiert als auch über die *on-line* Technik gemessen. Das aus der chromatographischen Vorfraktionierung resultierende HPLC-Chromatogramm ist in Abb. 22 dargestellt.

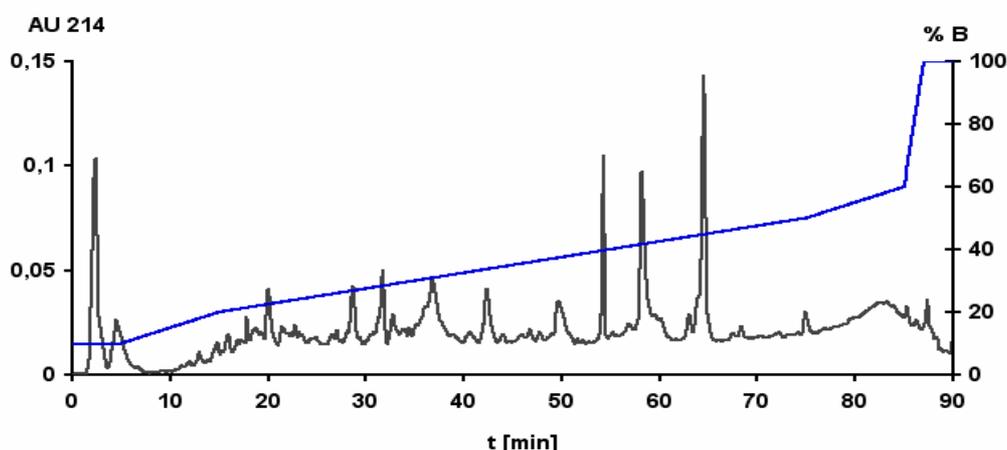


Abb. 22: Chromatographische Auftrennung des gereinigten endogen präsentierte Peptidpools aus 10^{11} CML-Zellen von Patient BK1 über eine RP-C2/C18 reverse-Phase-Säule. Es wurde ein TFA/ACN-Gradient (Eluent A: 0,1% TFA; Eluent B: 0,081% TFA in 80% ACN) gefahren. Die Auftrennung der Peptide erfolgte entsprechend ihrer Hydrophobizität im linearen Gradientenbereich von 20% bis 50% Eluent B (15-75 min). Die Flußrate betrug 150 μ l/min. Fraktionen zu je 150 μ l wurden über die Bereiche von 20%-50% Puffer B automatisch gesammelt. Die UV-Detektion erfolgte bei 214 nm.

Das Peptideluat der anderen Patienten wurde ausschließlich über die *on-line* Technik analysiert. Die Identifizierung der Peptide erfolgte unter Verwendung des Suchalgorithmus Mascot, gegebenenfalls erfolgte auch eine *de novo* Sequenzierung. Für insgesamt 67 Peptide konnte ein klares Sequenzspektrum erhalten werden, für 6 Peptide war das Spektrum nicht ganz eindeutig. Einundsechzig verschiedene Peptidsequenzen konnten auf bekannte Proteine zurückgeführt werden. Zwei Peptide wurden aus Proteinen mit noch unbekannter Funktion identifiziert, ein Peptid konnte nur auf ein hypothetisches Protein zurückgeführt werden.

Tabelle 8: Identifizierte Liganden, die endogen präsentiert auf Zellen von 4 Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie identifiziert wurden. Zusammengefaßt sind die Ergebnisse aus 4 unabhängigen Präparationen. Wo möglich, wurde eine Zuordnung zu den in den Tumorzellen exprimierten HLA-Allelen vorgenommen.

Swiss-Prot <i>accession</i> <i>number</i>	Protein (Position)	Masse (theor.)	Sequenz	Putatives HLA-Allel	Patient
P02571	Actin, cytoplasmic 2 (095-104)	1145.62	RVAPEEHPVL	HLA-A3	BK1
P51825	(Proto-oncogene) AF4 (359-367)	1143.57	ILKEMTHSW	HLA-A3	CP/AP
O96018	Amyloid beta A4 precursor protein-binding family A member 3 (325-333)	1152.58	LYKMLCHVF	HLA-B8	CP3
O15511	ARP2/3 complex 16 kDa subunit (058-067)	1094.64	ALKNPPINTK	HLA-A3	BK1
P55061	Bax inhibitor-1 (045-053)	1103.52	AYVHMVTHF	n.d.	CP3
P35222	Beta-catenin (246-254)	1025.51	SPVDSVLFY	HLA-B7	BK1
P07384	Calpain 1, large [catalytic] subunit (619-627)	1186.65	NYLSIFRKF	n.d.	CP3
P08311	Cathepsin G [Precursor] (234-242)	1163.62	FLPWIRTTM	HLA-A3	CP/AP
P08311	Cathepsin G [Precursor] (236-242)	903.46	PWIRTTM	n.d.	CP/AP
Q14839	Chromodomain helicase-DNA-binding protein 4 (767-775)	1047.53	SLYKEGHSK	HLA-A3	BK1
P08865	Colon carcinoma laminin-binding protein (149-156)	964.46	NTDSPLRY	n.d.	CP1
P04264	Cytokeratin 1 (634-643)	1069.54	VSTTYSGVTR	HLA-A3	BK1
Q9NP97	Dynein light chain 2A isoform a (044-052)	1074.58	SLMHSFILK	HLA-A3	CP1
P17844	DEAD-box protein p68 (148-156)	1037.62	YLLPAIVHI	HLA-A2	BK1 CP/AP CP3

Swiss-Prot <i>accession number</i>	Protein (Position)	Masse (theor.)	Sequenz	Putatives HLA-Allel	Patient
P62875	DNA-directed RNA polymerase II 7.6 kDa polypeptide (058-067)	1187.68	KLLNYAPLEK	HLA-A3	BK1
P42566	Epidermal growth factor receptor substrate 15 (746-754)	945.54	SVSNVVITK	HLA-A3	BK1
Q93063	Exostosin-2 (682-690)	978.52	SVFGTMPLK	HLA-A3	BK1
P02671	Fibrinogen alpha/alpha-E chain (527-536)	1157.56	KTFPGFFSPM	n.d.	CP/AP
Q9Y4J7	Fibroblast growth factor 2-interacting factor (479-487)	1002.51	QIYNPPSGK	HLA-A3	BK1
Q96T53	FKSG89 (061-069)	1069.58	SYLLFFPAL	HLA-A2	BK1 CP1
P06396	Gelsolin precursor (905-913)	993.56	IYKGGTISR	HLA-A3	BK1
P01922	Hemoglobin alpha chain (131-139)	920.52	SVSTVLTSK	HLA-A3	BK1
P02023	Hemoglobin beta chain (035-041)	996.48	YPWTQRF	n.d.	CP/AP CP3
P02023	Hemoglobin beta chain (033-041)	1194.62	VVYPWTQRF	n.d.	CP3
Q92522	Histone H1x (199-207)	924.58	KAAPSVPK	HLA-A3	BK1
P02278	Histone H2B.a/g/h/k/l (117-125)	983.53	AVTKYTSSK	HLA-A3	BK1
P62805	Histone H4 (064-072)	1049.55	NVIRDAVTY	HLA-A3	BK1
P30508	HLA class I histocompatibility antigen Cw*12 (003-011)	1212.61	VMAPRTLIL	HLA-B7	CP/AP
Q30126	HLA-DRB1 protein (005-014)	1050.55	KLPGGSYMAK	HLA-A3	BK1
P09651	hnRNP A1 (014-022)	980.57	KLFIGGLSF	HLA-A3	CP1
P22626	hnRNP A2 / hnRNP B1 (051-059)	1001.53	VVMRDPASK	HLA-A3	BK1
P52597	hnRNP F (192-200)	1061.55	RSYSDPPLK	HLA-A3	BK1
P38159	hnRNP G (280-288)	1168.46	SYRDSYESY	HLA-A3	BK1
Q00839	hnRNP U (324-332)	895.48	ASYGVSKGK	HLA-A3	BK1
Q00839	hnRNP U (807-815)	1132.55	GQFWGQKPW	n.d.	CP/AP CP1
Q9UF18	Hypothetical protein (099-107)	1016.57	FPVSKNNVL	n.d.	CP1

Swiss-Prot <i>accession</i> <i>number</i>	Protein (Position)	Masse (theor.)	Sequenz	Putatives HLA-Allel	Patient
Q9BQ61	Hypothetical protein (126-134)	899.58	ALKTGIVAK	HLA-A3	BK1
P13598	Intercellular adhesion molecule-2 (258-266)	979.49	GTYGVRAAW	HLA-A3	CP/AP
P01584	Interleukin-1 beta (200-208)	1046.51	SVDPKNYPK	HLA-A3	BK1
P61968	LIM domain transcription factor LMO4 (029-037)	1137.65	KIADRFLLY	HLA-A3	BK1 CP1 CP/AP
P12980	Lyl1 protein (070-077)	948.60	LRPPLLQL	HLA-A3	BK1
Q7YQ88	MHC class I antigen (003-011)	998.59	VMAPRTVLL	HLA-B7	CP/AP
Q29939	MHC class I lymphocyte antigen [Fragment] (203-212)	1118.54	HPISDHEATL	n.d.	CP1
O14925	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM23 (161-169)	1000.49	GTMTGMLYKZ	HLA-A2	BK1 CP1
P35579	Myosin heavy chain, nonmuscle type A (778-786)	1004.59	KITDVIIGF	HLA-A3	CP/AP
P19338	Nucleolin (062-070)	984.63	KVVVSPTKK	HLA-A3	BK1
P08567	Pleckstrin (283-292)	1034.54	AEDPLGAIHL	n.d.	CP3
O43660	Pleiotropic regulator 1 (127-135)	939.58	AVALPLQTK	HLA-A3	BK1
Q9P1F1	PRO2037 (052-059)	980.61	KVFKLISF	n.d.	CP/AP
P07737	Profilin I (117-125)	893.51	GVHGGLINK	HLA-A3	BK1
Q9R0T3	Protein kinase inhibitorp58 (225-231)	882.52	FYKISIL	n.d.	CP/AP
Q8IUQ4	Ubiquitin ligase SIAH1 (006-015)	945.51	ATALPTGTSK	HLA-A3	BK1
Q9UHB9	Signal recognition particle 68 kDa protein (476- 484)	1167.67	VLYDRVLKY	HLA-A3	BK1
Q9Y490	Talin 1 (346-354)	1159.62	KTKEVLQEW	n.d.	CP/AP
Q16621	Transcription factor NF-E2 45 kDa subunit (104- 112)	952.60	IPVSKPLSL	HLA-B7	BK1 CP/AP
Q9BUH5	Transgelin 2 (192-199)	976.52	YGMPRQIL	n.d.	CP/AP
P07437	Tubulin beta-1 chain (083-092)	1281.65	QIFRPDNFVF	HLA-A3	CP/AP
P08670	Vimentin (055-067)	1250.63	SPGGVYATR- SSAV	n.d.	CP/AP

Swiss-Prot <i>accession</i> <i>number</i>	Protein (Position)	Masse (theor.)	Sequenz	Putatives HLA-Allel	Patient
P08670	Vimentin (071-079)	926.55	SSVPGVRLI	n.d.	CP/AP
P05386	60S acidic ribosomal protein P1 (015-023)	1039.52	ILHDDEVTV	HLA-A2	BK1
P36578	60S ribosomal protein L4 (100-108)	1136.58	RMFAPKTW	HLA-A3	CP/AP CP1

Viele der identifizierten Peptide resultierten aus Proteinen, die von so genannten *hauskeeping* Genen kodiert werden. Einige der identifizierten Liganden erschienen im Kontext der CML jedoch sehr interessant, da sie auf Proteine mit bereits beschriebener Krebsassoziation zurückgeführt werden konnten oder einen Zusammenhang mit der onkogenen Transformation des BCR/ABL Proteins vermuten ließen.

4.3.1.1 Identifizierte Peptide aus Proteinen des Zytoskeletts und assoziierter Proteine

BCR-ABL induziert vielfältige Veränderungen in der Funktion und Struktur des Zytoskeletts. Siebzig Prozent des BCR-ABL-Proteins sind, gebunden an Aktin, im Zytoskelett lokalisiert und einige der meist prominenten Substrate der Tyrosinkinase sind Proteine des Zytoskeletts (51). In der vorliegenden Arbeit konnten auf BCR-ABL-positiven Zellen endogen präsentiert Peptidliganden aus Proteinen des Zytoskeletts und mit ihm assoziierter Proteine nachgewiesen werden; unter ihnen die Peptide RVAPEEHPVL (AA 95-104) aus zytoplasmatischem Aktin, QIFRPDNFVF (AA 83-92) aus der Tubulin β -1 Kette, SLMHSFILK (AA 44-52) aus Dynein leichter Kette, KTKEVLQEW (AA 346-354) aus Talin und SPVDSVLFY (AA 246-254) aus dem an der Zelladhäsion beteiligten Protein β -Catenin.

4.3.1.2 Identifizierte Peptide aus Aktin-assoziierten und -modulierenden Proteinen mit bekannter Krebsassoziation

Einer Reihe von Aktin-assoziierten und -modulierenden Proteinen wird eine besondere Rolle bei der Carcinogenese verschiedener Krebserkrankungen zugeschrieben. Einige Peptide aus solchen Proteinen wurden auf CML-Zellen endogen präsentiert nachgewiesen wie das Peptid IYKGGTSR (AA 905-913) aus dem aktinregulatorischen Protein Gelsolin, das bereits sehr früh in der Onkogenese bei Mammakarzinomen dysreguliert ist (149-151), der Ligand YGMPRQIL (AA 192-199) aus Transgelin, welches als diagnostischer Marker für Brust- und

Kolonkrebs diskutiert wird (152) und das Peptid GVHGGLINK (AA 117-125) aus Profilin1. Wie neuere Untersuchungen ergaben, sind Änderungen im Gehalt von Profilin1 bei der Entstehung des Brustkrebses beteiligt (153; 154).

4.3.1.3 Identifizierte Peptide aus Transkriptions- und Translations-assoziierten Proteinen

Viele der auf CML-Zellen identifizierten MHC-Klasse-I-Liganden waren Peptide, die auf Histone zurückgeführt werden konnten, welche eine wichtige Rolle bei der Transkription und Translation der wachsenden prä-mRNA spielen. Identifiziert wurden Peptide aus den Histonen hnRNP A2, hnRNP Q2, hnRNP F, hnRNP U, hnRNP G, Histon H4 und H1X. Unter ihnen befand sich auch das heterogene nukleäre Ribonucleoprotein hnRNP A1, aus dem das Peptid KLFIGGLSF (AA 14-21) identifiziert wurde (Abb. 23). hnRNP A1 fungiert als Regulator der normalen Hämatopoese sowie der BCR-ABL Leukämogenese und ist in Zellen von CML-Patienten insbesondere in der Blastenkrise erhöht (155). Nach Iervolino et al. (155) wird vermutet, dass durch die erhöhten hnRNP A1 Proteinspiegel der Kernexport von mRNAs gefördert wird, die für die leukämische Aktivität von BCR-ABL verantwortlich sind, wie dem anti-apoptotischen Protein der BCL-2 Familie BCL-X_L. Das Peptid AYVHMVTHF (AA 45-53) aus dem mit BCL-X_L interagierenden Bax-Inhibitor-1 wurde ebenfalls unter den endogen präsentierten Peptidliganden detektiert. Ferner wurde der Ligand ATALPTGTSK (AA 6-15) aus SIAH1 (*seven in absentia human 1A*), das an zahlreichen zellulären Prozessen wie Transkriptionsregulation und Apoptose beteiligt ist, identifiziert.

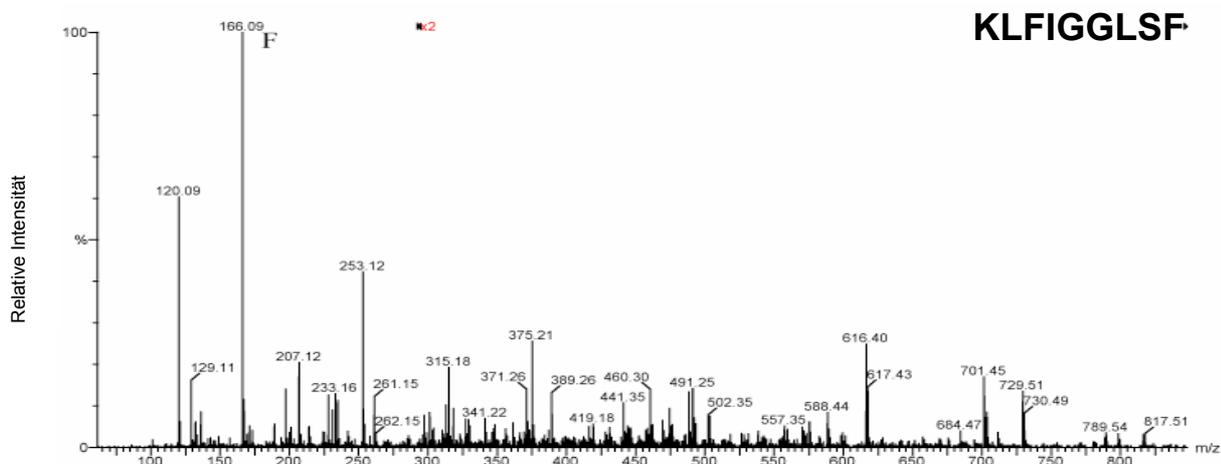


Abb. 23: MS/MS-Fragmentspektrum des Peptidliganden KLFIGGLSF aus hnRNP A1, identifiziert aus dem endogen präsentierten Peptidpool von Zellen des CML-Patienten CP1.

Maligne Transformationen von Zellen sind häufig mit Veränderungen in der Genexpression assoziiert, denen beispielsweise Veränderungen in der Chromatinorganisation oder auch die Dysregulation bestimmter Transkriptionsfaktoren zu Grunde liegen können.

Auf den hier analysierten Zellen wurde das Peptid KVVVSPTKK (AA 62-70) aus Nucleolin, einem Chromatin-assoziierten Protein, das in Krebszellen häufig überexprimiert ist (156), identifiziert sowie IPVSKPLSL (AA 104-112) aus NFE2, dem wichtigsten Transkriptionsfaktor des Differenzierungsprozesses von Erythrozyten und das Peptid NTDSPLRY (AA 149-156) aus dem Laminin-bindenden Protein LBP-40 (synonym 40S ribosomales Protein SA.). LBP-40 ist bei humanen Kolonkarzinomen überexprimiert und wird daher bereits als diagnostischer Marker diskutiert (157). Neben LBP-40 wurden zahlreiche andere Peptidliganden aus ribosomalen Proteinen auf CML-Zellen endogen präsentiert nachgewiesen, die im Rahmen dieser Arbeit jedoch von geringer Relevanz erschienen, da für diese Proteine bislang keine Krankheitsassoziation bekannt ist.

4.3.1.4 Identifizierte Peptide aus protoonkogenen Transkriptionsfaktoren und aus Genprodukten häufig translozierter Gene

Die Entstehung chimärer Transkriptionsfaktoren durch Chromosomentranslokationen ist ein allgemeiner Pathomechanismus vor allem bei akuten Leukämien. Besonders auffällig bei der in dieser Arbeit durchgeführten Analyse von CML-Zellen war der Befund, dass auf allen HLA-A3-positiven CML-Patientenzellen und den HLA-A3-transfizierten K562-Zellen der Ligand KIADRFLLY (AA 29-37) aus dem protoonkogenen Transkriptionsfaktor LMO4 endogen präsentiert wurde. LMO4 zählt zur Familie der LIM *only*-Transkriptionsfaktoren, die insbesondere bei Chromosomentranslokationen bei akuter lymphoblastischer Leukämie (T-ALL) beteiligt sind (158; 159). LMO4 ist eines der jüngst identifizierten Mitglieder dieser Familie, für das zwar noch keine Assoziation bei Chromosomentranslokationen gezeigt wurde, das aber bereits in Verbindung mit Brust- und Prostatakrebs gebracht wurde (144; 145; 160) und ebenfalls als Kandidatengen der T-ALL diskutiert wird (146).

Eine andere Gruppe häufig translozierter Gene bei akuten Leukämien sind Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktoren, zu denen LYL1 zählt. Aus diesem Protein wurde der endogen präsentierte Ligand LRPPLLQL (AA 70-77) identifiziert (Abb. 24). Ly11 ist vor allem bei akuter lymphoblastischer Leukämie (T-ALL) von Bedeutung, bei der eine Translokation von Ly11 in die T-Zellrezeptor β -Kette zur malignen Transformation führen kann (161; 162).

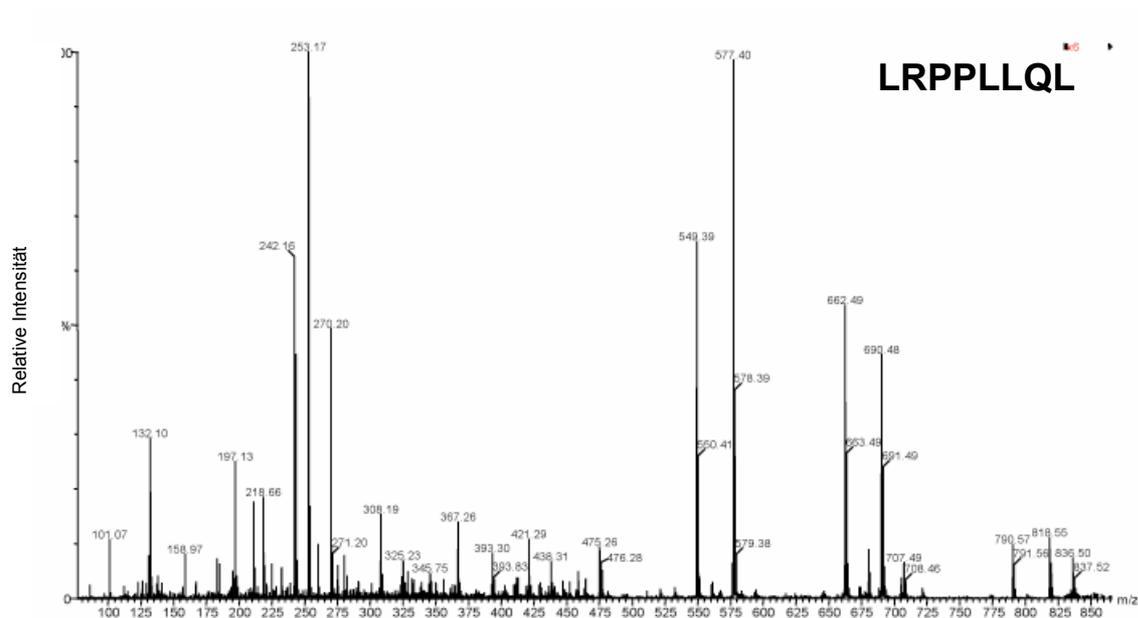


Abb. 24: MS/MS-Fragmentspektrum des Peptidliganden LRPPLLQL aus LYL1, identifiziert aus dem endogen präsentierten Peptidpool von CML-Zellen des Patienten BK1.

Ferner wurden auf den analysierten CML-Zellen endogen präsentierte Peptide aus zwei Protoonkogenen identifiziert, die potentielle Fusionspartner für das MLL (*Mixed Lineage Leukemia*) Gen darstellen. Es handelt sich um das Peptid SVSNVVITK (AA 746-754) aus dem Protoonkogen Eps15 (*epidermal growth factor receptor substrate 15*) (163) und das Peptid ILKEMTHSW (AA 33-42) aus AF4, dem prominentesten Fusionspartner von MLL. AF4 stellt vermutlich einen positiven Regulator bei der Expression kritischer Zielgene dar, die für den korrekten Ablauf der Lymphopoese benötigt werden (164).

4.3.2 Evaluierung der identifizierten Peptidliganden als potentielle Tumorstoffe

Um aus der Fülle der identifizierten Liganden solche in eine engere Auswahl aufzunehmen, die für einen immuntherapeutischen Ansatz potentiell geeignet sind, wurden für Liganden aus noch wenig charakterisierten Proteinen weitere Experimente durchgeführt. Zum einen wurde zur Fokussierung auf immuntherapeutisch relevante Peptide eine Analyse des Peptidrepertoires gesunder Zellen durchgeführt, zum anderen stellte eine Gen-Chip Analyse ein sehr schnelles *Screening* Verfahren dar, um potentielle tumorassoziierte Antigene zu benennen.

4.3.2.1 Analyse des Peptidrepertoires gesunder Zellen

Damit ein Peptid als Tumorstoff in Betracht gezogen werden kann, sollte der identifizierte Ligand möglichst nicht auf gesundem Gewebe präsentiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb auch das endogen präsentierte MHC-Klasse-I-Peptidrepertoire auf Zellen gesunder Spender untersucht. Hierfür wurden humane Milzen verwendet. Aufgrund der hohen Anzahl an Leukozyten stellen Milzen die am besten verfügbare Kontrolle für Leukozytenantigene dar. Vier humane Milzen, drei davon HLA-A3-positiv (davon eine HLA-A3/HLA-B8-positiv), wurden analog der Vorgehensweise bei CML einer Peptidextraktion und -analyse unterzogen. Die identifizierten Liganden sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Identifizierte Liganden, die endogen präsentiert auf Milzzellen von 4 gesunden Spendern nachgewiesen wurden. Zusammengefaßt sind die Ergebnisse aus 4 unabhängigen Präparationen. Wo möglich, wurde eine Zuordnung zu den in den Spendern exprimierten HLA-Allelen vorgenommen.

Swiss-Prot accession number	Protein (AA Position)	Masse (theor.)	Sequenz	Putatives HLA-Allel	Milz
O43707	Alpha-actinin 4 (205-212)	1055.54	HRPELIEY	n.d.	4
P55061	Bax inhibitor-1 (045-053)	1103.52	AYVHMTTHF	n.d.	4
P02570	Beta-actin (095-104)	1145.62	RVAPEEHPVL	HLA-A3	3, 4
P60709	Beta-actin (096-104)	989.52	VAPEEHPVL	HLA-B8	3
P60709	Beta-actin (098-106)	1033.54	PEEHPVLLT	n.d.	2, 4
P60709	Beta-actin (143-153)	1154.58	YASGRTTGIVM	n.d.	2, 3
P60709	Beta-actin (095-105)	1258.70	RVAPEEHPVLL	n.d.	3
P62158	Calmodulin (010-019)	1087.59	AEFKEAFSLF	HLA-A2	1
Q00610	Clathrin heavy chain 1 (421-430)	1190.63	LLDQGQLNKY	HLA-A1	1
P08865	Colon carcinoma laminin-binding protein (149-156)	964.46	NTDSPLRY	n.d.	1
Q92879	CUG triplet repeat RNA-binding protein 1 (120-128)	1123.53	TENDIRVMF	n.d.	1
Q14094	Cyclin I (072-080)	1046.61	LLDRFLATV	HLA-A2	1
P17844	DEAD-box protein p68 (148-156)	1037.63	YLLPAIVHI	HLA-A2	1

Swiss-Prot <i>accession</i> <i>number</i>	Protein (AA Position)	Masse (theor.)	Sequenz	Putatives HLA-Allel	Milz
P06396	Gelsolin precursor, plasma (595-604)	1061.61	VLKTPSAAYL	HLA-A3	3
P06396	Gelsolin precursor, plasma (318-327)	1073.55	ENPFAQGALK	HLA-A3	3
P06396	Gelsolin precursor, plasma (318-328)	1160.58	ENPFAQGALKS	HLA-A3	3
P06396	Gelsolin precursor, plasma (768-776)	1057.52	WSVDPLDRA	HLA-A3	3
Q06210	GFAT 1 (217-225)	1057.54	STDHIPILY	HLA-A1	1
P02023	Hemoglobin beta chain (023-031)	870.49	VGGEALGRL	n.d.	3
P02023	Hemoglobin beta chain (032-040)	1160.63	LVVYPWTQR	HLA-A3	3
P02023	Hemoglobin beta chain (033-041)	1194.62	VVYPWTQRF	HLA-A3	1-4
P02023	Hemoglobin beta chain (034-041)	1095.55	VYPWTQRF	n.d.	3
P02023	Hemoglobin beta chain (035-041)	996.48	YPWTQRF	n.d.	1, 3
P91879	Histone H4 (066-073)	1049.22	NVIRDAVTY	HLA-A3	2
P26599	hnRNP I (466-474)	1078.55	SEEDLKVLF	HLA-A1	1
O60506	hnRNP Q3 (339-347)	1044.61	VLFVRNLAN	HLA-A2	1
Q8TCP9	Hypothetical protein (417-425)	1097.71	KEIKLEILL	HLA-A2	1
Q9HDA7	Hypothetical protein (131-139)	1171.60	FIWENIHTL	HLA-A2	1
P04207	Ig kappa chain V-IIIregion CLL (001-009)	1018.52	MEAPAQLLF	HLA-A1	1
P01708	Ig lambda chain V-II region BUR (051-059)	980.46	YEVSSRPSG	n.d.	3
P13796	Lymphocyte cytosolic protein 1 (605-613)	1045.63	VEVNPKMVM	HLA-B8	3
Q9UL63	Muskelin (649-658)	1132.61	QVDPLSALKY	HLA-A1	1
Q96RQ5	Neuroplastoma apoptosis-related RNA-binding protein 3 (120-128)	1136.53	NENDIRVMF	n.d.	1
Q8N138	ORMDL3 (134-142)	1019.67	VLIPKLPQL	HLA-A2	1
P08567	Pleckstrin (282-291)	1034.54	AEDPLGAIHL	HLA-A2	1
P08670	Vimentin (115-123)	1166.64	NYIDKVRFL	n.d.	1
P62241	40S ribosomal protein S8 (074-082)	1105.65	KTRIIDVVY	HLA-A1	1
P62829	60S ribosomal protein L23 (051-061)	1084.57	RLPAAGVGDMV	n.d.	1

Von besonderem Interesse war der Befund, dass das auf allen HLA-A3-positiven CML-Zellen und KA3.2-Transfektanten nachgewiesene Peptid LMO4-KIADRFLLY in keiner einzigen Präparation von HLA-A3-positiven Milzzellen detektiert werden konnte.

Ein Vergleich der auf humanem Milzgewebe nachgewiesenen Liganden mit Tabelle 8 zeigte, dass vier der auf CML-Zellen identifizierten Liganden auch auf gesundem Gewebe präsentiert werden. Diese sind YLLPAIVHI aus dem RNA-Helikase *DEAD-box protein p68*, NTDSPLRY aus LBP-40 (synonym *Colon carcinoma laminin-binding protein* oder 40S ribosomales Protein SA), RVAPEEHPVL aus β -Aktin und AYVHMVTHF aus dem Bax Inhibitor-1. Ferner wurden Peptidliganden auf humanen Milzzellen identifiziert, die aus der Peptidprozessierung von Proteinen resultierten, aus denen bereits andere, nicht sequenzidentische Liganden auch auf CML-Zellen nachgewiesen wurden. Diese sind Vimentin NYIDKVRFL (AA 115-123), Histon H4 NVIRDAVTY (AA 66-73) und die Liganden ENPFAQGALK (AA 318-327), ENPFAQGALKS (AA 318-328), WSVDPLDRA (AA 768-776), VLKTPSAAYL (AA 595-604) aus dem Gelsolin *Precursor* Protein.

4.3.2.2 Gen-Chip Expressionsanalyse

Die Identifizierung von tumorspezifischen Antigenen stellt einen sehr seltenen Idealfall dar. Die überwiegende Mehrzahl potentiell immuntherapeutisch relevanter Peptide sind daher tumorassoziierte Antigene. Dies sind Peptide, die aus der Prozessierung solcher Proteine resultieren, die in Tumorzellen überexprimiert sind, jedoch auch in (manchen) gesunden Geweben exprimiert werden. Um unter den identifizierten Liganden tumorassoziierte Antigene benennen zu können, für die in der Literatur keine Information verfügbar ist, würde eine Proteinanalyse die Methode der Wahl darstellen. Aus Kosten- und Zeitgründen sowie (in manchen Fällen) der Nichtverfügbarkeit entsprechender Antikörper wird jedoch in der Praxis ein schnelles *Screening*-Verfahren wie es die Gen-Chip Expressionsanalyse bietet, bevorzugt.

Zur Durchführung dieses Verfahrens war es im Rahmen dieser Arbeit möglich, intakte RNA aus den Zellen von einem der vier untersuchten CML-Patienten (Patient BK1) zu präparieren. Hierüber gelang es, eine vergleichende Analyse des Genexpressionsprofils zwischen CML-Zellen versus Leukozyten gesunder Spender (gepoolt aus 4 Spendern) durchzuführen. Die Analyse erfolgte auf zwei getrennten Gen-Chips unter Verwendung des *Affymetrix Oligonukleotidarray HG-U133A*. Dieser *Array* enthielt etwa 22 000 so genannter Probesets. Jedes dieser Probesets entspricht in der Regel einem Gen. Für die meisten Gene, die Proteine kodierten, aus denen Peptide auf CML-Zellen identifiziert worden waren, war auf dem verwendeten Gen-Chip ein solches Probeset vorhanden. Unter diesen Genen

wiesen einige ein deutlich verändertes Expressionsniveau in CML-Zellen im Vergleich zu gesunden Leukozyten auf. Diese Ergebnisse sind in Abb. 25 zusammengefasst.

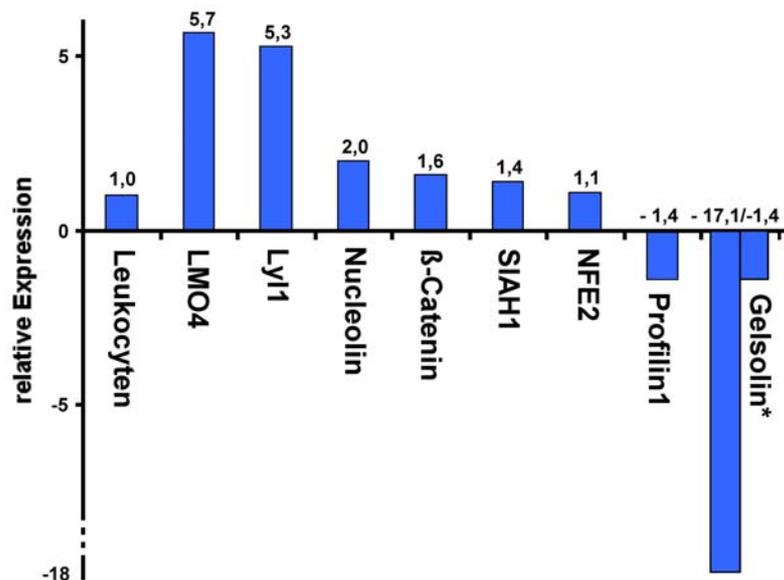


Abb. 25: Expressionsanalyse möglicher tumorassoziierter Gene bei Patient BK1 im Vergleich zu Leukozyten gesunder Spender mittels Affymetrix Oligonukleotidarray-Technologie. Die Analyse erfolgte wie unter 3.2.8 beschrieben unter Verwendung des Affymetrix Oligonukleotidarray HG-U133A. Über den Balken des Diagramms ist jeweils die relative Expression für CML-Zellen (Patient BK1) im Vergleich zu Leukozyten gesunder Spender (willkürlich auf 1,0 gesetzt) angegeben. *Für Gelsolin sind die Ergebnisse zweier Oligonukleotidsequenzen, die unterschiedliche Bereiche dieses Gens abdecken, dargestellt. LMO4 und Lyl1 sind in CML-Zellen des Patienten BK1 stark überexprimiert.

Die deutlichsten Unterschiede wurden für die protoonkogenen Transkriptionsfaktoren LMO4 und Lyl1 detektiert. Die gemessenen Werte für LMO4 waren in CML-Zellen nahezu 6fach gegenüber den Werten für Leukozyten gesunder Spender erhöht. Dieses Ergebnis konnte auch durch konventionelle Northern-Blot Technik bestätigt werden (Abb. 26). Ein ähnlich erhöhter Wert (Faktor 5,3) wurde für den onkogenen Transkriptionsfaktor Lyl1 gemessen. Daher wurde in weiteren Experimenten näher auf die Transkriptionsfaktoren LMO4 und Lyl1 fokussiert. Überexprimierte Gene waren darüber hinaus Nucleolin und β-Catenin. Auch SIAH1 und NFE2 zeigten tendenziell in CML-Zellen eine gegenüber gesunden Leukozyten erhöhte Genexpression.

Auffällig war, dass die Genexpression von Profilin1 und Gelsolin in CML-Zellen zum Teil deutlich gegenüber Leukozyten gesunder Spender verringert war. Eine verringerte Expression dieser Gene in Tumorzellen ist bereits für andere Krebserkrankungen bekannt. In der hier durchgeführten Genexpressionsanalyse wurde zum ersten Mal gezeigt, dass dies auch für CML-Zellen zutrifft. Für einen immuntherapeutischen Ansatz sind die aus Gelsolin

und Profilin1 identifizierten Peptide deshalb nicht geeignet. Das Ergebnis könnte aber einen interessanten Ausgangspunkt für andere Therapieansätze darstellen.

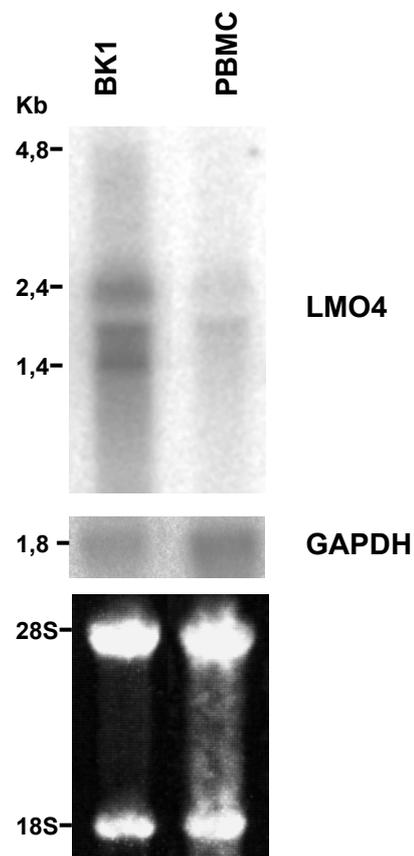


Abb. 26: Northern-Blot Analyse der LMO4-Expression in Zellen des Patienten BK1. Gesamt-RNA wurde auf einem 1,2% Agarosegel elektrophoretisch getrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Zur Kontrolle wurde Gesamt-RNA aus Leukozyten eines gesunden Spenders mitgeführt. Die Membran wurde mit einer ^{32}P -markierten LMO4-spezifischen Sonde hybridisiert. Die Menge der geladenen RNA wurde durch Hybridisierung mit einer ^{32}P -markierten GAPDH-spezifischen Sonde überprüft. Die Autoradiographie erfolgte über 12 Tage. Das Ethidium-Bromid gefärbte Gel (im Bild unten) zeigt die 28S und 18S ribosomale RNA nach elektrophoretischer Trennung. Die Northern-Blot Analyse bestätigt die stark erhöhte Expression von LMO4 in CML-Zellen des Patienten BK1.

4.3.3 Untersuchungen zu LMO4

4.3.3.1 Analyse der gewebespezifischen Expression von LMO4

Zur weiteren Evaluierung von LMO4 wurde die mRNA-Expression von LMO4 in verschiedenen humanen Geweben untersucht. Wie der in Abb. 27 dargestellte Northern-Blot zeigt, weisen die meisten Gewebe nur eine geringe LMO4-Expression auf. Keine oder nur minimale Transkripte sind in Lunge, Leber, Niere und Pankreas zu finden. Auch Herz und Plazenta zeigten nur sehr geringe Mengen an LMO4-spezifischer mRNA, wohingegen die Signalstärke der LMO4-Transkripte für Gehirn und Skelettmuskel deutlich stärker waren. Diese Ergebnisse stimmen mit den bereits zuvor von Racevskis et al. (165) gezeigten Daten überein. Im Unterschied zu der von Racevskis durchgeführten Analyse sind auf dem hier verwendeten Blot ebenfalls starke Signale für die Expression von LMO4 in Gehirn detektiert worden.

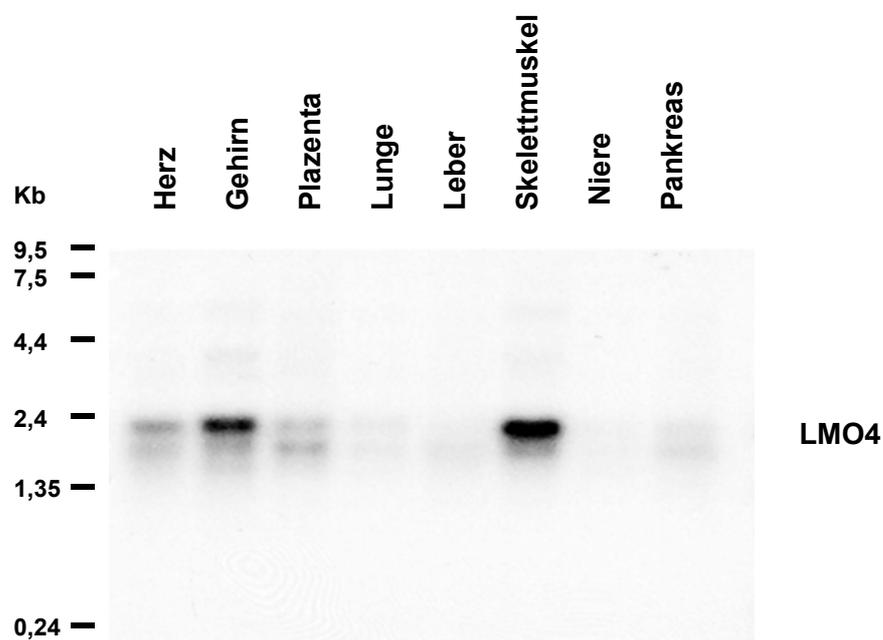


Abb. 27: LMO4-Expressionsanalyse in humanen Geweben von gesunden Spendern. Eine Northern-Blot Membran (*human MTNTM Blot*; Clontech), die 2 µg poly(A)⁺RNA je Spur von 8 verschiedenen humanen Geweben aus gesunden Spendern enthielt, wurde gegen eine ³²P-markierte LMO4-spezifische Sonde hybridisiert. Die Autoradiographie erfolgte über 12 Tage. LMO4 ist unterschiedlich stark in gesunden Geweben exprimiert, mit höchster Expression in Gehirn und Skelettmuskel.

4.3.3.2 Analyse der LMO4-Expression in verschiedenen humanen Tumoren

Zur weiteren Charakterisierung von LMO4 wurde in einem Northern-Blot die Expression von LMO4 in verschiedenen humanen Tumoren analysiert (Abb. 28). Die höchste Expression wurde bei Eierstocktumor festgestellt. Überraschenderweise lag diese weit über dem Expressionsniveau der LMO4-Transkripte bei Brustkrebs. In Tumoren des Rektums und Kolons waren keine LMO4-Transkripte zu detektieren. Auch bei Lungentumor wurden nur minimale LMO4-Transkripte nachgewiesen. Verglichen hierzu wurde bei Uterus-, Magen- und Nierentumor eine stärkere LMO4-Expression festgestellt.

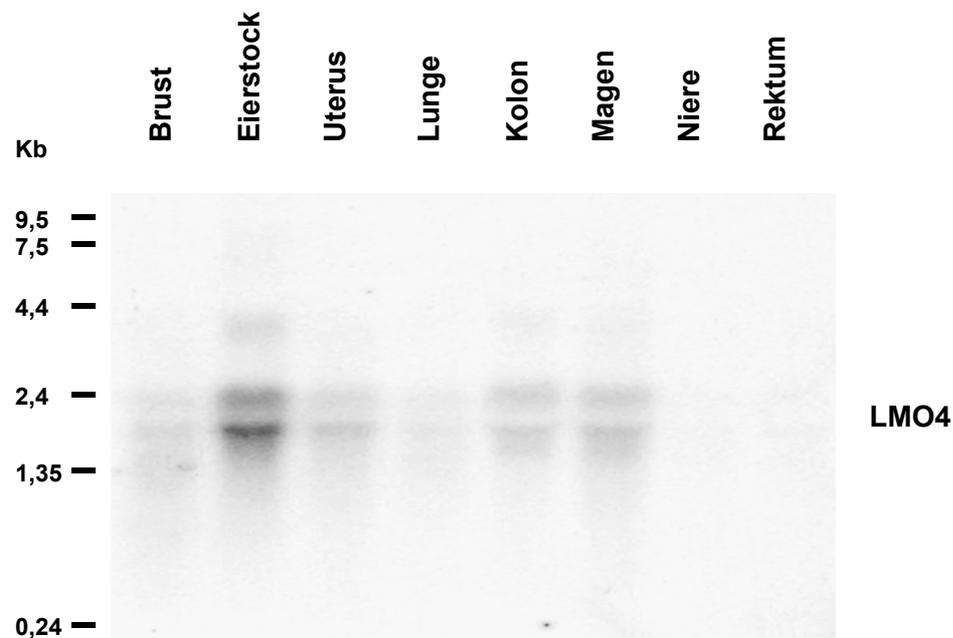


Abb 28: LMO4-Expressionsanalyse in verschiedenen humanen Tumoren. Eine Northern-Blot Membran (*human tumor MTNTM Blot*, Clontech), die 10 µg Gesamt-RNA je Spur von 8 verschiedenen Tumorgewebeprobe n enthielt, wurde gegen eine ³²P-markierte LMO4-spezifische Sonde hybridisiert. Die Autoradiographie erfolgte über 12 Tage. LMO4 ist am stärksten in Eierstocktumor exprimiert.

4.3.3.3 LMO4-Expressionsanalyse unter dem Einfluß des Tyrosinkinase-Inhibitors STI 572

Ziel der nachfolgenden Experimente war es, den Einfluß der ^{P210}BCR-ABL-Tyrosinkinase auf die Expression des LMO4-Gens zu untersuchen. Hierfür wurde in BCR-ABL-positiven Zellen gezielt die Tyrosinkinaseaktivität durch Applikation von STI 571, einem spezifischen

Tyrosinkinase-Inhibitor, inhibiert. In einem Vorversuch wurde die optimale STI 571-Konzentration für K562-Zellen ermittelt, bei der in einem Zeitfenster von 24 h bereits eine Wirkung des Tyrosinkinase-Inhibitors zu beobachten ist, der Prozentsatz apoptotischer Zellen jedoch unter 50% liegt (Abb. 29).

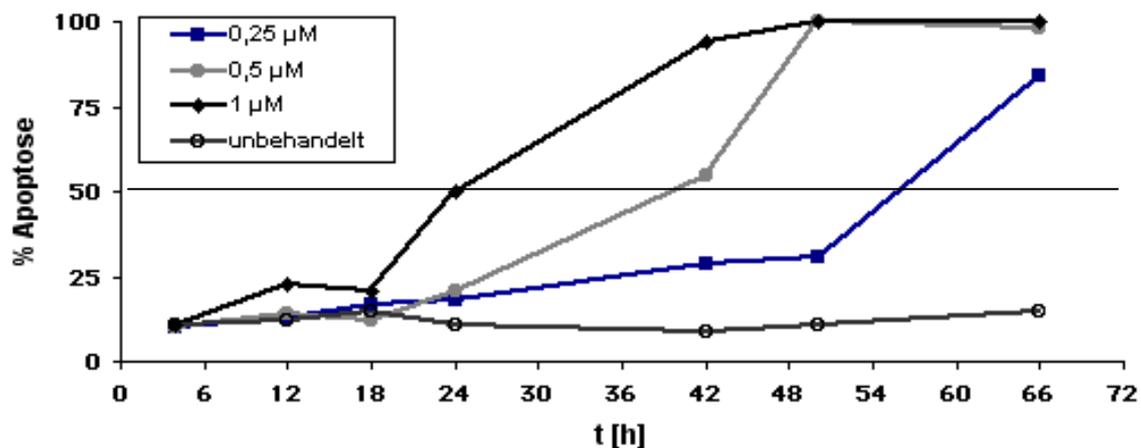


Abb. 29: Anteil apoptotischer K562-Zellen nach Applikation des Tyrosinkinase-Inhibitors STI 571. K562-Zellen wurden über ein Zeitintervall von 72 h mit verschiedenen STI 571-Konzentrationen inkubiert, die sich an den Konzentrationen von Gambacorti-Passerini et al. (166) orientierten. Zur Kontrolle wurden STI 571-unbehandelte K562-Zellen mitgeführt. Der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen mit charakteristischen, fragmentierten Kernen wurde durch Acridinorange-Färbung bestimmt. Die Werte beziehen sich auf Einzelmeßwerte eines einmalig durchgeführten Experiments. Der kritische Schwellenwert von 50% apoptotischer K562-Zellen wurde bereits 24 h nach 1 µM STI 571 Applikation erreicht, bei niedrigeren Konzentrationen dagegen erst nach 42 h (0,25 µM) oder 54 h (0,5 µM).

Wie in Abbildung 29 zu erkennen ist, stieg die Zahl apoptotischer Zellen mit zunehmender STI 571 Konzentration an. Der kritische Schwellenwert von 50% apoptotischer K562-Zellen wurde bereits 24 h nach 1 µM STI 571 Applikation erreicht. Die mit den niedrigeren STI 571-Konzentrationen behandelten Zellen wiesen zu diesem Zeitpunkt dagegen nur 18% (0,25 µM) bzw. 21% (0,5 µM) apoptotische Zellen auf und erreichten den kritischen Schwellenwert erst nach 42 h (0,25 µM) bzw. 54 h (0,5 µM). Es wurde daher eine Konzentration von 0,5 µM STI 571 gewählt, um den Einfluß der ^{P210}BCR-ABL-Tyrosinkinase auf die Transkription von LMO4 in K562-Zellen zu untersuchen (Abb. 30).

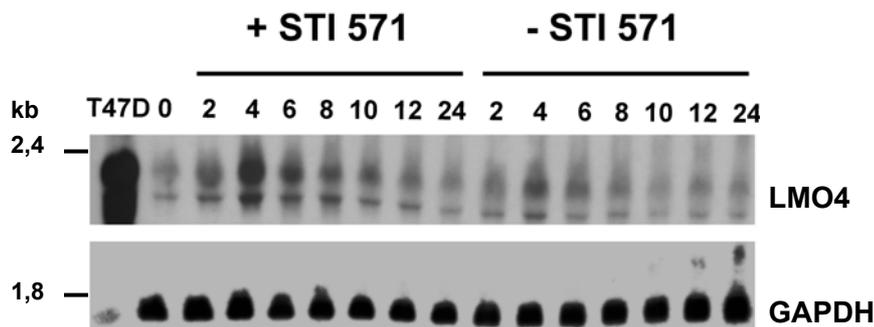


Abb. 30: Analyse der LMO4-Expression in K562-Zellen ohne STI 571 und nach Applikation von 0,5 μ M STI 571 über verschiedene Zeitintervalle. Gesamt-RNA (20 μ g) von STI 571 behandelten und unbehandelten K562-Zellen wurde, wie in Abb. 26, auf einer Nitrozellulose-Membran gegen eine LMO4- und GAPDH-spezifische Sonde hybridisiert. Zur Kontrolle wurde Gesamt-RNA aus der LMO4-überexprimierenden Brustepithel-Zelllinie T47D mitgeführt (145). Die Autoradiographie erfolgte über 12 Tage. Gezeigt ist eines von zwei unabhängigen Experimenten. Die Applikation des Tyrosinkinase-Inhibitors STI 571 zeigte keinen Einfluß auf das mRNA-Expressionsniveau von LMO4 in K562 Zellen.

Wie aus Abb. 30 ersichtlich wird, waren über den Zeitraum von 24 h Schwankungen in der Expression des LMO4-Gens zu verzeichnen. In den ersten vier Stunden stieg die Menge der LMO4-Transkripte stetig an, sank anschließend jedoch wieder und erreichte nach 24 h das Ausgangsniveau. Diese Schwankungen waren sowohl in STI 571 behandelten wie auch in unbehandelten K562-Zellen zu beobachten. Eine Wiederholung des Experiments mit den CML-Zelllinien LAMA-84 und KU-812 (im Rahmen einer unter meiner Anleitung durchgeführten Diplomarbeit (175)), führte zu einem ähnlichen Resultat. Daraus ist zu schließen, dass die Aktivität der BCR-ABL-Tyrosinkinase keinen Einfluß auf die mRNA-Expression von LMO4 ausübt.

4.3.3.4 LMO4-Expressionsanalyse in CML-Patienten und gesunden Spendern

In einem weiteren Northern-Blot Experiment wurde die Expression des LMO4-Gens sowohl in Milzzellen und PBMCs gesunder Spender (Abb. 31) als auch in CML-Patientenzellen untersucht, von denen fünf zum Zeitpunkt der Analyse unter einer Therapie mit STI 571 standen (Abb. 32).

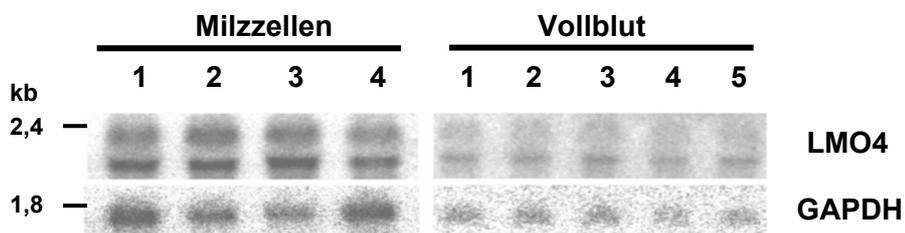


Abb. 31: Analyse der LMO4-Expression in Milzzellen und PBMCs von gesunden Spendern. Gesamt-RNA (10 µg) wurde, wie in Abb. 26, auf einer Nitrozellulose-Membran gegen eine LMO4- und GAPDH-spezifische Sonde hybridisiert. Die Detektion der Signale erfolgte über einen Phosphorimager. Milzzellen und PBMCs weisen ein konstantes LMO4-Expressionsniveau auf.

Die Expression des LMO4-Gens bei gesunden Menschen (Abb. 31) ist auf einem sehr konstanten Expressionsniveau. Dieses Resultat wurde sowohl für Milzzellen als auch für PBMCs erzielt, die aus unterschiedlichen Spendern erhalten worden waren.

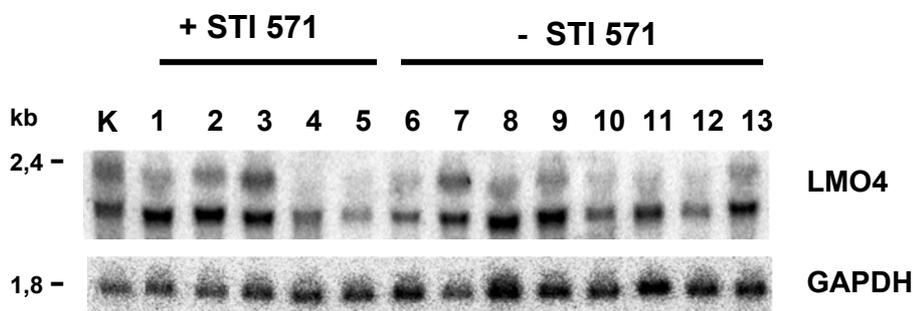


Abb. 32: Analyse der LMO4-Expression in CML-Patientenzellen. Die CML-Patienten 1-5 wurden zum Zeitpunkt der Analyse mit STI 571 therapiert, die Patienten 6-13 erhielten zum Zeitpunkt der Analyse eine alternative Therapie oder waren unbehandelt. Zur Kontrolle wurde Gesamt-RNA aus Milzzellen eines gesunden Spenders (Spender 2; Abb. 31) mitgeführt. Je Spur wurden 10 µg Gesamt-RNA geladen und wie in Abb. 26 auf einer Nitrozellulose-Membran gegen eine LMO4- und GAPDH-spezifische Sonde hybridisiert. Die Detektion der Signale erfolgte über einen Phosphorimager. Unabhängig von einer Therapie mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor STI 571 ist die Expression von LMO4 in Zellen von CML-Patienten heterogen.

Im Gegensatz zu Zellen gesunder Spender weist die mRNA-Expression von LMO4 in CML-Patientenzellen ein stark heterogenes Bild auf (Abb. 32). In den Zellen der STI 571 behandelten Patienten lag die Expression in drei Proben leicht über dem Niveau wie es in den Zellen von gesunden Spendern detektiert wurde und je eine Probe zeigte ein darunter liegendes oder unverändertes Niveau. Ähnliche Resultate wurden für die Gruppe der alternativ zu STI 571 therapierten oder unbehandelten Patienten erhalten. Zwei Proben

wiesen eine LMO4-Überexpression auf, drei zeigten eine LMO4-Expression ähnlich dem Niveau gesunder Zellen und in drei Fällen wurde eine geringere LMO4-Transkriptmenge als in der Referenzprobe festgestellt.

Dieses Experiment zeigt, dass bei CML erkrankten Patienten die Expression des LMO4-Gens dysreguliert ist. Ein direkter Zusammenhang zwischen den veränderten LMO4-Expressionsstärken und der Aktivität der BCR-ABL-Tyrosinkinase scheint auf mRNA-Ebene nicht gegeben zu sein.

4.3.3.5 Identifizierung potentieller LMO4-Peptidliganden mit HLA-A2-Restriktion

Immunologische Untersuchungen in unserem Labor an 3 HLA-A3-positiven CML-Patienten lieferten erste Hinweise darauf, dass CML-Patienten eine spontane T-Zell-Antwort gegen das HLA-A3-restringierte Peptid KIADRFLLY aus LMO4 generieren können (Daten nicht gezeigt). Für eine peptidbasierende CML-Immuntherapie wäre es wünschenswert, therapeutisch relevante Peptide zu benennen, die eine möglichst große Patientengruppe ansprechen. Da das HLA-A2 Allel mit einer prozentualen Repräsentanz von fast 40% das am häufigsten vertretene HLA-Klasse-I Allel in der kaukasischen Bevölkerung darstellt, wurde deshalb nach HLA-A2-restringierten Peptidliganden gesucht, die aus der Sequenz des LMO4-Proteins abgeleitet werden können. Mit Hilfe prädiktiver Computerprogramme wurden 10 Peptide ausgewählt, die bei der Epitopvorhersage am besten bewertet worden waren (siehe 3.1.13 Tabelle 3). Diese wurden synthetisch hergestellt und anschließend in einem MHC-Stabilisierungsversuch mit der TAP-Transporter defizienten Zelllinie 174 x CEM (T2) auf HLA-A2-Bindung in einer durchflusszytometrischen Analyse untersucht. Aus dieser Analyse gingen die Peptide LMO4-102, LMO4-70 und LMO4-30 als die drei best-bindenden HLA-A2-Liganden hervor (Abb. 33).

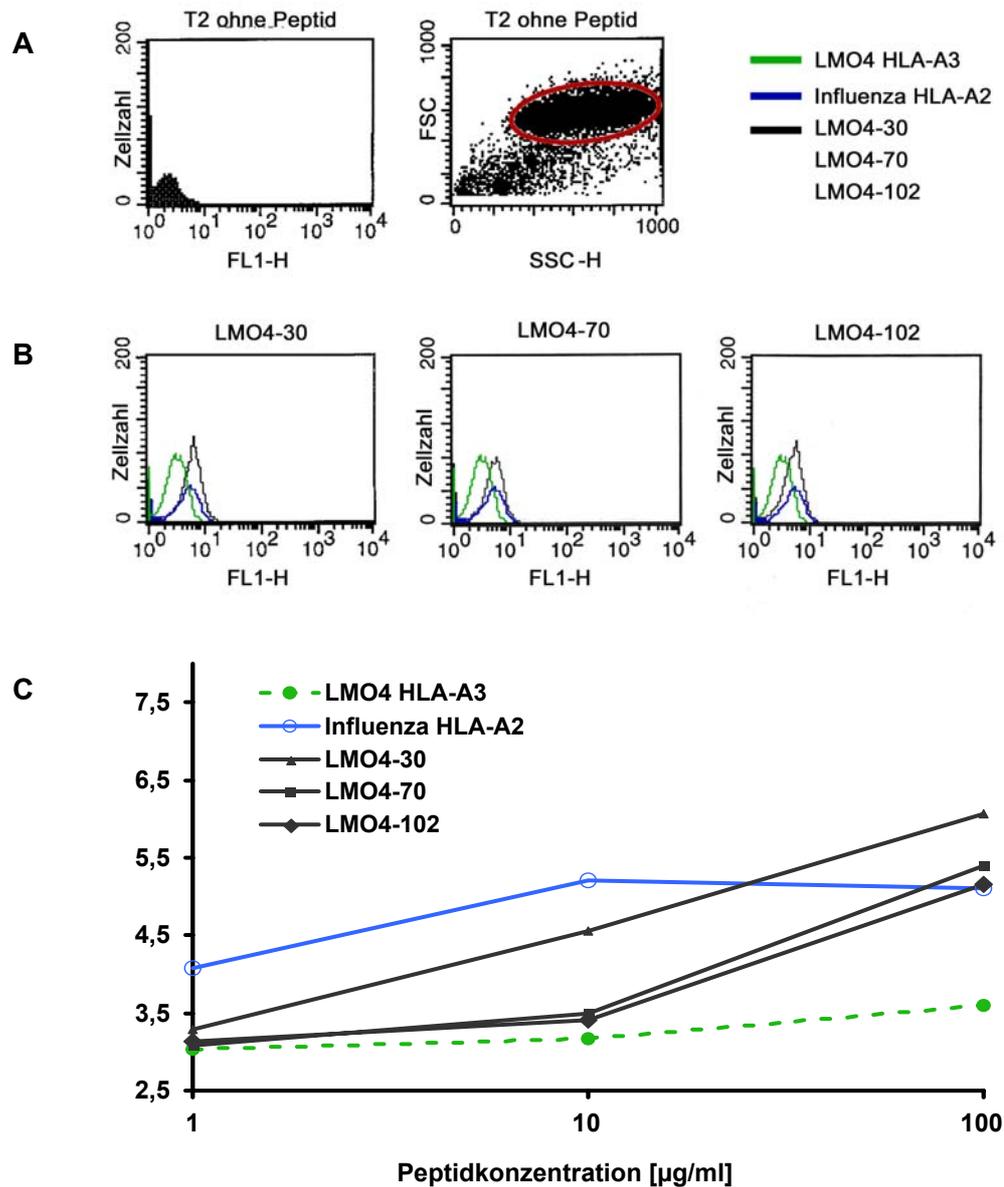


Abb. 33: Bindungsspezifität verschiedener vorhergesagter LMO4-abgeleiteter Peptide mit potentieller HLA-A2-Restriktion über einen MHC-Stabilisierungsversuch mit der TAP-defizienten Zelllinie T2 (174 x CEM T2). T2-Zellen wurden über Nacht mit unterschiedlichen Konzentrationen synthetischer LMO4-abgeleiteter Peptide inkubiert. Zum Nachweis der Bindungsspezifität für HLA-A2 wurde die Menge der durch exogene Peptidzugabe stabilisierten MHC-Klasse-I-Komplexe an der Zelloberfläche durchflusszytometrisch gemessen. Hierfür wurde ein Anti-HLA-A2-spezifischer Antikörper eingesetzt. In **A**) dargestellt sind Histogramm und Dot-Blot von T2-Zellen ohne Zusatz synthetischen Peptids und **B**) jeweils überlappend die Histogramme von T2-Zellen inkubiert mit LMO4-30 (IADRFLLYA), LMO4-70 (MILCRNDYI) oder LMO4-102 (RAQGNVYHL) und den Kontrollansätzen mit HLA-A2 restringiertem Influenza-Peptid GILFVFTL und dem HLA-A3-restringierten Peptid LMO4-KIADRFLLY. **C**) Graphische Darstellung der Werte der mittleren Fluoreszenz für die drei best-bindenden Peptide LMO4-30, -70 und -102. Gezeigt ist das Resultat für eines von zwei ähnlichen Experimenten.

4.3.4 Untersuchungen zu Lyl1

Wie weiterhin in unserem Labor gezeigt werden konnte, ist es auch möglich Lyl1-LRPPLLQL spezifische T-Zellen im Blut von CML-Patienten nachzuweisen (Daten nicht gezeigt). In Analogie zu den Versuchen unter 4.3.3.5 wurde untersucht, ob aus der Proteinsequenz von Lyl1 Peptide mit potentieller HLA-A2 Restriktion abgeleitet werden können. Neun Peptide, die bei der Epitopvorhersage am besten bewertet worden waren (siehe 3.1.13 Tabelle 3), wurden synthetisch hergestellt und in einem MHC-Stabilisierungsversuch auf HLA-A2 Bindung untersucht. Wie die durchflusszytometrische Analyse der Zellen zeigte, wurden die besten Resultate bezüglich der Stabilisierung von MHC-Klasse-I-Molekülen nach exogener Peptidzugabe mit den Peptiden Lyl1-42, Lyl1-79 und Lyl1-191 erzielt (Abb. 34).

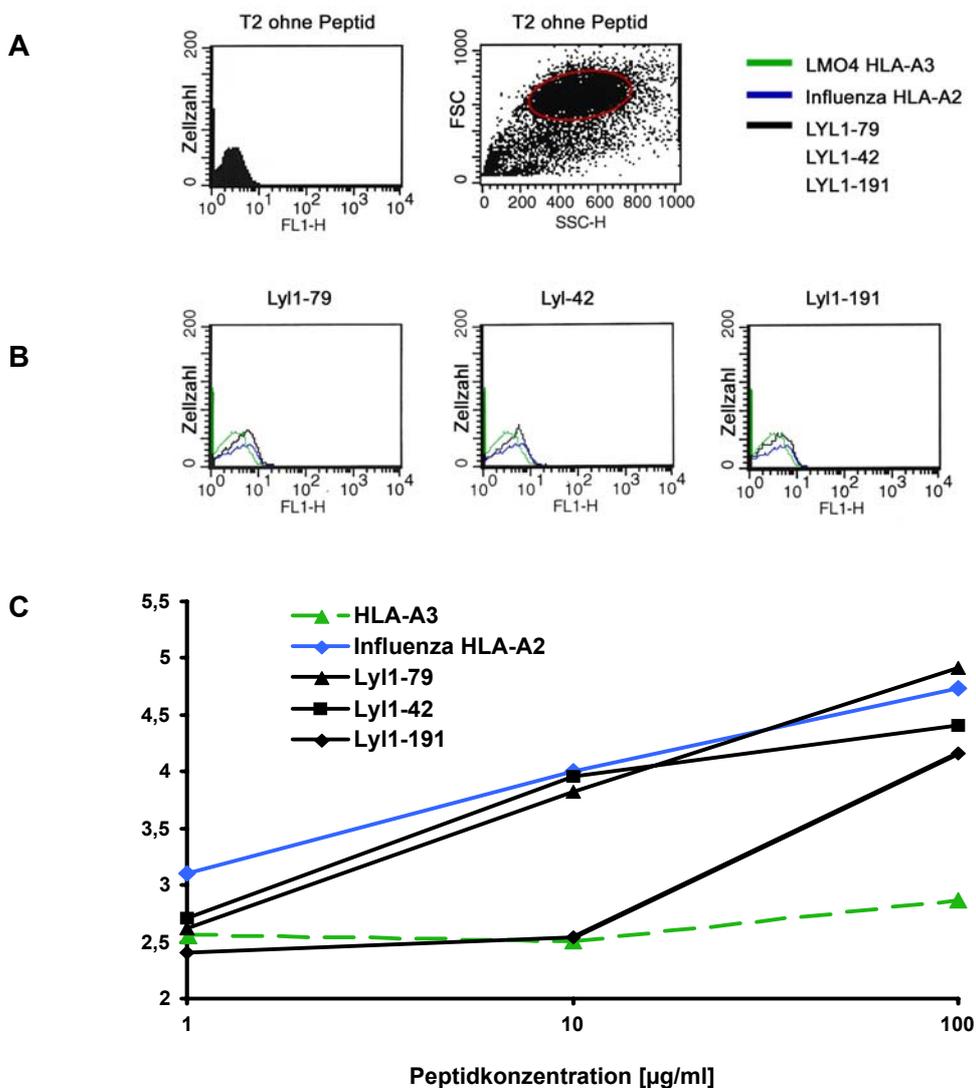


Abb. 34: Bindungsspezifität verschiedener vorhergesagter Lyl1-abgeleiteter Peptide mit potentieller HLA-A2 Restriktion über einen MHC-Stabilisierungsversuch mit der TAP-defizienten Zelllinie T2 (174 x CEM T2) wie in Abb. 33 für die drei best-bindenden Lyl1-Peptide Lyl1-79 (TLGTAPPTL) Lyl1-42 (RLLPPGVPVI) und Lyl1-191 (RLLRDQAAA).

4.4 Identifizierung von MHC-Klasse-I-Liganden auf AML-Zellen

Es ist durchaus schwierig, CML-Leukapherese-Material für den *Reversen Immunologie* Ansatz zu erhalten. Diese Leukapheresen werden nur als Notfallmaßnahme bei Patienten mit extrem hoher Leukozytenzahl durchgeführt, um Durchblutungsstörungen aufgrund der hohen Zelldichte zu verhindern, und sind dementsprechend selten. Bei einer Probe bestand zunächst der Verdacht, dass es sich um einen leukämischen Blastenschub einer CML handeln könnte. Dies wurde jedoch nach zwei Tagen ausgeschlossen und die Erkrankung als akute myeloische Leukämie eingestuft. So konnten wir neben den CML Proben auch eine Identifizierung von MHC-Klasse-I-Liganden bei akuter myeloischer Leukämie durchführen. Die Reinigung und Identifizierung der Peptide erfolgte analog zu der bei CML dargestellten Vorgehensweise. Der eluierte Peptidpool wurde geteilt und sowohl über die *off-line* Technik als auch über die *on-line* Technik gemessen. Die identifizierten Liganden sind in Tabelle 10 zusammengestellt.

Tabelle 10: Natürlich präsentierte MHC-Klasse-I-Liganden auf Zellen eines Patienten (AML1) mit akuter myeloischer Leukämie:

Swiss-Prot accession number	Protein (Position)	Masse (theor.)	Sequenz	Putatives HLA-Allel
P60709	Actin, cytoplasmic 1 (095-104)	1045.62	RVAPEEHPVL	HLA-A2
P55061	Bax inhibitor-1 (045-053)	1103.52	AYVHMTVTHF	n.d.
P17844	DEAD-box protein 5 (148-156)	1037.63	YLLPAIVHI	HLA-A2
Q08211	DEAH-box protein 9 (1037-1045)	1130.58	KYPSPPFFVF	HLA-A24
Q96RU3	Formin-binding protein 17 (251-259)	1099.55	DYSSILQKF	HLA-A24
P02023	Hemoglobin beta chain (021-031)	1114.56	DEVGGEALGRL	n.d.
P02023	Hemoglobin beta chain (032-040)	1160.63	LVVYPWTQR	HLA-A2
P02023	Hemoglobin beta chain (033-040)	1047.55	VVYPWTQR	n.d.
P02023	Hemoglobin beta chain (033-041)	1194.62	VVYPWTQRF	HLA-A24
Q9UI98	Hqp0256 protein (109-117)	1176.63	YYLFIPSKF	HLA-A24
Q8TCT9	Minor histocompatibility antigen H13 (074-081)	901.50	DAARFPIL	n.d.
O95298	NADH-ubiquinone oxidoreductase SU B14.5b (097-105)	1132.54	TYGEIFEKF	HLA-A24
P31483	Nucleolysin TIA-1 (245-253)	1058.51	VFPDKGYSF	HLA-A24
Q15121	Phosphoprotein enriched in diabetes (061-069)	1149.58	SYIEHIFEI	HLA-A24
Q15436	Protein transport protein Sec23A (576-584)	1194.60	LYPQFMFHL	HLA-A24
P00491	Purine nucleoside phosphorylase (090-098)	1109.59	GYPLWKVTF	HLA-A24

Swiss-Prot accession number	Protein (Position)	Masse (theor.)	Sequenz	Putatives HLA-Allel
P62136	Serine/threonine protein phosphatase PP1-alpha 1 catalytic SU (113-121)	1169.61	KYPENFFLL	HLA-A24
Q96GA9	Similar to v-crck avian sarcoma virus CT10 oncogene homolog (106-114)	1075.55	IHYLDTTTL	HLA-A2
Q15629	Translocation associated membrane protein 1 (154-162)	1092.51	AYPHNLMTF	HLA-A24
P08670	Vimentin (115-123)	1166.64	NYLDKVRFL	HLA-A24
Q96LD1	Zeta-sarcoglycan (005-014)	1191.59	QYILATQQNN	HLA-A24

Einundzwanzig Peptide konnten eindeutig identifiziert und auf bereits bekannte Proteine zurückgeführt werden. Die meisten dieser Proteine werden von *hauskeeping* Genen kodiert, über die keine Krebsassoziation bekannt ist, wie dem Proteintransport-Protein Sec23A, dem für die Translokation sekretorischer Proteine zuständigen Protein TRAM, die NADH-Ubiquinon Oxidoreduktase oder dem Protein Zeta-Sarkoglycan.

In direkter Verbindung mit der ABL-Tyrosinkinase steht jedoch das Protein CRK (*similar to v-crck avian sarcoma virus CT10 oncogene homolog*), aus dem das Peptid IHYLDTTTL (AA 106-114) identifiziert wurde. Am interessantesten erschien der endogene Nachweis des Liganden DYSSILQKF (AA 251-259) aus FBP17 (Abb. 35). FBP17 stellt einen Fusionspartner des MLL-Gens bei akuter myeloischer Leukämie dar. Wie ABL ist FBP17 auf Chromosom 9, Bande q34 lokalisiert, der Region, die insbesondere bei AML am stärksten von Deletionen oder Chromosomentranslokationen betroffen ist.

Darüber hinaus wurden einige endogen präsentierte Peptide auf AML-Zellen nachgewiesen, die bereits bei den untersuchten CML-Proben in Erscheinung getreten sind. Dies waren Peptide aus Aktin, Hämoglobin, Vimentin, dem Bax Inhibitor 1 und einigen RNA-Helikasen.

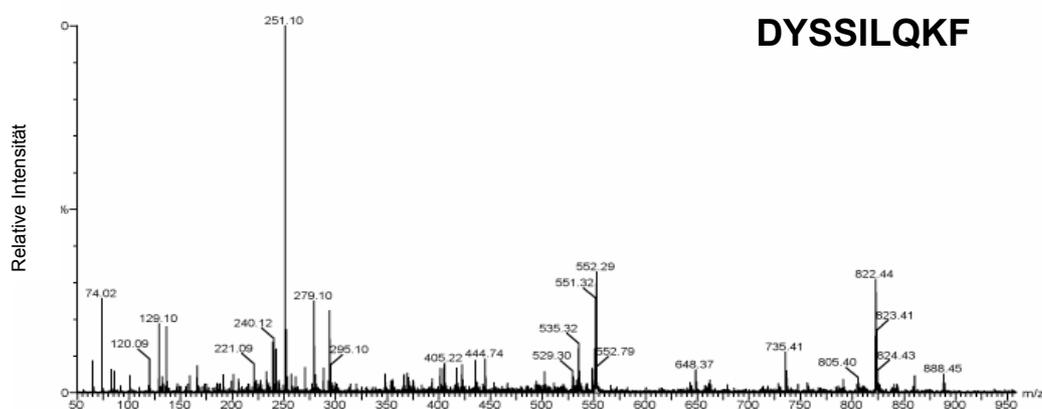


Abb. 35: MS/MS-Fragmentspektrum des Peptidliganden DYSSILQKF aus FBP17, identifiziert aus dem endogen präsentierte Peptidpool eines AML Patienten.