

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung nicht-kanonischer T-Zellepitope mit Hilfe artifizierlicher neuronaler Netze

3.1.1 Vorhersage der verwendeten Peptide

Ziel bei der Verwendung von artifizierlichen neuronalen Netzen (ANN) für die Vorhersage von T-Zellepitopen ist es, im Gegensatz zu den meist für diese Art von Vorhersagen verwendeten Algorithmen die Peptide in ihrem Gesamtsequenzzusammenhang und nicht nach einzelnen Aminosäuren an bestimmten Positionen in der Sequenz zu beurteilen. Mit Hilfe der hier verwendeten, von unseren Kooperationspartnern entwickelten ANN und spezifischen Filtern sollte es ermöglicht werden, zusätzlich zu neuen T-Zellepitopen mit bekannten HLA-Bindungsmotiven auch solche mit nicht üblichen Bindungsmotiven vorherzusagen (Filter, 2006). Solche Epitope werden mit den meist für Epitopvorhersagen verwendeten Algorithmen nicht gefunden, da diese mögliche Epitope anhand des Vorhandeseins der üblichen Bindungsmotive bewerten.

Die Vorhersage der Epitope erfolgte in drei Schritten. Zunächst wurden ANN trainiert, die in der Lage sind HLA-A*0201 bindende Nonamere vorherzusagen. Der positive Trainingsdatensatz für diese ANN beinhaltete 139 Epitopsequenzen aus der SYFPEITHI Datenbank und eigenen Datenbanken. Der negative Trainingsdatensatz bestand aus überlappenden 114 Nonapeptiden aus dem humanen p53 Protein. Falsch negative Peptide wurden sowohl im Trainingsdatensatz als auch im Testdatensatz toleriert. Für das Training der Netze wurden alle Aminosäuren an den einzelnen Positionen in normalisierte Werte für ihre Eigenschaften wie Hydrophobizität, Polarität, Refraktivität und Seitenkettenvolumen übersetzt. 227 der 253 Peptidsequenzen wurden als Trainingsdatensatz verwendet, 26 als unabhängige Testdaten. Mit den so erhaltenen ANN wurden Vorhersagen für alle prinzipiell möglichen Nonapeptide aus den Proteinen MAGE-A2, gp100, p53 und TRP-2 durchgeführt. Hierbei wurden auch bereits bekannte T-Zellepitope aus diesen Proteinen positiv bewertet, was die Fähigkeit der ANN zur Vorhersage korrekter Epitope bestätigte. Durch das Anlegen zweier verschiedener Filter wurden aus diesen Vorhersagen Peptide mit nicht üblichen Bindungsmotiven selektioniert. Der erste Filter (hard-filter) sorgte für den Ausschluß von Prolin, Glycin, Methionin, Cystein oder Folgen von mehr als 4 aliphatischen Aminosäuren, um Probleme mit unvorteilhaften Konformationen und bei der Synthese und Handhabung der Peptide zu vermeiden. Hierdurch wurde der vorhergesagte Datensatz bereits erheblich reduziert. Der zweite Filter (soft-filter) beurteilte die Peptide nach dem Grad ihrer

Konserviertheit, d.h. wie oft diese Peptide bei einem Protein-BLAST in allen Proteinen vorkommen (Filter, 2006).

Nach Anlegen dieser Filter und dem Ausschluß bereits bekannter Epitope wurden 7 Peptide aus den Proteinen MAGE-A2, gp100, p53 und TRP-2 erhalten, die alle nicht dem üblichen Bindungsmotiv für HLA-A*0201 entsprachen. Zusätzlich wurden für diese sieben Peptide Peptidvarianten synthetisiert, in welchen an Position 2 und 9 der Sequenz die ursprüngliche Aminosäure durch ein Leucin ersetzt wurde und die somit den üblichen Motiven entsprachen. Diese modifizierten Peptide, sogenannte Mimotope und die natürlichen Peptiden wurden im Vergleich auf ihre Fähigkeit T-Zellantworten auszulösen untersucht. Insgesamt wurden 14 Peptide getestet.

3.1.2 Vergleich der Vorhersagen der ANN mit SYFPEITHI und BIMAS

Um zu überprüfen, ob die Vorhersagen mit den von unseren Kooperationspartnern entwickelten ANN Peptide liefern, die mit anderen Algorithmen nicht vorhergesagt würden, wurden die Ergebnisse der Vorhersagen mit ANN mit denen von zwei im Internet zugänglichen, oft verwendeten Algorithmen (SYFPEITHI und BIMAS, siehe Einleitung) verglichen. Bei der Bewertung der 14 Peptide mit BIMAS wurde von den natürlichen Peptiden nur das Peptid TRP-2₁₈₅ als HLA-bindend vorhergesagt. Die sechs weiteren natürlichen Peptide wurden nicht als positiv bewertet, die Ankerposition-modifizierten Varianten erhielten alle eine positive Bewertung.

Der lineare, positionsspezifische SYFPEITHI Algorithmus bewertet Peptide nach dem Vorhandensein von Ankeramino­säuren in der Peptidsequenz. Ein nach SYFPEITHI als guter Binder bewertetes Peptid erhält einen Wert von mindestens 20. Werden diese Kriterien angelegt, wird keines der natürlichen Peptide als potentielles T-Zellepitop vorhergesagt, die modifizierten Varianten hingegen, erzielten alle eine positive Bewertung, da sie ja entsprechend der den Algorithmen zugrunde liegenden üblichen HLA-Motiven modifiziert wurden (Tabelle 3).

Tabelle 3: Ergebnisse der Vorhersagen mit ANN im Vergleich mit SYFPEITHI und BIMAS zu potentiellen T-Zellepitopen und ihren modifizierten Varianten

Antigen	Position	Modifikation ^a	Peptid	Sequenz	ANN ^b	SYFPEITHI ^c	BIMAS ^d
MAGE-A1	237-245		MAGE-A1 ₂₃₇	KLLTQDLVQ	67	14	0,079
MAGE-A1	237-245	Q245L	MAGE-A2 ₂₄₄ ^{mod}	KLLTQDLVL	99	24	113,424
MAGE-A2	116-124		MAGE-A2 ₁₁₆	LVHFLLLYKY	98	13	0,025
MAGE-A2	116-124	V117L, Y124L	MAGE-A2 ₁₁₆ ^{mod}	LLHFLLLYKL	99	29	83,527
MAGE-A2	250-258		MAGE-A2 ₂₅₀	LVQENYLEY	98	11	0,068
MAGE-A2	250-258	V251L, Y285L	MAGE-A2 ₂₅₀ ^{mod}	LLQENYLEL	99	27	223,344
gp100	286-294		gp100 ₂₈₆	VTAQVVLQA	81	16	0,27
gp100	286-294	T287L, A294L	gp100 ₂₈₆ ^{mod}	VLAQVVLQL	99	28	83,527
p53	17-25		p53 ₁₇	ETFSDLWKL	54	18	1,42
p53	17-25	T18L	p53 ₁₇ ^{mod}	ELFSDLWKL	97	24	102,259
p53	347-355		p53 ₃₄₇	ALELKDAQA	99	18	0,318
p53	347-355	A355L	p53 ₃₄₇ ^{mod}	ALELKDAQL	99	24	1,367
TRP-2	185-193		TRP-2 ₁₈₅	FVWLHYYSV	98	19	348,534
TRP-2	185-193	V186L, V193L	TRP-2 ₁₈₅ ^{mod}	FLWLHYYSL	99	25	1223,425

Es wurde der in dieser Arbeit verwendete Algorithmus mit den Ergebnissen der SYFPEITHI und BIMAS Algorithmen für T-Zellepitopvorhersagen verglichen.

^a die Peptide wurden durch Einfügen von Leucin, der bekannten üblichen Ankeramino-säure für HLA-A*0201, an Position 2 und 9 modifiziert.

^b Vorhersage mit dem in dieser Arbeit verwendeten ANN

^c Ergebnis für die Peptid/HLA-A*0201 Bindung vorhergesagt mit dem SYFPEITHI Algorithmus.

^d vorhergesagte Halbwertszeit für den Peptid/HLA-Klasse I/β2-Mikroglobulin Komplex in Minuten, BIMAS Algorithmus.

3.1.3 HLA-Stabilisierung durch die natürlichen Peptide und ihre modifizierten Varianten

Da die mit den ANN vorhergesagten Peptide nicht den üblichen Bindungsmotiven entsprechen, wurde in einem Stabilisierungsassay mit TAP-defizienten T2-Zellen untersucht, wie gut diese Peptide in der Lage sind, HLA-A*0201 zu stabilisieren. T2-Zellen sind gut geeignet, da sie ausschließlich HLA-A*0201 exprimieren, HLA-B5 wird zwar auch synthetisiert, aber nicht an der Oberfläche exprimiert. Außerdem können diese Zellen aufgrund eines Defekts im TAP-Transporter nur Signalpeptide und TAP-unabhängige Peptide an der Zelloberfläche präsentieren. Da HLA-Moleküle nur im Peptid-beladenen Zustand stabil exprimiert werden können, kann durch externe Zugabe von Peptiden eine Stabilisierung und Akkumulation der HLA-A*0201 Moleküle auf der Zelloberfläche erreicht werden. Die HLA-Menge an der Zelloberfläche nach externer Beladung der Zellen mit Peptid kann dann zur Beurteilung der Fähigkeit dieser Peptide den HLA zu stabilisieren genutzt werden. Durch das Ausmaß der Stabilisierung ist dann ein Rückschluß auf die Stärke der Bindung möglich. In Abbildung 6 ist zu sehen, daß außer TRP-2₁₈₅ keines der natürlichen Peptide zu einer

Zunahme der HLA- Expression führte, die oberhalb der Negativkontrolle ohne Peptid lag. Durch die Modifikationen in den Ankerpositionen konnte bei Peptid TRP-2₁₈₅ noch eine Zunahme der HLA-Expression gemessen werden, was für eine bessere Stabilisierung des HLA durch die modifizierte Variante spricht. Auch bei den Peptiden MAGE-A1₂₃₇ und gp100₂₈₆ ließ sich im Fall der modifizierten Peptidvarianten eine deutlich stärkere HLA-Expression beobachten. Bei den Peptiden MAGE-A2₁₁₆, MAGE-A2₂₅₀ und p53₁₇ konnte die HLA-Expression durch Einführung der Modifikation nur schwach erhöht werden, im Fall des p53₃₄₇ hatte die Modifikation keinen positiven Einfluß. Als Negativkontrolle dienten T2-Zellen ohne Peptidbeladung, als Positivkontrolle wurden die Zellen mit dem bekanntermaßen HLA-A*0201 bindenden Influenza-Matrixprotein Peptid M1₅₈ beladen (Abbildung 6).

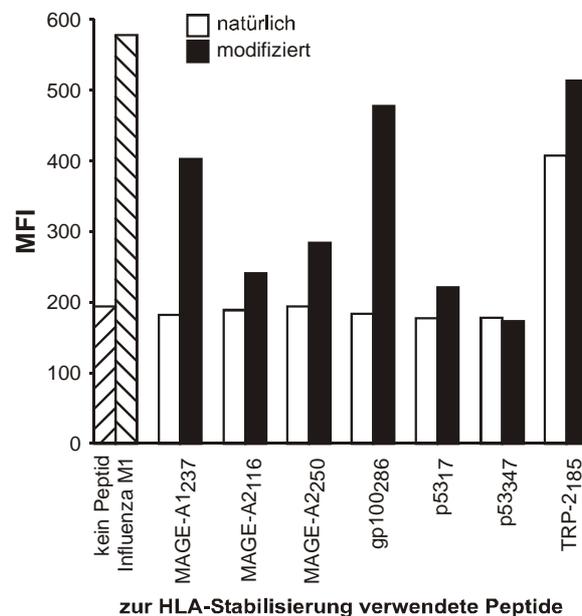


Abbildung 6: HLA-Stabilisierung durch die natürlichen Peptide und ihre modifizierten Varianten. T2-Zellen wurden mit den verschiedenen Peptide inkubiert. Die HLA-Expression wurde per FACS nach Färbung mit dem HLA-A2 spezifischen Antikörper BB7.2 bestimmt. Gezeigt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI). Als Negativkontrolle dienten T2-Zellen ohne Peptid, als Positivkontrolle wurden T2-Zellen mit dem HLA-A*0201 bindenden Influenza-Matrixprotein Peptid M1₅₈ inkubiert. Gestreifte Balken stellen die Kontrollen dar, offene Balken die natürlichen Peptide und gefüllte Balken die modifizierten Varianten.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die vorhergesagten natürlichen Peptide bis auf TRP-2₁₈₅ in der Tat nicht zu einer Zunahme der HLA-A*0201-Expression auf T2-Zellen führte, die oberhalb der Negativkontrolle lag, ihre modifizierten Varianten hingegen konnten den HLA in den meisten Fällen zumindest schwach stabilisieren.

3.1.4 T-Zellantworten gegen die vorhergesagten Peptide und ihre modifizierten Varianten

Der Stabilisierungsassay bestätigte, daß sechs der hier vorhergesagten Peptide nicht in der Lage waren, zu einer Stabilisierung von HLA-A*0201 auf T2-Zellen zu führen. Da gute T-Zellepitope nicht notwendigerweise gute HLA-Binder sein müssen, wenn sie in ausreichender Menge prozessiert und daher ständig an der Zelloberfläche präsentiert werden werden, wurde untersucht, ob die hier verwendeten Peptide trotz schwacher HLA-Stabilisierung T-Zellepitope darstellen. Hierzu wurden sie in zwei verschiedenen Ansätzen getestet. Zum einen wurden PBMC von Melanompatienten direkt *ex vivo* im IFN- γ ELISpot-Assay auf erhöhte Frequenzen an Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen getestet, zum anderen wurden CD8⁺ T-Zellen von gesunden Spendern *in vitro* mit den Peptiden induziert und die erhaltenen T-Zelllinien anschließend im ELISpot und ⁵¹Chromfreisetzungsversuchen untersucht. Mit Hilfe dieser Ansätze läßt sich zeigen, welche der Peptide von T-Zellen im Kontext des HLA-A*0201 erkannt werden und somit in der Lage sind, die Zellen zu aktivieren und eine spezifische IFN- γ Produktion auszulösen. Im Falle der Patienten kann durch ein positives Ergebnis in den *ex vivo* Analysen gezeigt werden, daß die Peptide relevant für eine anti-Tumor Immunität sein könnten, möglicherweise von den Tumorzellen natürlich prozessiert werden und bereits im Körper T-Zellen induziert haben.

Es wurden je fünf HLA-A*0201 exprimierende Patienten und gesunde Spender getestet. Als schwache T-Zellantworten wurden Reaktionen gewertet, bei denen die Anzahl der Spots mindestens dem Doppelten des Hintergrundwertes entsprachen, starke T-Zellantworten entsprachen mindestens dem fünffachen des Hintergrundwertes. Da im Prinzip jeder Spot einer reagierenden CD8⁺ T-Zelle entspricht, können anhand der Anzahl der Spots die *spot forming units* pro 1×10^6 CD8⁺ T-Zellen bestimmt werden. Bei den Versuchen mit den Patienten wurden komplette PBMC im ELISpot eingesetzt, zuvor wurde per FACS-Analyse der Prozentsatz an CD8⁺ T-Zellen bestimmt, um somit die Anzahl der CD8⁺ T-Zellen pro well bestimmen zu können. Ein repräsentativer ELISpot mit PBMC von Patienten ist hier am Beispiel von Patient LLI gezeigt (Abbildung 7).

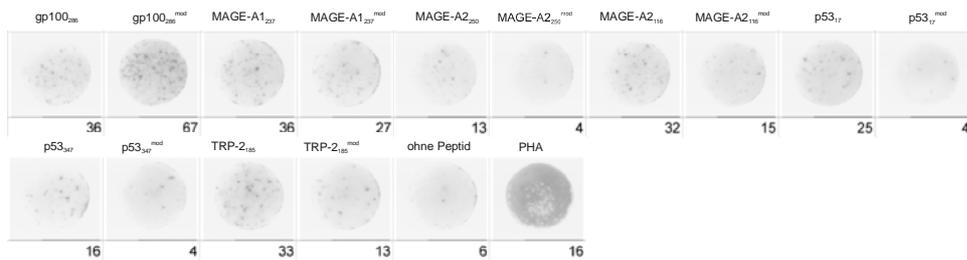


Abbildung 7: Repräsentativer ELISpot am Beispiel des Patienten LLI. Die Zahlen geben die Anzahl der Spots pro well wieder. In der Positivkontrolle mit PHA war die Reaktion so stark, daß keine einzelnen Spots mehr ausgelesen werden konnten. Anhand der eingesetzten Zellzahl und dem ermittelten Prozentsatz an CD8⁺ T-Zellen lassen sich aus den hier angegebenen Zahlen die *spot forming units* pro 1x10⁶ CD8⁺ T-Zellen berechnen.

Die hierbei erhaltenen Ergebnisse zeigen, daß *ex vivo* alle 7 natürlichen Peptide in der Lage sind, eine T-Zellantwort hervorzurufen. Ein starkes Ansprechen konnte gegen die Peptide MAGE-A2₁₁₆, MAGE-A1₂₃₇, gp100₂₈₆ und TRP-2₁₈₅ beobachtet werden (Tab. 4). Im Fall der modifizierten Peptidvarianten lösten alle Peptide, bis auf p53₁₇^{mod} und TRP-2₁₈₅^{mod} bei mindestens einem Patienten eine starke T-Zellantwort aus.

Tabelle 4: *Ex vivo* Frequenzen von CD8⁺ T-Zellen mit Spezifität für die vorhergesagten Peptide und ihre modifizierten Varianten in PBMC von Melanompatienten.

Peptid	Sequenz	SER	LTT	LLI	RAL	REN
MAGE-A2 ₁₁₆	LVHFLLLKY	300 ^c	1088^a	474	23	477
MAGE-A2 ₁₁₆ ^{mod}	LLHFLLLKL	2300	353 ^b	222	0	127
MAGE-A1 ₂₃₇	KLLTQDLVQ	900	529	533	293	287
MAGE-A1 ₂₃₇ ^{mod}	KLLTQDLVL	800	412	400	*	318
MAGE-A2 ₂₅₀	LVQENYLEY	200	294	192	45	64
MAGE-A2 ₂₅₀ ^{mod}	LLQENYLEL	300	765	59	181	127
gp100 ₂₈₆	VTAQVVLQA	0	824	533	226	223
gp100 ₂₈₆ ^{mod}	VLAQVVLQL	200	1235	993	451	637
p53 ₁₇	ETFSDLWKL	500	*	370	23	96
p53 ₁₇ ^{mod}	ELFSDLWKL	300	29	59	45	64
p53 ₃₄₇	ALELKDAQA	200	29	237	23	64
p53 ₃₄₇ ^{mod}	ALELKDAQL	300	88	59	0	319
TRP-2 ₁₈₅	FVWLHYYSV	1300	735	489	45	732
TRP-2 ₁₈₅ ^{mod}	FLWLHYYSL	900	88	192	0	191
Hintergrund		250	88	89	15	63

Dargestellt ist die Anzahl an *spot-forming units* (*sfu*) pro 1 x 10⁶ CD8⁺ T-Zellen.

^a fett gedruckte Zahlen repräsentieren eine starke T-Zellantwort \geq dem fünffachen des Hintergrundwertes

^b normal gedruckte Zahlen repräsentieren eine schwache T-Zellantwort \geq dem zweifachen des Hintergrundwertes

^c kursiv gedruckte Zahlen repräsentieren keine positive T-Zellantwort mit einem Ansprechen \leq dem zweifachen des Hintergrundwertes

*nicht auswertbar

Nach *in vitro* Induktion und in einem Fall auch nach Restimulation wurden CD8⁺ T-Zellen aus PBMC von fünf gesunden, HLA-A*0201 positiven Spendern ebenfalls im ELISpot getestet. Hier waren nur CD8⁺ T-Zellen im ELISpot eingesetzt worden und anhand der Anzahl der Spots konnten direkt die *spot forming units* pro 1x10⁶ CD8⁺ T-Zellen berechnet werden.

Auch hier konnte eine T-Zellreaktion gegen alle sieben natürlichen Peptide beobachtet werden, wobei die stärksten Antworten durch die Peptide MAGE-A2₁₁₆, MAGE-A1₂₃₇, p53₁₇, p53₃₄₇ und TRP-2₁₈₅ ausgelöst wurden. Für MAGE-A2₂₅₀ und gp100₂₈₆ konnte eine starke Reaktion nur gegen die modifizierten Varianten beobachtet werden. Bei den Spendern A und E konnten reaktive T-Zellen gegen 6 der natürlichen Peptide induziert werden, bei Spender D gegen drei und bei Spender C waren nach der zweiten Restimulation T-Zellen gegen 5 Peptide induziert worden (Tab. 5).

Tabelle 5: Frequenzen von CD8⁺ T-Zellen mit Spezifität für die vorhergesagten Peptide und ihre modifizierten Varianten in PBMC von gesunden Spendern nach *in vitro* Stimulation.

Peptid	Sequenz	A ¹	B ¹	C ²	C ³	D ¹	E ¹
MAGE-A2 ₁₁₆	LVHFLLLKY	343^a	314	342 ^b	743	2257	371
MAGE-A2 ₁₁₆ ^{mod}	LLHFLLLKL	3086	2086	1171	3228	1600	829
MAGE-A1 ₂₃₇	KLLTQDLVQ	114	571	486	1714	800	229
MAGE-A1 ₂₃₇ ^{mod}	KLLTQDLVL	29 ^c	686	86	2543	200	171
MAGE-A2 ₂₅₀	LVQENYLEY	86	29	57	171	114	29
MAGE-A2 ₂₅₀ ^{mod}	LLQENYLEL	800	57	1943	943	257	86
gp100 ₂₈₆	VTAQVVLQA	29	0	314	142	57	200
gp100 ₂₈₆ ^{mod}	VLAQVVLQL	86	86	1029	371	1200	57
p53 ₁₇	ETFSDLWKL	143	800	114	714	142	314
p53 ₁₇ ^{mod}	ELFSDLWKL	143	714	86	371	57	200
p53 ₃₄₇	ALELKDAQA	86	171	114	342	171	171
p53 ₃₄₇ ^{mod}	ALELKDAQL	57	257	29	229	114	86
TRP-2 ₁₈₅	FVWLHYYSV	2914	1171	1089	2400	629	914
TRP-2 ₁₈₅ ^{mod}	FLWLHYYSL	2542	800	414	628	743	943
Hintergrund		38	19	86	152	86	57

Dargestellt ist die Anzahl an *spot-forming units* (*sfu*) pro 1 x 10⁶ CD8⁺ T-Zellen.

^a fett gedruckte Zahlen repräsentieren starke T-Zellantworten \geq dem fünffachen des Hintergrundwertes

^b normal gedruckte Zahlen repräsentieren schwache T-zellantworten \geq dem zweifachen des Hintergrundwertes

^c kursiv gedruckte Zahlen repräsentieren keine positiven T-Zellantworten mit einem Ansprechen \leq dem zweifachen des Hintergrundwertes

¹ nach initialer Induktion

² nach einer Restimulation

³ nach zwei Restimulationen

Faßt man die Ergebnisse von Melanompatienten und gesunden Spendern zusammen, konnte gezeigt werden, dass alle 7 natürlichen Epitope T-Zellantworten auslösen können, 6 davon starke (MAGE-A2₁₁₆, MAGE-A1₂₃₇, p53₁₇, p53₃₄₇, gp100₂₈₆ und TRP-2₁₈₅).

3.1.5 Vergleich der T-Zellantworten gegen die natürlichen und modifizierten Varianten der vorhergesagten Epitope

In den vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß alle Epitope sowohl in ihrer natürlichen Form, als auch in modifizierter Version in der Lage waren, eine T-Zellantwort auszulösen. Dies könnte im Falle einer Verwendung der Peptide als Vakzine wichtig sein, da es hier von Vorteil ist, Peptide zu verwenden, die schnell und stark an das HLA binden, bevor eine Degradierung durch extrazelluläre Peptidasen stattfindet. Hier wäre es von Vorteil, die modifizierten Peptide einzusetzen, um T-Zellen zu induzieren, die dann allerdings in der Lage sein müssen, auch die natürliche Peptidvariante, die auf den Tumorzellen exprimiert wird, zu erkennen.

Um zu untersuchen, ob dies im Falle der hier verwendeten Peptide möglich ist, wurden CD8⁺ T-Zellen von zwei gesunden Probanden mit modifizierten Varianten der Peptide MAGE-A2₁₁₆, TRP-2₁₈₅ und MAGE-A2₂₅₀ induziert und anschließend auf ihre Reaktivität gegenüber beiden Formen der jeweiligen Peptide getestet.

Hierbei konnte gezeigt werden, daß in allen Fällen die mit der modifizierten Peptidvariante induzierten CD8⁺ T-Zellen in der Lage waren, auch die natürliche Version des jeweiligen Peptides zu erkennen. Bei beiden Spendern war die Reaktion gegen das native Peptid TRP-2₁₈₅ stärker als gegen die modifizierte Form, die beiden Peptide MAGE-A2₁₁₆ und MAGE-A2₂₅₀ lösten in ihrer modifizierten Form eine stärkere Reaktion aus (Abb. 8). Auffällig war, daß bei Donor C bei ausschließlicher Stimulation mit dem natürlichen MAGE-A2₂₅₀ keine T-Zellantwort ausgelöst werden konnte (Tab. 5). Dies deutet darauf hin, daß die modifizierte Form des Peptids MAGE-A2₂₅₀ potenter im Induzieren von T-Zellantworten ist und daß T-Zellen, die mit der modifizierten Peptidversion induziert wurden, in der Lage sind, sowohl die modifizierte, als auch die natürliche Peptidvariante zu erkennen.

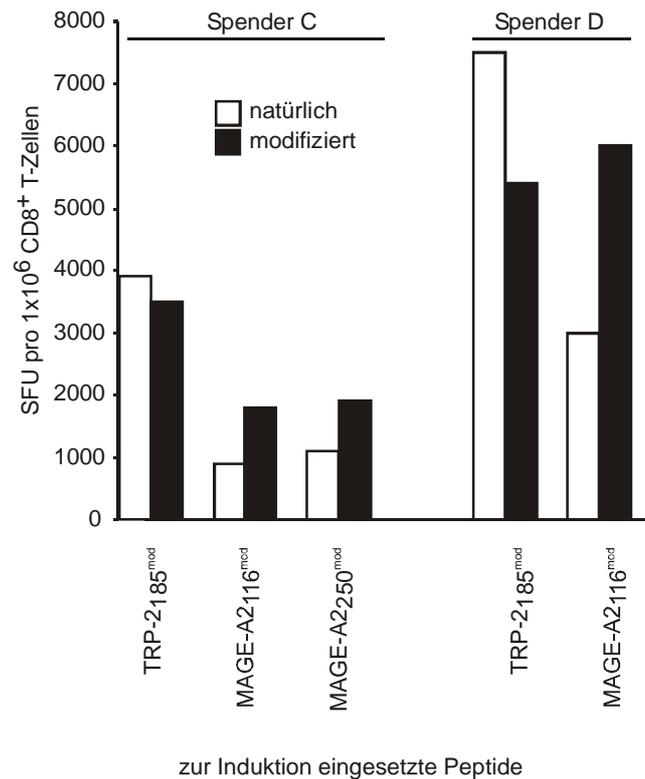


Abbildung 8: Erkennung der natürlichen Peptide durch CD8⁺ T-Zellen, welche mit der modifizierten Variante induziert wurden. CD8⁺ T-Zellen der Spender C und D wurden mit den angegebenen modifizierten Peptiden induziert und im ELISpot auf IFN- γ Sekretion als Antwort auf die natürlichen Peptide (offene Balken) und die modifizierten Varianten (gefüllte Balken) hin untersucht. Die Ergebnisse sind als *spot-forming units* pro 1 x 10⁶ CD8⁺ T-Zellen dargestellt.

Um die zytolytische Aktivität der induzierten Zellen zu analysieren, wurden die Ergebnisse aus dem ELISpot in einem Chromfreisetzungsversuch überprüft (Abb. 9). Hierzu wurden die mit MAGE-A2₁₁₆^{mod}, TRP-2₁₈₅^{mod} induzierten, für beide Peptidvarianten spezifischen, Zelllinien von Spender D und die mit MAGE-A2₂₅₀^{mod} induzierte und für beide Peptidvarianten spezifische Zelllinie von Spender C verwendet.

Es wurde gezeigt, daß sowohl durch die natürliche, als auch durch die modifizierte Variante der Peptide MAGE-A2₁₁₆, TRP-2₁₈₅ und MAGE-A2₂₅₀ nicht nur die IFN- γ -Freisetzung der T-Zellen induziert wird, sondern daß diese auch in der Lage sind, eine spezifische Lyse von peptidbeladenen T2-Zellen durchzuführen. T2-Zellen ohne Peptid wurden nicht lysiert. Am deutlichsten fällt die spezifische Lyse bei den mit MAGE-A2₁₁₆^{mod} induzierten Zellen aus, hier ist das geringste Effektor:Target Verhältnis nötig, um eine spezifische Lyse der Zielzellen zu erreichen. Bei den mit Peptid MAGE-A2₂₅₀^{mod} induzierten T-Zellen ist erst bei einem Effektor:Target Verhältnis von 20:1 eine deutliche Lyse gegenüber der Negativkontrolle ohne Peptide zu sehen (Abb.9).

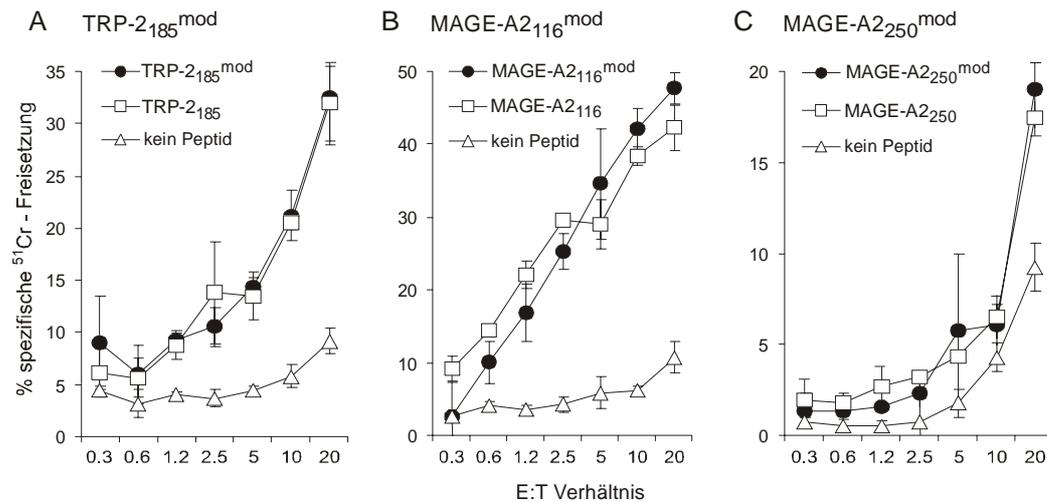


Abbildung 9: CD8⁺ T-Zellen, die mit der modifizierten Peptidvariante induziert wurden, erkennen auch das natürliche Peptid. T-Zellantworten auf Peptid-beladene T2-Zellen wurden als Triplikate getestet, gezeigt sind Prozent spezifische Zytolyse \pm Standardabweichung. Die Peptidkonzentration betrug 1 μ g/ml, die Effektor:Target Ratio wurde titriert.

(A) zeigt T-Zellantworten von Spender D induziert mit TRP-2₁₈₅^{mod}, (B) zeigt T-Zellantworten von Spender D induziert mit MAGE-A2₁₁₆^{mod} und (C) T-Zellantworten von Spender C induziert mit MAGE-A2₂₅₀^{mod}.

Um nun die Abhängigkeit dieser spezifischen Lyse von der Peptidkonzentration zu untersuchen, wurden in einem weiteren Chromfreisetzungsversuch die Peptide titriert. Als Zielzellen dienten mit verschiedenen Konzentrationen der beiden Peptidvarianten beladene T2-Zellen, als Effektorzellen wurde die mit MAGE-A2₁₁₆^{mod} induzierte Zelllinie von Spender D eingesetzt. Hierbei konnte gezeigt werden, daß eine etwa 150 fach höhere Konzentration des natürlichen Peptids für die halb-maximale Zytolyse benötigt wird als für die modifizierte Variante (Abb. 10)

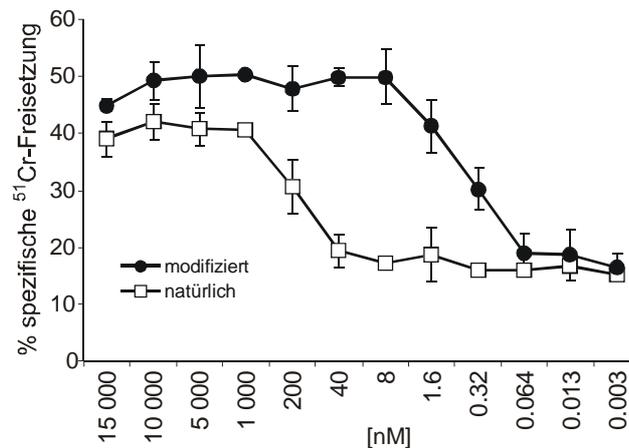


Abbildung 10: CD8⁺ T-Zellen von Spender D induziert mit MAGE-A2₁₁₆^{mod} wurden in einen Chromfreisetzungsversuch gegen T2-Zellen welche mit verschiedenen Verdünnungen der jeweiligen Peptidvarianten beladen waren getestet. Das Effektor:Target Verhältnis betrug 30:1. Gezeigt sind Prozent spezifische Zytolyse ± Standardabweichung.

3.1.6 Prozessierung und Präsentation der natürlichen Peptide durch Melanomzellen

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, daß die mit der modifizierten Peptidvariante induzierten T-Zellen in der Lage sind, auch die natürliche Version des Peptides zu erkennen. Um zu bestätigen, daß die vorhergesagten Epitope von Tumorzellen auch in natürlicher Weise prozessiert und präsentiert werden, wurden die MAGE-A2₁₁₆, MAGE-A2₂₅₀ und TRP-2₁₈₅ spezifischen CD8⁺ T-Zelllinien der gesunden Spender auf ihre Fähigkeit untersucht, Melanomzellen, welche das jeweilige Zielantigen und HLA-A2 exprimieren, spezifisch zu lysieren. Als Kontrolle der Spezifität und HLA- Restriktion wurden Antigen-exprimierende, HLA-A2 negative Zielzellen (LRD-mel) und HLA-A2⁺ Melanomzellen (SK-Mel 37), bei denen der HLA-A2 mit einem spezifischen Antikörper (BB7.2) blockiert wurde, getestet (Abb. 11).

Für alle drei T-Zelllinien konnte gezeigt werden, daß eine spezifische Lyse der SK-Mel 37 Melanomzelllinie, welche sowohl MAGE-A2, TRP-2 und HLA-A2 exprimiert stattfand. Diese Lyse ließ sich durch Zugabe des HLA-A2 spezifischen Antikörpers BB7.2 in allen Fällen blockieren. Im Fall der nicht HLA-A2 exprimierenden Zelllinie LRD-mel fand durch keine der Zelllinien eine spezifische Zytolyse statt. Die stärkste Lyse fand durch die mit MAGE-A2₁₁₆^{mod} induzierte Zelllinie von Spender D statt, hier konnte bei einem Effektor:Target Verhältnis von 20:1 eine fast hundertprozentige Lyse der Zielzellen beobachtet werden (Abb. 11B).

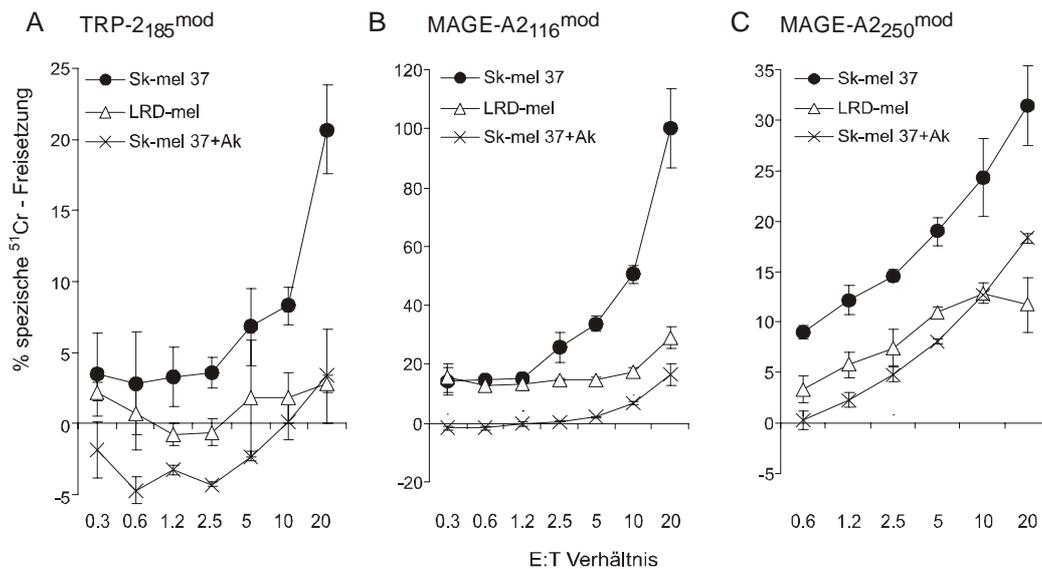


Abbildung 11: CD8⁺ T-Zellen, die mit der modifizierten Peptidvariante induziert wurden, erkennen das endogen prozessierte und natürlich präsentierte Epitop. T-Zellantworten wurden als Triplicate getestet, gezeigt sind Prozent spezifische Zytolyse \pm Standardabweichung. Das Effektor:Target Verhältnis wurde titriert.

(A) zeigt T-Zellantworten von Donor D induziert mit TRP-2₁₈₅^{mod}, (B) ebenfalls Donor D induziert mit MAGE-A2₁₁₆^{mod} und (C) T-Zellantworten von Donor C induziert mit MAGE-A2₂₅₀^{mod}. Alle T-Zelllinien wurden gegen die Melanomzelllinie SK-Mel 37, welche sowohl die beiden Antigene, als auch HLA-A*0201 exprimiert, sowie gegen die Melanomzelllinie LRD-mel, die zwar die Antigene, aber nicht den HLA-A*0201 exprimiert, getestet. Außerdem wurde zur Kontrolle der Spezifität und HLA-Restriktion die Zytolyse von SK-Mel 37 in Gegenwart des HLA-A2 blockierenden Antikörpers BB7.2 getestet.

In diesem Versuch konnte somit gezeigt werden, daß die drei vorhergesagten Epitope MAGE-A2₁₁₆, MAGE-A2₂₅₀ und TRP-2₁₈₅ von der Zelllinie SK-Mel 37 natürlich prozessiert und von den T-Zellen HLA-A2 restringiert erkannt werden.

Da im vorangegangenen Versuch gezeigt werden konnte, daß die drei hier untersuchten Epitope natürlich prozessiert werden und sich ein Effektor-Target-Verhältnis von 20:1 als am wirkungsvollsten herausstellte, wurde dieses Ergebnis bei festem Effektor-Target-Verhältnis mit weiteren Melanomzelllinien als Targets überprüft.

Hierzu wurden die mit MAGE-A2₁₁₆^{mod} induzierte T-Zelllinie von Spender D und eine mit TRP-2₁₈₅^{mod} induzierte T-Zelllinie, generiert aus CD8⁺ T-Zellen des Patienten REN als Effektoren eingesetzt.

Als Positivkontrollen dienten in beiden Fällen die Zelllinien SK-Mel 24, SK-Mel 37 und Malme-3M, welche alle sowohl die beiden Antigene MAGE-A2 und TRP-2, als auch HLA-A*0201 exprimieren und T2-Zellen, die sowohl mit den natürlichen, als auch den modifizierten Peptiden beladenen wurden. Negativkontrollen waren im Fall von Donor D die MAGE-A2⁺, HLA-A2⁻ Zelllinien HRR-mel und LRD-mel, die Zelllinie AOE-mel, die HLA-

A2, aber nicht MAGE-A2 exprimiert und T2-Zellen, welche mit irrelevantem, HLA-A2 bindendem Peptid (Influenza-Matrixprotein M1₅₈) beladen wurden (Abb. 12A).

Im Fall der spezifischen T-Zellen von Patient REN dienten als Negativkontrollen die Zelllinien SK-Mel 28, HHR-mel und IEL-mel, welche alle TRP-2, aber nicht HLA-A2 exprimieren und T2-Zellen, gepulst mit irrelevantem Influenza-Peptid (Abb. 12B).

Die T-Zelllinien beider Probanden zeigten eine spezifische Lyse der Melanomzelllinien, welche sowohl Antigen, als auch HLA-A2 exprimieren. Diese Lyse ließ sich durch Zugabe des HLA-A2 spezifischen Antikörpers BB7.2 in allen Fällen inhibieren. Die Melanomzelllinien, welche entweder nur Antigen oder HLA-A2 exprimieren, wurden nicht lysiert und auch im Fall der T2-Zellen war eine spezifische Zytolyse nur bei den mit den relevanten Peptiden gepulsten Zellen zu beobachten.

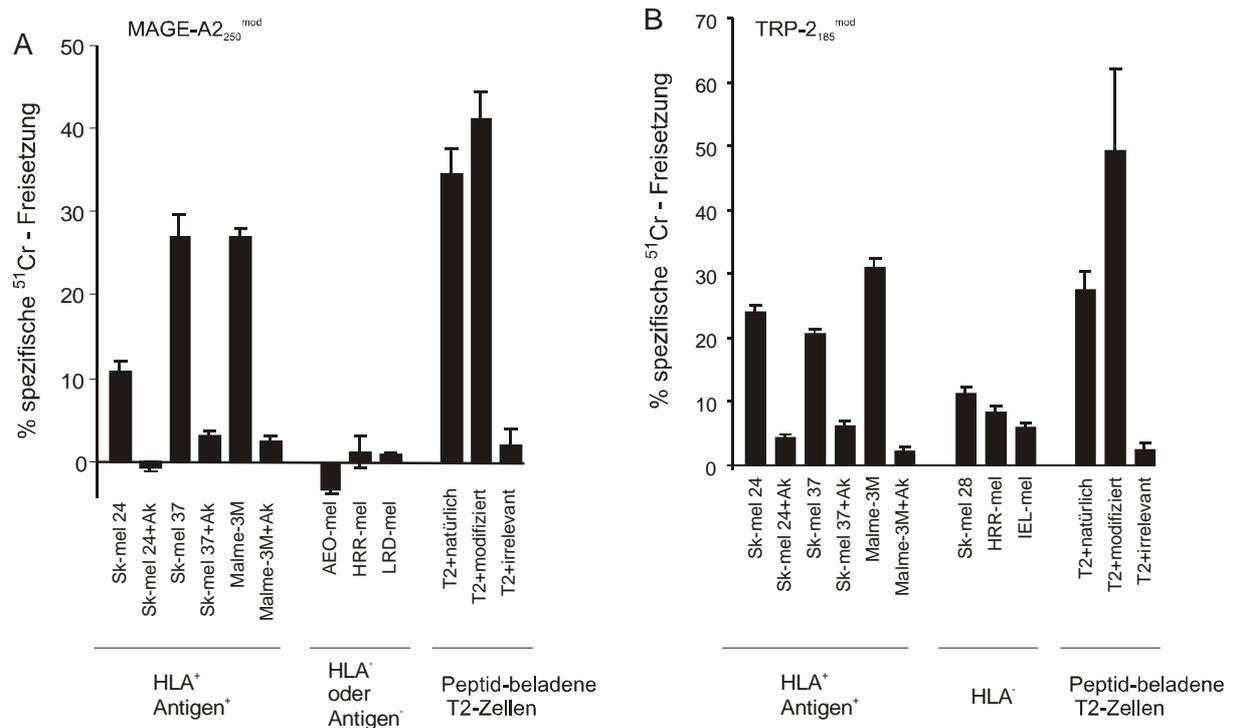


Abbildung 12: CD8⁺ T-Zellen, die mit der modifizierten Peptidvariante induziert wurden, erkennen das endogenprozessierte und natürlich präsentierte Epitop. T-Zellantworten wurden als Triplikate getestet, gezeigt sind Prozent spezifische Zytolyse ± Standardabweichung. Die einzelnen Kontrollen sind in beiden Teilen der Abbildung je als Blöcke zusammengefaßt, links die Zelllinien, welche sowohl Antigen, als auch HLA exprimieren. Auch hier wurde die Lyse mit dem HLA-A2 spezifischen Antikörper BB7.2 blockiert (+Ak). In der Mitte die Zelllinien, die entweder den HLA, oder das Antigen nicht exprimieren und ganz rechts die peptid-beladenen T2-Zellen.

(A) zeigt die Zytolyse durch mit MAGE-A2₂₅₀^{mod} induzierte CD8⁺-T-Zellen von Spender D.

(B) zeigt die Zytolyse durch mit TRP-2₁₈₅^{mod} induzierte CD8⁺-T-Zellen von Patient REN.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, daß mit Hilfe des hier verwendeten neuen Algorithmus sieben neue HLA-A*0201 restringierte T- Zellepitope identifiziert wurden. Sechs dieser Epitope wären mit den beiden anderen Vorhersagealgorithmen, SYFPEITHI und BIMAS als negativ bewertet worden. Es konnte außerdem gezeigt werden, daß die drei Epitope MAGE-A2₁₁₆, TRP-2₁₈₅ und MAGE-A2₂₅₀ von Tumorzellen natürlicherweise prozessiert und präsentiert werden, daß die Erkennung durch CD8⁺ T-Zellen HLA-A*0201 restringiert ist und daß die CD8⁺ T-Zellen, welche mit der modifizierten Peptidvariante induziert wurden, auch ihr natürliches Gegenstück erkennen.

3.2 Identifizierung von T-Zellepitopen nach Vorhersagen mit SVM und PSSM

3.2.1 Auswahl der Antigene

Um die Identifizierung von T-Zellepitopen aus unterschiedlichen tumorassoziierten Proteinen für unterschiedliche HLA weiter voran zu treiben, wurden in dieser Arbeit Vorhersagen für verschiedene HLA-Allele aus 35 verschiedenen, als tumorassoziiert beschriebenen Proteinen (siehe Anhang IV) durchgeführt. Diese Proteine wurden so ausgewählt, daß eine möglichst weite Bandbreite an Proteinen mit unterschiedlichsten Funktionen in der Zelle berücksichtigt wurde, um so Proteine einzubeziehen, die unverzichtbar für die Tumorzelle sind und um die Antigenität der Tumorzelle möglichst breit zu erfassen. So wurden z.B am Zellzyklus beteiligte Proteine wie Bcl-2, cdk4 und p53, aber auch in der Apoptose involvierte Proteine wie survivin und an der Signaltransduktion beteiligte Proteine wie APC und Her2/neu ausgewählt.

3.2.2 Bioinformatische Vorhersagen

Für die Vorhersagen wurden zwei verschiedene Algorithmen eingesetzt, zum einen von unseren Kooperationspartnern entwickelte *support vector machines* (SVM), zum anderen die positionspezifischen Bewertungsmatrizen (PSSM) von SYFPEITHI.

Die Vorhersagen mit SVM wurden von unseren Kooperationspartnern für die einzelnen Allomorphe der folgenden fünf HLA-Klasse I Supertypen durchgeführt, HLA-A1, -A2, -A3, -A24 und -B7. Insgesamt wurden somit Vorhersagen für 17 verschiedene Allomorphe gemacht. Die Daten für den Trainingsdatensatz wurden aus der SYFPEITHI-Datenbank (Stand 2002), der MHC Pep Datenbank von 1998 und aus Patentliteratur zusammengetragen. Abhängig von der für die einzelnen Allomorphe erhältlichen Datenmenge wurden bis zu drei

verschiedene Modelle mit unterschiedlichen Aufgaben für die Vorhersagen trainiert. D.h. die letztendliche Vorhersage bestand aus bis zu drei Bewertungen, die für die Beurteilung des jeweiligen Peptides gleich gewichtet wurden. Die drei verschiedenen Bewertungen beruhen auf:

1. Unterscheidung zwischen T-Zellepitopen und willkürlichen Peptiden (T-Zell Modell)
2. Unterscheidung zwischen HLA-bindenden und willkürlichen Peptiden (HLA Modell)
3. Vorhersage von Bindungskonstanten für das jeweilige HLA-Allomorph (IC50 Modell)

Für die Fälle, in denen die Daten nicht ausreichten, um die Bewertung eines Modells mit genügender Präzision durchzuführen, wurden nur die verbleibenden Modelle zur Bewertung des Peptides herangezogen. Zunächst wurde für alle drei Modelle eine umfassende Optimierung durchgeführt, anschließend die SVM trainiert und für die Vorhersagen eingesetzt.

Aus diesen Vorhersagen wurden dann Peptide ausgewählt, die bei der Summierung der Bewertungen der einzelnen Allele für den gesamten Supertyp eine positive Bewertung bekamen. Ausgewählt wurden Peptide, die entweder i) nur von einem der beiden verwendeten Algorithmen, ii) von beiden Algorithmen oder iii) von keinem der Algorithmen für ein bestimmtes HLA-Allomorph als bindend bzw. als Epitop vorhergesagt wurden (negativ). Es wurden aus allen diesen vier Möglichkeiten folgende Zahlen an Peptiden ausgewählt (Tab. 6):

Tabelle 6: Anzahl der für jeden Algorithmus und für jedes HLA ausgewählten Peptide. Die als negativ bezeichneten Peptide erhalten für keines der hier aufgeführten HLA eine positive Bewertung mit den verwendeten Algorithmen.

Algorithmus	A1	A2	A3	A24	B7	total
SVM	101	111	166	119	44	541
SVM+PSSM	60	239	64	41	28	432
PSSM	107	136	169	57	79	548
negativ						449
Gesamt						1970

Insgesamt wurden 1970 Peptide getestet (eine Liste aller ausgewählten Peptide befindet sich im Anhang II). Die durch die hier durchgeführten Analysen gewonnenen Ergebnisse sollen zum einen neue T-Zellepitope für verschiedene HLA-Allele, zum anderen neue Erkenntnisse zur Verbesserung von Vorhersagealgorithmen liefern.

3.2.3 Durchführung der Stimulationen und des ELISpots

Da es schwierig ist, Patientenmaterial in ausreichender Menge zu bekommen und die Anzahl der zu testenden Peptide sehr groß war, wurden zunächst gesunde Spender nach *in vitro priming* getestet, um zu untersuchen welche der Peptide prinzipiell T-Zellepitope darstellen können. Bei der großen Anzahl an Peptiden war eine Stimulation mit einzelnen Peptiden nicht möglich, so daß zunächst eine geeignete Methode zur Testung der gesamten Peptide etabliert werden mußte. In den in der Literatur beschriebenen durchgeführten Analysen zur Identifizierung von T-Zellepitopen werden in der Regel nur Vorhersagen für ein bestimmtes HLA-Allel durchgeführt und dann Spender die dieses Allel exprimieren mit den ausgewählten Peptiden getestet.

In dieser Arbeit hingegen wurde ein neuer Ansatz zur Identifizierung von T-Zellepitopen gewählt. Hierzu wurden die Einzelpeptide in Pools zusammengefaßt. Die Pools waren bezüglich der Proteine und vorhergesagter HLA-Restriktion vollkommen randomisiert und auch die getesteten Spender wurden völlig unabhängig von dem von ihnen exprimierten HLA rekrutiert. Dieser hier verwendete Ansatz bietet die Möglichkeit zusätzliche Informationen über die Bindungseigenschaften von HLA-Molekülen zu gewinnen. Wird z.B. ein Peptid, welches für ein bestimmtes HLA als bindend vorhergesagt wurde, für einen Spender als Antigen identifiziert, der dieses HLA nicht exprimiert, bedeutet das, daß die Bindung auch an ein anderes HLA erfolgen muß. Diese Informationen können dann zur Verbesserung der Algorithmen herangezogen werden.

Je Pool wurden durchschnittlich 22 Peptide zusammengefaßt. Insgesamt ergaben sich so 89 Pools. Aus diesen 89 Pools wurden noch 9 übergeordnete Pools angefertigt, diese bestanden aus 10 bzw. 9 der 89 Pools. Die Stimulation der CD8⁺ T-Zellen der gesunden Spender mit den Peptidpools erfolgte mit autologen PBMC als Antigen-präsentierende Zellen (APC), die für die Beladung mit Peptid in 9 Ansätze aufgeteilt wurden. Je einer dieser Ansätze wurde mit einem der übergeordneten Pools inkubiert, anschließend wurden alle Ansätze vereinigt und zu den T-Zellen gegeben. D.h. die Beladung der APC fand getrennt statt, die T-Zellen wurden aber mit allen Peptiden in einem Ansatz stimuliert. Nach frühestens sieben Tagen, nachdem die T-Zellen expandieren konnten, wurde zunächst in einem ersten ELISpot-Assay die Reaktivität gegenüber den übergeordneten Pools getestet. Zeigte sich hierbei ein positives Ergebnis in Form spezifischer IFN- γ Produktion folgte ein Test mit den einzelnen Pools. Anschließend wurden die Einzelpeptide des als Reaktion auslösend identifizierten Pools getestet und so letztendlich das antigene Peptid identifiziert. Dieses Vorgehen ist in Abbildung 13 in einem Beispiel dargestellt. CD8⁺ T-Zellen eines gesunden Spenders waren

mit allen Peptiden in einem Ansatz induziert worden, in einem ersten IFN- γ ELISpot konnten T-Zellantworten gegen die übergeordneten Pools 11-20 und 81-89 detektiert werden. In einem nächsten ELISpot, in dem die einzelnen Pools aus den übergeordneten Pools getestet wurden, zeigte sich spezifische IFN- γ Produktion als Reaktion auf die Pools 19, 20 und 83. Aus diesen Pools wurden in einem letzten ELISpot die Einzelpeptide getestet, hierbei konnten die Peptide Tyro₃₁₂ aus Pool 19, Sur₈₀ aus Pool 20 und Tyro₃₄₅ aus Pool 83 als diejenigen identifiziert werden, die die spezifische T-Zellantwort ausgelöst haben.

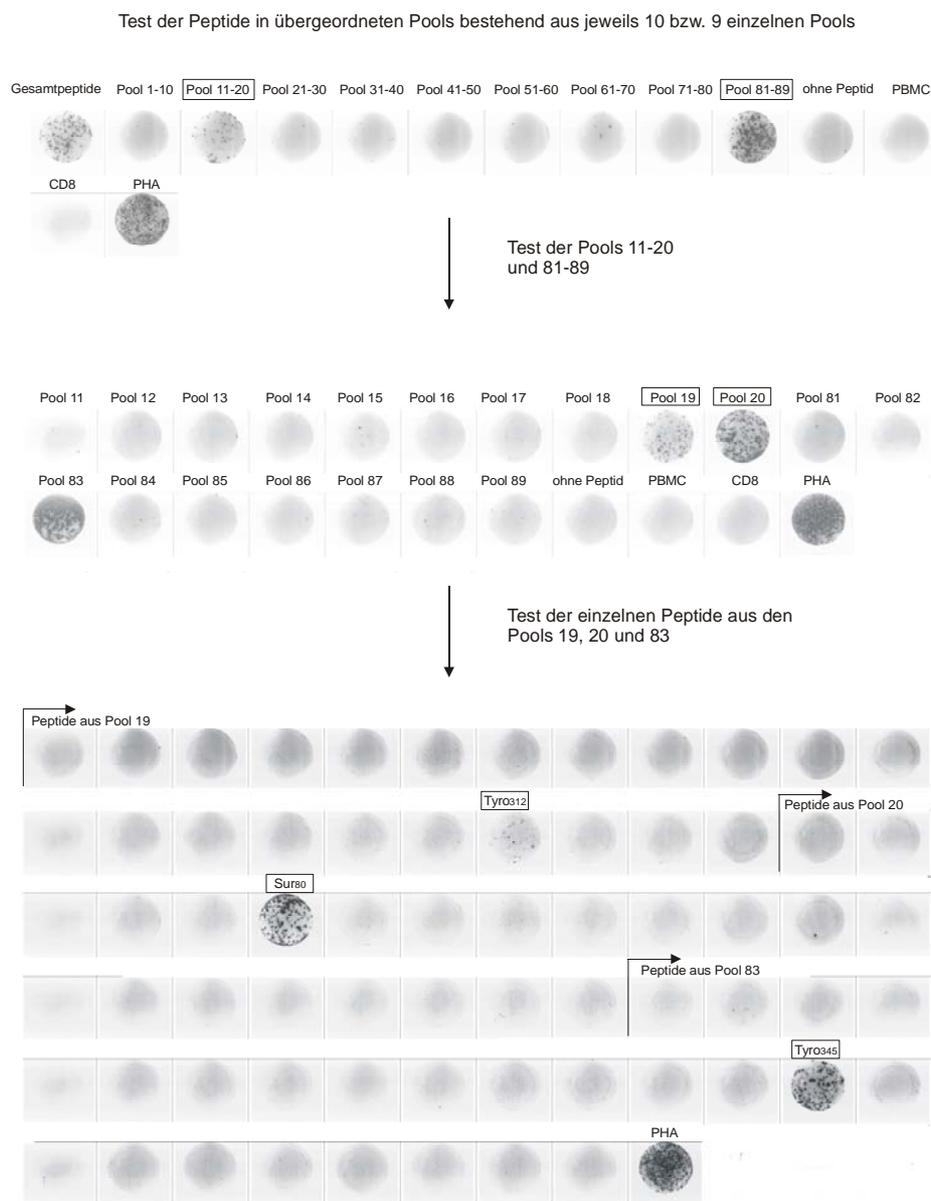


Abbildung 13: Beispiel des Testschemas zur Identifizierung antigener Peptide. Zunächst wurden die Peptide in übergeordneten Pools, bestehend aus jeweils 10 bzw. 9 einzelnen Pools getestet. Danach wurden die Einzelpools des positiv getesteten übergeordneten Pools untersucht. Anschließend wurden die Einzelpeptide des T-Zellreaktionen auslösenden Pools getestet, bis letztendlich das antigene Peptid bestimmt war. Positive Ergebnisse aus den einzelnen Schritten sind umrahmt.

3.2.4 T-Zellantworten nach *in vitro priming* gesunder Spender

Zur Analyse welche der 1970 Peptide prinzipiell T-Zellepitope darstellen können, wurden CD8⁺ T-Zellen gesunder Spender wie beschrieben untersucht. Die gesunden Spender sind mit Alter und HLA-Typ in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Tabelle 7: HLA-Typ und Alter der gesunden Spender

Name	Alter	HLA-A	HLA-B	HLA-Cw	HLA-DR	HLA-DQ
A	36	1, 2	57, 60	3, 6	8, 52, 53, 13	1, 8
B	39	2, 24	7, 39	2, 7	52	1, 7
C	32	2, 30	13, 60	3, 6	7, 15	1, 2
D	30	2, 24	35, 62	3, 4	1, 4, 53	1, 3
E	35	1, 2	27, 35	2	1, 12, 52	5, 7
F	28	3, 11	7, 35	4, 7	2, 4, 53	1, 3
G	34	1, 3	5, 7	7	2	1
H	55	29	44, 45	6, 7	6, 52	1
I	57	2, 66	35, 41	4, 6	1, 7, 53	1, 3
J	26	1	8, 61	2, 7	11, 3	1
K	27	32	14, 47	2	6, 7, 52, 53	1, 2
L	29	2, 26	7, 38	7	2, 6, 52	1
M	33	1, 11	8, 55	3, 7	3, 52 16	1, 2
N	27	32	14, 47	2	6, 7, 52, 53	1, 2
O	29	1, 33	8, 14	7	3, 6, 52	1, 2
P	51	2, 32	62, 70	3	4	3
Q	28	2, 3	39, 55	3, 7	2, 6, 52	1, 3
R	34	11	51	-	7, 53	3
S	28	2, 3	7, 27	2, 7	2, 4, 52	1, 3
T	32	25, 31	27, 44	2, 5	1, 11	1, 7
U	25	2, 11	35, 41	4, 7	3, 12, 52	2, 7
V	28	3, 26	7, 55	3, 7	-	-
W	35	2, 24	5, 62	3	1, 15	1

Es wurden Stimulationen mit CD8⁺ T-Zellen von 13 Spendern (A, B, C, E, F, M, P, R, S, T, U, V, W) aus obiger Tabelle mit allen 1970 Peptiden durchgeführt und anschließend die Spezifität der Zellen im ELISpot bestimmt. War nach zwei Restimulationen keine T-Zellantwort zu detektieren, wurde die entsprechende Stimulation als erfolglos beendet. In den meisten Fällen war allerdings bereits nach der initialen Induktion eine spezifische Reaktion auf mindestens eins der Peptide in Form von IFN- γ -Freisetzung zu sehen.

Die T-Zellantworten auslösenden Peptide sind zusammen mit dem jeweiligem Spender, aus welchem die reaktiven Zellen stammten in Tabelle 8 zusammengefaßt. Als positiv beurteilt

wurde ein Wert, der mindestens dem doppelten des höchsten Hintergrundwertes entsprach, die Werte sind als Stimulationsindices angegeben, stellen also ein entsprechend Vielfaches des höchsten Hintergrundwertes dar. Bei 11 der 13 getesteten Spender konnte eine T-Zellantwort induziert werden, die Zellen der Spender S und T zeigten auch nach zwei Restimulationen keine spezifische IFN- γ Produktion.

Insgesamt zeigten sich T-Zellantworten gegen 58 der insgesamt 1970 Peptide. Die identifizierten Peptide stammten aus 25 unterschiedlichen Proteinen, d.h. aus 10 der Proteine für die Vorhersagen durchgeführt wurden, konnten keine T-Zellepitope identifiziert werden. Gegen 50 der insgesamt 58 positiv getesteten Peptide reagierten jeweils T-Zellen nur eines Spenders, für acht Peptide konnte eine T-Zellantwort von mindestens zwei Spendern gezeigt werden. Bei fünf Spendern konnten T-Zellantworten gegen das Peptid Tyr₀₃₄₅ beobachtet werden. Dieses Peptid war somit das mit den meisten Ansprechern, gefolgt von Peptid SV40-T₃₄₀ mit vier und Peptid Sur₈₀ mit drei Ansprechern. Bei den Spendern U und F konnten mit 20 bzw. 27 T-Zellantwort auslösenden Peptiden die meisten spezifischen Reaktionen beobachtet werden.

Für einen Großteil der 25 reaktiven Proteine konnten zwischen ein und vier positive Epitope identifiziert werden. Für Tyrosinase und SV40 wurden mit jeweils 7 von 58 (11,9%) bzw. 6 von 58 (10,2%) Peptiden die meisten Epitope gefunden.

Im Hinblick auf die Vorhersagen zeigte sich, daß von den Reaktionen gegen die 58 Peptide insgesamt positive Reaktionen gegen 18 Peptide (31,03%), die mit beiden Algorithmen, gegen 19 Peptide (32,76%), die nur mit SVM und gegen 12 Peptide (20,69%), die nur mit SYFPEITHI vorhergesagt wurden, zu beobachten waren. 9 Peptide (15,52%), die eine T-Zellantwort auslösten, wurden von keinem der Algorithmen als potentiell T-Zellepitop oder als HLA-bindend für die HLA bewertet, für die Vorhersagen durchgeführt wurden.

Tabelle 8: Nach *in vitro* Induktion T-Zellantworten auslösende Peptide

Protein	Sequenz	Vorhersage ^a	Ansprecher ^b	SI ^c	HLA Vorhersage ^d	mögl. HLA ^e
APC ₁₈₃	DMTRRQLEY	PSSM	F	6,7	A1	A3
APC ₂₄₃₆	VLVRQSTFI	SVM	F	3	A2	A3
APC ₆₁₄	AFLVGTLY	PSSM	U	na	A1, A3	A3, A11, Cw4
BARD ₆₇₅	CYFYLVGTF	SVM+PSSM	F	17	A24	A3, Cw4
BARD ₄₄₉	QNGSDPNVK	neg	V	11,2	neg	A3
BARD ₁₀₃	SMIQLCSKL	PSSM	R	2	A2	A11
Bcl-2 ₂₁₉	TLLSLALVG	SVM	P	2,7	A2	A2
CEA ₄₆₇	ITEKNSGLY	SVM	U	2,2	A1	B35

Tabelle 8 fortgesetzt

Protein	Sequenz	Vorhersage ^a	Ansprecher ^b	SI ^c	HLA Vorhersage ^d	mögl. HLA ^e
CEA ₃₄₆	EPEIQNTTY	SVM+PSSM	F	4,7	A1	B7, Cw4
CEA ₃₁₁	TTVTTITVY	SVM+PSSM	F	3	A1	A3
CEA ₁₆₈	EPETQDATY	PSSM	B	2	A1	B7, Cw4
CLCA2 ₁₄	KFVTL LVAL	SVM	B	2	A2	A2
CLCA2 ₉₁₁	GLIGIICLI	SVM+PSSM	F	2	A2	A3
CLCA2 ₈₉₅	VPARDYLIL	SVM+PSSM	F, U	2,7/3,3	B7	B7/B35
CLCA2 ₁₉₈	SDITGIFVC	neg	F	3	neg	A3
E2BA ₁₁₈	FIKDGATIL	SVM+PSSM	W	6	A2	A2
Her2/neu ₉₈	RLRIVRGTQ	PSSM	F	9,7	A3	A3
Her2/neu ₉₁₁	TVWELMTFG	SVM	U	2	A2	A2
Her2/neu ₄₁₄	AWPDSL PDL	SVM	F	2,7	A24	B7, Cw4
Her2/neu ₇₉₇	VTQLMPYGC	neg	F	2,7	neg	?
hTert ₁₁₂₂	ALPSDFKTI	PSSM	B	6	A2	A2
IL-24 ₃₅	CLGFTLL L	SVM	F	2,7	A24	A3
IL-24 ₃₃	LPCLGFTLL	SVM+PSSM	F	2,7	B7	B7
LAGE ₁₁₂	DAAPLPRPG	neg	A	2,7	neg	?
MIA ₆₉	VVYVFSK LK	SVM+PSSM	U	2	A3	A11
MUC1 ₁₁₆₉	VLVALAIVY	SVM+PSSM	F	na	A1, A3	A3
MUC1 ₁₃	LLLTVLT VV	SVM+PSSM	U, C	10/na	A2	A2
p53 ₂₃₉	NSSCMGGMN	neg	U	2	neg	?
PHF ₇₇₉	ILD PDTLEN	SVM+PSSM	A	5	A1	A1
PHF ₇₃₀	RFMVGCGRC	neg	F	2	neg	A11, Cw4
PHF ₁₇₇₄	EFPSKSITF	SVM	U	na	A24	Cw4
PLST ₁₈₆	TPFIIQENL	PSSM	V	2	B7	B7
PSA ₂₃₉	RPSLYTKV V	PSSM	F	2	B7	B7
NRAGE ₇₆₉	FGAIGFFWV	SVM	U	2,7	A2	A2
NRAGE ₇₆₈	NFGAIGFFW	SVM	U	2,7	A24	Cw4
RasH ₅	KLVVVGAGG	PSSM	B	2	A3	A2
Rb ₇₇₉	LSPIPHIPR	SVM	A	3,3	A3	?
Rb ₁₀₀	GICIFIAAV	SVM+PSSM	U	2,3	A2	A2
Rb ₆₄₈	SLFYK K VYR	SVM+PSSM	U	2,2	A3	A11
Rb ₇₆	LTWEKVSSV	PSSM	U	2	A2	A2
SUR ₈₀	HSSGCAFLS	neg	E, U, P	33,3/21,7/19	neg	A2
SV40-T ₁₅₄	RTLACFAIY	SVM	A	27,7	A1	A1
SV40-T ₄₁₆	IPKKRYWLF	SVM	M	37,3	B7	B8
SV40-T ₃₄₀	AVDTVLA KK	PSSM	F, U, R, M	14,3/29/17,3/12,5	A3	A3, A11
SV40-T ₂₇	IPLMRKAYL	PSSM	F, M	18/3,8	B7	B7, B8
SV40-T ₂₁₆	CTFSFLICK	SVM	F	3,7	A3	A3

Tabelle 8 fortgesetzt

Protein	Sequenz	Vorhersage ^a	Ansprecher ^b	SI ^c	HLA Vorhersage ^d	mögl. HLA ^e
SV40-T ₁₃₈	FPSELLSFL	SVM+PSSM	F, U	4,7/4,7	B7	B7, B35
TSGA10 ₃₈₃	NDIKQKVQD	neg	A	2,3	neg	B60
TRP-2 ₄₈₅	GLFVLLAFL	SVM+PSSM	F	8,3	A2	A3, B7
TRP-2 ₄	LWWGFLLSC	SVM	F, U	2,3/2,3	A24	A11, Cw4
TYRO ₄₇₃	RIWSWLLGA	SVM	A	8	A2	A2
TYRO ₃₁₂	LPSSADVEF	SVM+PSSM	E	6,7	B7	B35
TYRO ₂₀₈	LPWHRLFLL	SVM+PSSM	F	10,3	B7	B7
TYRO ₃₄₅	EGFASPLTG	neg	E, U, P, B, W	28,7/26,7/22/13,3/6,7	neg	A2
TYRO ₁₇₁	NIYDLFVWM	SVM	F	2,3	A2	A3, Cw4
TYRO ₅	VLYCLLWSF	SVM	F	2,3	A24	A3
TYRO ₂₇₀	SSWQIVCSR	SVM	U	2,3	A3	A11
WT1 ₁₀	ALLPAVPSL	SVM+PSSM	F	3,3	A2	A3, Cw4

^a Algorithmus der für die Vorhersage verwendet wurde.

^b Spender, dessen T-Zellen gegen das jeweilige Peptide spezifische IFN- γ Produktion zeigten.

^c Stimulationsindex, diese Zahl gibt an um wieviel die Reaktion über dem Hintergrundwert lag, als positiv wurden nur Reaktionen gewertet, die mindestens dem Doppelten des höchsten Hintergrundwertes entsprachen.

^d HLA für den das jeweilige Peptid positiv vorhergesagt und ausgewählt wurde.

^e HLA in dessen Kontext das Peptid nach Abgleich mit bekannten Motiven möglicherweise präsentiert und erkannt wird.

na= nicht analysierbar

Die Spender waren nicht nach Übereinstimmung mit den für die Vorhersagen verwendeten HLAs ausgesucht worden, so daß sich das HLA für das die Vorhersage durchgeführt wurde des öfteren von denen des Spenders unterschied. Dadurch und durch die komplette Randomisierung der Peptide in den verschiedenen Pools können zusätzliche Informationen zu den HLA-Bindungseigenschaften der Peptide gewonnen werden. So kann gezeigt werden, daß ein Peptid welches als bindend für ein bestimmtes HLA vorhergesagt wurde, auch an ein anderes binden muß, wenn der reagierende Spender das HLA der Vorhersage nicht exprimiert. Sonst wäre es nicht zu einer spezifischen T-Zellreaktion in einem nicht HLA-übereinstimmenden Spender gekommen. Um in solchen Fällen das mögliche HLA des Spenders zu bestimmen, in dessen Kontext die Reaktion auf das jeweilige Peptid stattgefunden haben könnte, wurde die Peptidsequenz mit den bekannten Bindungsmotiven der verschiedenen HLA-Allele verglichen, soweit diese für den HLA-Typ des Spenders bekannt sind. Die Peptidsequenzen wurden auf bevorzugte Aminosäuren oder Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften in den Haupt- und Nebenankerpositionen hin untersucht und die Sequenz mit denen bereits bekannter HLA-Liganden und T-Zellepitopen verglichen. Das HLA des Spenders, auf dessen Bindungsmotiv die Peptidsequenz am besten passen würde, ist als mögliches HLA in Tabelle 8 angegeben.

Hierbei konnte gezeigt werden, daß bei 24 der 58 identifizierten Peptide noch ein anderes HLA als das bei den Vorhersagen als bindend beschriebene in der Lage sein muß, das Peptid zu binden und so in diesem Kontext eine T-Zellantwort zu induzieren. Besonders aufschlußreich sind hier die Fälle, in denen ein Peptid dem Motiv nach auf ein HLA passen würde, für das Vorhersagen durchgeführt wurden, das Peptid aber für dieses HLA nicht positiv bewertet wurde. Dies war bei den Peptiden APC₁₈₃, APC₂₄₃₆, BARD₆₇₅, BARD₁₀₃, CEA₃₄₆, CEA₃₁₁, CEA₁₆₈, CLCA2₉₁₁, Her2/neu₄₁₄, IL-24₃₅, RasH₅, TRP-2₄₈₅, TYRO₅, TYRO₁₇₁ und WT1₁₀ der Fall. Diese Peptide können direkt zur Beurteilung und Verbesserung der Algorithmen herangezogen werden, da sie einen falsch-negativen Datensatz liefern.

Im Falle der Peptide Tyro₂₇₀, SV40-T₃₄₀, MIA₆₉ und Rb₆₄₈ konnte jeweils eine T-Zellantwort im Kontext des A3-Supertyps, d.h. wahrscheinlich im Kontext von HLA-A11 beobachtet werden. Diese vier Peptide besitzen alle in Position 9 eine der von HLA-A11 bevorzugten Hauptankeraminosäuren Lysin oder Arginin. In der weiteren Peptidsequenz finden sich Nebenanker und bevorzugte Aminosäuren in den entsprechenden Positionen. Im Falle der Peptide CICA2₈₉₅, SV40-T₁₃₈ und Tyro₃₁₂ findet die Erkennung wahrscheinlich im Kontext des B7-Supertyps, d.h. im Kontext von HLA-B35 statt. Alle drei besitzen die Hauptankeraminosäure Prolin an Position 2 der Sequenz und mit Leucin oder Phenylalanin auch einen Hauptanker an Position 9. T-Zellen des Spenders M zeigten Reaktionen gegen die Peptide SV40-T₄₁₆ und SV40-T₁₃₈, beide waren für HLA-B7 vorhergesagt worden. Spender M exprimiert HLA-B8, in dessen Bindungsmotiv die beiden Peptide auch passen. T-Zellen des Spenders A reagierten auf Peptid TSGA10₃₈₃, dieses war von keinem der Algorithmen für eines der verwendeten HLAs positiv bewertet worden, nach Abgleich mit den Motiven kommt hier HLA-B60 in Betracht.

Für einige der Peptide ist der Abgleich mit den Motiven beispielhaft dargestellt (Tab. 9). Es ist jeweils ein Abgleich mit dem Motiv gezeigt, in dessen Kontext die Reaktion möglicherweise stattgefunden hat.

Tabelle 9: Abgleich einiger Peptide mit den Bindungsmotiven der HLA in deren Kontext die Präsentation und die Erkennung durch die T-Zellen möglicherweise stattgefunden hat.

HLA-A*03	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Anker und	L	<u>E</u>			I	I			K
Hilfsanker	V	<u>Y</u>			M	<u>L</u>			Y
		M			<u>E</u>	<u>M</u>			F
					<u>V</u>	<u>E</u>			
					<u>L</u>				
bevorzugte	I				I	T			Q
Aminosäuren					P				S
					V				T
					K				K
APC ₁₈₃	D	M	T	R	R	Q	<u>L</u>	E	Y
CEA ₃₁₁	T	T	V	T	T	I	T	V	Y

HLA-B*35	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Anker und		P							Y
Hilfsanker									F
									M
									L
									I
bevorzugte									
Aminosäuren	M	A	I	K	D	I	V	E	
		V	L	D	I	Q	N	Q	
		Y	F	E	V	K	E	V	
		R	V	G	T	V	Q	T	
		D	M	P	E	L	T		
		E	G	M	K				
		T	L						
		Y	M						
		N							
CLCA2 ₈₉₅	V	P	A	R	D	Y	L	I	L
Tyro ₃₁₂	L	P	S	S	A	D	V	E	F

HLA-Cw*0401	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Anker und		Y			<u>V</u>				L
Hilfsanker		P			I				F
		F			<u>L</u>				M
bevorzugte			D	D	A		A	K	
Aminosäuren			H	E	H			S	
			P	M			H		
					T				
					R				
CEA ₃₄₆	E	P	E	I	Q	N	T	T	Y
Her2/neu ₄₁₄	A	W	P	D	S	<u>L</u>	P	D	L

HLA-A*1101	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Anker und		<u>V</u>	<u>M</u>				<u>L</u>		K
Hilfsanker		I	<u>L</u>				I		R
		E	E				<u>Y</u>		
		<u>Y</u>	<u>Y</u>				<u>V</u>		
		I					E		
bevorzugte				A					
Aminosäuren	A	T	N	P	P	I		Q	
		D	G	I	V			K	
		E	D	F	M			N	
		Q	E	V				E	
			K	M					
Tyro ₂₇₀	S	S	W	Q	I	V	C	S	R
MIA ₆₉	V	<u>V</u>	<u>Y</u>	V	F	S	K	L	K

Alle weiteren in dieser Arbeit erwähnten Motive sind in Anhang I zusammengestellt.

Für die Peptide Her2/neu₇₉₇, LAGE₁₁₂, p53₂₃₉ und Rb₇₇₉ konnte durch Abgleich der Motive kein anderer HLA als eindeutig für den jeweiligen Spender identifiziert werden (? in Tabelle 8). So ist hier nur sicher, daß die T-Zellantwort im Kontext eines der sechs HLA-Klasse I Allele des Spenders stattgefunden haben muß. Diese Peptide waren, bis auf Rb₇₇₉ von vornherein für die für die Vorhersagen verwendeten HLA nicht als T-Zellepitop vorhergesagt wurden (in Tab. 8 als neg. bezeichnet). Zwei andere zu dieser Klasse an Peptiden gehörende Peptide, Sur₈₀ und Tyro₃₄₅ passen ebenfalls auf kein bekanntes HLA-Bindungsmotiv, da allerdings alle reagierenden Spender HLA-A2 exprimieren, wird dieser HLA als derjenige angenommen, über welchen diese Peptide präsentiert werden (siehe nächsten Abschnitt).

3.2.5 HLA-Restriktion der Peptide Sur₈₀ und Tyro₃₄₅

Eine andere Methode als der Abgleich mit bekannten Bindungsmotiven zur Identifizierung des möglichen HLA ist der Vergleich der von den reagierenden Spendern exprimierten HLA untereinander. Exprimieren alle Spender ein gleiches Allel, könnte dieses für die Präsentation des Peptides in Betracht kommen. Die beiden Peptide Sur₈₀ und Tyro₃₄₅ wurden von keinem der Algorithmen als potentiell Epitop vorhergesagt, in beiden Fällen zeigten sich jedoch nur positive Reaktionen bei HLA-A2 exprimierenden Spendern. Deshalb wurde die Reaktion von aus Spender E generierten T-Zelllinien mit Spezifität für die beiden Peptide auf Peptid-beladene HLA-A2⁺ T2-Zellen im ELISpot getestet, um die HLA-Restriktion zu bestimmen. Hierzu wurden die T2-Zellen mit Peptid Sur₈₀ oder Peptid Tyro₃₄₅ beladen, als Negativkontrollen dienten T2-Zellen, die mit einem HLA-A2 bindenden CMV-Peptid beladen wurden, sowie T2-Zellen ohne Peptidbeladung. In beiden Fällen konnte eine Reaktion gegenüber den mit Peptid Sur₈₀ oder Peptid Tyro₃₄₅ beladenen T2-Zellen beobachtet werden. Die Negativkontrollen lösten keine spezifische T-Zellreaktion aus. D.h. die beiden Peptide werden durch HLA-A2 präsentiert und in diesem Kontext von T-Zellen erkannt (Abb. 14).

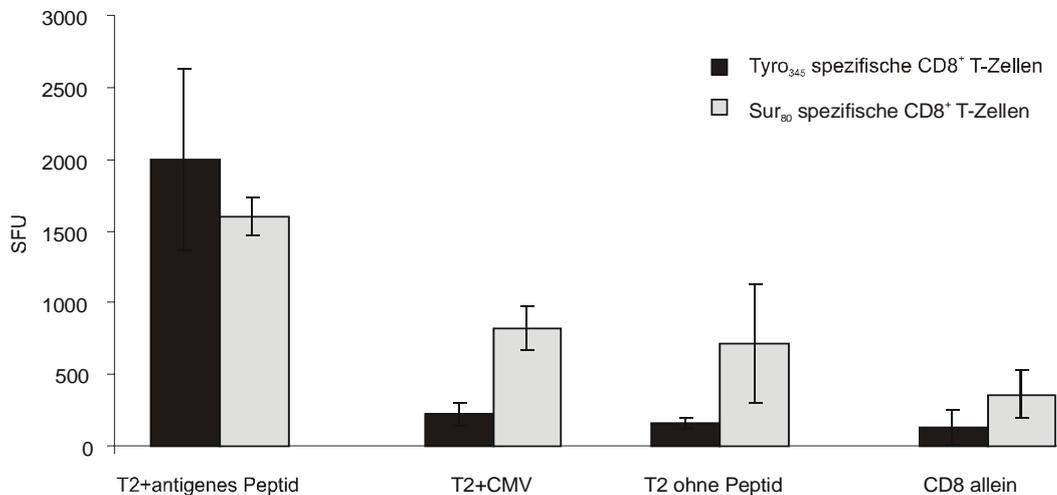


Abbildung 14: Prüfung der möglichen HLA-A*0201 Restriktion der Peptide Tyro₃₄₅ und Sur₈₀. Hierzu wurden T2 entweder mit dem zu testenden Peptid oder einem irrelevanten Peptid (CMV) gepulst. Als weitere Kontrolle dienten T2-Zellen ohne Peptid und die CD8⁺ T-Zellen aus der Kultur alleine. Es wurde ein IFN- γ ELISpot durchgeführt. Die Werte wurden als Triplikate bestimmt und die *spot forming units* \pm Standardabweichung angegeben.

3.2.6 *Ex vivo* Reaktionen von spezifischen CD8⁺ T-Zellen aus Melanompatienten und gesunden Spendern

Zeigt sich in *ex vivo* Analysen, daß T-Zellen mit Spezifität für die untersuchten tumoassoziierten T-Zellepitope in den Spendern expandiert sind, deutet dies auf eine spezifische Stimulation der T-Zellen bereits *in vivo* und somit auf eine mögliche natürliche Prozessierung der untersuchten Peptide hin. Finden sich nur in Patienten reaktive T-Zellen könnte dies ein Hinweis auf eine mögliche Rolle dieser Peptide in der Anti-Tumorimmunität sein. Da es sich bei positiven Ergebnissen allerdings auch um Kreuzreaktivitäten von T-Zellen mit anderen Spezifitäten handeln kann, wurden gesunde Spender im Vergleich getestet, um zu überprüfen, ob die T-Zellantworten ausschließlich in Patienten zu finden sind oder auch gesunde Spender spezifische T-Zellen für die hier identifizierten tumorassoziierten T-Zellepitope besitzen.

Für die Untersuchungen der *ex vivo* Reaktionen von spezifischen T-Zellen wurden 20 der bei gesunden Spendern nach *in vitro* Stimulation identifizierten Epitope ausgewählt und PBMC von Melanompatienten und gesunden Spendern direkt *ex vivo* im ELISpot analysiert. Hier wurden keine SV40 large T Peptide ausgewählt, diese wurden gesondert untersucht.

Es wurden 16 gesunde Spender aus Tabelle 7 ausgewählt. Alle Patienten, die PBMC für diese Arbeit zur Verfügung stellten, sind mit HLA-Typ in Tabelle 10 zusammengefaßt.

Tabelle 10: Patienten und zugehöriger HLA-Typ

Patient	Alter	HLA-A	HLA-B	HLA-Cw	HLA-DR	HLA-DQ
M-ASS	43	1, 23	7,8	7	3, 7, 52, 53	2
M-AVE	70	2, 3	51, 62	3	13, 52	1
M-BES	69	2	60, 62	1, 3	4, 7, 53	2, 3
M-BÜG	67	24, 30	-	-	-	-
M-CUZ	66	3	-	-	-	-
M-DAU	70	11, 24	55, 62	3	52	1
M-DEL	53	2, 3	7, 57	6, 7	7,8	3, 4
M-DLK	40	11, 24	44, 51	kI	4, 15, 53	1, 3
M-DLL	62	2	7, 44	5, 7	3, 4, 52, 53	2, 3
M-DNS	41	2, 3	18, 35	4, 7	1, 11, 52	1, 7
M-DOR	78	3, 25	7, 44	5, 7	1, 2	1
M-EHT	67	2, 11	-	-	-	-
M-EME	64	2	57, 62	3, 6	6, 7	-
M-ENZ	65	3, 24	5, 60	2, 3	11, 52	7
M-GIS	62	1, 2	8, 27	2, 7	3, 15, 52	1, 2
M-GOS	71	3, 26	5, 7	5, 7	2, 13, 52	1
M-HLR	66	1, 24	7, 13	6, 7	7, 15, 53	3, 7

Tabelle 10 fortgesetzt

Patient	Alter	HLA-A	HLA-B	HLA-Cw	HLA-DR	HLA-DQ
M-ILF	65	1, 11	18, 55	3, 7	4, 11, 52, 53	3, 7
M-INB	45	1, 2	37, 39	6	10	-
M-IWA	65	3, 11	7, 55	3, 7	13, 15, 52	1
M-KED	45	1, 2	8	7	15	1
M-KUE	71	1, 25	7, 17	7	7, 15, 53	1, 3
M-LCK	50	1, 2	8, 62	4, 7	15, 53	1
M-LEF	54	2	44, 60	3, 7	6, 52	1
M-LYE	66	11, 26	7, 14	7, 8	1, 15	1
M-MLL	38	3, 33	14, 57	6	-	-
M-NDN	66	2, 3	7, 51	7	1, 15	1
M-NFR	26	1, 26	7, 60	3, 7	13, 15, 52	1
M-OEG	63	1, 2	8, 44	2, 7	6, 52	1
M-ÖPE	35	24	15, 18	7	1, 7, 53	1, 2
M-ORN	35	1, 2	8, 50	-	-	-
M-REL	71	1, 26	8, 15	7	3, 13, 52	1, 2
M-RHÄ	55	1, 24	40	2, 3	9, 11, 52, 53	3, 7
M-RHE	71	2, 26	7, 44	5, 7	3, 4, 52, 53	2, 3
M-RHM	72	11, 24	8, 51	7	3, 4, 52, 52	2, 3
M-RIE	39	2	5, 44	7	2, 4, 53	1
M-RIG	65	2, 3	7, 44	7	11, 15, 52	1, 7
M-RRN	66	1, 2	37, 60	3, 6	11, 52	7
M-RRU	55	2, 26	38, 39	7	-	-
M-RUP	43	1, 2	8, 57	6, 7	3, 7, 52	2, 3
M-RZE	84	1, 2	7, 27	5, 7	7, 11, 52	1, 7
M-SLL	65	1, 24	-	-	-	-
M-SOM	64	1, 2	5, 61	2	11, 13, 52	1, 3
M-SSR	64	2	50, 60	3, 6	7, 52, 53	1, 2
M-SUR	71	28, 29	8, 44	7	3, 7, 52, 53	2
M-TBE	80	1, 2	8, 44	5, 7	3, 13, 52	1, 2
M-TRN	64	2, 25	8, 18	-	-	-
M-ÜLL	79	1, 31	5, 62	3	3, 15, 52	1, 2
M-UNG	58	1, 2	7, 60	3, 4	2, 3, 52	1, 2
M-VEI	69	24	35, 61	2, 4	-	-
M-WEH	66	25, 30	7, 13	6, 7	13, 14, 52	1
M-ZTO	63	2, 24	7, 35	4, 7	6, 52	1

- = nicht bekannt

Von vier dieser Patienten (M-DEL, M-GOS, M-OEG und M-RHE) konnten PBMC von zwei verschiedenen Entnahmekzeitpunkten getestet werden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind als Stimulationsindizes in Tabelle 11 zusammengefaßt, hierzu wurde die Anzahl der Spots gegenüber dem Hintergrund

normalisiert, sie stellen also ein Vielfaches des Hintergrundes dar. Schwache T-Zellreaktionen entsprechen mindestens dem Doppelten des höchsten Einzelwertes der Hintergrundreaktion (d.h. Werte ≥ 2), starke T-Zellreaktionen dem Fünffachen (Werte ≥ 5). Es sind nur die Spender aufgeführt, bei denen eine spezifische T-Zellreaktion zu beobachten war.

Es ließen sich in 23 (40,4 %) der insgesamt getesteten 53 Patienten *ex vivo* Reaktionen CD8-positiver T-Zellen gegen 19 der 20 getesteten Peptide nachweisen. In 11 Patienten fanden sich reaktive CD8⁺ T-Zellen gegen jeweils ein Peptid, die anderen zeigten T-Zellantworten gegen zwei bis sechs Peptide. Bei PBMC aus zwei Patienten konnten gegen deutlich mehr Peptide T-Zellantworten beobachtet werden, als bei den anderen Patienten. Im Fall von M-RZE lösten 12, im Fall von M-GIS 15 Peptide eine spezifische IFN- γ Produktion aus.

Bei den gesunden Spender fanden sich bei 4 von 16 (25%) *ex vivo* Reaktionen von CD8⁺ T-Zellen gegen insgesamt 13 Peptide. Bei Spender A lösten 9 Peptide eine T-Zellantwort aus, bei den anderen Spendern jeweils ein oder zwei.

Vier der getesteten Peptide riefen in deutlich mehr der untersuchten Probanden T-Zellantworten hervor als die anderen. Die Peptide MUC1₁₁₆₉, MUC1₁₃ und Tyro₃₄₅ lösten bei CD8⁺ T-Zellen von 12, das Peptid TRP-2₄₈₅ bei CD8⁺ T-Zellen von 10 Probanden eine spezifische IFN- γ Produktion aus. Das Peptid Tyro₃₄₅ hatte bereits zuvor in den *in vitro* Versuchen bei den meisten Probanden eine T-Zellantwort induziert.

Insgesamt konnte gegen 8 der 20 Peptide ein Ansprechen beobachtet werden, das mindestens dem fünffachen des höchsten Hintergrundwertes entsprach, die stärkste Reaktion zeigten T-Zellen des gesunden Spenders B gegen das Peptid hTert₁₁₂₂. Gegen dieses Peptid reagierte keiner der getesteten Patienten. Peptid Her2/neu₉₈ löste weder in T-Zellen von Gesunden, noch von Melompatienten eine Antwort aus. Für die Peptide Her2/neu₉₁₁, Tyro₁₇₁, BARD₆₇₅, Tyro₂₀₈, APC₁₈₃, PLST₁₈₆, hTert₁₁₂₃ und CaCl₂₋₈₉₅ fanden sich nur in den Patienten reaktive T-Zellen. Die 11 anderen Peptide wurden sowohl von T-Zellen aus Patienten, als auch aus gesunden Spendern erkannt.

Tabelle 11: Ex vivo T-Zellantworten gegen 20 ausgewählte, mit SVM und PSSM vorhergesagte Peptide

HLA-Vorhersage	PHF ₁₇₄ A24	TRP ₂₄₈₈ A2	PLST ₁₈₆ B7	SUR ₈₀ neg	CLCA ₂₈₉₅ B7	E2B ₁₁₈ A2	BARD ₆₇₅ A24	BARD ₄₉ neg	TYRO ₁₇₁ A2	TYRO ₃₁₂ B7	TYRO ₂₈₈ B7	TYRO ₄₄₅ neg	MUC ₁₁₀₉ A1	MUC ₁₃ A2	APC ₆₁₄ A1	APC ₁₈₃ A1	hTerf ₁₂₃ B7	hTerf ₁₂₂ A2	Her2 _{neu08} A3	Her2 _{neu01} A2	Summe
M-SOM	0,3	0,3	0,3	1,0	0,7	0,3	0,3	2,3	0,0	0,0	0,3	0,0	0,3	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,7	0,3	1
M-GOS-2	0,0	1,3	0,3	1,0	0,3	0,7	1,7	1,0	0,0	0,0	0,3	0,3	1,3	0,3	0,7	0,0	0,0	1,0	0,7	2,0	1
M-GOS	1,3	5,3	0,8	1,3	0,8	0,5	0,5	0,3	1,3	0,5	0,5	2,8	1,0	4,8	0,5	0,5	0,5	1,3	1,3	1,8	3
M-DNS	0,7	0,3	2,3	1,0	0,7	0,3	1,0	0,3	1,0	0,3	0,3	0,0	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	1,0	1
M-GIS	2,7	5,7	2,3	4,3	2,7	0,3	5,0	2,3	5,0	2,0	2,0	4,7	8,3	5,0	4,3	1,7	2,0	1,0	1,3	1,7	15
M-ILF	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,3	0,0	0,0	0,7	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	1
M-SLL	1,3	0,7	0,3	0,0	2,3	0,0	0,7	0,7	1,3	0,0	0,7	0,7	0,7	1,0	1,3	0,7	0,0	0,7	0,0	0,7	1
M-RUP	1,9	1,7	0,0	0,8	0,8	0,1	1,8	0,4	0,9	1,3	1,8	3,2	2,4	3,1	0,3	0,2	0,1	0,2	0,7	1,2	3
M-RZE	2,0	4,8	1,5	1,5	1,5	2,5	4,5	0,5	5,8	1,8	4,5	2,8	2,0	2,0	3,5	2,5	0,8	0,8	1,3	2,3	12
M-NDN	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	1,0	11,8	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	1,0	0,0	0,0	1,0	1
M-DOR	0,7	2,3	1,3	1,0	2,3	0,0	0,0	1,7	1,3	0,0	1,3	0,7	2,7	2,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	4
M-RHE-2	0,5	3,7	1,0	1,8	0,9	0,8	1,4	0,6	2,0	1,5	2,5	2,9	3,3	4,5	1,4	1,5	0,5	1,0	1,4	6	
M-RHE	1,3	4,3	0,5	2,5	1,3	0,3	1,3	0,5	1,5	0,3	1,3	1,8	3,8	2,5	0,3	0,0	0,3	0,5	0,0	0,5	4
M-VEI	0,3	0,9	0,2	0,5	0,8	0,3	0,3	0,4	0,1	0,6	2,8	0,3	3,0	0,4	0,3	0,5	0,6	0,3	0,4	1,3	2
M-SSR	1,3	0,3	0,3	1,7	1,7	1,7	1,3	2,0	1,7	1,0	0,7	0,7	1,0	0,7	0,7	0,7	0,3	0,7	0,3	0,3	1
M-CUZ	0,0	1,3	0,3	0,7	1,7	1,7	1,3	0,0	1,3	0,3	1,0	2,0	0,7	1,0	0,0	1,3	0,3	1,3	0,3	0,7	1
M-LEF	0,3	1,3	0,8	0,5	1,0	0,0	0,5	1,0	0,5	1,3	1,0	1,0	3,5	2,5	0,0	0,5	0,3	0,5	0,0	0,0	2
M-ZTO	0,2	1,8	0,8	0,2	2,0	0,2	0,0	0,2	1,4	0,4	2,2	3,6	4,8	1,2	0,6	0,8	0,2	0,4	0,6	0,4	4
M-LCK	0,7	4,3	2,6	2,4	1,4	0,2	1,4	1,8	1,2	0,7	1,9	2,8	3,7	3,3	1,3	1,3	0,7	0,4	0,7	1,7	6
M-AVE	1,3	3,0	1,0	2,7	0,7	1,0	2,0	0,0	0,3	1,0	1,0	1,7	1,7	2,7	1,0	0,0	1,3	0,0	0,3	0,3	4
M-RIE	0,7	0,7	0,3	0,0	2,0	0,7	0,3	0,0	1,0	0,0	1,0	1,0	0,7	0,0	0,7	0,3	0,3	0,7	1,0	0,7	1
M-SUR	0,0	0,3	0,3	0,3	0,7	0,3	0,3	0,0	0,3	0,3	0,7	4,0	1,7	0,7	0,7	0,7	0,3	0,3	0,3	0,7	2
M-RIG	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,3	0,0	1,0	3,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0	1
F	0,3	1,0	0,3	0,3	0,3	0,3	3,3	3,3	1,0	0,3	0,0	0,3	1,7	0,3	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1
A	3,0	4,3	1,0	2,0	1,3	3,3	0,7	1,7	0,7	2,3	1,0	5,3	3,3	3,0	3,0	1,3	0,7	2,3	0,3	1,3	10
M	1,7	0,0	0,7	2,3	0,0	0,3	0,0	0,3	0,7	0,3	1,3	0,3	3,0	0,7	0,7	0,0	0,7	0,3	0,3	0,0	3
B	0,7	0,3	0,7	0,3	0,0	1,7	0,0	0,7	0,3	0,0	0,0	0,3	0,0	0,7	0,0	1,0	1,7	12,3	0,3	0,0	1
insgesamt	3	10	3	6	5	2	3	4	3	2	6	12	12	12	3	1	1	2	0	2	
Patienten (%)	3,51	15,79	5,26	7,02	8,77	1,75	5,26	5,26	5,26	1,75	10,53	19,30	17,54	17,54	3,51	1,75	1,75	0,00	0,00	3,51	
Gesunde (%)	6,25	6,25	0	12,5	0	6,25	0	6,25	0	6,25	0	6,25	12,5	12,5	6,25	0	0	12,5	0	0	

Gezeigt sind ex vivo T-Zellantworten spezifischer CD8⁺ T-Zellen aus Melanopatienten und gesunden Spendern. Die Werte sind als gegenüber dem Background normalisierte Werte dargestellt. Als schwache T-Zellantworten (hellgrau) wurden Werte \geq dem Doppelten des höchsten Einzelwertes der Hintergrundreaktion beurteilt, starke T-Zellantworten (dunkelgrau) waren Reaktionen \geq dem fünffachen des höchsten Einzelwertes der Hintergrundreaktion. Bei umrandeten Werten entsprach der vom Spender exprimierte HLA-Typ nicht dem durch die Vorhersage für das jeweilige Peptid positiv bewerteten HLA.

Da wie beim *in vitro priming* die Probanden nicht nach HLA ausgesucht wurden, zeigten sich auch hier oft Reaktionen, die nicht im Kontext der bei den Vorhersage verwendeten und positiv bewerteten HLAs stattfanden. Von insgesamt 92 T-Zellantworten erfolgten 28 (30,4%) nicht im Kontext des HLA, für welchen das Peptid positiv bewertet worden war. In manchen Fällen fand die Reaktion im Kontext von zum gleichen Supertyp gehörenden HLAs statt, so z.B. bei Patient M-DNS im Falle des PLST₁₈₆ Peptides. Dieses wurde für HLA-B7 vorhergesagt, wurde von den T-Zellen des Patienten aber vermutlich im Kontext von HLA-B35 erkannt. Es gab aber auch Fälle, in denen die T-Zellantwort nicht im Kontext eines Supertyp stattfand, so z.B. die starke Reaktion des Patienten M-GOS gegen das Peptid TRP-2₄₈₅ oder die ebenfalls starke Reaktion des gesunden Spenders M gegen Peptid MUC1₁₃. Diese zwei Peptide waren von beiden Algorithmen als bindend für HLA-A2 vorhergesagt worden, welcher von beiden Spendern aber nicht exprimiert wird. Peptid TRP-2₄₈₅ entspricht seiner Sequenz nach am ehesten dem Bindungsmotiv zweier vom Spender exprimierten HLAs, HLA-A3 und -A26 (Tab. 12). Für Peptid MUC1₁₃ kommt eine Präsentation des Peptides über das vom Spender exprimierten HLA-B8 in Betracht (Tab. 12), zwar sind in der Peptidsequenz keine der Hauptankerminosäuren vertreten, aber in fünf der neun Positionen sind bevorzugte Aminosäuren vorhanden. Patient M-GIS wies spezifische T-Zellen für das Peptid BARD₆₇₅ auf, als präsentierend kommt hier nach Abgleich mit den Bindungsmotiven HLA-Cw7 in Betracht. T-Zellen des gleichen Spenders reagierten auch auf Peptid Tyro₂₀₈, dieses wird wahrscheinlich auch im Kontext von HLA-Cw7 präsentiert (Tab. 12). Für Peptid MUC1₁₁₆₉ wurden bei fünf Patienten T-Zellantworten beobachtet, die nicht im Kontext der positiv bewerteten HLAs A1 und A3 stattfanden. Für dieses Peptid kommt bei vier dieser Patienten (M-DOR, M-RHE, M-LEF und M-ZTO) wieder HLA-Cw7 in Betracht (Tab. 12), für diesen HLA spricht hier nicht nur das Motiv, sondern auch, daß vier der fünf reagierenden Patienten diesen exprimieren. Bei Patient M-VEI konnte Peptid MUC1₁₁₆₉ keinem der exprimierten HLAs eindeutig zugeordnet werden.

Tabelle 12: Abgleich einiger Peptide mit den Bindungsmotiven der HLA in deren Kontext die Präsentation und die Erkennung durch die T-Zellen möglicherweise stattgefunden hat.

HLA-A*03	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Anker und		L	E			I	I		K
Hilfsanker		V	Y			M	L		Y
		M				E	M		F
						V	E		
						L			
bevorzugte	I				I	T			Q
Aminosäuren					P				S
					V				T
					K				K
TRP-2 ₄₈₅	G	L	E	V	L	L	A	F	L

HLA-A*26	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Anker und		V				I			Y
Hilfsanker		T				L			F
		I				V			
		L							
		F							
bevorzugte	E		F	P		K			
Aminosäuren	D		I	E		M			
TRP-2 ₄₈₅	G	L	F	V	L	L	A	F	L

HLA-Cw*0702	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Anker und		Y			V	V			Y
Hilfsanker		P			Y	I			F
					I	L			L
					L	M			
					E				
					M				
bevorzugte	R	P	D	T	A	Y	E		
Aminosäuren	D	G	E		R	M	A		
		A	V		N	F			
			Q		R	D			
			P		V	K			
			S		F				
			G		E				
BARD ₆₇₅	C	Y	F	Y	L	W	G	T	F
Tyro ₂₀₈	L	P	W	H	R	L	F	L	L
MUC ₁₁₆₉	V	L	V	A	L	A	I	V	Y
CLCA2 ₈₉₅	V	P	A	R	D	Y	L	I	L

HLA-B*08	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Anker und			K		K				L
Hilfsanker					R				
bevorzugte	G		R	E		N	E	E	F
Aminosäuren	L			Q		Q	H	Q	M
		I		D		H	M	H	
				H		I	N	S	
				L		L	D	L	
				S		Y	Q	D	
				T		V	S	V	
				R		E	T	T	
				G		M	Y		
				K		S			
						T			
						F			
MUC ₁₃	L	L	L	T	V	L	T	V	V

Die T-Zellreaktion von Patient M-LCK auf Peptid PLST₁₈₆ könnte nach Abgleich mit den Bindungsmotiven im Kontext von HLA-Cw4 stattgefunden haben, die von Patient M-RIE und M-GIS auf Peptid CLCA2₈₉₅ im Kontext von HLA-Cw7.

Die T-Zellreaktionen auf die beiden Peptide PHF₁₇₇₄ und BARD₆₇₅ fanden alle nicht im Kontext des für beide Peptide positiv bewerteten HLA-A24 statt, auch konnte für die von den Spendern exprimierten HLAs keiner dem Motiv nach als präsentierend für diese Peptide zugeordnet werden. Im Fall des Peptides PHF₁₇₇₄ exprimieren alle Spender HLA-A1 und -A2, so daß möglicherweise die Präsentation über eines der beiden HLA stattgefunden hat. Die auf Peptid BARD₆₇₅ reagierenden Spender exprimieren alle übereinstimmend HLA-A2, was für eine Präsentation und Erkennung des Peptides in diesem HLA-Kontext sprechen könnte.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß aus 1970 Peptiden 58 als T-Zellepitope identifiziert wurden. Für 16 dieser Peptide konnte durch die neue Methode bei der Stimulation gezeigt werden, daß die spezifischen T-Zellantworten auch in einem HLA-Kontext stattgefunden haben, für den die Peptide bei den Vorhersagen nicht positiv bewertet wurden. Für andere wiederum, daß auch HLAs für die Präsentation in Frage kommen, für die keine Vorhersage durchgeführt wurde. Für zwei Peptide, die nach Vorhersage mit beiden Algorithmen nicht als potentiell T-Zellepitop ausgewählt würden und die auch nicht in ein bekanntes Bindungsmotiv passen, konnte gezeigt werden, daß sie im Kontext von HLA-A2 präsentiert und erkannt werden können. Von den 20 Peptiden, die für die *ex vivo* Versuche ausgewählt wurden, konnten für 8 T-Zellantworten ausschließlich in Patienten detektiert werden, was möglicherweise für eine Rolle dieser Peptide in der natürlichen Anti-Tumorreaktivität spricht.

3.3 Identifizierung von T-Zellepitopen aus SV40, BKV und JCV

SV40 ist ein primär in Rhesusaffen und Grünen Meerkatzen vertretenes Virus, welches sich möglicherweise durch kontaminierte Poliovakzine auf den Menschen übertragen hat (Carbone *et al.*, 1997). Die Beteiligung von SV40 an Tumorgenese wird sehr kontrovers diskutiert. Für die humanen Viren BKV und JCV wurde eine Expression in bestimmten Tumoren bereits gezeigt (Del Valle *et al.*, 2001). Für JCV werden etwa 80%, für BKV 63% der Bevölkerung seropositiv getestet. Als mit verantwortlich für die Tumorgenese durch diese Viren wird das sogenannte large T-Antigen, welches mit p53 und Rb interagieren kann, diskutiert. Die Proteinsequenz des large T-Antigens besitzt zwischen den drei Viren über 70% Ähnlichkeit. Deshalb wurden zusätzlich zu den vorhergesagten SV40 Peptiden aus den gleichen Sequenzbereichen des large T-Antigens die jeweils korrespondierenden Peptide der beiden anderen Viren ohne Vorhersagen ausgewählt (siehe Anhang III) und im Vergleich getestet. Die hier ausgewählten Peptide der einzelnen Viren stellen natürliche Mimotope für die Peptide der jeweils anderen beiden Viren dar, d.h. Kreuzreaktivitäten zwischen den Peptiden

aus den unterschiedlichen Viren wären von Vorteil, da beim Einsatz einer Vakzine gleich gegen alle drei Viren vorgegangen werden könnte.

3.3.1 *In vitro priming* von CD8⁺ T-Zellen gesunder Spender

Zunächst wurden CD8⁺ T-Zellen gesunder Spender nach *in vitro priming* analysiert, um zu untersuchen, welche der Peptide grundsätzlich in der Lage sind T-Zellantworten zu induzieren, und ob es Kreuzerkennung zwischen den korrespondierenden Peptiden der drei Viren gibt.

Die Stimulation erfolgte auch hier in Pools, getrennt nach den drei Viren, der Test im IFN- γ ELISpot wurde dann allerdings gegen alle Peptide durchgeführt. D.h. Zellen, die nur mit den SV40-Peptiden stimuliert wurden, wurden auch auf ihre Reaktivität gegenüber den Peptiden aus den anderen Viren getestet und umgekehrt. Bei der Beschreibung der Peptide werden unterschiedliche Aminosäuren in der gleichen Position der Sequenz der einzelnen Viren unterstrichen dargestellt, überlappende Sequenzen aus dem gleichen Virus kursiv.

Von den insgesamt 10 getesteten Spendern (A, C, D, F, J, M, O, R, S, V) zeigte sich bei 9 spezifische T-Zellantworten. Bei Spender S war auch hier, wie bei den vorangegangenen *in vitro* Induktionen, keine T-Zellantwort zu induzieren. 31 der insgesamt 45 Peptide, welche eine T-Zellantwort auslösten, wurden jeweils nur von den Zellen eines Spenders erkannt. Eine Reaktion von besonders vielen Spendern wurde gegen die drei Peptide SV40-T₂₇ (IPLMRKAYL), JCV-T₂₇ (IPVMRKAYL) und BKV-T₂₇ (LPLMRKAYL) beobachtet.

Die T-Zellen des Spenders F reagierten auch noch gegen die in der Sequenz überlappenden Peptide SV40-T₂₈/BKV-T₂₈ (PLMRKAYLK) und JCV-T₂₈ (PVMRKAYLK). Das entsprechende Peptid aus BKV ist hier 100% identisch mit dem SV40 Peptid. Von den T-Zellen des gleichen Spenders wurden außerdem die überlappenden Peptide SV40-T₁₃₄ (DPKDFPSEL) und SV40-T₁₃₈ (FPSELLSFL) erkannt.

T-Zellen des Spenders A zeigten spezifische IFN- γ Produktion als Reaktion auf die ähnlichen Peptide SV40-T₁₅₄ (RTLACFAIY), JCV-T₁₅₅ (RTVASFAVY) und BKV-T₁₅₆ (RTLACFAVY) aus allen drei Viren, außerdem auf die Peptide SV40-T₄₆₃ (VAIDQFLVV) und BKV-T₄₆₅ (VAIDQYMVV), das zugehörige JCV Peptid (VGIDQFMVV) löste keine Reaktion aus.

Spender C zeigte nur T-Zellantworten gegen BKV Peptide, von denen keines 100% Übereinstimmung zu einem der anderen Viren aufwies. T-Zellen des Spenders D erkannten nur ein einziges, aus JCV stammendes Peptid (JCV-T₁₅₅ RTVASFAVY).

Insgesamt lösten je 17 Peptide aus SV40 und BKV T-Zellantworten aus, aus JCV waren es 11.

Auch hier wurde das *in vitro priming* so durchgeführt, daß die HLAs der Spender nicht immer mit dem bei der Vorhersage als positiv bewerteten HLA übereinstimmten, so wurden in manchen Fällen die Peptide in einem anderen HLA-Kontext erkannt. In solchen Fällen wurde, wie bei den Versuchen mit den 1970 Peptiden versucht, die Peptidsequenz einem Bindungsmotiv eines vom Spender exprimierten HLA zuzuordnen. Da die Peptide aus JCV und BKV nicht vorhergesagt wurden, wurde auch hier so das mögliche HLA, in dessen Kontext die T-Zellreaktion stattgefunden haben könnte, identifiziert. Die so zugeordneten HLAs sind in Tabelle 13 als möglicher HLA angegeben.

Tabelle 13: Nach *in vitro* Induktion T-Zellantworten auslösende Peptide aus SV40, JCV und BKV

Protein	Sequenz	Vorhersage ^a	Ansprecher ^b	HLA Vorhersage ^c	mögl. HLA ^d
SV40-T ₅₃₈	QARFVKQID	neg	V	neg	?
SV40-T ₁₅₄	RTLACFAIY	PSSM	A, F	A1	A1, A3, Cw3
SV40-T ₄₆₃	VAIDQFLVY	PSSM	A	A2	A2
SV40-T ₅₇₅	LLLMLIWYR	PSSM	R	A3	A11
SV40-T ₁₄₆	LSHAVFSNR	PSSM	M, V	A3	A3
SV40 ₅₂₈	MNEFSVPKT	SVM	A	A1	A1
SV40 ₂₀₇	AINNYAQKL	SVM	V	A2	A26
SV40 ₃₄₀	AVDTVLAKK	SVM	F, R	A3	A3, A11
SV40 ₁₇₀	LLYKKIMEK	SVM	F, V	A3	A3
SV40 ₂₈	PLMRKAYLK	SVM	F	A3	A3
SV40 ₄₉₈	RDYLDGSVK	SVM	V	A3	A3
SV40 ₁₃₄	DPKDFPSEL	SVM	F	B7	B7
SV40 ₂₇	IPLMRKAYL	SVM	F, V, O, J, M	B7	B7, B8
SV40 ₂₁₄	KLCTFSFLI	SVM+PSSM	A	A2	A2
SV40 ₄₂₁	MVYNIPKKR	SVM+PSSM	F	A3	A3
SV40 ₃₄₉	RVDSLQLTR	SVM+PSSM	F, M, V	A3	A3
SV40 ₁₃₈	FPSELLSFL	SVM+PSSM	F	B7	B7
JCV ₁₅₅	RTVASFVY		A, C		A1, Cw3
JCV ₃₉₇	CLLPQMDTV		V		A3
JCV ₂₇	IPVMRKAYL		F, V, O, J, M		B7, B8
JCV ₅₆₉	ILQSGMTLL		J, V		B8, A3, A26
JCV ₄₃₉	ALLDLCGGK		V		A3
JCV ₁₃₉	FPVDLHAFI		F, V		B7
JCV ₁₃₅	DPKDFPVDL		V		B7
JCV ₂₈	PVMRKAYLK		F		A3

Tabelle 13 fortgesetzt

Protein	Sequenz	Vorhersage ^a	Ansprecher ^b	HLA Vorhersage ^c	mögl. HLA ^d
JCV ₅₀₉	NLERKHQNK		V		A3
JCV ₄₈₂	ESRDLPSGH		V		A3
JCV ₂₁₁	NYCQKLCF		V		A26, Cw7
BKV ₁₅₆	RTLACFAVY		A		A1
BKV ₄₆₅	VAIDQYMVV		A, C		A2
BKV ₃₅₁	RVDTLHMTR		A		A1
BKV ₂₁₂	NFCQKLCF		J		B8, Cw7
BKV ₅₈₂	IWFRPVADF		J		Cw7
BKV ₄₁₈	IPKRRYWLF		F, V, J, M		B7, B8
BKV ₁₉₁	CAGHNI IFF		C		Cw6
BKV ₄₁₅	VFNVPKRRY		V		A26
BKV ₆₁₃	TFSRMKYNV		C		A2
BKV ₄₁₀	FLHCVVFNV		C		A2
BKV ₅₃₀	MNEFPVPKT		C		A2
BKV ₄₈₁	GAESKDLPS		C		A2
BKV ₄₁₄	VVFNVPKRR		V		A3
BKV ₂₈₇	VFLLLGMYL		C		A2
BKV ₂₇	LPLMRKAYL		F, V, O, J, M		B7, B8
BKV ₅₇₀	ILQSGMTLL		V		A3
BKV ₄₇₀	YMVVFEDVK		V		A3

^a Algorithmus der für die Vorhersage verwendet wurde.

^b Spender, dessen T-Zellen gegen das jeweilige Peptide spezifische IFN- γ Produktion zeigten.

^c HLA für den das jeweilige Peptid positiv vorhergesagt wurde.

^d HLA in dessen Kontext das Peptid nach Abgleich mit bekannten Motiven und übereinstimmend exprimierten HLAs möglicherweise präsentiert und erkannt wird.

T-Zellen des Spenders F reagierten auf das für HLA-A1 vorhergesagte Peptid SV40-T₁₅₄. Dieses Peptid könnte nach Abgleich mit den Bindungsmotiven möglicherweise über den vom Spender exprimierten HLA-A3 präsentiert worden sein, da mit Tyrosin an Position 9 zumindest eine von HLA-A3 bevorzugte Hauptankeraminosäure vorhanden ist. Spender V zeigte eine T-Zellantwort auf das für HLA-A2 vorhergesagte Peptid SV40-T₂₀₇. Hier könnte die Reaktion im Kontext von HLA-A26 oder -Cw3 stattgefunden haben, für diese Allele sind Hauptankeraminosäuren in Position 2 bzw. 9 vorhanden (Tab. 14).

T-Zellen des Spenders R erkannten die beiden für HLA-A3 vorhergesagten Peptide SV40-T₅₇₅ und SV40-T₃₄₀ wahrscheinlich im Kontext des zum A3-Supertyp gehörenden HLA-A11. Das dominante, für HLA-B7 positiv bewertete Peptid SV40-T₂₇ weist auch Übereinstimmung mit dem Bindungsmotiv von HLA-B8 auf und wurde von den Spendern O, J und M

wahrscheinlich in diesem Kontext erkannt, genauso wie die Peptide JCV-T₂₇ und BKV-T₂₇ (Tab. 14). Für Peptid JCV-T₅₆₉ kommen nach Abgleich mit den Motiven vier verschiedene HLA für die Präsentation in Betracht, HLA-A3, -A26, -B8 und Cw3 (Tab. 14).

Tabelle 14: Abgleich einiger Peptide mit den Bindungsmotiven der HLA in deren Kontext die Präsentation und die Erkennung durch die T-Zellen möglicherweise stattgefunden hat.

HLA-A*03	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Anker und		L	<u>E</u>			I	I		K
Hilfsanker		V	<u>Y</u>			<u>M</u>	<u>L</u>		Y
		M				E	<u>M</u>		F
						<u>V</u>	E		
						<u>L</u>			
bevorzugte	I			I	T			Q	
Aminosäuren				P				S	
				V				T	
				K				K	
JCV-T ₅₆₉	I	L	Q	S	G	<u>M</u>	T	L	L
SV40-T ₁₅₄	R	T	L	A	C	<u>E</u>	A	I	Y

HLA-A*26	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Anker und		V				I			Y
Hilfsanker		T				<u>L</u>			F
		I				<u>V</u>			
		L							
		F							
bevorzugte	E	F	P			K			
Aminosäuren	D	I	E			M			
SV40-T ₂₀₇	A	I	N	N	Y	A	Q	K	L
JCV-T ₅₆₉	I	L	Q	S	G	M	T	L	L

HLA-B*08	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Anker und			K		K				L
Hilfsanker					R				
bevorzugte	G	R	E		N	E	E	F	
Aminosäuren	L		Q		Q	H	Q	M	
	I		D		H	M	H		
			H		I	N	S		
			L		L	D	L		
			S		Y	Q	D		
			T		V	S	V		
			R		E	T	T		
			G		M	Y			
			K		S				
					T				
					F				
JCV-T ₅₆₉	I	L	Q	S	G	M	T	L	L
SV40-T ₂₇	I	P	L	M	R	K	A	Y	L
BKV-T ₂₇	L	P	L	M	R	K	A	Y	L
JCV-T ₂₇	I	P	V	M	R	K	A	Y	L

HLA-Cw3	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Anker und			<u>V</u>	<u>P</u>		E			L
Hilfsanker			I			<u>Y</u>			F
			<u>Y</u>						M
			<u>L</u>						I
			M						
bevorzugte	H	E	E	M	N	Q	T		
Aminosäuren						S			
		R	N	R		M			
						K			
SV40-T ₂₀₇	A	I	N	N	Y	A	Q	K	L
JCV-T ₅₆₉	I	L	Q	S	G	M	T	L	L
SV40-T ₁₅₄	R	T	L	A	C	<u>E</u>	A	I	Y

HLA-A*0201	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Anker und		L				<u>V</u>			V
Hilfsanker		M							L
bevorzugte				E				K	
Aminosäuren				K					
JCV-T ₅₆₉	I	L	Q	S	G	M	T	L	L

Dem von keinen der beiden Algorithmen positiv bewerteten Peptid SV40-T₅₃₈ konnte kein möglicher HLA zugeordnet werden, ebenso nicht dem Peptid BKV-T₄₈₁. Für diese Peptide kann nur gesagt werden, daß die T-Zellantwort im Kontext eines der sechs von den Spendern exprimierten HLA-Klasse I Allele stattgefunden hat.

3.3.2 *Ex vivo* Reaktionen von spezifischen T-Zellen aus Melanompatienten und gesunden Spendern

Da die drei hier untersuchten Viren, vor allem aber SV40, sehr kontrovers im Hinblick auf ihre Beteiligung an Tumorentstehung und -progression diskutiert werden, wurden Patienten auf erhöhte Frequenzen an spezifischen T-Zellen für Peptide aus diesen drei Viren untersucht, was auf eine Rolle dieser Peptide in der Anti-Tumorimmunität hindeuten könnte. Da ein hoher Prozentsatz der Bevölkerung seropositiv für BKV und JCV ist und deshalb möglicherweise auch schon in Gesunden spezifische T-Zellen zu erwarten sind, wurden gesunde Spender im Vergleich getestet.

Insgesamt wurden 40 Patienten aus Tabelle 10, sowie 16 gesunde Spender untersucht. Es wurden 20 positive Peptide aus den *in vitro* Induktionen ausgewählt und im ELISpot-Assay getestet. Insgesamt wurden reaktive CD8⁺ T-Zellen in 29 (72,5%) Melanompatienten und in 4 (25%) der gesunden Spender detektiert. Es fällt auf, daß sich die positiven Reaktionen bei den BKV und JCV Peptiden häufen, hier werden alle Peptide von den T-Zellen mindestens eines Probanden erkannt. Es zeigte sich, daß Peptid JCV-T₅₆₉ besonders potent im Induzieren von T-Zellantworten war. Dieses Peptid löste in 25 (62,5%) der insgesamt 40 getesteten Patienten und 2 (12,5%) der 16 gesunden Spender eine T-Zellantwort aus. Drei weitere Peptide, JCV-T₄₃₉ mit 18 Ansprechern, BKV-T₂₇ mit 13 Ansprechern und JCV-T₂₇ mit 11 Ansprechern lösten deutlich mehr T-Zellantworten aus, als die restlichen Peptide. Die Peptide SV40-T₁₃₄, BKV-T₄₆₅ und BKV-T₄₁₈ lösten nur in PBMC von Patienten eine T-Zellantwort aus, die Peptide SV40-T₅₂₈ und JCV-T₂₈ nur in Gesunden, wobei die Reaktionen hier in beiden Fällen nur schwach waren. Zwei Peptide (SV40-T₃₄₀ und SV40-T₂₈) lösten in keinem Fall eine T-Zellantwort aus. Drei Patienten (M-ZTO, M-AVE und M-BÜG) reagierten mit einer spezifischen IFN- γ Produktion auf jeweils 10 bzw. 12 Peptide auf deutlich mehr als die anderen Patienten. Patient M-BÜG zeigte zudem gegen fast alle der erkannten Peptide ein starkes Ansprechen. Spezifische T-Zellen gegen 14 und somit die meisten Peptide wurden allerdings beim gesunden Spender A gefunden. Bei Spender F wurden auch *ex vivo* spezifische T-Zellantworten gegen die drei nach *in vitro* priming identifizierten Peptide SV40-T₂₇, JCV-T₂₇ und BKV-T₂₇ detektiert.

Tabelle 15: Ex vivo T-Zellantworten gegen 20 ausgewählte Peptide aus SV40, JCV, BKV

HLA Vorhersage	SV40-T ₅₃₈	SV40-T ₁₅₄	SV40-T ₅₁₅	SV40-T ₁₂₁	SV40-T ₄₉	SV40-T ₁₃₈	SV40-T ₃₄₀	SV40-T ₃₄₀	SV40-T ₁₃₄	SV40-T ₃₇	JCV-T ₃₉₇	JCV-T ₁₅₅	BKV-T ₂₇	BKV-T ₄₆₅	BKV-T ₁₅₆	BKV-T ₄₁₈	Summe
M-MLL	0,0	0,0	0,3	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,0	2
M-ZTO	1,0	3,7	1,9	2,0	1,0	2,4	0,9	3,3	3,4	2,4	1,6	2,1	2,7	2,0	5,1	12	
M-DLK	0,3	0,7	0,3	0,0	0,3	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0	0,3	0,3	0,3	0,7	1,0	2	
M-OEG-2	0,7	1,3	1,0	1,7	1,3	0,0	0,3	1,0	2,0	0,0	0,3	1,0	0,3	0,7	0,0	2	
M-EME	0,7	0,3	0,3	0,7	0,0	0,7	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3	1,0	0,0	1
M-IWA	0,9	3,3	2,7	2,6	1,4	1,1	1,1	1,1	2,9	1,3	2,9	2,6	2,7	2,3	0,0	8	
M-CUZ	0,0	0,0	0,0	0,3	0,7	0,3	0,3	5,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,3	0,3	0,0	2	
M-RRU	0,0	0,3	0,3	3,0	0,0	0,0	0,3	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	0,3	1,3	4
M-KUE	1,0	1,9	2,2	1,8	2,6	0,9	1,0	1,4	2,0	1,0	2,1	1,4	1,8	1,0	1,2	5	
M-HLR	0,3	0,3	0,7	0,7	1,7	0,3	1,3	5,0	0,0	0,7	0,0	0,7	2,0	1,3	0,3	3	
M-FNZ	0,9	1,7	2,5	2,1	1,0	1,4	1,1	1,7	2,4	1,5	1,6	1,9	1,9	1,4	0,5	4	
M-ÖPE	0,0	1,3	1,3	1,5	1,0	0,8	1,5	3,3	0,3	0,3	0,8	1,0	0,8	1,0	0,5	4,3	3
M-AVE	1,8	4,8	5,6	0,6	2,4	2,2	1,6	1,2	0,6	4,2	3,2	0,8	2,4	2,6	3,8	10	
M-NFR	0,7	0,0	0,0	1,0	0,3	0,3	0,0	0,7	0,0	0,3	0,7	0,0	0,0	0,0	1,0	1	
M-RHÄ-2	0,2	0,8	0,4	0,0	0,2	0,6	0,2	3,0	0,0	0,0	0,2	0,2	0,8	1,2	0,0	0,6	3
M-GIS	0,1	0,9	0,8	2,2	1,6	1,2	0,4	0,6	0,7	0,8	0,0	0,6	1,0	0,6	0,3	0,6	1
M-LEF	0,3	0,3	2,0	0,3	0,3	0,7	0,3	5,7	4,3	1,0	0,7	2,3	0,3	1,0	1,7	5	
M-RRN	0,0	1,0	0,3	0,7	1,0	0,3	0,3	3,0	0,0	0,0	0,3	2,0	0,3	0,0	0,3	3	
M-LYE	0,8	0,8	1,3	1,1	1,3	2,0	1,4	0,9	0,8	0,9	1,8	0,9	1,6	1,5	1,1	3	
M-VEI	1,0	1,7	1,0	1,3	0,3	1,7	1,0	4,0	0,3	0,7	1,0	1,0	2,3	0,7	0,0	0,3	3
M-BES	0,8	0,3	1,8	0,5	0,5	0,5	0,8	1,8	1,8	1,8	1,0	0,5	1,0	1,3	1,0	4,0	1
M-BÜG	0,5	8,5	5,3	10,3	0,3	1,8	1,3	12,3	0,5	6,5	0,0	0,8	3,8	1,0	8,3	10,0	10
M-NDN	0,0	0,0	1,0	1,0	0,0	0,0	0,0	6,0	0,0	1,0	1,0	0,0	1,0	0,0	1,0	0,0	3
M-ORN	0,0	1,3	0,7	0,7	1,3	0,3	0,3	1,3	0,3	0,3	0,3	0,0	0,7	0,0	0,3	1	
M-DOR	0,3	1,0	0,7	0,0	0,3	0,0	0,7	2,3	0,0	0,0	0,0	1,0	0,7	0,3	0,3	0,0	3
M-SLL	0,0	1,3	0,0	1,3	0,0	0,0	0,3	4,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	1,0	0,3	2	
M-ASS	0,7	0,3	0,0	0,3	0,0	0,3	0,0	1,7	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,7	0,0	0,0	1
M-INB	0,7	0,3	0,7	1,3	1,3	1,7	1,0	5,3	0,0	1,3	2,3	1,0	0,3	3,7	1,3	3,3	5
M-ILF	0,3	1,7	1,3	0,3	0,7	1,0	0,7	2,0	0,3	0,3	0,7	0,0	2,0	0,3	1,0	0,3	3
F	1,0	3,0	1,0	0,3	0,0	1,0	0,3	19,0	1,7	16,3	2,7	1,0	20,7	0,7	1,3	0,0	6
A	4,0	10,7	2,0	4,3	3,7	2,7	1,0	2,3	0,0	6,7	2,0	5,0	3,3	1,0	4,3	0,0	14
B	0,0	0,3	2,0	0,0	0,7	0,3	0,0	2,7	0,0	0,0	0,0	0,3	0,3	0,3	1,0	0,7	2
L	0,3	1,0	0,3	1,0	0,7	0,0	1,0	2,7	0,0	0,3	0,3	0,0	2,0	1,3	1,3	0,0	2
insgesamt	1	6	8	7	3	4	0	18	11	4	4	4	13	6	5	6	
Patienten (%)	0	10	15	15	5	7,5	0	40	5	62,5	22,5	7,5	25	15	10	15	
Gesunde (%)	6,25	12,5	12,5	6,25	6,25	6,25	0	12,5	12,5	12,5	6,25	6,25	18,75	0	6,25	0	

Gezeigt sind ex vivo T-Zellantworten spezifischer CD8⁺ T-Zellen aus Melanompatienten und gesunden Spendern. Die Werte sind als gegenüber dem Background normalisierte Werte dargestellt. Als schwache T-Zellantworten (hellgrau) wurden Werte \geq dem Doppelten des höchsten Einzelwertes der Hintergrundreaktion beurteilt, starke T-Zellantworten (dunkelgrau) waren Reaktionen \geq dem fünfachen des höchsten Einzelwertes der Hintergrundreaktion. Bei umrandeten Werten entsprach der vom Spender exprimierte HLA-Typ nicht dem durch die Vorhersage für das jeweilige Peptid positiv bewerteten HLA. Da die Peptide aus JCV und BKV nicht vorhergesagt wurden, sind hier keine HLA angegeben.

Auch bei diesen Versuchen wurden die Spender nicht nach ihrem HLA ausgewählt, so daß das für die Vorhersage herangezogene HLA in vielen Fällen nicht mit dem HLA-Typ des reagierenden Spenders übereinstimmt. Es waren nur für die SV40 Peptide Vorhersagen mit beiden Algorithmen durchgeführt worden, für die Peptide der beiden anderen Viren wurden die Peptidsequenzen mit den Bindungsmotiven verschiedener in Frage kommender HLA-Allele abgeglichen.

Fünf der insgesamt sechs T-Zellantworten auf Peptid SV40₁₅₄ fanden nicht im Kontext des positiv bewerteten HLA-A1 statt. Dem Bindungsmotiv nach kämen auch noch HLA-A3 und -Cw3 in Frage (Tab. 14). In diesem HLA-Kontext könnten das Peptid bei den Spendern M-IWA, M-AVE und F präsentiert worden sein. Bei Patient M-BÜG liegt nicht der gesamte HLA-Typ vor und für Patient M-ZTO konnte kein HLA zugeordnet werden.

Die Sequenz von Peptid JCV-T₄₃₉, welches in 18 Spendern eine T-Zellantwort hervorgerufen hat, paßt auf das Bindungsmotiv von HLA-A3 und -A11. Die Spender, bei denen eine T-Zellantwort zu beobachten waren, die diese HLA nicht exprimieren stimmen entweder in der Expression von HLA-A2, oder HLA-A24 überein, so daß diese beiden HLAs auch für die Präsentation des Peptides in Betracht kommen. Das Peptid JCV-T₅₆₉, welches T-Zellantworten in den meisten Spendern hervorgerufen hat, paßt zum Motiv vieler verschiedener HLA-Allele, HLA-A2, -A3, -A26, -B8 und -Cw3 (Tab. 14). 8 der insgesamt 27 reagierenden Spender exprimieren diese HLAs nicht, stimmen aber entweder in der Expression von HLA-A1 oder -A24 überein, möglicherweise wurde das Peptid auch über diese HLAs präsentiert.

Für die drei Peptide SV40-T₂₇, JCV-T₂₇ und BKV-T₂₇ kommen nach Abgleich mit den Bindungsmotiven sieben verschiedene HLAs in Betracht, HLA-B7, -B8, -B35, -Cw3, -Cw4, -Cw6 und -Cw7. Einer dieser HLAs wird von jedem reagierenden Spender exprimiert, für Patient M-DLK liegen nicht genug HLA-Informationen vor.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, daß aus den large T-Antigenen der drei Viren SV40, BKV und JCV insgesamt 45 Peptide als T-Zellepitope identifiziert wurden. Vier der SV40-T Peptide waren zuvor schon bei den Analysen mit den 1970 Peptiden identifiziert worden. Besonders potent im Induzieren von T-Zellantworten erwiesen sich die Peptide SV-T₂₇, BKV-T₂₇ und JCV-T₂₇. Bei den *ex vivo* Analysen zeigte sich, daß deutlich mehr T-Zellantworten auf Peptide aus den large T Antigenen von JCV und BKV stattgefunden haben. Trotz der hohen Durchseuchung der Bevölkerung mit diesen beiden Viren fanden deutlich mehr Reaktionen bei den Patienten, als bei den gesunden Spendern statt.

Faßt man die Ergebnisse aus den Analysen zu den 1970 vorhergesagten und den zusätzlich 107 ausgewählten Peptiden aus JCV und BKV zusammen, konnten insgesamt 99 der Peptide als T-Zellepitope identifiziert werden. Bei den Analysen zu *ex vivo* Frequenzen an T-Zellen gegen insgesamt 40 ausgewählte Peptide zeigte sich, daß für 37 der Peptide *ex vivo* Frequenzen in den getesteten Spendern zu finden waren. Dies spricht entweder für eine Induktion von T-Zellen gegen diese Peptide bereits *in vivo* oder für Kreuzreaktivitäten der reagierenden T-Zellen. Die Ergebnisse aus *in vitro* Stimulation und *ex vivo* Analysen zusammen zeigen, daß für einen Großteil der Peptide die T-Zellantwort nicht im Kontext des bei der Vorhersage positiv bewerteten HLA erfolgt ist. Diese Ergebnisse können zur Verbesserung der verwendeten Algorithmen herangezogen werden und helfen Bindungsmotive genauer zu definieren.

3.4 Expression tumorassoziierter Antigene im Melanom und anderen Geweben

Um die Expression der 35 für die Vorhersagen verwendeten Proteine (Anhang IV) in verschiedenen Tumoren und anderen Geweben zu analysieren und somit möglicherweise eine Aussage über die Relevanz der einzelnen Proteine für die hier untersuchten Tumore machen zu können, wurde mittels RT-PCR die Expression dieser Proteine im Melanom, Lymphom, Pankreaskarzinom, gesunder Haut, sowie PBMC von Melanopatienten und gesunden Spendern und in verschiedenen Zelllinien untersucht. Insgesamt wurden 37 Melanomproben sowohl von Zelllinien, als auch direkt von Metastasen, 9 Lymphomproben (Mycosis fungoides und Sézary Syndrom), 3 Pankreaskarzinomlinien, 7 Proben von PBMC aus Melanopatienten, 10 Proben von PBMC aus gesunden Spendern, 10 Proben gesunder Haut (Vorhaut und Brustreduktionshaut) und 14 verschiedene Zelllinien getestet. Unter den Zelllinien befanden sich 3 unterschiedliche Proben einer Margenkarzinomlinie, 3 akute lymphoblastische Leukämie Zelllinien (Molt-4, Jurkat, CCRF-CEM), 1 chronisch myelogene Leukämie-Zelllinie (K562), 1 Mycosis fungoides Zelllinie (MyLa), 5 B-Lymphoblastoide Zelllinien (Daudi, Tisi, Emj, JY, Hmy.C1R) und 1 akute monozytäre Leukämiezelllinie (THP1).

Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Tabelle 16 als Prozent der jeweils insgesamt getesteten Proben zusammengefaßt. Eine ausführliche Darstellung der Expression jedes Proteins in jeder Probe findet sich in Anhang V.

Es zeigte sich insgesamt ein recht heterogenes Expressionsmuster. Expression von APC, RasH, cdk4 und E2BA fand sich in allen getesteten Proben. Zu den am häufigsten

exprimierten Proteinen zählten BARD, Rb, NRAGE, p21, PLST, CA125 und PHF3. Auch Bcl-2, TRP-2 und Her2/neu fanden sich in einem Großteil der analysierten Proben. Für die meisten dieser Proteine ist Expression in einer Vielzahl von Geweben beschrieben, so daß eine weitverbreitete Expression auch in den hier analysierten Proben zu erwarten war. NY-ESO und GAGE, eigentlich als cancer/testis Antigene beschrieben, wurden in nahezu allen Geweben zumindest zu einem geringen Prozentsatz detektiert. Für NY-ESO fand sich keine Expression in gesunder Haut. p53-Expression konnte, außer in den Lymphomproben, zu einem gewissen Prozentsatz in allen Geweben detektiert werden. Für die Proteine PSA, BAGE und das hypothetische Protein XP058 konnte in keiner Probe mRNA-Expression nachgewiesen werden. Da für PSA Expression nur in Prostatagewebe beschrieben ist, war hier keine Expression zu erwarten. BAGE-Expression ist eigentlich fürs Melanom beschrieben, hier konnte BAGE in keiner Probe nachgewiesen werden. Bei der PCR für das SV40 large T-Antigen wurden zwar Amplifikate erhalten, es war allerdings keine eindeutige Sequenzierung möglich. Das an der Melanin-Biosynthese beteiligte Protein Tyrosinase wird nur im Melanom und sonst keinem anderen Tumor exprimiert. Aufgrund seiner allgemeinen Expression in Melanozyten findet es sich allerdings auch in gesunder Haut. Auffällig ist die hohe Expression von CEA in gesunder Haut. Expression von CLCA2 konnte nur in gesunder Haut nachgewiesen werden. Das einzige Protein, das eine Beschränkung auf Tumore (Melanom) und die Zelllinien (K562, CCR-CEM, JY und Hmy.C1R) zeigt, ist MAGE-A2.

Tabelle 16: Expression verschiedener TAA in unterschiedlichen Tumoren und Geweben, die Ergebnisse sind als Prozent der jeweils untersuchen Proben zusammengefaßt

Protein	Melanom (n=37)	Lymphom (n=9)	Pankreaskarz. (n=3)	gesunde Haut (n=10)	PBMC (n=7)	Mel.PBMC (n=10)	gesund Zelllinien (n=14)
APC	100	100	67	100	100	100	100
BAGE	0	0	0	0	0	0	0
BARD	100	100	100	100	100	100	93
Bcl-2	92	89	33	100	100	100	79
CA125	100	100	100	90	100	100	100
CLCA2	0	0	0	20	0	0	0
cdk4	100	100	100	100	100	100	100
CEA	3	11	33	80	0	0	0
E2BA	100	100	100	100	100	100	100
E2F	57	56	33	0	0	10	86
GAGE	71	56	33	80	29	70	64
Her2/neu	73	56	67	70	43	40	93
hTert	32	11	0	0	0	0	100
IL-24	65	0	33	80	0	0	7
LAGE	50	0	0	30	0	0	7
MAGE-2	78	0	0	0	0	0	50
MIA	92	11	33	50	14	0	21
MUC1	35	22	67	50	0	40	50
NY-ESO	76	33	100	100	100	0	29
p21	97	100	100	100	86	90	93
p53	38	0	33	40	71	90	86
PHF3	97	100	100	100	100	100	100
PLST	100	67	100	100	71	100	71
PSA	0	0	0	0	0	0	0
NRAGE	100	100	67	70	86	100	79
RasH	100	100	100	100	100	100	100
Rb	97	89	100	100	100	100	100
survivin	95	44	33	30	0	10	100
TRP-1	50	0	0	20	0	0	21
TRP-2	94	56	67	80	86	70	71
TSGA-10	74	100	33	100	86	100	93
Tyro	81	0	0	20	0	0	0
WT1	19	11	33	20	0	0	36
XP058	0	0	0	0	0	0	0

Da mittels RT-PCR nur qualitative und keine quantitative Aussagen zur Expression möglich sind, kann hier nicht beurteilt werden, ob in einem Teil der Proben gewisse mRNAs überexprimiert sind. Für einen Großteil der untersuchten Proteine konnte mRNA in einer Vielzahl der Proben nachgewiesen werden.

3.5 Analyse zur Expression der MAGE-A Familie der cancer/testis Antigene

Cancer/testis Antigene (CTA) stellen aufgrund ihrer spezifischen Expression in Tumor- und Testisgewebe, in manchen Fällen auch in Placenta oder dem Trophoblast, eine besonders interessante Gruppe von tumorassoziierten Antigenen dar. Wegen dieser eingeschränkten Expression sind sie nahezu tumorspezifisch und wären daher besonders als Ziele einer Immuntherapie geeignet. Deshalb wurde im weiteren die Expression der zu dieser Gruppe gehörenden MAGE-A Familie näher untersucht.

3.5.1 Organisation des MAGE-A Clusters auf Xq28

Die Gene der MAGE-A Familie sind auf einem etwa 3 Megabasen (Mb) großen Abschnitt des langen Arms des X-Chromosoms lokalisiert (Xq28, Position 148.37 Mb bis 151.97 Mb).

Das gesamte MAGE-A Cluster kann in 4 Subcluster unterteilt werden. Das am weitesten Richtung Centromer gelegene Cluster I (148.37 Mb – 148.68 Mb) beinhaltet die Gene für MAGE-A11, A9, A7 und A8 und wird durch etwa 2 Mb von Subcluster II (150.75 Mb – 150.98 Mb) getrennt. Subcluster II beinhaltet MAGE-A4, A5 und A10. Etwa 0,6 Mb downstream schließt sich das kompakte Subcluster III an (151,52 Mb-151,63 Mb), dieses beinhaltet die meisten Gene, MAGE-A6, A2b, A12, A2 und A3. In diesem Subcluster befinden sich nicht nur Gene der MAGE-A Familie, sondern auch die von vier anderen CTA, des Chondrosarkom-assoziierten Gens (CSAG) 1 und CSAG 2, ein Gen ähnlich dem Taxol-Resistenz assoziiertem Protein (LOC389903) und ein kürzlich als CSAG4 beschriebenes Gen. In dem sich anschließenden Subcluster IV (151,96 Mb-151,97 Mb) befindet sich nur MAGE-A1 (Abb. 17A).

3.5.2 Das MAGE-A Subcluster III ist hoch repetitiv und invertiert dupliziert

Aufgrund der Beobachtung, daß sowohl MAGE-A2 und MAGE-A2b, als auch CSAG2 und LOC389903 100% Sequenzidentität aufweisen wurde das Subcluster III näher untersucht. Hierbei zeigte sich, daß Subcluster III aus einem 51,2 kb großem DNA-Abschnitt besteht, welcher getrennt von einem 9 kb großen Bereich mit 98,9% Sequenzidentität invertiert dupliziert ist. Der dem Centromer am nächsten gelegenen invertierte Bereich beinhaltet ein

pseudo MAGE (LOC442468, ähnlich MAGE-A11), eine Sequenz mit geringer Ähnlichkeit zur kodierenden Sequenz von CSAG (in Abb. 17B als psCSAG2b bezeichnet), MAGE-A6, CSAG2, MAGE2b und CSAG4. In diesem Bereich sind alle MAGE Sequenzen in Richtung Centromer-Telomer (Cen-Tel) orientiert, wohingegen alle CSAG Sequenzen in Telomer-Centromer (Tel-Cen) Richtung orientiert sind. Der folgende 9kb große Sequenzabschnitt beinhaltet MAGE-A12 in Tel-Cen Orientierung. Der anschließende 51,2 kb große DNA-Abschnitt besteht aus CSAG1, MAGE-A2, LOC389903, MAGE-A3, einer Sequenz mit geringer Ähnlichkeit zur kodierenden Sequenz von CSAG (in Abb. 17B als psCSAG2 bezeichnet) und einer zusätzlichen pseudo MAGE Sequenz (psMAGEA). Die Orientierung der Leserahmen der MAGE-A Sequenzen geht hier Richtung Tel-Cen, die der CSAG Sequenzen in Cen-Tel Richtung. Schließt man CSAG4 und CSAG1 aus, zeigen die äußeren Bereiche eine Sequenzidentität von 99,8%.

Um auszuschließen, daß diese hoch gleichartige Sequenz ein Artefakt darstellt, welches durch falsche Assemblierung der genomischen Sequenz zustande gekommen ist, wurde mit Hilfe einer genomischen PCR der Übergang von verschiedenen zu identischen Sequenzbereichen untersucht. Hierzu wurden vier verschiedene Polymerase-Kettenreaktionen mit sechs verschiedenen Primern durchgeführt. Der Aufbau des MAGE-A Subclusters III und die Lage der Primer sind in Abbildung 17B dargestellt.

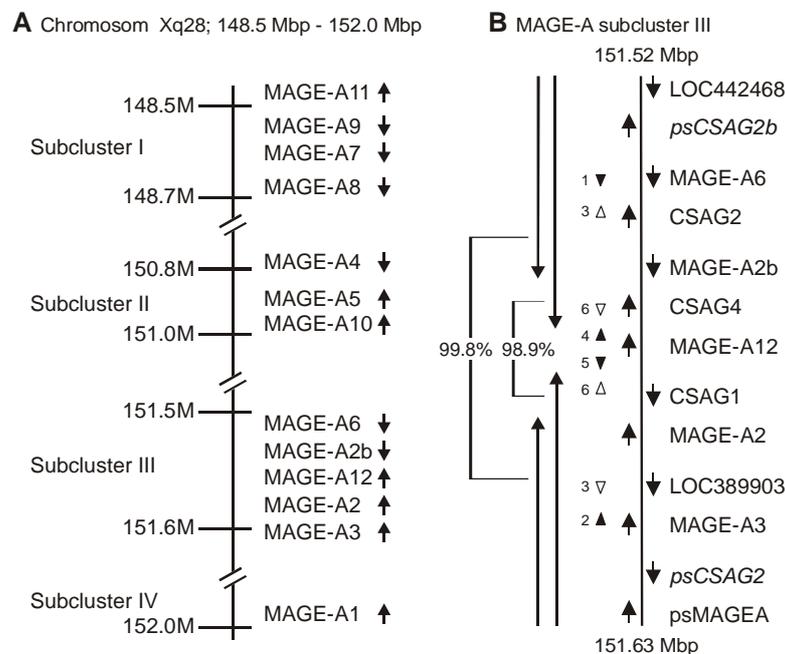


Abbildung 17: Chromosomale Lokalisation der MAGE-As und CSAGs. (A) Schematische Darstellung der vier MAGE-A subcluster auf dem X-Chromosom. Die Pfeile deuten die Richtung des offenen Leserahmens an. (B) Detaillierte Darstellung des MAGE-A subclusters III. Die kurzen Pfeile deuten die Richtung des offenen Leserahmens an, die langen Pfeile spezifizieren die invertierten Bereiche. Pfeilköpfe zeigen die verschiedenen Primer für die Analyse des cluster assembly. 1 = M6CS2 for., 2 = M3LOC for., 3 = M6CS2 rev., 4 = M12CS4 rev., 5 = M12CS1for., 6 = M12CS4 for. Die Abbildungen sind nicht maßstabsgetreu.

Alle vier Reaktionen lieferten ein spezifisches Produkt (Abb. 18) und die Sequenzierung dieser Produkte bestätigte die Übereinstimmung mit der Datenbank und die Struktur des MAGE-A Subclusters III. Hätte es sich um ein Artefakt gehandelt, wäre die Sequenz nur einmal vorhanden und es hätten nur zwei der PCRs zu einem Aplicon führen dürfen.

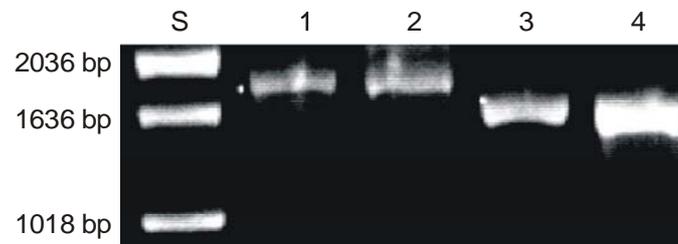


Abbildung 18: PCR zur Verifizierung der korrekten Assemblierung des MAGE-A Subclusters III. Es wurden 4 PCRs mit den 6 in Abbildung XX verzeichneten Primer auf genomischer DNA durchgeführt. Die PCRs wurden mit folgenden Primerkombinationen durchgeführt: 1 = Primer 5 und 6, 2 = Primer 4 und 6, 3 = Primer 2 und 3, sowie 4 = Primer1 und 3. Alle 4 PCRs lieferten ein spezifisches Amplifikat. S = 1kb Größenstandard.

3.5.3 Expression von MAGE-A mRNA im Melanom

Um Informationen über die mRNA Expression der verschiedenen Mitglieder der MAGE-A Familie zu erhalten, wurden spezifische Primer für jedes der 12 Mitglieder, sowie für CSAG1 und CSAG2 entworfen. Diese wurden zur Analyse von 38 Melanomproben von 16 Patienten und 5 verschiedenen kommerziell erhältlichen Zelllinien mittels RT-PCR verwendet. In zwei Fällen wurden zwei Metastasen desselben Patienten, welche zu unterschiedlichen Zeitpunkten entfernt wurden untersucht. Insgesamt wurden 18 Zelllinien von 11 Patienten getestet, 11 Metastasen von 9 Patienten wurden direkt *ex vivo* getestet. Von 7 Zelllinien wurden 2 oder 3 Sublinien erhalten und separat analysiert.

Wie Abbildung 19 zeigt, konnte in allen Proben eine spezifische Expression von mindestens einer MAGE-A mRNA pro Probe gezeigt werden. Nur das Pseudogen MAGE-A7 wurde nie nachgewiesen. In den insgesamt 38 analysierten Proben wurden MAGE-A2, -A3 und -A6 mit 35 positiven Proben (92%) und MAGE-A12 mit 30 Vertretern (79%) am häufigsten exprimiert. MAGE-A10, -A11 und -A1 wurden in 29 (76%), 24 (63%) und 23 (61%) der Proben, MAGE-A9 in 16 (42%) und MAGE-A4 in 15 (39%) der Proben detektiert. 4 Proben (11%) zeigten sich positiv für die Expression von MAGE-A5 und MAGE-A8. Expression von CSAG1 konnte in 32 (84%) gezeigt werden, CSAG2 mRNA wurde in 34 (89%) der Proben nachgewiesen.

Subcluster ¹	I				II			III ²					IV	Summe	
	11	9	7	8	4	5	10	6	C2 ³	12	C1 ³	2	3		1
Sk-Mel-37a ⁴	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	11
Sk-Mel-37b	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	10
Sk-Mel-37c	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	9
Sk-Mel-29	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	4
Sk-Mel-28	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	7
Sk-Mel-24a	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	4
Sk-Mel-24b	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	6
Malme-3Ma	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	2
Malme-3Mb	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	9
cLRDa ⁵	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	7
cLRDb	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	7
mHCH ⁵	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	5
mNRTa	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	4
cNRTa	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	4
cNRTb	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	4
cHRR1a ⁶	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	7
cHRR1b	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	7
cHRR2a	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	8
cHRR2b	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	8
mTRI	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	5
cHNS1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	6
cHNS2	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	7
cATE	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	7
cRTT	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	3
mGAR	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	5
mIEL1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	9
cIEL1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	9
mIEL2	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	10
cEET1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	7
mEET1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	8
mEET2	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	1
cEET2	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	2
cESA	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	9
mTRB	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	7
cISE	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	8
mHMO	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	7
mCLD	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	8
cCLD	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	9
38 samples	24	16	0	4	15	4	29	35		30		35	35	23	
	63%	42%	0%	11%	39%	11%	76%	92%		79%		92%	92%	61%	
sum ⁷	44				48			135					23	250	
	18%				19%			54%					9%	100%	

Abbildung 19: CTA mRNA Expression in Melanomproben. Gefüllte Kästchen zeigen an, daß das entsprechende Gen exprimiert wird, bei leeren Kästchen konnte keine Expression nachgewiesen werden.

¹Die 12 Mitglieder der MAGE-A Familie sind entsprechend ihrer Lokalisation auf dem X-Chromosom angeordnet und jeweils in die vier subcluster zusammengefaßt.

²die Expression von MAGE-A2b und LOC3809903 wurde aufgrund der 100%igen Sequenzidentität zu MAGE-A2 und CSAG2 nicht berücksichtigt.

³C2 = CSAG2, C1 = CSAG1

⁴kleine Buchstaben nach dem Probenamen bezeichnen cDNA Proben von unabhängigen Kulturen der gleichen Zelllinie.

⁵kleine Buchstaben vor dem Probenamen indizieren, daß die cDNA entweder direkt ohne Kultivierung aus der Tumorseite (m), oder aus einer durch Kultivierung gewonnenen Zelllinie (c) hergestellt wurde.

⁶Nummern nach dem Probenamen bezeichnen unterschiedliche Proben eines Patienten.

⁷Summe der Expression für die einzelnen 4 subcluster, die Prozentangaben wurden für die Gesamt-MAGE Expression kalkuliert.

Obwohl MAGE-A Expression in allen Proben nachgewiesen werden konnte, fiel auf, daß sich in einem Teil der Proben das Expressionsmuster der initialen Metastase deutlich von dem der aus ihr generierten Zelllinie unterschied und daß auch verschiedene Metastasen von einem Patienten ein unterschiedliches Muster zeigten. Zudem zeigte auch ein und dieselbe Zelllinie ein unterschiedliches Expressionsmuster in mRNA Präparationen aus unabhängigen Kulturen. Der auffälligste Wechsel der MAGE-A Expression konnte mit Metastasen und Melanomzellen von Patient EET beobachtet werden. Eine analysierte Metastase (mEET1) zeigte Expression von MAGE-A1 bis A6 und MAGE-A10, wohingegen kultivierte Melanomzellen aus dieser Metastase (cEET1) zusätzliche Expression von MAGE-A9, A11 und A12 zeigten, aber keine Expression mehr von MAGE-A5. Eine zweite Metastase des gleichen Patienten, welche zu einem späteren Zeitpunkt resektiert wurde (mEET2) zeigte nur Expression von MAGE-A5 und A10, die aus dieser Metastase generierte Zelllinie (cEET2) exprimierte nur MAGE-A10.

Eine ähnlich auffällige Beobachtung konnte auch für die Zelllinie Malme-3M gemacht werden, mRNA Präparationen von zwei unabhängigen Kulturen dieser Zelllinie zeigten komplett unterschiedliche Expressionsmuster. In der ersten Präparation (Malme-3Ma) konnte nur Expression von MAGE-A3 und A6 nachgewiesen werden, in der zweiten Präparation (Malme-3Mb) hingegen wurde MAGE-A1 bis A4, A6, A9 und A10 bis A12 amplifiziert (Abb. 20B). Auch die Zelllinie SK-Mel 37 wurde dreimal mit jeweils unterschiedlichem Expressionsmuster analysiert.

Es gibt aber auch Beispiele für das gleiche Expressionsmuster in Metastasen und kultivierten Zellen, wie die Proben mNRTa, cNRTa und cNRTb oder mIEL1 (Abb. 19 und Abb. 20A) und cIEL1 zeigen.

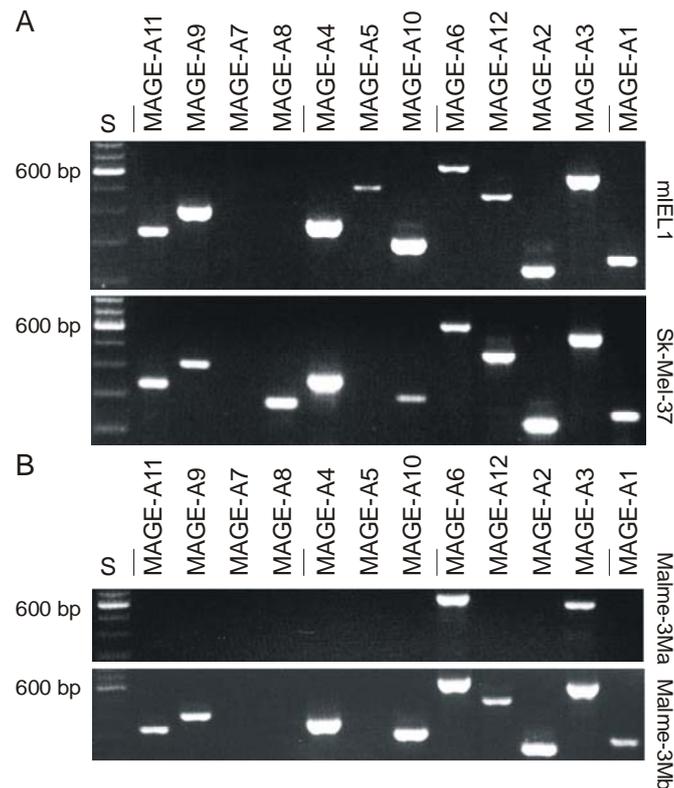


Abbildung 20: Expression der MAGE-A mRNA.

MAGE-A mRNA Expression in cDNA Präparationen der Zelllinien mIEL1 und SK-Mel 37. Bis auf das mutmaßliche Pseudogen MAGE-A7 sind Amplikate für alle MAGE-As gezeigt (A).

Differenzielle MAGE-A mRNA Expression in zwei unabhängigen Kulturen von Malme-3M Zellen (B).

Die 12 Mitglieder der MAGE-A Familie sind entsprechend ihrer Lokalisation auf dem X-Chromosom angeordnet und jeweils in die vier subcluster zusammengefaßt. S = 100bp Größensstandard.

Diese Daten zeigen, daß MAGE-A mRNA häufig in Melanomen exprimiert wird und daß jede analysierte Probe mindestens für ein MAGE-A Expression zeigt. Der Durchschnitt lag bei 6 MAGE-As pro Probe. Die Analyse deutet außerdem darauf hin, daß die verschiedenen MAGE-As in kultivierten Zellen, aber auch in Metastasen von ein und demselben Patienten differenziell exprimiert werden können.

3.5.4 Korrelation des Expressionsmusters und der chromosomalen Lokalisation

Anhand der hier gezeigten Expressionsanalyse konnte nachgewiesen werden, daß die MAGE-As aus Subcluster III für 54% der Gesamt-MAGE-Expression verantwortlich sind. Die drei Proben von Patient NRT zeigten ausschließlich Expression für alle MAGE-As aus Subcluster III und alle anderen Proben bis auf zwei (mEET2 und cEET2) zeigten Expression für mindestens zwei Mitglieder dieses Clusters. 29 der 38 (76%) analysierten Proben zeigten Expression aller Mitglieder des Subclusters III (Abb. 19). Da sich außer den Genen der MAGE-As auch die der CSAG Familie in diesem Cluster befinden, wurde deren Expression

mit der der MAGE-As korreliert. In 31 von 38 Proben (82%) konnte eine Amplifikation von CSAG1 und CSAG2/LOC389903 nachgewiesen werden. Drei der Proben zeigten nur für CSAG1 und eine Probe nur für CSAG2/LOC389903 ein Amplifikat. Für drei der Proben konnte kein CSAG-Amplifikat nachgewiesen werden. Auffällig ist die Beobachtung, daß jede Probe, in der ein Mitglied der CSAG Familie exprimiert wird, auch mindestens zwei Mitglieder der MAGE-As aus Subcluster III exprimiert. 74% der analysierten Proben exprimieren alle MAGE-As des Subclusters III zusammen mit CSAG1 und CSAG2/LOC389903. Lin et al. konnten mit Hilfe eines MAGE-A Familien-spezifischen Primerpaares, mit dem alle Mitglieder amplifiziert werden können, zeigen, daß CSAG1 im Chondrosarkom zusammen mit den MAGE-As exprimiert wird (Lin *et al.*, 2002). In der hier dargestellten Analyse konnte beim Vergleich der mRNA Expression der CSAGs und MAGE-As gezeigt werden, daß diese Koexpression auch im Melanom stattfindet. Aufgrund der wesentlich detaillierteren Untersuchung in dieser Arbeit konnten die MAGE-As aus Subcluster III als diejenigen nachgewiesen werden, die koexprimiert werden. Diese Untersuchungen zeigen, daß die Expression der unterschiedlichen Mitglieder der MAGE-A und CSAG Familie nicht unabhängig, sondern mit ihrem Arrangement auf dem X-Chromosom assoziiert sind und zwar so, daß die MAGE-As aus Subcluster III dominant im Melanom exprimiert werden und daß die meisten Proben Expression aller MAGE-As aus diesem Subcluster zusammen mit Expression der CSAGs zeigen.

3.5.5 Induktion der MAGE-A und CSAG Expression

Die koordinierte Expression der MAGE-A und CSAG Gene im Subcluster III kommt möglicherweise durch einen epigenetischen Kontrollmechanismus zustande. Da bisher gezeigt werden konnte, daß sich die Expression von MAGE-A1 bis A4 in MAGE-A negativen Zellen durch Behandlung mit der hypomethylierenden Substanz 5'Aza-2'-Deoxycytidin (5-Aza-dC) induzieren läßt wurde in dieser Arbeit untersucht, inwieweit dies auch für die anderen Mitglieder der MAGE-A Familie und auch für die CSAG Familie zutrifft. Hierzu wurden PBMC eines gesunden Spenders mit Lectin (PHA) stimuliert und mit 5-Aza-dC inkubiert. Anhand der extrahierten cDNA konnte gezeigt werden, daß bis auf MAGE-A5 und dem mutmaßlichen Pseudogen MAGE-A7 Transkription für alle MAGE-As und die CSAGs durch 5-Aza-dC induziert werden kann (Abb. 21). Diese Ergebnisse zeigen, daß die Expression der meisten MAGE-As und CSAGs mit veränderter DNA Methylierung assoziiert sein kann.

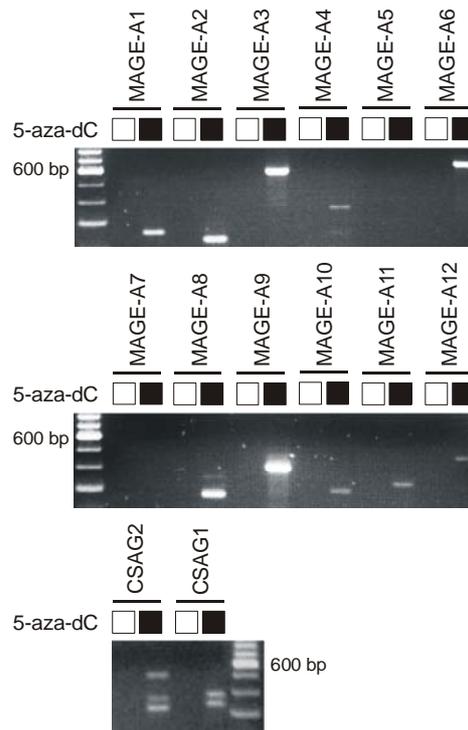


Abbildung 21: Induktion der MAGE-A und CSAG Expression. RT-PCR Analyse der mRNA Expression aller Mitglieder der MAGE-A Familie, CSAG1 und CSAG2. PHA stimulierte PBMC eines gesunden Spenders wurden mit 5-Aza-dC behandelt (■) oder bleiben unbehandelt (□).

3.5.6 mRNA Expressionsmuster der MAGE-As und CSAGs in nicht melanozytären Tumoren und gesunden Kontrollen

Zusätzlich zu den Melanomproben wurden noch Testisbibliothek cDNA, 3 Pankreaskarzinome, 12 Lymphomproben (3 Mycosis fungoides, 9 Sézary Syndrom), 3 akute lymphoblastische Leukämie Zelllinien (Molt-4, Jurkat, CCRF-CEM), 1 chronisch myelogenöse Leukämie-Zelllinie (K562), 1 Mycosis fungoides Zelllinie (MyLa), 4 B-Lymphoblastoide Zelllinien (Daudi, Tisi, Emj und JY), 1 B/T-lymphoblastoides Hybrid (T2), 1 Keratinozyten- (HaCaT) und 1 Monozytenlinie (THP1), sowie 15 gesunde Kontrollen (10 PBMC Proben und 5 Proben aus entweder Vorhaut oder Brustreduktionshaut) untersucht. Keine der gesunden Kontrollen zeigte Expression eines Mitglieds der MAGE-A Familie oder CSAG. In Testis war die Expression aller Mitglieder der MAGE-A Familie und von CSAG2 zu beobachten. Eines der drei Pankreaskarzinome zeigte Expression von MAGE-A10. Drei (1 MF und 2 SS) der 12 Lymphome zeigten ein Amplifikat für MAGE-A9. Die MyLa-Zelllinie exprimierte MAGE-A8, Tisi und Emj jeweils MAGE-A11. Die einzigen Zelllinien, die mehr als ein MAGE-A exprimierten waren K562, JY und T2. Für diese drei Linien konnte Expression der MAGE-As und CSAG2 aus Subcluster III gezeigt werden (Abb. 22).

		Subcluster ¹							III ²				IV		
		MAGE-A													
		11	9	7	8	4	5	10	6		12	2	3	1	
									C2 ³						
Probe	Gewebe														
Bibliothek	Testis	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
CHE	Pankreaskarzinom ⁴							■							
ROR	Lymphom (MF) ^{4,5}		■												
UGD	Lymphom (SS) ⁵		■												
NTR	Lymphom (SS)		■												
K562	CML ⁶				■				■	■	■	■	■	■	■
Myla	T-Lymphozyten				■										
Tisi	B-lymphoblastoid	■													
Emj	B-lymphoblastoid	■													
JY	B-lymphoblastoid		■					■	■	■	■	■	■	■	■
T2	B- and T-lymphoblastoides Hybrid								■	■	■	■	■	■	■

Abbildung 22: MAGE Expression in nicht-melanozytären Tumoren und gesunden Kontrollen. Nur Proben, bei denen Expression nachgewiesen werden konnte sind gezeigt. Gefüllte Kästchen zeigen an, daß das entsprechende Gen exprimiert wird, bei leeren Kästchen konnte keine Expression nachgewiesen werden.

¹Die 12 Mitglieder der MAGE-A Familie sind entsprechend ihrer Lokalisation auf dem X-Chromosom angeordnet und jeweils in die vier subcluster zusammengefaßt.

²in subcluster III wurde die Expression von MAGE-A2b aufgrund der Sequenzidentität zu MAGE-A2 nicht berücksichtigt.

³C2 = CSAG2

⁴ Es wurden drei Pankreaskarzinom- und 12 Lymphomproben analysiert, nur diejenigen, die MAGE Expression zeigten sind dargestellt.

⁵ MF = Mycosis fungoides, SS = Sézary Syndrom

⁶ CML = chronische myolegenöse Leukämie

Im Vergleich mit den Melanomproben ist die Expression der MAGE-As wesentlich weniger prominent, allerdings zeigt sich auch hier die koordinierte Expression der MAGE-As aus Subcluster III mit CSAG2.

Faßt man die Ergebnisse zusammen, konnte gezeigt werden, daß die MAGE-A Familie der cancer/testis Antigen ein gutes Ziel für eine Immuntherapie des Melanoms darstellen würde, da mindestens ein Vertreter dieser Familie in jedem untersuchten Melanom detektiert werden konnte. Dies könnte auch für die Diagnostik des Melanoms genutzt werden. Desweiteren konnte gezeigt werden, daß ein Großteil der untersuchten Melanomproben bevorzugt MAGE-As aus dem Subcluster III exprimieren und daß diese Expression mit der Expression zweier anderer in diesem Subcluster lokalisierten Cancer/testis Antigene korreliert. Für alle MAGE-As außer MAGE-A5 und MAGE-A7 konnte demonstriert werden, daß die Expression über DNA-Demethylierung induziert werden kann.

3.6 Ex vivo Reaktionen von spezifischen T-Zellen gegen Peptide der MAGE-A Familie

Die Mitglieder der cancer/testis Antigene stellen aufgrund ihre ausschließlichen Expression im Testis-, Plazenta und Tumorgewebe geeignete Proteine für eine gezielte, tumorspezifische Immuntherapie dar. Die obigen Untersuchungen zeigen außerdem, daß sich die MAGE-A Familie gut als Target für eine Immuntherapie des Melanoms eignet, da die Expression mindestens eines Vertreters dieser Familie in jedem untersuchten Melanom zu finden war.

Daher wurden Peptide ausgewählt, welche mit großer Sequenzähnlichkeit in allen 12 Mitgliedern der MAGE-A Familie zu finden sind. Durch den Einsatz solcher Peptide in einer Vakzine können Antigenverlustvarianten umgangen werde, da für den Fall, daß eines der Zielproteine der Therapie nicht mehr exprimiert wird, bereits auch T-Zellen gegen Peptide aus allen Proteinen der MAGE-A Familie induziert wurden. Wie bei den Peptiden aus SV40, BKV und JCV ist es hier möglich, Peptide zu verwenden, die für ein anderes Mitglied der MAGE-A Familie natürliche Mimotope darstellen. Die Auswahl der hier verwendeten Peptide erfolgte deshalb auch ohne Vorhersagen, sondern nur aufgrund großer Sequenzähnlichkeit der Peptide für alle Mitglieder der MAGE-A Familie. Für die Auswahl der Peptide wurden die Sequenzen aller Mitglieder der MAGE-A Familie bis auf das Pseudogen MAGE-A7 aligniert und aus den in Abbildung 23 rot markierten, homologen Bereichen 20 teilweise überlappende Peptide ausgewählt. Da die Sequenz von MAGE-A5 vor diesen Bereichen endet, konnten aus diesem Protein keine Peptide ausgewählt werden.

Es wurde darauf geachtet, daß sich die Peptide möglichst von Sequenzen der ubiquitär exprimierten MAGE-D Familie und dem MAGE verwandten Protein Nectin unterschieden.

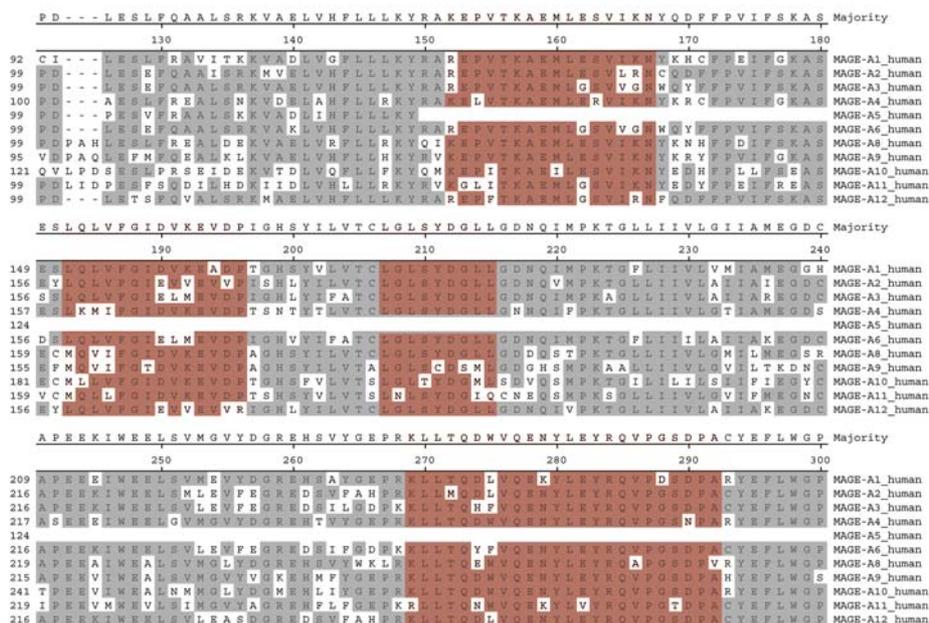


Abbildung 23: Alignment von 11 Mitgliedern der MAGE-A Familie. Das Pseudogen MAGE-A7 wurde außer acht gelassen.

Um zu überprüfen, welche der ausgewählten Peptide prinzipiell T-Zellepitope darstellen, wurden PBMC von 38 Patienten aus Tabelle 10 (von zwei dieser Patienten wurde Material von zwei verschiedenen Entnahmezeitpunkten getestet) und 16 gesunde Spender aus Tabelle 7 auf *ex vivo* Reaktionen gegen die folgenden 20 Peptide getestet.

Tabelle 17 : Sequenzen der ausgewählten MAGE-A Peptide

Bezeichnung	Sequenz
Peptid M1	EPVTKAEML
Peptid M2	VTKAEMLES
Peptid M3	TKAEMLESV
Peptid M4	EMLESVIKN
Peptid M5	VFGIDVKEV
Peptid M6	LGLSYDGLL
Peptid M7	KLLTQDWVQ
Peptid M8	LLTQDWVQE
Peptid M9	LTQDWVQEN
Peptid M10	TQDWVQENY
Peptid M11	QDWVQENYL
Peptid M12	DWVQENYLE
Peptid M13	WVQENYLEY
Peptid M14	VQENYLEYR
Peptid M15	QENYLEYRQ
Peptid M16	ENYLEYRQV
Peptid M17	NYLEYRQVP
Peptid M18	LEYRQVPGS
Peptid M19	EYRQVPGSD
Peptid M20	YRQVPGSDP

Die Ergebnisse dieser *ex vivo* Analysen sind in Tabelle 17 gezeigt. Es fiel auf, daß sich insgesamt bei nur 8 (21,1%) von 38 Patienten T-Zellantworten fanden.

Bei den gesunden Spendern allerdings fanden sich erneut T-Zellreaktionen bei 25% der getesteten Proben. Es gab insgesamt fast nur schwache Reaktionen, nur ein Patient (M-DNS) zeigte starke T-Zellantworten. T-Zellen dieses Patienten zeigten als einzige, mit einer Reaktion gegen 14 Peptide, T-Zellantworten gegen mehr als 3 Peptide. Vier der Peptide (M8, M9, M11 und M14) wurden nicht erkannt, am häufigsten lösten die Peptide M13 (WVQENYLEY) und M20 (YRQVPGSDP) eine Reaktion aus, mit jeweils 4 reagierenden Spendern.

Tabelle 18: *Ex vivo* T-Zellantworten gegen 20 Peptide aus verschiedenen Mitgliedern der MAGE-A Familie

	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	Summe	
M-TRN	0,5	0,0	0,3	0,3	0,5	3,3	1,3	0,8	0,3	0,5	0,5	0,5	0,0	0,5	0,5	0,0	1,5	1,0	0,5	0,5	0,5	1
M-RHE	0,7	3,0	0,3	0,3	1,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,3	0,0	0,3	0,7	0,7	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,7	1
M-ZTO	1,3	1,0	0,0	1,3	0,0	0,0	3,0	0,0	0,3	2,0	0,7	1,3	1,0	0,3	0,7	0,7	0,7	1,3	2,0	0,0	0,3	3
M-LCK	1,0	1,4	1,6	2,6	0,9	1,7	1,9	0,6	0,4	1,6	1,1	0,0	2,0	1,7	2,4	0,7	0,6	1,0	0,7	1,7	1,7	3
M-RRN	1,3	1,3	0,3	2,0	0,3	0,3	0,0	0,3	0,7	0,0	0,7	0,0	1,0	1,0	0,3	0,3	0,3	0,3	0,7	0,3	0,3	1
M-TBE	0,7	0,7	1,0	1,3	1,3	0,3	0,0	2,3	0,3	0,3	0,3	1,3	0,3	0,3	0,7	1,0	0,7	0,7	0,7	2,0	2	
M-WEH	0,3	0,7	0,3	1,0	1,0	1,3	1,0	1,0	0,7	0,0	0,3	0,3	2,0	0,3	0,3	1,0	0,0	0,3	0,7	0,0	0,0	1
M-DNS	3,7	4,3	4,0	11,3	2,7	1,7	4,3	6,0	0,0	5,3	1,7	4,0	5,0	1,3	1,0	2,0	4,0	1,3	4,0	3,3	3,3	14
V	1,3	1,0	1,7	1,7	0,7	1,7	1,0	1,7	0,0	1,7	0,3	0,7	2,0	1,0	1,7	2,0	1,3	0,3	1,3	2,0	2,0	3
M	4,7	0,0	0,0	0,0	0,3	0,7	0,7	0,3	0,3	2,0	0,3	0,3	0,3	0,3	0,0	0,0	1,3	0,3	0,0	0,0	0,0	2
B	0,3	0,3	0,0	0,0	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,7	0,7	0,3	0,3	0,3	0,7	0,3	0,0	0,3	0,3	2,0	2,0	1
N	0,0	1,0	2,3	0,7	1,3	0,7	0,3	0,7	1,7	1,0	0,3	0,3	0,7	0,7	1,3	0,3	0,3	0,0	0,7	0,0	0,0	1
insgesamt	2	2	2	3	1	1	2	2	0	3	0	1	4	0	1	2	1	0	2	4	4	4
Patienten	2,5	5	2,5	7,5	2,5	2,5	5	5	0	5	0	2,5	7,5	0	2,5	2,5	2,5	0	5	5	5	5
Gesund	6,25	0	6,25	0	0	0	0	0	0	6,25	0	0	6,25	0	0	6,25	0	0	0	0	0	12,5

Gezeigt sind *ex vivo* T-Zellantworten spezifischer CD8⁺ T-Zellen aus Melanompatienten und gesunden Spendern. Die Werte sind als gegenüber dem Background normalisierte Werte dargestellt. Als schwache T-Zellantworten (hellgrau) wurden Werte \geq dem Doppelten des höchsten Einzelwertes der Hintergrundreaktion beurteilt, starke T-Zellantworten (dunkelgrau) waren Reaktionen \geq dem fünfachen des höchsten Einzelwertes der Hintergrundreaktion.

Alle Spender, die T-Zellantworten gegen die beiden Peptide M13 und M20 zeigten, exprimieren HLA-Cw7, auch stimmt die Peptidsequenz zum Teil mit dem Bindungsmotiv für diesen HLA überein, was für eine Präsentation dieser Peptide in diesem HLA-Kontext spricht (Tab. 19). Für Peptid M13 kommt im Falle des Patienten M-DNS und des Spenders V auch HLA-A3 für die Präsentation in Betracht. Alle Spender, die T-Zellantworten gegen Peptid M4 zeigten exprimieren HLA-A2, so daß dieses Peptid möglicherweise in diesem HLA-Kontext präsentiert wird. (Tab. 19).

Tabelle 19: Abgleich einiger Peptide mit den Bindungsmotiven der HLA in deren Kontext die Präsentation und die Erkennung durch die T-Zellen möglicherweise stattgefunden hat.

HLA-Cw*0702	1	2	3	4	5	6	7	8	9	HLA-A*0201	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Anker und		<u>Y</u>			<u>V</u>	<u>V</u>			Y	Anker und		L				<u>V</u>			V
Hilfsanker		<u>P</u>			<u>Y</u>	I			F	Hilfsanker		M							L
					I	<u>L</u>			L	bevorzugte				E					K
					<u>L</u>	<u>M</u>				Aminosäuren				K					
					E					M4	E	M	L	E	S	<u>V</u>	I	K	N
					<u>M</u>														
bevorzugte		R	P	D	T	A	Y	E											
Aminosäuren		D	G	E		R	M	A											
			A	V			N	F											
				Q			R	D											
				P			V	K											
				S			F												
				G			E												
M13		W	V	Q	E	N	Y	L	E	Y									
M20		Y	R	Q	V	P	G	S	D	P									

Ingesamt zeigten sich weniger spezifische T-Zellantworten als bei den anderen *ex vivo* Analysen, von insgesamt 33 Reaktionen waren diese nur in 4 Fällen, bei Patient M-DNS, stark.

3.7 Theoretische Analyse zur natürlichen Prozessierung der identifizierten Epitope

Eine Frage, die sich bei der Identifizierung von T-Zellepitopen stellt, ist, ob diese auch von der Zelle in natürlicher Weise aus dem Protein, aus dem sie stammen prozessiert werden können. Diese Frage kann *in vitro* mit Hilfe von transfizierten Zelllinien, welche sowohl das in Frage kommende HLA und das Antigen exprimieren beantwortet werden, erste Hinweise können allerdings auch Algorithmen liefern, die die Proteinspaltung durch das Proteasom vorhersagen. Diese theoretischen Analysen bedürfen aber der experimentellen Überprüfung.

Zwei im Internet frei zugängliche Algorithmen, NetChop und PAMPro, die auf der Annahme beruhen, daß bei der Proteinspaltung durch das Proteasom bereits der korrekte C-Terminus generiert wird, bieten die Möglichkeit, die natürliche Prozessierung von Peptiden theoretisch zu analysieren. Beide Algorithmen können genutzt werden, um wahrscheinliche Schnittstellen des Proteasom in einer Proteinsequenz vorherzusagen (siehe Abschnitt 1.4).

Es wurden Vorhersagen für alle identifizierten Peptide durchgeführt. Hierbei läßt sich zumindest ein theoretischer Einblick gewinnen, ob die identifizierten Epitope potentiell durch das Proteasom generiert werden könnten. In folgender Tabelle sind die Ergebnisse dieser Vorhersagen ohne die 20 Peptide aus der MAGE-A Familie gezeigt, diese werden gesondert dargestellt.

Tabelle 20: Zusammenstellung der identifizierten Epitope und ihrer Prozessierungswahrscheinlichkeit vorhergesagt mit NetChop und PaProC

Protein	Sequenz	NetChop	PAProC	Protein	Sequenz	NetChop	PAProC
APC ₁₈₃	DMTRRQLEY	0,97	+	TYRO ₃₁₂	LPSSADVEF	0,97	+
APC ₆₁₄	AFLVGTLY	0,98	+++	TYRO ₃₄₅	EGFASPLTG	0,05	-
APC ₂₄₃₆	VLVRQSTFI	0,93	++	TYRO ₄₇₃	RIWSWLLGA	0,27	-
BARD ₁₀₃	SMIQLCSKL	0,94	++	TYRO ₁₇₁	NIYDLFVWM	0,48	-
BARD ₄₄₉	QNGSDPNVK	0,53	-	WT1 ₁₀	ALLPAVPSL	0,98	++
BARD ₆₇₅	CYFYLWGTF	0,86	++	SV40 ₅₂₈	MNEFSVPKT	0,03	-
Bcl-2 ₂₁₉	TLLSLALVG	0,05	+	SV40 ₄₆₃	VAIDQFLVV	0,95	-
CEA ₁₆₈	EPETQDATY	0,89	++	SV40 ₅₇₅	LLLMLIWYR	0,23	+++
CEA ₃₁₁	TTVTTITVY	0,98	-	SV40 ₁₄₆	LSHAVFSNR	0,28	+++
CEA ₃₄₆	EPEIQNTTY	0,94	+++	SV40 ₂₁₄	KLCTFSFLI	0,86	++
CEA ₄₆₇	ITEKNSGLY	0,90	-	SV40 ₄₁₂	MVYNIPKKR	0,60	+++
CLCA2 ₁₄	KFVTLVAL	0,93	-	SV40 ₃₄₉	RVDSLQLTR	0,37	-
CLCA2 ₁₉₈	SDITGIFVC	0,19	+	SV40 ₂₀₇	AINNYAQKL	0,89	-
CLCA2 ₈₉₅	VPARDYLIL	0,93	+	SV40 ₁₇₀	LLYKKIMEK	0,91	-
CLCA2 ₉₁₁	GLIGIICLI	0,56	-	SV40 ₂₈	PLMRKAYLK	0,94	-
E2BA ₁₁₈	FIKDGATIL	0,93	+++	SV40 ₄₉₈	RDYLDGSVK	0,32	-
Her2/neu ₉₈	RLRIVRGTO	0,12	-	SV40 ₁₃₄	DPKDFPSEL	0,98	++
Her2/neu ₄₁₄	AWPDSLPLD	0,95	-	SV40 ₅₃₈	QARFVKQID	0,04	-
Her2/neu ₇₉₇	VTQLMPYGC	0,03	+++	JCV ₁₅₅	RTVASFAVY	0,97	-
Her2/neu ₉₁₁	TVWELMTFG	0,37	+++	JCV ₃₉₇	CLLPQMDTV	0,19	++
hTert ₁₁₂₂	ALPSDFKTI	0,92	nca	JCV ₂₇	IPVMRKAYL	0,97	++
IL-24 ₃₃	LPCLGFTLL	0,98	-	JCV ₅₆₉	ILQSGMTLL	0,88	+++
IL-24 ₃₅	CLGFTLLLW	0,89	+++	JCV ₄₃₉	ALLDLCGGK	0,85	-
LAGE ₁₁₂	DAAPLPRPG	0,04	-	JCV ₁₃₉	FPVDLHAFI	0,96	+++
MIA ₆₉	VVYVFSKIK	0,76	+++	JCV ₁₃₅	DPKDFPVDL	0,98	-
MUC ₁₃	LLLTVLTVV	0,97	-	JCV ₂₈	PVMRKAYLK	0,89	-
MUC ₁₁₆₉	VLVALAIVY	0,72	+++	JCV ₅₀₉	NLERKHQNK	0,85	-
p53 ₂₃₉	NSSCMGGMN	0,02	-	JCV ₄₈₂	ESRDLPSGH	0,07	++
PHF ₇₃₀	RFMVGCGRC	0,03	-	JCV ₂₁₁	NYCQKLCF	0,66	-
PHF ₇₇₉	ILDPDTLEN	0,57	+++	BKV ₁₅₆	RTLACFAVY	0,93	-
PHF ₁₇₇₄	EFPSKSITF	0,97	-	BKV ₄₆₅	VAIDQYMVV	0,92	-
PLST ₁₈₆	TPFIIQENL	0,98	-	BKV ₃₅₁	RVDTLHMTR	0,75	-
PSA ₂₃₉	RPSLYTKVV	0,94	-	BKV ₂₁₂	NFCQKLCF	0,41	-
RAGE ₇₆₈	NFGAIGFFW	0,47	nca	BKV ₅₈₂	IWFRPVADF	0,94	+++
RAGE ₇₆₉	FGAIGFFVW	0,80	nca	BKV ₄₁₈	IPKRRYWLF	0,97	+++
RasH ₅	KLVVVGAGG	0,05	-	BKV ₁₉₁	CAGHNIIF	0,46	+++
Rb ₇₆	LTWEKVSSV	0,97	-	BKV ₄₁₅	VFNVPKRRY	0,78	+
Rb ₁₀₀	GICIFIAAV	0,92	+	BKV ₆₁₃	TFSRMKYNV	0,08	++
Rb ₆₄₈	SLFYKKVYR	0,36	+++	BKV ₄₁₀	FLHCVVFNV	0,27	-
Rb ₇₇₉	LSPIPHIPR	0,89	-	BKV ₅₃₀	MNEFPVPKT	0,03	+
SUR ₈₀	HSSGCAFLS	0,03	-	BKV ₄₈₁	GAESKDLPS	0,03	-
SV40 ₂₇	IPLMRKAYL	0,97	++	BKV ₄₁₄	VFNVPKRR	0,63	++
SV40 ₁₃₈	FPSELLSFL	0,94	+++	BKV ₂₈₇	VFLLGMYL	0,78	-
SV40 ₁₅₄	RTLACFAIY	0,79	-	BKV ₂₇	LPLMRKAYL	0,91	++
SV40 ₂₁₆	CTFSFLICK	0,38	++	BKV ₅₇₀	ILQSGMTLL	0,88	+++
SV40 ₃₄₀	AVDTVLAKK	0,97	-	BKV ₄₇₀	YMVVFEDVK	0,62	++
SV40 ₄₁₆	IPKKRYWLF	0,97	+++	MAGE-A2 ₁₁₆	LVHFLLLY	0,97	+++
TSGA10 ₃₈₃	NDIKQKVQD	0,03	-	MAGE-A1 ₂₃₇	KLLTQDLVQ	0,08	+
TRP-2 ₄	LWWGFLLS	0,27	+	MAGE-A2 ₂₅₀	LVQENYLEY	0,98	+++
TRP-2 ₄₈₅	GLFVLLAFL	0,92	+++	gp100 ₂₈₆	VTAQVVLQA	0,74	+++
TYRO ₅	VLYCLLWSF	0,97	-	p53 ₁₇	ETFSDLWKL	0,88	++
TYRO ₂₀₈	LPWHRLPLL	0,97	+++	p53 ₃₄₇	ALELKDAQA	0,79	-
TYRO ₂₇₀	SSWQIVCSR	0,89	+	TRP-2 ₁₈₅	FWLHYYSV	0,97	+

Dargestellt sind die Ergebnisse der Vorhersagen der Prozessierungswahrscheinlichkeit der aufgeführten Peptide vorhergesagt mit NetChop und PAProC. Fettgedruckte Werte symbolisieren positive NetChop-Vorhersagen, der Schwellenwert liegt bei 0,5. Bei PAProC finden Abstufungen von - bis +++ statt. nca = non-cleavable area

Mit NetChop wird für 73 der insgesamt 106 hier dargestellten Peptide Prozessierung durch das Proteasom vorhergesagt, mit PAMProC sind es 55. In 45 Fällen weichen die Vorhersagen voneinander ab. Diese Vorhersagen können allerdings auch nur eine Orientierungshilfe bieten, wie auch im Falle der Epitopvorhersagen müssen die Ergebnisse experimentell überprüft werden. Für die drei Peptide (MAGE-A2₁₁₆, TRP-2₁₈₅ und MAGE-A2₂₅₀) deren natürliche Prozessierung und Präsentation durch Tumorzellen gezeigt wurde, sagen beide Algorithmen eine wahrscheinliche Prozessierung voraus.

Diese Vorhersagen wurden auch für alle 20 ausgewählten Peptide der MAGE-A Familie durchgeführt. Hier wurde die Vorhersage für die Prozessierung aus jedem einzelnen Familienmitglied durchgeführt. Da die Peptide vor dem Hintergrund ausgewählt wurden, mit großer Sequenzabdeckung auf alle MAGE-As zu passen, wurde verglichen, ob sie auch aus jedem der Proteine gleich prozessiert würden.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 21 dargestellt, die grau hinterlegten Sequenzen entsprechen jeweils genau dem ausgewählten Peptid, die anderen Sequenzen den mit großer Sequenzdeckung ausgewählten Peptiden aus dem gleichen Bereich. Im weiteren werden diese Peptide gleich bezeichnet, d.h. die Bezeichnung Peptid M1 entspricht genau der ausgewählten, als auch den ähnlichen Peptidsequenzen.

Nach beiden Vorhersagen würden 8 der ausgewählten 20 Peptide durch Spaltung durch das Proteasom generiert werden. Die den beiden Peptiden M10 und M13 entsprechenden Peptide würden aus allen zur Vorhersage verwendeten Mitgliedern der MAGE-A Familie prozessiert. Nach beiden Algorithmen würde keine Prozessierung, egal aus welchem der 10 Proteine (MAGE-A7 und -A5 nicht berücksichtigt), der Peptide M4, M12, M15, M17 und M19 stattfinden. Peptid M9 würde demnach nur aus MAGE-A1 prozessiert, Peptid M18 nur aus MAGE-A11 und Peptid M20 nur aus MAGE-A4. Da die beiden Algorithmen wie im Falle der Peptide M2, M7, M8, M11 und M14 zu völlig verschiedenen Ergebnissen kommen, ist auch hier die experimentelle Überprüfung der Vorhersagen notwendig.

Die Peptide M1-M8, M10, M12, M13, M15-M17, M19 und M20 lösten bei *ex vivo* Analysen spezifische T-Zellantworten aus, dies läßt darauf schließen, daß die reaktiven T-Zellen bereits *in vivo* mit diesem Peptid induziert wurden, was für eine natürliche Prozessierung dieser Peptide spricht. Für die M10 und M13 sagen beiden Algorithmen diese Prozessierung voraus. Die T-Zellantworten können auch durch Kreuzerkennung der überlappenden Peptide zustande kommen, allerdings ist Spender M-DNS der einzige, der T-Zellreaktionen gegen überlappende Peptide zeigt (Tab. 18).

Tabelle 21: Peptidsequenzen für die einzelnen Mitglieder der MAGE-A Familie und die Wahrscheinlichkeit ihrer Prozessierung, vorhergesagt mit NetChop und PaProC

Sequenz	MAGE	NetChop	PAProC	Sequenz	MAGE	NetChop	PAProC	Sequenz	MAGE	NetChop	PAProC	Sequenz	MAGE	NetChop	PAProC
M1															
EPVTKAEML	MAGE-A1121	0,86	++	VFGIDVKEA	MAGE-A1199	0,26	++	LTQDLVQEK	MAGE-A1203	0,93	-	LVQEKYLEY	MAGE-A1203	0,93	+++
EPVTKAEML	MAGE-A2128	0,95	+	VFGIELEMEV	MAGE-A2161	0,16	-	LMQDLVQEN	MAGE-A2246	0,10	-	LVQENYLEY	MAGE-A2246	0,98	+++
EPVTKAEML	MAGE-A3128	0,77	-	VFGIELEMEV	MAGE-A3161	0,21	-	LTQHPVQEN	MAGE-A3246	0,07	-	FVQENYLEY	MAGE-A3246	0,98	+++
ELVTKAEML	MAGE-A4129	0,74	++	VFGIDVKEV	MAGE-A4162	0,76	-	LTQDWQVEN	MAGE-A4247	0,14	-	VQENYLEY	MAGE-A4251	0,98	+++
EPVTKAEML	MAGE-A6128	0,77	++	VFGIELEMEV	MAGE-A6161	0,16	-	LTQFPVQEN	MAGE-A6246	0,05	-	VQENYLEY	MAGE-A6250	0,98	+++
EPVTKAEML	MAGE-A8131	0,86	++	IFGIDVKEV	MAGE-A8164	0,77	-	LTQEPVQEN	MAGE-A8246	0,12	-	VQENYLEY	MAGE-A8253	0,98	+++
EPVTKAEML	MAGE-A9127	0,86	++	IFGIDVKEV	MAGE-A9160	0,77	-	LTQDWQVEN	MAGE-A9249	0,14	-	VQENYLEY	MAGE-A9253	0,98	+++
EPITKAEML	MAGE-A10153	0,74	-	VFGIDVKEV	MAGE-A10166	0,69	-	LTQDWQVEN	MAGE-A10271	0,14	-	VQENYLEY	MAGE-A10275	0,98	+++
GLITKAEML	MAGE-A11131	0,42	-	IFGIDVKEV	MAGE-A11164	0,78	-	LTQDWQVEN	MAGE-A11246	0,10	-	VQENYLEY	MAGE-A11257	0,98	+
EPFVTKAEML	MAGE-A12128	0,85	-	VFGIEVVEV	MAGE-A12161	0,22	-	LTQDLVQEN	MAGE-A12246	0,08	-	LVQENYLEY	MAGE-A12249	0,98	+++
M2															
VTKAEMLES	MAGE-A1123	0,02	+++	LGLSYDGLL	MAGE-A1175	0,61	-	TQDLVQEKY	MAGE-A1244	0,93	+++	VQEKYLEYR	MAGE-A1244	0,46	-
VTKAEMLES	MAGE-A2130	0,03	+++	LGLSYDGLL	MAGE-A2142	0,43	-	TQDLVQEKY	MAGE-A2247	0,90	+++	VQENYLEYR	MAGE-A2251	0,55	-
VTKAEMLS	MAGE-A3130	0,02	+++	LGLSYDGLL	MAGE-A3182	0,53	-	TQHFVQENY	MAGE-A3247	0,82	+++	VQENYLEYR	MAGE-A3251	0,55	-
VTKAEMLER	MAGE-A4131	0,04	++	LGLSYDGLL	MAGE-A4183	0,57	-	TQDWQVENY	MAGE-A4248	0,86	+++	VQENYLEYR	MAGE-A4252	0,35	-
VTKAEMLS	MAGE-A6130	0,02	+++	LGLSYDGLL	MAGE-A6182	0,53	-	TOYFVQENY	MAGE-A6247	0,84	+++	VQENYLEYR	MAGE-A6251	0,55	-
VTKAEMLES	MAGE-A8133	0,02	+++	LGLSYDGLL	MAGE-A8183	0,76	-	TQHFVQENY	MAGE-A8250	0,86	+++	VQENYLEYR	MAGE-A8254	0,75	-
VTKAEMLES	MAGE-A9129	0,03	+++	LGLSCDSML	MAGE-A9181	0,32	-	TQDWQVENY	MAGE-A9246	0,86	+++	VQENYLEYR	MAGE-A9250	0,55	-
ITKAEMLES	MAGE-A10155	0,02	+++	LGLSYDGLL	MAGE-A10167	0,63	-	TQDWQVENY	MAGE-A10272	0,86	+++	VQENYLEYR	MAGE-A10276	0,55	-
ITKAEMLS	MAGE-A11133	0,02	+++	LMSTYDGIQ	MAGE-A11182	0,73	-	TQDWQVENY	MAGE-A11249	0,88	+++	VQEKYLEYR	MAGE-A11253	0,73	-
FTKAEMLS	MAGE-A12130	0,02	+++	LGLSYDGLL	MAGE-A12182	0,43	-	TQDLVQEKY	MAGE-A12247	0,82	+++	VQENYLEYR	MAGE-A12251	0,55	-
M3															
TKAEMLESV	MAGE-A1124	0,08	+	KLLTQDLVQ	MAGE-A1237	0,08	+	QDLVQEKYL	MAGE-A1241	0,82	+	QENYLEYRQ	MAGE-A1245	0,05	-
TKAEMLESV	MAGE-A2134	0,12	-	KLLTQDLVQ	MAGE-A2244	0,05	++	QDLVQENYL	MAGE-A2248	0,95	-	QENYLEYRQ	MAGE-A2252	0,03	-
TKAEMLSV	MAGE-A3131	0,08	-	KLLTQHPVQ	MAGE-A3244	0,23	++	QHPVQENYL	MAGE-A3248	0,97	-	QENYLEYRQ	MAGE-A3252	0,03	-
TKAEMLESV	MAGE-A4132	0,07	-	KLLTQDMVQ	MAGE-A4248	0,09	++	QDMVQENYL	MAGE-A4249	0,97	-	QENYLEYRQ	MAGE-A4253	0,03	-
TKAEMLESV	MAGE-A6134	0,07	+	KLLTQYFVQ	MAGE-A6244	0,10	++	QYFVQENYL	MAGE-A6248	0,98	-	QENYLEYRQ	MAGE-A6252	0,03	-
TKAEMLESV	MAGE-A8134	0,07	+	KLLTQEVVQ	MAGE-A8247	0,08	++	QEVVQENYL	MAGE-A8251	0,97	-	QENYLEYRQ	MAGE-A8255	0,05	-
TKAEMLESV	MAGE-A9136	0,07	+	KLLTQDMVQ	MAGE-A9243	0,09	++	QDMVQENYL	MAGE-A9247	0,97	-	QENYLEYRQ	MAGE-A9251	0,03	-
TKAEMLESV	MAGE-A10146	0,21	-	KLLTQDMVQ	MAGE-A10249	0,09	++	QDMVQENYL	MAGE-A10273	0,97	-	QENYLEYRQ	MAGE-A10277	0,03	-
TKAEMLESR	MAGE-A11134	0,08	-	KLLTQEVVQ	MAGE-A11244	0,15	++	QDMVQENYL	MAGE-A11248	0,88	-	QEKYLEYRQ	MAGE-A11252	0,06	-
TKAEMLSV	MAGE-A12131	0,09	+	KLLTQDLVQ	MAGE-A12244	0,09	+	QDLVQENYL	MAGE-A12248	0,95	-	QENYLEYRQ	MAGE-A12252	0,03	-
M4															
EMLESYIKN	MAGE-A1127	0,07	-	LLTQDLVQE	MAGE-A1238	0,03	++	DLVQEKYLE	MAGE-A1242	0,03	-	EKYLEYRQV	MAGE-A1246	0,26	+
EMLESYIKN	MAGE-A2134	0,10	-	LLMQDLVQE	MAGE-A2248	0,03	+++	LLMQDLVQEN	MAGE-A2249	0,03	-	ENYLEYRQV	MAGE-A2253	0,45	+
EMLSGVYGN	MAGE-A3134	0,03	-	LLTQHPVQE	MAGE-A3246	0,06	+++	HFVQENYLE	MAGE-A3249	0,03	-	ENYLEYRQV	MAGE-A3253	0,44	+
EMLSGVYGN	MAGE-A4135	0,06	-	LLTQDMVQE	MAGE-A4246	0,03	+++	DMVQENYLE	MAGE-A4249	0,03	-	ENYLEYRQV	MAGE-A4253	0,23	+
EMLSGVYGN	MAGE-A6134	0,03	-	LLTQYFVQE	MAGE-A6248	0,07	+++	YFVQENYLE	MAGE-A6249	0,03	-	ENYLEYRQV	MAGE-A6253	0,45	+
EMLESYIKN	MAGE-A8137	0,14	-	LLTQEVVQE	MAGE-A8248	0,03	+++	EVVQENYLE	MAGE-A8252	0,03	-	ENYLEYRQV	MAGE-A8256	0,05	++
EMLSGVYGN	MAGE-A9133	0,05	-	LLTQDMVQE	MAGE-A9244	0,03	+++	DMVQENYLE	MAGE-A9248	0,03	-	ENYLEYRQV	MAGE-A9252	0,52	+
EMLSGVYGN	MAGE-A12134	0,04	-	LLTQDMVQE	MAGE-A10270	0,03	+++	DMVQENYLE	MAGE-A10274	0,03	-	ENYLEYRQV	MAGE-A10278	0,36	+
ELLESYIKN	MAGE-A10159	0,15	-	LLTQDMVQE	MAGE-A11248	0,03	+++	NVQEKYLE	MAGE-A11252	0,26	-	EKYLEYRQV	MAGE-A11256	0,74	+
EMLESYIKN	MAGE-A11175	0,07	-	LLTQDLVQE	MAGE-A12248	0,03	+++	DLVQENYLE	MAGE-A12249	0,03	-	ENYLEYRQV	MAGE-A12253	0,45	+
M5															
TKAEMLESV	MAGE-A1237	0,05	-	YRQVPDSDP	MAGE-A1251	0,05	-	YRQVPDSDP	MAGE-A1251	0,05	-	YRQVPDSDP	MAGE-A1251	0,05	-
TKAEMLESV	MAGE-A2247	0,03	-	YRQVPDSDP	MAGE-A2248	0,05	-	YRQVPDSDP	MAGE-A2248	0,05	-	YRQVPDSDP	MAGE-A2248	0,05	-
TKAEMLESV	MAGE-A3247	0,03	-	YRQVPDSDP	MAGE-A3248	0,05	-	YRQVPDSDP	MAGE-A3248	0,05	-	YRQVPDSDP	MAGE-A3248	0,05	-
TKAEMLESV	MAGE-A4248	0,03	-	YRQVPDSDP	MAGE-A4249	0,04	++	YRQVPDSDP	MAGE-A4249	0,04	++	YRQVPDSDP	MAGE-A4249	0,04	++
TKAEMLESV	MAGE-A6248	0,02	-	YRQVPDSDP	MAGE-A6248	0,05	-	YRQVPDSDP	MAGE-A6248	0,05	-	YRQVPDSDP	MAGE-A6248	0,05	-
TKAEMLESV	MAGE-A8250	0,02	-	YRQVPDSDP	MAGE-A8250	0,02	-	YRQVPDSDP	MAGE-A8250	0,02	-	YRQVPDSDP	MAGE-A8250	0,02	-
TKAEMLESV	MAGE-A9246	0,03	-	YRQVPDSDP	MAGE-A9246	0,03	-	YRQVPDSDP	MAGE-A9246	0,03	-	YRQVPDSDP	MAGE-A9246	0,03	-
TKAEMLESV	MAGE-A10242	0,03	-	YRQVPDSDP	MAGE-A10242	0,03	-	YRQVPDSDP	MAGE-A10242	0,03	-	YRQVPDSDP	MAGE-A10242	0,03	-
TKAEMLESV	MAGE-A11250	0,03	-	YRQVPDSDP	MAGE-A11250	0,03	-	YRQVPDSDP	MAGE-A11250	0,03	-	YRQVPDSDP	MAGE-A11250	0,03	-
TKAEMLESV	MAGE-A12247	0,03	-	YRQVPDSDP	MAGE-A12247	0,03	-	YRQVPDSDP	MAGE-A12247	0,03	-	YRQVPDSDP	MAGE-A12247	0,03	-
M6															
TKAEMLESV	MAGE-A1259	0,02	-	YRQVPDSDP	MAGE-A1259	0,02	-	YRQVPDSDP	MAGE-A1259	0,02	-	YRQVPDSDP	MAGE-A1259	0,02	-
TKAEMLESV	MAGE-A2257	0,03	-	YRQVPDSDP	MAGE-A2257	0,03	-	YRQVPDSDP	MAGE-A2257	0,03	-	YRQVPDSDP	MAGE-A2257	0,03	-
TKAEMLESV	MAGE-A3247	0,03	-	YRQVPDSDP	MAGE-A3247	0,03	-	YRQVPDSDP	MAGE-A3247	0,03	-	YRQVPDSDP	MAGE-A3247	0,03	-
TKAEMLESV	MAGE-A4248	0,03	-	YRQVPDSDP	MAGE-A4248	0,03	-	YRQVPDSDP	MAGE-A4248	0,03	-	YRQVPDSDP	MAGE-A4248	0,03	-
TKAEMLESV	MAGE-A6247	0,02	-	YRQVPDSDP	MAGE-A6247	0,02	-	YRQVPDSDP	MAGE-A6247	0,02	-	YRQVPDSDP	MAGE-A6247	0,02	-
TKAEMLESV	MAGE-A8250	0,02	-	YRQVPDSDP	MAGE-A8250	0,02	-	YRQVPDSDP	MAGE-A8250	0,02	-	YRQVPDSDP	MAGE-A8250	0,02	-
TKAEMLESV	MAGE-A9246	0,03	-	YRQVPDSDP	MAGE-A9246	0,03	-	YRQVPDSDP	MAGE-A9246	0,03	-	YRQVPDSDP	MAGE-A9246	0,03	-
TKAEMLESV	MAGE-A10242	0,03	-	YRQVPDSDP	MAGE-A10242	0,03	-	YRQVPDSDP	MAGE-A10242	0,03	-	YRQVPDSDP	MAGE-A10242	0,03	-
TKAEMLESV	MAGE-A11250	0,04	+	YRQVPDSDP	MAGE-A11250	0,04	+	YRQVPDSDP	MAGE-A11250	0,04	+	YRQVPDSDP	MAGE-A11250	0,04	+
TKAEMLESV	MAGE-A12247	0,03	-	YRQVPDSDP	MAGE-A12247	0,03	-	YRQVPDSDP	MAGE-A12247	0,03	-	YRQVPDSDP	MAGE-A12247	0,03	-

Dargestellt sind die Sequenzen der einzelnen überlappenden Peptide der jeweiligen Mitglieder der MAGE-A Familie und die Fragebnisse der Vorhersagen durchgeföhrt mit NetChop und PAProC. Fettdruckte Werte symbolisieren positive NetChop Vorhersagen, der Schwellenwert liegt bei 0,5. Bei PAProC finden Abstufungen von - bis +++ statt, near-non-cleavable area. Grau hinterlegte Sequenzen sind identisch mit den für die Tests ausgewählten Peptiden.