

4 Diskussion

Seit der Entdeckung der ersten tumorassoziierten Antigene wurden bereits T-Zellepitope aus diesen Proteinen in klinischen Studien eingesetzt, allerdings mit mäßigem Erfolg. Zwar wurden tumorspezifische T-Zellen induziert, der Tumor allerdings, bis auf sehr wenige Ausnahmen nicht eliminiert (Rosenberg, 2001; Parmiani, 2002). Ein möglicher Grund hierfür ist eine durch die Therapie herbeigeführte Selektion auf die Tumorzellen hin, welche das Zielantigen der Therapie nicht mehr exprimieren. Dies bedeutet, daß die Strategie der Vakzinierungstherapien weiter überdacht werden muss. Vieles spricht dafür, nicht nur einige wenige Peptide zur Vakzinierung einzusetzen, sondern einen Cocktail aus Peptiden möglichst vieler verschiedener Zielproteine, um die Chance der Entstehung solcher Antigenverlust-Varianten des Tumors zu minimieren (Rosenberg, 2001; Parmiani *et al.*, 2002). Zudem ist es wichtig, Epitope für möglichst viele verschiedene HLA-Allele zu identifizieren, um Patienten unterschiedlichen HLA-Typs behandeln zu können.

Durch die Nutzung von bioinformatischen Algorithmen für die Vorhersage von HLA-Liganden aus den Sequenzen von tumorassoziierten Antigenen konnte die Identifizierung von T-Zellepitopen einen großen Schritt voran getrieben werden. Ein Großteil der heute bekannten T-Zellepitope wurde zunächst mittels Bioinformatik vorhergesagt und anschließend experimentell bestätigt (Sensi *et al.*, 2002; Wagner *et al.*, 2003). Den bislang verfügbaren Algorithmen liegt jedoch oftmals eine Annahme zugrunde, durch die der Output der Vorhersagen stark eingeschränkt wird. Hierbei wird davon ausgegangen, daß Peptide bessere T-Zellepitope sind, wenn sie stark an das HLA binden. Die hier durchgeführten Arbeiten und andere Berichte widerlegen allerdings diese Annahme, bzw. deuten darauf hin, daß auch schwach bindenden Peptide T-Zellepitope darstellen können und daß bei der Beurteilung eines Peptides als T-Zellepitop der gesamte Sequenzkontext und nicht nur die Ankerpositionen in Betracht gezogen werden sollte (Udaka *et al.*, 1995a; Gundlach *et al.*, 1996; Bredenbeck *et al.*, 2005).

In der hier vorgestellten Arbeit wurden nun verschiedene neue Ansätze zur Identifizierung von tumorassoziierten T-Zellepitopen verfolgt. Zum einen wurden Epitopvorhersagen mit verschiedenen von unseren Kooperationspartnern entwickelten Algorithmen (ANN und SVM) im Vergleich mit bereits bekannten Algorithmen (PSSM) durchgeführt, zum anderen wurde eine völlig neue Strategie zur Testung der Peptide entwickelt, die zusätzliche Informationen zur möglichen HLA-Spezifität von Peptiden liefern kann.

Die von unseren Kooperationspartnern entwickelten Algorithmen sind in der Lage, Peptide in ihrem Gesamtsequenzkontext zu beurteilen, so sollte es mit diesen Algorithmen möglich sein,

eine neue Klasse von T-Zellepitopen zu identifizieren, die mit den üblicherweise für Epitopvorhersagen verwendeten Algorithmen nicht gefunden würden.

Mit Hilfe der ANN sollten unter Berücksichtigung des Gesamtsequenzkontext der Peptide und durch das Anlegen spezieller Filter T-Zellepitope für HLA-A*0201 vorhergesagt werden, die nicht den üblichen Bindungsmotiven für dieses Allel entsprechen und daher voraussichtlich nur schwach an das HLA binden (Filter, 2006). Es wurde bereits beschrieben, daß Epitope mit niedriger Affinität für das HLA durchaus T-Zellepitope darstellen können (Scardino *et al.*, 2002).

Es wurden ANN trainiert und damit Epitopvorhersagen für die Proteine gp100, p53, MAGE-A1/2 und TRP-2 durchgeführt. Diese Vorhersagen lieferten sieben Epitope, die nicht dem gängigen Motiv für HLA-A*0201 entsprachen, aber eine gute Bewertung bekamen. Die sieben vorhergesagten Peptide wurden im Vergleich mit in den Ankerpositionen modifizierten Peptiden getestet, um zu untersuchen, ob sich Unterschiede in der Fähigkeit T-Zellen zu induzieren zeigen. Für alle sieben natürlichen Peptide konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß sie in der Lage waren, sowohl *ex vivo* in PBMC von Melanompatienten, als auch *in vitro* nach *priming* von CD8⁺ T-Zellen gesunder Spender, T-Zellantworten zu induzieren. Für drei dieser Peptide konnte gezeigt werden, daß sie natürlicherweise von Tumorzellen prozessiert werden und von T-Zellen auf diesen erkannt werden können. Nach vergleichender Bewertung dieser sieben Peptide mit zwei anderen Algorithmen (SYFPEITHI und BIMAS) wären sechs der sieben hier identifizierten Epitope nicht vorhergesagt worden, da sie nicht die HLA-A*0201 spezifischen Motive aufweisen, die SYFPEITHI zugrunde liegen und weil die mit BIMAS kalkulierten Halbwertzeiten der Peptid-HLA-Komplexe zu gering waren. Diese Ergebnisse legen nahe, daß möglicherweise viele T-Zellepitope in bisherigen Untersuchungen irrtümlich zu den negativen gezählt wurden, selbst bei so gut untersuchten Proteinen wie MAGE und gp100. Peptid MAGE-2₁₁₆ wurde bereits als HLA-A3 restringiertes T-Zellepitop beschrieben (Reynolds *et al.*, 2000), in der hier durchgeführten Arbeit konnte gezeigt werden, daß dieses Peptid auch im Kontext von HLA-A*0201 präsentiert und von T-Zellen erkannt werden kann. Für sechs der sieben hier vorhergesagten Peptide konnte eine schwache Stabilisierung von HLA-A*0201 gezeigt werden. Nur Peptid TRP-2₁₈₅ war in der Lage, das HLA zu stabilisieren. Dies war für dieses Peptid bereits von Parkhurst *et al.* (Parkhurst *et al.*, 1998) in einem Bindungsaffinitätsassay gezeigt worden. In *in vitro* Stimulationen von T-Zellen aus Melanompatienten konnten von den Autoren allerdings, im Gegensatz zu der hier durchgeführten Arbeit, keine T-Zellantworten gegen Peptid TRP-2₁₈₅ induziert werden. Die hier durchgeführten Analysen zeigen, daß schwach HLA-bindende Peptide in der Tat T-

Zellepitope darstellen. Diese werden mit den üblicherweise verwendeten Algorithmen nicht gefunden, der hier verwendete Algorithmus ist in der Lage mit hoher Ausbeute Epitope vorherzusagen, die nicht den üblichen Bindungsmotiven entsprechen.

Bislang wurden die meisten Epitope für das in der kaukasischen Bevölkerung am weitesten verbreitete HLA-Allel-A*0201 identifiziert und viele Untersuchungen zur Identifizierung von T-Zellepitopen werden weiterhin für dieses Allel durchgeführt. Damit jedoch möglichst viele Patienten mit unterschiedlichen HLA-Typen behandelt werden können, ist es wichtig, Epitope für viele verschiedene HLA-Allele zu identifizieren. Da viele Tumorantigene nicht-mutierte Selbstantigene sind, ist es möglich, daß das tumorspezifische T-Zellrepertoire tolerant ist, d.h. auf diese Antigene nicht reagiert (Robbins and Kawakami, 1996). Dies spricht dafür, möglichst viele verschiedenen Antigene zu untersuchen, um Epitope, die spezifische T-Zellantworten auslösen können, zu identifizieren.

In dieser Arbeit wurden daher im weiteren über 2000 Peptide getestet, die aus insgesamt 47 verschiedenen Zielantigenen stammten. Diese Peptide waren i) mit Hilfe von Vorhersagen ausgewählt worden (SVM und PSSM), ii) wurden sie aufgrund von Homologien entweder zu vorhergesagten Peptiden (SV40, BKV, JCV), oder iii) innerhalb einer Proteinfamilie ausgewählt (MAGE-A Familie).

Da in dieser Arbeit erstmalig eine so große Menge an Peptiden gleichzeitig in einem Ansatz getestet wurde und das zur Verfügung stehende Blut für die Gewinnung von CD8⁺ T-Zellen begrenzt war, galt es zunächst, eine Strategie für die Testung einer solche Menge an Peptiden zu entwerfen. Eine Lösung dieser Problematik ist der Einsatz von Peptidpools zur Stimulation der T-Zellen, ein Problem hierbei könnte allerdings die gegenseitige Konkurrenz der Peptide um die HLA-Bindung sein. Von Thompson et al. wurde die Hypothese überprüft, daß Konkurrenz um HLA-Bindung zwischen Peptiden nicht dazu führt, daß einzelne Peptide aus einer Mischung nicht mehr durch T-Zellen erkannt werden können (Thompson *et al.*, 2004). Bei equimolaren Peptidkonzentrationen konnte in keinem Fall Inhibition der T-Zellantwort gegen das antigene Peptid beobachtet werden, wobei sich allerdings nicht mehr als 7 Peptide in einem Ansatz befanden. In einem Fall konnte durch einen 100000fachen Überschuß des Peptides mit höherer Affinität eine signifikante Inhibition ausgelöst werden.

Es wurden schon Versuche mit Stimulationen mit Peptidmischungen durchgeführt, hier wurden aber oftmals nicht mehr als 10 Peptide auf einmal verwendet. Von Riley et al. wurden Stimulation mit Mischungen von je 10 Peptiden aus gp100 und der TRP-2 Isoform 6b durchgeführt, welche unterschiedliche Bindungsaffinitäten für HLA-A*0201 besitzen (Riley

et al., 2003). Für beide Proteine konnten die bereits zuvor identifizierten immundominanten Peptide als T-Zellantworten auslösend identifiziert werden, obwohl sie nicht die Peptide mit der höchsten Bindungsaffinität waren.

Pelte *et al.* untersuchten in *ex vivo* Analysen Frequenzen CMV spezifischer T-Zellen in HLA-A*0201 positiven Spendern, hierbei wurden 261 Peptide in einem Pool eingesetzt, bei diesen Analysen konnte nur ein Peptid als T-Zellantwort induzierend identifiziert werden (Pelte *et al.*, 2004).

Diese Untersuchungen zeigen, daß Stimulationen von T-Zellen mit Peptidmischungen prinzipiell möglich sind und daß es in der Regel nicht zu einer gegenseitigen Konkurrenz um die HLA-Bindung kommt, die zu einer Inhibition der Induktion einer T-Zellantwort führen würde.

Da in dieser Arbeit jedoch eine solch große Anzahl an Peptiden verwendetet wurde und die Gesamtzahl an Peptiden gegenüber dem einzelnen Peptid sehr hoch war, wurde für die Stimulation ein neuer Ansatz gewählt. Die Peptide wurden gepoolt, die Beladung der APC mit den Peptiden wurde allerdings nicht mit allen Pools in einem Ansatz durchgeführt, sondern die Menge an insgesamt für die Stimulation benötigten APC aufgeteilt und jeweils nur mit etwa 1/10 der Peptide inkubiert. Danach wurden alle APC vereinigt und zu den CD8⁺ T-Zellen gegeben, so daß die T-Zellen mit allen Peptiden in einem Ansatz stimuliert wurden. So wurde sicher gestellt, daß ein einzelnes Peptid nicht mit der Gesamtpeptidmenge um die HLA-Bindung konkurrieren muß. In einem Test konnte demonstriert werden, daß, wenn parallel eine Stimulation mit steigender Anzahl an Peptiden durchgeführt wurde, trotzdem immer auch T-Zellen mit Spezifität für ein bestimmtes Peptid induziert wurden, egal, ob sich insgesamt 22 oder 1970 Peptide im Stimulationsansatz befanden.

In bislang beschriebenen Untersuchungen zur Identifizierung von T-Zellepitopen werden meist Peptide für ein bestimmtes HLA-Allel vorhergesagt und auch nur Spender getestet, die dieses Allel exprimieren (Zhu *et al.*, 2003; Kiessling *et al.*, 2004; Ramage *et al.*, 2004). In einer Studie von Elkington *et al.* wurden über 200 Peptide aus verschiedenen CMV Proteinen für eine große Anzahl an HLA-Allelen vorhergesagt und in Stabilisierungsassays getestet. Die Analysen zur Stimulation von T-Zellen wurden allerdings nicht in Pools durchgeführt und auch fanden die Analysen zu den einzelnen HLA-Allelen nur mit Spendern statt, die diese Allele exprimierten (Elkington *et al.*, 2003). Diese Vorgehensweisen begrenzen sich allerdings selbst im Hinblick der zu erzielenden Ergebnisse, da auch im Idealfall nur das Ergebnis erhalten wird, das man erwartet, nämlich daß ein für ein bestimmtes HLA-Allel vorhergesagtes Peptid an dieses HLA bindet und auch im Kontext dieses HLA-Allels eine T-

Zellantwort induziert oder nicht. Es können keine zusätzlichen Informationen gewonnen werden.

Deshalb wurde in der hier vorliegenden Arbeit zusätzlich zu der neu entwickelten Durchführung der Beladung der APC und der Testung der großen Anzahl an Peptiden in einem Ansatz auch eine völlig neue Strategie zur Stimulation der T-Zellen mit den Peptiden entwickelt. Sowohl Spender als auch Peptide wurden unabhängig vom exprimierten HLA, bzw. dem bei den Vorhersagen positiv bewerteten HLA in den Stimulationen eingesetzt. D.h. Zellen der Spender wurden mit Peptiden stimuliert, die möglicherweise durch die Vorhersagen keine positive Bewertung für den vom Spender exprimierten HLA-Typ bekamen bzw. die eine positive Bewertung für ein HLA-Allel bekamen, welches vom Spender nicht exprimiert wird. Durch diesen Ansatz können zusätzlich zu den für die Vorhersage verwendeten HLA weitere identifiziert werden, in deren Kontext die ermittelte T-Zellantwort stattgefunden haben muß. So können neue Informationen zu den Bindungseigenschaften von HLA-Molekülen gewonnen werden und bereits definierte Bindungsmotive erweitert werden.

Mit der beschriebenen Methode zur Testung der Peptide wurden bei den Analysen der 1970 mit SVM und PSSM vorhergesagten Peptide nach *in vitro priming* insgesamt 58 Peptide als T-Zellepitope identifiziert. Es lösten Peptide aus insgesamt 25 der 35 für die Vorhersagen verwendeten Proteine T-Zellreaktionen aus. Keine T-Zellantworten wurden z.B. gegen Peptide aus den als cancer/testis Antigenen (CTA) beschriebenen Proteinen BAGE, GAGE, und NY-ESO gefunden, wohingegen ein Spender T-Zellantworten gegen das CTA LAGE zeigte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß nicht eine bestimmte Gruppe an TAA potenter im Auslösen von T-Zellantworten ist als eine andere. Allerdings zeigten sich Peptide aus zwei Proteinen, Tyrosinase und dem SV40 large T-Antigen, besonders effektiv im Auslösen von T-Zellreaktionen. Auffällig ist außerdem, daß bei den beiden Spendern U und F mit T-Zellantworten gegen 20 bzw. 27 Peptide deutlich mehr Reaktionen stattfanden, als bei den anderen Spendern. Es wurden nicht alle Spender gleich oft getestet, d.h. es wurden zwischen einer und drei unabhängige Stimulationen von jedem der Spender angesetzt. Von Spender U gab es zwei Stimulationen in denen die 20 Peptide identifiziert wurden, im Vergleich hierzu wurden bei Spender E in zwei Stimulationen nur 3 Peptide identifiziert. Von Spender F wurden drei unabhängige Stimulationen angesetzt und 27 Peptide identifiziert, für Spender B waren es bei der gleichen Anzahl an Stimulationen nur 5. Diese heterogenen T-Zellantworten resultieren daraus, daß bei einer durchschnittlichen Blutentnahme von 100 ml, etwa 1×10^8 PBMC und im Durchschnitt 15%, also $1,5 \times 10^7$ CD8⁺ T-Zellen entnommen werden und daß

sich nicht immer T-Zellen mit gleicher Spezifität im peripheren Blut befinden. So entnimmt man an unterschiedlichen Tagen der Blutentnahme auch Zellen unterschiedlicher Spezifität. Das Vorkommen an naiven T-Zellen bestimmter Spezifität ist mit Frequenzen zwischen etwa 2×10^{-7} - 6×10^{-7} beschrieben (Chaux *et al.*, 1998; Coulie and Connerotte, 2005). Es wurden zwar mit Zahlen von bis zu 1×10^{-3} auch sehr hohe Frequenzen an naiven T-Zellen für das Peptid MART-1₂₇ beschrieben (Pittet, 1999), dies ist allerdings eher die Ausnahme.

Die beschriebenen multiplen T-Zellantworten von Spender U und F sprechen möglicherweise für ein weiter gefächertes T-Zellrepertoire dieser Spender, oder dafür, daß über die HLA dieser Spender mehr verschiedene Peptide präsentiert und damit mehr T-Zellantworten ausgelöst werden können als bei den anderen Spendern. Diese beiden exprimieren als einzige der hier getesteten 13 Spender, HLA-Cw4, so daß möglicherweise dieses HLA mit den multiplen T-Zellantworten in Zusammenhang steht.

Aus den drei Viren SV40, JCV und BKV sind bislang nur wenige Epitope bekannt. Die bisher identifizierten Peptide aus JCV stammen hauptsächlich aus dem VP1 Protein (Du Pasquier *et al.*, 2003; Du Pasquier *et al.*, 2004), diejenigen aus SV40 aus dem large T Antigen (Schell *et al.*, 2001; Velders *et al.*, 2001). Für ein Peptid aus VP1 wurden Kreuzreaktivitäten zwischen BKV und JCV festgestellt (Krymskaya *et al.*, 2005). Diese Epitope wurden alle für HLA-A*0201 identifiziert. In der hier vorliegenden Arbeit gelang es insgesamt 45 neue Epitope aus den large T-Antigenen dieser Viren zu identifizieren, die im Kontext verschiedener HLAs erkannt werden. Hier wurden zunächst gesunde Spender nach *in vitro priming* getestet. Hierbei wurde auch untersucht, ob T-Zellen, die mit Peptiden aus dem einen Virus induziert wurden, die homologen Peptide aus den anderen beiden Viren erkennen. Ein Großteil (31 von 45) der Peptide wurde nur von je einem Spender erkannt. Von fünf und damit den meisten Ansprechern wurden die drei homologen Peptide SV40₂₇ (IPLMRKAYL), BKV₂₇ (LPLMRKAYL) und JCV₂₇ (IPVMRKAYL) erkannt. Bei allen fünf Spendern reagierten die T-Zellen, die mit dem Peptid aus einem der Viren induziert wurden, auch gegen die beiden Peptide aus den anderen Viren, die sich um jeweils ein oder zwei Aminosäuren unterschieden, wobei es sich hier um konservative Austausch zwischen den aliphatischen Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin handelt.

Je 20 der bei den Untersuchungen identifizierten Peptide aus den 1970 vorhergesagten und aus den viralen Peptiden wurden auch zur Analyse von *ex vivo* Reaktionen CD8⁺ T-Zellen von Melanompatienten und gesunden Spendern eingesetzt. Auch die 20 für die MAGE-A

Familie ausgewählten Peptide wurden so getestet. Durch solche *ex vivo* Analysen kann gezeigt werden, daß die untersuchten Peptide möglicherweise natürlich prozessiert werden und bereits im Körper T-Zellen induziert haben. Zeigen sich reaktive T-Zellen nur in Melanompatienten, könnte dies ein Hinweis darauf sein, daß diese Peptide eine Rolle in der anti-Tumorimmunität spielen können. Zeigen sich reaktive T-Zellen auch in gesunden Spendern könnte es sich auch um Kreuzreaktivitäten handeln.

Es zeigten sich bei den Patienten große Unterschiede in der *ex vivo* Reaktivität gegenüber den drei Gruppen der untersuchten Peptide. Von den gesunden Spendern reagierten in jedem Fall 25%. Bei den 20 aus den 1970 vorhergesagten Peptiden zeigten sich in 40,4% der Patienten spezifische T-Zellantworten, bei den viralen Peptiden 72,5% und bei den MAGE-A Peptiden 21,1%. Von den insgesamt getesteten 60 Peptiden lösten 25 nur in Patienten eine Reaktion aus, wobei 14 davon aus den Proteinen der MAGE-A Familie stammen, was möglicherweise trotz des geringeren Prozentsatzes der reagierenden Patienten auf eine Rolle dieser Proteinfamilie bei der anti-Tumorimmunität hinweist. Da ein Großteil der Bevölkerung seropositiv für JCV und BKV ist, sollte eigentlich erwartet werden, daß auch viele der gesunden Spender T-Zellantworten gegen die ausgewählten Peptide zeigen, dies war allerdings nicht der Fall. In vielen Fällen fallen die T-Zellreaktion gegen die viralen Peptide, sowohl bei den Patienten, als auch bei den Gesunden deutlich stärker aus als bei den anderen *ex vivo* Analysen, d.h. die Frequenzen sind höher als gegen die Peptide aus den TAA. Auffällig ist auch, daß sich die T-Zellantworten bei den Peptiden aus JCV und BKV häufen, was wohl durch die Durchseuchung der Bevölkerung mit diesen Viren zustande kommt, so daß in deren Blut nicht nur Antikörper, sondern auch reaktive T-Zellen gegen diese Viren gefunden werden können. Die meisten spezifischen T-Zellreaktionen zeigten sich gegen die Peptide JCV₅₆₉, JCV₄₃₉, JCV₂₇ und BKV₂₇.

Im Gegensatz zu den für die anderen TAA spezifischen T-Zellen sollten, aufgrund der ausschließlich auf Tumor- und Testisgewebe limitierten Expression der MAGE-A Familie, und dadurch, daß Testis zu den immunprivilegierten Bereichen des Körpers zählt, spezifische T-Zellen für Peptide aus dieser Familie, ähnlich wie die virusspezifischen T-Zellen nicht der Selbsttoleranz unterliegen (De Visser *et al.*, 2003). Von den 20 getesteten Peptiden konnten 16 als T-Zellepitope identifiziert werden. Die für diese Untersuchungen verwendeten Peptide waren nicht vorhergesagt worden, sondern ausschließlich aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit zwischen den einzelnen Mitgliedern der MAGE-A Familie ausgewählt worden. Eine ähnliche Strategie war bereits von Graff-Dubois *et al.* verfolgt worden. Hier war nach Abgleich der Sequenzen von MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, -A6, -A10 und -A12 ein Peptid ausgewählt

worden, welches sich zwischen den einzelnen Proteinen nur in der C-terminalen Aminosäure unterschied. Das Peptid wurde in einer C-terminal modifizierten Variante, für die HLA-A2 restringierte Präsentation gezeigt werden konnte eingesetzt und T-Zellen damit stimuliert, die dann auch in der Lage waren, die natürlichen Varianten des Peptides zu erkennen (Graff-Dubois *et al.*, 2002). Von Tanzarella *et al.* ist bereits ein HLA-A37 restringiertes Peptid beschrieben, welches sowohl von MAGE-A1, -A2, -A3 und -6 codiert wird (Tanzarella *et al.*, 1999). Diese Ergebnisse zeigen, daß auch die Strategie, Peptide aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit auszuwählen, T-Zellepitope liefert.

Für einen Teil der Peptid, gegen die besonders viele Spender, sowohl Gesunde als auch Patienten, T-Zellantworten zeigten oder die Reaktionen besonders stark ausfielen, läßt sich dies möglicherweise auf Kreuzerkennung der Peptide durch T-Zellen mit Spezifität für andere Peptide zurückführen. Degeneriertheit in der Antigenerkennung, die sich dann in Kreuzreaktivität widerspiegelt, stellt ein generelles Merkmal der T-Zellrezeptorerkennung dar (Udaka *et al.*, 1995b; Gundlach *et al.*, 1996; Wucherpfennig, 2004). Auch die bei Melanompatienten und gesunden Spendern nachweisbaren hohen Frequenzen gegen das Melanom/Melanozyten spezifische Peptid MART-1₂₇ werden beispielsweise auf Kreuzerkennung durch T-Zellen mit Spezifität für Peptide aus Viren, Bakterien und humanen Selbstpeptiden zurückgeführt (Loftus *et al.*, 1996). D.h. T-Zellen, die eigentlich durch andere Peptide induziert wurden, erkennen dann auch die tumorassoziierten T-Zellepitope.

Bakterien stellen hauptsächlich Ziele für die humorale Immunantwort da, d.h. es werden Antikörper gegen die Bakterien gebildet. Werden die Bakterien mit Antikörpern bedeckt, verhindert dies zum einen ihre Bindung an Zellen, die von dem Bakterium befallen werden sollen, zum anderen wird hierdurch die Aufnahme durch phagozytierende Zellen wie Makrophagen erleichtert. Allerdings konnte auch gezeigt werden, daß Bakterien nicht nur ein Ziel der humoralen Immunantwort sind, sondern auch Ziele für zytotoxische CD8⁺ T-Zellen darstellen können (Silva and Lowrie, 2000; Dong *et al.*, 2004).

So weist das hier identifizierte Peptid Tyro₃₄₅ (EGFASPLTG), gegen welches *ex vivo* Reaktionen in 12 Spendern beobachtet werden konnten, zum einen Übereinstimmung mit einem Peptid aus *Vibrio parahaemolyticus* (EGFASPLKV), einem Bakterium welches häufig Auslöser für Lebensmittel-, insbesondere Fischvergiftungen ist und zum anderen mit einem Peptid aus *Burkholderia vietnamensis* (IGFAAPLTG) auf, dieses Bakterium kommt in feuchtem Milieu, wie Schwimmbädern vor. Fast alle beobachteten T-Zellantworten gegen Peptid Tyro₃₄₅ fanden voraussichtlich im Kontext von HLA-A2 statt, so ist zu vermuten, daß

auch kreuzreagierende T-Zellen durch ein in diesem Kontext präsentiertes Peptid induziert wurden. Dies könnte für das Peptid aus *Vibrio parahaemolyticus* zutreffen, da hier am C-Terminus mit Valin eine als Hauptanker für dieses HLA-Allel beschriebene Aminosäure vorhanden ist. Für Peptid Sur₈₀ (HSSGCAFLS) findet sich partielle Übereinstimmung mit einem *Helicobacter pylori* Peptid (GVSGCAFLD), mit diesem Bakterium sind etwa 35% der deutschen Bevölkerung besiedelt. Für Peptid Sur₈₀ konnte in dieser Arbeit trotz fehlender Ankeraminosäuren für HLA-A2 eine Präsentation im Kontext dieses Allels gezeigt werden und alle reagierenden Spender exprimieren dieses HLA. Besonders starke Reaktionen spezifischer T-Zellen zeigten sich beim gesunden Spender B gegen das hTert₁₁₂₂ Peptid (ALPSDFKTI), gegen dieses Peptid reagierte keiner der getesteten Patienten. Es weist große Ähnlichkeit mit einem Peptid aus *Candida albicans* (ALPSNFKKI) auf, einem Hefepilz, der bei 75% der Bevölkerung auf der Haut, den Schleimhäuten und im Darm nachgewiesen werden kann, so daß es sich auch hier möglicherweise um Kreuzreaktivität handelt. Auch Peptid hTert₁₁₂₂ wird über HLA-A2 präsentiert. In dem Peptid aus *Candida albicans* sind die Ankeraminosäuren nicht verändert, so daß dieses Peptid wohl auch im Kontext von HLA-A2 präsentiert werden kann. Hier betreffen die Aminosäureaustausche die mit dem T-Zellrezeptor wechselwirkenden Aminosäuren. Das Peptid TRP-2₄₈₅ (GLFVLLAFL), gegen welches *ex vivo* vorhandene spezifische T-Zellen bei 10 Spendern detektiert werden konnten, zeigt große Übereinstimmung mit einem Peptid aus dem Herpes simplex Virus (GLFVLLAYL), mit dem etwa 85% der Bevölkerung weltweit infiziert ist. Dies macht eine Kreuzerkennung möglich, zumal sich die Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin nur durch eine OH-Gruppe unterscheiden und es sich daher um einen konservativen Austausch zweier aromatischer Aminosäuren handelt, durch welchen keine Ankerpositionen betroffen sind. Auch die Peptide MUC1₁₁₆₉ (VLVALAIVY) und MUC1₁₃ (LLTVLTVV), die mit T-Zellantworten in je 12 Spendern diejenigen mit den meisten Ansprechern sind, weisen Ähnlichkeit zu Peptiden aus den Bakterien *Vibrio cholerae* (VLVALALVY) und *Pseudomonas aeruginosa* (VLVALAIVA) bzw. (LLVTVLTVV) auf. Bei zwei der Peptide handelt es sich wieder um einen sehr konservativen Austausch, einmal von einem Isoleucin zu einem Leucin, im anderen Fall von einem Leucin zu einem Valin, was eine Kreuzerkennung wahrscheinlich machen würde. Allerdings ist davon auszugehen, daß die reagierenden Spender mit *Vibrio cholerae* keinen vorherigeren Kontakt hatten, da dieses in Europa nicht weit verbreitet ist. So ist eine Kreuzerkennung der Peptide aus *Pseudomonas aeruginosa*, welches überall anzutreffen ist, wo genug Feuchtigkeit herrscht und eine große Rolle bei Atemwegserkrankungen wie Lungenentzündung spielt, wahrscheinlicher. Hier liegt zwar ein

Austausch einer großen aromatischen Aminosäure (Tyrosin) gegen eine kleine neutrale (Alanin) vor, da dieser Austausch allerdings am C-Terminus des Peptides liegt, sind keine Positionen betroffen, die in direktem Kontakt mit dem T-Zellrezeptor stehen. Bei der Analyse der Peptide aus der MAGE-A Familie waren die stärksten Reaktionen gegen Peptid M4 (EMLESVIKN) zu beobachten. Dieses Peptid weist große Homologie zu zwei Peptiden aus krankheitserregenden Organismen auf, zum einen zu einem Peptid aus *Entamoeba histolytica* (EILESVIKN), Infektion mit diesem Parasit verursacht die Amöbenruhr, zum anderen mit einem Peptid aus *Streptococcus mutans* (KMLESIIKN), einem Hauptverursacher der Karies. Der Austausch von einem Methionin zu einem Isoleucin kann als relativ konservativ betrachtet werden, da es sich in beiden Fällen um hydrophobe Aminosäuren handelt, dies trifft auch für den Austausch von Valin zum Isoleucin zu. Der Austausch der negativen Ladung am N-Terminus (Glutaminsäure) gegen eine positive Ladung (Lysin) könnte stärkere Auswirkung für eine Bindung dieses Peptides an das HLA haben.

Kreuzreaktivitäten zu humanpathogenen Organismen sind kein Nachteil bei der Verwendung von diesen Peptiden in einer Vakzine, da man sich die bereits im Patienten vorhandenen, für pathogene Organismen spezifischen Zellen für eine anti-Tumorreaktion zunutze machen kann und somit sowohl gegen den Tumor, als aber auch gegen Viren-, Protozoen- und Bakterieninfektionen vakzinieren kann.

Auch durch die Durchseuchung der Bevölkerung mit BKV und JCV können spezifische T-Zellen induziert werden, die diese beiden Viren untereinander, aber auch SV40 kreuzerkennen. Die in dieser Arbeit erreichte Identifizierung von verhältnismäßig vielen Epitopen aus SV40 bei den Analysen der 1970 Peptide ist möglicherweise auch auf Kreuzreaktivitäten von JCV oder BKV spezifischen Zellen zurückzuführen.

Bei den Untersuchungen der Peptide aus den drei Viren zeigte sich, daß fünf von zehn Spender T-Zellantworten gegen die drei homologen Peptide SV40₂₇ (IPLMRKAYL), BKV₂₇ (LPLMRKAYL) und JCV₂₇ (IPVMRKAYL) aufwiesen, hier reagierten die mit jeweils einem der Peptide induzierten T-Zellen auch auf die Peptide aus den anderen beiden Viren.

T-Zellen des Spenders A reagierten auf die Peptide SV40₁₅₄ (RTLACFAIY), BKV₁₅₆ (RTLACFAVY) und JCV₁₅₅ (RTVASFAVY). Hierbei zeigten allerdings die mit dem JCV Peptid induzierten T-Zellen keinerlei spezifische IFN- γ Produktion, die mit den beiden anderen Peptiden induzierten T-Zellen reagierten gegen alle drei Peptide. Bei Spender F war eine T-Zellreaktion gegen das SV40₁₅₄ Peptid zu beobachten, die hiermit induzierten T-Zellen reagierten allerdings nicht gegen die Peptide aus den anderen beiden Viren. Die mit den Peptiden aus JCV und BKV induzierten T-Zellen zeigten weder spezifische Reaktionen gegen

die für die Induktion verwendeten Peptide, noch Kreuzreaktivitäten gegen die Peptide aus den anderen beiden Viren. Bei Spender D hingegen reagierten nur die mit Peptid JCV₁₅₅ induzierten Zellen und zwar ausschließlich gegen dieses Peptid und nicht gegen die beiden anderen. Bei Spender A lösen auch die beiden Peptide SV40₄₆₃ (VAIDQFLVV) und BKV₄₆₅ (VAIDQYMVV) spezifische T-Zellantworten aus, allerdings nur bei den mit dem BKV Peptid induzierten T-Zellen, welche dann auch das SV40 Peptid erkennen. Das zugehörige JCV Peptid (VGIDQFMVV) löst keine Reaktionen aus.

Sowohl die Peptide aus den Proteinen der MAGE-A Familie, als auch die Peptide aus den large T-Antigenen der drei Viren stellen füreinander natürliche Mimotope dar. Bei den mit den ANN vorhergesagten Peptiden waren künstliche, Ankerposition-modifizierte Mimotope zusätzlich zu den natürlichen Peptiden getestet worden. Wichtig beim Einsatz von Mimotopen ist, ob sie im Gegensatz zur eigentlichen Peptidvariante einen Vorteil bei der Induktion von T-Zellen bieten. Mimotope, die in ihren Ankerpositionen modifiziert sind bzw. bei denen eines der natürlichen Mimotope bessere Ankeraminosäuren für ein bestimmtes HLA-Allel aufweist, können in einer Vakzine von Vorteil sein, da sie möglicherweise schneller und stärker an das HLA binden, als ihr Gegenstück und somit einer schnellen Degradierung durch Proteasen entgehen können. Ankerposition-modifizierte Mimotope, wie z.B. das MART-1/Melan-A_{26-2L} Epitop (Valmori *et al.*, 1998) und das gp100_{209-2M} Epitop (Rosenberg *et al.*, 1998) kommen bereits in klinischen Studien zum Einsatz, doch wird die Verwendung von Mimotopen kontrovers diskutiert, da gezeigt werden konnte, daß T-Zellen, die mit der modifizierten Peptidvariante induziert wurden, nicht immer in der Lage sind, auch ihr natürliches Gegenstück zu erkennen, besonders, wenn dieses nicht in Form von Peptid-beladenen Zielzellen, sondern von Tumorzellen präsentiert wird (Mandrizzato *et al.*, 2002; Rubio *et al.*, 2003).

Allerdings gibt es auch, wie in dieser Arbeit und von anderen gezeigt, Beispiele dafür, daß Mimotope eine stärkere Immunantwort, sowohl gegen das Mimotop selbst, als auch gegen das natürliche TATE induzieren, als ihr natürliches Gegenstück (Parkhurst *et al.*, 1996; Bredenbeck *et al.*, 2005). Bei drei der hier untersuchten, mit ANN vorhergesagten Peptide (MAGE-A₂₅₀, MAGE-A₂₁₆ und TRP-2₁₈₅) konnte gezeigt werden, daß die mit der modifizierten Peptidvariante induzierten T-Zellen auch in der Lage waren, das natürliche Peptid zu erkennen, auch wenn dieses von Tumorzellen prozessiert wurde. Im Falle des TRP-2₁₈₅ Peptides war die Erkennung der natürlichen Variante durch die induzierten T-Zellen stärker als die der modifizierten Variante. Für das Peptid MAGE-2₂₅₀ wurde gezeigt, daß das natürliche Peptid nur schwache T-Zellantworten auslöst, daß aber, wenn die T-Zellen mit der

modifizierten Variante induziert werden, diese auch in der Lage sind, die natürliche Form zu erkennen, sowohl auf Peptid-beladenen T2-Zellen, als auch auf Tumorzellen. Dies spricht dafür, daß die modifizierte Variante dieses Peptides wesentlich potenter im Induzieren von T-Zellantworten ist als die natürliche Form.

Es scheint also, wie hier auch bei den viralen Peptiden gezeigt, daß die Kreuzerkennung der Peptide durch die induzierten T-Zellen sowohl vom Peptid, als auch vom jeweiligen Spender abhängt. D. h., es muß für jeden einzelnen Fall vor dem Einsatz in Studien überprüft werden, ob das jeweilige Peptid in der Lage ist, die gewünschte T-Zellreaktion auszulösen.

Ein wichtiger Schritt bei der Entwicklung von Tumorstoffen ist die Identifizierung von Tumorstoffen und T-Zellepitopen. Ist ein Protein als Tumorstoff angenommen, können mit Hilfe der Bioinformatik Vorhersagen zu möglichen T-Zellepitopen aus der Proteinsequenz durchgeführt werden. Dieser bioinformatische Ansatz soll helfen, die Zahl der zu testenden Peptide einzuschränken und die Identifizierung von TATE zu erleichtern.

In dieser Arbeit wurden SVM, welche von unseren Kooperationspartner entwickelt wurden im Vergleich mit Vorhersagen, welche mit positionsspezifischen Bewertungsmatrizen (PSSM von SYFPEITHI) durchgeführt wurden, getestet. Von den 58 identifizierten Peptiden waren 19 (32,8%) mit den SVM, 12 (20,7%) mit SYFPEITHI, 18 (31,0%) mit beiden und 9 (15,5%) von keinem der Algorithmen positiv bewertet worden. Durch den hier gewählten Ansatz der T-Zellinduktion mit randomisierten Pools und Testung von Spendern unabhängig von den exprimierten HLA stellte sich heraus, daß ein Großteil der induzierten T-Zellantworten nicht im Kontext des HLA stattfand, für welches das jeweilige Peptid positiv vorhergesagt wurde. So konnten von den insgesamt 58 identifizierten Peptiden auf die 19 nur durch die SVM vorhergesagten Peptide nach *in vitro priming* 20 T-Zellantworten beobachtet werden, aber nur bei 7 davon exprimierte der Spender das HLA für welches das jeweilige Peptid positiv bewertet wurde. Auf die 12 nur von SYFPEITHI vorhergesagten Peptide reagierten insgesamt 16 Spender, bei 8 fand die Reaktion in dem HLA-Kontext statt, für welches die Peptide positiv bewertet wurden. Die 18 von beiden Algorithmen positiv bewerteten Peptide lösten insgesamt 21 T-Zellantworten aus, wovon 8 im HLA-Kontext der Vorhersage stattfanden. Eines der Peptide, die bei Spender F eine T-Zellreaktion auslösten, Peptid TRP-2₄₈₅, war bereits nach Vorhersagen für HLA-A*0201 von Sun et al. auf seine Bindungsaffinität für dieses Allel getestet worden, auch wurde versucht, T-Zellen von gesunden Spendern mit diesem Peptid zu induzieren (Sun *et al.*, 2000). Das Peptid zeigte nur eine sehr schwache Bindung an HLA-A*0201 und es konnten keine spezifischen T-Zellen induziert werden.

Auch in der hier durchgeführten Arbeit bekam dieses Peptid von beiden verwendeten Algorithmen eine positive Bewertung für HLA-A2 und es konnten *ex vivo* T-Zellantworten von 6 Patienten und einem gesunden Spender beobachtet werden, die wahrscheinlich in diesem HLA-Kontext stattgefunden haben. Allerdings konnten auch T-Zellantworten beobachtet werden, die möglicherweise im Kontext von HLA-A3 oder -B7 stattfanden, was wiederum für einen Test von Peptiden im Kontext unterschiedlicher HLA-Allele spricht. Nicht nur die Antigenerkennung durch den T-Zellrezeptor, sondern auch die Bindung von Peptiden an das HLA scheint eine gewisse Degeneriertheit aufzuweisen.

Bei den Stimulationen mit den SV40, BKV und JCV Peptiden waren nur die SV40 Peptide mit den Algorithmen bewertet worden, von diesen lösten insgesamt 17 Peptide eine T-Zellantwort aus. 8 (47,1%) hiervon waren mit SVM vorhergesagt, je 4 (23,5%) mit SYFPEITHI oder beiden Algorithmen und ein (5,9%) Peptid bekam von keinem der Algorithmen eine positive Bewertung. Gegen die 8 mit SVM positiv bewerteten Peptide gab es insgesamt 14 T-Zellantworten, von denen 9 im Kontext des HLAs stattfanden, für welchen die jeweiligen Peptide positiv bewertet wurden. Im Falle der mit SYFPEITHI vorhergesagten Peptide fanden von 6 T-Zellantworten insgesamt 4 im Kontext des HLAs der Vorhersage statt. Bei den Peptiden, die von beiden Algorithmen positiv für ein bestimmtes HLA bewertet wurden, exprimierte der reagierende Spender auch immer das HLA, für welches das Peptid eine positive Bewertung bekommen hat.

In den Fällen, in denen das von den Algorithmen positiv bewertete HLA nicht von den reagierenden Spendern exprimiert wurde, boten sich zwei Möglichkeiten zur Identifizierung des möglichen HLA in dessen Kontext die T-Zellantwort stattgefunden hat an. So wurden zum einen die Peptidsequenzen mit den bekannten Bindungsmotiven der vom reagierenden Spender exprimierten HLAs und mit Sequenzen bereits bekannter T-Zellepitope, die über diese HLAs präsentiert werden verglichen. So konnte z.B. für die beiden für HLA-B7 positiv bewerteten Peptide SV40-T₄₁₆ und SV40-T₁₃₈ gezeigt werden, daß sie auch die Anforderungen des Bindungsmotives für HLA-B8 erfüllen. Dieses HLA wird auch von dem T-Zellreaktionen zeigenden Spender M exprimiert. Zum anderen konnten in den Fällen, in denen viele Spender eine T-Zellantwort auf ein bestimmtes Peptid zeigten, die von den Spendern exprimierten HLAs miteinander verglichen werden und so ein Rückschluß auf das HLA gezogen werden, in dessen Kontext die Reaktion stattfand. Die beiden Peptide Tyro₃₄₅ und Sur₈₀ beispielsweise wurden von keinem der beiden Algorithmen als potentiell T-Zellepitop vorhergesagt, von den SVM auch nicht für ein einzelnes Allel der Supertypen. Es konnten allerdings *in vitro* T-Zellantworten in Spendern induziert werden, die alle HLA-A2

exprimieren. In einem ELISpot gegen mit den beiden Peptiden beladene HLA-A2⁺ T2-Zellen konnte gezeigt werden, daß beide Peptide in diesem HLA-Kontext binden, präsentiert und von spezifischen T-Zellen erkannt werden. Für Peptid Sur₈₀ wurde bereits eine schwache Bindung an HLA-A*0201 beschrieben (Bachinsky *et al.*, 2005). Beide Peptide scheinen außerdem sehr potent in der Induktion von T-Zellantworten zu sein. Auf Peptid Tyro₃₄₅ reagierten nach *in vitro priming* und auch in den *ex vivo* Analysen die meisten Spender, was allerdings möglicherweise auch durch die bereits diskutierte Möglichkeit der Kreuzreaktivitäten zustande kommen kann.

19 der vorhergesagten Peptide lösen vermutlich über ein HLA T-Zellreaktionen aus, für das sie nicht positiv bewertet wurden, für das aber auch Vorhersagen durchgeführt wurden. Peptid APC₁₈₃ z.B. wurde von SYFPEITHI für HLA-A1 positiv bewertet, nach Abgleich mit den bekannten Bindungsmotiven käme aber auch eine Präsentation über das vom reagierenden Spender F exprimierte HLA-A3 in Betracht. Für dieses HLA bekommt das Peptid aber von keinem der beiden für die Vorhersagen verwendeten Algorithmen eine positive Bewertung, die zur Auswahl dieses Peptides für HLA-A3 geführt hätte. Gleiches gilt für die anderen 18 Peptide. Durch die Durchführung der Stimulationen in randomisierten Pools und die Testung von Spendern unabhängig vom HLA können somit neue Erkenntnisse über die mögliche Bindung von Peptiden an unterschiedliche HLA-Allele gewonnen werden.

So konnte z.B. für das bereits als HLA-A3 restringiert beschriebene Peptid MAGE-A2₁₁₆ (LVHFLLLY) (Reynolds *et al.*, 2000) in dieser Arbeit durch Testung mit HLA-A*0201 positiven Spendern gezeigt werden, daß dieses Peptid auch über HLA-A2 präsentiert werden kann, obwohl sich diese beiden HLA-Allele in ihren Hauptankerpositionen unterscheiden. HLA-A2 bevorzugt an Position 9 in der Peptidsequenz aliphatische Aminosäuren wie Valin oder Leucin, hier konnte gezeigt werden, daß aber durchaus auch Peptide mit einer aromatischen Aminosäure an dieser Position gebunden werden und eine T-Zellantwort auslösen können. Ähnliches gilt für die beiden Peptide Tyro₃₄₅ (EGFASPLTG) und Sur₈₀ (HSSGCAFLS). Beide sind weder von den SVM noch von den PSSM für eines der HLA, für die Vorhersagen durchgeführt wurden positiv bewertet worden. In dieser Arbeit konnte allerdings eine Präsentation über HLA-A2 demonstriert werden. D. h. dieses HLA-Allel bindet entgegen der eigentlich als Hauptanker beschriebenen hydrophoben Aminosäuren in Position 2 und 9 durchaus auch auch Peptide mit hydrophilen oder neutralen Aminosäuren wie Serin und Glycin an diesen Positionen. Diese Fälle sind besonders sorgfältig zu betrachten, da sie direkt für die Verbesserung der Algorithmen herangezogen werden können. Die Algorithmen könnten so trainiert werden, daß eine positive Bewertung der Peptide auch

für die HLA stattfindet, für die sie bisher nicht positiv bewertet wurden, aber eine Präsentation in diesem Kontext gezeigt werden konnte. D.h. diese Peptide könnten direkt zur Erweiterung des Trainingsdatensatzes herangezogen werden, da es sich hier um falsch-negative Vorhersagen handelt.

Mit den sonst üblicherweise durchgeführten Untersuchungen, bei denen Peptide für ein bestimmtes HLA-Allel vorhergesagt und auch nur bei Spendern mit diesem Allel getestet werden, sind solche Aussagen nicht möglich und eine Weiterentwicklung der Algorithmen wird nicht gefördert. Stattdessen wird der systematische Fehler der durch die strikte Festlegung der Peptide auf bestimmte Motive und bestimmte Bindungsstärken in vielen Algorithmen vorhanden ist, durch diese Vorgehensweise noch verstärkt, da nur nach diesen Parametern bewertet wird und somit nur Peptide identifiziert werden, die diesen Parametern entsprechen. Diese Peptide fließen dann wieder in den Datensatz zur Generierung von Algorithmen ein, so daß sich der Fehler immer weiter fortsetzt.

Die in dieser Arbeit entwickelte Methode zur Testung von Peptiden bietet die Möglichkeit, diesen Fehler zu umgehen, da sie helfen kann, neue Motive zu definieren, bzw. die bereits bestehenden zu erweitern.

HLA-Allele, die offensichtlich ähnliche Bindungsmotive besitzen, lassen sich zu HLA-Supertypen zusammenzufassen (del Guercio *et al.*, 1995; Sidney *et al.*, 1996a; Sidney *et al.*, 1996b) (Sidney *et al.*, 2005). Für diese Supertypen wird versucht, Epitope zu identifizieren, welche an alle HLA-Allele eines Supertyps binden und in diesem Kontext eine T-Zellantwort auslösen können (Altfeld *et al.*, 2001) (Matsueda *et al.*, 2005). Diese Epitope werden auch als Supertope bezeichnet.

Durch Testung von Peptiden mit der hier beschriebenen Methode ist es möglich, zusätzlich zu Epitopen, die eine T-Zellantwort im Kontext der HLA-Supertypen, so wie hier mehrfach für HLA-A3/-A11 und HLA-B7/-B35 beschrieben, auslösen, Supertyp übergreifende Supertope zu identifizieren. Dies trifft für alle Peptide zu, bei denen zusätzlich zu dem bei den Vorhersagen positiv bewerteten HLA für den Spender, bei dem T-Zellantworten ausgelöst wurden, noch ein oder mehrere andere HLAs für die Präsentation in Frage kommen, die nicht zum gleichen Supertyp gehören, z.B. die Peptide TRP-2₄ und Tyro₅. Beide wurden für HLA-A24 vorhergesagt, werden aber möglicherweise über HLA-A11 und HLA-Cw4, bzw. über HLA-A3 präsentiert. Ein besonders interessantes Epitop stellt in diesem Zusammenhang auch Peptid JCV₅₆₉ (ILQSGMTLL) dar, welches von Motiv auf 5 verschiedene HLA-Allele, HLA-A2, -A3, -A26, -B8 und Cw3 passen würde und T-Zellantworten in insgesamt 27 Spendern auslöste. Diese Spender exprimieren entweder eines der erwähnten HLA oder stimmen in der

Expression von HLA-A1 oder -A24 überein, so daß diese HLA möglicherweise auch noch für die Präsentation des Peptides in Frage kommen. Mit einem solchen Epitop in einer Vakzine könnten eine Vielzahl von Patienten behandelt werden.

Bei der bioinformatischen Identifizierung von T-Zellepitopen ist nicht nur wichtig, ob das Antigen, aus dem sie stammen von Tumorzellen exprimiert wird, sondern auch, ob das identifizierte Peptid von den Zellen prozessiert wird. Daher wurden theoretische Analysen zur Prozessierung der 122 in dieser Arbeit identifizierten T-Zellepitope durchgeführt. Hierzu wurden zwei im Internet zugängliche Algorithmen (NetChop und PAPRoC) genutzt. Mit diesen Algorithmen wurden Vorhersagen zu allen 122 Peptiden durchgeführt, wobei die Algorithmen teilweise zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen kamen. Dies ist sehr wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Trainingsdatensätze, denen die Algorithmen jeweils zugrunde liegen, zurückzuführen. Der von Nussbaum et al. entwickelte PAPRoC-Algorithmus basiert auf experimentellen *in vitro* Daten, aus dem Verdau des Hefeproteins Enolase durch das 20S Proteasom der Hefe und des Menschen. NetChop wurde mit Daten bekannter HLA-Liganden, die von HLA-Molekülen eluiert wurden trainiert. Bei NetChop liegen daher indirekt Daten der Prozessierung sowohl durch das konstitutive, als auch durch das Immunoproteasom zugrunde. Außerdem sind hierbei, da natürliche HLA-Liganden den Algorithmen zugrunde liegen, auch HLA-Bindungspräferenzen berücksichtigt.

Es gibt Berichte, daß das Proteasom in der Lage ist, hinter nahezu jeder Aminosäure zu schneiden (Nussbaum *et al.*, 1998; Kisselev *et al.*, 2003), d.h. ein Teil der Epitope würde durch zerstörende Schnitte nicht mehr für Bindung an den HLA zugänglich bzw. aus jedem einzelnen Molekül eines bestimmten Proteins kann ein Epitop unterschiedlich ausgeschnitten werden. Dies würde bedeuten, daß prinzipiell jedes Epitop aus dem jeweiligen Protein generiert werden könnte. Allerdings konnten für das konstitutive und das Immunoproteasom Unterschiede in den bevorzugten Spezifitäten und den von ihnen generierten Peptiden gezeigt werden, so daß von diesen beiden Proteasomentypen wohl unterschiedliche Peptide generiert werden können, was gegen die Möglichkeit der Prozessierung jeden Epitops aus einem Protein sprechen würde (Chapiro *et al.*, 2006).

Doch nicht nur Proteasomen, sondern auch Aminopeptidasen wie TPPII sind an der Antigenprozessierung beteiligt. TPPII fungiert primär als Exopeptidase, die Tripeptide vom N-Terminus ihrer Substrate entfernt. Aufgrund dieser Exopeptidaseaktivität könnte TPPII eine Rolle bei der Generierung des N-Terminus aus verlängerten Epitopvorläufern spielen (Levy *et al.*, 2002). TPPII besitzt allerdings auch die Fähigkeit, endoproteolytische Schnitte

zu generieren, bevorzugt nach Lysinresten (Geier *et al.*, 1999). Hierdurch können auch C-Termini von Epitopen generiert werden, wie am Beispiel des HLA-A3 und HLA-A11 restringierten Epitops HIV-Nef₇₃ gezeigt wurden (Seifert *et al.*, 2003).

Durch Arbeiten von Demine (Demine and Walden, 2005), in denen an das Chaperon gp96 assoziierte Peptide isoliert und mittels Massenspektrometrie analysiert wurden, konnte gezeigt werden, daß die C-Termini der an gp96 gebundenen Peptide nicht mit den Vorhersagen für proteasomale Schnittstellen und auch nicht mit den beschriebenen Spezifitäten für TPPII übereinstimmen. Dies spricht entweder für noch unbekannte Spezifitäten des Proteasoms und von TPPII, oder für das Vorhandensein weiterer Peptidasen, die an der Prozessierung beteiligt sind.

Die in dieser Arbeit durchgeführten, theoretischen Analysen zur möglichen Prozessierung der identifizierten Epitope können ohnehin nur als Hinweis dienen und benötigen experimentelle Überprüfung. Für die drei Peptide (MAGE-A2₁₁₆, TRP-2₁₈₅ und MAGE-A2₂₅₀) deren natürliche Prozessierung durch Tumorzellen hier gezeigt werden konnte, wurde auch von beiden Algorithmen eine wahrscheinliche Prozessierung vorausgesagt.

Die Vorhersagen für die Prozessierung der MAGE-A Peptide wurde für die 10 Mitglieder der Proteinfamilie für welche die homologen Peptide ausgewählt wurden einzeln durchgeführt, um zu analysieren, ob die einzelnen Peptide aus den einzelnen Familienmitglieder gleich prozessiert werden würden. Auch hier kamen die Algorithmen zu unterschiedlichen Ergebnissen, beide sagten allerdings Prozessierung für 8 der 20 Peptide vorher, 5 Peptide würden nach beiden Algorithmen nicht generiert. Für die Peptide M2, M6-M8, M11 und M14 unterscheiden sich die Vorhersagen stark.

Manche der Peptide würden nur aus einem Teil der einzelnen MAGE-A Proteine prozessiert werden. Die Peptide M1-M8, M10, M12, M13, M15-M17, M19 und M20 lösten *ex vivo* meßbare T-Zellreaktionen aus, dies spricht dafür, daß diese Peptide möglicherweise natürlich prozessiert werden und bereits *in vivo* T-Zellen induziert haben. Für die Peptide M4, M12, M15, M17 und M19 wird allerdings von keinem der beiden Algorithmen Prozessierung vorhergesagt. Die experimentelle Überprüfung dieser Ergebnisse stellt sich weit schwieriger dar, da hier jeder Vertreter der MAGE-A Familie einzeln betrachtet werden müßte und hier, wie die Expressionsanalysen zeigen, Tumorzellen nicht genutzt werden könnten, da diese in der Regel mehr als ein MAGE-A exprimieren.

In dieser Arbeit wurde auch die Expression der für die Vorhersagen verwendeten Proteine mittels PCR in unterschiedlichen Geweben und Zelllinien getestet. Es wurden Melanom-, Lymphom- und Pankreaskarzinomproben, Proben gesunder Haut, sowie PBMC aus gesunden Spendern und Melanompatienten und Zelllinien verschiedenen histologischen Ursprungs analysiert. In dieser Arbeit konnte Expression von mRNA nahezu aller untersuchten Proteine im Melanom nachgewiesen werden. Nur XP058, BAGE und PSA wurden nicht exprimiert, diese mRNAs fanden sich auch nicht in anderen Proben.

Die Expression des Prostata spezifischen Antigens (PSA) wurde bislang nur für Prostatagewebe beschrieben (David *et al.*, 2002), in der hier durchgeführten Analyse konnte auch keine Expression in einem der untersuchten Gewebe nachgewiesen werden. Da keine Positivkontrollen vorhanden waren, kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß es mit den verwendeten Primer nicht möglich war, ein Amplifikat zu erhalten.

Die als cancer/testis Antigene beschriebenen Proteine GAGE, NY-ESO und TSAG10 wurden zu hohen Prozentsätzen in allen untersuchten Geweben und Zelllinien gefunden, dies widerspricht der beschriebenen ausschließlichen Expression in Tumor- und Testisgewebe. Für TSGA10 wurde die Expression in anderen Geweben bereits untersucht, hierbei konnte Expression auch in anderen Geweben als Tumor und Testis gezeigt werden, so z.B. in PBMC, gesunder Haut, Keratinozyten und im Pankreas (Tanaka *et al.*, 2004; Theinert *et al.*, 2005). Die cancer/testis Antigene LAGE und MAGE-A2 wurden zwar von den Tumorproben ausschließlich im Melanom exprimiert, aber auch in einem Teil der Zelllinien und im Falle von LAGE auch in gesunder Haut. Zelllinien haben aufgrund von Transformationen und ihrem unbegrenzten Wachstum tumorartige Eigenschaften, was die Expression von Tumorantigenen erklären kann. Über die Funktion von cancer/testis Antigenen ist sehr wenig bekannt, deshalb kann darüber kein Rückschluß auf den Grund ihrer Expression in gerade diesen Geweben gezogen werden. Für Tyrosinase und TRP-1 ist beschrieben, daß beide in pigmentierten Zellen exprimiert werden, was in der hier durchgeführten Analyse bestätigt werden konnte, es fand sich Expression im Melanom und gesunder Haut. Für TRP-1 fand sich zusätzlich Expression in 21% der Zelllinien, in einer Margenkarzinom-, einer Monozyten- und einer B-Lymphoblastoiden Zelllinie. Auch Expression von TRP-2 wurde bisher nur für pigmentierte Zellen beschrieben (Wang *et al.*, 1996), hier konnte allerdings Expression in allen untersuchten Geweben gezeigt werden. Bislang wurde die Funktion des Enzyms TRP-2 nur für die Melaninbiosynthese beschrieben, die hier beobachtete ubiquitäre Expression spricht dafür, daß dieses Enzym möglicherweise auch noch eine Rolle in von allen Zellen

benötigten Stoffwechselwegen spielt. Dies würde den Einsatz von TRP-2 als Ziel für eine Immuntherapie auf weitere Tumorentitäten als das Melanom erweitern.

Telomerase, als Protein welches während starker Zellproliferation verstärkt exprimiert wird, zeigt Expression in einem Teil der Melanom- und Lymphomproben und in 100% der Zelllinien. Die Expression von Telomerase in den Zelllinien ist nötig, da nur so deren unbegrenztes Wachstum möglich ist. Diese Fähigkeit wird auch von Tumorzellen benötigt, somit stellt Telomerase ein gutes tumorassoziiertes Antigen für eine Vielzahl von Tumoren dar. Therapiebedingter Antigenverlust würde in diesem Fall zum Tod der Tumorzellen führen. Am Zellzyklus beteiligte Proteine wie z.B. BARD, Bcl-2, cdk4, E2BA, p21 und p53 werden nahezu überall exprimiert. p53 wird in den meisten Proben zu einem geringeren Prozentsatz als die anderen fünf Proteine exprimiert. Schwache Expression von p53 in normalen Zellen ist beschrieben. CA125 ist im Zusammenhang mit Eierstockkrebs beschrieben, über seine Funktion und Expression ist allerdings nicht viel bekannt. Hier konnte es in so gut wie allen Proben nachgewiesen werden, was für eine ubiquitär benötigte Funktion dieses Proteins spricht.

Da durch die durchgeführte RT-PCR nur eine qualitative und keine quantitative Aussage zur Expression gemacht werden kann, kann nicht gesagt werden, ob in den einzelnen Proben die Expression insgesamt niedrig oder hoch ist, oder ob das Antigen immer nur von einem Teil der Zellen exprimiert wird.

Für alle Proteine, die als in einer Vielzahl von Geweben exprimiert beschrieben sind, konnte auch hier in nahezu allen Proben Expression nachgewiesen werden (siehe Anhang V).

Bei PCR mit für das SV40 large T-Antigen spezifischen Primern konnten zwar Amplifikate erhalten werden, allerdings erst nach 60 Zyklen PCR und es zeigte sich auch keine spezifische Expression in einem bestimmten der untersuchten Gewebe. Eine eindeutige Sequenzierung der Amplifikate aus den untersuchten Geweben war nicht möglich, so daß die Expression dieses Proteins weder bestätigt, noch widerlegt werden konnte. Als Positivkontrolle dienten hier SV40 exprimierende COS-7 Zellen, bei denen die Expression eindeutig bestätigt werden konnte.

Aufgrund ihrer spezifischen Expression in Tumor- und Testisgewebe, in manchen Fällen auch in Placenta und Trophoblast, stellen cancer/testis Antigene wie die der MAGE-A Familie eine besonders interessante Gruppe von tumorassoziierten Antigenen dar. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Expression der MAGE-A Familie näher untersucht. Bei diesen detaillierten Analysen zeigte sich eine interessante Struktur des Genlokus dieser Familie auf

dem X-Chromosom. Bei der Analyse der Expression von MAGE-A und CSAG mRNA in verschiedenen Melanomproben konnte gezeigt werden, daß mindestens ein Mitglied der MAGE-A Familie in jedem untersuchten Melanom exprimiert wurde und daß die Expression der CSAGs mit den MAGE-As aus Subcluster III korreliert. Bei der Untersuchung verschiedener Zelllinien zu unterschiedlichen Zeitpunkten und von Metastasen und den daraus gewonnenen Zelllinien fiel auf, daß sich diese in ihrem MAGE-Expressionsmuster sehr unterschieden. Dies zeigt allerdings, daß prinzipiell jedes MAGE-A von Melanomen exprimiert werden und die MAGE-A Expression innerhalb einer Probe sehr heterogen sein kann, abhängig vom jeweiligen Zeitpunkt der Analyse. Seit der Identifizierung von MAGE als tumorassoziertes Antigen und der Entdeckung der gewebespezifischen Expression wird diskutiert, ob diese Expression zur Tumorgenese beiträgt oder als Resultat des Krebses zu verstehen ist. Die Expression in Tumoren wird zum einen als Nebeneffekt einer weitgefächerten Disregulation der Genexpression in Tumorzellen, zum anderen als Folge der Aktivierung eines Keimbahn-assoziierten genetischen Programms diskutiert. Als Mechanismus der Regulation wurde von De Smet *et al.* die MAGE Expression mit der Genom-weiten DNA Demethylierung in Tumorzellen korreliert (De Smet *et al.*, 1996). Dieser Mechanismus ist nicht leicht mit der Heterogenität der MAGE Expression in Einklang zu bringen, sowohl im Hinblick auf die Anzahl der verschiedenen MAGE-Genprodukte und die Frequenz ihrer Expression, als auch im Hinblick auf die Tatsache, daß MAGE Expression zwar häufig im Melanom, aber nur gelegentlich in anderen Tumoren gefunden wird.

Daß die MAGE Expression durch Zugabe der hypomethylierenden Substanz 5'Aza-2'-Deoxycytidin induziert werden kann, konnte für MAGE-A1-A4 schon mehrfach gezeigt werden (Coral *et al.*, 2002) (De Smet *et al.*, 1996) (Sigalotti *et al.*, 2002; Sigalotti *et al.*, 2004) und durch die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche auch für die anderen Mitglieder der MAGE-A Familie und auch für die CSAGs demonstriert werden. Dies spricht für die prinzipielle Möglichkeit der Regulation der Genexpression der MAGE-A Familie über DNA-Methylierung. Da die Verwendung von 5'Aza-2'-Deoxycytidin jedoch eine Vielzahl von Genen direkt oder indirekt beeinflusst, sind solche Ergebnisse mit Vorsicht zu genießen. Die hier durchgeführten Analysen zeigen, daß trotz der insgesamt sehr heterogenen Expression der Mitglieder der MAGE-A Familie die Gene aus Subcluster III koordiniert exprimiert werden.

Veränderungen im Methylierungsmuster der DNA kann zusätzlich von Histonmodifikationen begleitet sein (Ng and Bird, 1999; Jenuwein and Allis, 2001; Bachmann *et al.*, 2003; Espada *et al.*, 2004). Von Fraga *et al.* konnte gezeigt werden, daß Tumorzellen fehlende

Monoacetylierung und Trimethylierung von Histon H4 aufweisen, was darauf zurückzuführen ist, daß repetitive DNA-Abschnitte in diesen Zellen hypomethyliert sind (Fraga *et al.*, 2005). Das zeigt, daß Histonmodifikationen und DNA-Hypomethylierung zu umfangreichen Chromotinumgestaltungen in Tumorzellen führen können. Die übereinstimmende Regulation und Expression der CTAs aus Subcluster III spricht für eine Regulation des gesamten Subcluster durch epigenetische Veränderungen. In nicht-Tumorzellen scheint Subcluster III für die Transkription nicht zugänglich zu sein, wohingegen in Tumor- und Testiszellen dieses Subcluster durch eine veränderte DNA-Struktur zugänglich wird.

Obwohl nicht viel über die Funktion der MAGE-Proteine bekannt ist, sind sie doch aufgrund ihrer beschränkten Expression passende Ziele für eine Immuntherapie und für die Überwachung und Kontrolle von Tumorerkrankungen.

4.1 Schlußfolgerung und Ausblick:

In dieser Arbeit konnten, mit neuen Ansätzen für Peptidvorhersagen und für die Testung dieser Peptide, 122 T-Zellepitope identifiziert werden. Diese Anzahl ist im Vergleich der bislang insgesamt bekannten Epitope aus tumorassoziierten Antigenen relativ hoch (Novellino *et al.*, 2005).

Bei den Analysen zu den 1970 mit SVM und PSSM vorhergesagten Peptiden zeigte sich, daß insgesamt 58 Peptiden als T-Zellepitop identifiziert werden konnten. Unter diesen identifizierten Peptiden befanden sich 9, die von keinem der beiden Algorithmen positiv bewertet wurden. Wäre die übliche Art der Testung von Peptiden angewendet worden, wobei Peptide, die positiv für ein bestimmtes HLA-Allel bewertet werden auch nur mit Zellen von Spendern, die dieses Allel exprimieren getestet werden, wäre die Zahl der identifizierten Peptide viel geringer. Insgesamt fanden auf von den Algorithmen positiv bewerteten Peptide nach *in vitro priming* 57 T-Zellantworten statt, allerdings nur 23 in dem HLA-Kontext für welchen das jeweilige Peptid positiv bewertet wurde. Das zeigt, daß beide verwendeten Algorithmen noch in ihrer Vorhersagequalität verbessert werden können. Die hier verwendete völlig neue Strategie der Testung der Peptide unabhängig vom HLA der Spender bietet die Möglichkeit, sowohl die Identifizierung von TATE, als auch die Entwicklung von Vorhersagealgorithmen weiter voranzutreiben. Auch können hiermit bereits definierte Bindungsmotive bestimmter HLA-Allele erweitert werden. Die HLA-unabhängige Testung von potentiellen T-Zellepitopen sollte also weiter verfolgt werden, allerdings ist im weiteren die experimentelle Überprüfung, sowohl der HLA-Restriktion, als auch der natürlichen Prozessierung ein wichtiger Schritt.

Dadurch, daß in dieser Arbeit Peptide aus einer so großen Zahl an TAA getestet wurden, ist es möglich, mit Hilfe der identifizierten Peptide zum einen verschiedene Tumorentitäten, wie z.B. Melanom, Mammakarzinom, Lungen- und Blasenkarzinome abzudecken, zum anderen innerhalb einer Tumorentität viele verschiedene Stoffwechselfvorgänge weitgehend zu umfassen. Mit Hilfe der Peptide aus den Polyomaviren wäre auch eine Vakzine für Tumore des zentralen Nervensystems denkbar. Eine ideale Vakzine sollte aus Peptide aus möglichst vielen verschiedenen TAA bestehen, am besten sollten Peptide enthalten sein, die über eine Vielzahl von HLA-Allelen präsentiert werden können, um viele Patienten mit einer Peptidmischung behandeln zu können und auch innerhalb eines Patienten möglicherweise mehrere Allele abdecken zu können. Aufgrund der Vorhersagen für verschiedene HLA-Allele und der angewendeten Methode für die Testung der Peptide wurden in dieser Arbeit Epitope für eine weite Bandbreite an HLA-Allelen identifiziert.

Mit Hilfe der verschiedenen Expressionsanalysen konnte gezeigt werden, daß für einen Teil der als CTA beschriebenen Proteine diese Beschreibung nicht zutrifft und auch für weitere Proteine konnte gezeigt werden, daß sie nicht nur in den bereits beschriebenen Geweben exprimiert werden. Für die MAGE-A Familie konnte gezeigt werden, daß sie sich durch ihre Expression in Melanomproben sehr gut zur Diagnose von Melanomen und auch als Ziel einer Immuntherapie eignet, so daß die Identifizierung von Epitopen, die die ganze Familie umfassen weiter voran getrieben werden sollte.

Desweiteren zeigen zum einen die mit den 7 mit ANN vorhergesagten Peptiden erhaltenen Ergebnisse, zum anderen die Identifizierung der relativ hohen Anzahl der Peptide die weder mit SVM, noch mit PSSM positiv bewertet wurden, daß es lohnenswert ist, auch Peptide mit nicht-üblichen Bindungsmotiven zu testen. Hierfür sollten nun basierend auf den Ergebnissen neue Algorithmen trainiert und die vorhergesagten Peptide wiederum HLA-unabhängig getestet werden.