

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg

Direktor: Prof. Dr. Hermann Einsele

Untersuchungen zur Präsentation kryptischer und kanonischer Peptide über
den MHC-Klasse-I-Komplex in Patienten mit akuter myeloischer Leukämie

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Flora Aehnlich

aus Würzburg

Würzburg, Oktober 2021

Referent bzw. Referentin: Priv.-Doz. Dr. Götz Ulrich Grigoleit

Korreferent bzw. Korreferentin: Univ.-Prof. Dr. Matthias Eyrich

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 06.04.2022

Die Promovendin ist Ärztin

1	Einleitung	1
1.1	Immunologische Grundlagen	1
1.1.1	T-Zell-vermittelte Immunität	2
1.1.2	Kreuzreaktivität von T-Lymphozyten	3
1.1.3	Das Repertoire des MHC-Klasse-I-Peptidoms	4
1.2	Tumorimmunologie	6
1.2.1	Tumorabwehr und -immunevasion	6
1.2.2	Tumorimmuntherapeutische Strategien	7
1.2.3	Zielantigene in der Tumorimmuntherapie	9
1.3	Akute myeloische Leukämie	10
1.3.1	Epidemiologie und Ätiologie	10
1.3.2	Klinik und Diagnostik	10
1.3.3	Therapieschema	12
1.3.4	Allogene Stammzelltransplantation	13
1.3.4.1	Graft-versus-Leukämie-Reaktion	13
1.3.4.2	CMV-Reaktivierung nach allogener Stammzell- transplantation	14
1.4	Zielsetzung der Arbeit	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Ethikvotum	17
2.2	Material	17
2.2.1	Geräte und Gebrauchsmaterialien	17
2.2.2	Chemikalien und Reagenzien	18

2.2.3	Kits	19
2.2.4	Lösungen	19
2.2.5	Monoklonale Antikörper	21
2.2.5.1	Antikörper für die Durchflusszytometrie	21
2.2.5.2	Antikörper für die Immunpräzipitation	21
2.2.6	Zellmaterial	21
2.2.6.1	Humane Zelllinien und Zellkulturmedien	21
2.2.6.2	Patientenmaterial	22
2.2.6.3	Spendermaterial für Kontrollgruppe	22
2.3	Methoden	23
2.3.1	Kultivierung humaner Zelllinien: DG-75, ML-2 und THP-1 .	23
2.3.2	Isolation der PBMCs und BMMCs	24
2.3.3	Isolation der Granulozyten	24
2.3.4	Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer	25
2.3.5	Einfrieren und Auftauen von Zellen	26
2.3.5.1	Wegfrieren als Pellet	26
2.3.5.2	Kryokonservierung	26
2.3.5.3	Auftauen kryopräservierter Zellen	26
2.3.6	Durchflusszytometrische Verfahren	26
2.3.6.1	Bestimmung der Granulozytenreinheit	27
2.3.6.2	Quantifizierung der MHC-Klasse-I-Moleküle . . .	27
2.3.7	Identifikation von MHC-präsentierten Peptiden	29
2.3.7.1	Herstellung der Sepharose-Antikörper-Matrix . . .	30
2.3.7.2	Vorbereitung der Affinitätschromatographiesäulen	30
2.3.7.3	Herstellung der Zelllysate	32
2.3.7.4	Isolation der MHC-Peptid-Komplexe	32
2.3.7.5	Trennung der MHC-Moleküle von den Peptiden .	33
2.3.7.6	Equilibrieren der ankonzentrierten Peptidproben .	33
2.3.7.7	Massenspektrometrie	34
2.3.7.8	Datenanalyse	35
2.3.8	Statistische Methoden	36
3	Ergebnisse	37
3.1	Güte der Peptididentifizierung	39
3.2	Quantifizierung der MHC-Klasse-I-Moleküle	41
3.2.1	Vergleich zwischen den Probenkategorien	43
3.2.2	Analyse der HLA-A*02-Molekülanzahlen	44
3.2.3	Affinität des Antikörpers W6/32 aus Tübingen	46

3.2.4	Korrelation MHC-Moleküle und Peptide	46
3.3	Quantitative Analyse der MHC-Klasse-I-Peptidome	48
3.3.1	Verwendung eines HLA-A*02-spezifischen Antikörpers . . .	51
3.3.2	Vergleich der Peptidome von PBMCs und BMMCs	51
3.3.3	Vergleich HLA-identischer AML- und benigner Peptidome	52
3.4	Qualitative Analyse der MHC-Klasse-I-Peptidome	53
3.4.1	AML-exklusive Peptide und ihre Quellproteine	53
3.4.1.1	Klassische Peptide und ihre Quellproteine	55
3.4.1.2	Kryptische Peptide und ihre Quellproteine	58
3.4.2	Vergleich mit in der Literatur beschriebenen Antigenen . . .	60
3.4.2.1	Vergleich mit Tumorantigenen der AML	60
3.4.2.2	Vergleich mit CMV-spezifischen T-Zell-Antigenen	65
4	Diskussion	69
5	Zusammenfassung	83
6	Literatur	85
Appendix		
I	Ergänzende Materialien	
I.1	Übersicht über die durchgeführten Immunpräzipitationen	
I.2	CD8 ⁺ T-Zell-spezifische immunogene CMV-Antigene	
II	Abkürzungsverzeichnis	
III	Abbildungsverzeichnis	
IV	Tabellenverzeichnis	
V	Danksagung	
VI	Lebenslauf	

In dieser Arbeit wird aus Gründen der besseren Lesbarkeit das generische Maskulinum verwendet. Weibliche und anderweitige Geschlechteridentitäten werden dabei ausdrücklich mitgemeint, soweit es für die Aussage erforderlich ist.

Mit rund 80 % stellt die AML (Akute myeloische Leukämie) einen bedeutenden Anteil der akuten Leukämien im Erwachsenenalter. Unter akuten Leukämien versteht man dabei hoch proliferative maligne Neoplasien der myeloischen oder lymphatischen Zellreihe im Knochenmark. Die Prognose der Erkrankung ist bisher trotz medizinischer Erfolge mit einer hohen Mortalität belegt, nur etwa jeder vierte Patient überlebt die ersten fünf Jahre nach Diagnosestellung der AML. [1] Die Therapie erfolgt derzeit risikoadaptiert nach Therapieprotokollen in Studiengruppen und umfasst zum Teil eine allogene Stammzelltransplantation [2]. Der hierdurch teils erzielte Erfolg spiegelt dabei das bedeutende Potenzial unsere Immunzellen wider, die AML erfolgreich heilen zu können. Mit weiteren immuntherapeutischen Ansätzen wird vielfach versucht, dieses Potenzial für die Therapie der AML weiter zu nutzen. Aufgrund diverser Hürden konnte bis dato dennoch keiner der Therapieansätze erfolgreich als Standardtherapie in der Klinik etabliert werden [3–5]. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten sollen gezielte immunologisch Therapieansätze ermöglichen und die Prognose von AML-Patienten nach allogener Stammzelltransplantation weiter verbessern.

1.1 Immunologische Grundlagen

Das humane Immunsystem setzt sich aus einem angeborenen unspezifischen sowie einem erworbenen adaptiven Anteil zusammen. Das angeborene Immunsystem umfasst, neben den physiologischen und mechanischen Barrieren des Körpers, einen humoralen (Komplementsystem, Zytokine) und zellulären Bestandteil (neutrophile und eosinophile Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, NK-

Zellen (Natürliche Killerzellen)). Es ist für eine schnelle, aber unspezifische Immunantwort verantwortlich. Dem entgegengesetzt bildet das erworbene spezifische Immunsystem, bestehend aus T- und B-Lymphozyten, eine zeitlich verzögerte, aber antigenspezifische Immunantwort. [6]

Da für die Immunabwehr von Tumoren vor allem zytotoxische T-Lymphozyten von Bedeutung sind [7], wird im Weiteren nur auf die T-Zell-vermittelte Immunreaktion im Detail eingegangen.

1.1.1 T-Zell-vermittelte Immunität

T-Lymphozyten entwickeln sich aus Vorläuferzellen im Knochenmark und migrieren früh als Thymozyten in den Thymus. Dort findet zunächst eine Positivselektion der Zellen statt, welche einen TCR (T-Zell-Rezeptor) besitzen und mit diesem körpereigene MHC (Haupthistokompatibilitätskomplex)-Moleküle erkennen. Im Anschluss erfolgt eine Negativselektion mit nachfolgender Apoptose jener Zellen, welche auf Selbstantigene reagieren. Zusammen führen diese Schritte zu einer Selektion selbsttoleranter, aber fremdantigen-erkennender T-Lymphozyten. [6]

Der TCR ist ein Antigenrezeptor auf der Zelloberfläche der T-Lymphozyten und für die Antigenerkennung essenziell. Jeder TCR ist aus zwei Polypeptidketten aufgebaut, die jeweils aus einer konstanten und einer variablen Region bestehen. Der Großteil der TCRs ist aus α - und β -Ketten zusammengesetzt, ein geringer Anteil auch aus γ - und δ -Polypeptidketten. [8] In der weiteren Arbeit bezieht sich der Begriff TCR jedoch nur auf den $\alpha\beta$ TCR.

Insgesamt können durch Mechanismen des Gen-Rearrangements und Splicings theoretisch circa 10^{18} verschiedene TCRs unterschiedlicher Antigenspezifitäten entstehen [9]. Pro Individuum wird jedoch nur eine Diversität von circa 2×10^7 vorkommenden TCRs beschrieben [10].

Der erste Antigenkontakt der T-Lymphozyten führt zu einer Aktivierung, Proliferation und Differenzierung der Zellen. Die Differenzierung erfolgt in verschiedene T-Effektorzellen sowie seltener zu T-Gedächtniszellen. Die Effektorzellen unterteilen sich in CD (Cluster of Differentiation) 8^+ zytotoxischen T-Zellen, CD 4^+ T-Helferzellen sowie Tregs (regulatorische T-Zellen). [8]

Um von einem TCR als Antigen erkannt zu werden und eine Immunantwort hervorrufen zu können, muss ein Antigen von speziellen Glykoproteinen, soge-

nannten MHC-Molekülen, auf der Zelloberfläche antigenpräsentierender Zellen präsentiert werden. Die MHC-Moleküle werden im Menschen von über 200 verschiedenen Genen, den HLA (humanes Leukozyten-Antigen)-Genen auf Chromosom 6, codiert. Diese werden in Klasse I (HLA-A, -B, -C) und Klasse II (HLA-DR, -DP, -DQ) unterteilt. Durch zahlreiche mögliche HLA-Allele sowie polymorphe Proteinprodukte können diverse MHC-Klasse-I- und -II-Moleküle unterschiedlicher Peptidbindungsspezifitäten entstehen. [8]

MHC-Klasse-I-Moleküle befinden sich auf der Zelloberfläche aller kernhaltigen Zellen des Körpers und werden nur von $CD8^+$ T-Lymphozyten erkannt. Sie werden im endoplasmatischen Retikulum direkt mit Peptiden aus dem Zytosol der Zelle beladen [6].

MHC-Klasse-II-Moleküle werden demgegenüber nur von antigenpräsentierenden Zellen exprimiert und durch $CD4^+$ T-Lymphozyten erkannt. Die Beladung erfolgt im Normalfall mit exogenen Antigenen, welche zuvor über Endozytose aufgenommen und in der Zelle prozessiert wurden [6]. Es ist jedoch auch eine Präsentation zytosolischer Peptide nach autophagischen Reaktionswegen möglich [8].

Bindet ein TCR einen MHC-Peptid-Komplex, führt dies zu einer Konformationsänderung des Korezeptors CD3 auf den T-Lymphozyten. Diese Konformationsänderung gilt als Trigger für intrazelluläre Signalkaskaden in T-Lymphozyten, welche zu einer T-Zell-Aktivierung führen. [11]

Mit Hilfe weiterer Korezeptoren expandieren sich die aktivierten T-Lymphozyten klonal und starten nachfolgende Reaktionswege. Die $CD8^+$ T-Lymphozyten übermitteln auf verschiedenen Wegen eine direkte zytotoxische Wirkung. Zum Beispiel werden Perforine in die Membran der Zielzelle eingefügt und durch diese zytoplasmatische Granula mit Granzymen in die Zielzelle gebracht, um dort eine DNA-Fragmentation und Apoptose zu induzieren. [6]

1.1.2 Kreuzreaktivität von T-Lymphozyten

Ursprünglich wurde angenommen, dass es für jedes Peptid einen spezifischen TCR gäbe. Dem widerspricht jedoch unter anderem, dass mehr verschiedene Peptide existieren, als ein Individuum T-Lymphozyten habe [12]. Zudem müsste jede peptidspezifische T-Zelle mehrfach vorhanden sein, um eine effiziente Immunantwort auszulösen [13]. Daher besitzen einzelne TCRs die Fähigkeit, trotz ihrer eigentlichen Antigen-spezifität mit verschiedenen MHC-Peptid-Komplexen Bindungen einzugehen. Diese Fähigkeit führt zu der sogenannten Kreuzreak-

tivität von T-Lymphozyten [14] - Rechnungen zufolge kann jeder TCR bis zu 10^7 verschiedene MHC-gebundenen Nonamere erkennen [12]. Die Kreuzreaktivität der T-Lymphozyten dient somit als Mittel, das effektive Spektrum des TCR-Repertoires zu vergrößern [15].

Nach dem Review von Yin und Mariuzza [15] werden fünf Mechanismen unterschieden, wie TCRs mit verschiedenen MHC-Peptid-Komplexen kreuzreagieren können:

- Je nach Peptid können strukturelle Veränderungen in der Peptid-Bindestelle des TCR's vorkommen, beispielsweise eine Konformationsänderung der CD3-Schleife oder eine Rotation von langen Aminosäureketten [16].
- Für die Erkennung unterschiedlicher Liganden kann der TCR unterschiedlich ausgerichtet werden, sodass verschiedene Bindestellen eines TCR verwendet werden [14].
- Strukturelle Degeneration kann einen Mangel an spezifischen Interaktionen zwischen dem TCR und dem Peptid, zum Beispiel an Wasserstoff- oder Salzbrücken, verursachen. Dies führt zu einer größeren Toleranz in der Peptiderkennung, beispielsweise der Akzeptanz von Aminosäuresubstitutionen an TCR-Kontakpositionen. [17]
- Molekulares Mimikry (gleiche strukturelle oder chemische Eigenschaften) verschiedener Liganden kann eine Kreuzreaktivität eines TCR ermöglichen [18].
- Auch Konformationsänderungen der MHC und/oder Peptide führen zur Erkennung mehrerer Antigene durch einen TCR [19].

Insgesamt erreiche ein TCR seine Spezifität und Kreuzreaktivität jedoch nicht über einen einzelnen Mechanismus, sondern eine Kombination dieser [15, 20].

1.1.3 Das Repertoire des MHC-Klasse-I-Peptidoms

Die MHC-Klasse-I-präsentierten Peptide stammen aus dem Zytosol der Zelle und werden anschließend im endoplasmatischen Retikulum auf die MHC-Moleküle geladen. Möglich sind dabei sowohl Peptide des normalen Proteinumsatzes von körpereigenen Proteinen, als auch virus- oder tumorspezifische Peptide bei virusinfizierten oder Tumorzellen. Bildlich gesehen kann man den

MHC-Klasse-I-Präsentationsweg, so beschreiben es Laumont und Perreault [21], als Dimensionsreduktionsfunktion sehen: ein großer Input-Datensatz, das Proteom, wird in einen kleineren Output-Datensatz, das MHC-Klasse-I-Peptidom, komprimiert. Dabei sei das Peptidrepertoire sehr plastisch und beispielsweise abhängig vom Zelltyp, -metabolismus oder von Infektionen.

Kryptische Peptide

Lange wurde angenommen, dass die MHC-Klasse-I-präsentierten Peptide nur durch die Translation protein-codierender Transkripte in ihrem kanonischen Leseraster, das heißt vom primären Start- zum Stopcodon, entstehen. Analysen des Peptidrepertoires zeigten jedoch, dass dieses zu mindestens 10 % aus sogenannten „kryptischen“ Peptiden des nicht-kanonischen Proteoms bestehe. Diese Peptide entstehen durch die Translation von Transkripten vermeintlich nicht-codierender genomischer Regionen oder durch exonische Translationen außerhalb des Leserasters [22].

Folglich repräsentieren das MHC-Klasse-I-Peptidom nicht nur die proteincodierenden Gene, welche lediglich 2 % des Genoms bilden, sondern einen weitaus größeren Anteil. In Analysen des Transkriptoms wurden Transkripte von 62 bis 75 % des Genoms aufgedeckt [23]. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass durch die Existenz kryptischer Peptide das CD8⁺ T-Zell-System 75 % statt ursprünglich gedachten 2 % des humanen Genoms überwachen kann [21].

Die Biogenese kryptischer Peptide ist auf der Translationsebene reguliert:

- Die Initiation bei nicht-primären Startcodons sowie bei Codons mit einer Basenabweichung vom Startcodon kann zur Translation im nicht-kanonischen Leseraster außerhalb proteincodierender Regionen oder auch zu einer Leserasterverschiebung in proteincodierenden Regionen führen.
- Bei der Elongation können, auch wenn im Menschen nur in weniger als 1 % der Gene, programmierte ribosomale Leserasterverschiebungen durch bestimmte Nukleotidsequenzen gefördert werden.
- Wird bei der Termination ein Stoppcodon überlesen, führt dies zur Translation der 3'UTR und folglich zur Produktion sowohl klassischer als auch kryptischer Peptide. Zusätzlich kann durch das Stoppcodon eine ribosomale Leserasterverschiebung initiiert werden.

Nach ihrer Translation benötigen die kryptischen Peptide wahrscheinlich weni-

ge bis gar keine Weiterverarbeitungsschritte, bevor sie von den MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden können [21]. Der anschließende Prozess der Antigenerkennung durch CD8⁺ T-Lymphozyten ist unabhängig von der Quelle der Peptide, sodass auch Immunantworten auf kryptische Peptide nachgewiesen werden konnten [24].

1.2 Tumorimmunologie

1.2.1 Tumorabwehr und -immunevasion

Aufgrund des Leistungsvermögens unseres Immunsystems ist die Fähigkeit eines Tumors, diesem zu entkommen, eines der zur Tumorentwicklung notwendigen Merkmale [25]. Komplexe Wechselwirkungen zwischen Tumoren und dem Immunsystem sind schon seit Langem bekannt und seither Gegenstand vieler Untersuchungen:

Bereits 1909 beschrieb der Nobelpreisträger Ehrlich die Bedeutung des Immunsystems für die Abwehr von Tumoren [26]. Etwa 50 Jahre später stellten Burnet und Thomas mit dem Begriff der Immunüberwachung („immune surveillance“) die Hypothese auf, dass Immunzellen fähig seien, Tumorzellen zu erkennen und zu eliminieren [27]. Später konnte beispielsweise an genveränderten immundefizienten Mäusen die Bedeutung von Lymphozyten in der Tumorabwehr, sowohl gegen spontan, als auch chemisch induzierte Tumore, nachgewiesen werden [28]. Ein einfacher klinischer Beleg für die Tumorabwehr durch das Immunsystem ist die erhöhte Inzidenz bestimmter Tumore bei immunkompromittierten Patienten: Patienten nach Organtransplantationen haben beispielsweise ein dreifach erhöhtes Risiko für maligne Erkrankungen gegenüber alters- und geschlechtsangepassten Vergleichsgruppen [29].

Dem Immunsystem wird jedoch nicht nur ein protektiver Effekt, sondern auch die Förderung von Tumorwachstum durch die Selektion gering immunogener Tumorzellen zugeschrieben. Der hierfür verwendete Begriff des Immuneditings wird in drei Phasen unterteilt: die Eliminierungs- („Elimination“), die Gleichgewichts- („Equilibrium“) und die Entkommensphase („Escape“). In der Eliminierungsphase erkennt das Immunsystem die potenziellen Tumorzellen und führt zu deren Zerstörung. Erfolgt die Eliminierung nicht vollständig, kommt es durch ständige Veränderungen der Tumorzellen unter dem Selektionsdruck des Immunsystems zu Varianten der Tumorzellen, welche der Eliminierung entkom-

men; dies beschreibt die Gleichgewichtsphase. Erwerben die Tumorzellen die Fähigkeit, dem Immunsystem vollkommen zu entgehen, so tritt die Entkommens- als Endphase ein. [30]

Die Tumorimmunevasionsmechanismen sind dabei sehr vielfältig, sodass im Folgenden nur einige Beispielmeechanismen genannt werden.

Zum Teil spielt das bereits zuvor genannte Immunediting, genauer die Selektion der Tumorzellvarianten, welche den Immunreaktionen entgehen, eine Rolle.

Zudem kann in der Tumormikroumgebung auf verschiedenen Wegen ein immunsuppressives Milieu erzeugt werden. So können beispielsweise verschiedene immunsuppressive Zytokine wie TGF (Tumorwachstumsfaktor)- β oder IL (Interleukin)-1 von Tumor- oder anderen Zellen sezerniert werden oder durch Tumorzell-initiierte Chemokinproduktion Tregs in die Tumor-Mikroumgebung gelockt werden und dort zu einer Immunsuppression führen.

Auf den Tumorzellen selbst kann die Antigenpräsentation über den MHC-Klasse-I-Signalweg auf den Tumorzellen herunterreguliert werden, sodass keine Tumorantigene mehr von den zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt werden können. Zusätzlich kann die Expression von kostimulatorischen Molekülen auf Tumorzellen fehlen und somit zu einer Toleranz durch die T-Lymphozyten führen. Auf verschiedenen Wegen kann zusätzlich eine Apoptose der zytotoxischen T-Lymphozyten durch die Tumorzellen induziert werden. [31]

1.2.2 Tumorimmuntherapeutische Strategien

Trotz der verschiedenen Immunevasionsmechanismen von Tumoren kann das Immunsystem für die Therapie von Tumoren so manipuliert werden, dass es zur Tumorerkennung und -elimination fähig ist [32]. In der Klinik werden bereits verschiedene Immuntherapien verwendet, welche auf unterschiedlichen Mechanismen beruhen:

Als erste beschriebene Immuntherapie gegen solide Tumoren gilt die Gabe von IL-2, welche 1992 für die Therapie von Nierenkarzinomen sowie später auch für Melanome zugelassen wurde [33]. IL-2 kann durch eine Induktion von T-Zell-Proliferation, -differenzierung und -aktivierung eine komplette Tumorregression hervorrufen, jedoch wurden zum Teil signifikante Nebenwirkungen beschrieben [34].

Des Weiteren können monoklonale Antikörper gegen Tumorantigene auf verschiedenen Wegen tumorspezifische Immunantworten stimulieren [35]. Als Bei-

spiel sei der anti-CD20-Antikörper Rituximab genannt, welcher bei B-Zell-Lymphom-Patienten zu einer nachweisbaren Aktivierung von NK-Zellen führt [36]. Neben dieser Induktion der zellulären Zytotoxizität wurde zusätzlich auch eine direkt-signalvermittelte sowie komplement-vermittelte Zytotoxizität durch Rituximab nachgewiesen [37].

Tumorspezifische T-Zellen können zudem im Rahmen einer adoptiven T-Zell-Therapie *ex-vivo* vermehrt und dem Patienten im Anschluss wieder zugeführt werden. Ein vielversprechender Ansatz ist hier die Verwendung von CAR (chimerer Antigenrezeptor)-T-Zellen. Dies sind gentechnisch veränderte zytotoxische T-Lymphozyten des Patienten, welche Rezeptoren für ein spezifisches Zielantigen exprimieren. CAR-T-Zellen ermöglichen, die Spezifität der T-Zellen zu bestimmen und die MHC-Restriktion zu umgehen [38]. In der Klinik wurden bereits verschiedene CAR-T-Zellen erfolgreich eingesetzt, beispielsweise CD19-spezifische-CAR-T-Zellen in der Therapie von akuten und chronischen lymphatischen Leukämien sowie B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen oder CD138-spezifische-CAR-T-Zellen bei Patienten mit multiplen Myelomen [39]. In der Therapie der AML ist der Einsatz von CAR-T-Zellen aufgrund der komplizierten Suche nach einem geeigneten Zielantigen [3] erschwert, wird jedoch derzeit bereits in klinischen Studien erprobt [40].

Ein weiterer Ansatz ist es, mittels einer Checkpoint-Blockade die natürliche Immunantwort gegen einen Tumor zu verstärken. Das Prinzip beruht auf der Ausschaltung inhibitorischer Mechanismen, den negativen Kontrollstellen in der Immunantwort, und folglich einer erleichterten T-Zell-Aktivierung. Der PD (programmed death)-1-Antikörper Nivolumab etwa verhindert die Bindung des Liganden PD-L1 an das Kontrollstellen-Molekül und inaktiviert somit die PD-1-vermittelte Inhibition der T-Zell-Aktivierung [41]. Nivolumab wurde 2014 das erste Mal zugelassen und wird in der Therapie von Melanomen, Nierenzellkarzinomen, Non-Hodgkin-Lymphomen sowie Nicht-kleinzelligen-Lungen-Karzinomen eingesetzt [42]. Durch die geringe Immunogenität der AML sowie die immunsuppressive Umgebung im Knochenmark konnten für die AML bisher mit Checkpoint-Inhibitoren jedoch keine vergleichbar gute Ergebnisse erzielt werden [4].

Gleichfalls eine Verstärkung der Immunantwort ist das Ziel einer therapeutischen Tumorstimmulierung, welche eine selektive Expansion tumorspezifischer Lymphozyten hervorrufen soll. Die Wirksamkeit der Stimmulierung ist dabei von der Funktionalität der T-Effektorzellen sowie der Aufhebung des immunsuppressi-

ven Tumormilieus abhängig [43]. Aufgrund mangelnder Wirkung hat die Tumorvakzinierung in der Klinik bisher wenig Bedeutung gewonnen [33], erneut stellt die Auswahl geeigneter Antigene eines der größten Hindernisse in der Therapieentwicklung dar [44]. Dennoch bestärken bereits erzielte klinische Erfolge [43, 45] das Potenzial von Tumorvakzinierungen für maligne hämatologische Erkrankungen.

1.2.3 Zielantigene in der Tumormimmuntherapie

Zum Erfolg einer Tumormimmuntherapie ist die Erkennung von Tumorzellen durch T-Lymphozyten eine Voraussetzung. Diese erfolgt anhand von Peptiden aus Tumorzellproteinen, welche auf der Tumorzelloberfläche durch MHC-Molekülen präsentiert werden [8]. Es kann zwischen tumor-assoziierten und -spezifischen Antigenen unterschieden werden. Erstere sind Antigene, welche vermehrt auf Tumoren nachgewiesen werden, aber auch schwach in anderen Geweben exprimiert werden [46]. Ihre Verwendung als Zielantigen in der Tumorthherapie ist durch die von den Selbstantigenen hervorgerufene Toleranz eingeschränkt. Dem entgegengesetzt werden tumorspezifische Antigene ausschließlich von Tumorzellen präsentiert, sodass für diese keine negative Selektion der zugehörigen spezifischen T-Zell-Populationen stattfindet. [47]

Zusammenfassend wird für die antigenspezifische Immuntherapie ein Zielantigen benötigt, welches vom Immunsystem erkannt wird und eine gegen den Tumor gerichtete Immunantwort auslöst. Anguille, Van Tendeloo und Berneman [48] definierten für ideale Zielantigene in der Therapie der AML folgende fünf Kriterien: (1) Leukämie-Spezifität (2) regelmäßige Expression auf AML-Zellen sowie bestenfalls Leukämie-Stammzellen (3) Onkogenität (4) Immunogenität (5) nachweisbare klinische Relevanz.

Die Identifikation von Tumorantigenen kann über genetische, reverse oder direkte zelluläre Ansätze erfolgen.

Ein klassisches Verfahren ist die Reverse Immunologie: zunächst erfolgt eine *in-silico*-Vorhersage von Antigenepitopen, im Anschluss werden diese dann experimentell validiert [32]. Die Sensitivität der Vorhersage ist jedoch begrenzt, sodass nicht alle natürlich präsentierten Peptide vorhergesagt werden, zudem gibt es hohe Zahlen falsch-positiver Peptide [49].

Ein etabliertes genetisches Verfahren ist die serologische Identifikation von Antigenen durch rekombinante Expressionsklonierung, auch unter SEREX bekannt.

Hier wird zunächst mit Tumorzellen eine cDNA-Bibliothek aufgebaut, über Expressionsvektoren in *Escherichia coli* exprimiert und die potenziellen Antigene auf Membranen übertragen. Nach Inkubation mit Patientenserum können im Anschluss über einen enzymkonjugierten anti-humaner-Ig (Immunglobulin) G-Antikörper die Antigen-Antikörper-Bindungen und folglich die reaktiven Antigene detektiert werden. [50]

Der zelluläre Ansatz hingegen beruht auf der Elution der Antigene von den Zielzellen und nachfolgender Ermittlung der Peptidsequenzen mittels Massenspektrometrie [32]. Dieses Verfahren ist aktuell das Einzige, welches das tatsächlich *in-vivo* vorkommende Repertoire an MHC-präsentierten sowie posttranslational-modifizierten Peptiden identifiziert [49].

1.3 Akute myeloische Leukämie

1.3.1 Epidemiologie und Ätiologie

Mit einer Inzidenz von 3,7 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr [2] werden in Deutschland circa 4.100 Neuerkrankungen der AML pro Jahr diagnostiziert. Bei stark ansteigenden Inzidenzen mit zunehmendem Lebensalter liegt das mittlere Erkrankungsalter bei 72 Jahren.

Die Prognose der AML variiert je nach Alter, Geschlecht, Risikostratifizierung und Therapie. In der Altersgruppe von 15 bis 35 Jahren wurde zwischen 2009 und 2013 ein relatives Fünfjahresüberleben von 60 % erreicht, wohingegen dieses in der Altersgruppe von 55 bis 64 Jahren bei nur 34 % und bei über 75-Jährigen lediglich bei 5 % lag. [1]

Ätiologische Faktoren können, neben Umweltfaktoren wie Arzneimitteln (u.a. Zytostatika, Topoisomerase-II-Hemmer), Chemikalien (u.a. Benzole, Äthylenoxyde) und ionisierenden Strahlen, auch genetische Faktoren sein. Zudem kann sich aus vorbestehenden hämatopoetischen Erkrankungen, beispielsweise einem myelodysplastischen Syndrom, eine AML entwickeln. [2]

1.3.2 Klinik und Diagnostik

Die klinische Symptomatik ist zu Beginn häufig unspezifisch und beruht vor allem auf den Folgen der Verdrängung der regulären Hämatopoese im Knochenmark: Durch eine Anämie werden unter anderem Müdigkeit, Schwäche und Bläs-

se verursacht, eine Granulozytopenie zeigt sich beispielsweise anhand bakterieller Infektionen oder systemischer Mykosen und eine Thrombozytopenie führt unter anderem zu einer erhöhten Blutungsneigung (Epistaxis, Menorrhagien, Zahnfleischbluten). Zudem können weitere Symptome, zum Teil subtypenspezifisch, auftreten:

- bei der akuten promeylozytären Leukämie ist eine vermehrte Blutungsneigung auch durch eine disseminierte intravasale Koagulation oder Hyperfibrinolyse möglich
- bei akuten myelo-monozytären Leukämien kann es durch Blasteninfiltration in der Schleimhaut zur Gingivahyperplasie kommen
- bei 2 % der AML-Erstdiagnosen tritt eine Meningeosis leucaemica durch Blasteninfiltration der Meningen auf
- leukämische Organinfiltrationen können zu Lymphknotenschwellung oder einer Hepatosplenomegalie führen

60 % der Patienten zeigen einen hyperleukozytären Verlauf, jedoch sind auch normo- oder hypoleukozytäre Verläufe möglich. Tritt eine Leukozytose mit mehr als 100.000 Leukozyten pro Mikroliter auf, besteht die Gefahr eines Leukostase-Syndroms mit Adhäsion der Leukozyten an den Gefäßwänden. Klinisch kann sich dies durch Hypoxie, Retinainfiltrationen und -einblutungen oder neurologische Symptome präsentieren. Das Leukostase-Syndrom ist ein hämatologischer Notfall und muss umgehend durch die Reduktion der peripheren Leukozytenzahl behandelt werden. [2]

Zur Diagnosestellung einer AML ist der Nachweis von mindestens 20 % Blasten im peripheren Blut oder Knochenmark notwendig. Zur Diagnostik zählen eine Anamnese und körperliche Untersuchung, ein Blutbild, die Knochenmarkszytologie, -zytochemie und -histologie, eine Immunphänotypisierung sowie zyto- und molekulargenetische Analysen. [51]

Die biologische Heterogenität der AML wird anhand verschiedener Systeme klassifiziert. Die Klassifikation der French-American-British-Group (FAB) teilt die Erkrankung anhand zytomorphologischer Charakteristika der Zellen in acht Subgruppen ein (vgl. Tabelle 1.1).

Im klinischen Alltag wird sie jedoch zunehmend von der WHO-Klassifikation abgelöst. Diese klassifiziert die AML mittels ihrer zyto- und molekulargenetischen Charakteristika und stellt somit die molekulare Pathogenese der Erkran-

Tabelle 1.1: FAB-Klassifikation der AML [53]

Typ	Beschreibung	Morphologie
M0	AML mit minimaler Differenzierung	Myeloblasten ohne Granula
M1	AML ohne Ausreifung	Myeloblasten ± Granula
M2	AML mit Ausreifung	Myeloblasten mit Granula, einzelne Myelozyten
M3	Akute Promyelozyten-Leukämie	Promyelozyten, deutlich granuliert
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie	Myeloblasten und Promyelozyten > 20 %
M5	Akute Monozyten-Leukämie	große und normale Monoblasten, Promonozyten und Monozyten, Monozytose im peripheren Blut
M6	Akute Erythroleukämie	Megaloblastäre Erythropoese > 50 %, Myeloblasten > 30 %
M7	Akute Megakaryoblasten-Leukämie	Megakaryoblasten

kung stärker dar. [51] Anhand der genetischen Charakteristika werden die Patienten laut der Empfehlung des „European Leukemia Net“ zudem in eine der drei Risikogruppen (Niedrig-, intermediäres und Hochrisiko) eingeteilt [52].

1.3.3 Therapieschema

Die Therapie der AML erfolgt adaptiert an die verschiedenen Sub-, Risiko- und Altersgruppen und wird oft im Rahmen von Therapiestudien durchgeführt. Das allgemeine Therapieschema lässt sich in eine Induktionstherapie zum Erreichen einer kompletten Remission sowie die Konsolidierungs- und Erhaltungstherapien in der Postremissionsphase gliedern. [51]

Bei Patienten unter 60 Jahren besteht die Standardinduktionstherapie aus einer siebentägigen Gabe von Cytarabin sowie einer dreitägigen Anthrazyklingabe (sogenanntes 7+3-Schema). Hiermit können Remissionsraten von circa 60-80 % erzielt werden. [52]

Die Konsolidierungstherapie wird in der Niedrigrisikogruppe standardmäßig mit mehreren Zyklen Cytarabin durchgeführt, wohingegen bei intermediärem oder hohem Risiko eine allogene Stammzelltransplantation als Postremissionstherapie angestrebt wird. Bei älteren Patienten kann je nach Gesundheitszustand eine kurativ-intendierte Therapie oder Best Supportive Care, gegebenenfalls mit einer palliativen zytoreduktiven Chemotherapie, erfolgen. [2, 51]

Eine Ausnahme bildet die akute Promyelozytenleukämie (FAB M3), welche mit All-Trans-Retinolsäure in Kombination mit Arsen trioxid oder Zytostatika therapiert wird. Hinzu gibt es diverse zielgerichtete Substanzen für die verschiedenen genetischen Defekte der Leukämiezellen. Diese werden derzeit jedoch teilweise noch in klinischen Studien erprobt und nicht als Standardtherapie empfohlen. [51]

1.3.4 Allogene Stammzelltransplantation

Die höchsten Heilungsraten der AML werden bishert nach allogener Transplantation hämatopoetischer Stammzellen erzielt. Erfolgt die Stammzelltransplantation in der ersten Remission, so liegt die Rezidivrate bei circa 20 %.[2]

Den Patienten werden dabei nach einer Konditionierung durch eine intensive Chemotherapie, sowie z.T. einer myeloablativen Ganzkörperbestrahlung des Knochenmarks, die Stammzellen eines HLA-kompatiblen Spenders intravenös infundiert. Im Empfänger kommt es somit zu einem vollständigen Ersatz der Hämatopoese durch die Spenderzellen. Die Spenderzellen können dafür aus dem peripheren Blut, dem Knochenmark oder aus Nabelschnurblut gewonnen werden, wobei ersteres Verfahren am häufigsten genutzt wird. Ist kein HLA-kompatibler Spender verfügbar, so kann auch eine Stammzelltransplantation mit einem HLA-haploidentischen familiären Spender erwogen werden [51].

Die Stammzelltransplantation kann zu verschiedenen Komplikationen führen. Neben häufigen toxischen Nebenwirkungen der Konditionierungstherapie (Übelkeit/ Erbrechen, Haarausfall, etc.) und Infektionen (Bakterien, Pilze, CMV (Cytomegalovirus), etc.) wird bei bis zu 50 % der Patienten eine GVHD (Graft-versus-Host-Erkrankung) hervorgerufen. Bei der GVHD kommt es durch die Spenderlymphozyten zu einer Schädigung der Empfängerorgane, wodurch beispielsweise Exantheme, Enteritiden und Hepatitiden entstehen können. [2]

1.3.4.1 Graft-versus-Leukämie-Reaktion

Während eine Vermeidung der GVHD angestrebt wird, soll hingegen eine maximale Wirkung des GvL (Graft-versus-Leukämie)-Effekts erzielt werden. Der GvL-Effekt beschreibt dabei die Wirkung des allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantats gegen die Leukämie: Spender-T-Zellen erkennen die Leukämiezellen als fremd und führen zu deren Zerstörung. [7, 8]

Die Fremderkennung basiert unter anderem auf der Erkennung von mHAg (Nebenhistokompatibilitätsantigenen) auf den Leukämiezellen im Empfänger. mHAg sind Peptide, welche auf nicht-identischen Gen-Loci codiert und somit bei Spender und Empfänger unterschiedlich sind [54, 55]. Eine Ausnahme wurde für identische Transplantate von Zwillingen beschrieben, hier konnte kein GvL-Effekt beobachtet werden [56]. Als Effektorzellen werden sowohl den CD8⁺ als auch den CD4⁺ T-Zellen eine Bedeutung für die GvL-Reaktion zugeschrieben [54, 57]. Voraussetzung ist jedoch das Vorliegen eines Spenderchimärismus im Empfänger [56].

Klinisch hat der GvL-Effekt in der Behandlung der AML eine enorme Bedeutung und bildet die Basis für ihre zelluläre Immuntherapie [58].

1.3.4.2 CMV-Reaktivierung nach allogener Stammzelltransplantation

Das humane CMV, auch als Humaner Herpesvirus 6 bekannt, ist ein DNA-Virus und gehört zur β -Herpesvirusfamilie. Das CMV ist ubiquitär vorhanden und zeigt weltweit variable Durchseuchungsraten von 45 bis 100 %, abhängig von Alter sowie geographischem, ethnischem und sozioökonomischem Hintergrund [59]. Die Übertragung erfolgt diaplazentar, über Schmier- und Tröpfcheninfektion, Bluttransfusionen und Organtransplantationen, Muttermilch oder sexuell [2].

Nach Erstinfektion persistiert das CMV lebenslang im Organismus, unter anderem in hämatopoetischen Zellen und Monozyten, und kann somit reaktiviert werden [60].

Bei Immunkompetenten zeigt sich bei Infektion meist ein symptomloser Verlauf, dabei wird jedoch die Bildung von CMV-spezifischen CD8⁺ Effektor- und Gedächtnis-T-Zellpopulationen induziert [61]. Bis zu 30 % aller CD8⁺ T-Zellen in gesunden Erwachsenen zeigen eine Reaktion auf CMV [62].

Dem entgegengesetzt wird bei immunsupprimierten Patienten oft eine schwere Symptomatik hervorgerufen. Als Beispiele sind hier die CMV-Kolitis,- Hepatitis, -Retinitis und interstitielle Pneumonie zu nennen. [60]

Die CMV-Reaktivierung ist eine häufige Komplikation der Immunsuppression nach allogener Stammzelltransplantation und kann zu lebensbedrohlichen Symptomen führen. Paradoxerweise wurden jedoch auch vorteilhafte Effekte einer CMV-Reaktivierung nach Stammzelltransplantation bei AML-Patienten beobachtet: Bereits 1986 beschrieben Lönnqvist et al. [63] ein reduziertes Leukämierisikodivrisiko bei Stammzellempfängern mit CMV-Infektion, zahlreiche nachfolgen-

de Studien bestätigten diesen Effekt [64]. In einer groß angelegten Studie von Elmaagacli et al. [65] 2011 wurde ein mehr als vierfach reduziertes Langzeit-Leukämie rezidivrisiko bei früher CMV-Replikation nach Stammzelltransplantation beschrieben.

Nachbaur et al. [66] wiesen eine erhöhte Überlebensrate nur für HLA*02-positive Patienten mit CMV-seropositiven Stammzellspendern nach. Die CMV-Seropositivität der Spender sei mit einer chronischen GVHD im HLA-A*02-positiven Empfänger assoziiert und führe zu einer geringeren Leukämie rezidivrate.

Für den antileukämischen Effekt der CMV-Reaktivierung nach allogener Stammzelltransplantation werden verschiedene Mechanismen postuliert. Zum Einen könne die CMV-Infektion direkte zytotoxische Effekte gegen Leukämiezellen haben [65]. Zum Anderen sei eine Erhöhung der leukämischen Immunogenität durch die Virusreaktion denkbar [67], beispielsweise über eine erhöhte Expression von mHAgS oder leukämie-assoziierten Antigenen, welche zu einer verstärkten Vulnerabilität gegenüber den zytotoxischen Spender-T-Zellen führe [65]. Des Weiteren käme eine Stimulation von T-Zell- und NK-Zell-Immunantworten durch die CMV-Reaktivierung in Betracht [67, 68]. Sowohl Elmaagacli et al. [65] als auch Nachbaur et al. [66] stellen die Hypothese einer Kreuzreaktivität CMV-spezifischer zytotoxischer T-Zellen mit HLA-A*02-beschränkten mHAgS oder leukämie-assoziierten Antigenen auf, welche einen GvL-Effekt bewirke.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Mit einem Anteil von 80 % an den akuten Leukämien im Erwachsenenalter [2] sowie einer durchschnittlichen Fünfjahresüberlebensrate von 20-30 % [1] ist die AML eine hämatologische Erkrankung mit großer Bedeutung für die Gesellschaft. Die eingeschränkte Prognose kann durch den bisherigen Mangel an durchschlagenden Therapiemöglichkeiten erklärt werden.

Viele Forschungsergebnisse und die Erfolge der allogenen Stammzelltransplantationen und GvL-Reaktionen belegen jedoch das enorme immunogene Potenzial der AML-Zellen, welches zur Therapie der Erkrankung genutzt werden kann. Trotz vieler bekannter Tumorantigene, häufig durch *in-silico*-Methoden vorhergesagt, konnte bisher keine wirkungsvolle Immuntherapie der AML etabliert werden.

In der vorliegenden Arbeit sollen in primären Patientenmaterialien und Zelllinien die über MHC-Klasse-I-präsentierten Peptide isoliert und analysiert werden. Die Kartierung dieser *in-vivo* vorkommenden MHC-Peptidome soll zur Identifikation tumorspezifischer Peptide als potenzielle Targets für immuntherapeutische Anwendungen bei AML-Patienten führen.

Dabei sollen auch die kryptischen Peptide speziell berücksichtigt werden: der Fakt, dass viele Transkripte vermeintlich nicht-codierender Genregionen ausschließlich in Tumorzellen exprimiert werden [69, 70], stellt die kryptischen Peptide als potenziell reichhaltige Quelle tumorspezifischer Antigene dar.

Die Ergebnisse zahlreicher Studien zeigen einen positiven Effekt einer CMV-Reaktivierung nach allogener Stammzelltransplantation auf das Rezidivrisiko der AML [63–66]. Der zugrundeliegende Mechanismus konnte hier jedoch noch nicht geklärt werden. Zur Überprüfung der Hypothese einer Kreuzreaktivität CMV-spezifischer T-Lymphozyten mit AML-Blasten sollen die identifizierten AML-Peptidome auf mögliche kreuzreaktive Peptide untersucht werden. Zur Entwicklung einer effizienten Immuntherapie der AML wären diese Peptide ebenfalls von besonderem Interesse.

Die Peptidpräsentation der Tumorzellen ist abhängig von der Expression der MHC-Moleküle und legt die Grundlage für den Erfolg einer antigenspezifischen Immuntherapie. Anhand einer Quantifizierung der MHC-Klasse-I-Moleküle soll die Eignung der AML-Blasten für einen solchen Therapieansatz überprüft werden.

2.1 Ethikvotum

Für die durchgeführten Untersuchungen an humanen Biomaterialien mit Patienten-/Probandenbezug (und zugehörigen personen-beziehbaren Daten) liegt ein Ethikvotum vor. Die zugehörigen Aktenzeichen der Ethikkommission sind AZ-85/13 sowie AZ-17/19.

2.2 Material

2.2.1 Geräte und Gebrauchsmaterialien

Geräte und Gebrauchsmaterialien	Firma
Brutschrank Thermo BBD 6220	Thermo Fisher Scientific, USA
CytoFLEX-Durchflusszytometer	Beckman Coulter, Krefeld
FACS-Röhrchen 5 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Gefrierschrank -80 °C Forma	Thermo Fisher Scientific, USA
Gefriertrockner Alpha 1-2 LD plus	Christ, Osterode am Harz
Kryoröhrchen Cryo.s	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Kühl- und Gefrierschrank Premium	Liebherr, Schweiz
Kühlraum	Universitätsklinikum Würzburg
Lichtmikroskop DM 1000	Leica, Wetzlar
Luer-Lock-Adaptoren male/female BioRad	BioRad, USA
Mikroliterspritzen 700 Series 50 µl, 500 µl	Hamilton, Schweiz
Mini Chiller 300 (Baker)	Diagenode, Belgien

Minirotator Bio RS-24 (BioSan)	Hartenstein, Würzburg
Nadeln Microlance 3	Becton Dickinson, Heidelberg
Neubauer-Zählkammer	Hartenstein, Würzburg
Pasteurpipetten steril 3ml	Biosigma, Italien
Perfusorspritze Injectomat 50 ml	Fresenius
Pipettensatz Discovery Comfort 1-1000µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen Biosphere FilterTips	Sarstedt, Nürnbrecht
Pipettenspitzen Low-binding DeckWorks	Corning [®] , USA
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra BioSciences, Biebertal
Protein LoBind Tubes 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Pumpenschlauch	Ismatec [®] Cole Parmer, Wertheim
Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nürnbrecht
Schlauchkassetten MS/CA Click'n'go	Ismatec [®] Cole Parmer, Wertheim
Schlauchpumpe Reglo digital	Ismatec [®] Cole Parmer, Wertheim
Schüttler DOS-20S	NeoLab, Heidelberg
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Silikonsschlauch Masterflex 2,06 mm	Cole Parmer, Wertheim
Spritzen Discardit 10 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilbank HERAsafe KS 12, KS 18	Thermo Fisher Scientific, USA
Sterilfilter 0,2 µm	Sarstedt, Nürnbrecht
Stickstoff-Gefrierbehälter Typ K10	Taylor Wharton, Husum
Ultraschallbad Elmasonic S 30 H	Elma, Singen
Ultraschallgerät Bioruptor [®] Plus	Diagenode, Belgien
Vortexer Reax control	Heidolph Instruments, Schwabach
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zellkulturflaschen 25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3-S-R	Thermo Fisher Scientific, USA
Zentrifuge Mikro 200-R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Zentrifuge Rotanta 46 RC	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Zentrifugenfiltereinheit Amicon Ultra 0,5 ml	Merck, Darmstadt
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen
ZipTip mit 0,6 µl-C ₁₈ -Harz	Merck, Darmstadt

2.2.2 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien u. Reagenzien

Acetonitril

Bezugsquelle

Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim

Aqua ad iniectabilia	Deltamedica, Reutlingen
BD FACS™ Lysing Solution	Becton Dickinson, Heidelberg
BD FACS™ Permeabilizing Solution 2	Becton Dickinson, Heidelberg
BD Pharm Lyse™	Becton Dickinson, Heidelberg
Biocoll	Merck, Darmstadt
CHAPS (AppliChem)	Hartenstein, Würzburg
CNBr-activated Sepharose	GE Healthcare, Freiburg
CytoFlex Sheath Fluid	Beckman Coulter, Krefeld
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline 1x	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
fetales Kälberserum	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Flow Clean Cleaning Agent	Beckman Coulter, Krefeld
Gentamycin 50 mg/ml	Gibco, Darmstadt
Glycin (AppliChem)	Hartenstein, Würzburg
Natriumchlorid (AppliChem)	Hartenstein, Würzburg
Natriumhydrogencarbonat (AppliChem)	Hartenstein, Würzburg
Natronlauge 0,5 N	Carl Roth, Karlsruhe
Polymorphprep	Alere Technologies AS, Norwegen
Proteaseinhibitortabletten cOplete	Roche, Mannheim
RPMI 1640 Glutamax	Gibco, Darmstadt
Salzsäure 1 N	Carl Roth, Karlsruhe
Trifluoressigsäure	Thermo Fisher Scientific, USA
Trypanblau 0,4 %	Gibco, Darmstadt
Viability Staining Solution 7-AAD	Thermo Fisher Scientific, USA
Wasser LC-MS Grade	Merck, Darmstadt

2.2.3 Kits

<u>QiFiKit® K0078</u>	Dako, Dänemark
- Set-Up Beads 1 ml	
- Calibration Beads 1 ml	
- FITC Konjugat 0,2 ml (F(ab') ₂ -Fragment von Ziegen-anti-Maus-Ig)	

2.2.4 Lösungen

Zum Ansetzen der Lösungen wurde jeweils Wasser LC-MS Grade verwendet.

A _{load} -Lösung	<u>TFA 0,05 %/ ACN 1 %</u> 0,025 ml TFA 0,5 ml ACN 49,475 ml H ₂ O
AB _E -Lösung	<u>TFA 0,2 %/ ACN 32,5 %</u> 0,1 ml TFA 16,25 ml ACN 33,65 ml H ₂ O
A-Lösung	<u>TFA 0,1 %</u> 0,05 ml TFA ad 50 ml H ₂ O
Bindungspuffer	<u>NaCl 0,5 M/ NaHCO₃ 0,1 M; pH 8,3</u> 14,61 g NaCl/ 0,5 l H ₂ O) 4,2 g NaHCO ₃ / 0,5 l H ₂ O) pH 8,3 mit circa 40 Tropfen NaOH 2 N eingestellt autoklaviert
Einfriermedium	RPMI 1640 Glutamax/ 50 % FCS/ 10 % DMSO
Glycin 0,2 M	3,75 g Glycin 0,25 l H ₂ O steril filtriert
HCl 1mM	0,5 ml HCl 1 N ad 500 ml H ₂ O
Lysispuffer (2x)	0,4 g CHAPS 1 Proteaseinhibitortablette 33 ml D-PBS
NaOH 0,1 N	10 ml NaOH 0,5 N ad 50 ml H ₂ O
TFA 0,2 %/ 10 %	TFA 1:500/ 1:10 mit H ₂ O verdünnt
Trypanblau 0,04 %	Trypanblau 0,4 % 1:10 mit D-PBS verdünnt
Waschpuffer	1% FCS/ D-PBS

2.2.5 Monoklonale Antikörper

2.2.5.1 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antigen	Konjugat	Isotyp	Klon	Hersteller
IgG _{1κ}	FITC	Maus IgG _{1κ}	X40	Becton Dickinson, Heidelberg
IgG _{1κ}	PerCP	Maus IgG _{1κ}	X40	Becton Dickinson, Heidelberg
IgG _{1κ}	APC	Maus IgG _{1κ}	X40	Becton Dickinson, Heidelberg
CD3	FITC	Maus IgG _{1κ}	SK7	Becton Dickinson, Heidelberg
CD8	APC	Maus IgG _{1κ}	SK1	Becton Dickinson, Heidelberg
CD14	PerCP	Maus IgG _{1κ}	MΦP9	Becton Dickinson, Heidelberg

2.2.5.2 Antikörper für die Immunpräzipitation

Antigen	Klon	Hersteller
pan-MHC-Klasse-I	W6/32// W17-118	Herr Prof. Dr. S. Stevanović Interfakultäres Institut für Zell- biologie, Universität Tübingen
pan-MHC-Klasse-I anti-HLA-A*02	W6/32 BB7.2	BioLegend, USA

2.2.6 Zellmaterial

2.2.6.1 Humane Zelllinien und Zellkulturmedien

Zelllinie DG-75	Burkitt-Lymphom (männlich, 10 Jahre) HLA A*02:01; 66:01 B*41:01; 50:01 C*06:02; 17:01 DSMZ (ACC-83)
Zelllinie ML-2	Akute myelomonozytäre Leukämie (männlich, 26 Jahre) HLA A*02:01; 02:01 B*44:02; 51:01 C*05:01; 14:02 DMSZ (ACC-15)
Zelllinie THP-1	Akute monozytäre Leukämie (männlich, 1 Jahr) HLA A*02:01; 24:02 B*15:11; 35:01 C*03:03; 03:03 DMSZ (ACC-16)

Die Zelllinie DG-75 wurde in RPMI 1640 L-Glutamax / 10 % FCS/ Gentamycin 50 µg/ml kultiviert. Die Kultivierung der Zelllinien ML-2 und THP-1 erfolgte in

RPMI 1640 L-Glutamax / 20 % FCS/ Gentamycin 50 µg/ml.

2.2.6.2 Patientenmaterial

In dem Zeitraum vom 14.03.2018 bis zum 15.01.2019 wurde in der Medizinischen Klinik II der Universitätsklinik Würzburg natives Probenmaterial in Form von EDTA-Blut, EDTA-Knochenmark oder Leukapheresen von Patienten bei Aufnahme mit der Verdachtsdiagnose AML gesammelt. Vor Probenentnahme erfolgte eine Aufklärung der Patienten von ärztlicher Seite, zudem wurde die Einwilligung schriftlich festgehalten. Insgesamt wurde bei 16 Patienten Material entnommen und zum Einfrieren aufgearbeitet (Abschnitt 2.3.2). Einschlusskriterien für die weitere Verwendung des Probenmaterials waren eine Bestätigung der Verdachtsdiagnose der AML sowie ein Blastenanteil von mindestens 80 % im Nativmaterial. Neun Patientenproben entsprachen diesen Kriterien und wurden für die weiteren Versuche verwendet, eine Übersicht dieser Patienten ist in Tabelle 2.1 dargestellt. Die HLA-Befunde dieser neun Patienten wurden von dem Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie des Universitätsklinikums Würzburgs bezogen.

Tabelle 2.1: Patientenmaterial

Nr.	HLA	Material
P1	A*01:01; 03:01 B*18:01; 40:02	18 ml EDTA-Blut, 20 ml EDTA-KM
P2	A*02:01; 03:01 B*27:05; 40:01	18ml EDTA-Blut
P3	A*02:01; 02:01 B*18:01; 40:01	Leukapherese
P4	A*01:01; 31:01 B*44:02; 51:01	27 ml EDTA-KM
P5	A*03:01; 11:01 B*35:01; 40:01 C*03:04; 04:01	18 ml EDTA-KM
P6	A*02:01; 03:01 B*07:02; 35:01 C*04:01; 07:02	19,5 ml EDTA-KM
P7	A*01:01; 03:01 B*08:01; 44:27 C*07:01; 07:04	18 ml EDTA-KM
P8	A*23:01; 24:03 B*07:02; 44:03 C*04:01; 07:02	24,5 ml EDTA-Blut
P9	A*24:02; 33:03 B*35:01; 52:01 C*04:01; 12:02	Leukapherese

2.2.6.3 Spendermaterial für Kontrollgruppe

Als Kontrollgruppe wurde acht gesunden Spendern venös für die Granulozytenisolation Blut in EDTA-Röhrchen entnommen (Tabelle 2.2).

Zum Einen stellten sich hierfür sechs freiwilligen gesunden Spendern zur Verfügung. Fünf dieser Spender (K1, K3, K4, K5, K6) bezogen zusätzlich ihre HLA-

Befunde über die DKMS (Deutsche Knochenmarkspenderdatei) und gaben diese für die Auswertung frei. K2 wurde von dem Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie des Universitätsklinikums Würzburgs HLA-typisiert.

Zum Anderen konnte den Patienten P3 (Kontrolle K8) und P4 (Kontrolle K7) nach Therapie der AML im Zustand der Remission für die Granulozytenisolation Blut entnommen werden. Die zugehörigen HLA-Daten sind bereits zuvor bezogen wurden.

Tabelle 2.2: Spendermaterial für Kontrollgruppe

Nr.	HLA
K1	A*03:ABWAJ; 32:ABWBP B*07:ADYXV; 44:ABZPJ C*07:XX; 08:ABXAT
K2	A*02:01; 32:01 B*40:02; 51:01 C*02:02; 14:02
K3	A*02:AMAUU; 02:ANUUM B*40:01:01G; 53:01:01G C*03:04:01G; 04:01:01G
K4	A*23:ENWE; 30:04:01 B*07:KMHM; 51:08 C*12:GJEF; 16:BNR
K5	A*03:01:01G; 03:01:01G B*07:02:01G; 07:02:01G C*07:02:01G; 07:02:01G
K6	A*02:05:01G; 68:02:01G B*50:01:01; 51:01:01G C*03:03:01G; 06:02:01G
K7	A*01:01; 31:01 B*44:02; 51:01
K8	A*02:01; 02:01 B*18:01; 40:01

2.3 Methoden

2.3.1 Kultivierung humaner Zelllinien: DG-75, ML-2 und THP-1

Von den Zelllinien wurden circa 5×10^6 Zellen aufgetaut (Abschnitt 2.3.5.3) und in 5 ml Zellkulturmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in eine 25 cm² Zellkulturflasche überführt und bei 37 °C und 5% CO₂ gelagert. Alle 3 bis 4 Tage erfolgte eine Zellzählung und anschließende Zellteilung. Die Zelllinie DG-75 wurde mit einer Zelldichte von circa 5×10^5 /ml kultiviert, ML-2 mit 8×10^5 /ml und THP-1 mit 4×10^5 /ml. Bei ausreichendem Volumen wurde die Zellsuspension in die nächstgrößere Zellkulturflasche überführt.

Sofern die Zellkulturen eine ausreichende Zellzahl erreichten, wurden die Zellsuspension in 50 ml Falconröhrchen überführt, 10 min bei 1500 rpm und 4 °C zentrifugiert und die Pellets in D-PBS zum poolen und zählen aufgenommen (vgl.

Abschnitt 2.3.4). Anschließend wurden sie als Pellets à $1,5 \times 10^8$ Zellen weggefroren (vgl. Abschnitt 2.3.5.1).

2.3.2 Isolation der PBMCs und BMMCs

Es wurden entweder die PBMCs (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) aus EDTA (Ethylendiamintetraacetat)-Blut oder die BMMCs (mononukleäre Zellen des Knochenmarks) aus EDTA-Knochenmark isoliert. Hierzu wurden die Abnehmeröhrchen in einem extra Röhrchen gepoolt und mit D-PBS ad 40 ml aufgefüllt. Je 20 ml der Zellsuspension wurden langsam auf je 15 ml vorgelegte Bioncoll Dichtegradientlösung (1,077 g/ml) gegeben und 20 min bei 2000 rpm ohne Bremse bei Raumtemperatur zentrifugiert. In der Trennlösung bildete sich eine Interphase mit den mononukleären Zellen, welche nach Abpipettieren der oberen Schicht mit einer Pipette gesammelt wurde. Anschließend wurden die Zellen noch zweimal mit D-PBS gewaschen und dabei je 10 min bei 1500 rpm und 4 °C zentrifugiert.

2.3.3 Isolation der Granulozyten

Die Granulozytenisolation wurde mit frisch abgenommenem EDTA-Blut und Polymorphprep-Dichtegradientlösung durchgeführt. Vom gepoolten Blut wurden circa 7 ml mit einer 10 ml Spritze mit 0,8 mm Kanüle auf je 5 ml vorgelegte Dichtegradientlösung geschichtet und 35 min mit 2200 rpm ohne Bremse bei Raumtemperatur zentrifugiert. Dabei aggregieren Polysaccharide der Dichtegradientlösung mit den Erythrozyten, sodass diese zügiger nach unten sinken. Während der Sedimentation kommt es durch eine Differenz der Osmolalität zwischen den Erythrozyten und der Lösung zur Diffusion von Wasser aus den Erythrozyten. Die osmotische Differenz verringert sich somit im zeitlichen Verlauf, während die Erythrozyten weiter absinken. In den tieferen Schichten kommt es aus diesem Grund zu einer geringeren Diffusion, sodass die Dichte der Lösung Richtung Boden zunimmt. Die Bestandteile des Blutes trennen sich entsprechend ihrer Dichte in dem Dichtegradienten auf (vgl. Abbildung 2.1).

Mit einer Pasteurpipette wurden zuerst das Serum sowie die obere Schicht mit den mononukleären Zellen abgenommen und anschließend die untere Schicht mit den polymorphkernigen Leukozyten gesammelt. Die Zellsuspension wurde mit einer 1:1-Lösung von D-PBS und destilliertem Wasser sowie nur mit D-PBS

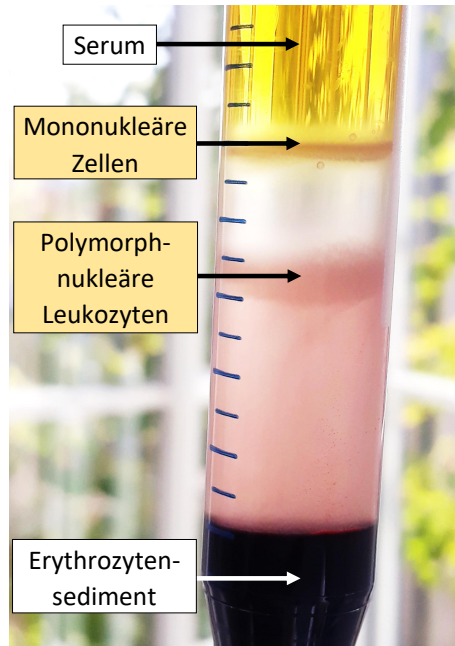


Abbildung 2.1: Separation der mononukleären Zellen und polymorphnukleären Leukozyten mit der Polymorphprep-Dichtegradientlösung, eigene Darstellung

gewaschen, bevor eine Erylyse mit 2-6 ml einfachkonzentrierter BD Pharmlyse für 3 min bei Raumtemperatur im Dunkeln durchgeführt wurde. Es folgen zwei weitere Waschschrte mit D-PBS, dann konnten die Granulozyten gezählt und eingefroren sowie die Reinheit am Durchflusszytometer bestimmt werden.

2.3.4 Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer

Ein kleiner Teil der Zellsuspension wird zur Bestimmung der Gesamtzellzahl mit einer von der Zelldichte abhängigen Menge Trypanblau verdünnt und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Unter dem Mikroskop werden nur die lebenden Leukozyten gezählt. Die Zellviabilität kann mit Hilfe des Farbstoffes Trypanblau beurteilt werden, welcher aufgrund der Membranpermeabilität nur abgestorbene und perforierte Zellen blau färbt. In der Zählkammer werden die großen Eckquadranten, welche in je 16 kleine Quadrate unterteilt sind, einzeln ausgezählt und die Gesamtzellzahl mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \frac{\text{gezählte lebende Leukozyten}}{\text{Anzahl Eckquadranten}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \\ \times \text{Volumen der Zellsuspension} \times \text{Kammerfaktor}(10^4)$$

2.3.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen

2.3.5.1 Wegfrieren als Pellet

Ein großer Teil der isolierten Zellen wurde als Pellet weggefroren. Hierzu wurde die Zellsuspension auf $1-3 \times 10^8$ Zellen pro Röhrchen aufgeteilt, mit D-PBS ad 10 ml aufgefüllt und 10 min bei 1500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgekippt und das Pellet bei -80 °C eingefroren.

2.3.5.2 Kryokonservierung

Zusätzlich wurden kleinere Zellmengen kryokonserviert, dass heißt die Vitalität der Zellen wurde während der Lagerung im flüssigen Stickstoff aufrechterhalten. Zunächst erfolgte hierfür die Zentrifugation der Zellsuspension wie für die Pellets und anschließend eine Resuspension des Pellets in vorgekühltem RPMI 1640 mit 50 % FCS und 10 % DMSO. Die Zellsuspension wurde auf mehrere Cryoröhrchen mit 1,5 ml und $1-4 \times 10^7$ Zellen pro Röhrchen verteilt. Die Cryoröhrchen wurden zunächst für bei -80 °C in einer Styroporbox eingefroren und dann in den flüssigen Stickstoff überführt.

2.3.5.3 Auftauen kryopräservierter Zellen

In Kryoröhrchen eingefrorene Zellen wurden zunächst bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und anschließend in 10 ml warmes Zellkulturmedium überführt, welches in einem 50 ml Falconröhrchen vorgelegt wurde. Es wurde 5 min bei 1500 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand abgekippt und das Zellpellet in 5 ml Zellkulturmedium zur Zellzählung (Abschnitt 2.3.4) aufgenommen.

2.3.6 Durchflusszytometrische Verfahren

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur quantitativen Analyse von Zellen. Dabei werden die Zellen im Durchflusszytometer in einem Flüssigkeitsstrom einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Das Laserlicht wird abhängig von der Zellgröße (Vorwärtsstreuung) und ihrer Granularität (Seitwärtsstreuung) verschieden gestreut und die Streuung detektiert. Durch eine zusätzliche Färbung mit fluoreszenz-aktivierten Antikörpern gegen Oberflächenantigene der

Zelle können durch Messung der Fluoreszenzintensität Informationen ihre Expression in den vermessenen Zellen erfasst werden. [71]

Die durchgeführten Messungen erfolgten am CytoFLEX Durchflusszytometer (Beckman Coulter) und dem CytExpert-Programm, die anschließende Auswertung erfolgte mit der Beckman Coulter Kaluza Analysis-Software.

2.3.6.1 Bestimmung der Granulozytenreinheit

Zur Bestimmung der Reinheit der Granulozytenisolation wurden je circa 5×10^5 Zellen vom Vollblut, von der Granulozytenaufarbeitung, den während der Granulozytenisolation abgenommenen mononukleären Zellen sowie einer Isotypenkontrolle in einem FACS-Röhrchen mit je 1 ml D-PBS mit 1 % FCS für 5 min bei 1500 rpm und 4°C gewaschen. Die Färbung erfolgte mit 5 µl CD3 FITC, 5 µl CD14 PerCP und 1 µl CD8 APC sowie entsprechenden Mengen der Isotypkontrollen für 20 min bei 4°C im Dunkeln. Bei dem Vollblut musste im Anschluss noch eine Erylyse (mit 2 ml 1:10 verdünnter Lysepuffer für 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln) durchgeführt werden. Es folgten zwei weitere Waschschrte wie zuvor, bevor die Proben in etwa 300 µl D-PBS mit 1 % FCS zum Messen suspendiert wurden. Die Messungen erfolgten bei einer Einstellung vom FSC/SSC = 82/52.

2.3.6.2 Quantifizierung der MHC-Klasse-I-Moleküle

Durch einen quantitativen indirekten Immunfluoreszenz-Assay mit Hilfe des QiFiKit's® (Dako Nr. K0078) können Oberflächen- und intrazelluläre Moleküle von Zellen quantifiziert werden. In dieser Arbeit erfolgte die Quantifizierung der gesamten MHC-Klasse-I- sowie spezifisch der HLA-A*02-Moleküle der verwendeten Proben. Das Prinzip beruht auf der Inkubation mit einem murinen Primärantikörper und anschließender Färbung mit einem fluoreszierenden Anti-Maus-Sekundärantikörper (vgl. Abbildung 2.2)

Hierzu wurden pro Probe 1×10^6 Zellen zweimal mit D-PBS mit 1 % FCS gewaschen und anschließend mit je 1 µg murinem Antikörper gegen das Zielantigen als Primärantikörper in Sättigungskonzentration für 30 min bei 4 °C gefärbt. Separat erfolgte eine Färbung entsprechender Zellmengen mit einem irrelevanten monoklonalen murinem Antikörper zur Isotypenkontrolle. Nach zwei weiteren Waschschrten wurden sowohl alle zu vermessenden Proben, als auch die ebenfalls gewaschenen Konfigurations- und Kalibrierungsbeads mit einem FITC-kon-

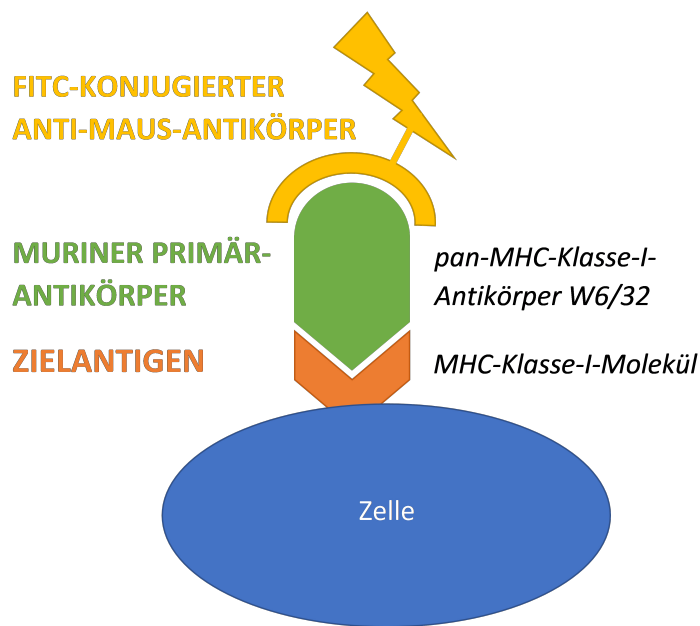


Abbildung 2.2: Schema der Funktionsweise des QiFiKits® am Beispiel der MHC-Klasse-I-Quantifizierung mit dem pan-MHC-Antikörper W6/32, eigene Darstellung

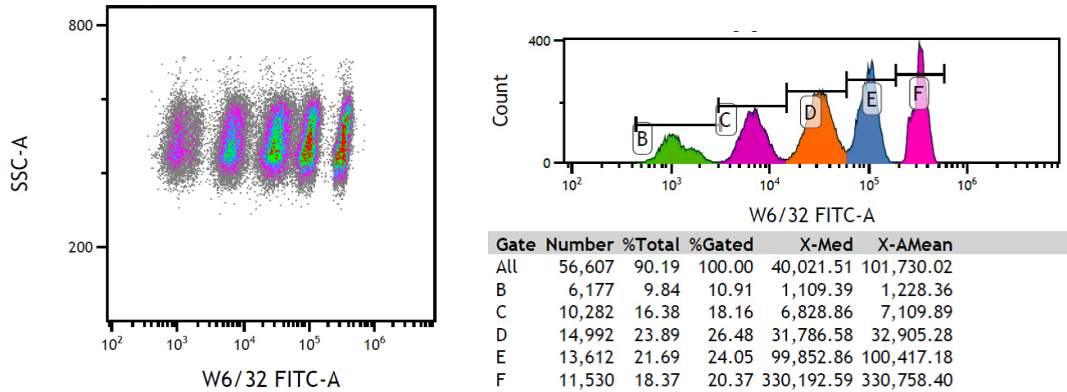
jugierten Anti-Maus-Sekundärantikörper für 45 min bei 4 °C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Ansätze in 2 ml D-PBS mit 1 %FCS aufgenommen und gleichmäßig auf je zwei Röhrchen verteilt. Es folgte eine erneute Zentrifugation mit anschließendem Abkippen des Überstands.

Je ein Ansatz jeder Probe wurde in 400 µl Waschpuffer zur Messung der Anzahl der extrazellulären MHC-Klasse-I-Moleküle suspendiert und vermessen.

Mit der anderen Hälfte der Ansätze erfolgte eine Messung der Gesamtheit der intra- und extrazellulären MHC-Klasse-I-Moleküle. Hierzu wurden die Ansätze zunächst durch Zugabe von je 250 µl 1X BD FACS Permeabilizing Solution 2 und Inkubation im Dunkeln für 12 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Im Anschluss folgten zwei Waschschriffe wie zuvor, sowie eine Wiederholung aller Schritte ab der Inkubation mit je 1 µg murinem Antikörper gegen das Zielantigen bis zur Suspension der Zellen in 400 µl Waschpuffer zur Messung am Durchflusszytometer.

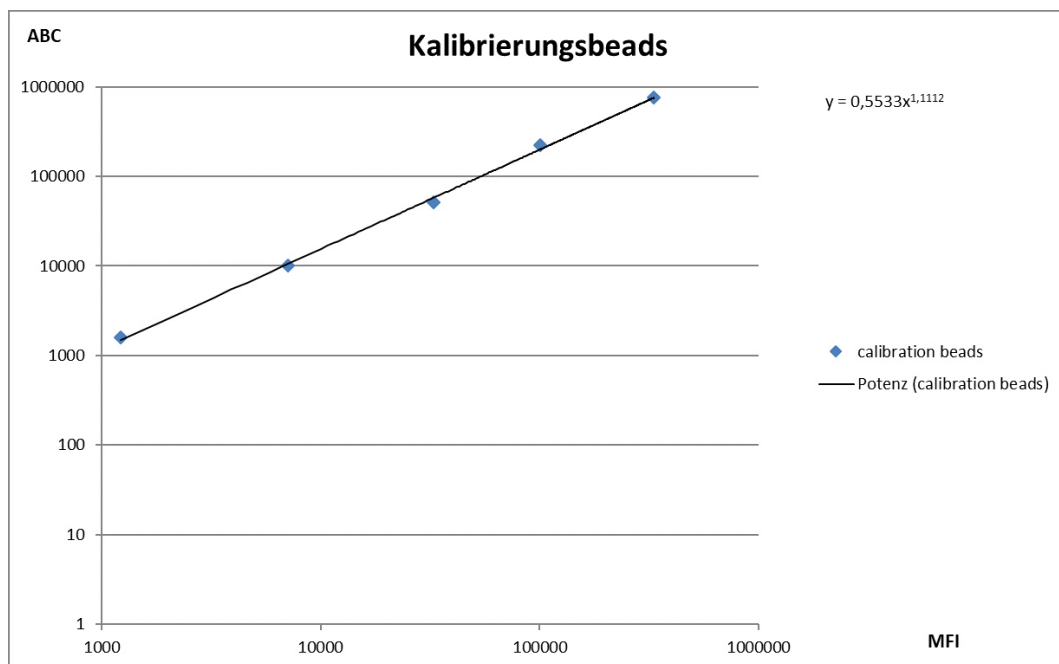
Bei der Auswertung wurde anhand der gemessenen Fluoreszenzintensität (vgl. Abbildung 2.3b) der Kalibrierungsbeads und deren definierter Beladung mit monoklonalen Antikörpern eine Kalibrierungskurve (vgl. Abbildung 2.3c) erstellt. Mittels dieser konnten mit den Fluoreszenzintensitäten der vermessenen Proben die Antigendichten berechnet werden .

Die Bestimmung der absoluten Menge an intrazellulären MHC-Klasse-I-Molekülen erfolgte durch Substraktion der extrazellulären Moleküle von der Gesamtheit der intra- und extrazellulären Moleküle.



(a) Durchflusszytometrie der Kalibrierungsbeads

(b) Histogramm der Kalibrierungsbeads



(c) Kalibrierungskurve mit MFI (Mean Fluorescence Intensity) versus ABC (Antibody-Binding-Capacity)

Abbildung 2.3: Auswertung der QiFiKit[®] Kalibrierungsbeads

2.3.7 Identifikation von MHC-präsentierten Peptiden

Die Isolation und Identifikation der MHC-präsentierten Peptide erfolgte in Anlehnung an das von Kowalewski und Stevanović publizierte Protokoll "Biochemical large scale identification of MHC class I ligands": Zuerst wurden mittels

Immunoaffinitäts-Chromatographie der Zellysate die Peptide über ihre MHC-Moleküle an die Sepharose-Antikörper-Matrix gebunden. Im Anschluss erfolgte die Elution der MHC-Peptid-Komplexe und eine Ultrafiltration des Eluats, bei welcher die MHC-Moleküle von den Peptiden getrennt und zurückgehalten wurden. Das Filtrat mit den Peptiden wurde gefriergetrocknet und über C18-Pipettenspitzen entsalzen. Zuletzt erfolgte eine weitere Gefrier Trocknung und anschließende massenspektrometrische Analyse (vgl. Abbildung 2.4). [72]

2.3.7.1 Herstellung der Sepharose-Antikörper-Matrix

Die Sepharose-Antikörper-Matrix der Affinitätschromatographie bestand aus CNBr (cyanogen bromid-aktiviert)-Sepharose sowie an sie gekoppelte Antikörper, hier wurden der pan-MHC-Klasse I Antikörper W6/32 sowie der HLA-A*02-spezifische Antikörper BB7.2 verwendet.

Zunächst wurden zur Aktivierung der abgewogenen CNBr-Sepharose 45 ml 1 mM HCL (Salzsäure, Chlorwasserstoffsäure) zugegeben, das Röhrchen fünf Mal invertiert und 30 min über Kopf rotiert. Nach einer Zentrifugation bei 300 rpm für 4 min ohne Bremse mit Abkippen des Überstandes folgte die Zugabe von Antikörperlösung und Bindungspuffer und erneutes fünfmaliges Invertieren und 120 min Rotation über Kopf zur Kopplung der Antikörper an die Sepharose. Zentrifugation und Abkippen des Überstandes wie zuvor, Zugabe von 45 ml 0,2 M Glycin und erneutes Invertieren und 60 min Rotation zum Blockieren der Bindung. Zuletzt wurde wie zuvor zentrifugiert und der Überstand abegekippt, die Sepharose zwei Mal mit je 45 ml D-PBS gewaschen und schließlich mit D-PBS auf eine Endkonzentration von 1 mg Antikörper/ 40 mg Sepharose/ 1 ml D-PBS aufgefüllt.

Es wurden jeweils 10 ml der Matrix vorbereitet und diese bei 4 °C gelagert.

2.3.7.2 Vorbereitung der Affinitätschromatographiesäulen

Die Econo-Column® Chromatographiesäulen wurden zunächst mit je 1 ml D-PBS gespült und anschließend mit 1 mg des Antikörpers, das heißt 1 ml der Antikörper-Sepharose-Matrix, unter sterilen Bedingungen befüllt. Nach einer Sedimentationszeit von etwa 60 min bei 4 °C wurden die Säulen sowie das mit D-PBS gefüllte Schlauchsystem im Kühlraum zuerst 15 min mit D-PBS, dann 10 min mit Lysispuffer in den Abfall gespült. Im Anschluss wurden 8 ml Lysispuffer je

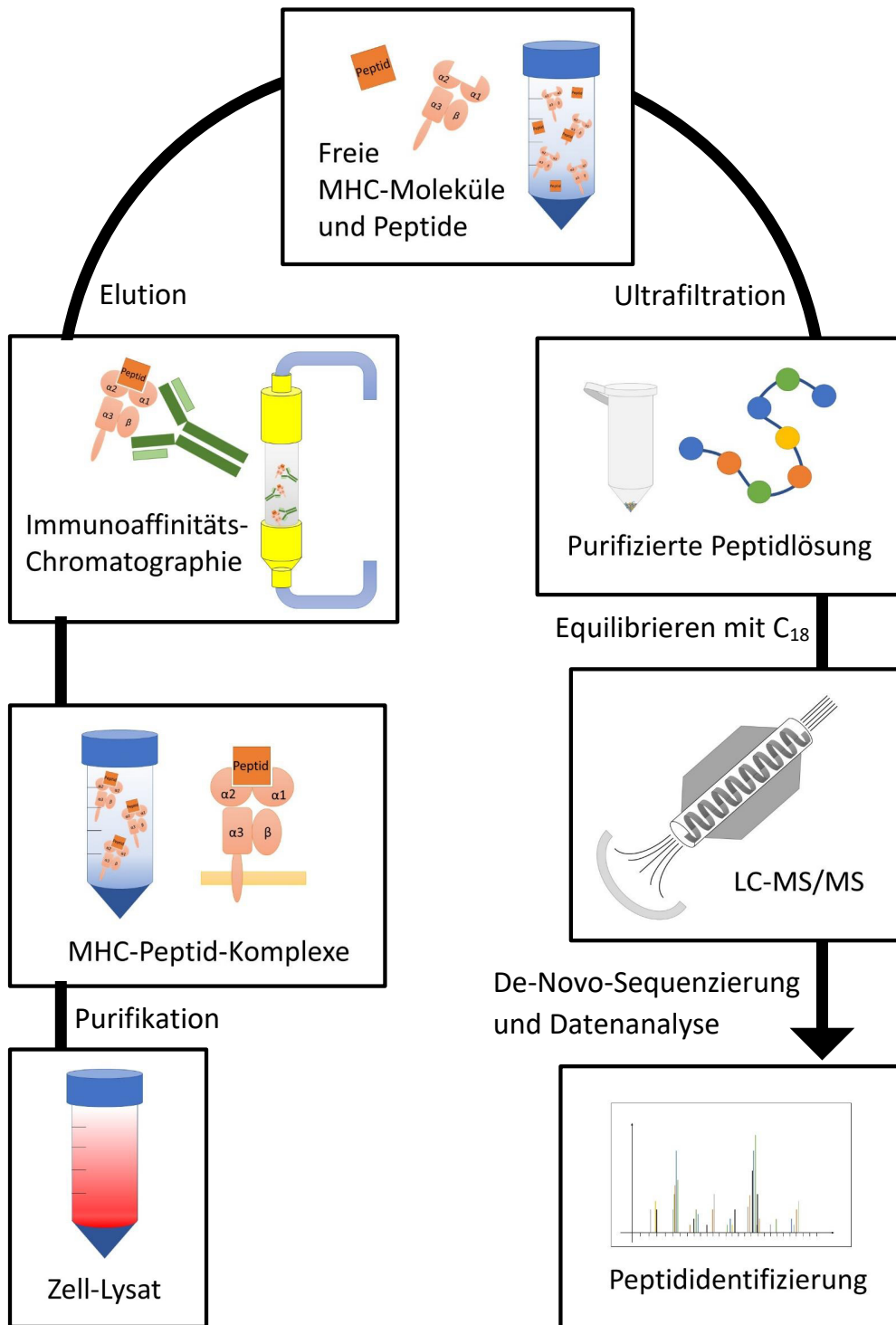


Abbildung 2.4: Ablauf der biochemischen Isolation der MHC-präsentierten Peptide durch eine Immunpräzipitation und massenspektrometrische Analyse, Abbildung in Anlehnung an [73]

Säule für ca. 90 min mit einer Pumpengeschwindigkeit von 7,5 U/min im Kreislauf durch das Säulen-Schlauch-System gepumpt.

2.3.7.3 Herstellung der Zelllysate

Die Zellpellets mit je $1-1,5 \times 10^8$ Zellen wurden mit 1 ml zweifachen Lysispuffer versehen, gevortext und, sofern nicht bereits der Fall, in ein 50 ml Falconröhrchen überführt. Nach Zugabe von weiteren 8 ml einfach-konzentriertem Lysispuffer wurden die Proben erneut gevortext und für 60 min bei 4 °C geschüttelt. Es folgten fünf Zyklen à 30 s Beschallung/ 30 s Pause der Zellen im 4 °C kühlen Bioruptor Plus, weitere 60 min schütteln und 45 min Zentrifugation bei 4000 rpm und 4 °C. Der Überstand mit dem Lysat wurde dann in ein 15 ml Falconröhrchen abgekippt. Bei der Probe der Zelllinie THP-1 für die IP23 und IP24 war das Lysat nicht klar, sodass dieses zusätzlich durch einen Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert wurde.

2.3.7.4 Isolation der MHC-Peptid-Komplexe

Als Schritt der Immunpräzipitation fand eine Immunoaffinitätschromatographie statt. Das Lysat wurde im Austausch gegen den Lysispuffer in das Säulen-Schlauch-System integriert und zirkulierte über Nacht im Kühlraum mit einer Pumpengeschwindigkeit von 7,5 U/min durch die Sepharose. Am folgenden Tag wurde das System im Kühlraum 30 min mit D-PBS und 60 min mit Aqua ad iniectionabilia in den Abfall gespült. Zuletzt wurden die Säulen durch den Einzug von Luft in die Schläuche halb trocken gelegt und mit einem Restüberstand der Spülflüssigkeit von circa 1,5 cm über der Sepharose aus dem System ausgebaut.

Im Labor wurde die restliche Spülflüssigkeit durch leichten Luftdruck aus der Säule entfernt, dies erfolgte mit einer 50 ml Spritze, welche über einen Schlauchadapter am Säulendeckel befestigt wurde. Zur Elution der MHC und Peptide wurde ein Tropfen 10 %ige TFA (Trifluoressigsäure) mit einer 50 µl Hamilton-Pipette sowie 100 µl 0,2 %ige TFA mit einer 500 µl Hamilton-Pipette auf das Gelbett gegeben, die Säulen 20 min auf dem Schüttler bei 4 °C inkubiert und das Eluat mit Luftdruck wie zuvor in ein low-binding Eppendorf-Gefäß überführt. Die Zugabe von 100 µl 0,2 %iger TFA wurde mit entsprechender Inkubation und Elution vier Mal wiederholt.

Insgesamt wurde ein Volumen von circa 500 µl eluiert, welches vor der Filtration noch 5 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert wurde.

2.3.7.5 Trennung der MHC-Moleküle von den Peptiden

Für die Aufreinigung der MHC-klasse-I-Peptide wurden Amicon Ultra - 0,5 ml Zentrifugen-Filtereinheiten mit einer Porengröße von 3 kDa verwendet. Bei ihrer Verwendung werden die MHC-präsentierten Peptide im Filtrat gesammelt, während die MHC-Moleküle im Rückstand zurückbleiben.

Die Filtereinheiten wurden zu-nächst in mehreren Zentrifugationsschritten bei 13000 rpm und 4 °C gewaschen: zunächst 8 min mit 500 µl MS-grade H₂O und anschließend je 15 min mit 500 µl 0,1 N NaOH, 500 µl MS-grade H₂O und 500 µl 0,2 %iger TFA. Der Durchfluss wurde jeweils weggekippt und die Filtereinheit vor dem nächsten Waschschrift auf einem Tuch ausklopft. Zuletzt wurden die Filtereinheiten mit 500 µl 0,2 %iger TFA gefüllt und so bei 4 °C zwischengelagert, bis sie zum Gebrauch (nach Beendigung der Elution) 15 min wie zuvor zentrifugiert, entleert und auf frische Sammelröhrchen gesetzt wurden.

Das Eluat wurde in die Filtereinheiten pipettiert, 30 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Durchfluss in einem low-binding Röhrchen gesammelt. Es folgte eine Zentrifugation der Filtereinheit mit dem Rest-Eluat der Filtereinheit sowie 450 µl AB_E-Lösung (32,5 % ACN (Acetonitril); 0,2 % TFA) für 5 min und Sammeln des Durchflusses wie zuvor. Das gesammelte Filtrat wurde bei -80 °C eingefroren und dann in dem Gefriertrockner Alpha 1-2 LD Plus lyophilisiert.

2.3.7.6 Equilibrieren der ankonzentrierten Peptidproben

Die ankonzentrierten Proben wurden über ZipTips mit 0,6 µl-C₁₈-Harz entsalzen und weiter konzentriert. Zur Vorbereitung der lyophilisierten Probe wurden 30 µl Puffer A (0,1% TFA) hinzugegeben, gevortext, die Probe 20 s im Wasserbad beschallt und 5 min bei 13000 rpm und Raumtemperatur abzentrifugiert. Das Zip-Tip wurde auf eine 10 µl-Pipette gesteckt und durch zehnmaliges Aufnehmen und Auslassen in 500 µl AB_E-Lösung vorbereitet. Es folgten fünf Durchgänge von zehnmaligen Aufnahmen und Auslassen in 500 µl Puffer A zum Equilibrieren, zehnmaligen Aufnahmen und Auslassen in der Probe zur Beladung, dreimaligen Aufnahmen und Auslassen in 500 µl Puffer A zum Entsalzen der Probe und Eluieren der Probe durch zehnmaliges Aufnehmen und Auslassen in 35 µl

AB_E-Lösung in einem low-binding Eppendorf-Gefäß. Der Wechsel zwischen den Lösungen erfolgte jeweils mit heruntergedrücktem Pipettenknopf.

Die equilibrierten Proben wurden bei -80 °C eingefroren und erneut gefriergetrocknet.

2.3.7.7 Massenspektrometrie

Die gewonnenen Peptidproben wurden mittels Nano-LC-MS/MS (Tandem-Nano-Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie) analysiert. Dies erfolgte an einem Orbitrap Fusion (Thermo Scientific) mit einer PicoView-Ionenquelle (New Objective) und gekoppelt an ein Easy-nLC 1000 (Thermo Scientific). Die MS (Massenspektrometrie) wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Andreas Schlosser und seiner Arbeitsgruppe am Rudolf-Virchow-Zentrum für Experimentelle Biomedizin der Universität Würzburg durchgeführt.

Zunächst wurden die Peptide über einen 30-minütigen linearen ACN-Gradienten von 3 % bis 40 % ACN und 0,1 % Methansäure bei einer Flussrate von 500 nl/ min flüssigkeitschromographisch nach ihrer Hydrophobizität aufgetrennt. Hierzu wurden die Peptide auf kapilläre Säulen (PicoFrit, 30 cm x 150 µm ID, New Objective) mit ReproSil-Pur 120 C18-AQ (Dr. Maisch, 1,9 µm) geladen. Die eluierenden Peptide wurden mittels Elektrospray-Ionisation ionisiert und im Anschluss im Orbitrap Analysator massenspektrometrisch vermessen. Bei diesem ersten MS-Scan erfolgte die Messung des Masse-/ Ladungsquotienten der intakten Masse des jeweiligen Peptids. Aus den generierten Übersichtsspektren jedes Scan-Zyklus wurden durch den on-line gekoppelten Orbitrap die Peaks möglicher MHC-präsentierter Peptide ausgewählt und diese Ionen mit einer HCD (Higher-Energy kollisions-induzierten Dissoziation) oder ETD (Elektronentransfer-Dissoziation) in der Kollisionskammer fragmentiert. Die entstandenen Fragmentationen wurden in dem zweiten MS-Scan der Tandem-MS vermessen.

Die generierten Rohdaten umfassten somit sowohl die intakten Massen als auch die Fragmentspektren der Peptidionen.

2.3.7.8 Datenanalyse

Die weitere Datenverarbeitung der Rohdaten bis zu den Datentabellen in Spotfire wurde ebenfalls von Herrn Dr. Schlosser und seiner Arbeitsgruppe erbracht.

Anhand der Rohdaten wurde zunächst eine De-novo-Sequenzierung der Peptide mittels PEAKS X+ (Bioinformatics Solutions Inc., Canada) durchgeführt. Zur weiteren Datenanalyse wurden die jeweiligen Top 10 Peptidsequenz-Kandidaten pro Peptidionenfragmentspektrum anhand des ALC (average local confidence)-Score ausgewählt und im Anschluss durch einen hauseigens entwickelten Algorithmus in einem Suchlauf mit verschiedene Datenbanken abgeglichen.

Dieser umfasste zunächst die Suche der zuvor de-novo-sequenzierten Peptidsequenzen-Kandidaten im gesamten humanen Genom von Uniprot sowie den Transkriptom inklusive aller bekannten Spleißvarianten von Ensembl anhand des Aho-Corasick-Algorithmuses. Es wurden dabei für das Genom alle sechs möglichen und für das Transkriptom alle drei möglichen Leseraster berücksichtigt. Da die beiden Aminosäuren Isoleucin und Leucin als Konstitutionsisomere massenspektrometrisch nicht zu unterscheiden sind, wurden diese in der De-novo-Sequenzierung gleichgesetzt und alle möglichen Kombinationen bei der Datenanalyse berücksichtigt. Gleiches galt für weitere variable Modifikationen wie beispielsweise die Deamidierung von Asparagin-Glutamin.

Im Anschluss wurden die identifizierten Übereinstimmungen kategorisiert. Folgende Kategorien (sortiert nach absteigender Priorität) waren hier möglich: CDS (codierende Sequenz), 5'UTR (5' untranslatierte Region), Off-Frame, 3'UTR (3' untranslatierte Region), ncRNA (nicht-codierende Ribonukleinsäure), intronisch oder intergenisch. Daraufhin wurde die Sequenz der jeweils höchsten Priorität unter den übereinstimmenden Peptidsequenz-Kandidaten ausgewählt und die restlichen Kandidaten der Top 10 verworfen.

In weiteren Schritten erfolgte das Mapping der identifizierten Sequenzen auf das Genom sowie die Bestimmung der Bindungsaffinitäten zu den MHC-Molekülen mittels NetMHCPan 4.0.

Die identifizierten Peptidsequenzen der De-novo-Sequenzierung und des Analysealgorithmuses wurden in der Software Spotfire weiter gefiltert. Zum Einen wurde die FDR (False Discovery Rate), berechnet durch eine Target-Decoy-Suche, auf 10 % gesetzt. Zum Anderen wurden mittels der MHC-Bindungsaffinität nur die Binder herausgefiltert, dass heißt Peptide, deren NetMHC-Score ≤ 2 % betrug.

2.3.8 Statistische Methoden

Die durchgeführten statistischen Analysen wurden alle eigenständig durchgeführt. Es erfolgte größtenteils die Nutzung des Statistikprogramms IBM SPSS Version 1.0.0.118. Die deskriptiven Daten wurden anhand absoluten und relativen Häufigkeiten sowie Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. Bei normalverteilten Daten gemäß des Shapiro-Wilk-Tests wurde der t-Test für unabhängige Stichproben (beziehungsweise der Welch-Test bei fehlender Varianzhomogenität nach dem Levene-Test) oder eine einfaktorische Varianzanalyse als parametrischer Test zum Vergleichen der Mittelwerte gewählt. Zur Bestimmung der bivariaten Korrelation wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient berechnet.

Die durchgeführte logarithmische Regressionsanalyse erfolgte mit Microsoft Excel 2016.

In unserem Immunsystem spielt das CD8⁺ T-Zellsystem zur Erkennung und Bekämpfung körperfremder Infektionserregern und malignen Zellen, wie beispielsweise Tumorzellen, eine bedeutende Rolle. Zur Aktivierung der CD8⁺ T-Lymphozyten ist zunächst ein Antigenkontakt nötig, bei welchem der TCR das Antigen der Zielzelle im Kontext von MHC-Klasse-I-Molekülen bindet; erst nachfolgend können weitere Reaktionswege gestartet werden. Die MHC-Klasse-I-gebundenen Peptide sind somit der Angriffspunkt der CD8⁺ T-Lymphozyten und infolgedessen auch als potenzielle Targets für immuntherapeutische Anwendungen von großer Bedeutung.

Identifikation der MHC-Klasse-I-Peptidome

In der vorliegenden Arbeit wurden die MHC-Klasse-I-Liganden in verschiedenen Probenmaterialien massenspektrometrisch identifiziert. Die Analyse der *in-vivo* vorkommenden MHC-Klasse-I-Peptidome in AML-Blasten im Vergleich zu benignen Kontrollzellen soll zur Erkennung potenzieller AML-spezifischer Antigene führen.

Die verwendeten AML-Blasten wurden aus PBMCs und BMNCs sowie Leukapheresematerial von AML-Patienten gewonnen. Im Zeitraum vom 14.03.2018 bis zum 15.01.2019 konnte hierfür von neun AML-Patienten des Universitätsklinikums Würzburg Probenmaterial verwertet werden. Für weitere Patienten- und Probencharakteristika vgl. Abschnitt 2.2.6.2. Zusätzlich wurden zwei AML-Zelllinien als Ergänzung zu den AML-Patienten analysiert.

Als benigne Kontrollzellen dienten die von acht gesunden Spendern isolierten Granulozyten. Zwei dieser Spender entsprechen Patienten aus der AML-Patien-

tengruppe, befanden sich zum Zeitpunkt der Probenentnahme für die Kontrollgruppe jedoch in Remission der Erkrankung, vgl. Abschnitt 2.2.6.3.

In der Aufarbeitung wurden die mononukleären Zellen aus dem Patientenmaterial, beziehungsweise die Granulozyten aus dem Spendermaterial, isoliert und als Pellet eingefroren. Die Zellpellets wurden lysiert, im Bioruptor Plus beschallt und anschließend über eine Immunoaffinitätschromatographie an die Sepharose-Antikörper-Matrix gebunden. Für die Sepharose wurden die Antikörper W6/32 (pan-MHC-Klasse-I-Antikörper) und BB7.2 (HLA-A*02-Antikörper) verwendet. Im Anschluss erfolgte eine Elution der MHC-Peptid-Komplexe von der Sepharose über TFA. Über Zentrifugen-Filtereinheiten wurden die Peptide von den MHC-Molekülen getrennt und dann lyophilisiert. Im letzten Schritt fand eine weitere Ankonzentration und Aufreinigung in ZipTip-Pipettenspitzen statt, bevor die Peptide massenspektrometrisch vermessen wurden. Zuletzt folgte eine Datenanalyse und Weiterverarbeitung der Rohdaten bis hin zu einer Auflistung der *in-vivo* präsentierten MHC-Klasse-I-Peptide der verarbeiteten Probe.

Insgesamt fanden für die vorliegende Arbeit 47 Immunpräzipitationen dieser Art statt. Die Tabelle I.1 im Anhang dieser Arbeit zeigt eine Übersicht aller Aufarbeitungen.

Da zu dieser verwendeten Methode der Identifikation von MHC-Liganden noch keine umfassenden Erfahrungswerte und Literatur vorhanden sind, wurde die Methode selbst bezüglich ihrer Güte hinsichtlich Validität, Objektivität und Reliabilität evaluiert. Zur Beurteilung dieser wurde die Lymphom-Zelllinie DG-75 als Referenz mehrfach aufgearbeitet und die jeweiligen Ergebnisse der Versuche miteinander verglichen.

Quantifizierung der MHC-Klasse-I-Moleküle

Die Antigenpräsentation einer Zelle ist abhängig von den MHC-Molekülen, sowohl ihrer Ausprägung, als auch ihrer Anzahl. Um mögliche Verzerrungen der quantitativen Ergebnisse der MHC-Peptidomanalyse durch interindividuell unterschiedliche MHC-Molekülzahlen erkennen zu können, wurden die MHC-Klasse-I-Moleküle der jeweiligen Proben quantifiziert. Die Ergebnisse der einzelnen Proben wurden untereinander verglichen sowie mit der Anzahl identifizierter Peptide in Korrelation gesetzt.

Zudem ist die Expression von MHC-Molekülen auf Tumorzellen für den Erfolg einer antigen-spezifischen Immuntherapie essentiell. Für viele Tumoren ist eine Herunterregulierung der MHC-Expression als Immunevasionsmechanismus be-

schrieben [74, 75]. Anhand der Quantifizierung der MHC-Klasse-I-Moleküle der AML-Blasten soll die Eignung der AML für peptid-spezifische Therapien überprüft werden.

Durch einen quantitativen indirekten Immunfluoreszenz-Assay mit Hilfe des QiFiKit's[®] wurden die Oberflächen- und intrazellulären MHC-Klasse-I-Moleküle von allen verwendeten Proben mit Ausnahme der AML-Patienten P1 und P2 sowie der Kontrolle K8 bestimmt. Bei den Proben P1, P2 und K8 stand leider kein geeignetes Probenmaterial für die MHC-Quantifizierung zur Verfügung.

3.1 Güte der Peptididentifizierung

Zunächst wurde das zuvor beschriebene Verfahren zur Identifikation von MHC-präsentierten Peptiden anhand der Aufarbeitungen der Zelllinie DG-75 evaluiert. Dies erfolgte durch die Beurteilung der drei Gütekriterien eines Experiments, welche die Basis für zuverlässige verwertbare Ergebnisse legen: Validität, Objektivität und Reliabilität.

Dabei beschreibt die Validität die Eignung des Experiments bezüglich seiner Zielsetzung, die Objektivität die Unabhängigkeit der Ergebnisse vom Versuchsleiter sowie die Reliabilität die Zuverlässigkeit der Methode, das heißt ob bei Wiederholung des Experiments die gleichen Ergebnisse erhoben werden können.

Insgesamt fanden neun separate Immunpräzipitationen statt, in denen die Peptide der Zelllinie DG-75 mit dem pan-MHC-Klasse-I-Antikörper W6/32 unter gleichen experimentellen Bedingungen isoliert und analysiert wurden.

Insgesamt führten diese Aufarbeitungen zur Identifikation einer Gesamtheit von 4.872 nicht-redundanten Peptiden. Im Durchschnitt wurden dabei 1.842 Peptide pro Immunpräzipitation detektiert, diese entsprachen je 37,8 % der Gesamtheit der isolierten Peptide. Das Minimum lag bei 590, das Maximum bei 2.539 Peptiden pro Aufarbeitung. Eine Übersicht über die Anzahl detektierter Peptide pro Immunpräzipitation zeigt die Abbildung 3.1.

Je ein Drittel der Peptide wurde in nur einer, in zwei bis vier beziehungsweise in fünf oder mehr Aufarbeitungen isoliert. Nur 5,2 % der Peptide konnten dabei in allen Immunpräzipitationen nachgewiesen werden. Im Durchschnitt waren jeweils 9,7 % der Peptide jeder Aufarbeitung unikal, das heißt in keiner der acht anderen Immunpräzipitationen zu finden.

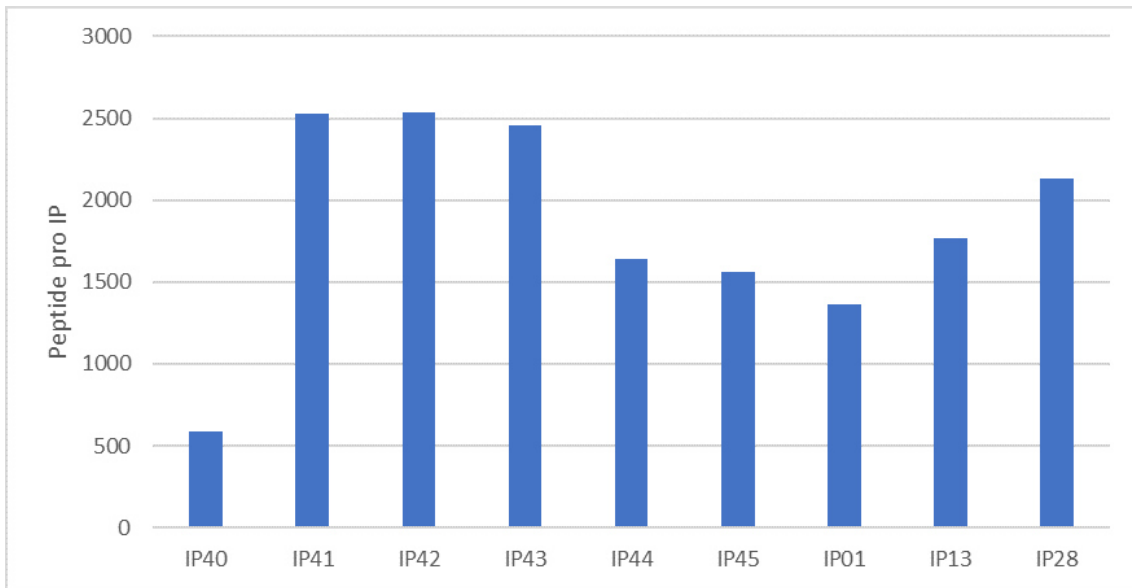


Abbildung 3.1: Übersicht über die Anzahl identifizierter Peptide pro Immunpräzipitation (IP-Nr. angegeben) der Zelllinie DG-75.

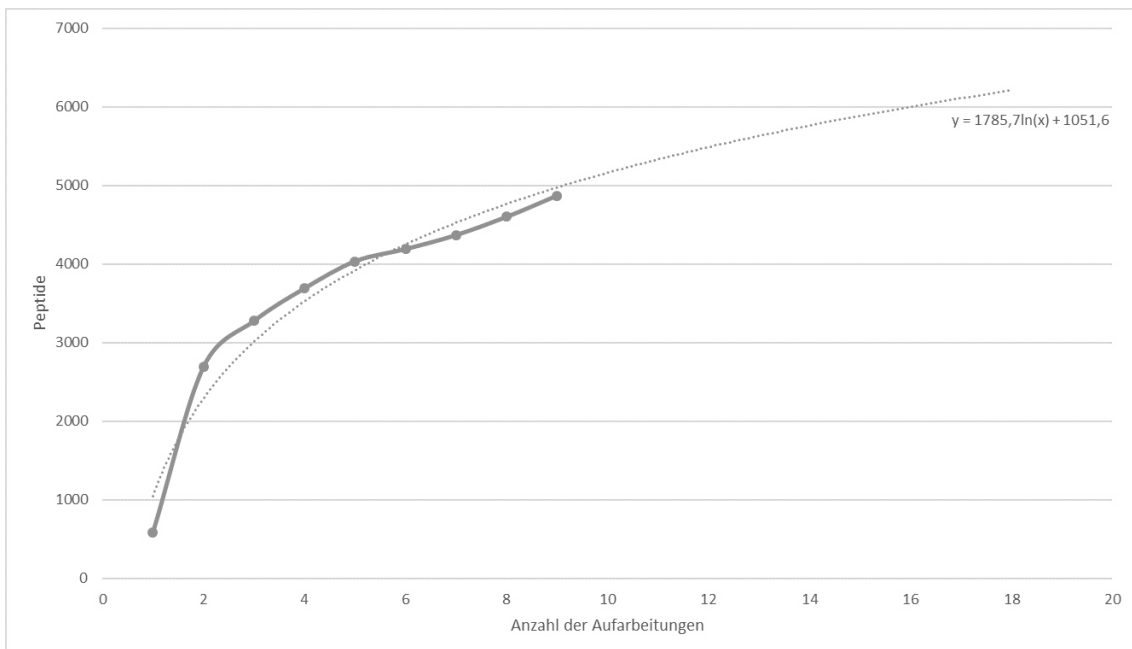


Abbildung 3.2: Peptidgewinn mit steigender Anzahl an Aufarbeitungen der Lymphom-Zelllinie DG75. Vorhersage des weiteren Peptidgewinns anhand einer logarithmischen Regressionsanalyse.

Die Abbildung 3.2 zeigt den Zugewinn an neuen Peptiden pro Immunpräzipitation. Der Kurvenverlauf der Gesamtpeptide nähert sich annähernd asymptotisch einem Maximum an isolierbaren Peptiden an. Mit den neun vollzogenen Aufarbeitungen wurde dieses Maximum jedoch noch nicht erreicht, die neunte Aufarbeitung führte mit 270 neuen Peptiden noch zu einem Zugewinn von 5,8 %. Die durchgeführte logarithmische Regressionsanalyse ($f(x)=1.785,7\ln(x)+1.051,6$) sagte eine Gesamtheit von 6.213 Peptiden bei 18 Aufarbeitungen vorher. Dies wäre ein weiterer Peptidgewinn von 27,5 % durch Verdopplung der Anzahl der Immunpräzipitationen von 9 auf 18. Die 50. Aufarbeitung brächte einen Zugewinn von 36 Peptiden. Nach dieser Regression könnte theoretisch mit 130 Immunpräzipitationen die Gesamtheit der isolierten Peptide auf 9.744 Peptide verdoppelt werden. Hypothetisch betrachtet, führte man 10 Millionen Immunpräzipitationen der Zelllinie DG-75 durch, käme man auf eine Gesamtheit von knapp 30.000 identifizierten nicht-redundanten Peptiden. Definierte man diese 30.000 Peptide als Maximum, so erbrächte jede einzelne Immunpräzipitation eine durchschnittliche Ausbeute von 6,1 % der potenziell identifizierbaren Peptide.

Zusammenfassend führten die Ergebnisse der Immunpräzipitationen der Zelllinie DG-75 zu einer Vielzahl an identifizierten MHC-Klasse-I-Peptiden, welche die Validität der Methode belegen. Die Objektivität konnte durch einen Vergleich mit anderen in der Arbeitsgruppe durchgeführten durchgeführten Experimenten bestätigt werden. Limitationen der Methode wurden in ihrer Reliabilität beobachtet: Wiederholungen des Verfahrens führten zwar zu ähnlichen Anzahlen identifizierter Peptide, jedoch zu unterschiedlichen Peptidsequenzen.

Gemeinsam mit den Hochrechnungen der Regressionsanalyse zeigte dies, dass mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit durch die neun durchgeführten Immunpräzipitationen der Zelllinie DG-75 nicht das gesamte HLA-Klasse-I-Peptidom der Zelllinie identifiziert werden konnte. Für die nachfolgenden Ergebnisanalysen kann somit gesagt werden, dass vermutlich nicht alle MHC-Klasse-I-assoziierten Peptide der analysierten Proben erfasst wurden.

3.2 Quantifizierung der MHC-Klasse-I-Moleküle

Neben der Immunpräzipitation zur Identifikation der MHC-Klasse-I-präsentierten Peptide erfolgte zusätzlich eine Quantifizierung der Oberflächen- und intrazellulären MHC-Klasse-I-Moleküle. Die Präsentation von MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche von Tumorzellen legt die Grundlage für

eine antigenspezifische Tumormimmuntherapie.

Zum Einen wurde die Anzahl der MHC-Klasse-I-Moleküle pro Zelle jeder Probe zwischen den einzelnen Probenkategorien verglichen. Hiermit wurde überprüft, ob Leukämiezellen eine signifikant unterschiedliche Anzahl an MHC-Klasse-I-Molekülen als benigne Zellen präsentieren. Zum anderen wurde getestet, ob die Anzahl identifizierter Peptide jeder Probe mit der zugehörigen MHC-Klasse-I-Molekülanzahl in Korrelation steht.

Es erfolgte jeweils zunächst eine Aufarbeitung des zu vermessenden Materials zur Quantifizierung der extrazellulären, das heißt auf der Zelloberfläche vorhandenen MHC-Klasse-I-Moleküle mit dem pan-MHC-Klasse-I-Antikörper W6/32. Vor der Messung im Durchflusszytometer wurden die Ansätze geteilt und bei je einem Ansatz pro Probe erfolgte eine Permeabilisierung der Zellen, sodass im Anschluss zusätzlich die Gesamtheit der extra- und intrazellulären MHC-Klasse-I-Moleküle quantifiziert werden konnten. Durch Subtraktion der extrazellulären Anzahl von der Gesamtheit wurde die intrazelluläre Anzahl von Molekülen berechnet.

Für alle drei Zelllinien sowie die Probe P3 fand zusätzlich eine Quantifizierung der HLA-A*02-Moleküle mit dem HLA-A*02-Antikörper BB7.2 statt, sodass hier ein Vergleich zwischen der Gesamt-MHC-Klasse-I-Expression und dem Anteil von HLA-A*02-Molekülen gezogen werden konnte.

Zudem fand zur Validierung des verwendeten Antikörpers die MHC-Quantifizierung der drei Zelllinien sowohl mit dem Antikörper W6/32 aus dem Interfakultären Institut für Zellbiologie aus Tübingen sowie mit dem von BioLegend statt. Es konnte somit die Affinität beider Antikörper verglichen werden.

Bei der Auswertung der durchflusszytometrischen Ergebnisse konnten mittels des vorwärts gestreuten Lichts (FSC (Forward Scatter)), welches mit der Größe der Zellen korreliert, sowie des Seitenstreulichts (SSC (Side Scatter)), welches mit die Granularität und Komplexität der Zellen widerspiegelt, verschiedene Zellpopulationen unterschieden werden. Für die Quantifizierung der MHC-Moleküle wurden jedoch alle Zellpopulationen mit in die Auswertung einbezogen, da dies der heterogenen Zellzusammensetzung in den Proben der Immunpräzipitationen entsprach.

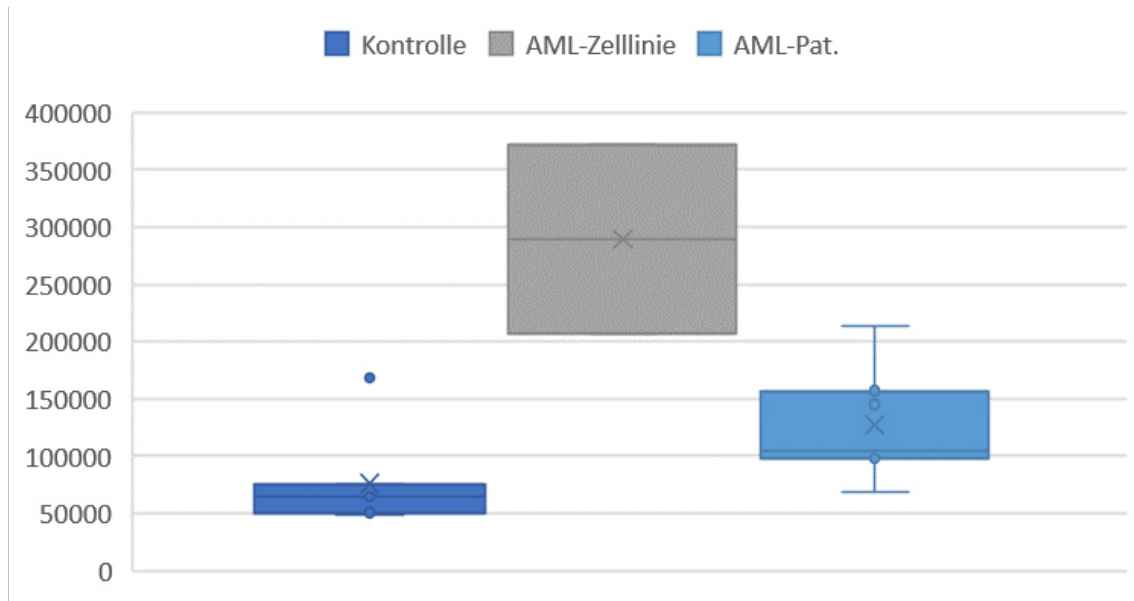
3.2.1 Vergleich zwischen den Probenkategorien

Die MHC-Klasse-I-Quantifizierung zeigte eine heterogene Expression der intra- und extrazellulären MHC-Klasse-I-Moleküle pro Zelle mit einer durchschnittlichen Molekülzahl (\pm Standardabweichung) von 125.051 (\pm 82.613) pro Zelle. Mit Werten zwischen 48.396 und 372.185 MHC-Klasse-I-Molekülen gab es hierbei starke interindividuelle Unterschiede. Zudem unterschieden sich die Mittelwerte zwischen den Leukämie- und benignen Proben signifikant ($t(14)=2,298$, $p \leq .05$). Die mittlere Gesamtmolekülzahl betrug bei den AML-Patienten 127.122 (\pm 66.059), bei den AML-Zelllinien 289.371 (\pm 82.814) sowie bei den Kontrollen 76.031 (\pm 44.091) pro Zelle, siehe auch Abbildung 3.3a. Die Leukämiezellen zeigten somit eine höhere MHC-Klasse-I-Expression als die Zellen der Kontrollgruppe.

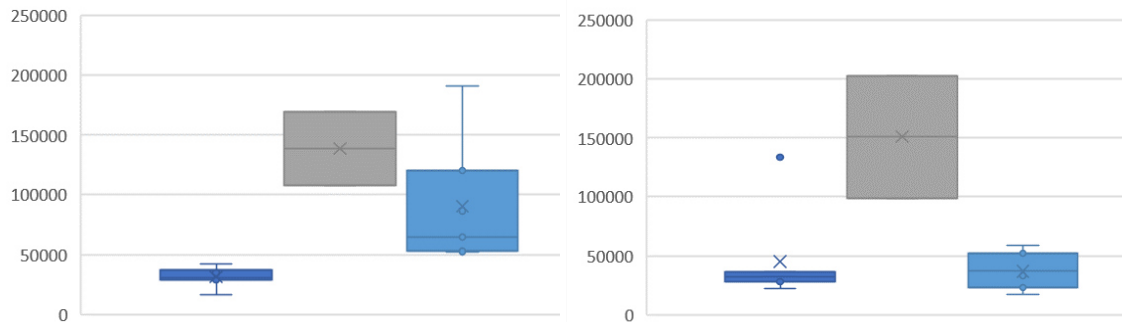
Der prozentuale Anteil von intrazellulären an der Gesamtanzahl der gemessenen MHC-Klasse-I-Moleküle variierte stark zwischen 10,83% und 79,3 % mit einem Mittelwert von 43,9 (\pm 16,1) %. Hier betrug der Mittelwert bei den AML-Patienten 31,3 (\pm 16,7) %, bei den AML-Zelllinien 51,2 (\pm 3,3) % und in der Kontrollgruppe 54,4 (\pm 21,6) %. Die Häufigkeitsverteilungen der Anzahlen der extra- und intrazellulären MHC-Klasse-I-Moleküle sind in den Abbildung 3.3b und 3.3c in Boxplots dargestellt.

In der Gruppe der AML-Patienten wurden verschiedene Zellmaterialien (PBMCs, BMMCs, Leukapheresen) für die Quantifizierung der MHC-Klasse-I-Moleküle verwendet. Die durchgeführte einfaktorielle Varianzanalyse zeigte keinen signifikanten Unterschied in der MHC-Klasse-I-Gesamtexpression zwischen den verschiedenen Zellmaterialien ($p \geq .05$).

Zusammenfassend zeigen die Blasten der AML-Patienten eine höhere MHC-Präsentation als die Kontrollgranulozyten, jedoch eine geringere Anzahl an MHC-Molekülen als die AML-Zelllinien. Auffällig ist dabei ein vergleichsweise geringerer Anteil an intrazellulären MHC-Molekülen in der Gruppe der AML-Patienten. Die hohe Anzahl der MHC-Moleküle der Leukämiezellen spricht für gute Grundvoraussetzungen bezüglich der Immunogenität der Zellen: die Leukämiezellen zeigen eine ausreichende Präsentation von MHC-Molekülen, ihre tatsächliche Immunogenität ist jedoch von der Immunogenität der präsentierten Liganden abhängig.



(a) Gesamtheit der intra- und extrazellulären MHC-Klasse-I-Moleküle



(b) Extrazelluläre MHC-Klasse-I-Moleküle (c) Intrazelluläre MHC-Klasse-I-Moleküle

Abbildung 3.3: Boxplots zur Darstellung der Anzahlen von intra- und extrazellulären MHC-Klasse-I-Molekülen pro Zelle in den verschiedenen Probenkategorien

3.2.2 Analyse der HLA-A*02-Molekülanzahlen

Analog zu den separaten Immunpräzipitationen mit dem HLA-A*02-spezifischen Antikörper BB7.2 (vgl. Abschnitt 3.3.1) wurden die HLA-A*02-Moleküle ebenfalls zusätzlich separat quantifiziert. Anhand des Anteils der HLA-A*02-Moleküle an den gesamten MHC-Klasse-I-Molekülen soll weiteres Wissen über A*02-spezifische MHC-Präsentation auf Tumorzellen gewonnen werden.

Hierfür wurde bei den Zelllinien DG-75, ML-2 und THP-1 sowie der AML-Patientenprobe P3 die MHC-Oberflächenquantifizierung sowohl mit dem pan-MHC-Klasse-I-Antikörper W6/32 als auch mit dem spezifischen HLA-A*02-Antikörper BB7.2 durchgeführt. Eine Übersicht über die bestimmten Molekülanzahlen zeigt die

Abbildung 3.4.

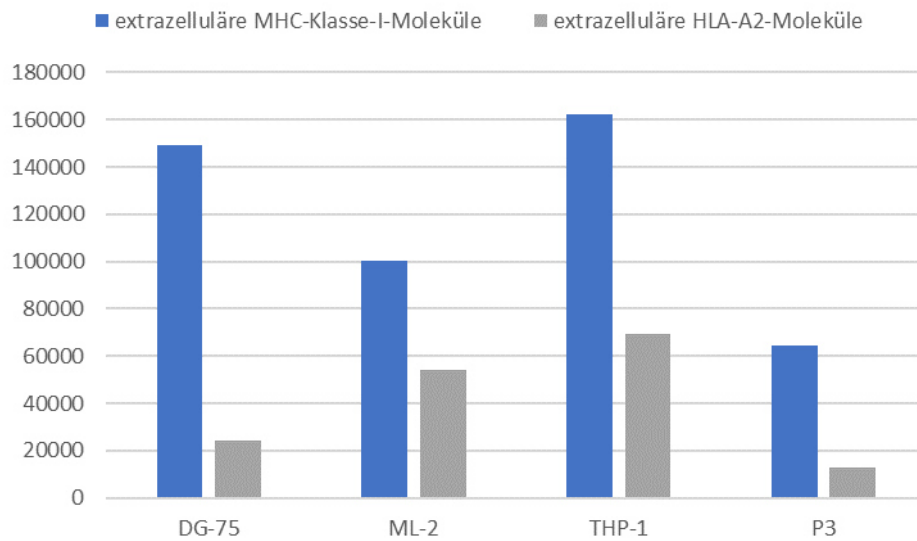


Abbildung 3.4: Quantitative Analyse der extrazellulären MHC-Klasse-I- und HLA-A*02-Moleküle pro Zelle bei den Zelllinien DG-75, ML-2 und THP-1 sowie der AML-Patientenprobe P3

Durchschnittlich exprimierten die Proben im Mittel $40.161,91 \pm 22.464,84$ extrazelluläre HLA-A*02-Moleküle bei insgesamt durchschnittlich $119.192,68 \pm 39.079,62$ MHC-Klasse-I-Molekülen. Dies entsprach einem relativen Anteil von $33,25 \pm 15,58$ %. Das Maximum lag hier bei $53,88$ % bei der AML-Zelllinie ML-2, das Minimum bei $16,3$ % bei der Lymphom-Zelllinie DG-75.

Der Mittelwert der beiden HLA-A*02-homozygoten Proben ML-2 und P3 lag bei $37,04 \pm 16,84$ % von den gesamten MHC-Klasse-I-Molekülen. Dabei betrug der Anteil an HLA-A*02-Molekülen bei der homozygoten AML-Zelllinie ML-2 mit $53,88$ % das 2,7-fache gegenüber den $20,2$ % bei der homozygoten AML-Patientenprobe P3.

Im Gegensatz dazu betrug der Mittelwert der heterozygoten Proben DG-75 und THP-1 $29,47 \pm 13,16$ %. Mit $16,3$ % bei der Zelllinie DG-75 und $42,63$ % bei Zelllinie THP-1 unterschieden sich die Anteile bei den beiden Proben signifikant. In Relation zu der Gesamtheit der MHC-Klasse-I-Moleküle waren 2,6 mal mehr HLA-A*02-Moleküle auf den Zellen der AML-Zelllinie THP-1 als bei der Zelllinie DG-75.

Die gewonnenen Daten präsentieren somit stark variable Ergebnisse und lassen auf große interindividuelle Unterschiede in der Präsentation von HLA-A*02-Molekülen sowohl bei HLA-A*02-homo- als auch heterozygoten Individuen

schließen. Es lässt sich keine allgemeine Aussage über den Anteil von HLA-A*02-Molekülen an den gesamten MHC-Klasse-I-Molekülen treffen. Allgemein lässt dies schließen, dass die Expression der einzelnen HLA-Allele interindividuell stark variiert.

3.2.3 Affinität des Antikörpers W6/32 aus Tübingen

Die durchgeführten Immunpräzipitationen zur Identifizierung der MHC-Klasse-I-präsentierten Peptide basierten auf einer Immunoaffinitätschromatographie. Bei dieser wurden die MHC-Peptide des verwendeten Zellmaterials an eine Sepharose-Antikörper-Matrix gebunden und im Anschluss für die weitere Aufarbeitung eluiert. Die Affinität des für die Matrix verwendeten Antikörpers ist folglich für die Güte der Ergebnisse der Immunpräzipitation essentiell.

Alle für diese Arbeit durchgeführten Immunpräzipitationen zur Identifizierung der gesamten MHC-Klasse-I-Peptidome fanden mit dem pan-MHC-Klasse-I-Antikörper W6/32 aus dem Interfakultären Institut für Zellbiologie der Universität Tübingen (Prof. Dr. S. Stefanović) statt. Zur Überprüfung dessen Affinität wurde der Versuch der MHC-Klasse-I-Quantifizierung der drei Zelllinien DG-75, ML-2 sowie THP-1 sowohl mit dem Antikörper W6/32 aus Tübingen als auch mit dem Antikörper W6/32 von BioLegend durchgeführt und die Ergebnisse beider Antikörper verglichen.

Die beiden Antikörper führten bei allen drei Zelllinien zu ähnlichen Anzahlen der MHC-Klasse-I-Moleküle, es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Antikörpern beschrieben werden. Die Affinität des für diese Arbeit verwendeten Antikörpers W6/32 aus Tübingen scheint somit mit anderen Produktionen des gleichen Klons vergleichbar zu sein.

3.2.4 Korrelation MHC-Moleküle und Peptide

Es wurde untersucht, ob die Anzahl der MHC-Klasse-I-Moleküle mit der Anzahl der identifizierten Peptide zusammenhängt. Zu diesem Zweck wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet. Hierfür wurden die Anzahlen extra- und intrazellulärer MHC-Klasse-I-Moleküle sowie die identifizierten Peptide pro Immunpräzipitation verwendet. Für einen besseren Vergleich zwischen den einzelnen Proben wurde bei mehrfach aufgearbeiteten Proben der Mittelwert der

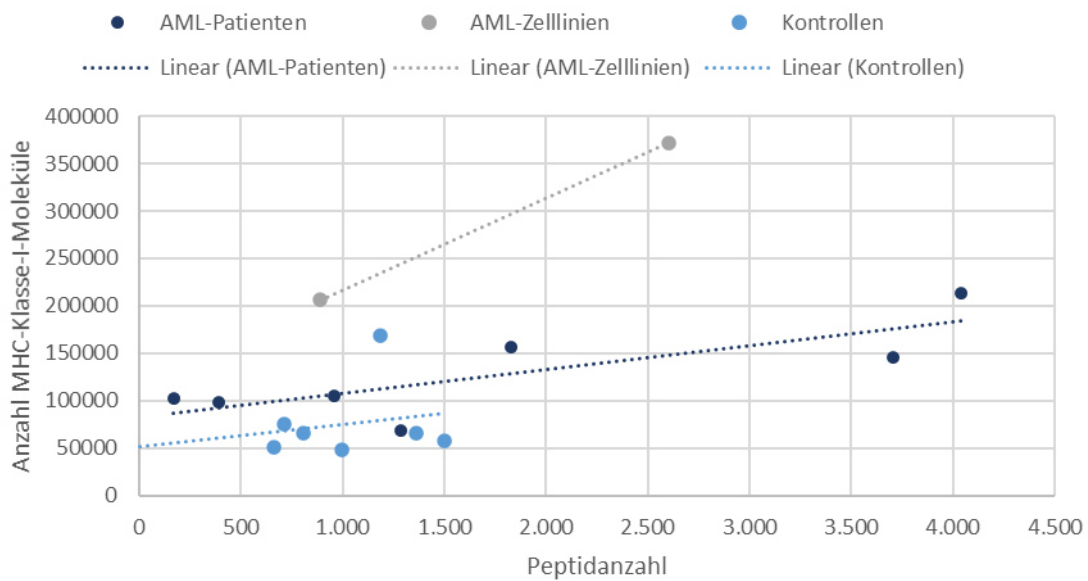


Abbildung 3.5: Darstellung der einzelnen Wertepaare von MHC-Klasse-I-Molekül- und Peptidanzahlen sowie der linearen Trendlinien der Korrelation in den einzelnen Probenkategorien

Peptidanzahlen der einzelnen Immunpräzipitationen berechnet und zur Auswertung genutzt.

Für die Gesamtheit aller Proben konnte eine statistisch signifikante mittelstarke positive lineare Korrelation zwischen der MHC-Klasse-I-Molekülanzahl und der Anzahl identifizierter Peptide gezeigt werden ($r = 0,54$; $p \leq .05$).

Die Korrelation unterschied sich in den einzelnen Probenkategorien, dies ist deutlich in dem Streudiagramm in Abbildung 3.5 erkennbar. Dabei konnte nur in der AML-Patientengruppe ein signifikanter Korrelationskoeffizient berechnet werden, welcher auf einen starken positiven linearen Zusammenhang hinwies ($r = 0,8$; $p \leq .05$). Die Korrelationskoeffizienten nach Pearson zeigten in der Kontrollgruppe sowie bei den AML-Zelllinien keine statistische Signifikanz.

Aufgrund relativ kleiner Gruppengrößen der einzelnen Probenkategorien hat die Berechnung des jeweiligen Korrelationskoeffizienten nur eine stark limitierte Aussagekraft. Die statistisch signifikante mittelstarke positive lineare Korrelation zwischen der MHC-Klasse-I-Molekülanzahl und der Anzahl identifizierter Peptide aller Proben sollte somit in den Vordergrund gestellt werden.

3.3 Quantitative Analyse der MHC-Klasse-I-Peptidome

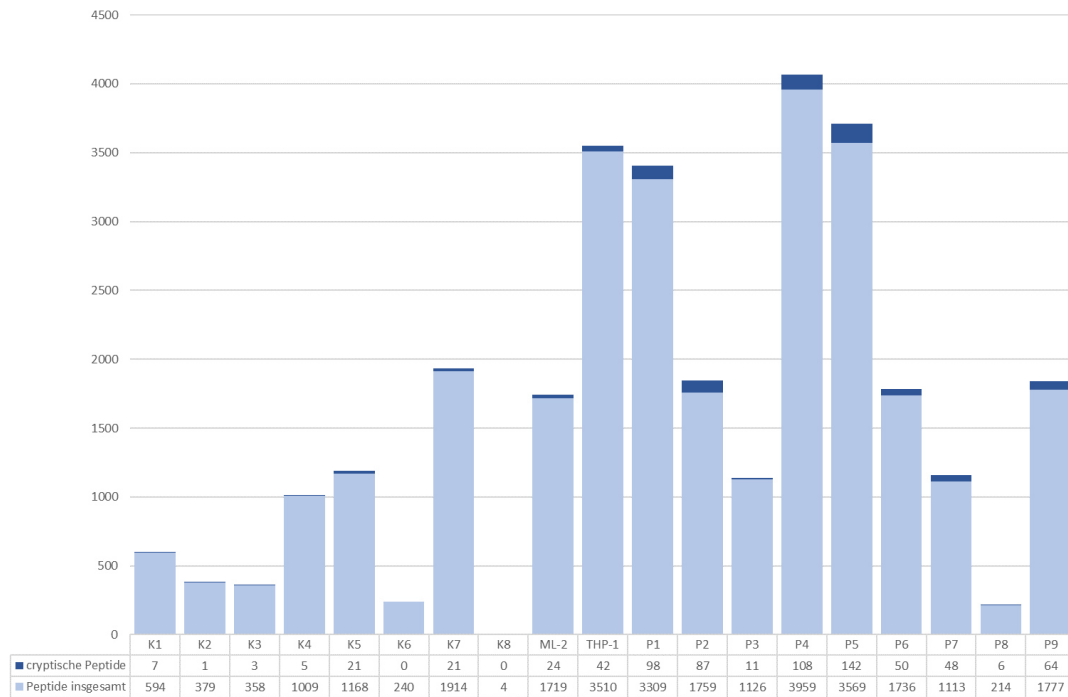
Im folgenden Kapitel wird die quantitative Auswertung der MHC-Klasse-I-Peptidom-Kartierung dargelegt. Es wurden die Ergebnisse der AML-Blasten in -Patienten und -Zelllinien sowie der Kontrollgranulozyten analysiert. Bei der Analyse wurde in die sogenannten „klassischen“ Peptide, welche aus codierenden Sequenzen der DNA stammen, und die „kryptischen“ Peptide unterteilt. Diese bezeichnen Peptide, die durch Translation in nicht-kanonischen offenen Leserahmen entstehen, das heißt in intergenischen, intronischen oder außerhalb des Leserasters („off-frame“) liegenden DNA-Bereichen, ncRNA oder 3- oder 5'-untranslatierten Bereichen codiert sind.

Es wurden die Peptidanzahlen pro Probe, die Überlappungen zwischen den einzelnen Proben sowie Merkmale der enthaltenen kryptischen Peptide verglichen. In den anschließenden Unterkapiteln wurden einzelne Vergleiche zwischen verschiedenen Proben detaillierter dargestellt.

Für die nachfolgenden Auswertungen wurden die Ergebnisse aller Immunpräzipitationen derselben Probe zusammengeführt, sofern diese mehrfach aufgearbeitet wurde. Der Begriff Probe bezeichnet daher beispielsweise die Ergebnisse beider Immunpräzipitationen von AML-Blasten der AML-Patientenprobe P2. Eine Übersicht über die einzelnen Immunpräzipitationen gibt die Tabelle I.1. Jede Probe kann dabei jeweils einer Probenkategorie (AML-Blasten, AML-Zelllinie oder Kontrolle) zugeordnet werden.

Insgesamt führten alle Immunpräzipitationen zu einer Summe von 17.750 verschiedenen Peptiden aus 6.218 Ursprungproteinen. Separat betrachtet wurden bei den AML-Blasten 13.214, bei den AML-Zelllinien 4.748 und bei den Kontrollen 4.050 nicht-redundante Peptide massenspektrometrisch identifiziert.

Die durchschnittliche Peptidanzahl (\pm Standardabweichung) lag bei 1.729 (\pm 1.237) Peptiden pro Probe. Dabei lag der Mittelwert bei den AML-Blasten bei 2.290 (\pm 1.360) Peptiden, bei den AML-Zelllinien bei 2.652 (\pm 1.854) Peptiden und bei den Kontrollen bei 995 (\pm 591) Peptiden. Bei der Interpretation dieser Zahlen ist jedoch zu berücksichtigen, dass einzelne Proben unterschiedlich oft in der Immunpräzipitation aufgearbeitet wurden. Die Peptidanzahlen pro Probe waren gemäß des Shapiro-Wilk-Tests in den Kategorien der AML-Patienten und Kontrollen normalverteilt ($p \geq .05$). In der Kategorie der AML-Zelllinien konnte aufgrund der kleinen Gruppengröße von $n=2$ kein Test auf Normalverteilung durchgeführt werden. Der Unterschied der Mittelwerte zwischen den



(a) Nicht-redundante MHC-Klasse-I-Peptide pro Probe (Kontrollen K1-K8, Zelllinien ML-2 und THP-1, AML-Patienten P1-P9)



(b) Klassische Peptide pro Probenkategorie (c) Kryptische Peptide pro Probenkategorie

Abbildung 3.6: Übersicht über die Anzahl aller identifizierten Peptide pro Probe (a) sowie die Überschneidungen der klassischen (b) und kryptischen (c) Peptide zwischen den einzelnen Probenkategorien

beiden Kategorien ist statistisch signifikant ($t(11,4) = 2,4; p \leq .05$). Die genauen Peptidanzahlen der einzelnen Proben sind in Abbildung 3.6a dargestellt.

77,2 % der Peptide kamen ausschließlich in Leukämie-Proben vor, 3 % waren in allen drei Probenkategorien auffindbar. Die Überlappungen der Peptide zwischen den einzelnen Probenkategorien sind in den Venn-Diagrammen in den Abbildung 3.6b und 3.6c dargestellt.

Insgesamt wurden 464 nicht-redundante kryptische Peptide identifiziert. Die Verteilung auf die einzelnen Probenkategorien zeigt das Venn-Diagramm in Abbildung 3.6c. 12,1 % der kryptischen Peptide waren nur in der Kontrollgruppe nachzuweisen, 87,9 % hingegen kamen in mindestens einer AML-Patientenprobe vor. Der Mittelwert lag bei 41 (± 40) kryptischen Peptiden pro Probe. Die kryptischen Peptide insgesamt entsprachen einem Anteil von 2,6 % aller identifizierten Peptide. Diese Prozentzahl unterschied sich zwischen den einzelnen Probenkategorien: durchschnittlich waren in der Gruppe der AML-Patienten 3,3 %, bei den Zelllinien 1,3 % und in der Kontrollgruppe 0,7 % der identifizierten Peptide kryptischer Herkunft. Dabei lag das Minimum mit 0 % bei den Proben K6 und K8, das Maximum mit 4,8 % bei der Probe P2. Hinzu variierte dieser Anteil stark zwischen den einzelnen HLA-Merkmalen, denen die Peptide zugeordnet wurden: durchschnittlich waren 1,4 % der zugeordneten Peptide pro HLA-Merkmal kryptisch, mit Anteilen von 4,3 % bis 7,1 % wurden bei den HLA-Merkmalen A*03:01, A*11:01, A*31:01, A*33:03, B*27:05 und B*44:03 die kryptischen Peptide jedoch drei bis fünf mal häufiger identifiziert.

Die Verteilung der Entstehungsmechanismen beziehungsweise Genregionen, in welchen die identifizierten kryptischen Peptide codiert sind, stellt das Tortendiagramm in Abbildung 3.7 dar.

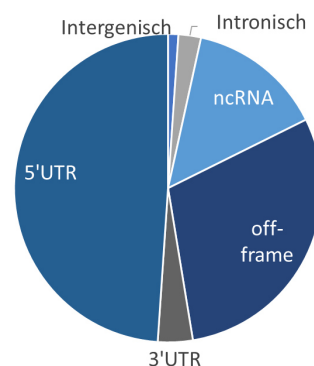


Abbildung 3.7: Biogenese-Mechanismen der identifizierten kryptischen Peptide

3.3.1 Verwendung eines HLA-A*02-spezifischen Antikörpers

Mit einer Häufigkeit von circa 30 % ist das HLA-Allel A*02 das am häufigsten vorkommende Allel in der deutschen Bevölkerung [76]. Eine zielgerichtete Therapie gegen ein A*02-assoziiertes tumorspezifisches Peptid käme demnach für ein Drittel der deutschen Bevölkerung in Betracht.

Wie bereits anhand der Hochrechnungen unter der Evaluation der Methode beschrieben, ist es sehr wahrscheinlich, dass nicht alle MHC-Klasse-I-assoziierten Peptide der analysierten Proben durch die Immunpräzipitationen mit dem pan-MHC-Klasse-I-Antikörper W6/32 erfasst wurden. Um jedoch eine maximal hohe Ausbeute der HLA-A*02-assoziierten Peptide zu erreichen, soll überprüft werden, ob die Ausbeute durch Immunpräzipitationen mit dem HLA-A*02-spezifischen Antikörper BB7.2 im Vergleich zu dem Antikörper W6/32 gesteigert werden kann.

Zu diesem Zweck wurden die HLA-A*02-positiven AML-Patientenproben P2 und P3 sowie alle Zelllinien sowohl mit dem pan-MHC-Klasse-I-Antikörper W6/32 als auch mit dem HLA-A*02-spezifischen Antikörper BB7.2 in der Immunpräzipitation aufgearbeitet. Für eine bessere Reliabilität wurde die P3 je drei Mal mit jedem Antikörper aufgearbeitet. Im Folgenden sollen die Ergebnisse der Aufarbeitungen beider Antikörper verglichen werden.

Im Vergleich mit den durch die Datenbankanalysen A*02 zugeordneten Peptiden nach der Immunpräzipitationen mit dem Antikörper W6/32 erbrachten die Aufarbeitungen mit dem Antikörper BB7.2 zwischen 34,9 % (ML-2) und 127,7 % (THP-1) der Peptidanzahl. Der Anteil übereinstimmender Peptide beider Aufarbeitungen war stark variabel: zwischen 11,1 % (P3) und 75,8 % (ML-2) der über BB7.2 identifizierten Peptide wurden gleichzeitig auch in der Immunpräzipitation mit W6/32 gefunden.

Insgesamt konnte aufgrund der Heterogenität der Ergebnisse keine signifikant verbesserte Ausbeute an HLA-A*02-assoziierten Peptiden durch die Ausführung der Immunpräzipitation mit dem HLA-A*02-spezifischen Antikörper BB7.2 im Vergleich mit dem pan-MHC-Klasse-I-Antikörper W6/32 beschrieben werden.

3.3.2 Vergleich der Peptidome von PBMCs und BMDCs

Im Folgenden wurde die MHC-Klasse-I-Präsentation von AML-Blasten unterschiedlicher Lokalisationen (peripheres Blut und Knochenmark) beispielhaft ver-

glichen. Hierfür standen sowohl PBMCs als auch BMMCs desselben Abnahmezeitpunkts von der AML-Patientenprobe P1 zur Verfügung. Beide Materialien wurden zweifach mit einer Immunpräzipitation aufgearbeitet und analysiert.

Insgesamt wurden 2.913 nicht-redundante Peptide bei den PBMCs und 2.814 bei den BMMCs identifiziert. Davon waren 1.954 Peptide identisch in beiden Materialien, dies entspricht 51,8 % aller in P1 identifizierten Peptide.

Als Vergleich hierzu können die Überschneidungen unter den mehrfach durchgeführten Immunpräzipitationen desselben Materials herangezogen werden. Hier stimmten jeweils 54,2 % der Peptide beider Aufarbeitungen der BMMCs sowie 39 % der Peptide beider Immunpräzipitationen der PBMCs überein. Im Mittel führt dies zu 45,4 % übereinstimmenden Peptiden in zwei unabhängig durchgeführten Immunpräzipitationen desselben Probenmaterials.

In Zusammenschau zeigten die PBMCs und BMMCs ähnliche Anzahlen von MHC-Klasse-I-präsentierten Peptiden. Der Anteil von circa 50 % übereinstimmenden Peptide zwischen den beiden Zellmaterialien war quantitativ mit den Überschneidungen zwischen zwei Immunpräzipitationen desselben Materials vergleichbar und kann somit auf die Methodik zurückgeführt werden. Es konnte somit sowohl qualitativ als auch quantitativ kein bedeutender Unterschied in der MHC-Präsentation von PBMCs und BMMCs beschrieben werden.

Zusätzlich konnte auch zwischen den Anteilen kryptischer Peptide an der Gesamtpeptidzahl mit 2,5 % bei den PBMCs und 2,9 % bei den BMMCs kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

3.3.3 Vergleich HLA-identischer AML- und benigner Peptidome

Die Polygenie sowie der Polymorphismus der MHC führen dazu, dass jedes Individuum MHC-Moleküle unterschiedlicher Peptidbindungsspezifitäten besitzt. Bei einem Vergleich der MHC-Peptidome von nicht HLA-identischen Proben kann allein die HLA-Abhängigkeit der Antigenpräsentation folglich zu unterschiedlichen MHC-assoziierten Peptiden führen. Ein definitiver Ausschluss der HLA-Abhängigkeit als kausale Ursache von verschiedenen MHC-Peptidomen ist nur bei einem Vergleich HLA-identischer Proben möglich.

Zu diesem Zweck standen von den AML-Patienten P3 und P4 jeweils sowohl AML-Blasten vom Zeitpunkt der Diagnosestellung als auch Granulozyten (K8 bzw. K7) in Remission der Erkrankung zur Verfügung. Die Immunpräzipitation der Granulozyten K8, korrespondierend zu P3, führte nur zur Identifikation von

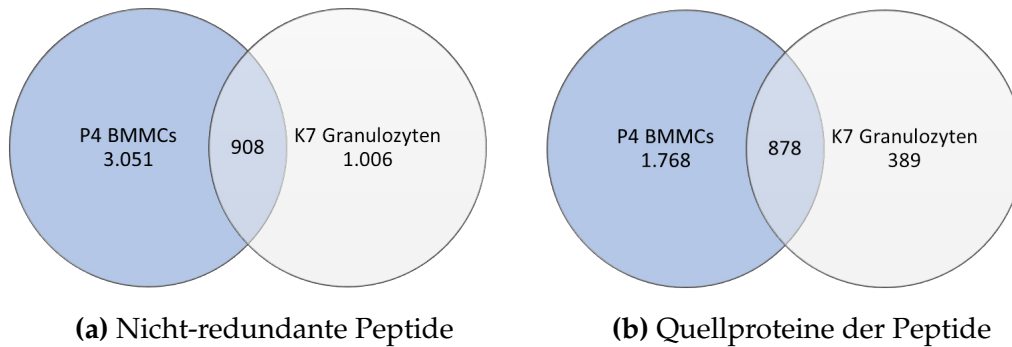


Abbildung 3.8: Übersicht über die Übereinstimmungen der (a) identifizierten Peptide und (b) zugehörigen Quellproteine der AML-Probe P4 und korrespondierenden Kontrollprobe K7

4 nicht-redundanten Peptiden, sodass hier ein Fehler in der Durchführung suggeriert wurde und somit kein direkter Vergleich mit dieser Aufarbeitung möglich war. Der anschließende Vergleich umfasst daher nur die AML-Blasten P4 mit den Granulozyten derselben Person nach allogener Stammzelltransplantation K7.

Bei P4 wurden insgesamt 3.959 und bei K7 1.914 Peptide über die Immunpräzipitation identifiziert. Dabei wurden die AML-Blasten einmal und die Kontrollgranulozyten zweimal aufgearbeitet. Die Übereinstimmungen der Peptide und Quellproteine zwischen den beiden Proben sind in dem Venn-Diagramm in Abbildung 3.8 dargestellt. 22,9 % der Peptide und 33,2 % der Quellproteine aus P4 kommen auch in K7 vor.

Zum Vergleich kamen 15,6 % der Peptide und 32,7 % der Quellproteine aller AML-Patientenproben in mindestens einer der Kontrollproben vor. In Nebeneinanderstellung mit den vorherigen Analysen ist die Übereinstimmung der Peptide somit zwischen den HLA-identischen Proben P4 und K7 deutlich höher, der Anteil übereinstimmender Quellproteine jedoch vergleichbar mit der allgemeinen Gegenüberstellung von AML-Patientenproben und Kontrollproben unterschiedlicher HLA-Typen.

3.4 Qualitative Analyse der MHC-Klasse-I-Peptidome

3.4.1 AML-exklusive Peptide und ihre Quellproteine

Nachfolgend wurden nun die Peptidsequenzen selbst im Hinblick auf potenziell interessante Zielantigene für eine antigenspezifische Immuntherapie der AML analysiert. Nach Anguille, Van Tendeloo und Berneman [48] sind unter anderem

die Leukämiespezifität sowie die regelmäßige Expression auf AML-Zellen bedeutende Kriterien für die Zielantigenauswahl: das Antigen sollte somit idealerweise ausschließlich, aber regelmäßig auf AML-Zellen präsentiert werden.

Zur Identifikation tumorspezifischer Peptide wurden in den nachfolgenden Analysen folglich lediglich die Peptide von „AML-exklusiven“ Antigenen berücksichtigt. Zur Definition dieser erfolgte die Analyse des Quellproteoms der Kontrollgruppe, welches als Negativkontrolle diente. Somit wurden in dieser Arbeit jene Peptide als „AML-exklusiv“ beschrieben, deren Quellproteine ausschließlich in AML-Zelllinien und/oder AML-Patientenmaterial vorkamen.

Insgesamt wurden 5.626 nicht-redundante AML-exklusive Peptide aus 2.918 Quellproteinen identifiziert, dies entspricht 41,1 % des in dieser Arbeit identifizierten AML-MHC-Klasse-I-Peptidoms. Die Häufigkeitsverteilungen, in wie vielen Proben die Peptide jeweils gefunden wurden, zeigt das Diagramm in Abbildung 3.9.

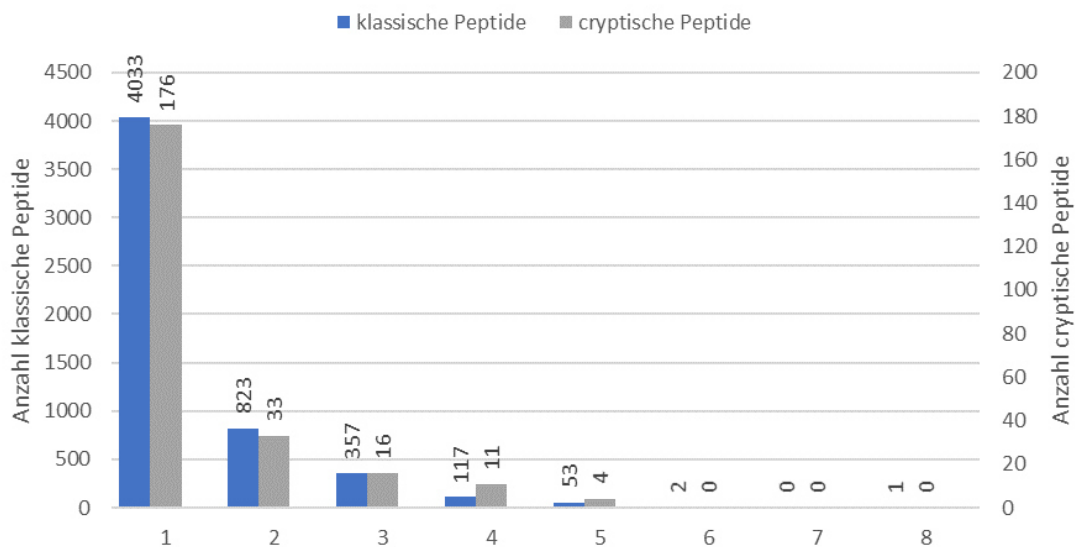


Abbildung 3.9: Anzahl der AML-Patientenproben und -Zelllinien, in denen jeweils eine definierte AML-exklusive Peptidsequenz gefunden wurde

Für die Zielsetzung dieser Arbeit waren von diesen Peptiden vor allem die mehrfach in unterschiedlichen Proben vorkommenden Peptide von besonderem Interesse. In den folgenden beiden Unterkapiteln wurden somit die am häufigsten auftretenden AML-exklusiven klassischen und kryptischen Peptide beschrieben. Die Auswertung von klassischen und kryptischen Peptiden erfolgt getrennt, so dass den kryptischen Peptiden trotz ihres selteneren Vorkommens ausreichend Bedeutung zugemessen werden konnte. In Anbetracht der Tatsache, dass vie-

le Transkripte vermeintlich nicht-codierender Genregionen ausschließlich in Tumorzellen exprimiert werden [69, 70], waren die kryptischen Peptide hier nämlich von besonderem Interesse.

3.4.1.1 Klassische Peptide und ihre Quellproteine

Es konnte eine Gesamtheit von 5.386 klassischen HLA-Klasse-I-Peptiden aus 2.749 Quellproteinen als AML-exklusiv beschrieben werden. Von diesen wurden 67,8 % ausschließlich auf Zellen der AML-Patienten, 21,2 % ausschließlich bei den AML-Zelllinien und die restlichen 11 % in beiden Probenkategorien identifiziert.

Die in Tabelle 3.1 dargestellten 56 Peptide aus 51 verschiedenen Quellproteinen kamen in mindestens 5 der insgesamt 11 Leukämie-Proben (45,5 %) vor. Diese stellten 1 % aller klassischen AML-exklusiven Peptide dar, weitere 8,8 % kamen in drei oder vier, 15,3 % in zwei und 74,9 % lediglich in einer Probe vor.

Nur ein Peptid, das NTTSAVTVK des 60 S-ribosomalen Quellproteins L37a, kam in acht der elf Proben (72,7 %) vor. Der Vorkommenshäufigkeit nach folgend wurde ein weiteres Peptid desselben Proteins, RTKKVGIVGK, sowie das Peptid ILDPHVLL vom Nuclear pore complex protein Nup88 identifiziert. Beide kamen in sechs Proben, entsprechend 54,5 %, vor.

Nur zwei Quellproteine sind Ursprung mehrerer AML-exklusiver klassischer Peptide, die in mindestens fünf Proben vorkamen. Dies sind zum Einen das bereits genannte 60 S-ribosomale Protein L37a (Peptide NTTSAVTVK, RTKKVGIVGK und YGTRYGASL) sowie das Structural maintenance of chromosomes Protein 4 (Peptide AVNPKEIASK, IIGPNGSGK, KVLDAIIQEK).

Für die 51 Quellproteine wurde eine funktionale Annotation durchgeführt (david.ncifcrf.gov, am 23.09.2019). Die Clusteranalyse zeigte eine heterogene Gesamtheit ohne erkennbare verbindende funktionale Charakteristika. Die Quellproteine entstammen verschiedenen Stoffwechsel- und Signalwegen, viele wurden dem allgemeinen Zellmetabolismus (ribosomaler Metabolismus, Translation, Transkription) zugeordnet.

Bei der Auswertung ist auffällig, dass 69,6 % der AML-exklusiven klassischen Peptide, welche in mindestens fünf der Leukämie-Proben vorkamen, u.a. dem HLA-Merkmal A*03:01 zugeordnet wurden. Im Vergleich wurden von der Gesamtheit aller AML-exklusiven klassischen Peptide nur 10,8 % dem Merkmal

Tabelle 3.1: AML-exklusive klassische Peptide, welche in mindestens 5 der Leukämie-Proben identifiziert wurden

	Peptid	Quellprotein	Vollständiger Quellproteinname	HLA
in 8 Pr.	NTTSAVTVK	RPL37A	60S ribosomal protein L37a	A*03:01 A*11:01 A*33:03
	ILDPHVLL	NUP88	Nuclear pore complex protein Nup88	A*01:01 A*02:01 C*04:01 C*05:01
in 6 Proben	RTKKVGIVGK	RPL37A	60S ribosomal protein L37a	A*03:01 A*31:01
	AIVDKVPSV	COPG1	Coatomer subunit gamma-1	A*02:01 B*08:01
Vorkommen in 5 Proben	AIYEPKTFK	MRPL20	39S ribosomal protein L20, mitochondrial	A*03:01
	AIYGRKFK	MPEG1	Macrophage-expressed gene 1 protein	A*03:01
	ALAPGLPTA	NENF	Neudesin	A*02:01
	ALLDGSNVVFK	PFDN6	Prefoldin subunit 6	A*03:01
	ALLDKLYAL	IMP3	U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein IMP3	A*02:01 B*08:01
	ALSTPVVEK	GTF2E2	Transcription initiation factor IIE subunit beta	A*03:01
	AQNAKVIEK	CXorf56	UPF0428 protein CXorf56	A*03:01
	ATGDMSSLK	AAMP	Angio-associated migratory cell protein	A*03:01 A*11:01
	ATSSTLVSK	STAC3	SH3 and cysteine-rich domain-containing protein 3	A*03:01 A*11:01
	AVAAVAARR	GANAB	Neutral alpha-glucosidase AB	A*03:01 A*11:01 A*33:03
	AVNPKEIASK	SMC4	Structural maintenance of chromosomes protein 4	A*03:01
	FAFEHSEEY	TCF25	Transcription factor 25	A*01:01 B*35:01 C*12:02
	FLDPNNIPKA	ALG8	Probable dolichyl pyrophosphate Glc1Man9GlcNAc2 alpha-1,3-glucosyltransferase	A*01:01 A*02:01
	FLWKEPATM	TCF25	Transcription factor 25	A*02:01 B*08:01 C*03:04
	GSYSSHSSK	ZEB2	Zinc finger E-box-binding homeobox 2	A*03:01
	HIMEIFSTY	RNPS1	RNA-binding protein with serine-rich domain 1	A*03:01 B*15:11 B*35:01 C*12:02
	HLVPEVPTV	ZBTB7B	Zinc finger and BTB domain-containing protein 7B	A*02:01
	HVAAPYIAK	ADNP	Activity-dependent neuroprotector homeobox protein	A*03:01 A*11:01
	IIGPNGSGK	SMC4	Structural maintenance of chromosomes protein 4	A*03:01
	IQFNPLSEK	KDM1B	Lysine-specific histone demethylase 1B	A*03:01
IVAGTLTNK	NDUFS7	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 7, mitochondrial	A*03:01	

Vorkommen in 5 Proben	KLDSVRVLR	MYC	Myc proto-oncogene protein	A*03:01
	KLGGVIKEK	NOP58	Nucleolar protein 58	A*03:01
	KLYEEGSNK	PSMA3	Proteasome subunit alpha type-3	A*03:01
	KVLDAIQEK	SMC4	Structural maintenance of chromosomes protein 4	A*03:01 A*11:01
	KVYTKSSHLK	KLF5	Krueppel-like factor 5	A*03:01
	LLGPPVGV	CIZ1	Cip1-interacting zinc finger protein	A*02:01
	LLYGPPGTGK	PEX1	Peroxisomal ATPase PEX1	A*03:01
	RAYPHVFTK	UQCRQ	Cytochrome b-c1 complex subunit 8	A*03:01
	RIGNFIVKK	SORD	Sorbitol dehydrogenase	A*03:01
	RIYNMEMARK	MRPS21	28S ribosomal protein S21, mitochondrial	A*03:01
	RLAEWKATKL	PDCL3	Phosducin-like protein 3	A*02:01 A*03:01
	RLAKNLVEK	GOLPH3	Golgi phosphoprotein 3	A*03:01
	RLQEDPPAGV	UBE2A	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 A	A*02:01
	RTAVVSLHK	METTL5	Methyltransferase-like protein 5	A*03:01 A*11:01
	RTDGHTLSEK	CNOT2	CCR4-NOT transcription complex subunit 2	A*03:01
	RTLEPLAKK	CEBPZOS		A*03:01
	SIFDGRVVAK	TMCO1	Calcium load-activated calcium channel	A*03:01
	SLLEKSLGL	EEF1E1- BLOC1S5		A*02:01 B*08:01
	SLMHSFILK	DYNLRB1	Dynein light chain roadblock-type 1	A*03:01
	SLYGPGTNR	NOL7	Nucleolar protein 7	A*03:01
	STNPKAALK	RPRD2	Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein 2	A*03:01 A*11:01
	STSEPLSSK	AC009086.2		A*03:01 A*11:01
	TLADVLYHV	ASH2L	Set1/Ash2 histone methyltransferase complex subunit ASH2	A*02:01
	TLDEATPTL	TAB1	TGF-beta-activated kinase 1 and MAP3K7-binding protein 1	A*01:01 A*02:01 C*05:01
	TSGPVTTSK	HTT	Huntingtin	A*03:01 A*11:01
	TVYRNPESFK	ARL10	ADP-ribosylation factor-like protein 10	A*03:01
	VLGAPVKGK	DDX56	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX56	A*03:01
	YGTRYGASL	RPL37A	60S ribosomal protein L37a	C*03:03 C*03:04 C*12:02 C*14:02
	YLDPAQRGV	METTL26	Methyltransferase-like 26	A*01:01 A*02:01 C*05:01
	YLHSQVSV	AL669918.1		A*02:01 B*08:01
	YPVEIHEY	C1D	Nuclear nucleic acid-binding protein C1D	B*18:01 B*35:01

A*03:01 zugewiesen. A*03:01 war jedoch mit Vorkommen in fünf AML-Patientenproben auch das am häufigsten vertretene HLA-Allel bei den Leukämie-Proben.

Trotz der Heterogenität der HLA-Typen der Proben ist jedoch festzuhalten, dass alleine mit den drei am häufigsten vorkommenden AML-exklusiven Peptiden (NTTSAVTVK, ILDPHVLL und RTKKVGIVGK) alle Leukämie-Proben abgedeckt sind, das heißt jede der Proben mindestens eines dieser Peptide präsentiert hat. Für die Entwicklung einer klinisch breit anwendbaren peptidspezifischen Immuntherapie stellt eine solche Peptidkombination ein enormes Potenzial dar.

3.4.1.2 Kryptische Peptide und ihre Quellproteine

Im Ganzen wurden 240 kryptische AML-exklusive Peptide aus 225 Quellproteinen identifiziert, diese repräsentieren 51,7 % des kryptischen Peptidoms der Leukämie-Proben. Der Ursprung lag zu 48,8 % im 5' untranslatierten Bereich, 30,8 % off-frame, 15,4 % in ncRNA, 2,9 % im 3' untranslatierten sowie 2,1 % im intronischen Bereich.

84,6 % dieser Peptide wurden exklusiv auf Zellen der AML-Patienten identifiziert, 9,6 % nur bei den AML-Zelllinien und 5,8 % in beiden Leukämie-Probenkategorien.

Zusätzlich wurde analysiert, in wie vielen Proben die Peptide jeweils vorkamen. Insgesamt 73,3 % aller kryptischen AML-exklusiven Peptide kamen jeweils nur in einer Probe vor, 13,8 % in zwei Proben und 12,9 % in drei bis fünf Proben. Letztere, das heißt alle 31 AML-exklusiven kryptischen Peptide welche in mindestens drei der elf Leukämie-Proben vorkamen, stellt die Tabelle 3.2 mit ihrem zugeordneten Quellprotein, ihrem Ursprung sowie dem zugeordneten HLA-Allel dar.

Ein einziges Quellprotein, der Magnesiumtransporter NIPA2 (non imprinted in Prader-Willi/Angelman syndrome 2), führte zu zwei Peptiden (RISHWTATK und RISHWTATKA), welche in mindestens drei Proben vorkamen. Alle weiteren Quellproteine führten jeweils nur zu einem Peptid, welches in mindestens drei Proben vorkamen. Die funktionelle Annotation zeigte eine Beteiligung an verschiedenen Stoffwechsel- und Signalwegen der Zelle, wobei vorrangig eine gehäufte Zuordnung (26,7 %) der Quellproteine zur Transkription und -regulation beobachtet wurde (david.ncifcrf.gov am 24.09.2019).

Alle vier Peptide, welche in fünf verschiedenen Proben identifiziert wurden, kamen in denselben fünf Proben vor: den AML-Patientenproben P1, P2, P5, P6 und

Tabelle 3.2: AML-exklusive kryptische Peptide, welche in mindestens drei der Leukämie-Proben identifiziert wurden

	Peptid	Protein-Symbol	Vollständiger Proteinname	Kateg.	Chr.	HLA
in 5 Proben	QLYRHSQEK	MFN2	Mitufosin 2	Off-frame	1	A*03:01
	RFYNPPGTPK	RNF130	Ringfingerprotein 130	5'UTR	5	A*03:01
	RISHWTATK	NIPA2	Magnesiumtransporter NIPA2	5'UTR	15	A*03:01
	SVLAPAGNK	MVB12A	Multivesicular body subunit 12A	5'UTR	19	A*03:01
Vorkommen in 4 Proben	ALYGGRIK	NFX1	Nuclear transcription factor, X-box binding 1	Off-frame	9	A*03:01
	HLDSRVGNTK	ZNF322	Zinkfingerprotein 322	5'UTR	6	A*03:01
	KTSQTLQK	MED21	Mediator complex subunit 21	Off-frame	12	A*03:01 A*11:01
	LLLDQLTKA	IFT122	Intraflagellar transport 122	5'UTR	3	A*02:01
	QTLRVHTLK	METTL5	Methyltransferase like 5	5'UTR	2	A*03:01 A*11:01
	RTTTWNTLK	COPS2	COP9 signalosome subunit 2	Off-frame	15	A*03:01
	RVHEVFRVVK	CUL5	Cullin5	5'UTR	11	A*03:01
	RVWKHLTK	LMBR1L	Limb development membrane protein 1 like	5'UTR	12	A*03:01
	SLFSGSFSK	FOSL2	FOS like 2, AP-1 transcription factor subunit	5'UTR	2	A*03:01
	VVISRAISVK	AP002360.2		ncRNA	11	A*03:01
	VVRASSGLK	CES2	Carboxylesterase 2	5'UTR	16	A*03:01
Vorkommen in 3 Proben	GVYTGKLEK	ZBTB17	zinc finger and BTB domain containing 17	5'UTR	1	A*03:01
	ILYEILLGK	AC245427.1		Off-frame	7	A*03:01
	ISDPGVQGY	ELP1	elongator complex protein 1	Off-frame	9	A*01:01 A*35:01
	KTLQTQIAK	RSRC2	arginine and serine rich coiled-coil 2	5'UTR	12	A*03:01
	KVLGDVATK	TLK1	tousled like kinase 1	Off-frame	2	A*03:01
	LIYFQTQRK	EEF1B2	eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2	5'UTR	2	A*03:01
	NYQGHFHLF	RMND5A	required for meiotic nuclear division 5 homolog A	Off-frame	2	A*24:02 A*23:01
	RISHWTATKA	NIPA2	NIPA magnesium transporter 2	5'UTR	15	A*03:01
	RLWKKSTPK	SNRNP25	small nuclear ribonucleoprotein U11/U12 subunit 25	Off-frame	16	A*03:01
	RSAEPWRTK	TWF2	twinfilin actin binding protein 2	5'UTR	3	A*03:01
	RTLPTSGTWTK	HTATSF1	HIV-1 Tat specific factor 1	Off-frame	X	A*03:01 A*11:01
	SADPGNLKY	SMG1P5	SMG1 pseudogene 5	ncRNA	16	A*01:01 B*35:01
	SLISTYFHV	CCDC88A	coiled-coil domain containing 88A	5'UTR	2	A*02:01
	TPVAVITDM(+15.99)	WAC	WW domain containing adaptor with coiled-coil	5'UTR	10	B*08:01 B*35:01
	VQYHGQHRV	SLC39A9	solute carrier family 39 member 9	5'UTR	14	A*02:01 B*52:01
	VTEKVYADTGLY	TMEM168	transmembrane protein 168	5'UTR	7	A*01:01 A*03:01

P7. Dies sind genau die fünf AML-Patienten, welche das HLA-Merkmal A*03:01 aufweisen. Insgesamt stellen die auf diesen Proben identifizierten Peptide 83,9 % der in mindestens drei Proben vorkommenden Peptide, jedoch nur 54,6 % aller kryptischen AML-exklusiven Peptide.

Allgemein wurde, wie auch schon bei den klassischen AML-exklusiven Peptiden beschrieben, ein Großteil der in mindestens drei Proben vorkommenden kryptischen Peptide (77,4 %) dem HLA-Merkmal A*03:01 zugeordnet. Kein weiteres HLA-Merkmal zeigte eine ähnliche Dominanz.

3.4.2 Vergleich mit in der Literatur beschriebenen Antigenen

3.4.2.1 Vergleich mit Tumorantigenen der AML

In der Literatur sind mehrere tumorspezifische und -assoziierte Antigene für die AML beschrieben. Die Identifizierung dieser Tumorantigene kann über genetische, reverse oder direkte zelluläre Ansätze stattfinden. Dabei ist der direkte zelluläre Ansatz, wie auch in der vorliegenden Arbeit durchgeführt, die bisher einzige Möglichkeit, das tatsächlich *in-vivo* präsentierte MHC-Peptidom zu analysieren.

Nachfolgend wurde untersucht, zu welchen bereits etablierten Tumorantigenen der AML in dieser Arbeit korrespondierende natürlich MHC-präsentierte Peptide in den verschiedenen Probenmaterialien, sowohl Leukämie- als auch benignen Zellen, gefunden wurden. Die Tabelle 3.3 zeigt eine Übersicht der von Anguille, Van Tendeloo und Berneman [48] herausgearbeiteten T-Zellepitope, welche als Grundlage für den durchgeführten Vergleich dienten, sowie die in dieser Arbeit identifizierten korrespondierenden Peptide.

Anguille, Van Tendeloo und Berneman [48] beschreiben insgesamt 38 Tumorantigene der AML, davon 5 leukämie-spezifische, 28 leukämie-assoziierte sowie 5 Krebs-Hoden-Antigene. In den Proben dieser Arbeit konnten 84 nicht-redundante Peptide identifiziert werden, welche 19 der 38 beschriebenen Tumorantigenen der AML repräsentieren.

Die einzelnen AML-Patientenproben zeigten korrespondierende Peptide zu zwei (P8) bis zehn (P4) und die AML-Zelllinien zu neun (ML-2) und zehn (THP-1) Tumorantigenen.

Neben den Leukämie-Proben zeigten zusätzlich sechs Kontrollproben Peptide zu mindestens einem Tumorantigen, das Maximum lag bei Peptiden zu fünf Tu-

Tabelle 3.3: Korrespondierende Peptide zu in der Literatur beschriebenen Tumorantigenen der AML [48]

	Tumorantigen	Alternative Symbole	Zugehörige Peptide in AML-Patienten und Zelllinien	Zugehörige Peptide in Kontrollen
1. Leukämie-spezifische Antigene	AML1-ETO	RUNX1-RUNX1T1		
	DEK-CAN			
	PML-RARα	PML-RARA		
	Fit3-ITD			
	NPM1 (Nucleophosmin 1)	NPM1	AVEEVSLRK (P5) DELHIVEA (P1) DENEHQLSL (P1) HQLSLRTV (P9) MSVQPTVSL (P5) TPPVVLR (P4) VEAEAM(+15.99)NY (P1) VEAKFINY (P1) YEGSPIKVTL (P2, P5)	
2. Leukämie-assoziierte Antigene	AurA (Aurora Kinase A)	AURKA		
	Bcl-2	BCL2, PPP1R50		
	BI-1 (Transmem-brane BAX inhibitor motif containing 6)	TMBIM6, BAX1	AYVHM(+15.99)VTHF (P8, P9, ML-2, THP-1) DALLKFSHI (P4, ML-2) YVHM(+15.99)VTHF (P8, ML-2, THP-1)	AAGAYVHM(+15.99)V (K4) ALYARRRSY (K1) AYVHM(+15.99)VTHF (K4, K2) DALLKFSHI (K7, K2)
	BMI1	RNF51		
	BRAP (BRCA1 associated protein)	BRAP2, IMP, RNF52	VYVERAEVL (ML-2, THP-1)	
	CML28 (Exosome complex component RRP46)	EXOSC5	HPRTSITV (P4)	
	CML66 (NudC domain-containing protein 1)	NUDCD1	DPFILHSI (P4, ML-2)	DPFILHSI (K7)
	Cyclin B1	CCNB1	ALVQDLAKA (THP-1) EEEQAVRPKY (ML-2) EEQAVRPKY (ML-2) GEVDVEQHTL (P1, P2, P3, P5) TLAKYLM(+15.99)EL (ML-2) VDVEQHTL (P1)	
	Cyclin E	CCNE1	IYPPKLHQF (THP-1)	
	CYP1B1 (cytochrome P450 family 1 subfamily B member 1)	CP1B	AAVGQAAHL (THP-1) FLDPRPLTV (P3, P6, ML-2, THP-1)	FLDPRPLTV (K7)
	ETO/MTG8			
	G250/CAIX			

HOXA9 (HomeoboxA9)	HOX1G		
hTERT (Telomerase reverse transcriptase)			
Mcl-1 (MCL1 apoptosis regulator)	BCL2L3	ETLRRVGDGVQR (P9) GRIVTLISF (P2) ISFGAFVAK (P1, P5, P6) RELGGGEAGAVL (P5) RPPPIGAEV (P6) RSWFGISNK (P5) SRKALETLR (P2) VEFFHVEDL (P1, P5)	KALETLRRV (K7, K4) RPPPIGAEV (K4, K5) TATPARLLF (K4) VEFFHVEDL (K3) ITDVLVRTK (K5)
Mesothelin	MSLN, CAK1, MPF		
LRH-1 (nuclear receptor subfamily 5 group A member 2)	NR5A2		
Myeloperoxidase	MPO	ADYLHVAL (P1) DFTPEPAAR (P1, P3, P7, P9) EEAKQLVDKAY (P7, ML-2) FVDASM(+15.99)VY (P1, P7) GEVDTSLVL (P1) GVSEPLKRR (P1) LTSFVDASM(+15.99)VY (P1) NQINALTSF (P6) PELTSM(+15.99)HTL (P2, P3, P6, P8) QPVAATRTA (P9) QPVAATRTAV (P6, P8) RDYLPLVL (P1) SEM(+15.99)PELTSM(+15.99) (P1, P3) SLWRRPFNV (ML-2) TDVLTPAQL (P1) TIRNQINAL (P6) TLLLREHNR (P4, P9) VLGPTAM(+15.99)RK (P1) YFKQPVAATR (P9)	FSM(+15.99)QQRQAL (K2, K3) PELTSM(+15.99)HTL (K1)
MPP11 (DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C)	DNAJC2, ZUO1	KM(+15.99)M(+15.99)EEVEKL (THP-1)	
MUC1 (Mucin 1)	CD227, PEM, MCD, MCKD, ADMCKD (1)		

	NuSAP1 (Nukleolär-und-Spindel-assoziertes Protein 1)	FLJ13421, LNP, ANKT, NuSAP1, APL, M037, PRO0310p1, Q0310	ATQTPVSNK (P2) ESIDQYIER (P9) SVASTPISQR (P5, P7) SVWTLTHSR (P4) VASTPISQR (P5)	
	OFA/iLRP			
	Proteinase 3	PRTN3	AEIVGGHEA (P1) LLLSGAARA (ML-2) NDVLLIQL (P1)	
	RGS5 (regulator of G protein signaling 5)			
	RHAMM (hyaluronan mediated motility receptor)	HMMR	KLQEELNKV (THP-1) RLNAALREK (P5)	
	SSX2IP (SSX family member 2 interacting protein)	hMsd1	KLDNQVSKV (ML-2, THP-1)	
	Survivin (baculoviral IAP repeat containing 5)	BIRC5, EPR-1		
	WT1	WAGR, WIT-2, AWT1, NPHS4	RIHTHGVFR (P4)	
3. Krebs-Hoden-Antigene	Cyclin A1	CCNA1, CT146	EPPAVLLL (P4, ML-2) SLM(+15.99)EPPAVLLL (ML-2)	
	MAGE family (Melanoma antigen family)		DVYPEIIEER (P9) EIDKNDHLY (P1, P4, P7) GVYDGEESHV (THP-1) GVYDGREHTV (THP-1) KEIDKEEHL (P5) KVLEHVVRV (THP-1) NADPQAVTM(+15.99) (P4, P5, P9, THP-1) SM(+15.99)M(+15.99)QTLTIV (P3) VPNSNPPEY (P6) VQPSKYHFL (THP-1) VQQRYSYR (P4)	ILISTPESL (K1) NADPQAVTM(+15.99) (K1)
	PASD1 (PAS domain containing repressor 1)	CT63		
	PRAME (preferentially expressed antigen in melanoma)	CT130	AAFDGRHSQTL (THP-1)	
	RAGE-1 (MOK protein kinase)	MOK, STK30		

morantigenen in einer Kontrollprobe (K7). Insgesamt wurden Peptide von sechs verschiedenen Tumorantigenen in den Kontrollproben identifiziert. Alle in Kontrollproben identifizierten Tumorantigene kamen jedoch auch in mindestens einer Leukämie-Probe vor.

Von den fünf beschriebenen „leukämie-spezifischen“ Tumorantigenen wurde nur eines, das Tumorantigen Nucleophoshmin 1, anhand MHC-Klasse-I-präsentierter Peptide in Proben dieser Arbeit gefunden. Hierzu wurden in fünf verschiedenen AML-Patientenproben insgesamt neun verschiedene korrespondierende Peptide sequenziert. Im Gegensatz dazu wurden in keiner AML-Zelllinie und keiner Kontrollprobe Peptide zu bekannten leukämie-spezifischen Antigenen identifiziert.

Bei den „leukämie-assoziierten“ Tumorantigenen wurden Peptide zu 15 der 28 beschriebenen Antigene gefunden. Davon waren zehn Tumorantigene lediglich in AML-Blasten von -Patienten und Zelllinien zu finden, fünf wurden gleichzeitig auch in Kontrollproben identifiziert.

Das dominanteste Tumorantigen war hier die Myeloperoxidase, zu welcher in acht der neun AML-Patientenproben sowie einer der zwei AML-Zelllinien zugehörige Peptide identifiziert wurden. Mit 19 verschiedenen Peptiden ist die Myeloperoxidase das Quellprotein, welches in den meisten AML-Proben vorkam und die meisten Peptide hervorbrachte. Eines der Peptide wurde ebenfalls in zwei Kontrollproben gefunden, zusätzlich auch noch ein weiteres zur Myeloperoxidase korrespondierendes Peptid in einer anderen Kontrollprobe.

Weitere dominante Quellproteine, die den leukämie-assoziierten Tumorantigenen zugeordnet werden, sind der MCL1-Apoptose-Regulator und das nukleolär- und-Spindel-assoziierte-Protein 1 (NuSAP1), beide führten zu Peptiden in fünf AML-Patientenproben; MCL1 zudem auch in vier Kontrollproben.

Zusammenfassend wurden natürlich präsentierte Peptide zu genau 50 % der von Anguille, Van Tendeloo und Berneman [48] beschriebenen Tumorantigene der AML in Proben dieser Arbeit nachgewiesen. Durch einen Vergleich der Quellproteine der Leukämie- und benignen Proben konnten 13 der 19 nachgewiesenen Tumorantigene in den hier untersuchten Proben als AML-exklusiv identifiziert werden, darunter ein leukämie-spezifisches Antigen, zehn leukämie-assoziierte Antigene und zwei Krebs-Hoden-Antigene.

3.4.2.2 Vergleich mit CMV-spezifischen T-Zell-Antigenen

Anhand klinischer Daten wurde mehrfach ein reduziertes Leukämierisikoprävalenz bei CMV-Reaktivierung nach allogener Stammzelltransplantation bei Leukämiepatienten beschrieben [63–66]. Es werden hierfür verschiedenste Hypothesen als Mechanismen diskutiert, unter anderem eine Kreuzreaktivität von CMV-spezifischen CD8⁺ T-Lymphozyten mit AML-Blasten. Ein solches kreuzreaktives Peptid auf AML-Blasten wäre als Zielantigen für eine Immuntherapie der AML von besonderer Bedeutung.

Zur Überprüfung der Hypothese der Kreuzreaktivität von CMV-spezifischen T-Zellen mit Antigenen auf AML-Zellen wurden die in dieser Arbeit identifizierten Peptide auf Überschneidungen mit bekannten CMV-Antigenen und ihren Proteinsequenzen untersucht.

Zunächst wurden alle Peptidsequenzen in alle möglichen Subsequenzvarianten mit einer Länge von sieben Aminosäuren aufgespalten. Die Originalpeptide dieser Arbeit zeigten eine Länge von 8 bis 15 Aminosäuren, sodass jedes Peptid zu mindestens zwei möglichen 7er-Sequenzen führte. Mit der Liste der 7er-Sequenzen wurde im Anschluss ein multipler Peptid Match über research.bioinformatics.udel.edu (abgerufen am 24.09.2018) durchgeführt. Bei diesem fand ein Abgleich der 7er-Sequenzen gegen das Proteom des Humanen Cytomegalovirus (Taxid 10359) statt, welches aus der Datenbank UniprotKB plus SwissProt bezogen wurde. Isoformen wurden in die Suche mit eingeschlossen. Für die aus dem Vergleich erhaltenen Übereinstimmungen wurde manuell überprüft, ob weitere direkt mit den Teilpeptiden benachbarte Aminosäuren der Originalpeptide sich mit der CMV-Proteinsequenz überlappten und somit um eine Sequenzüberlappung von mehr als sieben Aminosäuren vorlag.

Die zu den CMV-Proteinen korrespondierenden Gene wurden mit den von Sylvester et al. [62] beschriebenen CD8⁺ T-Zell-spezifischen immunogenen CMV-Protein-Zielstrukturen abgeglichen. Somit wurden die Überschneidungen mit jenen CMV-Proteinen identifiziert, welche nachgewiesen eine CMV-spezifische T-Zell-Antwort gegen die in Tabelle I.2 aufgelisteten Ursprungsgene hervorrufen.

Die Tabelle 3.4 stellt alle Sequenzhomologien mit einer Mindestlänge von sieben Aminosäuren zwischen allen in dieser Arbeit identifizierten Peptiden und dem Proteom des Humanen Cytomegalovirus dar.

Insgesamt waren 45 der Peptid-Subsequenzen mit mindestens sieben Aminosäu-

Tabelle 3.4: Identifizierte Übereinstimmungen der Peptidsequenzen mit dem CMV-Proteom der UniProtKB Datenbank. Die rot markierten Aminosäuren der Peptidsequenzen zeigen die Überschneidungen mit CMV-Proteinsequenzen. In den fett markierten Zeilen wurde das Quellprotein in dieser Arbeit als AML-exklusiv beschrieben. Die dunkelgrau hinterlegten korrespondierenden CMV-Proteine lösen nach Sylwester et al. [62] eine CD8⁺ T-Zell-spezifische Immunantwort aus.

Peptid		AML Pat.	AML Zelll.	Kontrollen	Peptid-Quellprotein	HLA	CMV-Protein
MAPRSLLL	klassisch	0/9	0/2	1/8	HLA-F	B*51:01	UL40
EVSSLIIR	klassisch	1/9	0/2	0/8	SETMAR	A*33:03	UL111A
SYGSGRRF	klassisch	1/9	1/2	1/8	AC078778.2	A*24:02, C*14:02	UL136
RRSSLVITTK	klassisch	1/9	0/2	0/8	KCNAB1	B*27:05	RL13
RYSRKGFLF	klassisch	1/9	1/2	0/8	SUPT5H	A*24:02	UL57
ALYATKTLR	klassisch	3/9	0/2	0/8	LATS1	A*03:01	US14
QLLTAIVKL	klassisch	0/9	1/2	0/8	AP1B1	A*02:01	UL51
SLSSLVVQL	klassisch	0/9	1/2	0/8	AC073896.4	A*02:01	UL95
MPPTSTTSTRF							UL31 (pp150)
MPPTSTTSTRF	kryptisch	0/9	1/2	0/8	AC008124.1	B*35:01	RL1
MPPTSTTSTRF							UL73
GTAPPTLAL	klassisch	0/9	1/2	0/8	LYL1	C*03:03	UL137
SLDSVRSVL	klassisch	0/9	0/2	1/8	MPP7	B*07:02	UL55 (gB)
TPRATLLTF	klassisch	0/9	0/2	1/8	IGF2R	B*07:02	TRS1/IRS1
VMAPRLLLL	klassisch	8/9	2/2	7/8	HLA-A	A*01:01, A*02:01, A*23:01, A*31:01, B*08:01, B*51:01, C*02:02, C*03:03, C*04:01, C*05:01, C*07:02, C*16:01	UL40
NLLALLLL	klassisch	0/9	0/2	1/8	MT-ND3	A*68:02	US29
RAAPPPPR	kryptisch	1/9	0/2	0/8	RHEB	A*03:01	UL101
RLSGIEERY	klassisch	0/9	0/2	1/8	SPTBN1	A*30:01	UL87
TVAEGLRQLY	klassisch	0/9	0/2	1/8	EHD1	A*30:04	UL24
AASSSLEK	klassisch	1/9	0/2	7/8	POTEI	A*03:01, A*11:01, A*30:04, A*31:01, C*02:02, C*03:03, C*03:04	UL122 (IE2)
TAASSSLEK	klassisch	0/9	0/2	3/8		A*03:01, A*30:04, C*02:02	
ATAASSSLEK	klassisch	3/9	0/2	4/8	PLEKHB2	A*03:01, A*11:01, A*30:04, A*31:01	UL48
ATAASSSLEK	klassisch	3/9	0/2	4/8	PLEKHB2	A*03:01, A*11:01, A*30:04, A*31:01	UL48
TASPPPPK	klassisch	1/9	0/2	0/8	SRRM1	A*11:01	UL50
SVSDLAPPRK	klassisch	1/9	0/2	0/8	ANAPC16	A*11:01	UL135
RELGGGEAGAVL	klassisch	1/9	0/2	0/8	MCL1	B*40:01	UL95
ATLGDCLKLVEK	klassisch	1/9	0/2	0/8	COPB1	A*11:01	UL48
AAAAAALLY	klassisch	2/9	0/2	1/8	ZFP36L2	A*01:01, A*03:01, B*35:01	UL124
SSSAASSLKK	klassisch	1/9	0/2	0/8		A*11:01	UL150A
GTSSAASSLK	klassisch	1/9	0/2	0/8	ARID1B	A*11:01	UL150A
GRYLRELL	klassisch	1/9	0/2	0/8	IP6K2	B*27:05	UL77
SSDGAISLLTY	klassisch	3/9	0/2	0/8	SEC13	A*01:01, B*35:01	UL123 (IE1)
ASSPHGLVM(+15.99)	klassisch	1/9	0/2	0/8	C3orf38	B*07:02	UL70
LTSSAVTTALK	kryptisch	4/9	0/2	0/8	LMO2	A*03:01, A*11:01	UL150A
LPPPPPPAM(+15.99)	klassisch	1/9	1/2	0/8	PRR12	B*51:01	UL112
LPPPPPHL	klassisch	0/9	1/2	0/8	CASC3	B*51:01	
APGSARRPL	klassisch	1/9	0/2	1/8	LAMP1	B*07:02, B*08:01	UL50
AAAAAAAAY							TRS1/IRS1
AAAAAAAAY bzw. AAAAAAAY	klassisch	1/9	1/2	0/8	TLE3	A*01:01, B*15:01	UL88
AAAAAAAAY							UL105
AAAAAAAATY							vgl. AAAAAAAY
AAAAAAAATY	klassisch	1/9	0/2	0/8	NKX2-4	A*01:01	TRS1/IRS1
AAAAAAAATY							UL38
YAAAAAAA	klassisch	0/9	1/2	0/8	IRX3	C*03:03	vgl. AAAAAAAY
SPSSVTGNAL	klassisch	1/9	0/2	1/8	TERF2IP	B*07:02, B*08:01	UL7/8
APSGVGAAL	kryptisch	1/9	0/2	0/8	RNF28	B*08:01	UL57
ATAPPGADK	klassisch	1/9	0/2	0/8	MED19	A*03:01	UL80
FAALHGPAL	klassisch	2/9	1/2	0/8	TTL12	A*02:01, C*03:03, C*03:04	UL6
M(+15.99)APPPRSV	klassisch	1/9	2/2	0/8	CBLL1	B*51:01, C*03:03	US17
RVITALVER	klassisch	1/9	0/2	1/8	KIF11	A*31:01	US24
STLESYQR	klassisch	2/9	0/2	1/8	STAT6	A*31:01, A*33:03	UL111A
GEGEQVTITL	klassisch	1/9	0/2	0/8	EAF2	B*40:01	UL141
LPPPPPPAM(+15.99)	klassisch	1/9	1/2	0/8	PRR12	B*51:01	UL69

ren mit Sequenzbereichen des CMV-Proteoms identisch. Diese stammen von Proben aller drei Probenkategorien, nur 3 Proben (P3, K8, K9) zeigten keine mit CMV homologe Subsequenz. Im Durchschnitt wurden bei den AML-Patientenproben 5,2, bei den AML-Zelllinien 8 und bei den Kontrollproben 3,7 übereinstimmende Peptide pro Probe gefunden. Das Maximum lag mit 12 Peptiden bei Probe P5. Die Peptide werden insgesamt 26 verschiedenen HLA-Allelen zugeordnet, am häufigsten den Allelen A*03:01, A*11:01, B*51:01 und C*03:03 .

Acht Subsequenzen zeigten sogar eine Sequenzübereinstimmung von acht und eine Subsequenz von neun Aminosäuren. Zwei Originalpeptide dieser Arbeit wurden in voller Länge im CMV-Proteom identifiziert: das klassische Peptid MAPRSLLL aus dem Quellprotein HLA-F sowie das ebenfalls klassische Peptid VMAPRTLLL aus dem HLA-A-Quellprotein. Beide wurden in dem CMV-Protein UL40 nachgewiesen.

Einige Subsequenzen kamen in mehreren Peptiden vor, die Anzahl ist in Klammern angegeben: AAAAAAA (3), AAAAAAA (3), AASSSSL (3), SSAASSL (2) sowie LPPPPPP (2). Die Subsequenzen AAAAAAA und AAAAAAAT wurden zusätzlich in zwei verschiedenen CMV-Proteinen identifiziert. Andersherum enthielten vier Peptide mehr als eine Subsequenz, die sich mit dem CMV-Proteom überschneidet: das Peptid MPTTSTTSTRF zeigte drei, die Peptide AAAAAAAAY, AAAAAAAATY und ATAASSSLEK je zwei verschiedene Subsequenzüberschneidungen.

Die zu den Subsequenzen korrespondierenden Peptide waren größtenteils klassischer Herkunft, nur vier der 46 Peptide waren kryptischen Ursprungs. Bei zwölf der Peptide wurden die dazugehörigen Quellproteine in dieser Arbeit als AML-exklusiv beschrieben.

Die Überschneidungen lagen mit insgesamt 38 verschiedenen CMV-Proteinen vor. Neun dieser CMV-Proteine wurden von Sylwester et al. [62] durch Nachweis einer CMV-spezifischen T-Zell-Antwort als immunogen nachgewiesen, diese sind in der Tabelle 3.4 durch dunkelgraue Felder markiert. Um das beschriebene erniedrigte Rezidivrisiko für AML-Patienten mit früherer CMV-Replikation nach Stammzelltransplantation [65] mit einer möglichen Kreuzreaktivität von CMV-spezifischen T-Zellen mit AML-Blasten zu erklären, bräuchte es eine Kreuzreaktivität von AML-Antigenen mit immunogenen CMV-Antigenen. Zur Erhöhung der Spezifität wären AML-exklusiven Antigenen vorteilhaft. Dies führt bei den Peptiden dieser Arbeit zu folgenden Kriterien: 1) AML-Exklusivität des dazugehörigen Quellproteins 2) Sequenzhomologie mit immunogenem CMV-

Protein. Zwei Peptide entsprachen diesen beiden Kriterien:

- **MPTTSTTSTRF**: Das kryptische Peptid entstammt der ncRNA des Gens AC008124.1 auf Chromosom 12 und wurde auf Zellen der AML-Zelllinie THP-1 identifiziert. Die MHC-Präsentation wurde dem HLA-Allel B*35:01 zugeordnet. Die Subsequenz MPTTSTTS mit einer Länge von acht Aminosäuren ist identisch mit einem Sequenzbereich des Tegumentproteins pp150 auf dem Gen UL32 des humanen Cytomegalovirus.
- **AAAAAAAATY**: Dieses klassische Peptid, identifiziert im Probenmaterial des AML-Pat. P6, wurde über das HLA-Allel A*01:01 präsentiert und stammt von dem Homeoboxprotein NKX2-4 ab. Dies ist ein Transkriptionsfaktor mit prognostizierter intrazellulärer Lokalisation und mRNA-Expression vor allem in den Geweben des Hypothalamus, der Hypophyse und der Hoden, gering jedoch auch in Monozyten (Human Protein Atlas [77]). Die beiden Subsequenzen des Peptids AAAAAAAA und AAAAAAAT mit je acht Aminosäuren stimmen mit Sequenzbereichen des CMV-Tegumentproteins TRS1/IRS1 überein. Zusätzlich ist die sieben Aminosäuren lange Subsequenz AAAAAAA mit einem Bereich der DNA-Replikationshelikase auf dem CMV-Gen UL105 homolog.

Beide dieser Peptide könnten potenziell eine Kreuzreaktion bei bei CMV-spezifischen CD8⁺ T-Lymphozyten auslösen und das verminderte Rezidivrisiko der AML bei CMV-Reaktivierung nach allogener Stammzelltransplantation erklären.

Die AML ist eine maligne Neoplasie hämatopoetischer Stammzellen der myeloischen Zellreihe. Sie tritt mit einer Inzidenz von 3,7 Erkrankungen pro 100.000 Einwohnern auf und zeigt eine stark ansteigende Häufigkeit im Alter, 80 % der akuten Leukämien im Erwachsenenalter sind AML [51]. Trotz intensiver Forschung nach Therapiemöglichkeiten ist die Prognose derzeit eingeschränkt und stark abhängig vom Alter sowie molekularen und zytogenetischen Veränderungen. Im schwedischen Register lagen die 5-Jahresüberlebensraten bei Patienten unter 30 Jahren bei 60 %, in der Altersgruppe zwischen 55 und 64 Jahren lediglich bei 23 % und sanken im Alter weiter ab [78]. Die Therapie erfolgt risikoadaptiert nach Therapieprotokollen innerhalb von Studiengruppen. Die höchsten Heilungsraten werden durch die myeloablative allogene Transplantation hämatopoetischer Stammzellen erzielt. Diese ermöglicht durch den GvL-Effekt, bei welchem die Spender-T-Lymphozyten die Tumorzellen als fremd erkennen und angreifen, zum Teil eine Langzeitremission [2].

Die erzielten Erfolge der Stammzelltransplantationen sprechen für das Potenzial immuntherapeutischer Anwendungen bei einer AML sowie die Immunogenität der Tumorzellen. Weitere Ansätze der AML-Tumorimmuntherapie sind bisher nicht routinemäßig in der klinischen Anwendung etabliert. Der Blick auf die Erfolge neuer Immuntherapien bei anderen hämatologischen Tumorerkrankungen, beispielsweise der CAR-T-Zelltherapie für die ALL (Akute lymphatische Leukämie)[79] und das Multiple Myelom [80], lässt den Wunsch nach einer effizienten immuntherapeutischen Anwendung für die AML wachsen. Für CAR-T-Zell- und weitere antigenspezifische Therapien ist die Wahl eines geeigneten tumorspezifischen Zielantigens essentiell und vermutlich die größte Hürde in der Etablierung

der Verfahren für die AML [3, 44].

Grundlegend für den Erfolg einer antigenspezifischen Immuntherapie ist die Präsentation von Peptiden durch die Tumorzellen, welche abhängig von deren Expression der MHC-Moleküle ist. Seit langem gilt eine Verminderung der MHC-Expression auf Tumorzellen als klassischer Tumorigmunevasionsmechanismus [75] - eine Herunterregulierung der MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche führt zu einer verminderten Suszeptibilität für zytotoxische T-Lymphozyten und NK-Zellen. Der Erfolg T-Zell-basierter Immuntherapien kann mithin stark beeinträchtigt werden [74] und setzt folglich eine ausreichende MHC-Expression der Zielzellen voraus.

Anhand eines indirekten Immunfluoreszenz-Assays wurden in der vorliegenden Arbeit die Oberflächen- und intrazellulären MHC-Klasse-I-Moleküle quantifiziert. Die Ergebnisse der MHC-Quantifizierung bestätigten keine verminderte MHC-Klasse-I-Expression auf AML-Blasten. Im Gegenteil lag die durchschnittliche Anzahl an MHC-Klasse-I-Molekülen pro Zelle bei den AML-Blasten sogar signifikant über der mittleren Gesamtmolekülzahl der benignen Kontrollgranulozyten. Vergleichbare Ergebnisse wurden ebenfalls durch vorherige Arbeiten beschrieben [81, 82]. Die beobachtete Überexpression auf den Tumorzellen könnte durch eine Induktion der MHC-Expression durch Entzündungsreaktionen oder Lymphokinfreisetzungen in der Tumorumgebung erklärt werden [83]. Hierdurch ließe sich auch erläutern, weshalb der Anteil intrazellulärer Moleküle an der Gesamtheit der MHC-Klasse-I-Moleküle bei AML-Patienten geringer war als bei den AML-Zelllinien und Kontrollgranulozyten: Nur die Zellen der AML-Patienten entstammten einer natürlichen Tumorumgebung, welche die verstärkte Präsentation der MHC-Moleküle induziert haben könnte.

Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson wies eine statistisch signifikante mittelstarke positive lineare Korrelation zwischen der MHC-Klasse-I-Molekülzahl und der Summe identifizierter nicht-redundanter Peptide für die Gesamtheit aller Proben nach. Es kann somit die Hypothese aufgestellt werden, dass durch die Überexpression der MHC-Klasse-I-Moleküle auf den AML-Blasten vermehrt auch die Peptide präsentiert werden, welche bei der geringeren MHC-Molekülzahl benigner Zellen zurückgehalten werden. Diese könnten als AML-exklusive Peptide von besonderer Bedeutung sein.

Bei dem verwendeten Verfahren zur HLA-Quantifizierung wurden die Proben zunächst mit einem der murinen Primärantikörpern W6/32 oder BB7.2 inkubiert und anschließend mit einem fluoreszierendem Anti-Maus-Antikörper gefärbt.

Die nachfolgende Messung der Fluoreszenzintensität im Durchflusszytometer ermöglichte anhand der definierten Referenzwerte der ebenfalls vermessenen Kalibrierungsbeads einen Rückschluss auf die Quantität der Zielantigene der Primärantikörper. Die Methode ist in dieser Weise stark abhängig von der Affinität und Spezifität aller verwendeten Antikörper. Um die unspezifische Hintergrundbildung des Anti-Maus-Antikörpers zu ermitteln, wurde eine Negativkontrolle, gefärbt mit einem murinen Antikörper desselben Isotyps, welcher keine Bindung mit humanen Antigenen eingeht, angefertigt. Durch die Subtraktion des Signals der Anti-Maus-Negativkontrolle vom Ergebnis wurde das Hintergrundsignal auf die verwendeten Primärantikörper W6/32 und BB7.2 reduziert.

Die Affinität des verwendeten pan-MHC-Klasse-I-Primärantikörpers W6/32 aus dem Interfakultären Institut für Zellbiologie in Tübingen wurde durch einen Vergleich mit einem kommerziell erhältlichen Antikörper W6/32 evaluiert: Die Gegenüberstellung bei der MHC-Quantifizierung von dem für diese Arbeit verwendeten Antikörper W6/32 des Tübinger Instituts sowie des von uns genutzten kommerziell erhältlichen Antikörpers W6/32 (vgl. Abschnitt 2.2.5.2) erbrachte keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Antikörpern. Der verwendete Antikörper entspricht demgemäß vermutlich der Qualität weiterer erhältlicher Antikörper des Klons W6/32. Unter der Voraussetzung einer zusätzlich bereits erfolgten Qualitätssicherung im Rahmen der Antikörperproduktion wurde auf weitere Versuche zur Antikörpertestung verzichtet.

Sollte der Antikörper weiter validiert werden, so wäre es jedoch möglich, die Kriterien der International Working Group for Antibody Validation zu überprüfen: Diese beschreiben insgesamt fünf verschiedene Säulen zur Validierung von Antikörpern, wobei das jeweilige Vorgehen anwendungsspezifisch angepasst werden soll. Für die Methode der Immunpräzipitation ist zum einen die genetische Säule empfohlen, bei welcher ein Antikörper, der spezifisch für ein bestimmtes Protein ist, mit einer Probe getestet wird, welche aufgrund genetischer Veränderungen dieses Protein nicht mehr exprimiert [84]. Das Hintergrundsignal des verwendeten Antikörpers W6/32 ließe sich folglich durch eine Immunpräzipitation mit Zellen ohne MHC-Klasse-I-Moleküle ermitteln. Zudem wäre es eine weitere Möglichkeit, den Antikörper W6/32 anderen anti-MHC-Klasse-I-Klonen gegenüberzustellen.

Bisher wurde keine absolute Mindestanzahl an MHC-Molekülen für ein erfolgreiches Ansprechen auf T-Zell-basierte Immuntherapien definiert, sodass zur Beurteilung der Ergebnisse lediglich der Vergleich mit benignen Zellen zu Rate gezogen werden kann. Die Überexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen

bei AML-Blasten in Gegenüberstellung zu den benignen Kontrollgranulozyten spricht dabei für eine potenzielle Eignung der AML-Blasten als Targets für eine T-Zell-Immuntherapie.

In Abhängigkeit von dem Zielliganden einer solchen Therapie, sollte jedoch die allel-spezifische MHC-Expression überprüft werden. Bei der erfolgten Quantifizierung der MHC-Klasse-I-Moleküle mit dem pan-MHC-Klasse-I-Antikörper W6/32 bliebe ein Verlust eines spezifischen HLA-Allels, wie zum Teil für Tumore beschrieben [83], unerkant. Die stark interindividuell unterschiedlichen Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten spezifischen HLA-A*02-Quantifizierung unterlegen den Sachverhalt, dass man von der Gesamtheit der MHC-Moleküle nicht auf die Expression eines einzelnen Allels schließen sollte. Es sollten somit für jedes potenzielle Targetpeptid die Allele spezifisch überprüft werden, über welche das Peptid präsentiert wird.

Ein geeignetes Zielantigen für antigenspezifische Therapieansätze zeichnet sich idealerweise durch seine ausschließliche, aber regelmäßige Expression auf den AML-Zellen, Onkogenität, Immunogenität sowie nachweisbare klinische Relevanz aus [48]. Die Grundlage für die Immunogenität eines Antigens ist seine Präsentation über MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche, welche für die Erkennung durch T-Lymphozyten unabdingbar ist. Soll ein Peptid von zytotoxischen CD8⁺ T-Lymphozyten erkannt werden, so muss es auf der Tumorzelle über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert werden.

Durch breite *in-silico* Genom- und Transkriptomanalysen wurden bereits zahlreiche tumorspezifische Antigene beschrieben. Trotz fortgeschrittener bioinformatischer Algorithmen zur Vorhersage der Immunogenität der Liganden konnten in den nachfolgenden Versuchen zur Validierung der T-Zell-Antwort diese jedoch nur teils bestätigen [47]. Das derzeitige Wissen über die tatsächlich *in-vivo* präsentierten MHC-Klasse-I-Peptidome auf AML-Blasten ist derzeit hingegen stark begrenzt. Das in dieser Arbeit durchgeführte direkte zelluläre, massenspektrometrisch basierte Verfahren der Immunpräzipitation ermöglichte genau die Identifikation jener Peptide, welche *in-vivo* von MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden.

Obwohl das gewählte Verfahren die Identifikation einer Vielzahl natürlich präsentierter Peptide ermöglichte, so wies die Auswertung der drei Gütekriterien Validität, Objektivität und Reliabilität auch Limitationen der Methode auf. Definierte man als Ziel der Methode allein die Identifizierung MHC-präsentierter Peptide, so konnten die Validität und Objektivität ohne weiteres bestätigt werden: die Ergebnisse führten, unabhängig vom Versuchsleiter, zu einer großen

Anzahl identifizierter MHC-präsentierter Peptide: Insgesamt wurde in der vorliegenden Arbeit eine Gesamtheit von 17.750 nicht-redundanten MHC-Klasse-I-präsentierten Peptiden identifiziert. Darunter konnte eine Vielzahl von 5.626 Peptiden mit Präsentationsfrequenzen bis zu 72 % als AML-exklusiv beschrieben werden.

Dem entgegengesetzt wurde die Reliabilität nur eingeschränkt belegt: Mehrfache Wiederholungen des Verfahrens erbrachten zwar ähnliche Anzahlen an identifizierten Peptiden, durchschnittlich 1.729 Peptide pro Probe, jedoch unterschieden sich diese in ihren Peptidsequenzen. Ein Peptid X, welches in der Probe A im ersten Durchlauf identifiziert wurde, wurde demnach nicht immer auch im zweiten oder dritten Durchlauf der Probe A nachgewiesen. Die Sensitivität der Methode, das Peptid X zu identifizieren, ist somit limitiert. Eine durchgeführte logarithmische Regressionsanalyse zeigte nachfolgend, dass anhand einer einzelnen Aufarbeitung nur circa 6 % der potenziell nachweisbaren Peptide identifiziert wurden. Eine Eignung der Methode zur Identifizierung des gesamten MHC-Peptidoms einer Probe besteht demgemäß nicht. Dies bestätigt auch die von Hassan et al. [85] durchgeführte Quantifizierung der MHC-präsentierten Peptide mittels isotopisch markierter MHC-Peptid-Komplexe, welche alle Verluste im Laufe der gesamten Probenaufarbeitung mit erfasste. Insgesamt wurde dabei sogar nur eine Peptidausbeute von 0,5 bis 3 % beschrieben. Weitere Versuche zeigten, dass 90 bis 99 % der Peptidverluste auf den Schritt der Immunpräzipitation zurückzuführen seien [85]. Mögliche spezifische Ursachen könnten hier in der Bindungsspezifität und Affinität des verwendeten Antikörpers sowie den vielen nötigen Waschschritten liegen [86].

Trotz der geringen Ausbeute ist die Methode der Immunpräzipitation auf Basis einer Immunoaffinitätschromatographie jedoch anderen Methoden zur Identifizierung MHC-Klasse-I-präsentierter Peptide deutlich überlegen: Eine ebenfalls massenspektrometrie-basierte Alternative wäre beispielsweise die Isolation der Peptide durch eine milde saure Elution der Peptide von der Zelloberfläche ganzer Zellen, bei welcher jedoch auch eine Elution kontaminierender, nicht-MHC-präsentierter Peptide stattfände [87]. Zudem betrage die Ausbeute identifizierter MHC-Klasse-I-präsentierter Peptide bei dieser Methode nur etwa ein Sechstel der durch die Immunpräzipitation identifizierten Peptide [88].

Insgesamt wurden mononukleäre Zellen von neun AML-Patienten, zwei AML-Zelllinien sowie acht gesunden Kontroll-Spendern in der Immunpräzipitation aufgearbeitet.

Einschlusskriterien für die AML-Patienten war neben der Diagnose der AML

ein Blastenanteil von mindestens 80% im Nativmaterial. Im weiteren Verlauf der Aufarbeitung erfolgte keine weitere Zellsortierung, folglich ist nicht sicher auszuschließen, dass wenige benigne Zellen mit den Leukämie-Proben aufgearbeitet wurden. Da ein großer Teil der Proben jedoch deutlich über 90% Blasten enthielt, lässt sich annehmen, dass dies maximal bei wenigen Ausnahmen der Fall ist und die Wertigkeit der Ergebnisse nicht mindert. So wählte die ähnlich angelegte Studie von Berlin et al. [81] zur Identifizierung von MHC-Peptidomen in Leukämiepatientenmaterial mit dem Cut-off-Wert von 80 % Blasten und keiner weiteren Zellsortierung das gleiche Vorgehen. Sollte die Methode jedoch mit soliden Tumoren durchgeführt werden, so hätte die Zellsortierung aufgrund des häufig höheren Anteils von beispielsweise Bindegewebszellen oder Leukozyten einen größeren Stellenwert.

Aus den MHC-Klasse-I-Peptiden der Granulozyten acht gesunder Spender wurde zum Vergleich ein Benignom gebildet. Mit der Ausnahme der beiden Kontrollproben, welche von AML-Patienten in Remission der Erkrankungen stammten, lagen jedoch keine HLA-identischen AML- und Kontrollproben vor. Zudem kamen nicht alle in den Leukämie-Proben vorkommenden HLA-Allele ebenfalls in den Kontrollproben vor. Zumal die verschiedenen MHC-Moleküle jedoch unterschiedliche Peptidbindungsspezifitäten aufweisen, besteht indessen eine HLA-Abhängigkeit der MHC-präsentierten Peptide. Bei einem Vergleich nicht-HLA-identischer Proben kann somit allein die HLA-Abhängigkeit der Antigenpräsentation zu unterschiedlichen MHC-Peptidomen führen. Für die in dieser Arbeit als AML-exklusiv identifizierten Peptide bedeutet dies, dass ein Teil der Peptide bei einer Erweiterung der Kontrollgruppe seinen Status der AML-Exklusivität mutmaßlich verlieren würde. Der Aufbau einer größeren Benignom-Datenbank mit einem breiteren Spektrum an HLA-Allotypen wäre somit für weitere Analysen sinnvoll. Es ist jedoch hervorzuheben, dass bei dem durchgeführten Vergleich einer AML- mit HLA-identischer Kontrollprobe in Gegenüberstellung zu nicht-HLA-identischen Vergleichen lediglich eine höhere Übereinstimmung der präsentierten Peptide gefunden wurde, nicht jedoch der zugehörigen Quellproteine. Die Definition der AML-exklusiven Peptide dieser Arbeit erfolgte jedoch genau auf Grundlage der Quellproteome: Nur die Peptide, deren zugehörigen Quellproteine kein Peptid in der Kontrollgruppe hervorbrachten, wurden als AML-exklusiv identifiziert. Es kann folglich die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Differenz der HLA-Allotypen der AML- und Kontrollproben die Aussagekraft der identifizierten AML-exklusiven Peptide nicht signifikant mindern sollte.

Die Identifikation der MHC-Klasse-I-Peptidome der AML-Blasten und Kontrollen führte zu insgesamt 17.750 nicht-redundanten Peptiden. Mit einem Durchschnittswert von 2.290 nicht-redundanten Peptiden pro AML-Patient wurden deutlich höhere Peptidanzahlen als in der Vergleichsstudie von Berlin et al. [81] erzielt. Dementgegen beträgt der Maximalwert dieser Arbeit mit 3.959 Peptiden in einer AML-Probe nur ein Bruchteil der maximal identifizierten Peptidanzahl bei Proben eines humanem Melanoms [89] - dies könnte jedoch auf die bekannte intratumoröse Zellheterogenität des Melanoms [90] zurückzuführen sein.

Angesichts der Tatsache, dass viele vermeintlich nicht-codierende Transkripte nur in Tumorzellen exprimiert werden [69, 70], stellen die Peptide der Transkripte vermeintlich nicht-codierender Genregionen oder von Translationen außerhalb des Leserasters, sogenannte kryptische Peptide, eine potenziell bedeutende Quelle tumorspezifischer Antigene dar.

Der durchschnittliche Anteil der kryptischen Peptide am gesamten MHC-Klasse-I-Peptidom lag bei den AML-Patienten dieser Arbeit bei 3,3 %. Obgleich dieser Wert nur etwa der Hälfte des von Laumont et al. [22] beschriebenen Anteils der kryptischen Peptide bei einer B-lymphoblastoiden Zelllinie entspricht, so lassen sich die Ergebnisse beider Arbeiten dennoch vereinen: Die Analysen dieser Arbeit wiesen auf eine starke HLA-Abhängigkeit hin, mit einer vermehrten Expression der kryptischen Peptide auf den Molekülen der HLA-Allele A*03:01, A*11:01, A*31:01, A*33:03, B*27:05 und B*44:03. Diese HLA-Abhängigkeit stimmt mit den Beobachtungen von Laumont et al. [22] überein. Betrachtet man die spezifischen Bindemotive der HLA-Allele, so gehören alle genannten HLA-A-Allele demselben HLA-Supertypen an, welcher sich durch eine basische Aminosäure an Position 9 seines Bindemotivs definiert [91]. Kryptische Peptide zeigen, vermutlich bedingt durch eine Proteasom-unabhängige Prozessierung, im Gegensatz zu klassischen Peptiden andere Aminosäurekombinationen in ihrem C-Terminus. Für die Position 1 des C-Terminus eines kryptischen Peptids sind dabei polare Aminosäuren beschrieben [22]. Bei einem Peptid einer Länge von 9 Aminosäuren entspricht dabei die Position 1 des C-Terminus der Position 9 des Bindemotivs. Eine dort positionierte polare Aminosäure führt zu einer Bindung über das Bindemotiv der besagten HLA-Allele. Die bevorzugte Bindung kryptischer Peptide an spezifische HLA-Allele scheint folglich schlüssig und könnte auf den abweichenden C-Terminus zurückgeführt werden. Infolge des Sachverhalts, dass die in der Vergleichsarbeit verwendete Zelllinie sowohl das Allel HLA-A*03:01 als auch -B*44:03 besitzt [22], ist der dortige höhere Anteil kryptischer Peptiden nachvollziehbar.

Da klassische Datenanalysen der Massenspektrometrie lediglich Peptidsequenzen aus Referenzdatenbanken identifizieren können, bedarf die Identifikation der kryptischen Peptide eines besonderen Analysealgorithmus. Durch eine De-Novo-Sequenzierung wurde in der vorliegenden Arbeit die Bestimmung der Peptidsequenzen unabhängig von Proteindatenbanken ermöglicht: Hierfür wurden die isolierten Peptide im Anschluss an die Immunpräzipitation und Aufreinigung zunächst mittels Nano-LC-MS/MS analysiert. Nachfolgend erfolgte die Weiterverarbeitung der massenspektrometrischen Rohdaten zu den einzelnen Peptidsequenzen. Die Datenanalyse basierte dabei auf einer zunächst durchgeführten De-Novo-Sequenzierung. Im weiteren Verlauf wurden die identifizierten Peptide anhand eines Analysealgorithmus unter anderem mit dem humanen Genom und Transkriptom abgeglichen sowie weiter gefiltert.

Anhand der gemessenen Peptidionenfragmentspektren können die Aminosäuren der Peptidsequenzen jedoch nicht mit hundertprozentiger Wahrscheinlichkeit abgeleitet werden. Vielmehr wurden mittels der Spektren und ALC-Scores zunächst Listen der wahrscheinlichsten Peptidsequenzen gebildet, welche im Anschluss durch den Analysealgorithmus weiter gefiltert wurden. Unter anderem wurde hierfür in der nachfolgend verwendeten Analysesoftware Spotfire ein Grenzwert von $\leq 10\%$ für die FDR nach dem Target-Decoy-Ansatz gewählt. Definierte man einen kleineren Wert für die FDR, beispielsweise zwischen 1 und 5 % wie in Vergleichsarbeiten [81, 89, 92, 93], so wäre zwar die Rate falscher Peptide weiter minimiert, jedoch die Anzahl der identifizierten Peptide darunter stark reduziert. Damit könnten vor allem niedrig abundante Peptide, die dennoch bedeutend sein können, in der Analyse verloren gehen. Der gewählte Grenzwert von 10 % ist somit als Kompromiss zwischen minimaler Fehlerwahrscheinlichkeit und maximaler Peptidausbeute anzusehen.

Trotz einer gering vorhandenen Fehlerwahrscheinlichkeit ist die Datenanalyse auf Grundlage der De-Novo-Sequenzierung als großes Plus zu unterstreichen. Nur anhand dieser konnten Peptide aus Transkripten aller möglichen Leseraster aller genomischer Regionen identifiziert und die kryptischen Peptide in die Auswertung eingeschlossen werden.

Obwohl der in der vorliegenden Arbeit verwendete Analysealgorithmus der De-Novo-Sequenzierung unter Verwendung humaner Genom- und Transkriptomdatenbanken bereits zur Identifizierung kryptischer Peptide führt, werden jedoch keine Peptide erfasst, welche durch tumorspezifische DNA-Alterationen entstehen [94]. Erst eine Kombination der massenspektrometrischen Peptidomanalyse mit der Genom- und Transkriptomsequenzierungen ein- und desselben Patien-

tenmaterials ermöglicht die Identifizierung solcher Neoantigene, die durch Mutationen in der DNA der malignen Zellen entstehen [47, 95]. Für die Identifizierung klinisch relevanter Neoantigene beim Humanen Melanom [89] konnte diese Methode bereits erfolgreich eingesetzt werden. Im Hinblick auf die Tatsache, dass 99 % der tumorspezifischen Mutationen in nicht-codierenden Genregionen vorkommen [96], stellt das kryptische Peptidom eine potenziell reichhaltige Quelle für Neoantigene dar. Diese spielen eine bedeutende Rolle als potenzielle Therapietargets. Die Kombination der bereits durchgeführten massenspektrometrischen De-Novo- könnte durch die zusätzliche Genomsequenzierung desselben Patientenmaterials und Einbau der Genom-Daten in die Analysedatenbank zur Identifizierung AML-spezifischer kryptischer Neoantigene führen. Dies würde zusätzliche Möglichkeiten öffnen und in Zukunft zu einer Weiterentwicklung der verwendeten Methode führen.

Die für ein ideales Zielantigen genannten Kriterien der Leukämiespezifität und regelmäßigen Expression auf AML-Blasten [48] wurden von einer Vielzahl der identifizierten Peptide erfüllt: Von insgesamt 5.386 identifizierten AML-exklusiven klassischen Peptiden kamen 56 verschiedene Peptide in mindestens fünf der elf untersuchten Leukämie-Proben vor. Darunter zeigte das Peptid NTTSAVTVK des 60 S-ribosomalen Quellproteins L37a mit Vorkommen in acht AML-Proben die höchste Präsentationsfrequenz. Nähme man die drei meist präsentertesten AML-exklusiven Peptide dieser Arbeit (NTTSAVTVK, ILDPHVLL und RTKKVGIVGK) als Targets einer Immuntherapie, so deckte diese Kombination alle untersuchten Leukämie-Proben mindestens einfach ab.

Von den kryptischen Peptiden wurden 240 Peptide als AML-exklusiv definiert, dies entspricht circa jedem zweiten identifizierten kryptischen Peptid. Auch hier konnten Übereinstimmungen zwischen verschiedenen Proben beobachtet werden: 31 der AML-exklusiven kryptischen Peptide kamen in mindestens drei der elf der Leukämie-Proben vor.

Es können somit die Ergebnisse vorheriger Arbeiten bestätigt werden, dass eine Vielzahl tumorspezifischer klassischer und kryptischer Peptide auf den MHC-Klasse-I-Molekülen der Tumorzellen präsentiert und diese zum Teil von verschiedenen Individuen geteilt werden [22, 81, 89]. Der durchgeführte Vergleich mit etablierten Tumorantigenen zeigte zu 19 der 38 von Anguille, Van Tendeloo und Berneman [48] beschriebenen etablierten AML-Tumorantigenen korrespondierende Peptide in dieser Arbeit. Von sechs dieser bestätigten Tumorantigenen wurden jedoch auch Peptide in Proben gesunder Spender identifiziert. Es wurde somit die Peptidexpression *in-vivo* von 50 % der etablierten Tumorantigene [48]

nachgewiesen - zu den anderen 50 % der beschriebenen AML-Tumorantigenen jedoch kein korrelierendes Peptid in den untersuchten AML-Proben identifiziert. Dies unterstreicht erneut die Bedeutung der Identifizierung natürlich präsentierter Peptide im Vergleich zu anderen Vorhersagemethoden.

Auffällig bei der Betrachtung der mehrfach identifizierten Peptide ist die häufige Präsentation durch das gleiche Allel oder Allele desselben HLA-Supertypen nach Lund et al. [91]. So teilten sich beispielsweise alle fünf untersuchten HLA-A*03:01 positiven Leukämie-Proben ganze vier identische AML-exklusive kryptische Peptide. Dies weist erneut darauf hin, wie bedeutend die Ausprägung der HLA-Allele für das präsentierte Peptidrepertoire einer Zelle ist. Diese HLA-Abhängigkeit der Peptidpräsentation sollte bei der Entwicklung antigenspezifischer Tumormimmuntherapien unbedingt berücksichtigt werden.

Zum einen könnte für jeden Patienten anhand des HLA-Allotyps eine HLA-spezifische Therapie erstellt werden. Singh-Jasuja, Emmerich und Rammensee [32] schlagen für einen Multipeptidimpfstoff vor, pro HLA-Allel ein Set von sechs bis zehn Peptiden zu erarbeiten, die in den meisten Tumorpatienten vorkämen. Kämen die Peptide bei jeweils 60 % der Patienten vor, so würden damit bei über 80 % der Patienten mindestens drei verschiedene T-Zellantworten hervorgerufen. Die Peptidsets der verschiedenen Allele könnten dann je nach Patienten unterschiedlich kombiniert werden. Obgleich die Spezifität dieses Ansatzes sehr attraktiv ist, sind aufgrund der Patientenindividualität jedoch erheblicher Zeitaufwand und Kosten damit verbunden. Eine routinemäßige Anwendung dieses Konzeptes in der Klinik scheint somit in naher Zukunft nicht realistisch.

Zum anderen könnte eine nicht-personalisierte, breit anwendbare Immuntherapie angestrebt werden. Dieser Ansatz basiert auf einer fixen Kombination der Therapie-Targets, welche die häufigsten HLA-Allotypen der Bevölkerung abdecken. Im Gegensatz zum vorherigen Therapiekonzept gewinnt dieses Vorgehen durch seine einfachere und kosteneffizientere Anwendung an Attraktivität. Die Auswahl optimaler Targets trägt hierbei besondere Bedeutung, um trotz weniger Angriffspunkte pro Patienten eine ausreichende Wirkung der Therapie zu erzielen. Bestätigten sich die zuvor genannten drei AML-exklusiven Peptide, welche in allen untersuchten Leukämie-Proben präsentiert wurden, in der weiteren Validierung als AML-exklusiv und immunogen, so erfüllten diese die Voraussetzungen optimal.

Die Prüfung der Immunogenität der identifizierten Peptide spielt auf dem weiteren Weg zur Auswahl geeigneter Therapietargets eine essenzielle Rolle - an-

hand der durchgeführten Versuche kann hierüber bisher keine Aussage getroffen werden. Erst die Erkennung MHC-Klasse-I-präsentierter Peptide durch das Immunsystem, vor allem CD8⁺ T-Lymphozyten, führt zu der gewünschten Immunantwort. Im nächsten Schritt sollten die identifizierten AML-exklusiven Peptide mit hohen Präsentationsfrequenzen somit anhand eines Immunogenitätstests weiter gefiltert werden. Zunächst könnte eine Überprüfung der CD8⁺-T-Zellreaktivität *in-vitro* beispielsweise mittels eines Interferon- γ ELISpot (Enzyme Linked Immuno Spot)-Assays durchgeführt werden, bei welchem die CD8⁺-T-Lymphozyten durch die zu überprüfenden Peptide stimuliert werden [97]. Im weiteren Verlauf der Validierung eines Peptids ist jedoch auch eine Kontrolle der Immunogenität *in-vivo* unabdingbar [48].

Eine bedeutende Immunogenität *in-vivo* ist auf jeden Fall für Antigene des Cytomegalovirus beschrieben: durchschnittlich 10 % und zum Teil ≥ 20 % aller CD8⁺ T-Gedächtniszellen CMV-seropositiver Spender zeigen spezifische Reaktionen auf den Virus [62]. Während die Bildung CMV-spezifischer CD8⁺ Effektor- und Gedächtniszellpopulationen induziert wird, verläuft sowohl die Primärinfektion als auch die anschließende lebenslange Persistenz des Virus bei Immunkompetenten meist symptomlos. Dementgegen kann eine Infektion beziehungsweise Virusreaktivierung bei immungeschwächten Patienten zu schweren Symptomen führen. [61]

Paradoxerweise, obwohl stammzelltransplantierte Patienten eben jener immungeschwächten Gruppe angehören, wurde hier ein positiver Effekt einer CMV-Reaktivierung beschrieben: Klinische Daten weisen ein vermindertes Rezidivrisiko der AML bei CMV-Reaktivierung nach allogener Stammzelltransplantation auf [63–66]. Der Mechanismus hierfür ist bislang ungeklärt. Möglich wäre dabei eine Kreuzreaktivität zwischen CMV-spezifischen T-Lymphozyten und tumorspezifischen Antigenen auf den AML-Blasten [65] - aufgrund des enormen immunogenen Potenzials wäre eine antitumoröse Kreuzreaktion als GvL-Effekt denkbar. Die Identifizierung eines solchen kreuzreaktiven Peptids wäre für die Entwicklung einer effektiven Immuntherapie der AML folglich von großem Interesse.

Entgegen der Hypothese von Nachbaur et al. [66], welche eine Kreuzreaktivität von CMV-spezifischen T-Lymphozyten auf ein HLA-A*02-beschränktes mHAg auf Leukämiezellen suggeriert, konnten andere durchgeführte Studien die Hypothese der HLA-A*02-beschränkten Kreuzreaktivität auf mHAg nicht bestätigen [65, 98]. Vor diesem Hintergrund wurde bei der Suche nach kreuzreaktiven Determinanten in der vorliegenden Arbeit das gesamte MHC-Klasse-I-präsentierte

Peptidrepertoire in Betracht gezogen.

Es wurden 45 identische Sequenzbereiche einer Mindestlänge von sieben Aminosäuren zwischen identifizierten MHC-Klasse-I-präsentierten Peptiden und dem CMV-Proteom ermittelt. Für kreuzreaktiv-erkannte Determinanten werden zumeist partiell identische Aminosäuresequenzen oder zumindest strukturelle Ähnlichkeiten wie Größe, Ladung und Hydrophobizität in bestimmten Positionen beschrieben [13]. Da ein TCR vor allem die zentralen Aminosäuren eines Peptids erkennt, können TCR-MHC-Peptid-Bindungen trotz eines Aminosäureaustauschs an den Seiten des Peptids entstehen und zur Kreuzreaktivität führen [99]. Bei einer durchschnittlichen Länge der MHC-Klasse-I-präsentierten Peptide von 8 bis 16 Aminosäuren [7] ist eine Kreuzreaktivität bei einer Übereinstimmung von mindestens sieben aufeinanderfolgenden Aminosäuren gut vorstellbar.

Ein potenziell klinisch relevantes Peptid sollte zudem im Idealfall AML-Exklusivität aufweisen sowie die Immunogenität des homologen CMV-Proteins nachgewiesen sein. Zwei der identifizierten Sequenzhomologien erfüllten beide dieser Kriterien: Die korrespondierenden Peptide waren das kryptische Peptid MPTTSTTSTRF der ncRNA des Gens AC008124.1 präsentiert durch HLA-B*35:01 sowie das klassische Peptid AAAAAAAATY des Homeobox-proteins NKX2-4 präsentiert durch HLA-A*01:01. Die weitere Verifizierung dieser potenziell kreuzreaktiven Peptide könnte mittels eines Interferon- γ ELISpot-Assays erfolgen. Eine Interferon- γ Produktion durch CMV-spezifische T-Lymphozyten nach Stimulation durch die zu testenden AML-Peptide spräche dabei für eine vorliegende Kreuzreaktivität.

Während der beschriebene positive Effekt der CMV-Reaktivierung nach allogener Stammzelltransplantation auf den GvL-Effekt der Spender-T-Lymphozyten zurückzuführen ist, wäre es für mögliche Therapieansätze bedeutend, die Klonalität der T-Lymphozyten in AML-Patienten zu kennen. Sollte sich ein relevanter Anteil der T-Lymphozyten auch bei AML-Patienten, die CMV-Seropositivität sei hier vorausgesetzt, als CMV-spezifisch erweisen, so könnte eine Reaktivierung der patienteneigenen T-Lymphozyten potenziell zu einer wirksamen Immunantwort gegen die AML führen. Zhang et al. [100] zeigten für erwachsene AML-Patienten bereits, dass bei vergleichsweise reduzierter TCR-Klonalität der Anteil virusspezifischer TCR's höher war als bei Proben gesunder Spender - die mangelnde Funktionalität könnte unter anderem dem immunsuppressiven Tumormilieu zugeschrieben werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden zahlreiche Peptide als potenzielle Targets ei-

ner Immuntherapie der AML identifiziert. Auf dem Weg zur Entwicklung einer immuntherapeutischen Anwendung zählt dies als bedeutender erster Schritt und Grundlage jedes T-Zell-basierten Therapieansatzes.

Voraussetzung für die erfolgreiche Anwendung einer solchen Immuntherapie ist zudem das Vorhandensein funktionsfähiger T-Zellpopulationen. Während kein Konsens über die Hoch- oder Herunterregulierung der absoluten T-Lymphozytenzahl in AML-Patienten besteht [100, 101], liegt durch die verschiedenen Tumormimmunescapemechanismen jedoch häufig eine Dysfunktion der T-Lymphozyten vor. Immunsuppressive Zellen und lösliche Faktoren in der Tumormikroumgebung führen zu einer Inhibition der T-Lymphozyten, zudem können die Liganden inhibitorischer Immuncheckpoints auf den Tumorzellen exprimiert werden oder notwendige kostimulatorische Moleküle zur T-Zellaktivierung fehlen [5, 31].

Ein vielversprechender Ansatz, der Immunescape der Tumorzellen entgegenzuwirken und die natürliche antitumoröse Immunantwort zu stärken, liegt in der Blockade der inhibitorischen Immuncheckpoints. Die Anwendung von Checkpoint-Inhibitoren, beispielsweise gegen das CTLA-4 (zytotoxisches T-Lymphozyten-Antigen 4) oder PD-1, wird derzeit vielfach in Studien untersucht [4, 5, 102]. Hier wäre auch eine Reaktivierung der virusspezifischen T-Lymphozyten in AML-Patienten und somit eine Boosterung der eventuellen Kreuzreaktion cmv-spezifischer T-Lymphozyten mit AML-Peptiden vorstellbar.

Zusätzlich zur unspezifischen Verstärkung der natürlichen Immunantwort sollten verschiedene zielgerichtete Therapieansätze in Betracht gezogen werden. Die auf tumorspezifischen Antigenen basierende Vakzinierung hat die spezifische Vermehrung und Aktivierung tumorreaktiver T-Lymphozyten als Ziel. In der Etablierung der Tumorstimmungsreaktion traten dabei vor allem die Auswahl geeigneter Targets sowie die Induktion einer klinisch relevanten Immunantwort in den Vordergrund. Eine Verstärkung der Immunantwort kann unter anderem durch Adjuvantien und Immunomodulatoren, wie beispielsweise das Zytokin GM-CSF (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor) oder Cyclophosphamid, hervorgerufen werden, sodass bereits klinische Erfolge der Tumorstimmungsreaktion gezeigt werden konnten [45, 103]. Anhand der zu berücksichtigenden Faktoren wurden in dieser Arbeit potenzielle Targets einer Vakzinierung ermittelt.

Eine weitere hochspezifische Möglichkeit stellen CAR-T-Zellen dar, dessen Spezifität gezielt auf ein bestimmtes Antigen gerichtet ist. Mit dem Blick auf den Erfolg der CD19-spezifischen CAR-T-Zelltherapie für die ALL und Non-Hodgkin-

Lymphome [39] sollte dieser Ansatz auch für die AML weiter verfolgt werden. Die Kombination von beispielsweise Immuncheckpointinhibitoren zur Überwindung des immunsuppressiven Milieus der Tumormikroumgebung mit zielgerichteten Immuntherapien wie Tumorstimmungsreaktionen oder CAR-T-Zellen weist für die Zukunft der AML-Therapie hoffnungsvolle Möglichkeiten auf. Die größte Herausforderung lag hier bisher in der Auswahl eines geeigneten Targets [3] und weist erneut auf die Bedeutung der Identifizierung tumorspezifischer Antigene hin.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit zahlreiche potenzielle MHC-Klasse-I-präsentierte Targetpeptide ermittelt: Von den insgesamt 17.750 identifizierten MHC-Klasse-I-präsentierten Peptiden konnten 5.626 Peptide als AML-exklusiv beschrieben werden. Hierunter waren neben kryptischen Peptiden vermeintlich nicht-codierenden Ursprungs auch potenziell CMV-kreuzreaktive Peptide, die zu der reduzierten Rezidivrate bei CMV-Infektion nach allogener Stammzelltransplantation führen könnten. Die ermittelten Peptide legen somit einen bedeutenden Grundstein in der weiteren Etablierung antigenspezifischer immuntherapeutischer Anwendungen bei AML-Patienten.

Die AML stellt mit einem Anteil von 80 % an den akuten Leukämien bei Erwachsenen [2] eine bedeutende Erkrankung für die Gesellschaft dar. Aufgrund fehlender durchbrechender Erfolge in der Therapieentwicklung liegt die durchschnittliche Fünfjahresüberlebensrate dennoch nur bei etwa 25 % [1]. Der Blick auf die Kraft des GvL-Effekts nach allogener Stammzelltransplantation, eine Langzeitremission der AML erzielen zu können, weist jedoch auf die Immunogenität und Eignung der Erkrankung für neue immuntherapeutische Ansätze hin.

Anhand der Kartierung der *in-vivo* präsentierten MHC-Klasse-I-Peptidome auf AML-Blasten sollten in dieser Arbeit potenziell geeignete Therapietargets identifiziert werden um eine breitere Anwendung immuntherapeutischer Strategien bei AML-Patienten zu ermöglichen.

Auf primären Patientenmaterialien, Zelllinien und benignen Zellen wurden hierzu über eine Immunoaffinitätschromatographie mit nachfolgenden Purifizierungsschritten die MHC-präsentierten Peptide massenspektrometrisch-basiert identifiziert. Zusätzlich erfolgte eine Quantifizierung der Oberflächen- und intrazellulären MHC-Klasse-I-Moleküle der verwendeten Proben durch einen indirekten Immunfluoreszenz-Assay.

Unter der Gesamtheit von 17.750 identifizierten nicht-redundanten MHC-Klasse-I-präsentierten Peptiden konnte eine Vielzahl von 5.626 Peptiden mit Präsentationsfrequenzen bis zu 72 % als AML-exklusiv beschrieben werden. Hierunter wurden 240 kryptische Peptide vermeintlich nicht-codierenden Ursprungs identifiziert. Zudem wurden mehrere potenziell CMV-kreuzreaktive AML-Peptide erfasst, die zu der reduzierten Rezidivrate bei CMV-Infektion nach allogener

Stammzelltransplantation [63–66] führen könnten.

Bei der MHC-Quantifizierung wiesen die AML-Blasten keine verminderte MHC-Expression auf und stellten sich somit als geeignete Targetzellen für eine T-Zell-Immuntherapie dar.

Im nächsten Schritt sollten zur Validierung der identifizierten AML-exklusiven Peptide unter anderem ein Vergleich mit einem größeren Benignom sowie Immunogenitätstests erfolgen. Bei der nachfolgenden Wahl eines geeigneten T-Zell-basierten Therapieansatzes sollten zudem mögliche Tumorummunevasionsmechanismen berücksichtigt und konterkariert werden.

Insgesamt wurde mit den Daten dieser Arbeit ein breite Grundlage für die weitere Entwicklung einer effizienten Immuntherapie der AML geschaffen.

- [1] Klaus Kraywinkel und Claudia Spix. „Epidemiologie akuter Leukämien in Deutschland“. In: *Onkologe* 23.7 (2017), S. 499–503.
- [2] Gerd Herold. *Innere Medizin 2017*. 2016.
- [3] Susanne Hofmann et al. „Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cell Therapy in Acute Myeloid Leukemia (AML)“. In: *Journal of Clinical Medicine* 8.2 (2019), S. 200.
- [4] Maximilian Stahl und Aaron D. Goldberg. „Immune Checkpoint Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia: Novel Combinations and Therapeutic Targets“. In: *Current Oncology Reports* 21.4 (2019).
- [5] Adam J. Lambie und Evan F. Lind. *Targeting the immune microenvironment in acute myeloid leukemia: A focus on T cell immunity*. 2018.
- [6] Jacqueline Parkin und Bryony Cohen. *An overview of the immune system*. 2001.
- [7] Abul K Abbas et al. *Cellular and molecular immunology*. English. ninth edit. Elsevier, 2018.
- [8] Kenneth Murphy et al. *Janeway Immunologie*. German. 9.Auflage. Springer Spektrum, 2018.
- [9] M. Attaf et al. „The T cell antigen receptor: The Swiss army knife of the immune system“. In: *Clinical and Experimental Immunology* 181.1 (2015), S. 1–18.
- [10] T P Arstila et al. „A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity.“ eng. In: *Science (New York, N.Y.)* 286.5441 (1999), S. 958–961.
- [11] Jamie Rossjohn et al. „T Cell Antigen Receptor Recognition of Antigen-Presenting Molecules“. In: *Annual Review of Immunology* 33.1 (2015), S. 169–200.

- [12] Don Mason. „A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T- cell receptor“. In: *Immunology Today* (1998).
- [13] Matthias Regner. „Cross-reactivity in T-cell antigen recognition“. In: *Immunology & Cell Biology* 79.2 (2001), S. 91–100.
- [14] Leremy A. Colf et al. „How a Single T Cell Receptor Recognizes Both Self and Foreign MHC“. In: *Cell* 129.1 (2007), S. 135–146.
- [15] Yiyuan Yin und Roy A. Mariuzza. „The Multiple Mechanisms of T Cell Receptor Cross-reactivity“. In: *Immunity* 31.6 (2009), S. 849–851.
- [16] Catherine Mazza et al. „How much can a T-cell antigen receptor adapt to structurally distinct antigenic peptides?“ In: *EMBO Journal* 26.7 (2007), S. 1972–1983.
- [17] Yili Li et al. „Structure of a human autoimmune TCR bound to a myelin basic protein self-peptide and a multiple sclerosis-associated MHC class II molecule“. In: *EMBO Journal* (2005).
- [18] Whitney A. Macdonald et al. „T Cell Allorecognition via Molecular Mimicry“. In: *Immunity* 31.6 (2009), S. 897–908.
- [19] Oleg Y. Borbulevych et al. „T Cell Receptor Cross-reactivity Directed by Antigen-Dependent Tuning of Peptide-MHC Molecular Flexibility“. In: *Immunity* 31.6 (2009), S. 885–896.
- [20] Brian M. Baker et al. „Structural and dynamic control of T-cell receptor specificity, cross-reactivity, and binding mechanism“. In: *Immunological Reviews* 250.1 (2012), S. 10–31.
- [21] Céline M. Laumont und Claude Perreault. „Exploiting non-canonical translation to identify new targets for T cell-based cancer immunotherapy“. In: *Cellular and Molecular Life Sciences* 75.4 (2018), S. 607–621.
- [22] Céline M. Laumont et al. „Global proteogenomic analysis of human MHC class I-associated peptides derived from non-canonical reading frames“. In: *Nature Communications* (2016).
- [23] Sarah Djebali et al. „Landscape of transcription in human cells“. In: *Nature* (2012).
- [24] Shelley R. Starck und Nilabh Shastri. *Nowhere to hide: unconventional translation yields cryptic peptides for immune surveillance*. 2016.
- [25] Douglas Hanahan und Robert A Weinberg. „Hallmarks of cancer: the next generation.“ In: *Cell* 144.5 (2011), S. 646–74.
- [26] P. Ehrlich. „Über Den Jetzigen Stand Der Karzinomforschung““ *Beiträge zur experimentellen*. 1909.
- [27] F. M. Burnet. *The concept of immunological surveillance*. 1970.

- [28] Vijay Shankaran et al. „IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity“. In: *Nature* 410.6832 (2001), S. 1107–1111.
- [29] Claire M. Vajdic und Marina T. Van Leeuwen. „Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation“. In: *International Journal of Cancer* 125.8 (2009), S. 1747–1754.
- [30] Gavin P. Dunn, Lloyd J. Old und Robert D. Schreiber. „The Three Es of Cancer Immunoediting“. In: *Annual Review of Immunology* 22.1 (2004), S. 329–360.
- [31] Dass S. Vinay et al. „Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies“. In: *Seminars in Cancer Biology* 35 (2015), S185–S198.
- [32] Harpreet Singh-Jasuja, N. P N Emmerich und Hans Georg Rammensee. „The Tübingen approach: Identification, selection, and validation of tumor-associated HLA peptides for cancer therapy“. In: *Cancer Immunology, Immunotherapy* 53.3 (2004), S. 187–195.
- [33] Steven A. Rosenberg. „Entering the mainstream of cancer treatment“. In: *Nature Reviews Clinical Oncology* (2014).
- [34] Hani Choudhry et al. „Prospects of IL-2 in Cancer Immunotherapy“. In: *BioMed Research International* 2018 (2018), S. 1–7.
- [35] Louis M. Weiner, Madhav V. Dhodapkar und Soldano Ferrone. „Monoclonal antibodies for cancer immunotherapy“. In: *The Lancet* 373.9668 (2009), S. 1033–1040.
- [36] Suresh Veeramani et al. „Rituximab infusion induces NK activation in lymphoma patients with the high-affinity CD16 polymorphism“. In: *Blood* (2011).
- [37] George J. Weiner. „Rituximab: Mechanism of action“. In: *Seminars in Hematology* 47.2 (2010), S. 115–123.
- [38] Saar Gill und Carl H. June. „Going viral: Chimeric antigen receptor T-cell therapy for hematological malignancies“. In: *Immunological Reviews* (2015).
- [39] Zijun Zhao et al. „The application of CAR-T cell therapy in hematological malignancies: advantages and challenges“. In: *Acta Pharmaceutica Sinica B* 8.4 (2018), S. 539–551.
- [40] Sherly Mardiana und Saar Gill. *CAR T Cells for Acute Myeloid Leukemia: State of the Art and Future Directions*. 2020.
- [41] Julie R. Brahmer, Hans Hammers und Evan J. Lipson. „Nivolumab: Targeting PD-1 to bolster antitumor immunity“. In: *Future Oncology* 11.9 (2015), S. 1307–1326.

- [42] Matthieu Collin. „Immune checkpoint inhibitors: the battle of giants“. In: *Pharmaceutical Patent Analyst* 6.4 (2017), S. 137–139.
- [43] David Avigan und Jacalyn Rosenblatt. *Vaccine therapy in hematologic malignancies*. 2018.
- [44] Sofia Farkona, Eleftherios P. Diamandis und Ivan M. Blasutig. „Cancer immunotherapy: The beginning of the end of cancer?“ In: *BMC Medicine* 14.1 (2016), S. 1–18.
- [45] Steffen Walter et al. „Multi-peptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival“. In: *Nature Medicine* (2012).
- [46] Yong-chen Lu und Paul F Robbins. „Cancer immunotherapy targeting neoantigens“. In: *Seminars in Immunology* 28.1 (2016), S. 22–27.
- [47] Eva Bräunlein und Angela M. Krackhardt. „Identification and Characterization of Neoantigens As Well As Respective Immune Responses in Cancer Patients“. In: *Frontiers in Immunology* (2017).
- [48] S. Anguille, V. F. Van Tendeloo und Z. N. Berneman. *Leukemia-associated antigens and their relevance to the immunotherapy of acute myeloid leukemia*. 2012.
- [49] Michal Bassani-Sternberg und George Coukos. „Mass spectrometry-based antigen discovery for cancer immunotherapy“. In: *Current Opinion in Immunology* 41 (2016), S. 9–17.
- [50] Ugur Sahin, Özlem Türeci und Michael Pfreundschuh. „Serological identification of human tumor antigens“. In: *Current Opinion in Immunology* 9.5 (1997), S. 709–716.
- [51] Christoph Röllig et al. „Akute myeloische Leukämie (AML)“. In: *Onkologia Leitlinien* (2018).
- [52] Hartmut Döhner et al. *Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel*. 2017.
- [53] Kompetenznetz Leukämie. *AML Klassifikation*. 2015.
- [54] J. H Frederik Falkenburg und Edus H. Warren. „Graft versus Leukemia Reactivity after Allogeneic Stem Cell Transplantation“. In: *Biology of Blood and Marrow Transplantation* (2011).
- [55] Hans Jochem Kolb. „Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes“. In: *Blood* (2008).
- [56] Hans Jochem Kolb et al. „Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras“. In: *Blood* 103.3 (2004), S. 767–776.

- [57] M. Kapp et al. „CD8+ T-cell responses to tumor-associated antigens correlate with superior relapse-free survival after allo-SCT“. In: *Bone Marrow Transplantation* 43.5 (2009), S. 399–410.
- [58] Jacob M. Rowe. *Graft-versus-disease effect following allogeneic transplantation for acute leukaemia*. 2008.
- [59] Michael J. Cannon, D. Scott Schmid und Terri B. Hyde. *Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection*. 2010.
- [60] Daniel Lancini et al. „Cytomegalovirus disease in immunocompetent adults“. In: *Medical Journal of Australia* 201.10 (2014), S. 578–580.
- [61] Paul Klenerman und Annette Oxenius. „T cell responses to cytomegalovirus“. In: *Nature Reviews Immunology* 16.6 (2016), S. 367–377.
- [62] Andrew W Sylwester et al. „Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4 and CD8 T cells dominate the memory compartments of exposed subjects“. In: 202.5 (2005), S. 673–686.
- [63] B. Lönnqvist et al. „Reduced risk of recurrent leukaemia in bone marrow transplant recipients after cytomegalovirus infection“. In: *British Journal of Haematology* (1986).
- [64] Nicolle H.R. Litjens et al. „Potential beneficial effects of cytomegalovirus infection after transplantation“. In: *Frontiers in Immunology* 9.MAR (2018).
- [65] Ahmet H. Elmaagacli et al. „Early human cytomegalovirus replication after transplantation is associated with a decreased relapse risk: Evidence for a putative virus-versus-leukemia effect in acute myeloid leukemia patients“. In: *Blood* (2011).
- [66] David Nachbaur et al. „Survival after bone marrow transplantation from cytomegalovirus seropositive sibling donors“. In: *Lancet* 358.9288 (2001), S. 1157–1159.
- [67] Zinaida Peric et al. *Early human cytomegalovirus reactivation is associated with lower incidence of relapse of myeloproliferative disorders after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. 2018.
- [68] Jae-Ho Yoon et al. „Impact of cytomegalovirus reactivation on relapse and survival in patients with acute leukemia who received allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in first remission.“ In: *Oncotarget* 7.13 (2016), S. 17230–41.
- [69] Nicole M. White et al. „Transcriptome sequencing reveals altered long intergenic non-coding RNAs in lung cancer“. In: *Genome biology* (2014).

- [70] Thomas Trimarchi et al. „Genome-wide mapping and characterization of notch-regulated long noncoding RNAs in acute leukemia“. In: *Cell* (2014).
- [71] Axel M. Gressner und Torsten Arndt. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Hrsg. von Axel M. Gressner und Torsten Arndt. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013.
- [72] Daniel J. Kowalewski und Stefan Stevanović. „Biochemical large-scale identification of MHC class I ligands“. In: *Methods in Molecular Biology* (2013).
- [73] Lena Katharina Freudenmann, Ana Marcu und Stefan Stevanović. *Mapping the tumour human leukocyte antigen (HLA) ligandome by mass spectrometry*. 2018.
- [74] Daniel J. Hicklin, Francesco M. Marincola und Soldano Ferrone. *HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story*. 1999.
- [75] M. Campoli und S. Ferrone. *HLA antigen changes in malignant cells: Epigenetic mechanisms and biologic significance*. 2008.
- [76] Carlheinz R. Müller, Gerhard Ehninger und Shraga F. Goldmann. „Gene and haplotype frequencies for the loci HLA-A, HLA-B, and HLA-DR based on over 13,000 German blood donors“. In: *Human Immunology* (2003).
- [77] Mathias Uhlén et al. „Tissue-based map of the human proteome“. In: *Science* (2015).
- [78] Gunnar Juliusson et al. *Acute myeloid leukemia in the real world: Why population-based registries are needed*. 2012.
- [79] Theodora Anagnostou et al. „Anti-CD19 chimeric antigen receptor T-cell therapy in acute lymphocytic leukaemia: a systematic review and meta-analysis“. In: *The Lancet Haematology* (2020).
- [80] Philippe Moreau et al. „Chimeric antigen receptor T-cell therapy for multiple myeloma: A consensus statement from the European Myeloma Network“. In: *Haematologica* (2019).
- [81] C. Berlin et al. „Mapping the HLA ligandome landscape of acute myeloid leukemia: a targeted approach toward peptide-based immunotherapy“. In: *Leukemia* (2015).
- [82] M. Wetzler et al. „HLA class I antigen cell surface expression is preserved on acute myeloid leukemia blasts at diagnosis and at relapse“. In: *Leukemia* (2001).
- [83] A. Sette, R. Chesnut und J. Fikes. „HLA expression in cancer: Implications for T cell-based immunotherapy“. In: *Immunogenetics* (2001).

- [84] Mathias Uhlen et al. *A proposal for validation of antibodies*. 2016.
- [85] Chopie Hassan et al. „Accurate quantitation of MHC-bound peptides by application of isotopically labeled peptide MHC complexes“. In: *Journal of Proteomics* (2014).
- [86] Sachin Kote et al. *Mass spectrometry-based identification of MHC-associated peptides*. 2020.
- [87] Frances Rose Schumacher et al. *Building proteomic tool boxes to monitor MHC class I and class II peptides*. 2017.
- [88] Joël Lanoix et al. „Comparison of the MHC I Immunopeptidome Repertoire of B-Cell Lymphoblasts Using Two Isolation Methods“. In: *Proteomics* (2018).
- [89] Michal Bassani-Sternberg et al. „Direct identification of clinically relevant neoepitopes presented on native human melanoma tissue by mass spectrometry“. In: *Nature Communications* 7.May (2016).
- [90] Tomasz M. Grzywa, Wiktor Paskal und Paweł K. Włodarski. *Intratumor and Intertumor Heterogeneity in Melanoma*. 2017.
- [91] Ole Lund et al. „Definition of supertypes for HLA molecules using clustering of specificity matrices“. In: *Immunogenetics* (2004).
- [92] Marian Christoph Neidert et al. „The natural HLA ligandome of glioblastoma stem-like cells: antigen discovery for T cell-based immunotherapy“. In: *Acta Neuropathologica* (2018).
- [93] Ana Marcu et al. „The HLA Ligand Atlas. A resource of natural HLA ligands presented on benign tissues“. In: *bioRxiv* (2019).
- [94] Ton N Schumacher und Robert D Schreiber. „Realising the promise: neoantigens in cancer immunotherapy“. In: *Science (New York, N.Y.)* 348.6230 (2015), S. 69–74.
- [95] Xiaomei Zhang et al. *Application of mass spectrometry-based MHC immunopeptidome profiling in neoantigen identification for tumor immunotherapy*. 2019.
- [96] Ekta Khurana et al. *Role of non-coding sequence variants in cancer*. 2016.
- [97] Yasushi Miyahira et al. „Quantification of antigen specific CD8+ T cells using an ELISPOT assay“. In: *Journal of Immunological Methods* (1995).
- [98] Veronique Erard et al. „Impact of HLA A2 and cytomegalovirus serostatus on outcomes in patients with leukemia following matched-sibling myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation“. In: *Haematologica* (2006).

- [99] Charles E. Hall et al. „Sequence homology between HLA-bound cytomegalovirus and human peptides: A potential trigger for alloreactivity“. In: *PLoS ONE* 12.8 (2017), S. 1–23.
- [100] Jian Zhang et al. „Immune receptor repertoires in pediatric and adult acute myeloid leukemia“. In: *Genome Medicine* (2019).
- [101] Rifca Le Dieu et al. „Peripheral blood T cells in acute myeloid leukemia (AML) patients at diagnosis have abnormal phenotype and genotype and form defective immune synapses with AML blasts“. In: *Blood* (2009).
- [102] Jan Davidson-Moncada et al. *Dissecting the immune landscape of acute myeloid leukemia*. 2018.
- [103] Hans Georg Rammensee und Harpreet Singh-Jasuja. *HLA ligandome tumor antigen discovery for personalized vaccine approach*. 2013.

ANHANG I

ERGÄNZENDE MATERIALIEN

I.1 Übersicht über die durchgeführten Immunpräzipitationen

I.2 CD8⁺ T-Zell-spezifische immunogene CMV-Antigene

Tabelle I.1: Übersicht Immunpräzipitationen

Die mit einem * markierten IPs wurden mit dem BB7.2-AK durchgeführt, die restlichen IPs mit dem W6/32-AK. n.a. = nicht analysiert.

Probenkategorie	Probe	IP-Nr.	Zellzahl	Peptidanzahl gesamt (kryptische Peptide)
Zelllinien	DG-75	IP01	1,5x10 ⁸	1366 (94)
		IP13	1,6x10 ⁸	1769 (137)
		IP14*	1,6x10 ⁸	504 (11)
		IP28	1,6x10 ⁸	2129 (152)
		IP40	1,5x10 ⁸	590 (n.a.)
		IP41	1,5x10 ⁸	2528 (165)
		IP42	1,5x10 ⁸	2539 (160)
		IP43	1,5x10 ⁸	2455 (161)
		IP44	1,5x10 ⁸	1631 (112)
	IP45	1,5x10 ⁸	1560 (110)	
	ML-2	IP02	1,0x10 ⁸	787 (14)
		IP18	1,5x10 ⁸	993 (16)
		IP19*	1,5x10 ⁸	132 (1)
		IP47	1,0x10 ⁸	728 (19)
	THP-1	IP03	1,0x10 ⁸	2219 (19)
IP23		1,3x10 ⁸	2991 (51)	
IP24*		1,3x10 ⁸	894 (14)	
AML-Patienten	P1	IP07	1,6x10 ⁸	2599 (68)
		IP08	1,6x10 ⁸	1449 (31)
		IP09	1,2x10 ⁸	2333 (44)
		IP10	1,2x10 ⁸	2007 (73)
	P2	IP11	1,4x10 ⁸	1688 (86)
		IP30*	1,4x10 ⁸	149 (1)
	P3	IP20*	8,3x10 ⁸	387 (8)
		IP21*	8,3x10 ⁸	342 (7)
		IP22*	8,3x10 ⁸	593 (3)
		IP37	8,3x10 ⁸	379 (n.a.)
		IP38	8,3x10 ⁸	404 (n.a.)
		IP39	8,3x10 ⁸	399 (n.a.)
	P4	IP05	1,5x10 ⁸	4041 (113)
	P5	IP04	3,0x10 ⁸	3705 (126)
	P6	IP17	1,0x10 ⁸	1829 (42)
	P7	IP12	1,5x10 ⁸	1288 (36)
	P8	IP15	1,6x10 ⁸	192 (3)
		IP16	1,6x10 ⁸	149 (3)
	P9	IP25	2,0x10 ⁸	325 (9)
		IP26	2,0x10 ⁸	1376 (49)
IP27		2,0x10 ⁸	1166 (39)	
Kontrollgruppe	K1	IP33	5,0x10 ⁷	807 (10)
	K2	IP32	5,0x10 ⁷	665 (4)
	K3	IP31	1,3x10 ⁸	994 (10)
	K4	IP36	1,9x10 ⁸	1362 (13)
	K5	IP34	2,1x10 ⁸	1503 (30)
	K6	IP35	1,3x10 ⁸	711 (0)
	K7	IP06	5,6x10 ⁷	1462 (9)
		IP29	1,0x10 ⁸	909 (6)
K8	IP46	7,0x10 ⁷	3 (0)	

Tabelle I.2: von Sylwester et al. [62] nachgewiesene CD8⁺ T-Zell-spezifischen immuno-
genen CMV-Antigene

UL48	UL69	UL34
UL83 (pp65)	UL105	US30
UL123 (IE1)	UL82 (pp71)	TRL14
UL122 (IE2)	UL99 (pp28)	IRS-1
US32	UL154	UL36
UL28	UL44 (pp50)	UL37
US29	UL86	UL75 (gH)
US3	UL33	UL45
UL32 (pp150)	UL49	UL153
UL55 (gB)	US1	UL116
UL94	UL150	UL54

ANHANG II

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

3'UTR 3' untranslatierte Region

5'UTR 5' untranslatierte Region

ACN Acetonitril

ALC average local confidence

ALL Akute lymphatische Leukämie

AML Akute myeloische Leukämie

BMNCs mononukleäre Zellen des Knochenmarks

CAR chimärer Antigenrezeptor

CD Cluster of Differentiation

CDS codierende Sequenz

CMV Cytomegalovirus

CNBr cyanogen bromid-aktiviert

CTLA-4 zytotoxisches T-Lymphozyten-Antigen 4

DKMS Deutsche Knochenmarkspenderdatei

EDTA Ethylendiamintetraacetat

ELISpot Enzyme Linked Immuno Spot

ETD Elektronentransfer-Dissoziation

FDR False Discovery Rate

FSC Forward Scatter

GM-CSF Granulocyte macrophage colony-stimulating factor

GVHD Graft-versus-Host-Erkrankung

GvL Graft-versus-Leukämie

HCD Higher-Energy kollisions-induzierten Dissoziation

HCL Salzsäure, Chlorwasserstoffsäure

HLA humanes Leukozyten-Antigen

Ig Immunglobulin

IL Interleukin

mHAg Nebenhistokompatibilitätsantigenen

MHC Haupthistokompatibilitätskomplex

MS Massenspektrometrie

Nano-LC-MS/MS Tandem-Nano-Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie

ncRNA nicht-codierende Ribonukleinsäure

NK-Zellen Natürliche Killerzellen

PBMCs mononukleäre Zellen des peripheren Blutes

PD programmed death

SSC Side Scatter

TCR T-Zell-Rezeptor

TFA Trifluoressigsäure

TGF Tumorwachstumsfaktor

Tregs regulatorische T-Zellen

2.1	Separation der mononukleären Zellen und polymorphnukleären Leukozyten	25
2.2	Funktionsweise des QiFiKits®	28
2.3	Auswertung der QiFiKit® Kalibrierungsbeads	29
2.4	Ablauf der biochemischen Isolation der MHC-präsentierten Peptide	31
3.1	Identifizierte Peptide pro Immunpräzipitation der Zelllinie DG-75 .	40
3.2	Peptidgewinn mit steigender Anzahl an Aufarbeitungen	40
3.3	Anzahlen von intra-und extrazellulären MHC-Klasse-I-Molekülen pro Zelle in den verschiedenen Probenkategorien	44
3.4	Quantitative Analyse der extrazellulären MHC-Klasse-I- und HLA-A*02-Moleküle pro Zelle	45
3.5	Wertepaare von MHC-Klasse-I-Molekül- und Peptidanzahlen sowie der linearen Trendlinien der Korrelation	47
3.6	Anzahlen aller identifizierten Peptide pro Probe sowie Überschneidungen der klassischen und kryptischen Peptide zwischen den einzelnen Probenkategorien	49
3.7	Biogenese-Mechanismen der identifizierten kryptischen Peptide . .	50
3.8	Übereinstimmungen der identifizierten Peptide und zugehörigen Quellproteine der AML-Probe P4 und korrespondierenden Kontrollprobe K7	53
3.9	Anzahl der AML-Patientenproben und -Zelllinien, in denen jeweils eine definierte AML-exklusive Peptidsequenz gefunden wurde	54

1.1	FAB-Klassifikation der AML [53]	12
2.1	Patientenmaterial	22
2.2	Spendermaterial für Kontrollgruppe	23
3.1	AML-exklusive klassische Peptide, welche in mindestens 5 der Leukämie-Proben identifiziert wurden	56
3.2	AML-exklusive kryptische Peptide, welche in mindestens drei der Leukämie-Proben identifiziert wurden	59
3.3	Korrespondierende Peptide zu in der Literatur beschriebenen Tu- morantigenen der AML [48]	61
3.4	Identifizierte Übereinstimmungen der Peptidsequenzen mit dem CMV-Proteom der UniProtKB Datenbank	66

ANHANG V

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank nachstehenden Personen entgegen bringen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Promotionsschrift niemals zustande gekommen wäre:

Mein Dank gilt zunächst Herrn Priv.-Doz. Dr. Götz Ulrich Grigoleit für die Betreuung dieser Arbeit und die Möglichkeit, diese in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Dies umfasste eine stete Hilfsbereitschaft sowie einen durchgehend bereichernden und konstruktiven Austausch, welchen ich sehr zu schätzen weiß.

Ich danke Herrn Dr. Andreas Schlosser für die gute Kooperation, die Durchführung der Massenspektrometrie in seiner Arbeitsgruppe sowie die Datenanalyse der massenspektrometrischen Rohdaten. Ohne den hauseigens entwickelten Analysealgorithmus wäre die vorliegende Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Matthias Eyrich für die freundliche Mitbetreuung dieser Arbeit.

Mein herzlicher Dank geht an Frau Elke Baumeister für die Einarbeitung ins Labor, die gute und intensive Betreuung und Unterstützung, die viele Geduld, das Beantworten vieler Fragen und das liebevolle Verständnis! Ich bin zutiefst dankbar für die gemeinsame Zeit im Labor und die vielen Gespräche auf fachlicher und persönlicher Ebene. Ihr früher Tod macht mich sehr betroffen und zeigt mir erneut die enorme Bedeutung medizinischer Forschung, weshalb ich ihr diese Arbeit widmen möchte.

Zudem danke ich Frau Carolin Köchel für die Unterstützung und Hilfe im Labor,

die stetige Hilfsbereitschaft und ihre positive Energie im Labor!

Mein besonderer Dank an die AG Schlosser am Rudolf-Virchow-Zentrum, insbesondere Frau Beate Vogt und Frau Christiane Winkler, für die freundliche Kooperation und die Durchführung der Massenspektrometrie!

Danke an die gesamte AG Löffler als Nachbararbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit und das nette Miteinander!

Der Medizinischen Klinik II ein großes Dankeschön für die unkomplizierte Bereitstellung der AML-Proben!

Ich danke dem Institut für klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie für die HLA-Typisierung einiger Proben!

Herrn Prof. Dr. Stefan Stevanović sowie dem Interfakultären Institut für Zellbiologie der Universität Tübingen einen herzlichen Dank für die Produktion und Bereitstellung des verwendeten Antikörpers W6/32!

Zuletzt gilt ein großes Dankeschön meiner Familie und Freunden, die mich auf diesem Weg unterstützt haben und stets mit Rat und Tat zur Seite standen! Ein herauszustellender Dank geht hier an meine Schwester, die mir nicht nur menschlich sondern auch wissenschaftlich vielfach weiter geholfen hat! Hinzu ein großer Dank an meine Eltern für die liebe- und verständnisvolle Unterstützung während des gesamten Studiums!