

**Nachweis einer ausgeprägten
Individualität von HLA-Ligandomen
durch massenspektrometrische Analysen**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2008

vorgelegt von

Nina Hillen

Tag der mündlichen Prüfung

27. März 2008

Dekan

Prof. Dr. L. Wesemann

1. Berichterstatter

Prof. Dr. S. Stevanović

2. Berichterstatter

Prof. Dr. H.-G. Rammensee

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XI
Abkürzungsverzeichnis	XIII
1. Einleitung	1
1.1. MHC-Moleküle: die Schaufenster der Zelle	1
1.2. MHC-Klasse-I-Antigenprozessierung: das Screenen des Proteoms	3
1.3. Analyse von allelspezifischen MHC-Peptidmotiven	8
1.4. Diversität des HLA-Ligandoms	10
1.5. HLA-Supertypen	12
1.6. Reverse Immunologie: Vorhersage von T-Zell-Epitopen	14
1.7. Die T-Zell-Antwort als Konsequenz des MHC-Ligandoms	15
1.8. Strategien der MHC-Ligandom-Analyse	18
1.8.1. Qualitative und Quantitative Analyse von Einflüssen auf das MHC-Ligandom	19
1.8.2. Gezielte Suche nach krankheitsassoziierten MHC-Liganden	20
1.8.3. Differentielle Quantifizierung von MHC-Ligandomen	21
1.9. Analyse von Ligandom und Proteom im Vergleich	22
1.10. Zielsetzung dieser Arbeit	25
2. Material und Methoden	26
2.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial	26
2.2. Geräte und Zubehör	28
2.3. Puffer und Lösungen	29
2.4. Patientenmaterial	33
2.5. Zellbiologische Methoden	34
2.5.1. Einfrieren und Auftauen von Zellen	34
2.5.2. Kultivierung der Zelllinien	34
2.5.3. Bestimmung der Lebendzellzahl	36
2.5.4. Zellernte	36
2.5.5. Isolierung von PBMCs	36

2.5.6.	Isolierung von CD8 ⁺ T-Zellen durch MACS	37
2.6.	Expansion antigenspezifischer T-Zellen	37
2.6.1.	Präparation humaner Dendritischer Zellen	37
2.6.2.	Antigenspezifische Stimulation von T-Zellen mit autolo- gen Dendritischen Zellen	38
2.6.3.	Herstellung von aAPCs	38
2.6.4.	Antigenspezifische Stimulation von T-Zellen mit aAPCs	39
2.6.5.	Weiterführende Peptid- und Allostimulationen	39
2.7.	Detektion und Analyse antigenspezifischer T-Zellen	40
2.7.1.	Präsensitivierung von PBMCs	40
2.7.2.	IFN- γ -ELISPOT <i>ex vivo</i> und <i>in vitro</i>	40
2.7.3.	Herstellung von MHC-Tetrameren	41
2.7.4.	Tetramerfärbung	41
2.7.5.	Intrazelluläre IFN- γ -Färbung	42
2.7.6.	Durchflusscytometrie	43
2.8.	Weitere immunologische Methoden	44
2.8.1.	Säureextraktion von MHC-Liganden nach Immunpräzi- pitation mit CNBr-aktivierter Sepharose	44
2.8.2.	Western Blot	46
2.9.	Biochemische Methoden	48
2.9.1.	Peptidsynthese	48
2.9.2.	Differentielle Modifizierung von Peptiden	48
2.9.3.	Proteasommarkierung	49
2.9.4.	Proteinbestimmung nach Bradford	49
2.10.	Analytische Methoden	50
2.10.1.	Sequenzanalyse und Quantifizierung von Peptiden durch Edman-Abbau	50
2.10.2.	Massenspektrometrie	51
2.11.	Bioinformatische Methoden	62
2.11.1.	Visualisierung von Peptidmotiven	62
2.11.2.	Vorhersage-Matrizen für MHC-Liganden	62
2.11.3.	Datenanalyse nach Gesichtspunkten der Proteomik . . .	63
3.	Ergebnisse und Diskussion	64
3.1.	Neue und verfeinerte HLA-Peptidmotive	65
3.1.1.	HLA-A*0201	65
3.1.2.	HLA-A*0301	68
3.1.3.	HLA-A*6601	70
3.1.4.	HLA-A*2601, -A*2602, -A*2603	72

3.1.5.	HLA-B*3801, -B*3901, -B*3902	75
3.1.6.	Der HLA-B44-Supertyp	78
3.1.7.	Der Einfluss des Proteasoms auf das Motiv	85
3.1.8.	Der Einfluss der Ligandenzahl auf das Motiv	90
3.1.9.	Zusammenfassung und Ausblick	93
3.2.	Überlappung von HLA-Ligandomen	95
3.2.1.	Reproduzierbarkeit von LC-MS/MS-Experimenten	95
3.2.2.	Reproduzierbarkeit von HLA-Peptid-Extraktionen	103
3.2.3.	Überlappung des HLA-A*02-Ligandoms mit anderen Li- gandomen	106
3.2.4.	Überlappung von Subtyp-Ligandomen: HLA-A*2601, - A*2602, -A*2603	107
3.2.5.	Überlappung über Antigengrenzen hinweg: HLA-B*3801, -B*3901, -B*3902	109
3.2.6.	Überlappung von Peptidrepertoires innerhalb des HLA- B44-Supertyps	111
3.2.7.	HLA-A3: Ein anderer Supertyp zeigt andere Ligandom- überlappungen	116
3.2.8.	Zusammenfassung und Ausblick	118
3.3.	Analyse von HLA-Ligandomen nach Gesichtspunkten der Pro- teomik	121
3.3.1.	Gewebsspezifität	121
3.3.2.	Allotypische Peptide	131
3.3.3.	Ligandenreiche Quellproteine	140
3.3.4.	Zusammenfassung und Ausblick	143
3.4.	Bedeutung der HLA-Ligandom-Analyse für die klinische Anwen- dung	145
3.4.1.	Kandidaten für Peptidvakzinierungen	145
3.4.2.	Antigenspezifische Stimulation von CD8 ⁺ T-Zellen	149
3.4.3.	T-Zellepitop-Erkennung innerhalb des HLA-B44-Supertyps	154
3.4.4.	Zusammenfassung und Ausblick	158
4.	Zusammenfassung	159
A.	Anhang	160
A.1.	HLA-A*02	160
A.2.	Überlappende HLA-A*02-Liganden	183
A.3.	HLA-A*03	186
A.4.	HLA-A*26	197

A.5. HLA-A*2601 aus MGAR	200
A.6. HLA-A*2602 aus C1R-A*2602	201
A.7. HLA-A*2603 aus C1R-A*2603	202
A.8. Überlappung von HLA-A*25 und HLA-A*26	203
A.9. HLA-A*6601 aus LCL721.221-A*6601	205
A.10.HLA-B*38	206
A.11.HLA-B*3801 aus C1R-B*3801	208
A.12.HLA-B*3901 aus C1R-B*3901	209
A.13.HLA-B*3902 aus C1R-B*3902	211
A.14.Der HLA-B44-Supertyp	212
A.15.Halbwertszeiten von Quellproteinen	228
B. Literaturverzeichnis	231
C. Publikationen	253
D. Akademische Lehrer	254

Abbildungsverzeichnis

1.1. Bindungsfurche eines MHC-Klasse-I-Moleküls	2
1.2. Effizienz der Antigenprozessierung	7
1.3. Einflüsse auf das Ligandom	11
1.4. Einteilung der HLA-A- und -B-Supertypen.	13
1.5. Strategien der MHC-Ligandom-Analyse	18
2.1. Schematischer Q-TOF-Aufbau	54
2.2. Der DDIS-Ansatz	58
3.1. Peptidmotiv von HLA-A*02	66
3.2. Peptidmotiv von HLA-A*03	69
3.3. Peptidmotiv von HLA-A*6601	71
3.4. Peptidmotive des HLA-A26-Supertyps	73
3.5. Peptidmotive des HLA-B39-Supertyps	76
3.6. Abdeckung der Bevölkerung durch den HLA-B44-Supertyp . .	78
3.7. Peptidmotive des HLA-B44-Supertyps	80
3.8. Proteasomaktivitäten in verschiedenen Zelllinien	87
3.9. Auftrennung der Proteasomuntereinheiten	87
3.10. Proteasomaktivitäten sowie Mengen an β -Actin und β 5 in ver- schiedenem Zelllinien.	89
3.11. Chronologische Entwicklung der HLA-A*02-Ankerpositionen .	91
3.12. Chronologische Entwicklung der Position P1 von HLA-A*02 . .	92
3.13. Auswirkung des Retentionszeitfensters auf die Reproduzierbarkeit	98
3.14. Vergleich der Methoden zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit	102
3.15. Bestimmung der biologischen Reproduzierbarkeit	104
3.16. Biologische Reproduzierbarkeit am Beispiel BM15	106
3.17. Überlappung der Peptidrepertoires der HLA-A*26-Subtypen . .	108
3.18. Überlappung der Peptidrepertoires von HLA-B*3801, -B*3901 und -B*3902	110
3.19. Promiskuitive HLA-Liganden des HLA-B44-Supertyps	112
3.20. Markierungsfreie Untersuchung der Überlappung der HLA-Li- gandome dreier Allotypen des HLA-B44-Supertyps.	114

3.21. Vergleich zweier HLA-Ligandome durch differentielle Modifizierung.	115
3.22. Überlappung der Peptidrepertoires von HLA-A*03, -A*11 und -B*1501	117
3.23. Vergleich verschiedener „Zustände“ von RCC-Geweben	124
3.24. Überlappung der Ligandome verschiedener RCC-Patienten	125
3.25. Vergleich der HLA-A*02-Ligandome dreier B-LCLs	126
3.26. Überlappung der Ligandome verschiedener Tumorarten	126
3.27. Vergleich verschiedener Gewebstypen	127
3.28. Überlappung der Transkriptome verschiedener Gewebe	129
3.29. Referenzspektren für die Suche nach allotypischen HLA-A*02-Peptiden	132
3.30. Referenzspektrum für die Suche nach allotypischen HLA-A*03-Peptiden	133
3.31. HLA-Liganden aus Proteinen mit unterschiedlicher HWZ	144
3.32. Relative mRNA-Expression der Gene der Kandidatenpeptide	148
3.33. Tetramer-Analyse der DC-Stimulation mit OSMR ₉₇₁₋₉₇₉	150
3.34. Tetramer-Analyse der Stimulation mit HLA-A*0201:NDC80	153
3.35. IFN- γ -Produktion der HLA-A*0201:NDC80-stimulierten Zellen	154
3.36. Allotypspezifische Erkennung von EBV-Epitopen durch T-Zellen im IFN- γ -ELISPOT	157

Tabellenverzeichnis

1.1. Die Bindungstaschen von MHC-Molekülen	3
2.3. Verwendete Zelllinien	35
2.4. T-Zell-Epitope aus HIV-1	40
2.5. Monoklonale Maus- α human CD8-Antikörper für Tetramerfärbungen	42
2.6. α HLA-Antikörper für Immunpräzipitation und FACS	45
2.7. Zusammensetzung des Polyacrylamidgels	47
2.8. Massen der Aminosäurereste in MS/MS-Spektren	61
2.9. Punktezuordnung für Vorhersagematrizen	63
3.1. Die Taschenstruktur der HLA-B44-Supertyp-Allele.	82
3.2. Zelllinien für den Vergleich von Proteasomaktivitäten.	85
3.3. Chronologische Zunahme der HLA-A*02-Ligandenanzahl	91
3.4. Übersicht über die Anzahl bekannter HLA-Liganden der verschiedenen HLA-Allotypen	94
3.5. LC-MS/MS-Experimente zur Reproduzierbarkeit	97
3.6. Reproduzierbarkeit von LC-MS/MS-Experimenten	99
3.7. Reproduzierbarkeit und Detektionswahrscheinlichkeit	100
3.8. Einfluss von Falschpositiven auf die Reproduzierbarkeit	101
3.9. Biologische Replikate von Peptidextraktionen aus der Zelllinie BM15	105
3.10. HLA-A*02-Liganden auf anderen Allelen	107
3.11. Überlappung innerhalb des HLA-A3-Supertyps	119
3.12. Von verschiedenen Allelen des HLA-A3-Supertyps restringierte T-Zell-Epitope	120
3.13. Vergleich verschiedener „Zustände“ des gleichen Gewebes	123
3.14. Einteilung in Gewebstypen	127
3.15. Kandidaten für allotypische Peptide	133
3.16. <i>Sources</i> für die Suche nach allotypischen Peptiden	135
3.17. Dominanz allotypischer Peptide	136
3.18. Detektion allotypischer Peptide in verschiedenen <i>Sources</i>	137

3.19. Verschiedene HLA-Allotypen präsentieren verschiedene Peptide	141
3.20. HLA-Liganden aus abundanten Proteinen	142
3.21. T-Zellepitopkandidaten aus potentiellen Tumorantigenen	146
3.22. Leukapherisate für Stimulationsexperimente	149
3.23. Übersicht über die antigenspezifischen T-Zell-Stimulationen	150
3.24. Epitope des HLA-B44-Supertyps für den Elispot	155
3.25. Allotypspezifische Erkennung von EBV-Epitopen durch T-Zellen im IFN- γ -ELISPOT	156

Abkürzungsverzeichnis

_M	Metastase
_N	Normalgewebe
_T	Tumorgewebe
aAPC	artifizielle antigenpräsentierende Zelle
ACN	Acetonitril
AG	Antigen
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
β 2m	β ₂ -Mikroglobulin
BCIP/NBT	<i>5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate toluidine und nitroblue tetrazolium</i>
B-LCL	B-lymphoblastoide Zelllinie
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
blastp	<i>search protein database using a protein query</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
CCA	<i>colorectal carcinoma</i> (kolorektales Karzinom)
CD	<i>cluster of differentiation</i> (Differenzierungscluster)
CID	<i>collisionally induced decay</i>
cTEC	corticalen Thymusepithelzelle
cts/s	<i>counts</i> (Detektoreinschläge) pro Sekunde
CTL	cytotoxischer T-Lymphocyt
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-Propan-Sulfonat
DALVS	DansylAhx3L3VS
DC	<i>dendritic cell</i> (Dendritische Zelle)
DDIS	<i>data-dependent ion selection</i>
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DRiPs	<i>defective ribosomal products</i>

EBV	Epstein-Barr-Virus
ECACC	<i>European Collection of Cell Culture</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISPOT	<i>enzyme-linked immunosorbent spot</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERAAP	<i>ER aminopeptidase associated with antigen processing</i>
ESI	Electrospray-Ionisation
EST	<i>expressed sequence tag</i>
est_human	<i>human subset of est (database of GenBank + EMBL + DDBJ sequences from EST Divisions)</i>
ESTDAB	<i>European Searchable Tumour Line Database</i>
EtOH	Ethanol
FACS	<i>fluorescence-activated-cell-sorter</i> (fluoreszenzaktivierter Zellsorter)
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>forward scatter</i> (Vorwärtsstreuung)
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
HD	<i>high density</i>
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HS	Humanserum
HWZ	Halbwertszeit
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LC	<i>liquid chromatography</i>
LC-MS	<i>liquid chromatography mass spectrometry</i>
LD	<i>low density</i>
LPS	Lipopolysaccharide
M	Mittelwert
mAK	monoklonaler Antikörper
MACS	<i>magnet assisted cell sorting</i>
MALDI	<i>matrix-assisted laser desorption ionization</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)

MS	Massenspektrometrie
MSC	<i>mean spot count</i> (mittlere Spotzahl pro well)
MSCI	<i>mean spot count index</i> (Faktor über HIV der mittleren Spotzahl pro well)
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
mTEC	medulläre Thymusepithelzelle
MÜ	München
MW	<i>molecular weight</i> (Molekulargewicht)
m/z	Verhältnis aus Masse m und Ladung z eines Ions
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NIC	leichte Isotopenmarkierung mit einem H ₄ -Nicotinsäurederivat
dNIC	schwere Isotopenmarkierung mit einem D ₄ -Nicotinsäurederivat
n	Anzahl der Experimente
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NLVS	4-Hydroxy-5-iodo-3-nitrophenylacetyl-Leu-Leu-Leu-vinylsulfone
nr (blastp)	<i>all non-redundant GenBank CDS translations + RefSeq Proteins + PDB + SwissProt + PIR + PRF</i>
nr (tblastn)	<i>all GenBank + RefSeq Nucleotides + EMBL + DDBJ + PDB sequences (excluding HTGS0,1,2, EST, GSS, STS, PAT, WGS)</i>
NSCLC	<i>non-small cell lung carcinomas</i> (Nichtkleinzelliges Karzinom)
p.a.	<i>pro analysis</i> (zur Analyse)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBL	<i>peripheral blood lymphocyte</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycocerythrin
PGHP	Peptidyl-Glutamyl-Peptid-Hydrolase
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PHA	Phytohämagglutinin
PMA	1-(4-methoxyphenyl)propan-2-amine
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PP	Polypropylen
PSD	<i>post source decay</i>
PTC	Phenylthiocarbamoyl

PTH	Phenylthiohydantoin
Q-ToF	<i>quadrupol-time of flight</i>
RCC	<i>renal cell carcinoma</i> (Nierenzellkarzinom)
refseq	<i>RefSeq protein sequences from NCBI's Reference Sequence Project</i>
refseq_genomic	<i>Genomic entries from NCBI's Reference Sequence project</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RP-HPLC	<i>reversed phase-HPLC</i>
RT	<i>retention time</i> (Retentionszeit)
SARB	<i>supermotif average relative binding</i>
SDS	<i>sodium-dodecyl-sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SE	<i>standard error of the mean</i> (Fehler des Mittelwerts)
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SSC	<i>side scatter</i> (seitliche Streuung)
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TBB	<i>Tris BSA buffer</i>
tblastn	<i>search translated nucleotide database using a protein query</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i> (T-Zellrezeptor)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TIC	<i>total ion current</i> (Gesamtionenstrom)
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
TSB	<i>tetramer staining buffer</i>
TÜ	Tübingen
TWB	<i>Tris washing buffer</i>

1. Einleitung

1.1. MHC-Moleküle: die Schaufenster der Zelle

Bei MHC-Molekülen handelt es sich um membranständige, hochpolymorphe Glykoproteine. Sie sind in einer Region des Genoms codiert, deren Name *Major Histocompatibility Complex* auf ihre entscheidende Funktion für die Gewebeverträglichkeit (Histokompatibilität) bei Transplantationen hinweist. Beim Menschen liegt diese Region auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 und die MHC-Moleküle werden auch als *human leukocyte antigen* (HLA) bezeichnet.

Die Aufgabe der MHC-Moleküle ist es, das Proteom einer Zelle an deren Oberfläche in Form von Peptiden zu offenbaren, um dem Immunsystem indirekt einen Blick ins Innere der Zelle zu ermöglichen. Erst die Peptidpräsentation ermöglicht die T-Zell-Erkennung und damit nicht nur die Unterscheidung zwischen Selbst- und Fremdan antigenen, sondern auch zwischen normalen und entarteten Zellen.

Es gibt zwei verschiedene Klassen von MHC-Molekülen, die für die Antigenpräsentation gegenüber zwei verschiedenen T-Zell-Populationen zuständig sind. MHC-Klasse-I-Moleküle werden von den Rezeptoren von $CD8^+$ T-Zellen, den sogenannten cytotoxischen T-Lymphocyten (CTLs), erkannt, die daraufhin erkrankte Zellen lysieren. Alle kernhaltigen Körperzellen exprimieren MHC-Klasse-I-Moleküle. $CD4^+$ T-Zellen hingegen erkennen MHC-Klasse-II-Moleküle, die nur auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APCs) – wie Dendritischen Zellen (DCs), Makrophagen und B-Zellen – exprimiert werden. Die beiden Klassen unterscheiden sich hinsichtlich Struktur, Synthese, Funktion und Vorkommen leicht voneinander. Da sich die vorliegende Arbeit ausschließlich mit MHC-Klasse-I-Molekülen und $CD8^+$ T-Zellen befasst, werden sich die Erläuterungen im Folgenden ebenfalls darauf konzentrieren.

MHC-Klasse-I-Moleküle (Abbildung 1.1) setzen sich zusammen aus einer schweren Kette (44 kDa), die aus einer Transmembran- und drei extrazellulären Domänen (α_1 - α_3) besteht, sowie einem nicht kovalent gebundenen β_2 -Mikroglobulin-Molekül (12 kDa). Die Domänen α_1 und α_2 bilden zusammen eine Furche, in der die präsentierten Peptide gebunden werden. Die Ränder dieser Furche werden dabei von je einer α -Helix der Domänen gebildet; der Boden besteht aus einem antiparallelen β -Faltblatt (Bjorkman et al., 1987).

1. Einleitung

Die in dieser Spalte gebundenen Peptide sind typischerweise acht bis zwölf Aminosäuren lang. Sie können – im Gegensatz zu MHC-Klasse-II-Molekülen – nicht über die Enden der Bindungsgrube hinausragen, da diese durch Wechselwirkungen zwischen konservierten Seitenketten des MHC-Moleküls und den Peptid-Termini verschlossen sind. Diese Wechselwirkungen haben den größten stabilisierenden Einfluss (Bouvier und Wiley, 1994). Obwohl der Bindungsspalt für Peptide mit einer Länge von neun Aminosäuren optimal ist, passen auch längere Peptide hinein, wenn sie sich nach außen wölben oder das Rückgrat abgeknickt wird.

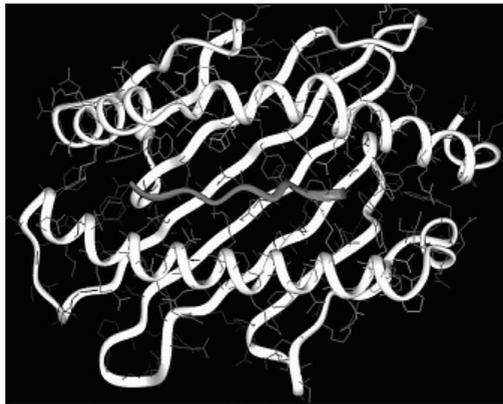


Abbildung 1.1.: Bindungsfurche eines MHC-Klasse-I-Moleküls mit gebundenem Peptid von oben. Die Ränder der Furchen werden von zwei α -Helices gebildet, der Boden von einem β -Faltblatt. Quelle: <http://pps00.cryst.bbk.ac.uk>

Weitere Beiträge zur Bindung liefern Interaktionen der Peptidseitenketten mit mehreren Taschen am Boden der Furche (Saper et al., 1991). Diese Taschen nehmen die sogenannten Ankeraminosäuren des gebundenen Peptids auf, die zu der Struktur oder dem Ladungszustand der Tasche komplementär sein müssen (Tabelle 1.1). Dabei unterscheidet man zwischen den stets vorhandenen Hauptankern (meist P2 und P Ω / C-Terminus des Peptids) und den selteneren Hilfsankern (Rammensee et al., 1997; Rötzschke et al., 1992; Ruppert et al., 1993). Das sogenannte Peptidmotiv definiert sich durch die Aminosäuren, die in diesen Ankerpositionen erlaubt sind, wobei dies für Hauptanker strikter geregelt ist als für Hilfsanker.

Tabelle 1.1.: Die Bindungstaschen von MHC-Molekülen

Peptid-Position	Tasche	Wechselwirkende Aminosäuren des MHC-Moleküls ^a
P1	A	5, 7, 33, 59, 62, 63, 66, 99, 159, 163, 167, 171
P2	B	7, 9, 24, 25, 26, 34, 35, 36, 45, 62, 63, 66, 67, 70, 99, 159, 163, 167
P3	D	7, 9, 62, 66, 70, 97, 99, 113, 114, 152, 155, 156, 159, 160, 163
P6	C	7, 9, 22, 24, 66, 69, 70, 73, 74, 97, 99, 114, 116, 133, 147, 152, 155, 156
PΩ	F	70, 73, 74, 76, 77, 80, 81, 84, 95, 96, 97, 114, 116, 118, 123, 124, 142, 143, 146, 147

^a Chelvanayagam (1996); Matsumura et al. (1992); Saper et al. (1991)

Insgesamt sind für die Wechselwirkungen etwa 35 Reste innerhalb der Bindungsfurche verantwortlich. Ungefähr 20 von ihnen sind polymorph. Daher weisen verschiedene MHC-Moleküle aufgrund unterschiedlicher Aminosäurezusammensetzungen der Taschen auch unterschiedliche Peptidmotive auf (Falk et al., 1991b) (siehe 1.4).

1.2. MHC-Klasse-I-Antigenprozessierung: das Screenen des Proteoms

Damit MHC-Moleküle an der Zelloberfläche Peptide präsentieren können, müssen diese zunächst generiert und auf MHC-Moleküle geladen werden. Diesen Vorgang bezeichnet man als Antigenprozessierung. Er besteht aus vielen einzelnen Schritten, von denen jeder gewisse Spezifitäten aufweist. Diese führen insgesamt dazu, dass nur wenige Fragmente eines bestimmten Antigens auf MHC-Molekülen präsentiert werden (Groothuis et al., 2005).

MHC-Klasse-I-Moleküle werden im Cytosol synthetisiert und cotranslational ins Endoplasmatische Reticulum (ER) transportiert. Hier binden sie an Chaperone wie Calnexin, die die korrekte Faltung und die Bildung von Disulfidbrücken unterstützen. Die gefaltete schwere Kette löst sich von Calnexin, bindet an β 2-Mikroglobulin und wird Teil des Peptidbeladungskomplexes (*peptide-loading complex*, PLC). Dieser enthält weitere Chaperone wie Calreticulin und Erp57 sowie Tapasin und beide TAP-Untereinheiten (*transporter*

associated with antigen processing). In dieser Form warten die leeren und daher instabilen MHC-Moleküle auf ihre Beladung mit Peptiden.

Die von MHC-Klasse-I-Molekülen präsentierte Peptide werden in der Regel im Cytosol durch das Proteasom generiert. Dieses ist ein aus mehreren Untereinheiten bestehender Protease-Komplex. Er zerschneidet sowohl abzubauende Proteine am Ende ihrer Lebensspanne – die häufig, aber nicht immer durch Ubiquitin markiert (Qian et al., 2005) sind – als auch während der Translation entstehende DRiPs (*defective ribosomal products*).

Etwa 70% der von Ribosomen neu synthetisierten Proteine sind langlebig und weisen Halbwertszeiten (HWZ) von durchschnittlich 3000 min auf, bevor sie vom Proteasom abgebaut werden. Die übrigen 30% setzen sich zusammen aus kurzlebigen Proteinen (*short-lived proteins*, SLiPs) und DRiPs, die durch Fehler bei der Faltung, der Translation oder der Transkription entstehen. Die Halbwertszeit dieser rasch abgebauten Fraktion beträgt durchschnittlich nur 10 min. Die meisten der MHC-präsentierten Peptide stammen dabei aus DRiPs (Yewdell et al., 2003). Je nach Zelltyp machen sie 20 bis 70% aller Translationsprodukte der Zelle aus (Princiotta et al., 2003). Insbesondere für die Sekretion bestimmte Proteine und Membranproteine, die entweder aus der Zelle freigesetzt oder aber im endosomal-lysosomalen Kompartiment abgebaut werden, können nur aus DRiPs auf MHC-Klasse-I-Moleküle gelangen. Von Yewdell und Nicchitta (2006) wurde kürzlich die Hypothese der Existenz von „Immunribosomen“ aufgestellt, einer Untergruppe von Ribosomen, die darauf spezialisiert ist, Peptide aus Translationsprodukten direkt dem TAP zuzuführen.

Das 20S-Proteasom besteht aus vier Ringen, die zu einem Zylinder gestapelt sind und von denen jeder aus sieben Untereinheiten des α - bzw. β -Typs besteht ($\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$). Dadurch entsteht ein zentraler Hohlraum, der von den proteolytisch aktiven Stellen ausgekleidet wird. Untereinheit β_1 schneidet abzubauende Proteine C-terminal von sauren Resten. Die trypsinartig wirkende Untereinheit β_2 spaltet C-terminal von basischen Aminosäuren. Untereinheit β_5 , die chymotrypsinartige Aktivität besitzt, schneidet nach hydrophoben Resten. Durch Zusammenlagerung mit zwei 19S-Regulatoren, die ubiquitinierte Proteine erkennen, entsteht aus dem 20S-Proteasom das 26S-Proteasom.

Interferone wie das $\text{IFN}\gamma$, die als Reaktion auf Virusinfektionen gebildet werden, induzieren den Austausch dieser drei konstitutiv exprimierten Untereinheiten gegen die Untereinheiten MECL1, LMP2 und LMP7. Dadurch entsteht das Immunproteasom (Tanaka und Kasahara, 1998). Außerdem wird der PA28-(11S)-Aktivator synthetisiert, der sich mit dem Immunproteasom zusammenlagert, wodurch sich die Produktion von Peptiden erhöht. Zudem ändern sich die Längenverteilung der Peptide sowie die Schnittstellenspezifität des Proteasoms

(Dick et al., 1996; Ehring et al., 1996; Wenzel et al., 1994). Dadurch werden vermehrt virale MHC-Liganden generiert und präsentiert (Toes et al., 2001).

Die Längenverteilung der Peptide entspricht einer Gaußverteilung mit einem Maximum bei einer Länge von acht bis zehn Aminosäuren (Kisselev et al., 1998). Die produzierten Peptide besitzen bereits den passenden C-Terminus für MHC-Liganden, N-terminal jedoch noch zusätzliche Reste (Cascio et al., 2001; Stoltze et al., 1998). Proteasen im Cytosol können Vorläuferpeptide noch weiter spalten (Seifert et al., 2003; Stoltze et al., 2000), wenn diese dort nicht durch Bindung an das Chaperonin TRiC (*TCP-1 ring complex*) geschützt werden (Kunisawa und Shastri, 2003).

Bei DCs gibt es außer den zum Abbau bestimmten Proteinen am Ende ihrer Lebensspanne und den DRiPs noch eine weitere Quelle für MHC-Klasse-I-präsentierte Peptide: die *cross presentation*. DCs haben die Fähigkeit, exogene Antigene durch Phagozytose aufzunehmen und CD8⁺ T-Zellen in Form von Peptid-MHC-Klasse-I-Komplexen zu präsentieren (Ackerman und Cresswell, 2004; Guernonprez und Amigorena, 2005). Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind noch nicht im Detail erklärbar. Allerdings scheinen Phagosomen als eigenständig zur Antigenpräsentation fähige Organellen eine zentrale Rolle zu spielen (Lehner und Cresswell, 2004).

Die entstandenen Peptide werden vom TAP ins ER transportiert. Dieser ATP-abhängige Transporter in der ER-Membran weist eine gewisse Spezifität für bestimmte Peptide auf. Bevorzugt werden solche mit einer Länge von acht bis 16 Aminosäuren und einem basischen oder hydrophoben C-Terminus, also solche, die an MHC-Klasse-I-Moleküle binden können (Neeffjes et al., 1993). Im ER werden die Peptide noch weiter von Aminopeptidasen wie ERAAP (*ER aminopeptidase associated with antigen processing*) gekürzt (Serwold et al., 2002), wobei die MHC-Moleküle selbst als Schablone für das Zurechtschneiden – das „Trimming“ – ihrer Liganden dienen (Kanaseki et al., 2006). ERAAP ist wie die TAP-Untereinheiten IFN γ -induzierbar und besitzt eine breite Spezifität. Sie spaltet allerdings keine Aminosäuren ab, auf die ein Prolin folgt. Daher findet man häufig MHC-Bindungsmotive mit einem Prolin an Position 2. Neueste Ergebnisse weisen auch auf die Mitwirkung einer Carboxydipeptidase (*angiotensin converting enzyme*, ACE) beim Trimming im ER hin (Shen et al., 2008). Schließlich wird der vollständig zusammengebaute, durch das Peptid stabilisierte MHC-Peptid-Komplex aus dem PLC entlassen, über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert und dort den T-Zellen präsentiert.

Erstaunlicherweise ist die Antigenprozessierung ein sehr ineffizienter Vorgang (Yewdell, 2001). Die meisten – etwa 60% – der vom Proteasom generierten Peptide im Cytosol sind zu kurz (Cascio et al., 2001). Außerdem wird der cy-

tosolische Peptid-Pool durch Proteasen dezimiert, die dem TAP Konkurrenz machen. Nur etwa 1% der cytosolischen Peptide kann vom TAP ins ER „gerettet“ werden (Reits et al., 2003). Die Peptide im ER werden entweder noch weiter gekürzt und mit Hilfe des PLC auf MHC-Moleküle geladen, falls sie in deren Bindungsfurche passen, oder sie werden zurück ins Cytosol transportiert, wo sie wiederum dem Selektionsprozess unterliegen (Koopmann et al., 2000). Vermutlich können nur 3% der ins ER transportierten Peptide an ein bestimmtes MHC-Molekül binden (Stevanovic und Schild, 1999).

Am Beispiel von Ovalbumin wurde in Mauszellen gezeigt, dass 40 Proteinnmoleküle abgebaut werden müssen, um ein cytosolisches H2-K^b-bindendes SIINFEKL- (OVA_{257–264})-Peptid zu erhalten (Princiotta et al., 2003). Nur eines von 50 Peptiden erreicht die Oberfläche zusammen mit einem K^b-Molekül. Folglich ist im Fall von Ovalbumin der Abbau von 2000 Proteinmolekülen erforderlich, um einen einzigen Peptid-MHC-Komplex zu generieren. Andere Studien zeigten Prozessierungseffizienzen mit ähnlicher Größenordnung (Cascio et al., 2001; Montoya und Val, 1999; Shahar et al., 1999). Die meisten Antigene werden noch weniger effizient prozessiert, so dass vermutlich etwa 10000 Moleküle für die Präsentation eines Peptid-MHC-Komplexes an der Zelloberfläche nötig sind.

1.2. MHC-Klasse-I-Antigenprozessierung: das Screenen des Proteoms

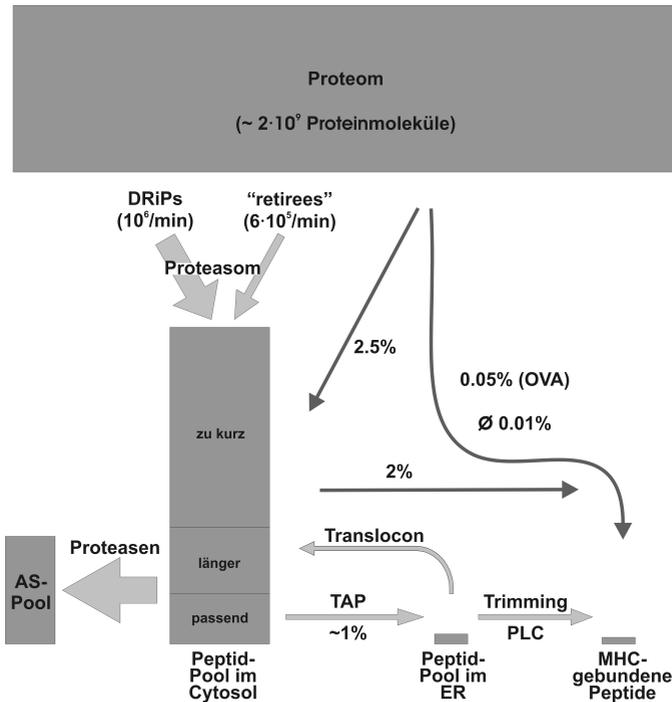


Abbildung 1.2.: Effizienz der Antigenprozessierung. Nur ein geringer Teil des Proteoms wird auf MHC-Molekülen präsentiert. Die Antigenprozessierung führt in mehreren Schritten vom intakten Protein zum MHC-gebundenen Peptid. Der cytosolische Peptid-Pool wird durch den proteasomalen Abbau von DRiPs und von Proteinen am Ende ihrer Lebensspanne (*retirees*) gespeist. Die meisten Peptide sind jedoch zu kurz für eine Präsentation auf MHC-Molekülen. Etwa 1% der cytosolischen Peptide wird durch den Transport ins ER vor dem vollständigen Abbau zu Aminosäuren (AS) bewahrt. Im ER werden die Peptide entweder weiter gekürzt und mittels PLC auf MHC-Moleküle geladen, oder sie werden wieder ins Cytosol zurück transportiert. Die Abmessungen der Felder spiegeln nicht die tatsächlichen Verhältnisse wider.

1.3. Analyse von allelspezifischen MHC-Peptidmotiven

Zur Isolierung von natürlichen, MHC-präsentierten Liganden gibt es verschiedene Methoden. So können die Peptide beispielsweise durch milde Säurebehandlung von der Zelloberfläche abgelöst werden. Dies erlaubt eine wiederholte Verwendung derselben Zellen (Storkus et al., 1993).

Die Immunaffinitätsreinigung von Peptid-MHC-Komplexen aus Zelllysaten mit anschließender Säureextraktion der Peptide und Abtrennung durch Ultrafiltration ist hingegen eine gezieltere Methode. Hier ermöglichen es monoklonale Antikörper, allelische Subgruppen von MHC-Molekülen spezifisch zu isolieren (Falk et al., 1991b). Allerdings könnten die so extrahierten MHC-Peptidrepertoires leicht vom verwendeten Antikörper abhängen, da peptidinduzierte Konformationsänderungen das Bindungsverhalten beeinflussen können (Bluestone et al., 1992; Solheim et al., 1993). Neben dem Einsatz spezifischer Antikörper kann die Komplexität der Peptid-Eluate noch weiter eingeschränkt werden, indem homozygote Zelllinien mit definierten MHC-Molekülen oder sogar Transfektanten mit sehr geringer Expression endogener MHC-Moleküle für Extraktionen verwendet werden.

Eine der Schwierigkeiten ist bei allen bisher genannten Methoden, die benötigte Menge an Peptid zu erreichen. Daher wurde ein dritter Ansatz für die schnelle und einfache Gewinnung von Probenmaterial entwickelt. Dabei werden Zellen mit einem Expressionsvektor transfiziert, der trunkierte und daher lösliche MHC-Moleküle codiert und so zu Sekretion dieser Moleküle ins Medium führt. Mittels Immunaffinitätsreinigung lassen sich dann große Proteinmengen aus dem Medium isolieren (Margulies et al., 1986; Prilliman et al., 1997). Diese häufig eingesetzte Technik stellt zwar ausreichendes Material für Analysen im großen Stil sicher, setzt aber die Verwendung kultivierter Zelllinien voraus. Das Peptidrepertoire kultivierter Zelllinien unterscheidet sich jedoch von dem primärer Gewebe (siehe 3.3.1). Folglich muss zur Untersuchung primärer Gewebe wie Biopsien von Krebspatienten die Immunaffinitätsreinigung nach der Lyse mittels Detergenzien erfolgen (Krüger et al., 2005; Weinschenk et al., 2002).

In der Anfangsphase der Analyse von Peptidrepertoires wurde der Edman-Abbau (siehe 2.10.1) verwendet: entweder für Poolsequenzierungen zur Beschreibung des allgemeinen Peptidmotivs eines Allels oder aber für die Analyse einzelner *reversed phase high performance liquid chromatography*- (RP-HPLC)-Fraktionen, um auch einzelne Peptidsequenzen ermitteln zu können (Falk et al., 1991a,b). So wurde 1991 der erste MHC-Ligand, SYFPEITHI, mittels Edman-Abbau in Eluaten von H2-K^d-Molekülen der Maustumorlinie P815 direkt sequenziert.

Aufgrund der limitierten RP-HPLC-Trennkapazität und Sensitivität des Edman-Abbaus bedeutete die Verwendung der Massenspektrometrie zur Charakterisierung einzelner Liganden einen technischen Durchbruch (Hunt et al., 1992; Rötzschke et al., 1990). Bei dieser Technik steht noch eine weitere Trenndimension zur Verfügung: das Verhältnis von Masse und Ladung (m/z) eines Peptids. Es gibt zwei sanfte Ionisierungsmethoden für Peptide und Proteine, die Electrospray-Ionisation (ESI) und die *matrix-assisted laser desorption ionization* (MALDI). Beide Techniken werden vorwiegend in Kombination mit RP-HPLC eingesetzt. Mit zunehmender Sensitivität der Massenspektrometer bietet jedoch auch die Kapillarelektrophorese eine neue Alternative (Kolch et al., 2005; Schiffer et al., 2006).

MALDI-*time of flight* (TOF)-Massenspektrometrie (MS) erfordert normalerweise eine *offline*-Trennung der Probe; es gibt jedoch auch *online*-Methoden. *Offline*-Trennungen haben den Vorteil, dass Vorläufer-Ionen sorgfältig ausgewählt werden können, um Redundanzen bei der Analyse zu vermeiden und die Detektion wenig intensiver Peptide zu verbessern. Allerdings erhöhen sie die für die Analyse benötigte Zeit und den damit verbundenen Aufwand. Bisher bestehende Limitierungen der MALDI-Fragmentierung durch *post source decay* (PSD) wurden durch neue Entwicklungen in der Flüssigkeitschromatographie (*liquid chromatography*, LC) überwunden (Bodnar et al., 2003; Chen et al., 2005; Hofmann et al., 2005; Macdonald et al., 2002; Sickmann et al., 2000).

Bei der ESI-Massenspektrometrie ist die direkte Kopplung von LC und ESI-Interface sehr einfach und erlaubt die vollständige Automatisierung. Zudem bietet sie hohe Sensitivität, eine hohe Qualität der Spektren sowie eine hohe Aufnahmegeschwindigkeit. Allerdings kann es wegen der datenabhängigen Auswahl der Vorläufer-Ionen (*data-dependent ion selection*, DDIS) zu Redundanzen bei der Peptid- oder Proteinidentifikation kommen.

In der ESI-Massenspektrometrie finden verschiedene Arten von Instrumenten, wie Tripelquadrupole, Quadrupol-Ionenfallen und Quadrupol-TOF-Massenspektrometer (Q-TOF), Verwendung (de Jong, 1998; Domon und Aebersold, 2006; Guerrero und Kleiner, 2005; Lemmel und Stevanovic, 2003). Heute erlaubt die LC-gekoppelte Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) die Identifizierung Hunderter Liganden in einem Experiment (Dengjel et al., 2005; Dongre et al., 2001; Hickman et al., 2004).

1.4. Diversität des HLA-Ligandoms

Die HLA-Moleküle des Menschen werden innerhalb des MHC durch drei verschiedene Loci für Klasse-I-Moleküle codiert: HLA-A, HLA-B und HLA-C. Die parentalen Allele dieser Loci werden codominant exprimiert, wodurch bis zu sechs verschiedene Klasse-I-Allele in einem Individuum vorhanden sein können.

Zusätzlich zu dieser Polygenie gibt es bei den HLA-Molekülen außerdem einen ausgeprägten Polymorphismus, der die Diversität weiter erhöht. Derzeit sind für Klasse-I (HLA-A, -B, -C) 1947 Allele bekannt, die die Expression von 1592 verschiedenen Proteinen ermöglichen¹.

Der Großteil der polymorphen Aminosäuren befindet sich innerhalb der Peptidbindungsgrube, vor allem in den Taschen. Aufgrund ihrer Bedeutung für die Wechselwirkungen mit dem gebundenen Peptid sind diese Aminosäureaustausche verantwortlich für die vielfältigen Peptidbindungsspezifitäten der verschiedenen HLA-Allele. Die Aminosäurezusammensetzung einer Tasche bestimmt sowohl deren Stereochemie als auch deren Polarität und entscheidet somit über die Seitenketten des Peptids, die in die Taschen hineinragen dürfen.

Die Komplexität des MHC-Ligandoms wird vor allem durch Polygenie und Polymorphismus bestimmt. Mehr als 10^5 HLA-Klasse-I-Moleküle werden auf der Oberfläche einer einzigen Zelle exprimiert. Dabei kann die Anzahl der identischen Peptid-MHC-Komplexe zwischen einigen wenigen und bis zu 10000 Kopien pro Zelle variieren (Stevanovic und Schild, 1999). Das MHC-Ligandom beschreibt die Gesamtheit all dieser MHC-präsentierten Peptide, die aus Tausenden verschiedenen Proteinen stammen können und dadurch das Proteom an der Zelloberfläche für das Immunsystem sichtbar machen. Beeinflusst wird es durch verschiedenste Faktoren wie Zelltyp und Gewebeart, Infektion oder Transformation sowie den aktuellen Zustand der einzelnen Zelle (Abbildung 1.3). Dieser hängt beispielsweise von der Nährstoffsituation oder äußeren Stressfaktoren ab. Hinzu kommen noch interindividuelle Unterschiede (Hickman et al., 2003; Rammensee et al., 2002; Weinschenk et al., 2002).

¹<http://www.anthonynolan.org.uk/HIG/>, Release 2.20.0, Abfrage: 10.02.2007

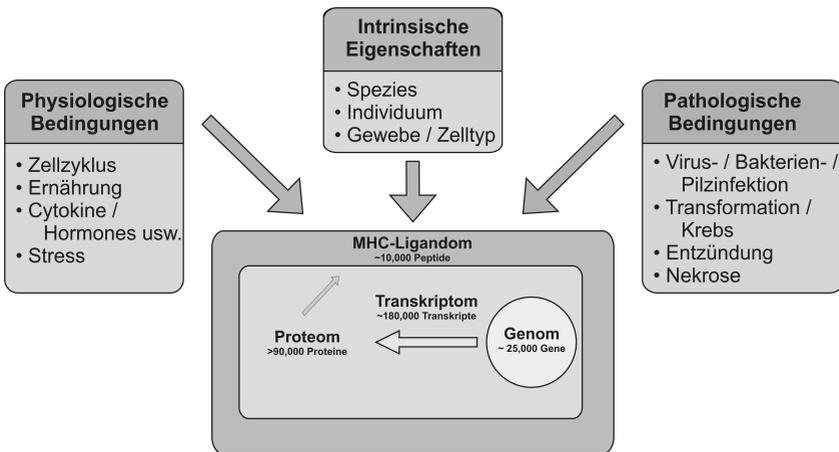


Abbildung 1.3.: Einflüsse auf das Ligandom. Das Repertoire MHC-präsentierter Liganden wird durch eine Vielzahl von Faktoren bestimmt, zu denen intrinsische Eigenschaften ebenso zählen wie äußere physiologische und pathologische Bedingungen. Folglich spiegelt das MHC-Ligandom den zellulären Status, insbesondere das Proteom (Harrison et al., 2002), wider. Letzteres ist über das Transkriptom (Carninci et al., 2005) mit dem Genom (Southan, 2004) der Zellen verbunden.

1.5. HLA-Supertypen

Mit einer wachsenden Zahl an genauer charakterisierten HLA-Allelen wurde deutlich, dass diese zu Gruppen zusammengefasst werden können. Die Einteilung in die sogenannten HLA-Supertypen kann entweder aufgrund ihrer Struktur oder ihrer Funktion erfolgen. Im ersten Fall werden dazu entweder die Primärsequenzen der HLA-Allele – vollständig oder auf die Taschen beschränkt (Chelvanayagam, 1996; McKenzie et al., 1999) – oder aber ihre Tertiärstruktur (Doytchinova et al., 2004) berücksichtigt. Der zweite Ansatz gruppiert die Allele entsprechend ihres Peptidbindungsmotivs (del Guercio et al., 1995) oder aufgrund von Allel-übergreifend bindenden Peptiden (Sidney et al., 1996b). Er nähert sich damit stärker der Funktion von HLA-Molekülen, der Peptidpräsentation gegenüber T-Zellen, an. Abbildung 1.4 zeigt eine solche Einordnung verschiedener HLA-Allele, bei der diese basierend auf experimentell beobachteten Peptidbindungsspezifitäten gruppiert wurden (Lund et al., 2004). Sidney et al. (1995) haben die Hypothese aufgestellt, dass ein Peptid, das an eines der Moleküle eines Supertyps bindet, mit hoher Wahrscheinlichkeit auch in der Lage ist, an die anderen Supertyp-Mitglieder zu binden.

Die Immuntherapie von Krebs oder viralen Infektionen kann auf immunogenen, HLA-präsentierten Peptiden basieren, die aus Antigenen stammen, welche spezifisch für die jeweilige Krankheit sind (C. L. Slingluff et al., 2003; Ramensee et al., 2002; Weinschenk et al., 2002). Mit Hilfe dieser Strategie könnte es gelingen, T-Zell-Antworten zu induzieren, die eine Zerstörung der entarteten oder infizierten Zellen bewirken. Ein gewichtiger Nachteil dieses sicheren und technisch einfachen Ansatzes ist die HLA-Restriktion der Peptide. Sie macht es notwendig, verschiedene Impfstoffe zu verwenden, die für jeden Patienten entsprechend seiner HLA-Typisierung maßgeschneidert sind. Der ausgeprägte Polymorphismus der HLA-Moleküle stellt die peptidbasierte Immuntherapie vor eine große Herausforderung.

Das Konzept der HLA-Supertypen mit promiskuitiven HLA-Liganden, die alle Antigene eines ganzen Supertyps binden können, scheint eine vielversprechende Lösung dieses Problems zu sein. Ein und dasselbe Peptid könnte zur Therapie einer Vielzahl von Patienten mit den unterschiedlichsten HLA-Allelen eingesetzt werden, wenn die Allele zum gleichen Supertyp gehören. Daher wurden solche promiskuitiv bindenden Peptide mit Bindungsstudien, T-Zell-Stimulationen oder Vorhersagen intensiv untersucht (Burrows et al., 2003; Matsueda et al., 2005; Minami et al., 2006; Sidney et al., 2003; Takedatsu et al., 2004).

Die ersten Supertypen, A2, B7 und A3, wurden 1995 und 1996 definiert

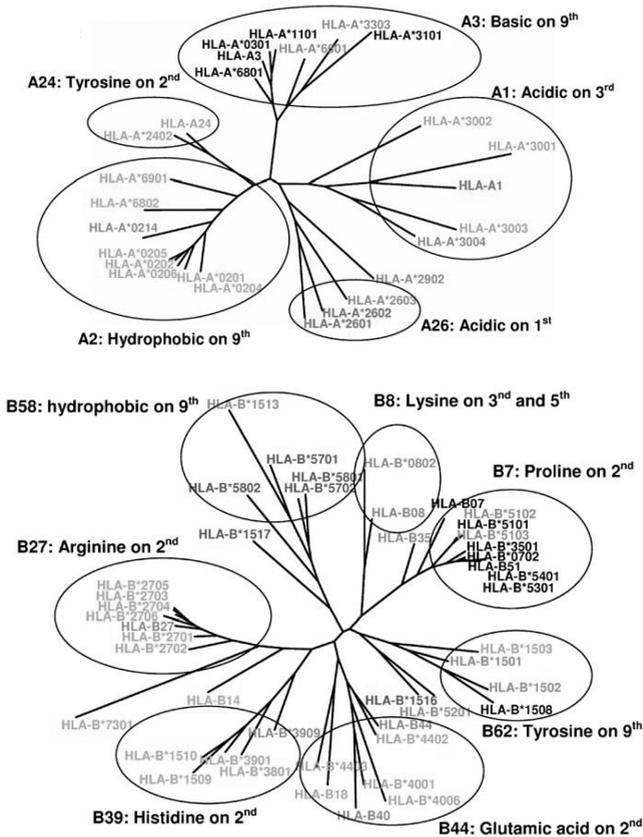


Abbildung 1.4.: Einteilung der HLA-A- und -B-Supertypen nach Lund et al. (2004). Die HLA-Allele wurden basierend auf ihren Peptidbindungsspezifitäten zu Clustern zusammengefasst.

(del Guercio et al., 1995; Sidney et al., 1995, 1996b). So werden HLA-A*0301, -A*1101, -A*3101, -A*3301 sowie -A*6801 unter Berücksichtigung von Taschenstrukturen, Peptidmotiven, kreuzreagierenden Peptiden und deren möglicher Vorhersage in den HLA-A3-Supertyp eingeordnet. Zum HLA-B44-Supertypen wurden 1996 basierend auf Peptidbindungsmotiven HLA-B37, -B41, -B44, -B45, -B47, -B49, -B50, -B60 und -B61 zusammengefasst (Sidney et al., 1996a). Dabei wurden im Fall von B37 (Falk et al., 1993), B40/B60 (Falk et al., 1995a; Harris et al., 1993) und B44-Subtypen (DiBrino et al., 1995; Fleischhauer et al., 1994) Informationen aus Poolsequenzierungen berücksichtigt. Inzwischen wurden auch HLA-Peptidbindungsstudien unter Einsatz von Peptiden mit Aminosäureaustauschen und von Peptidbibliotheken verwendet, um die Bindungsmotive von sechs Molekülen des HLA-B44-Supertyps genauer zu charakterisieren und promiskuitiv bindende Peptide zu finden (Sidney et al., 2003). Auch einige natürliche Liganden konnten mit Hilfe der Massenspektrometrie seither sequenziert werden (Hickman et al., 2004; Krüger et al., 2005).

1.6. Reverse Immunologie: Vorhersage von T-Zell-Epitopen

Noch im selben Jahr, in dem die ersten allelspezifischen Peptidmotive publiziert wurden (Falk et al., 1991b), unternahm man erste Anstrengungen, solche Motive für die Vorhersage von T-Zell-Epitopen aus Proteinsequenzen zu verwenden (Pamer et al., 1991; Rotzschke et al., 1991). Mit Hilfe dieser „reversen Immunologie“ konnten bereits viele T-Zell-Epitope identifiziert werden (Celis et al., 1994). Insbesondere in den letzten Jahren ist der Anteil der durch reverse Immunologie identifizierten T-Zell-Epitope deutlich gestiegen, vor allem auch der von CD4⁺ T-Zell-Epitopen (Kessler und Melief, 2007). Weitere Ansätze zur Identifizierung von T-Zell-Epitopen sind in Stevanovic (2002) sowie Kessler und Melief (2007) dargestellt.

Mittlerweile sind viele Vorhersageprogramme, die auf unterschiedlichen Algorithmen beruhen, entwickelt und im Internet frei zugänglich gemacht worden. Die meisten sagen die MHC-Bindung voraus (NetMHC, SVMHC, PRE-DEP), einige den TAP-Transport (MHCpred) oder die proteasomale Prozessierung (PAProC, NetCHOP) und manche sogar eine Kombination von zwei oder drei dieser Einzelschritte der Antigenprozessierung (MHC-Pathway/ IEDB, WAPP). Übersichten über verfügbare Programme zeigen Stevanovic (2005) sowie Kessler und Melief (2007). Die bekanntesten davon sind derzeit SYF-PEITHI und BIMAS.

SYFPEITHI Die Vorhersagen von MHC-Klasse-I- und -Klasse-II-Liganden durch SYFPEITHI basieren ausschließlich auf natürlichen Liganden. Folglich sagt SYFPEITHI nicht die MHC-Bindung voraus, sondern natürliche MHC-Liganden nach erfolgreicher Prozessierung, Transport und MHC-Bindung. Zugrunde liegt die Annahme, dass alle Aminosäuren eines Peptids einen mehr oder weniger großen Beitrag zur Bindung liefern. Diese Beiträge werden durch Matrizen beschrieben, die jeder Aminosäure in jeder Position des Peptid einen bestimmten Wert zuordnen. Zur Vorhersage von T-Zell-Epitopen wird ein Protein in alle theoretisch denkbaren Peptide zerlegt und diese werden durch Addition der Punktwerte aus der entsprechenden Matrix beurteilt. Die tatsächlichen T-Zell-Epitope werden unter den 2% der Peptide mit den höchsten Werten erwartet (Rammensee et al., 1999).

BIMAS BIMAS basiert auf Bindungsstudien mit synthetischen Peptiden. Wie SYFPEITHI geht auch die BIMAS-Vorhersage davon aus, dass der Beitrag der verschiedenen Aminosäuren in jeder Position des Peptids unabhängig von der gesamten Peptidsequenz ist. Im Gegensatz zu SYFPEITHI wird jedoch kein additives, sondern ein multiplikatives Verfahren zur Berechnung der theoretischen Bindungsstabilität von Peptiden eingesetzt. Auch hier werden biologisch relevante Peptide unter den besten 2% erwartet. BIMAS war der erste frei im Internet zugängliche Vorhersagealgorithmus (Parker et al., 1994).

Weitere Methoden Den Algorithmen von SYFPEITHI und BIMAS liegen *position-specific scoring matrices* (PSSMs) zugrunde: Alle Positionen liefern ihre Beiträge unabhängig voneinander. Es gibt jedoch noch viele weitere Methoden, wie *artificial neural networks* (ANNs) oder *support vector machines* (SVMs), die beide gut geeignet für das Erkennen nicht-linearer Muster sind – wenn also die einzelnen Positionen beispielsweise nicht unabhängig voneinander sind. Lundegaard et al. (2007) und Peters et al. (2006) bieten eine Übersicht und einen Vergleich der verwendeten Methoden.

1.7. Die T-Zell-Antwort als Konsequenz des MHC-Ligandoms

Das Screenen des Proteoms einer Zelle durch die Antigenprozessierung und die nachfolgende Präsentation auf der Zelloberfläche offenbart das Innere der Zelle dem Immunsystem – insbesondere den T-Zellen. Dies bedeutet, dass CD8⁺ T-Zellen die Peptid-MHC-Komplexe mit Hilfe ihrer T-Zell-Rezeptoren (TCR)

abtasten, um pathologische Veränderungen – angezeigt beispielsweise durch virale Peptide – detektieren und die entsprechenden Zellen eliminieren zu können. Dabei sind für die Immunantwort neben der Interaktion von TCR und Peptid-MHC-Komplex gleichzeitige costimulatorische Signale nötig, die beispielsweise durch Wechselwirkung von CD28-Molekülen auf der T-Zelle mit CD80 oder CD86 auf einer professionellen APC zustande kommen. Auf die Erkennung von Fremd-Peptiden reagieren die T-Zellen mit der Freisetzung von cytotoxischen Substanzen wie Perforin und Granzym, die die erkrankte Zelle zerstören. Dabei polymerisiert das Perforin in der Zielmembran und bildet Löcher, durch die die Granzyme in die Zielzelle hineingelangen und dort Apoptose auslösen können. Ein weiterer Mechanismus zur Induktion von Apoptose ist die Wechselwirkung von Fas-Ligand auf der T-Zelle mit Fas auf der Zielzelle.

Selbst-Peptide aus normalen, körpereigenen Proteinen dürfen hingegen nicht erkannt werden, sonst liegt eine Autoimmunreaktion vor. Um dieser vorzubeugen, werden die T-Zellen im Thymus der negativen Selektion unterworfen: T-Zellen, die Selbst-Peptid-MHC-Komplexe erkennen, werden aus dem T-Zell-Repertoire eliminiert. Trotz der „ektopischen“ oder „promiskuitiven“ Expression gewebespezifischer Proteine im Thymus (Derbinski et al., 2001, 2008; Sospedra et al., 1998) können jedoch nicht alle körpereigenen Peptide den T-Zellen zu Selektionszwecken vorgesetzt werden. Daher können autoreaktive T-Zellen auch in der Peripherie durch Anergie stillgelegt werden, wenn sie Peptid-MHC-Komplexe auf anderen Zellen als aktivierten, professionellen APCs erkennen und daher keine costimulatorischen Signale erhalten.

Im Fall einer Tumorerkrankung kann die T-Zell-Toleranz gegenüber körpereigenen Peptiden jedoch zum Problem werden. Tumorassoziierte T-Zell-Epitope können aus verschiedenen Arten von Tumorantigenen stammen (Stevanovic, 2002):

- tumorspezifische Antigene, die ausschließlich im Tumor zu finden sind
 - *cancer-testis*-Antigene, die normalerweise nur in Keimzellen exprimiert werden (z.B. MAGE-A1, NY-ESO-1)
 - mutierte Proteine durch Punktmutation, Leserastermutation, Translokation, alternatives mRNA-Spleißen, Ablesen alternativer offener Leserahmen, Translation von Introns, veränderte posttranslationale Modifikationen (PTMs), Proteinspleißen u.a.
 - oncovirale Proteine (z.B. E7 aus dem Humanen Papillomvirus 16)
- tumorassoziierte Antigene, die auch auf normalem Gewebe vorkommen

- Differenzierungsantigene, die gewebsspezifisch auch in Normalgeweben exprimiert werden (z.B. Tyrosinase und gp100 in Melanocyten, PSA in der Prostata)
- Proteine, die im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe überexprimiert werden (z.B. MUC1, CEA, Survivin)

Um T-Zell-Antworten gegen Tumorantigene erfolgreich induzieren zu können, muss zunächst eine eventuell vorhandene Toleranz gegenüber diesen gebrochen werden. Dies betrifft insbesondere die tumorassoziierten Antigene, die auch im Normalgewebe zu finden sind. Sie sollten als körpereigene Bestandteile normalerweise nicht von T-Zellen erkannt werden. Gotter et al. (2004) zeigten außerdem, dass nicht nur die Melanom-Differenzierungsantigene Melan-A und Tyrosinase im Thymus exprimiert werden, sondern auch *cancer-testis*-Antigene wie MAGE-A1, -A3, -A4 und NY-ESO-1. Möglicherweise kann also im Thymus auch eine zentrale Toleranz gegenüber tumorspezifischen Antigenen induziert werden, die immuntherapeutische Ansätze erschwert.

Allerdings exprimierten alle getesteten Thymi auch Melan-A (Gotter et al., 2004). Trotzdem ruft beispielsweise das A*02-restringierte T-Zell-Epitop ELA-GIGILTV aus Melan-A in den meisten Menschen T-Zell-Reaktionen hervor. Es wird sogar als Positivkontrolle in T-Zell-Stimulationsexperimenten verwendet. Trotz der Expression im Thymus sind also in der Peripherie spezifische T-Zellen vorhanden. Auch gegen weitere Peptide aus Melanom-Differenzierungsantigenen konnten spezifische CTLs aus peripherem Blut induziert werden (Kawakami et al., 1996).

Die Expression von MUC1 und CEA im Thymus wurde auf Proteinebene nachgewiesen (Cloosen et al., 2007). Von MUC1 waren allerdings lediglich die voll glykosylierte Form oder die differenzierungsabhängige Glykoform vorhanden, nicht aber die tumorassoziierte Glykoform (Reis et al., 1998). Obwohl MUC1 und CEA also empfänglich für zentrale Toleranz zu sein scheinen, könnte diese unvollständig sein, was verschiedene Glykoformen betrifft, die nur auf Tumorzellen vorkommen.

Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass der Schwellenwert der zentralen Toleranz gegenüber gewebsspezifischen Antigenen stark von der Höhe der Antigenexpression im Thymus abhängt. Entscheidend für die zentrale Toleranz scheint also nicht nur zu sein, ob ein Antigen im Thymus exprimiert wird oder nicht, sondern auch in welcher Höhe.

All dies weist darauf hin, dass immuntherapeutische Ansätze zwar durch die zentrale Toleranz gegenüber den Tumorantigenen erschwert werden. Es gibt

jedoch auch Anhaltspunkte, dass die Toleranz nicht unbedingt vollständig ist und dass spezifische T-Zellen trotzdem vorhanden sein können.

1.8. Strategien der MHC-Ligandom-Analyse

Prinzipiell lassen sich drei primäre Strategien bei der Analyse von MHC-Ligandomen unterscheiden, die im Folgenden näher erläutert werden (Abbildung 1.5).

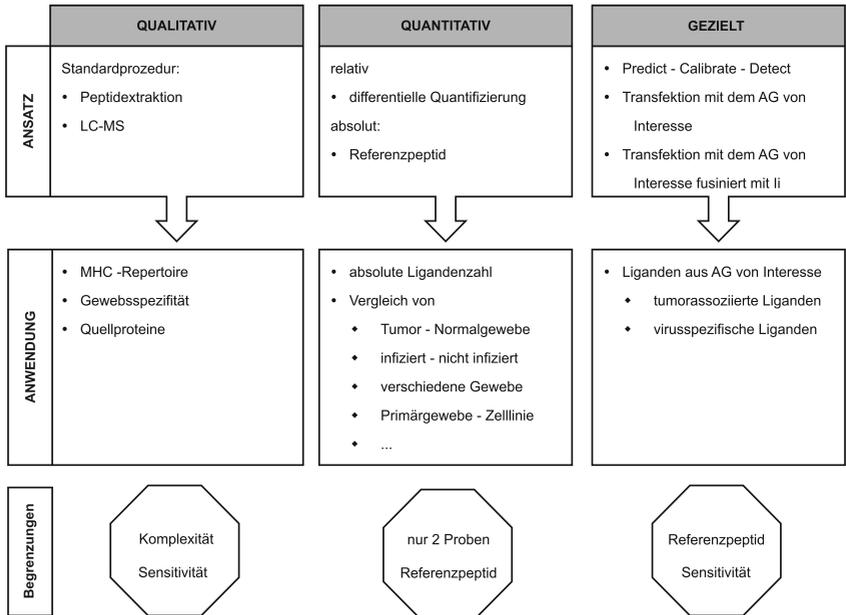


Abbildung 1.5.: Strategien der MHC-Ligandom-Analyse. Für die Analyse von MHC-Ligandomen sind drei verschiedene Vorgehensweisen verfügbar (Buchsbbaum et al., 2003; Dengjel et al., 2004, 2005; Hickman et al., 2004; Krüger et al., 2005; Lemmel et al., 2004; Pascolo et al., 2001; Planz et al., 2001; Schirle et al., 2000; Weinschenk et al., 2002; Weinzierl et al., 2007). Sie ermöglichen eine Reihe von Anwendungen, haben aber auch gewisse Einschränkungen. AG, Antigen; Ii, invariante Kette.

1.8.1. Qualitative und Quantitative Analyse von Einflüssen auf das MHC-Ligandom

Ein Beispiel für die qualitative und quantitative Analyse von MHC-Ligandomen zeigen Dengjel et al. (2005). Die beiden Antigenprozessierungswege der Zelle beginnen mit sehr unterschiedlichen Schritten: Das Proteasom generiert die Peptide für die Präsentation auf MHC-Klasse-I-Molekülen (siehe 1.2) aus intrazellulären Proteinen; Abbauprozesse im endosomal-lysosomalen System erzeugen MHC-Klasse-II-Liganden aus extrazellulären Quellproteinen. Aus klassischer Sicht existieren diese beiden Wege getrennt voneinander. Wie bereits erwähnt, gibt es jedoch das Phänomen der *Crosspresentation*, durch die exogene Antigene auf MHC-Klasse-I-Moleküle gelangen. Außerdem sind auf Klasse-II-Molekülen auch häufig Peptide aus cytosolischen Quellproteinen zu finden (Dongre et al., 2001; Nimmerjahn et al., 2003). Um die Rolle der Autophagie für diesen alternativen Weg sowie ihre Einflüsse auf das MHC-Peptidrepertoire zu untersuchen wurden verschiedene massenspektrometrische Methoden eingesetzt.

Da Autophagie eine Reaktion der Zelle auf Nährstoffmangel oder Stress ist, wurde die Zelllinie Awells einerseits in normalem Medium kultiviert, andererseits in Medium, dem Serum und Aminosäuren fehlten (Dengjel et al., 2005). Durch die qualitative Analyse des MHC-Klasse-II-Peptidrepertoires (HLA-DR) wurden auf normalen Awells-Zellen 404 verschiedene Peptidsequenzen identifiziert. Wie bei Klasse-II-präsentierten Peptiden üblich handelte es sich dabei um Längenvarianten von insgesamt 173 verschiedenen Kernsequenzen. Diese stammten hauptsächlich aus intrazellulären und Membranproteinen, aber zu einem kleineren Prozentsatz auch aus Proteinen anderer Kompartimente. Zusätzlich zur qualitativen Analyse wurde die Präsentation von 54 Peptiden auf normalen und hungernden Zellen anhand der Signalintensitäten in LC-MS-Experimenten differentiell quantifiziert. Dabei zeigte sich, dass unter Mangelbedingungen die Präsentation von intrazellulären und lysosomalen Proteinen stark erhöht ist. Dies wird vermutlich vor allem durch die verstärkte Bildung von autophagischen Vakuolen verursacht, daneben aber auch durch veränderte Aktivitäten lysosomaler Proteasen. Beide Einflüsse führen zu einem veränderten Pool an Proteinen für die Prozessierung bzw. an Peptiden für die Beladung der MHC-Moleküle.

Die durch Autophagie verursachten Veränderungen des Proteoms werden also auch auf der Zelloberfläche von MHC-Molekülen wiederspiegelt, sodass diese Veränderungen einer Überprüfung durch das Immunsystem zugänglich werden.

Doch nicht nur die Autophagie hinterlässt ihre Spuren im MHC-Ligandom

einer Zelle. So verändert $\text{IFN-}\gamma$ die Zusammensetzung und dadurch die proteolytischen Aktivitäten des Proteasoms, sodass sich dessen Schnittspezifitäten verändern (Stoltze et al., 2000). Osterloh et al. (2006) zeigten *in vivo* in Mäusen, dass die Zusammensetzung der Proteasomuntereinheiten das Ovalbuminspezifische CD8^+ T-Zell-Repertoire beeinflusst; vermutlich durch Veränderung der MHC-Peptidrepertoires, die im Thymus den sich entwickelnden T-Zellen präsentiert werden. Massenspektrometrische Analysen von Luckey et al. (2001) konnten qualitative sowie quantitative Veränderungen des MHC-Ligandoms unter dem Einfluss von Proteasominhibitoren nachweisen.

Tapasin-defiziente Zellen weisen ebenfalls ein verändertes Peptidrepertoire auf, wie Untersuchungen durch Edman-Abbau und Massenspektrometrie zeigten (Purcell et al., 2001). Auch qualitative und quantitative Vergleiche von TAP-exprimierenden und -defizienten Zellen offenbarten deren unterschiedliche MHC-Ligandome (Weinzierl et al., 2008).

Viele Krankheiten wie Krebs oder Virusinfektionen haben Mechanismen entwickelt, um der T-Zell-Erkennung zu entgehen, indem sie verschiedene Schritte der Antigenprozessierung stören oder außer Kraft setzen (Bubenik, 2004; Liley und Ploegh, 2005). Obwohl eine Behinderung der Antigenprozessierungsmaschinerie vorteilhaft für den Tumor oder das Pathogen ist, weisen die dabei verursachten Ligandomveränderungen auf Ansatzpunkte für Immuntherapien hin, die ihrerseits wiederum das Peptidrepertoire beeinflussen können (Reits et al., 2006).

1.8.2. Gezielte Suche nach krankheitsassoziierten MHC-Liganden

Pathologische Umstände, wie virale Infektionen oder Krebsentstehung, beeinflussen ebenfalls nicht nur das Proteom der Zelle, sondern infolgedessen auch das MHC-Ligandom. Erkennen T-Zellen darin krankheitsassoziierte Liganden, können sie diese Gefahr eliminieren. Die Identifizierung solcher Liganden bildet daher die Grundlage für immuntherapeutische Ansätze wie Peptidvakzinierungen (C. L. Slingsluff et al., 2001, 2003) oder adoptiven T-Zell-Transfer (Dudley et al., 2005). Haupthindernis ist dabei die geringe Zahl bekannter Tumorantigene und daraus abstammender T-Zell-Epitope (siehe 1.7).

Mit Hilfe der *Predict – Calibrate – Detect*-Strategie kann gezielt nach vorhergesagten T-Zell-Epitopen (siehe 1.6) aus einem beliebigen krankheitsassoziierten Antigen gesucht werden. Ziel ist der massenspektrometrische Nachweis des Epitops auf molekularer Ebene, d.h. als auf der Zelloberfläche präsentierter Ligand. Durch dieses Vorgehen wurden beispielsweise HLA-A*02-restringierte Epitope aus den tumorassoziierten Antigenen CEA und p53 sowie

aus dem tumorspezifischen MAGE-A1 identifiziert (Pascolo et al., 2001; Schirle et al., 2000). Für die Proteinsequenzen der Antigene wurden zunächst mit Hilfe der SYFPEITHI-Algorithmen (siehe 1.6) mögliche T-Zell-Epitope vorhergesagt, die dann synthetisiert und zur Kalibrierung des analytischen Systems eingesetzt wurden. Diese Standardpeptide wurden zunächst in LC-MS- und -MS/MS-Experimenten (siehe 2.10.2) anhand der Parameter Molekulargewicht, Retentionszeit und Peptidfragmentierung charakterisiert. Anschließend wurden Peptideluatate von Geweben oder Zelllinien, die das entsprechende Antigen exprimieren, unter gleichen Bedingungen analysiert. Die Detektion der vorhergesagten T-Zell-Epitope erfolgte durch Vergleich der Parameter der Peptide aus dem komplexen Gemisch natürlicher Liganden mit denen der Standardpeptide. Der Vergleich der Signalintensitäten ermöglicht außerdem eine Abschätzung der Kopienzahl eines bestimmten Peptids auf der Zelloberfläche. Auch virale Peptide können auf diese Art und Weise detektiert werden (Planz et al., 2001).

1.8.3. Differentielle Quantifizierung von MHC-Liganden

Auch mit Hilfe der differentiellen Quantifizierung lassen sich krankheitsassoziierte Liganden identifizieren. Durch Markierung mit unterschiedlichen Isotopen kann die Peptidpräsentation zweier Proben relativ quantifiziert werden. Im Gegensatz zur *Predict – Calibrate – Detect*-Strategie ist kein vorheriges Wissen über relevante Proteine oder Peptide nötig. Dabei werden die Peptide zunächst von zwei verschiedenen Proben – beispielsweise Tumor- und Normalgewebe oder virusinfizierte und nicht infizierte Zellen – isoliert und mittels der dNIC-Methode differentiell modifiziert (Lemmel et al., 2004; Weinzierl und Stevanovic, 2006). Beide Proben werden anschließend gemischt und in einem LC-MS-Experiment analysiert. War ein Peptid in beiden Proben vorhanden, liegt es im Gemisch in einer mit dem schweren Isotop und in einer mit dem leichten Isotop markierten Form vor. Daher sind zwei Signale mit einem bestimmten Massenunterschied sichtbar. Das Verhältnis dieser Signale repräsentiert das Verhältnis der Peptidpräsentation. Kommt ein Peptid nur in einer der beiden Proben vor, zeigt sich bei der Massenspektrometrie nur ein Signal.

Diese Technik erlaubt beispielsweise die groß angelegte differentielle Analyse der Peptidpräsentation von Tumor- und Normalgeweben (Weinzierl et al., 2007), die zur Identifizierung tumorassoziierter Liganden führen kann. Einige Liganden werden ausschließlich auf einem der beiden Gewebe exprimiert, während andere auf beiden vorkommen – jedoch mit deutlichen quantitativen Unterschieden.

Die differentielle Quantifizierung eignet sich auch zum Vergleich von un-

transfiziert auf der einen und transfizierten Zellen auf der anderen Seite, die ein bestimmtes Antigen von Interesse exprimieren. So wurden beispielweise normale Awells-Zellen mit Keratin 18-Transfektanten verglichen, wobei ein aus Keratin 18 abstammender MHC-Ligand identifiziert wurde (Lemmel et al., 2004). Keratin 18 ist ein tumorassoziiertes Antigen, das in einigen Krebsarten überexprimiert wird.

Beide Beispiele zeigen, dass die differentielle Quantifizierung eine weitere Methode bei der Suche nach krankheitsassoziierten MHC-Liganden ist. Ob die durch sie identifizierten Liganden aber auch Epitope darstellen, die T-Zell-Reaktionen gegen die entsprechende Krankheit hervorrufen können, muss in weiteren Experimenten untersucht werden.

1.9. Analyse von Ligandom und Proteom im Vergleich

Während der Begriff „Proteom“ die Gesamtheit aller Proteine bezeichnet, die einem Genom entsprechen, (Wasinger et al., 1995), umfasst das „MHC-Ligandom“ das gesamte Peptidrepertoire, das auf MHC-Molekülen präsentiert wird. Das MHC-Ligandom macht das Proteom für die Überwachung durch das Immunsystem zugänglich, indem es das Proteom in Form von Peptiden auf der Zelloberfläche widerspiegelt. Das Ligandom repräsentiert also gewissermaßen das funktionelle Bindeglied zwischen der Proteomik und der MHC-Ligandomik der Immunologie. Ähnliche Techniken finden in beiden Forschungsfeldern Verwendung, wobei die Massenspektrometrie deren Herzstück darstellt.

Eine der Parallelen zwischen Proteomik und Ligandomik ist die Suche nach Biomarkern (Group, 2001). Eine der Hauptanwendungen der Proteomik ist die Charakterisierung von Biomarkern für die klinische Anwendung bei Diagnose, Therapie, Prognose und Monitoring oder auch für die Entwicklung von Medikamenten und die Überwachung klinischer Studien (Cho und Cheng, 2007). Dabei werden vor allem Körperflüssigkeiten untersucht, da sie sehr leicht zugänglich sind (Hu et al., 2006). Für eine erste Definition eines Biomarkers spielen jedoch auch Gewebsbiopsien eine wichtige Rolle (Lescuyer et al., 2007).

Auch in der MHC-Ligandomik spielen klinische Anwendungen eine wichtige Rolle. MHC-präsentierte Peptide werden bereits in klinischen Studien analog zu den Biomarkern für immuntherapeutische Vakzinierungen und das Immunmonitoring der behandelten Patienten eingesetzt. Im Vordergrund steht dabei die Suche nach Peptiden aus tumorassoziierten Antigenen (TAA), die für solche Zwecke eingesetzt werden (siehe 1.8.2). Im Gegensatz zum Proteom, in dem sich krankhafte Entwicklungen als Erstes bemerkbar machen, repräsentiert jedoch

das Ligandom die Verbindung zum Immunsystem, das diesen entgegenwirken kann. Solche Veränderungen der beiden Repertoires müssen allerdings nicht unbedingt zusammenhängen. So korrelieren weder Transkriptom und Proteom (Gygi et al., 1999) noch Transkriptom und Ligandom (Weinzierl et al., 2007). Daher ist eine Korrelation von Proteom und Ligandom ebenfalls unwahrscheinlich. Nicht nur Proteinabundanzen bestimmen das MHC-Peptidrepertoire, sondern auch Synthese- und Abbauraten (Milner et al., 2006; Yewdell und Lev, 2007).

Einer der größten Vorteile der Proteomik gegenüber der Genomik oder Transkriptomik besteht in der Möglichkeit, die posttranslationalen Modifikationen (PTMs) von Proteinen zu charakterisieren (Jensen et al., 2006; Mann und Jensen, 2003). Da diese PTMs viele zentrale Aufgaben bei Struktur und Regulation übernehmen, müssen T-Zellen in der Lage sein, auch Änderungen der PTMs zu detektieren, die beispielsweise durch Dysregulation, onkogene Transformation oder Entzündungsprozesse hervorgerufen werden. Die Massenspektrometrie ist ein ideales Werkzeug für die PTM-Analyse. Sie ermöglicht nicht nur die Analyse der PTMs von Proteinen, sondern auch von MHC-präsentierten Peptiden, und damit die T-Zell-unabhängige Identifizierung modifizierter, natürlich prozessierter Peptide, die zu Immunantworten führen können. So wurden zwei natürliche HLA-Klasse-II-Liganden (HLA-DR), die aus CD53 stammen, identifiziert. Ihre N-Glykosylierung wurde durch eine Kombination von Peptidfragmentierungen in der Quelle und in der Kollisionszelle eines Q-TOF-Massenspektrometers charakterisiert (Dengjel et al., 2005). Für Klasse-I-Moleküle wurde bereits gezeigt, dass T-Zellen Glykosylierungen erkennen können (Haurum et al., 1994; Kastrop et al., 2000). Dies ist also auch für Klasse-II-Moleküle denkbar. Noch viele weitere PTMs von MHC-Peptiden sind bekannt (Engelhard et al., 2006), wodurch sich die Komplexität des MHC-Ligandoms erneut erhöht. Dies ist jedoch unerlässlich, da es die Aufgabe des Ligandoms ist, möglichst alle Veränderungen des Proteoms widerzuspiegeln.

So wie Ligandomik und Proteomik von den Entwicklungen in der massenspektrometrischen Analyse profitieren (siehe 1.3), treffen auch deren Beschränkungen für beide Gebiete zu. In beiden liegt eine enorme Variationsbreite der Peptid- bzw. Proteinkonzentrationen vor: etwa fünf Größenordnungen im Fall der MHC-Liganden und mehr als zehn Größenordnungen bei der Analyse von Proteomen wie dem menschlichen Plasma-Proteom (Anderson und Anderson, 2002). Seltener vorkommende Bestandteile sind einer Beobachtung nur schwer zugänglich: zum einen da die höher konzentrierten Moleküle mit viel höherer Wahrscheinlichkeit detektiert werden, zum anderen bedingt durch die Detektionsgrenzen der verwendeten Instrumente.

In der Proteomik besteht außerdem das Problem, dass bei der zweidimensionalen (2D-) Gelelektrophorese einige Teile des Proteoms (z.B. membranassoziierte oder -gebundene Proteine) mit extremen physikochemischen Eigenschaften (isoelektrischer Punkt, Molekulargewicht) nicht leicht zu untersuchen sind (Corthals et al., 2000). Diese Einschränkung betrifft MHC-Liganden weniger stark, da sie nicht ganz so extreme Eigenschaften aufweisen.

Obwohl die 2D-Gelelektrophorese Hunderte Proteinspots in einem einzigen Gel auftrennen kann (Gygi et al., 2000), stellen diese doch nur einen kleinen Teil des gesamten menschlichen Proteoms dar. Dieses wird durch etwa 25000 Gene codiert (Southan, 2004), die in verschiedenen Spleißvarianten exprimiert oder unterschiedlich posttranslational modifiziert werden können, was die Komplexität des Proteoms noch weiter erhöht. Trotz der zunehmenden Verwendung der LC-MS/MS in der Proteomik müssen noch einige technische Schwierigkeiten gelöst werden, bevor die vollständige Sequenzierung von Proteomen möglich sein wird (Gygi et al., 2002; Mann et al., 2001; Washburn et al., 2001). Auch in der MHC-Ligandom-Analyse besteht eine Hauptschwierigkeit in der Komplexität der Proben. Derzeit ist es möglich, einen kleinen Prozentsatz eines MHC-Ligandoms zu entschlüsseln: einige Hundert von etwa 10^4 verschiedenen Peptiden, die von einem MHC-Allotyp präsentiert werden.

Eine große Herausforderung der MHC-Ligandomik ist – verglichen mit der Proteomik – die Analyse experimenteller MS-Daten. Die Proteomik zielt für gewöhnlich auf die Identifizierung von Proteinen beispielsweise in tryptischen Verdau ab, die sich auf mehrere Peptide aus demselben Protein stützt. MHC-Peptidrepertoires entstehen zwar auch durch enzymatische Spaltungen während der Antigenprozessierung, in der Regel wird jedoch nur ein Peptid aus jedem Protein gefunden. Während in der Proteomik solche *one hit wonders* als nicht ausreichend zuverlässig angesehen werden, erhöht eine größere Anzahl an MHC-Liganden aus demselben Protein nicht die Sicherheit der Identifizierung (Veenstra et al., 2004). Außerdem können automatische Datenbankabfragen nicht durch die Schnittpspezifität des zum Verdau verwendeten Enzyms beschränkt werden, da eine große Bandbreite an Spaltspezifitäten zur Entstehung von MHC-Liganden beiträgt. Tryptische Peptide weisen außerdem ein C-terminales Arginin oder Lysin auf, was zu typischen Fragmentierungsmustern mit zusammenhängenden Ionenserien führt. MHC-Peptide hingegen können geladene Aminosäuren auch mitten in der Sequenz enthalten oder sogar nur aus hydrophoben Aminosäuren aufgebaut sein. So präsentiert HLA-A*02 Liganden mit hydrophoben Ankerresten in P2 und P Ω und bindet auch in anderen Positionen nur ungern geladene Aminosäuren. Daher ist eine manuelle Auswertung von Fragmentspektren unverzichtbar, die aber einiges an Expertise und Erfahrung erfordert. Gleichzeitig wird sie durch automatische Algorithmen zur

Identifizierung kaum erleichtert und ist daher sehr zeit- und personalintensiv.

Während für die Analyse von PTMs bereits viele Suchprogramme entwickelt wurden, stellt die *de novo*-Sequenzierung immer noch eine große Herausforderung dar (Reinders et al., 2004). Durch *de novo*-Sequenzierung könnten auch Sequenzen identifiziert werden, die bisher nicht in durchsuchbaren Datenbanken enthalten sind (z.B. aufgrund von *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) oder Proteinspleißen).

Die Herausforderungen in der Massenspektrometrie von Peptiden betreffen also die Analyse von Proteomen und MHC-Ligandomen gleichermaßen. Da die Proteomik ein rasch wachsendes Forschungsfeld darstellt, das derzeit viel Aufmerksamkeit auf sich zieht, sind hier baldige Weiterentwicklungen zu erwarten. Als der immunologisch spezialisierte Teil der Proteomik wird auch die MHC-Ligandomik stark von solchen Fortschritten profitieren und im Gegenzug das Verständnis von Prozessen innerhalb des Proteoms vertiefen.

1.10. Zielsetzung dieser Arbeit

Zu Beginn dieser Arbeit waren zwar für einige HLA-Allotypen Peptidmotive bekannt; diese basierten jedoch zum großen Teil auf Poolsequenzierungen durch Edman-Abbau, Bindungsstudien mit synthetischen Peptiden oder einer geringen Zahl individueller natürlicher Liganden. Durch deutliche Erhöhungen der Anzahl natürlicher HLA-Liganden mittels massenspektrometrischer Methoden sollten diese Motive überprüft und verfeinert werden. Daneben waren die Motive für weitere HLA-Allotypen mit bislang unbekanntem Peptidspezifitäten von Grund auf neu zu definieren (3.1).

Die Überlappung von HLA-Ligandomen verschiedener HLA-Allotypen war im Vorfeld dieser Arbeit lediglich auf Grundlage von Bindungsstudien mit synthetischen Peptiden untersucht worden. Daher waren Ligandomüberschneidungen mit Hilfe einer erheblichen Anzahl natürlicher Liganden sowie direkten massenspektrometrischen Vergleichen genauer zu analysieren. Die Bedeutung solcher Überlappungen für klinische Anwendungen sollte schließlich in T-Zell-Experimenten überprüft werden (3.2, 3.4).

Diese Arbeit sollte darüber hinaus die Übertragbarkeit von Konzepten der Proteomik auf die HLA-Ligandomik und deren Anwendung auf die vorhandene Datenlage untersuchen. So waren beispielsweise Analysen zur Gewebsspezifität von MHC-Liganden sowie zu deren Quellproteinen durchzuführen. Ausgewählte, potentiell tumorassoziierte Peptide aus der HLA-Ligandom-Analyse sollten zudem auf ihren klinischen Nutzen getestet werden (3.3, 3.4).

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

0,2 μm -Sterilfilter	Millipore, Schwalbach
10% Ammoniumpersulfat	Sigma, München
10 μl -Quarzküvette	Hellma, Müllheim
100 \times nicht-essentielle Aminosäuren	Sigma, München
1D1k	MabTech, Nacka Strand, Schweden
1 ml-Spritze Plastipak TM	Becton Dickinson, Heidelberg
40% Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (29:1)	Roth, Karlsruhe
500 μl -, 15 ml- und 50 ml-Röhrchen	greiner bio-one, Frickenhausen
5.6 μm polystyrene microspheres („Beads“)	Bangs Laboratories, USA
6-, 12-, 24-, 48- und 96- <i>well</i> -Platten	Becton Dickinson, Heidelberg
7-B6-1	MabTech, Nacka Strand, Schweden
7-B6-1-Biotin	MabTech, Nacka Strand, Schweden
96-Rundbodenplatten	greiner bio-one, Frickenhausen
96- <i>well</i> -ELISPOT-Platten MSHAN4B50	Millipore, Bedford, MA, USA
$\alpha\beta$ -Actin-Peroxidase	Sigma, München
α MHC- α -Kette, monoklonaler Maus- α -Human-HLA-A,A,B,C-IgG	Anogen, Mississauga, CAN
BCIP/NBT	Sigma Aldrich, Steinheim
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
CNBr-acticated Sepharose 4B	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Cryoröhrchen, 2 ml	greiner bio-one, Frickenhausen
Cytofix/Cytoperm	Becton Dickinson, Heidelberg
DansylAhx3L3VS	Herman Overkleeft, Leiden, NL
ECL Plus	GE Healthcare, Freiburg
ExtrAvidin-Alkaline Phosphatase	Sigma, München
FACS-Clean	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Flow	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Rinse	Becton Dickinson, Heidelberg
FCS	PAA Laboratories, Cölbe
Filterpapier Whatman 3MM	Whatman, Maidstone, UK
FITC-konjugierter Ziege- α Maus-IgG	Jackson Immuno Research, Soham, UK
Gentamycin	Cambrex, Verviers, B
Glutamin	PAA Laboratories, Cölbe
GM-CSF (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	Novartis
Golgi-Stop	Becton Dickinson, Heidelberg
IL-2 ($10^3/10^4$ U/ml)	R&D Systems, Minneapolis, USA

2.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

IL-4 (10 µg/ml)	R&D Systems, Minneapolis, USA
IMDM	Cambrex, Verviers, B
Ionomycin	Sigma, München
100µl-Spritze Hamilton Gastight Syringe Type 1710N	Mascom, Bremen
Humanserum	PAA Laboratories, Cölbe
LC-MS-Wasser LiChrosolv	Merck, Darmstadt
LS-MACS-Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Lymphocyten-Separationsmedium	PAA Laboratories, Cölbe
Membranfilter diverser Größen	Sartopure, Epsom, UK
Meerrettich-Peroxidase konjugierter Schaf- αMaus-IgG Antikörper	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
MHC-Monomere	Immunologie, Universität Tübingen
Multipette	Roth, Karlsruhe
Nitrozellulosemembran Hybond ECL	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
NLVS	Hidde Ploegh, Cambridge, MA, USA
Pasteurpipette, 230 mm	Fortuna, Wertheim
PBS	Cambrex, Verviers, B
Penicillin-Streptomycin-Mix, je 10 mg/ml	PAA Laboratories, Cölbe
Peptide Cleanup C18 Spin Tubes	Agilent, Palo Alto, CA, USA
Perm/Wash	Becton Dickinson, Heidelberg
PHA (1 mg/ml)	Roche, Mannheim
PhaseLock Gel Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
pH-Indikatorstäbchen pH-Fix 0-14	Macherey-Nagel, Düren
PMA (10 µg/ml)	Sigma, München
Polypropylen-Röhrchen, Schraubverschluss	Merck, Darmstadt
Proteaseinhibitor-Tabletten „complete“	Roche, Mannheim
Protein A-Sepharose, CL-4B	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Reaktionsgefäße diverser Größen	Eppendorf, Hamburg
Roti-Nanoquant Proteinassay 5×	Roth, Karlsruhe
RPMI-1640-Medium	Gibco, Karlsruhe
See Blue Plus 2 Prestained Standard	Invitrogen, Karlsruhe
Streptavidin, APC-Konjugat	Molecular Probes, Karlsruhe
Streptavidin, PE-Konjugat	Molecular Probes, Karlsruhe
Streptavidin-Microbeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Streptavidin, unkonjugierte	Sigma, München
TFA	Applied Biosystems, Foster City, USA
TEMED	Sigma, München
Trypanblaulösung (0,05% w/v)	Gibco, Karlsruhe
Tween® 20	Serva
Universalindikator pH 0-14	Merck, Darmstadt
VECTASTAIN Elite ABC kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus	NEN Life Science Products, Boston, USA
Zellkulturflaschen 100, 250, 550 ml, steril	greiner bio-one, Frickenhausen

2. Material und Methoden

Zentrifugalkonzentratoren centricon filters 10	Millipore, Schwalbach
Biotinylierter IgG2a Maus- α human CD28 (clone 9.3)	
Biotinylierter IgG1 Maus- α human 4-1BB (clone 4B4-1)	Garni-Wagner et al. 1996

Soweit nicht anders angegeben stammen alle Glaswaren von der Firma Schott, alle Chemikalien (p.a. Qualität) von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (München) oder Roth (Karlsruhe).

2.2. Geräte und Zubehör

Branson Sonifier 250	Branson Ultrasonics, Danbury, USA
C-18 Säulen Spheri-5 PTH 5 μ m, 220 x 2,1 mm	Perkin Elmer, Boston, USA
ABI 433A Peptide Synthesizer	Applied Biosystems, Foster City, USA
ABI „Procise“ 494A Protein Sequencer	Applied Biosystems, Foster City, USA
Economy Peptide Synthesizer EPS221	ABIMED, Langenfeld
Einfrierbehälter „Cryo Freezing Container“ FACSCanto	Nalgene, Houghton le Spring, UK
<i>fused-silica</i> - μ Kapillarsäule (5 μ m C-18, 75 μ m ID x 250 mm)	Becton Dickinson, Heidelberg
Gammacell 1000 Elite	LC Packings, Germering
Gelkammer Mini-Protean II Electrophoresis Cell	MDS Nordion, Ottawa, ON, Canada
Glashomogenisator	Bio-Rad, München
Hybrid-Q-TOF-Massenspektrometer	Sartorius, Göttingen
Image-Station LAS-1000	Micromass, Manchester, UK
ImmunoSpot Image Analyzer (series 1)	FujiFilm, Düsseldorf
37°C Inkubator, 7,5% CO ₂ Begasung Forma Scientific	Cellular Technology, Cleveland, OH, USA
Kühlzentrifuge RC 5C Plus, Rotor SLA 3000, Rotor GS-3	Labotect, Göttingen
Lichtmikroskop Leica DMIL	Sorvall, Langensfeld
Lyophilisieranlage Vaco5	Leica, Bensheim
MACS-Magnet	ZIRBUS, Bad Grund
Magnetrührer RCT basic	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Membran-Vakuumpumpe	IKA, Staufen
Mikro-pH-Elektrode InLab 423	Vacuubrand, Wertheim
Mini-Tischzentrifuge	Mettler Toledo, Gießen
μ Kapillar-LC-System Ultimate nanoLC-2D	Qualitron, KOR
	Dionex, Germering
	Eksigent, Dublin, CA

<i>offline</i> -ESI Kapillare Medium Capillaries Q-TOF ES387	Proxeon, Odense, DK
<i>online</i> -ESI Kapillare, 360/20 μm OD/ID Kapillare, 10 μm ID Auslassöffnung, 1P-4P coating	New Objective, Woburn, USA
Peristaltische Pumpe P-1	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
pH-Meter 765	Knick, Berlin-Zehlendorf
Quarzküvetten, Schichtdicke 10 mm, Zentrum 15 mm	Hellma, Müllheim
112A Oven/Injector	Applied Biosystems, Foster City, USA
Rollergestell	
Rotator	Bachofer, Reutlingen
Rotator Vibramax 100	Heidolph, Schwabach
Schütteltisch Duomax 1030	Heidolph Instruments, Schwabach
Semi-Dry-Elektroblotgerät Transfer-Blot Kammer SD1	CTI, Idstein
Software Immunospot 3.2, Image Acquisition 4.5	Cellular Technology, Cleveland, OH, USA
Spannungsquelle Power Pac 200	Bio-Rad, München
SpeedVac Vacuum Concentrator	Bachhofer, Reutlingen
Sterilbank Technoflow	Integra Biosciences, Fernwald
Sunrise microplate reader	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Thermoschüttler Thermometer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischkühlzentrifuge Biofuge 13	Heraeus, Hanau
Tischkühlzentrifuge Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Tischkühlzentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau
Tischkühlzentrifuge Megafuge 2.0	Heraeus, Hanau
Ultrazentrifuge L-80, Rotor Ti45	Beckman Coulter, Krefeld
UV-Spektrometer Ultrospec 3000	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Vorsäulenpumpe ABI 140D Delivery System	Perkin Elmer, Boston, USA
Wasserbad Thermomix BM-S	Braun Biotech, Göttingen
Vortexer Minishaker MS 1	IKA, Staufen
Vorsäule C-18-Material, 300 μm , 10 mm	Dionex, Germering
Zählkammer Neubauer, Tiefe 0,1 mm	LO - Laboroptik, Friedrichsdorf

2.3. Puffer und Lösungen

Anodenpuffer	50 mM Natriumborat Zugabe von 20% Methanol pH 9
--------------	---

2. Material und Methoden

Citratlösung	50 mM Citronensäure pH 3,0 mit NaOH eingestellt
Coomassie Entfärbelösung	10% Eisessig 40% Methanol in H ₂ O
Coomassie Färbelösung	0,25% Coomassie R-250 10% Eisessig 45% Methanol in H ₂ O
(d)NIC-Reagenz	2,2 mg (d)NIC 1 ml 50 mM Phosphatpuffer
Einfriermedium	90% hitzeinaktiviertes FCS 10% DMSO
ELISPOT-Kulturmedium	IMDM 1% Penicillin-Streptomycin-Mix 50 μ M β -Mercaptoethanol 2% Humanserum
FACS-Fix	PFEA 1% Formaldehyd
GUA-Reagenz	100 mg O-Methyl-Isoharnstoff 102 μ l ddH ₂ O
Kathodenpuffer	50 mM Natriumborat 0,05% SDS pH 9
Kopplungspuffer	0,1 M NaHCO ₃ 0,5 M NaCl pH 8,3 mit NaOH eingestellt
2 \times Ladepuffer	125 mM Tris HCl pH 6,8 3,5% SDS 20% Glycerol 10% β -Mercaptoethanol

2.3. Puffer und Lösungen

	0,2% Bromphenolblau
Lösungsmittel A ₁	4 mM NH ₄ Ac in H ₂ O (HPLC-grade, Lichrosolv) pH 3 mit Ameisensäure (conc.) eingestellt
Lösungsmittel A ₂	H ₂ O (HPLC-grade, Lichrosolv) pH 2 mit Ameisensäure (conc.) eingestellt
Lösungsmittel B ₁	2 mM NH ₄ Ac in 20% H ₂ O (HPLC-grade, Lichrosolv) 80% Acetonitril (HPLC-grade, Lichrosolv) pH 3 mit Ameisensäure (conc.) eingestellt
Lösungsmittel B ₂	20% H ₂ O (HPLC-grade, Lichrosolv) 80% Acetonitril (HPLC-grade, Lichrosolv) pH 2 mit Ameisensäure (conc.) eingestellt
2× Lysepuffer	200 ml PBS 0,6% (w/v) CHAPS 3 Tabletten Proteaseinhibitor „complete“
2× Triton-Lysepuffer (pH 7,4)	20 mM Tris-HCl 10 mM EDTA 300 mM NaCl 2% TritonX-100 in PBS
MgCl ₂	1 M
Nanoflow-Lösungsmittel	50% Methanol 1% Ameisensäure in Wasser
50 mM Na ₂ HPO ₄ -Puffer	0,78 g Na ₂ HPO ₄ mit ddH ₂ O auf 100 ml auffüllen
50 mM NaH ₂ PO ₄ -Puffer	0,88 g NaH ₂ PO ₄ mit ddH ₂ O auf 100 ml auffüllen
PBE	PBS 0.5% BSA

2. Material und Methoden

	2 mM EDTA
PBEA	PBS 0,5% BSA 2 mM EDTA 0,01% Natriumazid
PBS-BSA	PBS 0.5% BSA
PBS-Tween	PBS 0.05% Tween
PFEA	PBS 2% hitzeinaktiviertes FCS 2 mM EDTA 0,01% Natriumazid
50 mM Phosphatpuffer	100 ml 50 mM Na ₂ HPO ₄ -Puffer mit ca. 1 ml NaH ₂ PO ₄ auf pH 8.5 einstellen
Präsensitivierungsmedium	IMDM 1% Penicillin-Streptomycin-Mix 50 µM β-Mercaptoethanol 2% Humanserum 0,3% Gentamycin
5× Puffer <i>lower</i>	1,875 M Tris-HCl 0,5% SDS pH 8,8
5× Puffer <i>upper</i>	1,875 M Tris-HCl 0,5% SDS pH 6,8
RPMI*-Medium	2 g/l NaHCO ₃ 2,4 g/l HEPES 2 mM L-Glutamin 30 µM β-Mercaptoethanol 100 µg/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin

	<p>1× nicht-essentielle Aminosäuren 1 mM Na-Pyruvat 10% FCS, 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert in RPMI 1640</p>
10× SDS-Laufpuffer	<p>0,25 M Tris-HCl 1,9 M Glycin 1% SDS</p>
TBB-Puffer	<p>3% BSA 5 mM EDTA in TWB-Puffer</p>
10× TBS-Puffer	<p>500 mM Tris-HCl pH 8 1,5 M NaCl</p>
TBS	<p>20 mM Tris 150 mM NaCl pH 8,0 eingestellt mit HCl_{cc}.</p>
Tris	<p>1 M pH 8,0</p>
TSB	<p>50% PBS 50% hitzeinaktiviertes FCS 2 mM EDTA 0,01% Natriumazid</p>
TWB-Puffer	<p>0,1% (w/v) Nonidet P-40 in TBS-Puffer</p>
T-Zell-Medium	<p>RPMI 1640 GlutaMAX 25 mM HEPES 10% hitzeinaktiviertes HS 1% PenStrep 1% Gentamycin</p>

2.4. Patientenmaterial

Chirurgisch entfernte *renal cell carcinoma-* (RCC-) und *colorectal carcinoma-* (CCA-)Gewebeproben wurden von den Abteilungen Urologie und Chirurgie des Universitätsklinikums Tübingen zur Verfügung gestellt (Jörg Hennenlotter, Prof. Dr. med. Arnulf Stenzl). Sofort nach der Entnahme wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Die Studien wurden von der lokalen Ethikkommission ge-

nehmigt und die Patienten haben nach entsprechender Aufklärung schriftlich ihr Einverständnis bestätigt. Krankheitsstadium (*staging*) und Malignitätsgrad (*grading*) wurden am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen ermittelt.

Erythrocyten-depletiertes peripheres Blut sowie Leukapherisate von gesunden Spendern wurden von der Abteilung für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Tübingen (Prof. Dr. med. Dorothee Wernet) bezogen. Hier wurden auch die HLA-Typisierungen dieser Proben vorgenommen. HLA-Feintypisierungen sowohl von Gewebe als auch Zelllinien wurden von der Sektion Transplantationsimmunologie und Immunhämatologie der Universität Tübingen (Prof. Dr. Claudia A. Müller) durchgeführt.

2.5. Zellbiologische Methoden

2.5.1. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um zuvor eingefrorene Zellen zu kultivieren, werden die bei 37°C aufgetauten Zellen in 5 ml vorgelegtem Medium resuspendiert, bei 415 g 2 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und in 5 ml frischem Medium wieder resuspendiert. Die Zentrifugation wird wiederholt und die Zellen werden in 6 ml frischem Medium aufgenommen. In die Vertiefungen einer 6-*well*-Platte, in denen zwischen 1 und 6 ml Medium bereits vorgelegt wurden, wird je 1 ml der Zellsuspension gegeben.

Zum Einfrieren werden die Zellen abzentrifugiert (415 g, 10 min) und in Einfriermedium (90% FCS, 10% DMSO als Gefrierschutzmittel) resuspendiert, sodass man standardmäßig bei Zelllinien eine Endkonzentration von $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml erhält und bei PBMCs $2 \cdot 10^7$ Zellen/ml oder $1 \cdot 10^8$ Zellen/ml. Von dieser Suspension wird je 1 ml in ein Polypropylenröhrchen mit Schraubverschluss überführt und bei -80°C in Isopropanol-gefüllten Behältern tiefgefroren. Die langfristige Lagerung erfolgt in flüssigem Stickstoff.

2.5.2. Kultivierung der Zelllinien

Es wurden verschiedene Zelllinien verwendet (Tabelle 2.3). Bei den meisten handelt es sich um EBV-transformierte humane B-lymphoblastoide Zelllinien (B-LCLs). RCC068_ZL wurde aus Tumorgewebe des Nierenkrebspatienten RCC068 generiert, RCC026_ZL ist eine B-LCL des Patienten RCC026. EOL-1 stammt von einer humanen akuten myeloischen Leukämie ab. M18 ist eine

Tabelle 2.3.: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	HLA-A, -B-Typisierung	Referenz
WIL-JON ^a	A*02, A*29, B*15, B*41	ECACC
BM15	A*0101, B*4901	ECACC: 88052040
HO301	A*0301, B*1402	ECACC: 88052055
JY	A*0201, B*0702	Engelhard et al. (1978)
Awells	A*0201, B*44021	ECACC: 94082236
EMJ	A*0201, A*0301, B*4001	ECACC: 8602103
LCL026_ZL	A*0201, A*3303, B*4101, B*5101	E. Nößner, MÜ
M18	A*2902, B*4901	ESTDAB-133
EOL-1	A*24, A*29, B*35, B*4403	ECACC: 94042252
RCC068_ZL	A*02, A*29, B*1501, B*4501	C. Gouttefangeas, TÜ
MGAR	A*2601, B*0801	ECACC: 88022014
C1R-A*2602	A*2602	ECACC: 94050320
C1R-A*2603	A*2603	ECACC: 94050320
C1R-B*3801	B*3801	ECACC: 94050320
C1R-B*3901	B*3901	ECACC: 94050320
C1R-B*3902	B*3902	ECACC: 94050320

^a entspricht nicht der im ECACC-Katalog aufgeführten Zelllinie; wurden falsch geliefert

humane Melanomzelllinie. Alle Zelllinien wurden in RPMI 1640-Medium kultiviert, das zusätzlich NaHCO_3 (2 g/l), HEPES (2,4 g/l), L-Glutamin ($2 \mu\text{mol/l}$), 2-Mercaptoethanol ($50 \mu\text{mol/l}$), Penicillin (50 U/ml), Streptavidin ($50 \mu\text{g/ml}$) sowie 10% fötales Kälberserum (FCS) enthielt. Im kleinen Maßstab wurden die Zellen im Brutschrank bei 37°C und 7,5% CO_2 in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre gehalten. Für größere Mengen wurden 2l-Glasflaschen bei 37°C und 1,5 Umdrehungen pro Minute im Rollergestell verwendet. Alle Zelllinien wurden regelmäßig auf Mycoplasmen getestet. Bei der Kultur transfizierter C1R-Zelllinien in Zellkulturflaschen wurden gegebenenfalls G418 oder Hygromycin B als Selektionsmarker zugesetzt (G418: 1 mg/ml; Hygromycin B: 0,2-0,5 mg/ml).

2.5.3. Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wird ein $50 \mu\text{l}$ -Aliquot der zu zählenden Zellsuspension mit $50 \mu\text{l}$ Trypanblau gemischt und damit eine Neubauer-Zählkammer gefüllt. Unter dem Mikroskop werden zwei Großquadrate ausgezählt. Die Membran toter Zellen ist durchlässig für den Farbstoff, sodass die Zellen blau erscheinen. Daher werden nur die ungefärbten Zellen gezählt. Multipliziert man das Ergebnis mit 10^4 und berücksichtigt den Verdünnungsfaktor, erhält man die Zellzahl pro Milliliter.

2.5.4. Zellernte

Um Zellen für eine MHC-Isolierung zu ernten, werden die in Glasflaschen gehaltenen Zellen 10 min bei 415 g und 4°C abzentrifugiert und in eiskaltem PBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (415 g, 15 min, 4°C) wird der Überstand abdekantiert und das feuchte Pellet bei -80°C tiefgefroren und gelagert.

2.5.5. Isolierung von PBMCs

Alle Arbeitsschritte erfolgen unter sterilen Bedingungen. Das Leukapherisat (peripheres, leukocytenangereichertes Blut) wird mindestens auf das Doppelte des Ausgangsvolumens so verdünnt, dass das Gesamtvolumen ein Vielfaches von 30 ml erreicht. 15 ml Lymphocyten-Separationsmedium pro 50 ml-Röhrchen werden mit je 30 ml des verdünnten Leukapherisats überschichtet und zentrifugiert (820 g, 20 min, 20°C , ohne Bremse). Anschließend wird die weiße Interphase aus jedem Röhrchen abgenommen und mit je 30 ml PBS gewaschen. Es folgen erneute Zentrifugation (660 g, 8 min, 20°C), Abdekantieren des Überstandes und wiederum Waschen mit PBS mit abschließender Zentrifugation

(460 g, 5 min, 20°C). Die isolierten PBMCs werden vereinigt, gezählt und umgehend weiter verwendet oder eingefroren (siehe 2.5.1).

2.5.6. Isolierung von CD8⁺ T-Zellen durch MACS

Alle Arbeiten erfolgen unter sterilen Bedingungen. Die Zentrifugationen erfolgen 10 min bei 460 g und 4°C. Frisch isolierte PBMCs werden mit PBE gewaschen und abzentrifugiert. Das Zellpellet wird anschließend mit einer Endkonzentration von $2 \cdot 10^8$ Zellen/ml und 5 µg/ml OKT-8 Antikörper in PBE resuspendiert. Nach 15-minütiger Inkubation bei 4°C erfolgen zwei Waschschritte mit 30 und 10 ml PBE. Die Zellen werden wieder in der gleichen Konzentration wie zuvor und mit 10 µl Streptavidin-Microbeads pro $2 \cdot 10^7$ Zellen in PBE 15 Minuten bei 4°C inkubiert und anschließend zweimal mit PBE gewaschen.

Die vom Magneten festgehaltene LS-MACS-Säule wird mit 3 ml PBE equilibriert, bevor die in 500 µl PBE resuspendierten Zellen aufgetragen werden. Nach dreimaligem Waschen mit je 3 ml PBE wird die Säule aus dem Magneten entnommen. Mit 4 ml PBE und unter Zuhilfenahme eines Stempels werden die CD8⁺ Zellen in ein 15 ml-Röhrchen eluiert. Diese werden zentrifugiert, zweimal mit PBE gewaschen, gezählt, zweimal mit je 5 ml vorgewärmtem T-Zell-Medium gewaschen und schließlich eingefroren oder zur weiteren Kultivierung in T-Zell-Medium aufgenommen.

2.6. Expansion antigenspezifischer T-Zellen

2.6.1. Präparation humaner Dendritischer Zellen

Frisch isolierte PBMCs werden in T-Zell-Medium aufgenommen und mit einer Dichte von $10\text{-}12 \cdot 10^7$ Zellen in 20 ml pro 250 ml-Zellkulturflasche ausgesät. Nach einem zweistündigen Adhärenzschritt im Brutschrank wird der Überstand abgenommen. Die nur locker adhärerten Zellen werden mit Medium abgespült. Diese PBLs werden für Kontrollexperimente eingefroren oder für Stimulationsexperimente weiter in T-Zell-Medium kultiviert. Zu den am Plastikboden der Flasche adhärerten Monocyten wird neues T-Zell-Medium gegeben, das an Tag 1 nach der Adhärenz mit 100 ng/ml GM-CSF und 20 ng/ml IL-4 versetzt wird. Diese Zugabe wird an den Tagen 3, 5 und 7 wiederholt. An Tag 7 werden die inzwischen entstandenen unreifen Dendritischen Zellen (DCs) durch mindestens 24-stündige Inkubation mit 100 ng/ml LPS gereift.

2.6.2. Antigen-spezifische Stimulation von T-Zellen mit autologen Dendritischen Zellen

Alle Arbeiten werden unter sterilen Bedingungen ausgeführt. Zentrifugationen erfolgen 5 min bei 460 g und 20°C. Die reifen DCs (2.6.1) werden geerntet, indem der Überstand aus der Zellkulturflasche entnommen wird und die restlichen Zellen durch PBS mit 5 mM EDTA abgelöst werden. Die Zellen werden vereinigt, mit T-Zell-Medium gewaschen und gezählt. Die Stimulationen werden in 24-well-Platten durchgeführt. Für jedes Peptid, mit dem stimuliert werden soll, werden mindestens drei *wells* angesetzt. Pro *well* werden $5 \cdot 10^5$ DCs eingesetzt. Überschüssige DCs werden für Restimulationen eingefroren. Die DCs werden zunächst in einem 15 ml-Röhrchen in 1 ml Medium mit 1 mg/ml Peptid 2 h im Brutschrank zur Beladung inkubiert. Autologe PBMCs oder PBLs werden zweimal mit T-Zell-Medium gewaschen und gezählt. Pro *well* werden $3 \cdot 10^6$ Zellen vorgelegt, zu denen die DCs nach der Beladung hinzugegeben werden. Es folgt eine 7-tägige Ruhe der Zellen im Brutschrank.

Zur Restimulation werden die Zellen aus den *wells* entnommen, mit T-Zell-Medium gewaschen und mit einer Zellzahl von $5 \cdot 10^5$ pro *well* erneut ausgesät. Dabei können genau wie bei der ersten Stimulation DCs eingesetzt werden. Sind keine DCs mehr vorhanden, werden autologe PBMCs aufgetaut, mit T-Zell-Medium gewaschen und wie DCs mit Peptid beladen. Pro *well* werden $2,5 \cdot 10^6$ PBMCs benötigt. Nach der Peptidbeladung werden die PBMCs mit 30 Gy bestrahlt und in die *wells* verteilt. Bei einer Restimulation mit PBMCs werden nun an jedem zweiten Tag 2 ng/ml IL-2 zugegeben, beginnend mit dem ersten Tag nach der Restimulation. Bei einer Restimulation mit DCs ist dies nur gegen Ende nötig. Falls erforderlich, wird in beiden Fällen verbrauchtes, gelbes Medium durch frisches ersetzt. Nach wiederum sieben Tagen können die Zellen für verschiedene Experimente wie Tetramerfärbungen eingesetzt oder erneut restimuliert werden.

2.6.3. Herstellung von aAPCs

Artifizielle antigen-präsentierende Zellen (aAPCs) sind *beads*, die mit MHC-Monomeren sowie mit Antikörpern gegen kostimulatorische Moleküle (CD28, 4-1BBL) beladen sind. Sie werden zur antigen-spezifischen Stimulation von T-Zellen *in vitro* eingesetzt, da die Stimulationsbedingungen so am besten zu kontrollieren sind.

Alle Arbeitsschritte werden unter sterilen Bedingungen und auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt. Zentrifugationen erfolgen für 2 min bei 800 g. Die aAPCs

werden in 96-*well*-Platten mit einem Gesamtvolumen von 250 μl pro *well* hergestellt mit der gleichen Anordnung, die für die T-Zell-Stimulationen später verwendet werden soll. Von den Antikörpern werden Verdünnungen in PBE mit einer Konzentration von 20 nM hergestellt, von den biotinylierten MHC-Monomeren solche mit einer Konzentration von 20 nM für *high density*-aAPCs oder 200 pM für *low density*-aAPCs. Um ausreichend aAPCs für vier Stimulationen herzustellen, werden für jedes *well* $1 \cdot 10^6$ Beads durch zweimaliges Waschen mit PBE vorbereitet. Dann werden pro *well* 50 μl der MHC-Monomer- sowie der Antikörperlösung mit 150 μl der *bead*-Suspension vereinigt und auf einem Schüttler für 30 min inkubiert. Anschließend werden die aAPCs in der Platte dreimal mit PBE gewaschen und zum Schluss in 200 μl PBE pro *well* resuspendiert. Die Platte wird bis zur weiteren Verwendung mit Plastikfolie vor dem Austrocknen geschützt und bei 4°C im Dunkeln gelagert. Für T-Zell-Stimulationen werden 50 μl der aAPC-Suspension in eine neue 96-*well*-Platte überführt, dreimal mit Medium gewaschen und zu den Zellen hinzugegeben.

2.6.4. Antigen-spezifische Stimulation von T-Zellen mit aAPCs

Alle Arbeiten erfolgen unter sterilen Bedingungen. Die Stimulationen beginnen an Tag 1 in 96-*well*-Platten. CD8⁺ T-Zellen aus einer MACS-Separation werden gezählt und in vorgewärmtem T-Zell-Medium aufgenommen. Pro *well* werden $1 \cdot 10^6$ Zellen in 100 μl und $2 \cdot 10^5$ aAPCs in 50 μl vereinigt. Dem T-Zell-Medium wurde IL-12 mit einer Endkonzentration im *well* von 5 ng/ml zugesetzt. An Tag 4 werden pro *well* 100 μl Medium abgenommen und durch frisches, IL-2-haltiges Medium ersetzt (Endkonzentration im *well* 2 ng/ml). An den Tagen 8 und 15 werden die Zellen wie an Tag 1 restimuliert, während an den Tagen 11 und 18 wie an Tag 4 gefüttert wird. An Tag 21 werden aus jedem *well* 50 μl entnommen und mit Tetramer gefärbt (2.7.4).

2.6.5. Weiterführende Peptid- und Allostimulationen

Nach mehreren (Re-) Stimulationen mit DCs, PBMCs oder aAPCs können weitere Stimulationen auch mit Peptid allein erfolgen (1 oder 5 $\mu\text{g/ml}$). Um die T-Zellen beispielsweise vor einer FACS-Sortierung noch weiter unspezifisch, aber stark zu expandieren, kann außerdem eine Allostimulation durchgeführt werden. Dabei werden je $5 \cdot 10^5$ mit 30 Gy bestrahlte PBMCs von zwei verschiedenen, fremden Leukapherisaten als *feeder*-Zellen zugegeben. Außerdem werden 2 $\mu\text{g/ml}$ IL-2 und 0,5 $\mu\text{g/ml}$ PHA zugegeben.

2.7. Detektion und Analyse antigenspezifischer T-Zellen

2.7.1. Präsensitivierung von PBMCs

Um die im ELISPOT zu detektierenden Antworten von Memory-T-Zellen zu verstärken, werden PBMCs elf Tage lang mit Peptidpools inkubiert. Die frisch aufgetauten PBMCs werden mit 2,5 ng/ml IL-4 in Kultur genommen (Tag 1). An Tag 2 werden 1 µg/ml pro Peptid sowie erneut 2,5 ng/ml IL-4 zugegeben. Die Stimulationen finden in Pools mit bis zu 15 Peptiden statt. An den Tagen 4 und 6 werden 2 ng/µl IL-2 zugesetzt. Das Medium wird immer dann teilweise ausgetauscht, wenn die Gelbfärbung anzeigt, dass es verbraucht ist. Der ELISPOT wird an Tag 13 durchgeführt.

2.7.2. IFN- γ -ELISPOT *ex vivo* und *in vitro*

Der IFN- γ -ELISPOT kann *ex vivo* mit frisch aufgetauten PBMCs oder *in vitro* mit präsensitivierten PBMCs durchgeführt werden. Zunächst werden 96-*well*-ELISPOT-Platten mit einer Membran aus Nitrozellulose am Boden durch mindestens 12-stündige Inkubation bei 4°C mit Antikörpern gegen humanes IFN- γ (1D1k, 5 or 2 µg/ml) beschichtet. Dann werden sie zweimal mit IMDM und einmal mit Kultiviermedium gewaschen. Pro *well* werden 5·10⁵ PBMCs mit 1 µg/ml Peptid 26 h lang stimuliert. Als Negativkontrolle werden entsprechend der HLA-Allele der PBMC-Spender HIV-Peptide eingesetzt (Tabelle 2.4). Als Positivkontrolle dient pro PBMC-Spender ein *well*, das mit PHA (Endkonzentration 10 µg/ml) stimuliert wird. Außerdem wird zur Kontrolle ein *well* ohne Zellen angesetzt. Bis auf dieses *well* ohne Zellen werden alle Stimulationen in Duplikaten durchgeführt.

Tabelle 2.4.: T-Zell-Epitope aus HIV-1

Sequenz	ID	HLA	Quellprotein
GSEELRSLY	60369	A*01	Gag-Pol
ILKEPVHGV	60179	A*02	Gag-Pol
KIRLRPGGK	70083	A*03	Gag-Pol
TPGPGVRYPL	70088	B*07	Nef
GGKKKYKL	70089	B*08	Gag-Pol

Nach der Peptid- und PHA-Stimulation werden die Platten einmal mit PBS-Tween, einmal mit destilliertem Wasser und dann fünfmal mit PBS-Tween

gewaschen. Anschließend erfolgt eine zweistündige Inkubation mit dem biotinylierten Sekundäntikörper 7-B6-1-Biotin ($0,33 \mu\text{g/ml}$) in PBS-BSA. Nach sechsmaligem Waschen mit PBS-Tween wird 1 h bei 4°C mit Avidin-konjugierter Alkalischer Phosphatase in PBS-BSA inkubiert. Es schließen sich je drei Waschschritte mit PBS-Tween und PBS an. In destilliertem Wasser aufgelöste BCIP/NBT Tabletten werden zugegeben. Die enzymatische Farbreaktion wird im Dunkeln so lange entwickelt, bis eine genügende Intensität der Spots in den *wells* erreicht ist (ca. 5 min). Die Reaktion wird durch Abspülen des Substrats mit Wasser gestoppt und die Plastikabdeckung des Plattenbodens wird entfernt. Die Platten werden über Nacht im Dunkeln getrocknet.

Zur weiteren Auswertung werden sie mit dem ImmunoSpot Image Analyzer eingelesen und mit Hilfe der ImmunoSpot Software Version 3.2e analysiert. Als positive Reaktion wird definiert, wenn die mittlere Spotanzahl pro *well* der Duplikate mindestens 10 beträgt (*mean spot count*, $\text{MSCI} > 10$) und mindestens um den Faktor 3 bzw. 5 über der mittleren Spotanzahl der HIV-Kontrolle liegt (*mean spot count index*, $\text{MSCI} \geq 3$ *ex vivo*, $\text{MSCI} \geq 5$ mit Präsensitivierung). Diese wird auf 1 gesetzt, falls die mittlere Spotanzahl der HIV-Kontrolle unter 1 liegt, um eine Division durch 0 zu vermeiden. Sind die Spots in einem *well* zu zahlreich, um noch einzeln aufgelöst zu werden, wird der Faktor MSCI als 2000 definiert ($\text{MSCI} = 2000$).

2.7.3. Herstellung von MHC-Tetrameren

Ein Aliquot mit $50 \mu\text{g}$ biotinyliertem MHC-Monomer wird aufgetaut und kurz abzentrifugiert. Alle 30 min werden 10% von $78,5 \mu\text{l}$ Streptavidin-PE oder aber $43,5 \mu\text{l}$ Streptavidin-APC zugegeben. Dies entspricht einem stöchiometrischen Verhältnis von 4:1 (MHC-Monomer:Streptavidin-Konjugat). Zwischen den Zugaben wird die Reaktion im Kühlraum auf einem Rotator inkubiert. Nach zehn Zugaben wird das Tetramer abzentrifugiert und bei 4°C dunkel gelagert.

2.7.4. Tetramerfärbung

Tetramerfärbungen werden in 96-*well*-Platten durchgeführt. Zentrifugationen erfolgen bei 660 g und 4°C für 2 min. Alle Schritte außer der Entnahme von Zellen aus Stimulationsansätzen werden unsteril und bei 4°C oder auf Eis durchgeführt.

Aliquots der zu färbenden T-Zellen (etwa $2 \cdot 10^5$ Zellen) werden in eine 96-*well*-Platte überführt und mit PBEA gewaschen. Anschließend werden die Zellen in $50 \mu\text{l}$ Antikörperlösung 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Antikörper

perlösung enthält die Antikörper in der richtigen Verdünnung (Tabelle 2.5) in PBEA sowie 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ freies Streptavidin, um verbliebenes Biotin aus der Zellkultur abzufangen, das sonst zu einem hohen Hintergrund führen würde. Nach zweimaligem Waschen mit PFEA werden die Zellen in 50 μl Tetramerlösung 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Tetramerlösung besteht aus 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ APC-konjugiertem Tetramer bzw. 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PE-konjugiertem Tetramer in TSB. Sie wird vor Verwendung kurz abzentrifugiert, um eventuell vorhandene Aggregate zu entfernen. Nach drei Waschschrritten mit PFEA werden die Zellen in 100-200 μl FACS-Fix resuspendiert und mit dem FACS-Gerät gemessen.

Tabelle 2.5.: Monoklonale Maus- α human CD8-Antikörper für Tetramerfärbungen

Fluoreszenz	Hersteller	Verdünnung
FITC	laborintern (Klon OKT8)	1:100
PE	Immunotools (Klon MEM-31)	1:200
PerCP	Becton Dickinson (Klon SK1)	1:20
APC	Becton Dickinson (Klon SK1)	1:50

2.7.5. Intrazelluläre IFN- γ -Färbung

Um die antigenspezifische IFN- γ -Sekretion von Zellen nachzuweisen, werden Aliquots der Zellen möglichst am Tag vor der eigentlichen Färbung in eine neue 96-*well*-Platte überführt. Vor der Intrazellulärfärbung werden sie mit Peptid stimuliert. Angesetzt werden drei *wells* für das Peptid (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), mit dem die Zellen im Vorfeld stimuliert worden sind, sowie ein *well* mit einem Fremdpeptid (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), mit dem die Zellen bisher keinen Kontakt hatten, ein *well* ohne Peptid und ein *well*, das mit PMA (50 ng/ml) und Ionomycin (1 μM) als Positivkontrolle stimuliert wird. Nach einer Stunde im Brutschrank wird allen sechs *wells* Golgi-Stop-Lösung (1:1500) zugesetzt. Nach mindestens weiteren 5 h Inkubation kann mit der Färbung begonnen werden.

Die intrazelluläre IFN- γ -Färbung wird im Anschluss an eine normale Tetramerfärbung (2.7.4) durchgeführt. Nach dem abschließenden Waschen mit PFEA werden die Zellen nicht in FACS-Fix aufgenommen, sondern mit 100 μl Cytotfix/Cytoperm 20 min bei 4°C permeabilisiert. Nach zwei Waschschrritten mit Perm/Wash wird mit einem FITC-konjugierten α IFN- γ -Antikörper in ei-

ner 1:200-Verdünnung 30 min bei 4°C inkubiert. Wiederum wird zweimal mit Perm/Wash und einmal mit PFEA gewaschen. Schließlich werden die Zellen in 100-200 µl FACS-Fix resuspendiert.

2.7.6. Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie werden in einem Flüssigkeitsstrom befindliche Zellen mit Hilfe eines *Fluorescence-Activated-Cell-Sorter*- (FACS-)Geräts analysiert, gezählt und gegebenenfalls getrennt. Die Streuung in Einstrahlrichtung (FSC) des zur Detektion verwendeten Laserlichts gibt Auskunft über die Größe der Zellen, während die Seitwärtsstreuung (SSC) Aussagen über deren Granularität erlaubt. Anhand dieser beiden Größen lassen sich verschiedene Zellpopulationen unterscheiden.

Zusätzlich können Oberflächenmoleküle durch monoklonale Antikörper oder MHC-Tetramere gefärbt werden, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind oder die ihrerseits von fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpern erkannt werden. Zur parallelen Färbung mehrerer Oberflächenmoleküle müssen Fluoreszenzfarbstoffe mit unterschiedlichen Emissionsspektren verwendet werden. Während beispielsweise Fluoresceinisothiocyanat (FITC) vorwiegend im grünen Spektralbereich emittiert, liegt die Emission von Phycoerythrin (PE) im roten.

Alle Messungen wurden am FACSCanto durchgeführt. Zunächst werden die Spannungen an FSC- und SSC-Detektoren so abgestimmt, dass bei der Auftragung von FSC- gegen SSC-Signal im *dot blot* eine definierte Population lebender Zellen zu erkennen ist. Diese wird dann durch Setzen eines Rahmens ausgewählt und für die weitere Analyse verwendet.

Anhand ungefärbter Zellen und mit nur je einem Antikörper gefärbter Zellen werden die Messkanäle für die Fluoreszenz eingestellt. Die Kompensation der Überlappung verschiedener Fluoreszenzkanäle wird dann vom FACS-Gerät automatisch durchgeführt und abschließend anhand der Kontrollzellen überprüft. Alle weiteren Messungen werden mit den gleichen Einstellungen vorgenommen. Es werden stets so viele Zellen wie möglich gemessen, da mit einer sehr niedrigen Frequenz antigenspezifischer Zellen gerechnet wird.

2.8. Weitere immunologische Methoden

2.8.1. Säureextraktion von MHC-Liganden nach Immunpräzipitation mit CNBr-aktivierter Sepharose

Zur Isolierung MHC-präsentierter Peptide müssen die geernteten Zellen zunächst aufgeschlossen werden sowie die membranständigen Moleküle in Lösung gebracht und von Zelltrümmern befreit werden. Mit Antikörpern werden die MHC-Moleküle abgetrennt und anschließend die Peptide unter sauren Bedingungen aus ihren Bindungsgruben eluiert.

2.8.1.1. Herstellung der Säule

Pro 1 ml Zellpellet, das eingesetzt werden soll, wird 1 mg pro Antikörper verwendet. Je nach HLA-Typisierung des Gewebes oder der Zellen werden verschiedene Antikörper benutzt, um die Komplexität der Eluate so weit wie möglich zu reduzieren (Tabelle 2.6). Pro Antikörper wird eine Säule hergestellt. Für jede Säule werden pro 1 mg zu koppelndem Antikörper 37,5 mg CNBr-aktivierte Sepharose in einem 50 ml-Röhrchen eingewogen und zur Aktivierung mit 1 mM HCl aufgefüllt. Nachdem 30 min Inkubation bei Raumtemperatur im Rotator wird die Sepharose abzentrifugiert (Megafuge; 4 min, 60 g, ohne Bremse) und der Überstand abgenommen.

Zur Kopplung an die Sepharose werden die Antikörper in Kopplungspuffer zugegeben, sodass das Endvolumen bei etwa 40 ml liegt, und 90-120 min bei Raumtemperatur rotiert. Um die Kopplungseffizienz zu verfolgen, wird dabei immer wieder die OD₂₈₀ von abzentrifugierten Aliquots gemessen. Die Effizienz sollte über 95% liegen. Nach spätestens 120 min wird die Sepharose zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Die verbliebenen Bindungsstellen der Sepharose werden nun 60 min lang bei Raumtemperatur mit 0,2 M Glycin blockiert. Danach wird die Sepharose zweimal mit PBS gewaschen und schließlich mit PBS aufgeschlämmt und in die Säule überführt.

2.8.1.2. Herstellung des Zellysats

Das Volumen des zu bearbeitenden Zellpellets wird bestimmt. Das gefrorene Zellpellet wird im gleichen Volumen zweifach konzentrierten Aufschlusspuffers langsam bei 4°C unter Rühren aufgetaut. Nach Zugabe eines weiteren Volumens einfach konzentrierten Aufschlusspuffers wird die Zellsuspension eine Stunde bei 4°C gerührt.

Tabelle 2.6.: α HLA-Antikörper für Immunpräzipitation und FACS

AK	α HLA-	Referenz
W6/32	A,B,C	Barnstable et al. (1978)
B1.23.2	B,C	Rebai und Malissen (1983)
BB7.2	A2	Parham und Brodsky (1981)
GAP-A3	A3	Berger et al. (1982)
L243	DR	Fong et al. (1981)

Dann werden die Zellen durch Ultraschallbehandlung (3×20 s mit je 20 s Pause dazwischen, *Duty Cycle* 50%, *Output* 50%) weiter aufgeschlossen. Ein weiteres Volumen Aufschlusspuffer wird zugegeben und das Lysat wiederum eine Stunde bei 4°C gerührt.

Um Zelltrümmer zu beseitigen, wird das Lysat zunächst 20 min bei 4°C und 330 g (Megafuge) und dann in der Ultrazentrifuge (Beckman, Ti45-Rotor) eine Stunde bei 125000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird durch einen $0,2\ \mu\text{m}$ -Filter gedrückt. Vom Filtrat werden $500\ \mu\text{l}$ abgenommen und bei -80°C für weitere Analysen (z.B. Western Blot) gelagert.

2.8.1.3. Affinitätschromatographie

Das Lysat wird zunächst einmal linear über die Säulen gepumpt und anschließend zyklisch über Nacht. Nachdem die Säulen dann 30 min mit PBS und anschließend 60 min mit Wasser gewaschen worden sind, lässt man sie trocken laufen. Zur Elution wird achtmal nacheinander so viel 0,2%ige TFA auf jede Säule aufgetragen, dass ein dünner Flüssigkeitsfilm auf dem Gelbett steht (bei 10 mg Antikörper und 375 mg Sepharose ca. $200\ \mu\text{l}$). Beim ersten Mal werden zusätzlich noch $10\text{-}30\ \mu\text{l}$ 10%ige TFA zugesetzt. Die Eluate werden jeweils in ein Zentrifuge gepumpt, das zuvor mit 0,2%iger TFA gewaschen wurde, um eine Anreicherung von Polyethylenglycol (PEG) im Eluat zu verhindern.

Alternativ zur Elution mit TFA kann eine saure Citratlösung verwendet werden. Dabei lässt man die Säulen jedoch nicht trocken laufen, sondern lässt das Wasser des letzten Waschschritts nur einsinken und überschichtet je nach Säulengröße mit ca. 8 ml Citratlösung. Statt diese über die Säule zu pumpen lässt man sie nur langsam gravimetrisch durchlaufen. Die Vorfraktion mit neutralem pH-Wert wird verworfen. Erst wenn der pH-Wert sinkt, wird das Eluat in Centricons aufgefangen. Anschließend kann die Antikörper-beladene Säule mit

PBS regeneriert werden, sodass das Lysat erneut darüber gepumpt und mit TFA abschließend eluiert werden kann.

Zur Bestimmung der Menge an MHC-Molekülen können 2-5% jedes Eluats abgenommen und mittels Edman-Abbau oder Western Blot analysiert werden. Der Rest der Eluate wird durch Zentrikons gefiltert (Megafuge; 330 g, 4°C, Dauerbetrieb), die zuvor mit 0,2% TFA gewaschen worden sind. Aufgrund des noch zu großen Volumens müssen die Eluate vor der massenspektrometrischen Analyse lyophilisiert und in einem kleineren Volumen eines entsprechenden Puffers wieder aufgenommen werden.

2.8.2. Western Blot

Um Proteine in einem Proteingemisch spezifisch zu detektieren und gegebenenfalls zu quantifizieren, wird das Gemisch, z.B. ein Zelllysate, zunächst durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach dem apparenten Molekulargewicht unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Die Größe wird durch Vergleich mit Standardproteinen bestimmt, die Menge durch Vergleich mit verschiedenen Mengen eines Standards. Anschließend werden die Proteine zur spezifischen Detektion mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern auf eine Membran übertragen.

2.8.2.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

In einer Gelgießapparatur wird zunächst das Trenngel und anschließend das Sammelgel zwischen zwei Glasplatten gegossen (Tabelle 2.7). Um ein Aushärten des Trenngels unter Sauerstoffausschluss zu gewährleisten und eine gerade Kante zu erhalten, wird die noch flüssige Gelmischung mit Isopropanol überschichtet. In das frisch gegossene Sammelgel wird ein Kamm gesteckt, um Probenaschen zu erhalten. Eine Laufapparatur mit dem eingesetzten Gel wird mit Laufpuffer befüllt.

Dann werden *Prestained Protein Marker*, Standards und Proben in die Gelaschen geladen. Als Standard wird ein biotinyliertes HLA-A*0201-Monomer verwendet. Die Stammlösung wird so mit Wasser verdünnt und mit Ladepuffer vermischt, dass die Gesamtmenge an Protein pro Tasche schließlich 0,05-0,7 µg beträgt. Die Proben bzw. deren Verdünnungen werden mit 1 µl NaOH sowie mit Ladepuffer versetzt. Sowohl Standards als auch Proben werden vor dem Laden 5 min bei 95°C denaturiert. Vom Marker wird 1 µl aufgetragen, in alle anderen Taschen 20 µl.

Tabelle 2.7.: Zusammensetzung des Polyacrylamidgels

	Trenngel	Sammelgel
H ₂ O	7,3 ml	12,8 ml
1,5 M Tris (pH 8,6)	5 ml	-
1 M Tris (pH 6,8)	-	5 ml
Acrylamid/ Bisacrylamid	7,5 ml	2 ml
10% SDS	200 μ l	200 μ l
TEMED	20 μ l	20 μ l
10% APS	100 μ l	100 μ l

Es wird eine Spannung von 110 V angelegt, bis die Lauffront das Trenngel erreicht. Danach wird die Spannung auf 140 V erhöht. Die Elektrophorese ist beendet, wenn die Lauffront am unteren Ende des Trenngels ankommt.

Falls kein Western Blot durchgeführt werden soll, wird das SDS-Gel zur Anfärbung der Proteine 1 h in Coomassie-Färbelösung geschüttelt, mit Wasser gespült und in Coomassie-Entfärber so lange entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich zu erkennen sind.

2.8.2.2. Western Blot

Um die elektrophoretisch getrennten Proteine zu detektieren, müssen sie auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert werden. Dazu werden vier in Anodenpuffer getränkte Filterpapiere, die Membran, das Gel und vier in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere gestapelt und zusammengedrückt in die *semi dry*-Transferapparatur gelegt. Der Transfer erfolgt drei Stunden bei 40 mA, was etwa 1 mA/cm² entspricht.

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wird die Membran anschließend über Nacht auf dem Schüttler mit TBB inkubiert. Danach erfolgt eine 90-minütige Inkubation mit dem Erstantikörper ($\alpha\beta$ 2-Mikroglobulin, 1:50000 in TBB mit 0,02% Natriumazid). Dann wird die Membran dreimal je 5 min mit TWB gewaschen und 1 h mit dem Zweitantikörper (α *rabbit*, gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase, 1:5000 in TBB) geschüttelt. Es folgen mehrere Waschschritte: 5 min TBS, dreimal 10 min TWB, zweimal 5 min TBS.

Zur Detektion werden zwei Chemilumineszenz-Reagenzien im Verhältnis 1:1 gemischt und auf die Membran aufgetragen. Die Membran wird in Plastikfolie eingeschlagen, aus der nach 3 min die Reagenzien ausgestrichen werden. Die

Chemilumineszenz, die bei der Umsetzung der Reagenzien durch die Meerrettich-Peroxidase entsteht, kann mit Hilfe einer Image-Station beobachtet werden.

2.9. Biochemische Methoden

2.9.1. Peptidsynthese

Alle verwendeten Peptide wurden von Patricia Hrستیć und Stefan Stevanović nach der Standard Fmoc-Chemie im Abimed Economy Peptide Synthesizer EPS 221 oder ABI 433A Peptide Synthesizer synthetisiert.

2.9.2. Differentielle Modifizierung von Peptiden

Die lyophilisierten Eluate der Immunpräzipitation werden in 500 μl LC-MS-Wasser gelöst und mit 92 μl GUA-Reagenz (2,5 M) sowie 20 μl Natronlauge (10 M) gemischt. Es wird sichergestellt, dass der pH zwischen 10,5 und 11,5 liegt. Die Guanidierung erfolgt bei 65°C und wird nach 10 min mit 40 μl konzentrierter Ameisensäure auf Eis gestoppt. Wiederum wird der pH überprüft, der für die weiteren Reaktionen bei 3-4 liegen muss.

Die weitere Modifizierung erfolgt auf *Peptide Cleanup C18 Spin Tubes*. Dazu werden die Säulen zunächst durch dreimaliges Auftragen von 200 μl 50% ACN mit 0,1% TFA mit anschließender Zentrifugation (8 g, 45 s) aktiviert. Danach werden sie equilibriert ($3 \times 200 \mu\text{l}$ H₂O, 0,1% TFA) und die Probe aufgetragen (in 200 μl -Aliquots, die je dreimal die Säule passieren). Zum Entsalzen wird gewaschen ($3 \times 200 \mu\text{l}$ H₂O). Anschließend erfolgt die (d)Nicotinylierung mit 500 μl NIC- bzw. dNIC-Reagenz (20 mM). Dazu werden die Säulen auf die abgeschnittene Spitze von 1 ml-Spritzen aufgesetzt und das Reagenz in 50 μl -Schritten alle 1-2 min mit Hilfe des Stemples durch das Säulenmaterial gesogen. Nach einem weiteren Waschschrift ($3 \times 200 \mu\text{l}$ H₂O) werden unerwünschte Nicotinylierungen von Tyrosinseitenketten durch 10-minütige Behandlung mit 500 μl 50% Hydroxylamin (50 μl alle 1-2 min) entfernt. Nach einem abschließenden Waschschrift ($3 \times 200 \mu\text{l}$ H₂O) werden die Peptide eluiert ($4 \times 50 \mu\text{l}$ 50%ACN, 1% Ameisensäure).

Um zwei Peptideluate mittels MS vergleichen zu können, wird eine der Proben mit NIC, die andere mit dNIC modifiziert. Dabei wird auch eine Blindprobe (LC-MS-Wasser ohne Peptid) mitgeführt. Nach der Elution wird in der Speedvac zunächst ACN abgedampft, das wie Nicotinsäure bei 260 nm leicht absorbiert und somit stören würde. Die Proben werden mit Lösungsmittel A

wieder auf 200 μl aufgefüllt. Die Absorption der verschiedenen Proben wird bei 260 nm gemessen, um den Peptidgehalt der Proben abschätzen zu können. Die Werte der Proben werden um den der Blindprobe korrigiert. Anschließend wird die Hälfte der Probe, die weniger Peptid enthält, mit einem Aliquot der anderen Probe vermischt, das einen gleichen Peptidgehalt hat. Diese Mischung wird für LC-MS-Experimente verwendet, während die Reste beider Proben für separate LC-MS/MS-Messungen eingesetzt werden (2.10.2.3).

2.9.3. Proteasommarkierung

$2 \cdot 10^7$ Zellen werden in ihrem üblichen Medium aufgenommen, sodass das Endvolumen 200 μl beträgt. Dann werden die Zellen zusammen mit dem Dansyl-Ahx3L3VS-(DALVS)-Reagenz in einer Endkonzentration von 1 μM 1 h bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle werden auch Zellen markiert, die zuvor 16 h mit 50 μM NLVS, einem Proteasominhibitor, im Medium inkubiert wurden. Anschließend werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Das Zellpellet wird im gleichen Volumen des doppelt konzentrierten Triton-Lysepuffers (pH 7,4) aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation (20000 g, 30 min, 4°C) wird der Überstand abgenommen und zur Proteinbestimmung nach Bradford verwendet. Dazu wird zunächst 1 μl des Überstands 1:50 mit Wasser verdünnt. Ist die Proteinkonzentration für eine korrekte Proteinbestimmung noch zu hoch, wird die Probe erneut verdünnt und bestimmt.

Beim anschließenden Western Blot (siehe 2.8.2) werden 50 μg Gesamtprotein eingesetzt. Als Erstantikörper wird ein *rabbit*- α DALVS-Antikörper in einer 1:2000-Verdünnung 1 h bei Raumtemperatur eingesetzt, als Zweitantikörper ein biotinylierter α *rabbit*-Antikörper 1:5000 45 min bei Raumtemperatur. Schließlich wird der Blot 1 h bei Raumtemperatur mit Vectastain-Reagenz inkubiert. Die Detektion erfolgt durch ECL Plus mit anschließender Autoradiographie. Als Kontrolle dient die Färbung von Actin mit α β -Actin-Peroxidase in einer 1:50.000-Verdünnung für 45 min.

2.9.4. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bradford-Proteinbestimmung nutzt den Effekt, dass sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs Coomassie-Brillantblau im sauren Milieu und in Gegenwart von Protein von 465 zu 595 nm verschiebt. Es handelt sich um den empfindlichsten quantitativen Färb-Assay.

Die Messung erfolgt in Duplikaten in einer 96-Rundbodenplatte. Jede Probe wird so verdünnt, dass die aufgrund der photometrischen Bestimmung zu erwartende Konzentration bei etwa 60 bzw. 90 $\mu\text{g/ml}$ liegt. Als Standard dienen BSA-Lösungen verschiedener Konzentration.

Jeweils 50 μl Probe werden in eine Vertiefung gegeben und mit 200 μl Nanoquant-Lösung vermischt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird der Quotient $\frac{OD_{590\text{ nm}}}{OD_{450\text{ nm}}}$ im Sunrise-Plattenleser gemessen. Mit Hilfe der Auswertungssoftware wird für die Standardreihe eine Regressionsgerade erstellt und die Konzentration der Proben daraus berechnet.

2.10. Analytische Methoden

2.10.1. Sequenzanalyse und Quantifizierung von Peptiden durch Edman-Abbau

Der Edman-Abbau ist eine zyklische Reaktionskaskade zum sequenziellen Abbau von Peptiden und Proteinen, bei der pro Zyklus eine Aminosäure vom N-Terminus abgespalten und detektiert wird und so eine Sequenzanalyse sowie Quantifizierung ermöglicht (Edman und Begg, 1967). Die Nachweisgrenze liegt dabei im Picomolbereich.

Ein Zyklus besteht aus drei Reaktionsschritten: Kupplung, Spaltung und Konvertierung. Als Erstes koppelt Phenylisothiocyanat (PITC) an die freie N-terminale Aminogruppe des Peptids, sodass ein Phenylthiocarbamoylpeptid (PTC-Peptid) entsteht. Für diesen nukleophilen Angriff sind alkalische Bedingungen und etwa 55°C nötig.

In der zweiten Teilreaktion wird das PTC-Peptid durch Behandlung mit wasserfreier Säure gespalten. Dabei greift der aus dem PITC stammende Schwefel des PTC-Peptids die Carbonylgruppe der ersten Peptidbindung an, wodurch das Peptid unter Freisetzung einer Anilinothiazolinon- (ATZ-)Aminosäure um eins verkürzt wird. Letztere wird mit einem hydrophoben Lösungsmittel vom Restpeptid abgetrennt.

Bei der Konvertierung wird schließlich die relativ instabile ATZ-Aminosäure unter Einwirkung von wässriger Säure und erhöhter Temperatur in ein stabileres Phenylthiohydantoin (PTH-)Derivat umgewandelt. Diese Derivate werden durch Reversed-Phase-HPLC anhand ihrer Retentionszeiten identifiziert und UV-spektroskopisch bei 269 nm quantifiziert. Das Restpeptid wird weiteren Abbauzyklen unterworfen.

2.10.2. Massenspektrometrie

Bei der Massenspektrometrie handelt es sich um eine Technik zur Bestimmung der Molekülmassen von Ionen in der Gasphase. Die Ionen werden in einer Ionenquelle durch unterschiedlichste Methoden erzeugt, in einem Massenanalysator entsprechend ihres Masse/Ladungs-Quotienten (m/z) aufgetrennt und in einem Detektor qualitativ durch ihren m/z -Wert und quantitativ anhand ihrer relativen Menge analysiert. Die Empfindlichkeit dieser Verfahren erstreckt sich bis in den Femtomol- und Subfemtomol-Bereich, sodass sie hier der Edman-Sequenzierung überlegen sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich die Elektrospray-Ionisation (ESI) zur Erzeugung der Ionen und ein Hybrid-Quadrupol-*Time-of-Flight*-Massenspektrometer (Q-TOF) zu deren Analyse verwendet. Darauf beschränken sich auch die weiteren Erläuterungen.

2.10.2.1. Elektrospray-Ionisation

Bei der Elektrospray-Ionisation handelt es sich um eine schonende Ionisierungsmethode, die sich gut für große, nicht-flüchtige Biomoleküle eignet. In einem elektrischen Feld werden gelöste Ionen in die Gasphase überführt, indem die Lösung aus einer engen Kapillare versprüht wird. Dabei bilden sich zunächst kleine geladene Lösungströpfchen, die durch Verdampfen des Lösungsmittels kleiner werden, was zu einer Erhöhung der Ladungsdichte an der Oberfläche führt. Die Tröpfchen zerfallen immer weiter durch sogenannte Coulomb-Explosionen, bis schließlich freie Gasphasen-Ionen am Übergang in das Massenspektrometer entstehen (de la Mora et al., 2000; Smith et al., 1990).

Das Versprühen der Analytlösung in das elektrische Feld wird durch ein *nebulizer gas* koaxial zur Kapillare unterstützt. Es findet bei Atmosphärendruck statt, während die spätere Analyse der freien Ionen im Hochvakuum durchgeführt wird. Das Potential, das an der leitfähigen Kapillare anliegt und zu der benötigten Potentialdifferenz zwischen Kapillarenspitze und einer Interface-Platte am Übergang zum Massenspektrometer führt, beträgt 1000-2000 Volt. An der Mikroöffnung zum Massenspektrometer fließt geheiztes Stickstoffgas (*curtain-gas*) senkrecht zur Flugrichtung der Tröpfchen des Sprays, wodurch eine Zone hohen Drucks entsteht. Dies verhindert, dass auch Neutralteilchen in das Hochvakuum gesaugt werden.

Die charakteristische Bildung mehrfach geladener Ionen $[M + nH]^{n+}$ beim ESI-Verfahren zeigt sich im Spektrum als Serie von Ionensignalen mit $m/z = (M + nH)/n$, die sich in der Anzahl der angelagerten Protonen n und damit

ihrer Ladung unterscheiden. Bei Proteinen, die viele Ladungen tragen können, entstehen so Serien, die aus mehr als hundert Peaks bestehen können. Bei Peptiden mit einem Molekulargewicht zwischen 1000 und 2000 Da dominieren dabei die zweifach geladenen Ionen, die am Abstand der Isotopensignale $-0,5 \text{ Da}$ – erkannt werden können.

Die von Wilm und Mann entwickelte Nanoflow-Elektrospray-Methode (Wilm und Mann, 1996) dient der *offline*-Messung von Proben. Dabei werden mit Gold beschichtete, dünn ausgezogene Glaskapillaren eingesetzt, die mit einigen μl Probe befüllt werden. Die Flussraten sind sehr gering im Vergleich zur herkömmlichen ESI-Technik und liegen im Bereich von etwa 20 nl/min , was zu einer Verlängerung der möglichen Messzeit durch geringeren Probenverbrauch und zu einer Steigerung der Empfindlichkeit um den Faktor 10^3 führt.

2.10.2.2. Q-TOF-Massenspektrometer

Ein Q-TOF besteht aus zwei Einheiten: einem Quadrupol (Q) und einem *Time-of-flight*-Analysator (TOF).

Quadrupole dienen als Massenanalytoren und -filter. Ein Quadrupol besteht aus vier stabförmigen, parallel angeordneten Metallelektroden, an denen eine Gleich- und eine Wechselspannung anliegen. Das Verhältnis beider Spannungen ist entscheidend dafür, welche Ionen mit einem bestimmten m/z -Wert aufgrund stabiler Oszillationen den Quadrupol passieren können und welche an und zwischen den Stäben verloren gehen.

Flugzeitmassenspektrometer (TOF) bestimmen Ionenmassen im Hochvakuum ($p = 3,8 \cdot 10^{-8} \text{ bar}$) durch eine exakte elektronische Bestimmung der Zeit, die die Ionen benötigen, um die Strecke zwischen Ionenquelle und Detektor zu durchfliegen. Die Ionen werden an der Quelle durch ein elektrostatisches Feld beschleunigt und durchqueren dann eine feldfreie Driftstrecke, in der sie nach ihrem m/z -Wert aufgetrennt werden. Letzteres ist möglich, da alle Ionen zwar die gleiche kinetische Energie aus dem elektrostatischen Feld aufnehmen, dabei jedoch entsprechend ihren m/z -Werten unterschiedliche Geschwindigkeiten erreichen. Durch Messung der Flugzeit lässt sich das m/z -Verhältnis berechnen:

$$E_{kin} = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2 = \frac{m \cdot l}{2 \cdot t^2} = z \cdot e \cdot U$$

$$m/z = \frac{2 \cdot e \cdot U \cdot t^2}{L^2}$$

mit

m	=	Masse des Ions
v	=	Geschwindigkeit des Ions nach Beschleunigungsstrecke
z	=	Ladungszahl
e	=	Elementarladung
t	=	Gesamtflugzeit
L	=	Länge der feldfreien Driftstrecke des Flugrohrs

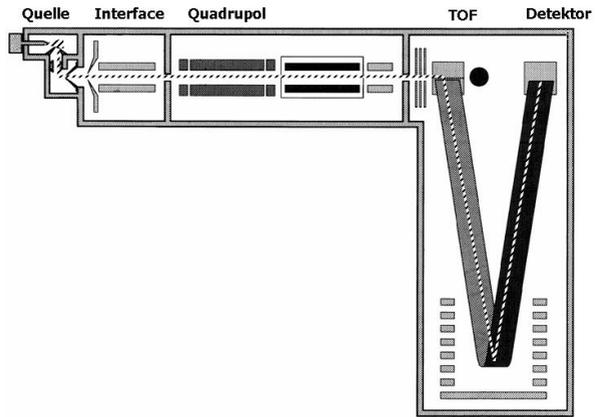
Zur Detektion werden Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) verwendet. Der auf die Konversionsdynode auftreffende Ionenstrom erzeugt einen Sekundärionenstrom, der seinerseits durch eine Elektronenkaskade an weiteren Dynoden verstärkt wird.

Das hier verwendete Q-TOF besteht aus den beiden funktionellen Einheiten MS1 und MS2. Die an der Quelle durch ESI gebildeten Ionen erreichen den Quadrupol-Analysator MS1 durch eine unabhängig evakuierte Ionenoptik. Ab hier unterscheidet man zwei Fälle: MS-Experimente ohne Fragmentierung der Ionen und Tandem-MS-Experimente (MS/MS), bei denen die Ionen fragmentiert werden.

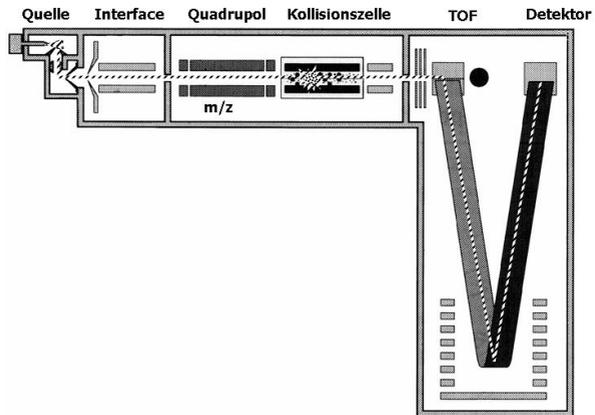
Im MS-Modus ohne Fragmentierung der Ionen ist der Quadrupol nicht eingeschaltet, sodass die Ionen ihn sowie die dahinter folgende evakuierte Hexapol-Kollisionszelle passieren und von der Hexapol-Transferlinse auf den *Pusher* fokussiert werden, der den Ionenstrom mit maximaler Frequenz von 20 kHz in die MS2-Einheit ablenkt. Diese ist orthogonal zu MS1 angeordnet und besteht aus dem Reflektion-*Time-of-flight*-Massenspektrometer, in dem die m/z -Verhältnisse durch Messung der Flugzeit zwischen Pusher-Aktivierung und Eintreffen am Detektor bestimmt werden.

Bei MS/MS-Experimenten wird der Quadrupol-Analysator so eingestellt, dass nur Ionen eines definierten m/z -Wertes die Kollisionszelle erreichen. Diese ist mit einem Inertgas (z.B Argon) gefüllt. Bei Niedrig-Energie-Stößen mit den Gasmolekülen wird kinetische Energie auf die Ionen übertragen und in Schwingungsenergie umgewandelt, die das Peptidion durch Fragmentierungsreaktionen wieder abgibt (*collisionally induced decay*, CID). Die Fragment-Ionen werden ebenso detektiert wie im MS-Modus.

Vor der Stoßaktivierung ist häufig noch eine zusätzliche Beschleunigung der Ionen nötig. Die angelegte Kollisionsspannung beträgt 20-60 V. Der genaue



(a) MS-Modus



(b) MS/MS-Modus

Abbildung 2.1.: Schematischer Q-TOF-Aufbau

Wert richtet sich nach Art und Druck des Gases in der Kollisionszelle sowie Art und Ladung des zu fragmentierenden Ions.

Um den Ionenstrom optimal einstellen zu können, gibt es einen Punktdetektor für Ionen, die MS1 verlassen und nicht am *Pusher* abgelenkt werden. Zur Gerätesteuerung, Datenaufnahme und -verarbeitung dient die MassLynx 4.0 Software.

Das instrumentelle Auflösungsvermögen beträgt in etwa 5000 FWHM (*full width at half maximum*). Es wird nach $R = \frac{m}{\Delta m}$ berechnet, wobei m die Masse des verwendeten monoisotopischen Peaks im unteren Massenbereich und Δm seine Halbwertsbreite ist. Ab einem Wert von 2000 FWHM im Massenbereich der Peptidionen wird eine Grundlinientrennung der Isotopenpeaks erreicht.

Der m/z -Bereich, der einer Messung zugänglich ist, liegt zwischen 2 und 4000, wobei jedoch auch erheblich größere Moleküle aufgrund ihrer mehrfachen Ladungen analysiert werden können.

2.10.2.3. Liquid Chromatography Mass Spectrometry-Kopplung

Zur *online*-Detektion wird die Mikrospray-Methode im Gegensatz zur Nanospray-Methode (2.10.2.1) eingesetzt. Dabei wird ein HPLC-System zur Reduktion der Probenkomplexität direkt mit einer Elektrospray-Quelle gekoppelt (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry* (LC-MS)-Kopplung). Dies ermöglicht die fortdauernde Aufnahme von MS- und MS/MS-Spektren der von der Säule eluierenden Komponenten. Einen ersten Anhaltspunkt zur Identität der Peptide bietet die Kombination aus Retentionszeit und Masse. Diese ermöglicht außerdem die Selektion bestimmter, beispielsweise vorhergesagter Peptide für die Fragmentierung. Das System erreicht durch die kleinen Elutionsvolumina eine hohe Sensitivität, da die Peptide in konzentrierter Form vorliegen.

Eine μ Kapillarsäule wird mit einer goldbeschichteten Kapillare verbunden, die als ESI-Quelle dient. Die Flussrate im μ Kapillar-HPLC-System (Ultimate) beträgt 150 bis 200 $\mu\text{l}/\text{min}$. Vor Probenschleife und HPLC-Säule befindet sich ein T-Stück, das den Flüssigkeitsstrom splittet, sodass der Fluss über die HPLC-Säule auf 300 nl/min verringert wird.

Zunächst wird das System zehn Minuten mit 100% Lösungsmittel B_1 gewaschen und anschließend mit 15% B_1 30 Minuten lang äquilibriert. 100-150 μl der in Lösungsmittel A_1 gelösten Probe werden in eine 200 μl -Probenschleife injiziert und mit einer Flussrate von 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ 30 Minuten unter Äquilibrierungsbedingungen auf die C18-Vorsäule geladen, die der Aufkonzentration und Entsalzung dient. Schließlich wird die Säule in das System der μ Kapillarsäule eingeschaltet. Die gebundenen Peptide werden durch einen linearen Gradienten

von 15-45% B₁ innerhalb von 120 Minuten auf die μ Kapillarsäule eluiert und dort aufgetrennt. Zum Schluss werden Probenreste durch Waschen mit 100% B₁ entfernt und das System neu äquilibriert.

Für einige der späten, im Rahmen dieser Arbeit erfolgten Messungen wurde statt des Ultimate-HPLC-Systems eine nanoLC (Eksigent) eingesetzt. Diese arbeitet splitfrei mit Flussraten zwischen 1 und 1000 nl/min. Die nanoLC wurde bei 300 nl/min mit leicht veränderten Lösungsmitteln (A₂, B₂) aber den gleichen Säulen und Vorsäulen betrieben.

Datenerfassung und Auswahl der Vorläufer-Ionen $[M + 2H]^{2+}$ für die Fragmentierung erfolgen automatisch entsprechend der in der MassLynx 4.0 Software eingestellten Parameter (*data-dependent ion selection*, DDIS). Die Integrationszeit des TOF-Analysators beträgt bei MS-Spektren 1 s und im MS/MS-Modus 4 s bei einer Interscanverzögerung von 0,1 s.

2.10.2.4. Analyse von MS-Daten

Differentiell modifizierte Peptidmischung (dNIC) Mit der Mischung von Peptiden aus zwei differentiell modifizierten Proben (2.9.2) wird ein LC-MS-Experiment durchgeführt. Pärchen von Peptidsignalen, die sich entsprechend der differentiellen Modifikation mit NIC und dNIC um 4 Da unterscheiden, werden manuell in den MS-Daten des Experiments gesucht. Zur Darstellung werden Massenchromatogramme der leichten sowie schweren Version eines Peptids erstellt und die Scans aufsummiert, die dieses Peptid enthalten. Dabei wird eine gleiche Anzahl von Scans mit ähnlicher Retentionszeit als Hintergrund subtrahiert.

Vergleich von drei unmodifizierten Peptidproben (DDIS) Um auch drei nicht modifizierte Peptidproben miteinander vergleichen zu können, werden hintereinander in zufälliger und wechselnder Reihenfolge separate LC-MS/MS-Experimente mit DDIS von den drei Proben durchgeführt. Durch Prozessierung der Daten erhält man von jedem einzelnen Experiment eine DDIS-Liste mit fragmentierten Vorläufer-Ionen, die unter anderem deren Retentionszeit und m/z -Werte enthält. Die Listen zweier Experimente verschiedener Proben werden miteinander verglichen und eine Paar-Liste mit Vorläufer-Ionen erstellt, die in beiden Experimenten vorhanden sind und sich höchstens um 0,4 Da in ihrem m/z -Wert und je nach Experiment maximal 1-5 min in ihrer Retentionszeit unterscheiden¹. Diese Paar-Liste kann manuell überprüft werden, in-

¹MATLAB-Programm *nina2* von Lorenz T. Gerstmayr

dem die zu den Vorläufer-Ionen gehörenden Fragmentspektren verglichen werden. Vorläufer-Ionen-Paare, deren Fragmentierungsmuster nicht übereinstimmen, werden aus der Liste entfernt. Abbildung 2.2 zeigt eine Übersicht über den DDIS-Ansatz.

Die Überlappung $O_{A \cap B}$ zweier LC-MS/MS-Experimente, A und B, wird wie folgt berechnet:

$$O_{AB} = \frac{\text{Anzahl der Fragmentspektren aus A mit Gegenstück in B}}{\text{Anzahl der Fragmentspektren aus A}}$$

$$O_{BA} = \frac{\text{Anzahl der Fragmentspektren aus B mit Gegenstück in A}}{\text{Anzahl der Fragmentspektren aus B}}$$

$$O_{A \cap B} = \frac{O_{AB} + O_{BA}}{2}$$

Um die Überlappung $O = O_{A \cap B \cap C}$ dreier LC-MS/MS-Experimente, A, B und C, zu bestimmen, werden folgende Berechnungen durchgeführt (i= A, B, C):

$$O_{ABC_i} = \frac{\text{Anzahl der Fragmentspektren-Paare aus } O_{AB} \text{ mit Gegenstück in C}}{\text{Anzahl der Fragmentspektren aus i}}$$

$$O_{BAC_i} = \frac{\text{Anzahl der Fragmentspektren-Paare aus } O_{BA} \text{ mit Gegenstück in C}}{\text{Anzahl der Fragmentspektren aus i}}$$

$$O_{BCA_i} = \frac{\text{Anzahl der Fragmentspektren-Paare aus } O_{BC} \text{ mit Gegenstück in A}}{\text{Anzahl der Fragmentspektren aus i}}$$

$$O_{CBA_i} = \frac{\text{Anzahl der Fragmentspektren-Paare aus } O_{CB} \text{ mit Gegenstück in A}}{\text{Anzahl der Fragmentspektren aus i}}$$

$$O_{ACB_i} = \frac{\text{Anzahl der Fragmentspektren-Paare aus } O_{AC} \text{ mit Gegenstück in B}}{\text{Anzahl der Fragmentspektren aus i}}$$

$$O_{CAB_i} = \frac{\text{Anzahl der Fragmentspektren-Paare aus } O_{CA} \text{ mit Gegenstück in B}}{\text{Anzahl der Fragmentspektren aus i}}$$

$$O = \frac{\sum_i O_{ABC_i} + \sum_i O_{BAC_i} + \sum_i O_{BCA_i} + \sum_i O_{CBA_i} + \sum_i O_{ACB_i} + \sum_i O_{CAB_i}}{72}$$

Die Paarungen von Fragmentspektren aus der Überlappung zweier Experimente mit denen aus dem dritten Experiment wurden dabei zuvor wiederum anhand der Fragmentspektren verifiziert.

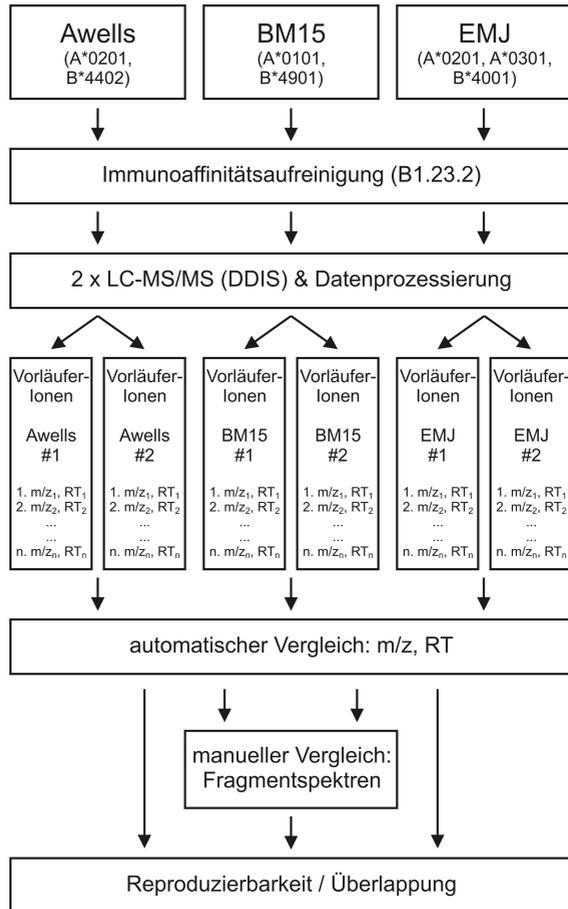


Abbildung 2.2.: Der DDIS-Ansatz zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit und der Überlappung von HLA-Ligandomen am Beispiel der B-LCLs Awells, BM15 und EMJ (siehe auch 3.2.6).

2.10.2.5. Interpretation der ESI-Fragmentspektren von Peptiden

Durch ESI werden Peptidionen erzeugt, bei denen Protonen an allen stark basischen Stellen angeheftet sein können, beispielsweise an der N-terminalen Aminogruppe und den Seitenketten von Histidin, Lysin und Arginin. In der Gasphase ist die Basizität der Seitenketten sehr stark. Daher sind an dieser Stelle angeheftete Protonen sogar bei Stoßaktivierung fixiert. Die Protonen an den N-Termini hingegen können zu jeder der Peptidbindungen wandern (Migration durch interne Solvatisierung). Dort sind sie dann an den Carbonylsauerstoff angelagert. So entsteht aus einem Peptid eine heterogene Population von Ionen, die sich hinsichtlich der Position der Protonen an den Amidbindungen unterscheiden (Wysocki et al., 2000). Diese Protonierungsstelle lenkt die Fragmentierungsreaktion. Daher fragmentiert jede Subpopulation von Vorläuferionen unterschiedlich, sodass eine Serie von Fragment-Ionen entsteht, die in ihrer Gesamtheit die Sequenz des Peptids erkennen lässt (Hunt et al., 1986; Kinter und Sherman, 2000).

Die Fragmentierung wird an der protonierten Stelle initiiert und führt zu einem zyklischen Intermediat, das durch eine von zwei verschiedenen Reaktionen schrittweise fragmentiert. Dabei können entweder zwei einfach geladene Fragment-Ionen entstehen oder je ein doppelt geladenes und ein neutrales.

N-terminale Fragmente, die eine Ladung tragen und somit im Spektrum sichtbar sind, werden a-, b- und c-Fragmente genannt. Geladene C-Termini gehören zur x-, y- bzw. z-Serie. Jedes Fragment erhält einen zusätzlichen Index, der die Zahl der darin enthaltenen Aminosäuren angibt. In den zu analysierenden Spektren dominieren b- und y-Ionen. Die a-Serie entsteht durch neutralen Verlust von Kohlenmonoxid aus den b-Ionen ($\Delta m = 28$ Da).

Weitere mögliche neutrale Verluste sind die Abspaltung von Wasser ($\Delta m = 18$ Da) aus b- und y-Fragmenten sowie aus den Seitenketten von Serin, Threonin, Aspartat und Glutamat, von Ammoniak ($\Delta m = 17$ Da) aus Asparagin, Glutamin, Lysin und Arginin, von Dehydroalanin aus Cystein ($\Delta m = 34$ Da) und die Abspaltung von Methylsulfensäure (HSOCH_3 , $\Delta m = 64$ Da) aus oxidiertem Methionin. Zusätzlich können noch interne Fragmente durch Bruch von zwei Peptidbindungen auftreten.

Der Abstand zwischen den benachbarten Peaks einer Serie entspricht einer Aminosäure, deren Identität ermittelt wird anhand der Differenz der m/z -Werte, die für alle Aminosäuren tabelliert sind (Tabelle 2.8). Weitere Hinweise auf enthaltene Aminosäuren geben die Immonium-Ionen ($\text{H}_2\text{N}=\text{CHR}^+$), die im unteren Massenbereich des Spektrums sichtbar sind und typische m/z -Werte für bestimmte Aminosäuren aufweisen.

Ist schließlich eine Teilsequenz des Peptids durch Auswertung des Spektrums bekannt, kann hiermit eine Datenbank-Suche (NCBI nr oder IPI) mit Hilfe des MASCOT-Programms² durchgeführt werden (Perkins et al., 1999). Je länger die Teilsequenz ist, desto spezifischere Treffer erhält man. Außerdem wird die Massengenauigkeit angegeben, um die Treffer einzuschränken. Je geringer die erlaubte Toleranz ist, desto spezifischer werden die Treffer. Die Massengenauigkeit des hier verwendeten Q-TOF liegt üblicherweise bei Peptiden mit einem Molekulargewicht von etwa 1000 Da bei 0,2 Da (200 ppm). Allerdings hängt die Massengenauigkeit zum einen von der Kalibrierung ab und kann sich zum anderen im Tagesverlauf oder durch Temperaturschwankungen verändern. Bei den meisten Messungen ist eine Toleranz von 200 ppm bei der MASCOT-Suche jedoch angemessen. Aus den erhaltenen Treffern kann dann die Sequenz bestimmt werden, der das Fragmentspektrum am ehesten entspricht. Eine endgültige Bestätigung ist nur durch Aufnahme eines Fragmentspektrums des entsprechenden synthetischen Peptids möglich.

²<http://www.matrixscience.com>

Tabelle 2.8.: Massen der Aminosäurereste in MS/MS-Spektren

Aminosäure	3-Buchstaben -Code	1-Buchstaben -Code	Masse	Immonium -Ion
Alanin	Ala	A	71	44
Arginin	Arg	R	156	129
Asparagin	Asn	N	114	87
Aspartat	Asp	D	115	88
Cystein	Cys	C	103	76
Glutamat	Glu	E	129	102
Glutamin	Gln	Q	128	101
Glycin	Gly	G	57	30
Histidin	His	H	137	110
Isoleucin	Ile	I	113	86
Leucin	Leu	L	113	86
Lysin	Lys	K	128	101
Methionin	Met	M	131	104
Methionin, oxidiert	Met _{ox}	M _{ox}	147	120
Phenylalanin	Phe	F	147	120
Prolin	Pro	P	97	70
Serin	Ser	S	87	60
Threonin	Thr	T	101	74
Tryptophan	Trp	W	186	159
Tyrosin	Tyr	Y	163	136
Valin	Val	V	99	72

2.11. Bioinformatische Methoden

2.11.1. Visualisierung von Peptidmotiven

Zur Darstellung eines Peptidmotivs werden die absoluten und relativen Häufigkeiten aller Aminosäuren in jeder Peptidposition unter allen Liganden gleicher Länge eines MHC-Allels bestimmt³. Zur Visualisierung werden die Taschen in der Bindungsfurche des MHC-Moleküls dargestellt, in die die Seitenketten der Ankeraminosäuren hineinragen. Die relativen Häufigkeiten der Aminosäuren in Anker- und Hilfsankerpositionen werden mit einer zur Häufigkeit proportionalen Schriftgröße angegeben (3-28 pt, 0,25 pt $\hat{=}$ 1%). Aminosäuren, die nur in ein oder zwei Liganden an dieser Stelle vorkommen, werden nicht gezeigt. Bevorzugte Aminosäuren werden nur abgebildet, wenn sie diese Position in mindestens 30% der Liganden einnehmen.

2.11.2. Vorhersage-Matrizen für MHC-Liganden

Mit Hilfe der SYFPEITHI-Datenbank kann für eine gegebene Proteinsequenz für jedes mögliche Peptid bestimmter Länge eine Liste möglicher Liganden für ein bestimmtes MHC-Allel erstellt werden. Diese sind nach der Wahrscheinlichkeit ihrer Präsentation auf diesem spezifischen MHC-Allel geordnet.

Der Vorhersage-Algorithmus benötigt dazu eine Matrix, deren Reihen-Index die Aminosäuren repräsentiert, während die Spalten jeweils für die Position des Aminosäurerestes im Peptid stehen. Es gibt folglich unterschiedliche Matrizen für verschiedene Peptidlängen.

Solche Matrizen werden anhand der Peptidmotive aufgestellt. Jeder Aminosäure wird in jeder Position ein Wert zwischen 0 und 10 zugeordnet. Die genaue Punktzahl hängt davon ab, ob eine einzelne Aminosäure eine bestimmte Häufigkeit erreicht oder ob dazu mehrere ähnliche Aminosäuren zu einer Gruppe zusammengefasst werden müssen. Ist keine Gruppierung der Aminosäuren möglich, werden sie mit geringeren Punktzahlen einzeln gewertet. Tabelle 2.9 zeigt die genaue Punktezuordnung. In den Ankerpositionen bekommen verschiedene Aminosäuren der gleichen Gruppe, die diesen Anker bilden, nur dann unterschiedlich hohe Punktwerte, wenn sich ihre Häufigkeiten mindestens um den Faktor 3 unterscheiden. Aminosäuren mit Häufigkeiten von über 50% in den Ankerpositionen wird der Wert 10 zugeordnet. Für Aminosäuren, die seltener auftauchen als bei Gleichverteilung statistisch erwartet (< 5%), können negative Punkte verteilt werden. Die gilt jedoch nicht für an sich seltene Aminosäuren

³MATLAB-Programm *frequency* von Lorenz T. Gerstmayr

wie beispielsweise Cystein und Tryptophan.

Tabelle 2.9.: Punktezuordnung für Vorhersagematrizen

Besetzung einer Position	Bezeichnung	Punkte
> 75%	Gruppe (Anker)	10, 8 oder 6
> 50%	Gruppe (Anker, Hilfsanker)	6 oder 4
40-50%	einzelne AS	4
30-40%	einzelne AS	3
20-30%	einzelne AS	2
10-20%	einzelne AS	1
< 5%	einzelne AS	-1 oder -3

Zur Vorhersage von Peptiden wird die Sequenz eines Proteins in alle theoretisch möglichen Peptide einer bestimmten Länge zerlegt. Für jedes davon wird dann ein Wert berechnet durch Aufsummierung der Punktzahl jeder enthaltenen Aminosäure für die jeweilige Position. Zu erwartende T-Zell-Epitope sollten unter den 2% der am höchsten bewerteten Peptide zu finden sein.

2.11.3. Datenanalyse nach Gesichtspunkten der Proteomik

Die Quellproteine aller Liganden werden durch BLAST-Abfragen⁴ zunächst in Proteindatenbanken (`blastp: nr, refseq`) und anschließend auch in Nukleotiddatenbanken (`tblastn: nr, refseq_genomic, est_human`) ermittelt. Jedem Quellprotein wird eine *GeneID* der *Entrez Gene*-Datenbank zugeordnet. Ist dies für einen Liganden nicht möglich, da kein passendes Quellprotein in einer Proteindatenbank vorliegt, wird er als EST aufgeführt. Kann ein Ligand aus mehr als einem Quellprotein stammen, wird bei der Datenanalyse stets nur die niedrigste *GeneID* berücksichtigt. Dies ermöglicht ein systematisches Vorgehen ohne Voreingenommenheit oder Beliebigkeit, wenngleich in einigen Fällen vermutlich eine andere *GeneID* aufgrund von Gewebespezifitäten oder Ähnlichem passender wäre.

⁴<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>

3. Ergebnisse und Diskussion

Im Folgenden werden basierend auf der Analyse natürlicher HLA-Liganden zunächst die Peptidmotive einiger HLA-Allele völlig neu definiert sowie die bereits bekannten Motive anderer Allele verfeinert. Anschließend werden die Überlappung der Peptidrepertoire dieser Allele und die Spezifität ihrer Liganden bezüglich verschiedenster Gesichtspunkte untersucht. Schließlich werden die Konsequenzen für die biologische Funktion sowie die klinische Relevanz überprüft.

Ausgangspunkt für die Analyse natürlicher Liganden können Zelllinien, Primärzellen oder auch solide Gewebe sein. Mit dem Begriff *Source* wird im Folgenden jegliche Art von Zelllinie oder Gewebe bezeichnet, von der HLA-Liganden mittels Immunpräzipitation isoliert wurden. Bei der Verwendung von Zelllinien müssen diese zuvor im großen Stil als Rollerkulturen auf mindestens 30-50 Liter expandiert und dann geerntet werden. Von einer *Source* werden die HLA-präsentierten Peptide durch Lyse mittels Detergenz, nachfolgende Immunpräzipitation durch verschiedene MHC-spezifische Antikörper, Säureextraktion und Ultrafiltration isoliert. Das Eluat jedes einzelnen Antikörpers wird anschließend in LC-MS/MS-Experimenten analysiert. In einem solchen Experiment werden in der Regel einige Hundert Fragmentspektren von Peptiden aufgenommen. Die einzelnen Fragmentspektren werden dann manuell ausgewertet, um die Peptidsequenzen zu bestimmen. In Abhängigkeit von der extrahierten Peptidmenge, der Qualität der Messung sowie den präsentierenden HLA-Allelen (basische Ankeraminosäuren erleichtern die Auswertung beispielsweise erheblich) können aus einem Experiment etwa zwischen 20 und 200 Peptidsequenzen gewonnen werden.

Eine genaue Zuordnung von MHC-Präparationen, LC-MS/MS-Experimenten sowie Peptidbewertungen zu Personen ist mittels der internen Peptiddatenbank jederzeit möglich. Zugangsdaten können bei Stefan Stevanović erfragt werden. Kultivierung und Ernte von Zelllinien werden nicht registriert. Sie wird durch Technische Assistentinnen, PraktikantInnen, KooperationspartnerInnen, DiplomandInnen und DoktorandInnen der Arbeitsgruppe Stevanović durchgeführt.

Für die vorliegende Arbeit wurden 1953 HLA-Liganden verwendet. 737 davon, also 38%, wurden von der Autorin eigenständig sequenziert. Dazu gehö-

ren insbesondere alle Liganden von HLA-B*3801, -B*3901 und B*3902. Weitere 90 HLA-A*0301-Liganden sowie 8 HLA-A*0201-, 45 HLA-A*6601- und 44 HLA-A*2603-Liganden wurden unter Anleitung und Betreuung der Autorin von den wissenschaftlichen Hilfskräften Madeleine Hipp und Hans-Henning Schmidt sequenziert (insgesamt 10% aller verwendeten Peptide). Die Analyse der übrigen Liganden erfolgte durch PraktikantInnen, KooperationspartnerInnen, DiplomandInnen und DoktorandInnen der Arbeitsgruppe Stevanović, darunter insbesondere: Florian Altenberend, Jörn Dengjel, Oliver Drews, Marc Günder, Ziad Haddad, Norbert Hilf, Ashley Knights, Tobias Krüger, Claudia Lemmel, Verena Meyer, Margret Müller, Anneke Neumann, Markus Schirle, Oliver Schoor, Juliane Stickel, Toni Weinschenk und Andreas Weinzierl.

3.1. Neue und verfeinerte HLA-Peptidmotive

Die Analyse natürlicher Liganden und die darauf aufbauenden Definitionen von Peptidmotiven für möglichst viele HLA-Allele ermöglichen fundamentale Einblicke in die Prinzipien der Antigenprozessierung und sind Grundvoraussetzung für jede Art von peptidbasierter Immuntherapie. Im Folgenden werden daher die Motive von 18 HLA-Allelen anhand einer Vielzahl natürlicher Liganden entweder ganz neu definiert oder aber aufgrund einer erheblich erweiterten Datenlage überarbeitet und verfeinert.

3.1.1. HLA-A*0201

Das Peptidmotiv von HLA-A*0201, dem häufigsten Allel der kaukasischen Population, basiert auf insgesamt 502 natürlichen Liganden. Davon sind 281 vierstellig typisiert und stammen vor allem aus Zelllinien wie EMJ, Awells, LCL721.45 und HeLaP83.30 (Idler, 2004). Da die übrigen, nicht feintypisierten Liganden keine abweichende Aminosäureverteilung zeigen, wurden sie zur Aufstellung des Motivs hinzugenommen. Sie stammen vor allem aus RCC-Tumorgeweben.

Zu beachten ist dabei, dass es mehr als 90 HLA-A*02-Subtypen gibt, von denen einige – wie HLA-A*0205 – ein von HLA-A*0201 abweichendes Peptidmotiv aufweisen und deren Peptidrepertoire nur wenig überlappen (persönliche Kommunikation, Claudia Trautwein, immatics biotechnologies). Sie kommen allerdings in der kaukasischen Bevölkerung nur bei etwa 5% der HLA-A*02⁺ Menschen vor (Krausa et al., 1995). Zu erwarten ist also, dass 11 der insgesamt 502 HLA-A*02-Liganden von anderen Subtypen als HLA-A*0201 stammen.

3. Ergebnisse und Diskussion

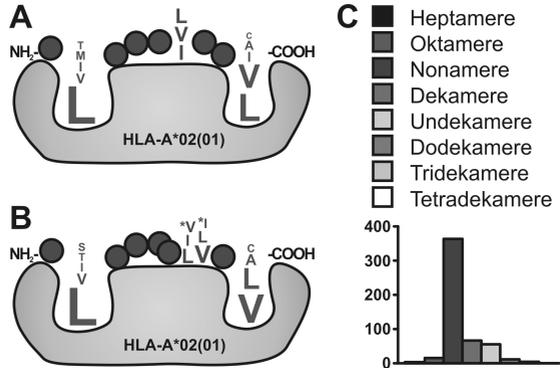


Abbildung 3.1.: Peptidmotiv von HLA-A*02. Peptidmotive von HLA-A*02(01) basierend auf Nonameren (A) und Dekameren (B), sowie die Peptidlängenverteilung (C). Dargestellt sind die Taschen in der Bindungsfurche des MHC-Moleküls, in die die Seitenketten der Ankeramino­säuren (P2, PΩ) hineinragen. Für die Hilfsanker sind keine Taschen dargestellt. Die in Anker- und Hilfsankerpositionen vorkommenden Aminosäuren sind im 1-Buchstaben-Code angegeben. Ihre relativen Häufigkeiten werden mit einer zur Häufigkeit proportionalen Schriftgröße angegeben. Aminosäuren, die nur in ein oder zwei Liganden an dieser Stelle vorkommen, werden nicht gezeigt. Bevorzugte Aminosäuren werden nur abgebildet, wenn sie diese Position in mindestens 30% der Liganden einnehmen. Das * zeigt an, dass es sich bei dieser Gruppe nicht um einen Hilfsanker handelt. Sie ist nur zum Vergleich dargestellt.

Aufgrund dieses minimalen Anteils von etwa 2% wurden sie hier vernachlässigt.

Die Datenbank SYFPEITHI¹ enthält zusätzliche 65 Peptide, die sich in ihrer Aminosäureverteilung praktisch nicht unterscheiden. Für das Peptidmotiv wurden jedoch nur die von der AG Stevanović gefundenen Peptide verwendet.

Dekamere stellen mit einem Anteil von 13% nach den Nonameren mit 72% die zweithäufigste HLA-A*02-präsentierte Peptidlänge dar. Da sich die Dekamere auch in den Hilfsankern leicht von den Nonameren unterscheiden, stellt Abbildung 3.1 Peptidmotive für beide Längen dar.

Die erste Ankerposition in P2 wird über alle Peptidlängen hinweg stark von

¹<http://www.syfpeithi.de>

Leucin dominiert. Die aufnehmende Tasche B wird von sieben Seitenketten des MHC-Moleküls maßgeblich beeinflusst: Tyr₇, Phe₉, Met₄₅, Glu₆₃, Lys₆₆, Val₆₇ und Tyr₉₉. Dank des nicht zu großen Phe₉ können noch langkettige, aliphatische Seitenketten Platz finden; ein Tyrosin würde hier nur noch kurzkettenige erlauben (siehe Seite 71). Auch die Orientierung von Val₆₇ spielt eine wichtige Rolle, da die Methylgruppen den tieferen Zugang zur Tasche blockieren können. Dies ist bei HLA-A*0201 allerdings nicht der Fall und größere Seitenketten – neben Leucin auch Methionin und Isoleucin – finden genügend Platz. Da jedoch Leucin in P2 mit den Seitenketten von Met₄₅ und Phe₉ über van-der-Waals-Kräfte wechselwirken kann, ist es sehr stark bevorzugt. Auffällig ist, dass trotz einer positiven Nettoladung der Tasche keine Präferenz für saure Aminosäuren besteht. Diese Beobachtung trifft auch auf die anderen HLA-A-Allotypen zu, deren Anker in P2 hydrophob und vom Ladungszustand der Tasche unabhängig ist.

Auch die C-terminale Ankerposition besitzt mit ihrer ausgeprägten Präferenz für Leucin und Valin hydrophoben Charakter, wobei Häufigkeiten dieser beiden Aminosäuren bei den verschiedenen Peptidlängen leicht variieren. Am Ende der Tasche F liegt Tyr₁₁₆, dessen Hydroxylgruppe mit Asp₇₇ eine Wasserstoffbrückenbindung eingeht und das den für die Seitenkette von P9 verfügbaren Raum begrenzt. Je größer diese Seitenkette ist, desto mehr muss sich Tyr₁₁₆ wegorientieren, wodurch die intramolekularen Wechselwirkungen geschwächt werden.

Für HLA-A*0201-präsentierte Nonamere findet sich außerdem in P6 ein ebenfalls hydrophober Hilfsanker, der von der Gruppe aus Isoleucin, Valin und Leucin dominiert wird. Dieser lässt sich bei längeren Peptiden nicht beobachten. Dennoch gibt es in P7 und P8 eine Häufung von Aminosäuren der gleichen Gruppe, die allerdings die Kriterien für einen Hilfsanker nicht erfüllt. Abbildung 3.1 zeigt dieses „Verschmieren“ des Nonamer-Hilfsankers über zwei Positionen. Es kommt dadurch zustande, dass sich längere Peptide ganz unterschiedlich durch Abknicken des Rückgrats an den verfügbaren Platz zwischen den Taschen B und F anpassen.

HLA-A*0201 ist aufgrund seiner Häufigkeit und der damit verbundenen klinischen Relevanz das am besten charakterisierte HLA-Allel und besitzt Modellcharakter. Schon 1991b wurde sein Peptidmotiv als eines der ersten untersucht (Falk et al., 1991b). Seither sind eine Vielzahl natürlicher Liganden und T-Zell-Epitope beschrieben worden². Das Motiv selbst blieb in den grundsätzlichen Präferenzen der Ankerpositionen zwar gleich, aber gerade bei den Hilfsankern

²<http://www.syfpeithi.de>

und bevorzugten Aminosäuren erlaubte die große Zahl massenspektrometrisch gefundener Liganden eine genauere Analyse.

Bei Bindungsstudien wurde eine Abneigung von HLA-A*0201 gegen saure Aminosäuren und Prolin in P1 beobachtet (Ruppert et al., 1993). Unter den 502 betrachteten Peptiden dieser Arbeit weisen eines ein Prolin, sechs ein Aspartat und neun ein Glutamat auf. Diese Aminosäuren sind hier also möglich, allerdings treten sie in P1 seltener auf als in anderen Positionen, die ebenfalls weder Anker noch Hilfsanker sind. Ähnliches gilt auch für eine bevorzugte Bindung aromatischer Aminosäuren in P1 und P3 (Ruppert et al., 1993). Unter den natürlichen Liganden treten einige dieser Reste hier etwas häufiger auf als in P4 bis $P\Omega - 1$; sie erfüllen die Hilfsankerkriterien jedoch bei weitem nicht.

Peptidmotive, die entweder auf Bindungsstudien oder im Gegensatz dazu auf der Analyse natürlicher Liganden beruhen, können sich also deutlich unterscheiden. Dies wurde schon in vielen vergleichenden Studien beobachtet (Davenport et al., 1997; Matsumura et al., 1992; Seeger et al., 1999). Allein eine gute Bindung eines Peptids an ein HLA-Molekül genügt nicht für eine Präsentation auf der Zelloberfläche, da hier auch die verschiedenen Schritte der Antigenprozessierung – proteolytische Aktivitäten und Spezifitäten sowie Präferenzen beim Transport – eine wichtige Rolle spielen.

3.1.2. HLA-A*0301

HLA-A*0301 ist das dritthäufigste HLA-Allel innerhalb der kaukasischen Bevölkerung. Bei der Aufstellung des Peptidmotivs wurden 106 feintypisierte HLA-A*0301-Liganden – vor allem aus der Zelllinie HO301 – verwendet. Daneben wurden weitere 177 zweistellig typisierte Liganden verschiedener *Sources* – meist RCCs – berücksichtigt, da die Aminosäureverteilungen beider Fraktionen fast identisch sind. Insgesamt waren 53% der Peptide Nonamere und 30% Dekamere. Dieser große Anteil an Dekameren und die Tatsache, dass sich die Längenvarianten in der Aminosäureverteilung merklich unterscheiden, machen individuelle Motive für Nonamere und Dekamere erforderlich.

Sowohl Nonamere als auch Dekamere besitzen einen hydrophoben Anker in P2, der von Leucin und Valin mit je ca. 30% gleichermaßen dominiert wird. Daneben kommen auch Isoleucin und Threonin vor und mit einigem Abstand weitere Aminosäuren, die aber nie mehr als 5% beitragen. Tasche B ist also hydrophob wie bei HLA-A*02, allerdings ist Leucin weniger häufig anzutreffen. Dafür kommt vermehrt das etwas kleinere Valin vor. Dies lässt sich anhand der durch mehrere Aminosäureaustausche veränderten Taschenstruktur erklären. Insbesondere das kleine Gly₆₆ wird durch das voluminösere Glutamin ersetzt,

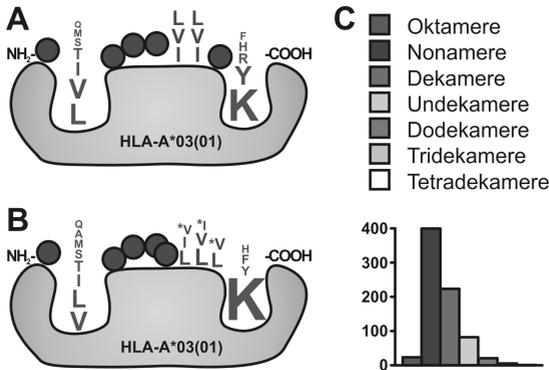


Abbildung 3.2.: Peptidmotiv von HLA-A*03. Peptidmotive von HLA-A*02(01) basierend auf Nonameren (A) und Dekameren (B), sowie die Peptidlängenverteilung (C). Das * zeigt an, dass es sich bei dieser Gruppe nicht um einen Hilfsanker handelt. Sie ist nur zum Vergleich dargestellt.

was den verfügbaren Raum einschränkt. Die Positionen 9 und 99 sind allerdings unverändert.

Die C-terminale Ankerposition zeigt eine starke Präferenz für Lysin, die bei den längeren Peptiden mit 75% stärker ausgeprägt ist als bei Nonameren mit 53%. Dementsprechend gibt es unterschiedliche Vorkommen des aromatischen Tyrosins, das bei Nonameren mit 27% weiter verbreitet ist als bei Dekameren mit nur noch 7%. Daneben kommen in fast vernachlässigbaren Häufigkeiten weitere aromatische Reste wie Phenylalanin und basische Reste wie Arginin und Histidin vor. Die Präferenz für basische Aminosäuren ergibt sich aus dem sauren Triplet Asp₇₄-Asp₇₇-Asp₁₁₆. Außerdem erlaubt Asp₁₁₆ im Gegensatz zu Tyr₁₁₆ bei HLA-A*02 die Aufnahme voluminöser Seitenketten wie beispielsweise der von Tyrosin.

Bei den Nonameren gibt es außerdem zwei hydrophobe Hilfsanker mit Leucin, Isoleucin und Valin in P6 und P7. Allerdings überschreitet P6 die 50%-Schwelle nur knapp (52%). Dekamere zeigen keine Hilfsanker und auch keine Bevorzugung einzelner Aminosäuren. Allerdings ist der Anteil der Gruppe aus Leucin, Isoleucin und Valin in P7, P8 und P9 mit 36%, 44% und 31% deutlich stark erhöht. Das um eine Aminosäure verlängerte Zwischenstück des Peptids von P3 bis P9 wird also ganz unterschiedlich zwischen den beiden Ankerpositio-

nen verteilt, sodass die Hilfsankerpositionen der Nonamere quasi über mehrere Positionen „verschmiert“ werden – wie schon bei HLA-A*02.

P1 erfüllt die Kriterien für einen Hilfsanker weder bei Nonameren noch bei Dekameren. Allerdings kommen jeweils in etwa 40% der Liganden die basischen Aminosäuren Arginin oder Lysin vor. Saure Aminosäuren sind hier selten, aber nicht völlig ausgeschlossen. Diese Präferenz für basische Reste resultiert aus der negativen Nettoladung der Tasche A, die P1 aufnimmt.

In der Literatur sind sowohl Poolsequenzierungen als auch Sequenzierungen einzelner HLA-A*03-Liganden durch Edman-Abbau beschrieben (DiBrino et al., 1993; Kubo et al., 1994; Maier et al., 1994). Dabei gibt es nur leichte Unterschiede zum Peptidmotiv aus Abbildung 3.2. Bei dem auf 283 natürlichen Liganden basierenden Motiv dominiert im Gegensatz zu DiBrino et al. (1993) nicht Tyrosin, sondern Lysin den C-Terminus. Außerdem stellt Phenylalanin in P3 keinen Hilfsanker dar, wengleich es hier mit 20% häufiger vorkommt als in anderen Positionen. Maier et al. (1994) konnten in P Ω vor allem Lysin, danach Tyrosin und außerdem Phenylalanin beobachten. Kubo et al. (1994) berichten ebenfalls von einer starken Lysin-Häufung. Auch bei den durch MALDI- oder ESI-Massenspektrometrie sequenzierten Peptiden (Hofmann et al., 2005; Krüger et al., 2005) dominieren basische Aminosäuren, vor allem Lysin, am C-Terminus. Insgesamt zeigen also alle Ansätze grundsätzlich ähnliche Peptid-motive.

3.1.3. HLA-A*6601

52 HLA-A*6601-Liganden wurden aus der mit HLA-A*6601 transfizierten Zelllinie LCL721.221, die keine endogene HLA-Expression mehr aufweist, extrahiert und sequenziert. Darunter sind 23 Nonamere und 24 Dekamere, was eine sehr auffällige Längenverteilung darstellt. Die Unterschiede zwischen beiden Längen schlagen sich aber nur unwesentlich im Peptidmotiv nieder, zumal für beide alleine nicht genügend HLA-Liganden bekannt sind, um von kleineren beobachteten Unterschieden der Aminosäurehäufigkeiten auf verschiedene Motive schließen zu können. Daher berücksichtigt Abbildung 3.3 bei den dargestellten Häufigkeiten Peptide aller Längen und deutet Dekamere durch die zusätzliche, heller abgehobene Aminosäure an.

Die Position P1 des Peptids bildet einen ausgeprägten Hilfsanker. Aspartat ist in mehr als der Hälfte aller Liganden zu finden und erfüllt damit schon alleine das Kriterium für einen Hilfsanker. Dazu passt auch die Häufung des ebenfalls sauren, aber etwas größeren Glutamats an dieser Stelle.

Unter den Resten der HLA- α -Kette, die Tasche A bilden, sind zwei Arginine

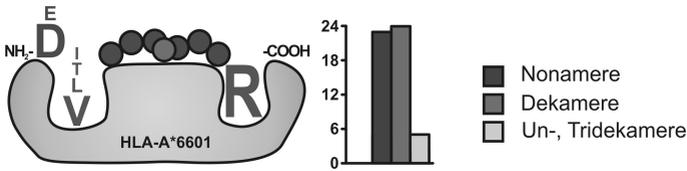


Abbildung 3.3.: Peptidmotiv von HLA-A*6601. Das Peptidmotiv ist für Nona- und Dekamere gleichzeitig dargestellt, wie die zusätzliche, heller abgehobene Aminosäure symbolisiert. Zudem ist die Peptidlängenverteilung dargestellt, wobei alle Peptide mit mehr als zehn Aminosäuren zusammengefasst sind.

(Arg₆₂ und Arg₁₆₃), jedoch keine sauren Aminosäuren. Hier kommt also eine positive Nettoladung der Tasche zustande, die die starke Bevorzugung saurer Reste erklärt. Interessanterweise sind alle Positionen, die zu Tasche A beitragen, in HLA-A*6601 und den Subtypen von HLA-A*26 identisch. Trotzdem sind die Präferenzen für Aspartat und Glutamat sehr unterschiedlich (siehe Seite 75).

Die Ankerposition in P2 wird von den hydrophoben aliphatischen Aminosäuren Isoleucin, Leucin, Threonin und vor allem Valin dominiert. Wie bei allen HLA-A-Molekülen hat Tasche B auch bei HLA-A*6601 einen hydrophoben Charakter. Die Tyrosine in den Positionen 9 und 99 des HLA-Moleküls beschränken den in Tasche B für die Seitenketten verfügbaren Platz, sodass meist nur kurzkettige aliphatische Aminosäuren wie Valin und Threonin vorkommen. Lediglich das etwas längere Leucin wird noch toleriert.

Der C-Terminus ist in fast allen Liganden mit Arginin besetzt. Daneben wurde in ganz seltenen Fällen das ebenfalls positiv geladene Lysin beobachtet. HLA-A*6601 ist ein typischer Vertreter der HLA-Moleküle mit einer Bevorzugung für einen basischen C-Terminus. Voraussetzung hierfür sind wie bei HLA-A*03 drei saure Aspartatreste in den Positionen 74, 77 und 116 (Rötzschke et al., 1994). Die Größe der erlaubten Reste in Tasche F wird vor allem durch Position 116 vorgegeben. Das Aspartat lässt bei HLA-A*6601 das sperrige Arginin zu, während beispielsweise bei HLA-A*02 das Tyr₁₁₆ kleinere Reste wie Valin und Leucin erforderlich macht (siehe Seite 67).

Diese Ergebnisse zeigen eine hohe Übereinstimmung mit bisher publizierten Motiven aus Poolsequenzierungen und einigen Liganden (Seeger et al., 1999). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei dieser Liganden (DTIEIITDR, ELPIVTPALR, EVAQLIQGGR) wieder gefunden. Allerdings ist Glutamat in P1 erheblich häufiger als Aspartat. In P2 kommen zusätzlich zu Threonin und

Valin auch Isoleucin und Leucin vor, Valin ist jedoch mit Abstand am häufigsten. Auch ist der Anteil an Dekameren erheblich höher als bei aus Poolsequenzierungen ersichtlich.

Das Peptidmotiv ist schließlich auch eine Erklärung dafür, dass drei der 52 HLA-A*6601-Liganden auch auf HLA-A*68 und einer auch auf HLA-A*3101 gefunden wurde. Alle drei Peptidmotive weisen einen kleinen, hydrophoben Anker in P2 und einen basischen Anker am C-Terminus auf. Mit diesen drei sowie mit weiteren HLA-Allelen wie HLA-A*03 und -A*11 gehört HLA-A*6601 aufgrund des Peptidmotivs zum HLA-A3-Supertyp.

3.1.4. HLA-A*2601, -A*2602, -A*2603

Die Subtypen von HLA-A*26 kommen vor allem in Asien vor. Die Peptidmotive von HLA-A*2601, -A*2602 und -A*2603 wurden basierend auf 32, 57 bzw. 53 natürlichen Liganden definiert. Diese wurden aus einer B-LCL (MGAR, HLA-A*2601) sowie mit HLA-A*2602 oder -A*2603 transfizierten C1R-Zellen isoliert. Dabei ergab sich bei den aus MGAR extrahierten Liganden das Problem, dass diese Zellen außerdem noch HLA-B*0801 exprimieren. Die Ankerpositionen für dieses Allel befinden sich nicht in P2 und P Ω der Peptide, sondern in P3, P5 und P Ω , wobei in P3 und P5 basische Reste dominieren. Um jegliche Falschzuordnung auszuschließen, wurden daher solche Peptide nicht zugeordnet, die eigentlich bezüglich P2 und P Ω dem Motiv von HLA-A*2601 entsprachen, aber basische Reste in P3 und/ oder P5 aufwiesen. Daher waren hier beim Aufstellen des Peptidmotivs einige Liganden weniger verfügbar als bei den anderen beiden Allelen. Außerdem gab es noch 86 weitere, nur zweistellig typisierte HLA-A*26-Liganden vor allem aus primären Tumorgeweben. Diese wurden jedoch wegen unbekannter Subtypen ebenfalls nicht berücksichtigt.

Da bei allen drei HLA-A*26-Subtypen unter den Liganden neben etwa 60% Nonameren auch mindestens ein Viertel – also überdurchschnittlich viele – Dekamere identifiziert wurden, sind bei den Peptidmotiven die Dekamere explizit berücksichtigt, wie die heller abgehobene Aminosäure verdeutlicht (Abbildung 3.4).

Alle drei Peptidmotive sind sich bis auf den C-Terminus überaus ähnlich. In P1 zeigen alle einen sauren Hilfsanker, der vor allem von Glutamat dominiert wird. Er spielt bei der Wechselwirkung der HLA-A*26-Moleküle mit ihren Liganden eine sehr wichtige Rolle (Dumrese et al., 1998; Yamada et al., 1999). Wie bei HLA-A*6601 führt die positive Nettoladung der Tasche A durch zwei Arginine in den Positionen 62 und 163 zur Präferenz für saure, negativ geladene Reste in P1.

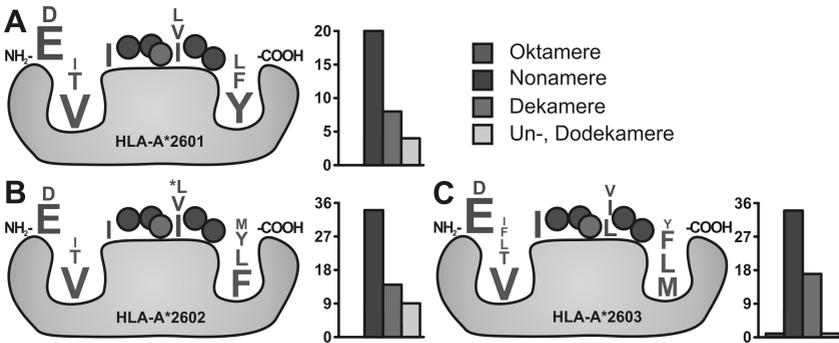


Abbildung 3.4.: Peptidmotive des HLA-A26-Supertyps. Die Peptidmotive und -längenverteilungen von HLA-A*2601, -A*2602 und -A*2603 sind dargestellt. Dabei wurden jeweils alle bekannten Liganden berücksichtigt. Die zusätzliche, heller abgehobene Aminosäure symbolisiert insbesondere die Dekamere.

Der in Tasche B hineinragende Anker in P2 ist hydrophob und wird durch Tyr₉₉ in seiner Größe eingeschränkt, sodass hier eher kurzketzige aliphatische Aminosäuren wie Isoleucin, Threonin und besonders Valin vorkommen. In P3 zeigt sich eine Bevorzugung von Isoleucin, das jedoch nicht die Kriterien für einen Hilfsanker erfüllt. Insbesondere bei HLA-A*2602 sind die Erfordernisse für eine Bevorzugung (>30%) bei den Nonameren nur knapp, über alle Peptidlängen betrachtet hingegen gar nicht erfüllt (26%). Bei den anderen beiden Subtypen ist dieses Merkmal deutlicher ausgeprägt. Ein echter Hilfsanker findet sich jedoch in P Ω -3 (also P6 bei Nonameren und P7 bei Dekameren), der von der Gruppe Valin, Leucin, Isoleucin gebildet wird. Dabei lassen sich auch hier geringfügige Unterschiede in den Häufigkeiten dieser Reste zwischen den drei Subtypen feststellen.

Die größten Unterschiede zwischen den drei HLA-A*26-Subtypen zeigen sich beim C-terminalen Anker. Zwar kommen in allen Fällen die hydrophoben Aminosäuren Phenylalanin und Leucin vor, sie werden jedoch bei HLA-A*2601 durch Tyrosin zur ankerbildenden Gruppe ergänzt und bei HLA-A*2603 vor allem durch Methionin. Bei HLA-A*2602 treten sowohl Tyrosin als auch Methionin oft auf. Allerdings sind die Häufigkeiten dieser Aminosäuren sehr unterschiedlich. Während bei HLA-A*2601 Tyrosin mit einer Häufigkeit von 60% dominiert, treten bei HLA-A*2603 Leucin und Methionin mit jeweils 30% glei-

3. Ergebnisse und Diskussion

chermaßen auf. Bei HLA-A*2602 hingegen sind die häufigsten Aminosäuren am C-Terminus von Nonameren Tyrosin und Phenylalanin, die jeweils etwa 30% ausmachen. Berücksichtigt man Peptide aller Längen, steigt die Häufigkeit von Phenylalanin bei zunehmender Peptidlänge nochmals auf Kosten des Tyrosins deutlich an (45% und 18%). Diese Tendenz der Zunahme von C-terminalem Phenylalanin, wenn man nicht nur Nonamere, sondern alle Peptide berücksichtigt, ist im Übrigen auch bei den anderen beiden Subtypen zu beobachten. Allerdings reichen die Ligandenzahlen in keinem Fall aus, um diese Tendenz auch statistisch zu untermauern.

Die Unterschiede in $P\Omega$ zwischen den drei Subtypen lassen sich durch Betrachtung der Aminosäurezusammensetzung von Tasche F erklären. Zwischen HLA-A*2601 und -A*2602 gibt es nur einen Austausch in Position 116: Statt des Aspartats schränkt hier das etwas sperrigere Asparagin den verfügbaren Platz stärker ein, sodass Phenylalanin, das eine Hydroxylgruppe weniger hat, gegenüber Tyrosin bevorzugt wird. Bei HLA-A*2603 ist zwar wieder Aspartat in Position 116 zu finden, dafür sind jedoch im Vergleich mit den beiden anderen Subtypen die Positionen 74 (D→H), 76 (A→V) und 77 (N→D) verändert. Vor allem das Valin bei HLA-A*2603 ist sperriger und verkleinert somit das Volumen von Tasche F. Folglich wird vor allem das kleinere Methionin stärker bevorzugt.

Im Vergleich mit anderen HLA-Allelen ist ein interessanter Unterschied zu HLA-A*6601 in P1 zu finden. Diese bevorzugt hier wie die HLA-A*26-Subtypen saure Aminosäuren – das etwas kleinere Aspartat allerdings erheblich stärker als Glutamat. Dieser auffällige Unterschied in der Identität der sauren Aminosäure in P1 lässt sich nicht mit Resten der HLA- α -Kette erklären, für die bisher ein Beitrag zur Tasche A bekannt ist, da diese zwischen den HLA-A*26-Subtypen und HLA-A*6601 nicht polymorph sind. Auch die Reste, die in der benachbarten Tasche B allelspezifische Wechselwirkungen eingehen, sind bis auf den Austausch von Histidin gegen Glutamin in Position 77 nicht polymorph. Dafür sind die C-Termini der Peptidmotive extrem unterschiedlich: hydrophob bei HLA-A*26 und basisch bei HLA-A*6601. Möglicherweise wirkt sich dies auf die Struktur des gesamten Moleküls so aus, dass auch Tasche A davon beeinflusst wird. Alternativ könnten weitere Reste der HLA- α -Kette eine strukturelle Veränderung von Tasche A bewirken, die bisher nicht beschrieben ist. Am Beispiel von HLA-B*4402 und -B*4403 zeigt sich, dass der Austausch einer einzigen Aminosäure (156) des HLA-Moleküls genügt, um sowohl das Peptidrepertoire als auch die T-Zell-Erkennung zu verändern. Die Peptidrepertoires von HLA-B*4402 und -B*4403 zeigen allerdings eine deutliche Überlappung von 95%. Dieser Austausch von Aspartat in HLA-B*4402 gegen Leucin in HLA-B*4403

führt zu einer strukturellen Veränderung, sodass die Bindungsfurche weiter wird (Macdonald et al., 2003).

Bindungsstudien mit allen drei HLA-A*26-Subtypen weisen nach, dass ein ansonsten identisches Peptid eine höhere Affinität besitzt, wenn es mit Glutamat statt Aspartat beginnt (Yamada et al., 1999). Die natürlichen Liganden hingegen zeigen ein umgekehrtes Bild. Diese Tatsache weist darauf hin, dass die Ursachen für die unterschiedliche Bevorzugung nicht allein in einer unterschiedlichen Affinität liegen. Möglicherweise könnte der Grund auch in einer unterschiedlichen Antigenprozessierungsmaschinerie der verschiedenen Zelllinien zu suchen sein. Allerdings wurden bei den HLA-A*26-Subtypen drei verschiedene Zelllinien verwendet, die alle übereinstimmende Präferenzen in P1 aufweisen, was diese Option weniger wahrscheinlich macht. Abschließend kann diese Frage hier jedoch nicht beantwortet werden.

Insgesamt sind sich HLA-A*26 und HLA-A*6601 sehr ähnlich. Nur vier Positionen, die die Taschen B (70), D (70), C (74) und F (70, 74, 76, 77) beeinflussen, sind polymorph. Wie bereits erwähnt, bietet dies für die Unterschiede in P1 keine Erklärung. Vergleicht man P3, die in Tasche D hineinragt, fällt auch bei HLA-A*6601 eine Häufung von Isoleucin auf, die allerdings bei unter 30% liegt und durch den Austausch von Histidin gegen Glutamin anscheinend kaum beeinflusst wird. Ähnlich liegt der Fall bei dem Hilfsanker in P Ω - 3, bei dem HLA-A*6601 auch nur knapp unter der erforderlichen Häufigkeit bleibt. Deutlich anders ist die Situation jedoch bei P Ω . Während HLA-A*6601 drei Aspartate in den Positionen 74, 76 und 116 aufweist, kommen die HLA-A*26-Subtypen hier auf maximal zwei. Dies erklärt, warum der C-terminale Anker bei HLA-A*6601 basisch ist, bei HLA-A*26 jedoch hydrophob.

Die hier beschriebenen, anhand einer Vielzahl natürlicher Liganden aufgestellten Peptidmotive stimmen weitgehend mit den publizierten Motiven, die auf Poolsequenzierungen und einigen wenigen Liganden basieren, überein (Dumrese et al., 1998) und erfassen auch bekannte T-Zell-Epitope (Koga et al., 2003).

3.1.5. HLA-B*3801, -B*3901, -B*3902

Aus mit dem entsprechenden Allel transfizierten C1R-Zellen wurden 57 HLA-B*3801-, 102 -B*3901- sowie 51 -B*3902-Liganden isoliert und identifiziert. Außerdem wurden in einigen Tumorgeweben und Zelllinien weitere 43 Peptide von HLA-B*38 charakterisiert. Aufgrund der übereinstimmenden Aminosäurehäufigkeiten wurden diese ebenfalls beim Aufstellen des HLA-B*3801-Motivs verwendet, obwohl die entsprechenden *Sources* nicht vierstellig typisiert waren.

3. Ergebnisse und Diskussion

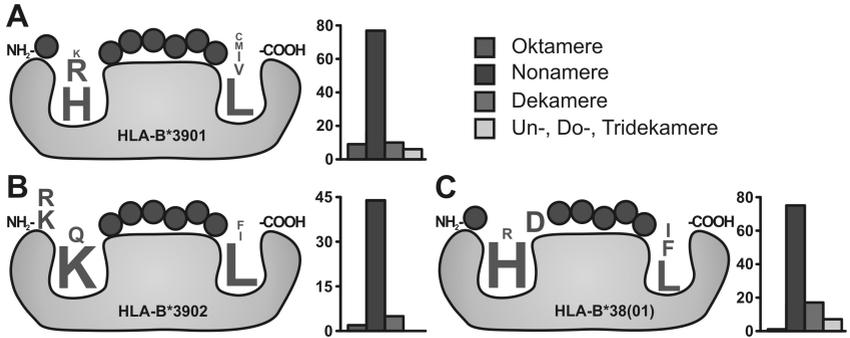


Abbildung 3.5.: Peptidmotive des HLA-B39-Supertyps. Die Peptidmotive und -längenverteilungen von HLA-B*3901, -B*3902 und -B*38(01) sind dargestellt. Dabei wurden in allen Fällen nur Nonamere berücksichtigt.

HLA-B*3801-präsentierte Peptide zeigen zumeist einen basischen Anker in P2, der vor allem von Histidin (85%) und erheblich seltener von Arginin (11%) gebildet wird. P Ω ist dagegen hydrophob und vor allem durch Leucin, aber auch Phenylalanin und Isoleucin besetzt. Eine besondere Bevorzugung von Aspartat weist P3 auf (32%). Es erreicht jedoch nicht die Schwelle für einen Hilfsanker, selbst wenn man das ebenfalls saure Glutamat (10%) noch hinzu zählt. Auch für P1 konnten im Gegensatz zu HLA-A*6601 und den HLA-A*26-Subtypen keine Präferenzen festgestellt werden.

Die von HLA-B*3901 eluierten Peptide zeichnen sich ebenfalls durch basische Reste in P2 – vor allem Histidin (60%) und etwas seltener Arginin (35%) – sowie durch einen von Leucin deutlich dominierten hydrophoben Anker in P Ω aus.

HLA-B*3902-Liganden weisen in P2 außer dem besonders häufigen, basischen Lysin (77%) auch das neutrale, polare Glutamin (21%) auf, während die C-terminale Ankeraminosäure zumeist von Leucin (80%) gestellt wird. Außerdem hat dieses Allel einen basischen Hilfsanker in P1.

Ein Vergleich der drei Allele zeigt, dass das Peptidmotiv von HLA-B*3901 mehr dem von HLA-B*3801 ähnelt als dem des anderen HLA-B*39-Subtyps. Eine Betrachtung der Molekülstruktur macht dies nachvollziehbar. Nur zwei Positionen, die einen Beitrag zur Tasche B liefern, sind zwischen den drei Allelen polymorph: 63 und 67. Dabei sind Asn₆₃ und Cys₆₇ sowohl in HLA-B*3801 als auch -B*3901 vorhanden, während an diesen Stellen bei HLA-B*3902 Glutamat

und Serin vorkommen. Dies erklärt, warum sich die ersten beiden Allele so ähnlich sind. Die zusätzliche negative Ladung in Position 63 führt in Tasche A dazu, dass es keine Nettoladung gibt. Dies begründet plausibel, warum HLA-B*3902 hier einen basischen Hilfsanker hat und die anderen beiden Allele nicht.

Der basische Charakter von P2 wird bei allen drei Allelen durch das saure Glu₄₅ zusammen mit Cys₆₇ oder Ser₆₇ bedingt. Allerdings bestehen in P2 auch Unterschiede zwischen HLA-B*3801 und -B*3901. Während Histidin bei HLA-B*3801 in P2 85% ausmacht, sind dies bei HLA-B*3901 nur 60%. Eine Erklärung hierfür ist vermutlich außerhalb der Reste zu suchen, die direkt die Struktur der Taschen beeinflussen. Die Aminosäuren 82 und 83 sind zwischen beiden Allelen ausgetauscht. Dies wirkt sich möglicherweise indirekt auf Tasche B aus. So ist – wie bereits erwähnt – beispielsweise Position 156, die ebenfalls nicht direkt an einer Tasche beteiligt ist, zwischen HLA-B*4402 und HLA-B*4403 polymorph. Der Austausch bewirkt eine Veränderung in der Weite der Bindungsfurche, wodurch sich auch das Peptidrepertoire verändert.

HLA-B*3801 unterscheidet sich in P3 durch eine stärkere Bevorzugung von Aspartat von den beiden HLA-B*39-Subtypen. Dies lässt sich ebenfalls nicht mit den Positionen der HLA- α -Kette erklären, die die aufnehmende Tasche D bilden, da sie für alle drei Allele identisch sind.

Betrachtet man Tasche F, ist die Aminosäurezusammensetzung nun für die beiden HLA-B*39-Subtypen identisch, die sich in den Positionen 74, 77, 80 sowie 81 von HLA-B*3801 unterscheiden. Allen drei Allelen gemeinsam ist, dass Phe₁₁₆ den Zugang zur Tasche begrenzt, sodass vor allem aliphatische Reste bevorzugt werden – besonders Leucin. Die Austausche in den genannten Positionen haben jedoch zur Folge, dass daneben bei HLA-B*3801 auch Isoleucin und das aromatische Phenylalanin vorkommen.

Das Peptidmotiv von HLA-B*3801, -B*3901 und -B*3902 wurde bereits 1995 basierend auf Poolsequenzierungen sowie einigen wenigen HLA-B*3801 und -B*3901-Liganden aufgestellt (Falk et al., 1995b). Vier Jahre später wurden zehn weitere Peptide von HLA-B*3901 sequenziert (Yague et al., 1999). Für HLA-B*3902 waren bislang keine individuellen Peptidsequenzen bekannt. Die vorliegende Arbeit erlaubt also durch eine Vielzahl natürlicher Liganden eine weitergehende Beurteilung der Poolsequenzierungsmotive bzw. zeigt die ersten HLA-B*3902-Liganden. Sie füllt so eine weitere Lücke in unserem Kenntnisstand natürlicher Liganden und Peptidmotive. Es zeigt sich, dass die Motive beider Ansätze sehr gut übereinstimmen. Allerdings genügen P3, P5 und P6 bei keinem der Allele in den 50-100 natürlichen Liganden den Hilfsankerkriterien.

Lund et al. (2004) schlagen vor, HLA-B*3801 und -B*3901 zusammen mit einigen anderen Allelen statt im bis damals angenommenen HLA-B27- zum

HLA-B39-Supertyp zusammenzufassen, der durch eine Präferenz für Histidin in P2 charakterisiert wird. Das Repertoire natürlicher Liganden unterstützt diese neue Einordnung. HLA-B*3902 verbleibt jedoch im HLA-B27-Supertyp. Dies ist angesichts von über 50 Liganden, von denen kein einziger Arginin in P2 aufweist, allerdings nicht gerechtfertigt. HLA-B*3902 ist vielmehr in keinen der bisher postulierten Supertypen einzuordnen. Somit ist es entweder ein Ausreißer oder eröffnet sogar einen neuen Supertyp, der durch Lysin in P2 charakterisiert wird. Auch bei HLA-B*1503 (Prilliman et al., 1999) und -B*4801 (Martinez-Naves et al., 1997) nimmt Tasche B vor allem Lysin und Glutamin auf. Wahrscheinlich gehören hier auch HLA-B*3908 sowie -B*4802 und -B*4803 hin, die als einzige Allele neben HLA-B*3902, -B*1503 und -B*4801 die Kombination Glu₄₅-Glu₆₃-Ser₆₇ aufweisen. Ser₆₇ ist hierbei ausschlaggebend, da die HLA-B*27-Subtypen mit C₆₇ eine andere Spezifität, nämlich für Arginin in P2 aufweisen. Auch Glu₄₅ spielt eine wichtige Rolle, da Allele mit Met₄₅-Glu₆₃-Ser₆₇ wie HLA-B*1301, -B*1501 und -B*1512 ebenfalls Glutamin in P2 bevorzugen, allerdings keine positiv geladenen Reste zulassen.

3.1.6. Der HLA-B44-Supertyp

Dem HLA-B44-Supertyp werden neun HLA-Antigene zugeordnet, darunter einige der am häufigsten vorkommenden. So sind Subtypen von HLA-B*44 und -B*40 in allen ethnischen Populationen weit verbreitet (Cao et al., 2001). Mit Hilfe des Algorithmus von Schipper et al. (1996) kann die Abdeckung der Bevölkerung durch den HLA-B44-Supertyp berechnet werden (Schipper et al., 1996). Der Anteil derer, die mindestens ein Allel des Supertyps aufweisen, ist in der kaukasischen Bevölkerung mit 53,4% am höchsten und in der afroamerikanischen mit 37,5% am geringsten.

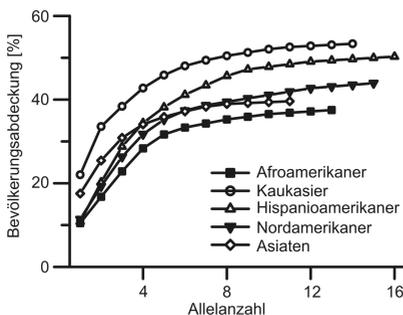


Abbildung 3.6.: Abdeckung der Bevölkerung durch den HLA-B44-Supertyp. Etwa die Hälfte der kaukasischen Population besitzt mindestens eines der neun Allele des HLA-B44-Supertyps. Dieser Anteil liegt in anderen Populationen zwischen 30 und 50%.

Die Peptidmotive aller neun HLA-Allotypen des HLA-B44-Supertyps wurden neu definiert oder verfeinert (Abbildung 3.7). Dazu wurden insgesamt 670 HLA-Liganden verwendet, die aus verschiedenen Zelllinien und Primärgeweben isoliert wurden. Im Allgemeinen bevorzugen die Mitglieder des Supertyps saure Aminosäuren – zumeist Glutamat – in der ersten Ankerposition (P2). Die zweite Ankerposition am C-Terminus (P Ω) kann von einer Vielzahl hydrophober Reste besetzt werden.

Bei genauerer Betrachtung der unterschiedlichen Allotypen zeigen sich jedoch bei den Peptidmotiven viele einzigartige Merkmale. Obwohl die meisten Mitglieder des Supertyps fast ausschließlich Liganden mit Glutamat in P2 präsentieren, bevorzugen HLA-B*37 und -B*4701 in dieser Position stattdessen Aspartat mit Häufigkeiten von 60% bzw. 95%. Noch stärker ausgeprägt sind die individuellen Unterschiede zwischen den Allotypen für P Ω . Während HLA-B*4101, -B*4501 und -B*5001 kleine Aminosäuren wie Alanin und Prolin bevorzugen, lassen HLA-B*1801 und -B*4402 hier vor allem aromatische Reste zu. Einen weiteren Beitrag zur Individualität leistet bei HLA-B*4901, -B*4001, -B*4701 und -B*37 die starke Präferenz von P Ω für Isoleucin, Leucin oder Phenylalanin.

Bei einigen Allotypen stellt P1 einen Hilfsanker dar. Dieser kann saure Eigenschaften besitzen wie bei HLA-B*1801 oder basisch sein wie im Fall von HLA-B*4101 und -B*4701. Bei HLA-B*4402-Liganden verschiedenster Längen stellt diese Position zwar keinen Hilfsanker dar, wird jedoch mit 46% Alanin, 28% Glutamat und 26% Serin von wenigen, allerdings recht unterschiedlichen Aminosäuren dominiert.

HLA-B*4701 weist als einziges Mitglied des HLA-B44-Supertyps einen basischen Hilfsanker in P Ω – 1 auf, der Aminosäure, die dem C-Terminus unmittelbar vorausgeht. Des Weiteren bevorzugen HLA-B*37 und -B*4701 Leucin in P3. HLA-B*37-Liganden haben außerdem häufig ein Arginin in P5, HLA-B*4701-Liganden ein weiteres Leucin. Einen hydrophoben Hilfsanker in P7 bilden Valin, Leucin und Isoleucin im Fall von HLA-B*4001.

Zusätzlich zu der auf Aminosäurehäufigkeiten basierenden Individualität unterscheiden sich auch die Verteilungen der Ligandenlängen bei den verschiedenen Allotypen zum Teil deutlich. So bevorzugen HLA-B*1801 und -B*37 Oktamere auf Kosten der Nonamere, während längere Peptide im Repertoire von HLA-B*4001 und -B*4402 dominieren.

Die Unterschiede der Peptidmotive innerhalb des HLA-B44-Supertyps können teilweise anhand der Taschenstruktur erklärt werden (Tabelle 3.1). Auffällig sind diese Unterschiede beispielsweise bei den in P1 vorkommenden Aminosäuren. So dominieren hier bei HLA-B*1801 saure Aminosäuren, und Arginin

kommt nicht vor. HLA-B*4701 hingegen schließt an dieser Stelle die sauren Reste aus (wie auch HLA-B*37, -B*4001, -B*4101, -B*4901 und -B*5001) und bevorzugt Arginin. Im Fall von HLA-B*4101 kann neben Arginin auch das ebenfalls basische Lysin auftreten.

Betrachtet man die Taschenstruktur, kann die Häufung von Glutamat und Aspartat in P1 bei HLA-B*1801 mit der positiven Nettoladung der Tasche A erklärt werden, die durch das basische His₁₇₁ der HLA- α -Kette verursacht wird. Bei allen anderen Supertyp-Allelen hingegen ist Tasche A negativ geladen; die Toleranz gegenüber sauren Seitenketten ist jedoch recht unterschiedlich.

Die Aminosäure in Position 45 der HLA- α -Kette ist für die Polarität der Tasche B und somit auch von P2 des Peptids verantwortlich. In den meisten Fällen bildet sich zwischen einem sauren Rest in P2 (Glutamat oder Aspartat) und dem basischen Lysin₄₅ eine Salzbrücke aus. Nur bei HLA-B*1801 und -B*37 ist das Lysin durch ein Threonin ersetzt. Außerdem führen Geometrie und Zusammensetzung der Tasche möglicherweise dazu, dass His₉ besonders wichtig wird, da es mit der Carboxylgruppe der sauren Seitenketten in P2 wechselwirken kann (Thorpe und Travers, 1994; Zhang et al., 1998). Bei HLA-B*4402 und -B*4403 bildet Tyr₉ eine Wasserstoffbrücke zum Glutamat in P2 (Macdonald et al., 2003).

Die unterschiedlichen Vorlieben für Glutamat oder das etwas kleinere Aspartat können zum Teil mit den Aminosäuren 9 und 99 der HLA- α -Kette erklärt werden. Diese schränken die Größe der Seitenketten ein, die in Tasche B hineinragen dürfen. Bei HLA-B*4701, das Aspartat in P2 bevorzugt, ist das übliche His₉ durch das beträchtlich größere Tyrosin ersetzt. Dadurch wird Glutamat aus der Tasche ausgeschlossen. Andererseits besitzt auch HLA-B*4402 ein Tyr₉, zeigt aber keinerlei Präferenz für Aspartat. In beiden Allelen, die Aspartat bevorzugen, ist das übliche Tyr₉₉ durch Serin oder Phenylalanin ersetzt. Beide Aminosäuren sind allerdings kleiner als Tyrosin und nicht größer, wie zu erwarten gewesen wäre. Daher scheint zwar ein Zusammenhang zwischen dem Austausch in Position 99 und den veränderten Vorlieben in P2 zu bestehen, eine hinreichende Erklärung bietet dieser Austausch aber nicht.

Die Aminosäuren 77, 81, 95 und 116 tragen zur Struktur von Tasche F bei und sind daher entscheidend für die Charakteristiken von P Ω . Die Größe der hydrophoben Seitenketten am C-Terminus des Peptids wird stark durch die Positionen 81, 95 und 116 der HLA- α -Kette beeinflusst. Trp₉₅ (HLA-B*4101, -B*4501, -B*4901, -B*5001) sowie Tyr₁₁₆ (HLA-B*4001, -B*4101) scheinen aromatische Aminosäuren aufgrund ihrer Größe aus Tasche F auszuschließen. Phenylalanin₁₁₆ toleriert Phenylalanin am C-Terminus des Peptids, das weniger Platz braucht als Tyrosin (HLA-B*37). Das kleine Ser₁₁₆ von HLA-B*1801

3. Ergebnisse und Diskussion

erlaubt aromatische Ankeraminosäuren und bevorzugt dabei Tyrosin stärker als alle anderen Supertyp-Mitglieder, da die Hydroxylgruppen von Serin und Tyrosin wechselwirken können. Mit einem Asp₁₁₆ (HLA-B*4402) sind alle aromatischen Seitenketten erlaubt und zum Teil sogar stark bevorzugt. Sie sind jedoch nicht obligatorisch, wie die ausgeprägte Vorliebe von HLA-B*4701 für Leucin zeigt. Die Kombination von Leu₈₁ mit Trp₉₅ und Tyr₁₁₆ oder Leu₁₁₆ verengt Tasche F aufgrund der voluminösen, hydrophoben Seitenketten. Dies erklärt die Bevorzugung von kleinen Resten wie Alanin und Prolin bei Liganden von HLA-B*4101, -B*4501 und -B*5001.

Tabelle 3.1.: Die Taschenstruktur der HLA-B44-Supertyp-Allele.

	Tasche A			Tasche B			Tasche F		
	P1			P2			PΩ		
	63	163	171	9	45	99	81	95	116
B*1801	N	T	H	H	T	Y	L	L	S
	D E			E			Y F		
B*37	E	T	Y	H	T	S	L	I	F
	nicht D E			E D			L F		
B*4001	E	E	Y	H	K	Y	L	L	Y
	nicht D E			E			L		
B*4101	E	T	Y	H	K	Y	L	W	Y
	nicht D E			E			P A		
B*4402	E	L	Y	Y	K	Y	A	I	D
				E			Y W F		
B*4501	E	L	Y	H	K	Y	L	W	L
				E			A P		
B*4701	E	E	Y	Y	K	F	L	L	D
	R			D			L		
B*4901	E	L	Y	H	K	Y	A	W	L
	nicht D E			E			V I		
B*5001	E	L	Y	H	K	Y	L	W	L
	nicht D E			E			A		

Der HLA-B44-Supertyp wurde bislang vor allem basierend auf Poolsequenzierungen³, HLA-Bindungsstudien oder strukturellen Merkmalen der HLA-Mo-

³<http://www.syfpeithi.de>

leküle definiert. Die vorliegende Arbeit überprüft nun diese Definition und charakterisiert den Supertyp noch detaillierter anhand von 670 HLA-Liganden. Dies erlaubt zugleich das Aufstellen neuer sowie die Überarbeitung bereits etablierter Peptidmotive aller neun Antigene des HLA-B44-Supertyps.

Hickman et al. (2004) haben bereits HLA-B*1801 untersucht und 200 natürliche Liganden beschrieben, die von löslichen, in LCL721.221 transfizierten HLA-Molekülen extrahiert wurden. Die vorliegende Arbeit trägt weitere 121 Liganden von soliden Tumor- und Normalgeweben bei. Trotz der unterschiedlichen Methoden zur Gewinnung der HLA-Liganden liefern beide Ansätze ähnliche Peptidmotive (Hickman et al., 2004). Bei Liganden von löslichen HLA-Molekülen ist die Verwendung von Aminosäuren in den Ankerpositionen zwar etwas weniger eingeschränkt. Beispielsweise kommen in Tasche B außer Glutamat und Aspartat noch elf andere Aminosäuren vor, sogar einige basische. Da diese untypischen Reste aber nur in wenigen Liganden von löslichen HLA-Molekülen vorliegen, sind die aus beiden Ansätzen abgeleiteten Motive recht ähnlich.

Im Gegensatz dazu wurden jedoch einige Unterschiede zu HLA-Peptid-Bindungsstudien (Sidney et al., 2003) beobachtet, in denen Glycin als am C-terminalen Anker bevorzugte Aminosäure auftritt. Hingegen weist kein einziger der 121 in dieser Arbeit vorgestellten HLA-Liganden ein Glycin in P Ω auf. Auch unter 200 von Hickman et al. (2004) beschriebenen Peptiden haben nur zwei Glycin an dieser Stelle. Folglich bindet HLA-B*1801 Peptide mit C-terminalem Glycin zwar möglicherweise. Bei natürlichen Liganden kommen jedoch auch Spezifitäten des Proteasoms und des TAP-Transporters zum Tragen, die die Charakteristiken der tatsächlich an der Oberfläche präsentierten Peptide beeinflussen. In HLA-Peptid-Bindungsstudien sind diese Informationen hingegen nicht zugänglich.

Die in dieser Arbeit mit Hilfe natürlicher Liganden charakterisierten Peptidmotive von HLA-B*37, -B*4001 und -B*4402, stimmen weitgehend mit den bisher bekannten Motiven aus Poolsequenzierungen überein (DiBrino et al., 1995; Falk et al., 1993, 1995a; Fleischhauer et al., 1994; Harris et al., 1993; Lemmel et al., 2004; Macdonald et al., 2003). Im Gegensatz zu Poolsequenzierungen können jedoch mit Hilfe der Massenspektrometrie Oktamere und Nonamere unterschieden werden. Bei HLA-B*37 ist beispielsweise der bisher beschriebene Hilfsanker in P5 (Isoleucin, Valin) nur für Oktamere gültig, für die auch ein neuer Hilfsanker in P4 (Isoleucin, Leucin) gefunden wurde. Auch für Nonamere konnte ein Hilfsanker definiert werden, der allerdings nicht hydrophob sondern eher basisch ist. Die Massenspektrometrie erlaubt also für HLA-B*37 eine individuelle Charakterisierung verschieden langer Liganden, deren Peptidmotive

in diesem Fall recht unterschiedlich sind.

Von HLA-B*4501 waren bisher nur vier Epitope und 15 natürliche Liganden, aber kein Peptidmotiv bekannt (⁴; Koelle et al., 2001; Schneider et al., 1998; Krüger et al., 2005). Dieses konnte nun anhand vieler natürlicher Liganden definiert werden. Bindungsstudien von Sidney et al. (2003) haben ebenfalls eine Vorliebe von HLA-B*4501 für kleine Aminosäuren am C-Terminus gezeigt. Allerdings wurde Prolin als in P Ω nicht erlaubter Rest beschrieben, das in der vorliegenden Arbeit jedoch bei 35% der Liganden festgestellt wurde. Dies offenbart erneut die großen Unterschiede zwischen Bindungsstudien, die die *a priori* bestehende Möglichkeit der Bindung zeigen können, und der *ex vivo* Analyse natürlicher Liganden, die alle Schritte der Antigenprozessierung automatisch einbezieht. In der Regel werden bei Bindungsstudien mehr verschiedene Aminosäuren in einer Position beobachtet als bei der Ligandenanalyse. Der Fall des C-terminalen Prolins bei HLA-B*4501-Liganden bildet davon jedoch eine Ausnahme.

Für HLA-B*4101, -B*4701, -B*4901 und -*5001 waren bis jetzt noch keinerlei Ligandenspezifitäten bekannt. Die in dieser Arbeit beschriebenen natürlichen Liganden und Peptidmotive schließen also bislang vorhandene Wissenslücken bezüglich des HLA-B44-Supertyps.

HLA-A*29 kann dem HLA-B44-Supertyp nicht zugeordnet werden, obwohl einige Liganden mit Glutamat in P2 beschrieben wurden (Boisgerault et al., 1996). Sie wurden jedoch aus der Zelllinie Sweig isoliert, die sowohl HLA-A*2902 als auch HLA-B*4002 exprimiert. Die Depletion von HLA-B- und -C-Molekülen mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers vor der Anwendung des HLA-A,-B,-C-spezifischen Antikörpers W6/32 war sehr wahrscheinlich unvollständig und führte zur Bindung von HLA-B*4002-Liganden an W6/32. HLA-A*29 hat jedoch eine Vorliebe für Tyrosin und Phenylalanin in P2 und für Tyrosin in P9 (Krüger et al., 2005 und nicht publizierte Daten).

Es konnte gezeigt werden, dass die Gruppierung von HLA-B*18, -B*37, -B*40, -B*41, -B*44, -B*45, -B*47, -B*49 und -B*50 zu einem HLA-Supertyp gerechtfertigt ist. Alle Allele weisen einen sauren Anker in P2 und einen hydrophoben Anker in P Ω auf. Dennoch existiert eine Vielzahl allelspezifischer Merkmale bezüglich dieser Ankerpositionen, die zur Individualität jedes einzelnen Supertypmitglieds beitragen. So gibt es zwei Moleküle, HLA-B*37 und -B*4701, die an Stelle von Glutamat Aspartat in P2 bevorzugen – und dies in unterschiedlichem Maße. Auch anhand der Vorlieben für P Ω kann der Supertyp weiter unterteilt werden. Während HLA-B*1801 und -B*4402 eine Präferenz

⁴<http://www.hiv.lanl.gov/>

für große, aromatische Aminosäuren zeigen, ziehen HLA-B*4101, -B*4501 und -B*5001 sehr kleine Reste vor. All diese allelspezifischen Eigenschaften der primären und sekundären Anker sowie der Peptidlängenverteilung führen dazu, dass die Peptidrepertoires verschiedener Allotypen des gleichen Supertyps sich nur minimal überlappen.

3.1.7. Der Einfluss des Proteasoms auf das Motiv

Tabelle 3.2.: Zelllinien für den Vergleich von Proteasomaktivitäten. Für jede Zelllinie sind das HLA-Allel und die Anzahl bekannter Liganden mit der zugehörigen Aminosäureverteilung in PΩ angegeben: jeweils die drei häufigsten Aminosäuren und deren Häufigkeiten.

Zelllinie	HLA	PΩ							
		Liganden	AS1	%	AS2	%	AS3	%	
MGAR	A*2601	32	Y	53,1	F	21,9	L	18,8	
C1R-A*2602	A*2602	57	F	45,6	L	22,8	Y	17,5	
C1R-A*2603	A*2603	53	M	28,3	L	28,3	F	26,4	
C1R-B*3801	B*3801	57	L	52,6	F	28,1	I	12,3	
C1R-B*3901	B*3901	102	L	71,6	V	9,8	I	6,9	
C1R-B*3902	B*3902	51	L	78,4	I	7,8	F, V	5,9	
HO301	A*0301	91	K	63,7	Y	25,3	H	4,4	
EMJ	A*0301 ^a	283	K	64,9	Y	17,5	R	5,6	
EMJ	B*4001	40	L	92,5	I	5,0	F	2,5	
WIL-JON	B*4101	16	A	50,0	P	25,0	C	12,5	
BM15	B*4901	164	I	54,3	V	30,5	L	11,6	
Awells	B*4402	92	Y	39,1	F	31,5	W	17,4	

^a Da von EMJ noch keine HLA-A*0301-Liganden sequenziert sind, werden hier alle bekannten HLA-A*03-Liganden berücksichtigt.

Die unterschiedlichen C-terminalen Präferenzen von HLA-A*2601-, -A*2602- und -A*2603-präsentierten Peptiden bei ansonsten sehr ähnlichen Peptidmotiven sind aufgrund der unterschiedlichen Aminosäurezusammensetzungen der Tasche F plausibel. Da die HLA-Liganden jedoch aus verschiedenen Zelllinien isoliert wurden, ist noch eine andere Erklärung denkbar. Während der N-Terminus eines zu präsentierenden Peptids im ER durch Trimming entsteht, wird der endgültige C-Terminus bereits im Cytosol durch das Proteasom generiert. So könnte es zwischen den Zelllinien Unterschiede bezüglich Aktivität und

Spezifität der Untereinheiten des Proteasoms geben, die zu einer veränderten Aminosäureverteilung am C-Terminus führen.

Dies wurde im Rahmen einer Zusammenarbeit mit Marianne Kraus und Jeanette Gogel von der Arbeitsgruppe Driessen durch Proteasommarkierung weiter untersucht. Bei dieser Technik werden die Zellen zunächst mit DALVS-Reagenz behandelt, das in lebenden Zellen kovalent an die aktiven Zentren der proteolytischen Untereinheiten des Proteasoms bindet. Diese Markierung wird nach SDS-PAGE und Blot ähnlich wie bei einem normalen Western Blot mit Antikörpern detektiert. Der entscheidende Unterschied zum Western Blot besteht darin, dass nicht die Menge der in der Zelle vorhandenen Proteasomuntereinheiten sichtbar gemacht wird, sondern deren Aktivität.

Dabei wurden die Zelllinien MGAR, C1R-A*2602 und C1R-A*2603 verwendet, um den Einfluss der Proteasomaktivität auf das Peptidmotiv der verschiedenen HLA-A*26-Subtypen zu untersuchen (Tabelle 3.2). Die Zelllinien C1R-B*3801, -B*3901 und -B*3902 wurden untersucht, da $P\Omega$ bei ihnen erheblich ähnlicher ist als bei den HLA-A*26-Allelen. Die Linien HO301 und EMJ besitzen beide das gleiche Allel, HLA-A*0301. Leider ist aus EMJ bislang erst ein HLA-A*03-Ligand sequenziert. Die Peptidmotive für HLA-A*0301 sollten jedoch für beide Zelllinien gleich sein. Liganden von EMJ, WIL-JON, Awells und BM15 weisen noch unterschiedlichere C-Termini auf als die HLA-A*26-Gruppe: aliphatisch (Leucin), klein, aromatisch und aliphatisch (Isoleucin). Auch hier soll ein Einfluss der Proteasomaktivität auf das Motiv ausgeschlossen werden.

Zunächst wurde ein Aliquot der Proben, das 50 μg Gesamtprotein entspricht, für ein 10 \times 15 cm großes SDS-Polyacrylamidgel eingesetzt, welches sich wegen der höheren Auflösung gut eignet (Abbildung 3.8). Abbildung 3.9 zeigt die Auftrennung der Proteasomuntereinheiten und die Identität der Banden.

Nach Nussbaum et al. (1998) schneiden die Untereinheiten des Proteasoms nach folgenden Aminosäuren: β_1 nach den sauren Resten Glutamat und Asparat (ähnlich wie Peptidyl-Glutamyl-Peptid-Hydrolase, PGPH), β_2 nach den basischen Resten Arginin und Lysin (trypsin-ähnlich), β_5 nach den hydrophoben Aminosäuren Tryptophan, Phenylalanin, Tyrosin und Leucin (chymotrypsin-ähnlich). Nach Dahmann et al. (2000) zeigt das konstitutive Proteasom viel chymotryptische und PGPH-Aktivität, das Immunoproteasom hingegen mehr tryptische. In den Versuchen von Tenzer et al. (2004) zeigen das konstitutive c20S- und das durch IFN- γ hochregulierte i20S-Proteasom ähnliche Schnittspezifitäten (besonders nach Tryptophan, Tyrosin, Valin, Phenylalanin, Leucin), allerdings mit leicht unterschiedlichen Häufigkeiten. So schneidet das konstitutive Proteasom häufiger als das Immunoproteasom nach Tryptophan und Glycin, während der umgekehrte Fall für Valin, Phenylalanin und Leucin zutrifft.

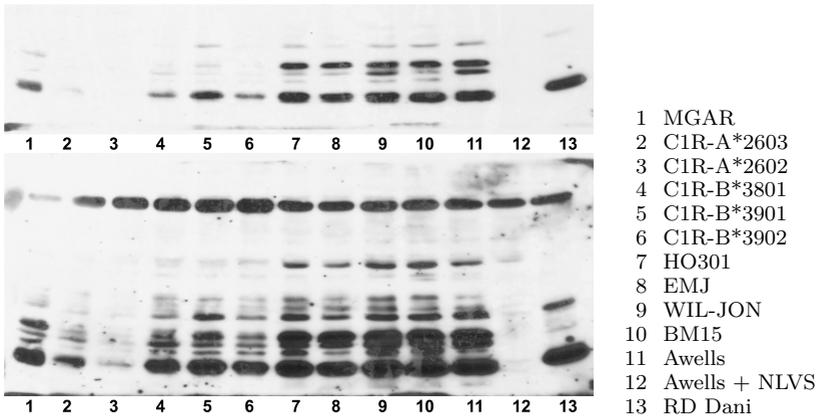


Abbildung 3.8.: Proteasomaktivitäten in verschiedenen Zelllinien. Als Negativkontrolle dienen Awells-Zellen, deren Proteasomaktivität durch NLVS inhibiert wurde. RD Dani, eine Probe von Marianne Kraus, stellt eine Positivkontrolle dar. Oben: kurze Belichtungszeit zur optimalen Detektion der intensiven Banden. Unten: längere Belichtungszeit zur optimalen Detektion schwacher Banden.

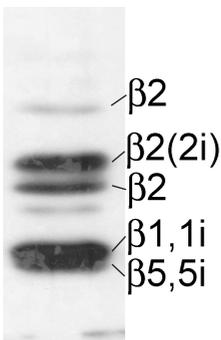


Abbildung 3.9.: Auftrennung der Proteasomuntereinheiten. Bei der eindimensionalen SDS-PAGE können konstitutive und Untereinheiten des Immunoproteasoms nicht aufgetrennt werden. β 1 und β 5 bilden eine Doppelbande.

Die Spuren 7-11 zeigen alle eine Doppelbande, d.h. in allen Zellen mit Allelen des HLA-B44-Supertyps gibt es deutliche $\beta 5(i)$ -Aktivität, die vor allem nach Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan schneidet. Betrachtet man hingegen die C-Termini der präsentierten Peptide, sind diese extrem unterschiedlich. So entspricht das HLA-B*4402-Peptidmotiv mit der Bevorzugung aromatischer Aminosäuren dem Schnittmotiv am ehesten. Doch auch WIL-JON-Zellen, die beispielsweise Peptide mit sehr kleinen Resten in P Ω auf HLA-B*4101 präsentieren, zeigen vergleichbare $\beta 5$ -Aktivität.

HO301- und EMJ-Zellen zeigen zwar eine deutliche $\beta 2$ -Aktivität, die dem Peptidmotiv mit basischem C-terminalen Anker entgegenkommen könnte, sowie $\beta 5$ -Aktivität für die Generierung von Peptiden mit Tyrosin am C-Terminus. Beides kann jedoch auch bei vielen anderen Zelllinien mit völlig anderen Peptidmotiven beobachtet werden.

Auch die mit HLA-B*3801, -B*3901 und -B*3902 transfizierten C1R-Zellen unterscheiden sich nur wenig. Sollte ein Einfluss des Proteasoms auf das Peptidmotiv gegeben sein, so würde man am ehesten bei den C1R-B*3801 eine erhöhte $\beta 5$ -Aktivität erwarten, da Phenylalanin erheblich häufiger ist als bei den anderen beiden. Der Blot zeigt jedoch so gut wie keine Aktivität in allen drei Zelllinien. Allenfalls bei C1R-B*3901 könnte die $\beta 5$ -Aktivität leicht erhöht sein. Hier ist nicht genau erkennbar, ob es sich um eine Doppelbande handelt.

Bei den Zelllinien, die HLA-A*26-Subtypen exprimieren, ist ebenfalls kein Zusammenhang zwischen den Proteasomaktivitäten und dem Peptidmotiv festzustellen. Auffällig ist hier vor allem, dass beispielsweise in C1R-A*2602 die Proteasomaktivität drastisch verringert und fast nicht mehr nachweisbar ist gegenüber der in MGAR vorhandenen Aktivität. Dies scheint die Peptidpräsentation jedoch nicht negativ zu beeinflussen, da aus 50 ml C1R-A*2602-Pellet mit 6 nmol reichlich Peptid isoliert und 57 Liganden sequenziert werden konnten.

In einem weiteren Versuch mit zwei kleineren Gelen konnten die Ergebnisse des ersten Versuchs reproduziert werden (Abbildung 3.10). Darüber hinaus wurde β -Actin angefärbt, um zu zeigen, dass von allen Proben gleiche Proteinmengen aufgetragen worden waren. Außerdem wurde die Proteasomuntereinheit $\beta 5$ nach dem Western Blot-Prinzip angefärbt, um neben der Aktivität auch Informationen über die Proteinmenge zu erhalten. Besonders interessant sind hier die mit verschiedenen Allelen transfizierten C1R-Zellen (Spuren 1-6). Sie weisen extrem unterschiedliche Zusammensetzungen der Proteasomaktivitäten auf, obwohl die Menge an $\beta 5$ in allen etwa gleich ist. Dies unterstreicht, wie wichtig es ist, nicht nur Proteinmengen zu untersuchen, sondern vor allem Aktivitäten (Berkers et al., 2005).

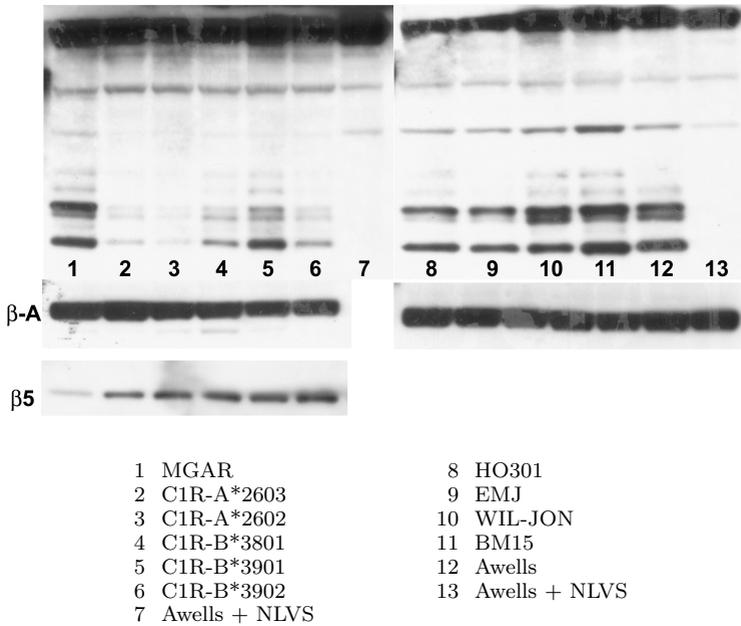


Abbildung 3.10.: Proteasomaktivitäten sowie Mengen an β -Actin und Unter-einheit β 5 in verschiedenen Zelllinien. Als Negativkontrolle dienen Awells-Zellen, deren Proteasomaktivität durch NLVS inhibiert worden ist. β -A: β -Actin-Färbung nach dem Western Blot-Prinzip, β 5: Färbung der Proteasomuntereinheit β 5 nach dem Western Blot-Prinzip.

Insgesamt lässt sich also kein Zusammenhang zwischen der Proteasomaktivität in der Zelle und den an der Oberfläche präsentierten Peptiden beobachten. Auch besteht kein Zusammenhang zwischen Menge und Aktivität von Proteasomuntereinheiten. In weiteren Experimenten könnte untersucht werden, ob sich die Zellkulturbedingungen auf die aktuell in den Zellen vorhandene Proteasomaktivität auswirkt und ob diese über längere Zeit hinweg unverändert bleibt. Zum Vergleich könnten außerdem weitere C1R-Transfektanten sowie untransfizierte oder nur mit leerem Vektor transfizierte C1R-Zellen genauer untersucht werden, um der Ursache für die unterschiedlichen Aktivitäten auf den Grund zu gehen. Hierbei könnten beispielsweise auch zweidimensionale Auftrennungen durchgeführt werden, die eine Unterscheidung von konstitutiven und immun-Untereinheiten erlauben. Die bisherigen Versuche dienen also vor allem als Pilotexperimente für weitere Studien, zeigen aber auch deutlich, dass kein genereller Einfluss der Proteasomaktivität auf Peptidmotive oder die Überlappung von Peptidrepertoires zu erwarten ist.

3.1.8. Der Einfluss der Ligandenzahl auf das Motiv

Um den Einfluss der Ligandenzahl auf das Peptidmotiv besser beurteilen zu können, wurden die in der Datenbank SYFPEITHI⁵ enthaltenen HLA-A*02-Liganden chronologisch nach dem Jahr ihrer Veröffentlichung geordnet. Dann wurden die Aminosäureverteilungen für unterschiedlich große Zeitintervalle, die unterschiedlichen Ligandenzahlen entsprechen, bestimmt (Tabelle 3.3). Zusätzlich wurden für das Zeitintervall 1991-2008 noch Liganden aus der internen Datenbank verwendet, die noch nicht in SYFPEITHI aufgenommen sind. HLA-A*02 wurde als Modell verwendet, weil hierfür nach und nach von verschiedenen Gruppen viele Liganden sequenziert wurden.

Zunächst wird die Betrachtung auf die Ankerpositionen P2 und P Ω beschränkt. In P2 ist Leucin die mit Abstand häufigste Aminosäure (>60%), gefolgt von Valin (ca. 10%). Die Dominanz von Leucin ist für alle Zeitintervalle und damit Ligandenzahlen überaus deutlich, wenngleich die relative Häufigkeit dieser Aminosäure sich insgesamt mit steigender Ligandenzahl auf einen im Vergleich zum Anfangswert niedrigeren Wert einpendelt. Dafür steigt die Häufigkeit von Valin leicht an, pendelt sich aber ebenfalls ein.

P Ω wird im Gegensatz zu P2 nicht hauptsächlich von einer Aminosäure dominiert, sondern gleichermaßen von zweien: Leucin und Valin. Auch hier zeigen sich leichte Schwankungen mit steigenden Ligandenzahlen, die die Aminosäu-

⁵<http://www.syfpeithi.de>

Tabelle 3.3.: Chronologische Zunahme der HLA-A*02-Ligandenanzahl

Zeitintervall	Ligandenanzahl
1991-1992	13
1991-1996	30
1991-2001	53
1991-2002	100
1991-2005	310
1991-2008	567

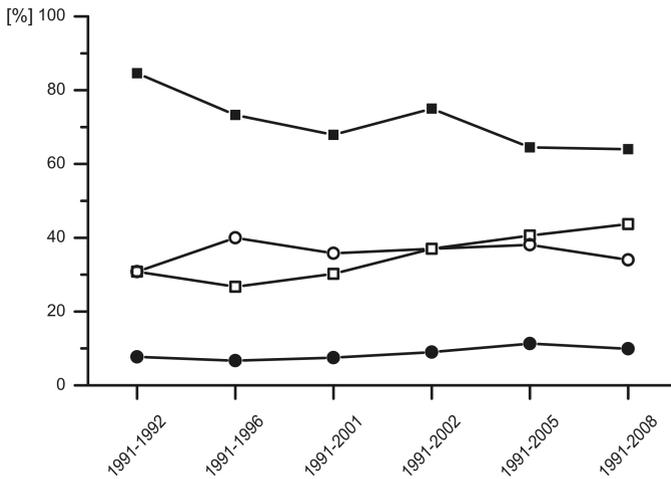


Abbildung 3.11.: Chronologische Entwicklung der HLA-A*02-Ankerpositionen. Die Häufigkeiten der Aminosäuren Leucin und Valin in den beiden Ankerpositionen P2 und PΩ von HLA-A*02 verändern sich mit steigender Ligandenanzahl kaum. □ Leucin, ○ Valin, gefüllt: P2, offen: PΩ.

3. Ergebnisse und Diskussion

rendominanz der Ankerposition jedoch nicht grundlegend verändern. In beiden Ankerpositionen, in denen entweder eine oder zwei Aminosäuren vorherrschen, gibt es also zwar leichte Schwankungen; diese beeinflussen das grundsätzliche Peptidmotiv jedoch nicht maßgeblich.

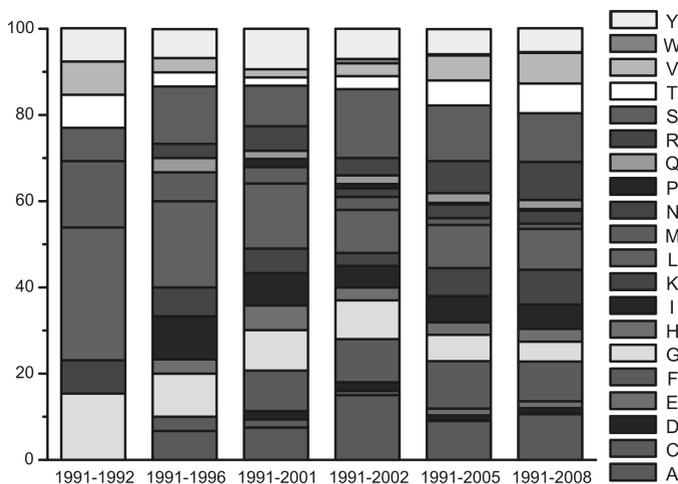


Abbildung 3.12.: Chronologische Entwicklung der Position P1 von HLA-A*02. Für alle Aminosäuren sind die relativen Häufigkeiten für verschiedene Zeitintervalle, die zunehmenden Ligandenanzahlen entsprechen, gezeigt.

Als Beispiel für Peptidpositionen, die nicht zu den Ankern oder Hilfsankern gehören, wurde außerdem die Entwicklung der Aminosäureverteilung in P1 der HLA-A*02-Liganden untersucht (Abbildung 3.12). Die Verteilung aller 20 Aminosäuren ändert sich dabei zunächst recht stark. Dies ist dadurch zu erklären, dass in den ersten beiden Jahren insgesamt nur 13 Peptide bekannt waren. Folglich können hier nur maximal 13 verschiedene Aminosäuren in P1 vorkommen, deren relative Anteile dafür aber um so größer sind. Mit zunehmender Ligandenanzahl pendeln sich die Anteile der verschiedenen Aminosäuren dann jedoch auf annähernd konstante Werte ein. Zwischen den 310 Liganden aus den Jahren 1991-2005 und den 567 Liganden bis zum Jahr 2008 sind kaum noch Unterschiede erkennbar.

3.1.9. Zusammenfassung und Ausblick

Ausgehend von verschiedenen *Sources* wurden natürliche HLA-Liganden mittels Immunpräzipitation isoliert und in LC-MS/MS-Experimenten analysiert. Basierend auf knapp 2000 Liganden wurden einerseits die Peptidmotive von vier HLA-Allelen neu aufgestellt und andererseits die Peptidmotive von 14, zuvor meist durch Poolsequenzierungen charakterisierten HLA-Allotypen überarbeitet und verfeinert. Dabei wurden Anker und Hilfsanker sowie bevorzugte Aminosäuren – zum Teil in Abhängigkeit von der Peptidlänge – definiert. Als Grundlage für eine Erklärung der beobachteten Aminosäureverteilungen und für deren Vergleich zwischen verschiedenen Allelen dienten dabei die Primärsequenzen der HLA-Moleküle sowie aus Kristallstrukturen bekannte Interaktionen innerhalb der Peptidbindungsfurche. Dabei zeigte sich, dass schon geringfügige Unterschiede zwischen den HLA-Molekülen zu weitreichenden Veränderungen der Peptidrepertoires führen können. So zeigen die HLA-Allele des HLA-B44-Supertyps zwar alle recht ähnliche Peptidmotive – sauer in P2 und hydrophob in P Ω –, die individuelle Ausgestaltung dieses Supertyp-Motivs fällt jedoch sehr unterschiedlich aus. Daher besitzt jeder der Allotypen des HLA-B44-Supertyps ein einzigartiges Peptidmotiv mit einer Vielzahl von Merkmalen, die es gegen die Motive anderer Allotypen abgrenzen. Eine Verzerrung der beobachteten Peptidmotive durch Einflüsse des Proteasoms oder der Liganden Zahlen konnte dabei ausgeschlossen werden.

Noch sind für einige Dutzend HLA-Allele keine Peptidmotive oder natürliche HLA-Liganden bekannt oder die Anzahl an Liganden ist für eine Feincharakterisierung noch zu gering (Tabelle 3.4). Sie werden sicherlich nach und nach Gegenstand zukünftiger Analysen sein. Dabei werden neue Entwicklungen in der Massenspektrometrie die Anzahl verfügbarer Peptidsequenzen für das Aufstellen von Motiven noch deutlich steigern können: HPLC-Systeme mit besserer und schnellerer Trennung komplexer Peptidgemische; zweidimensionale HPLC-Trennungen; MS-Geräte mit höherer Sensitivität, Auflösung oder neuen Analyseprinzipien; schließlich verbesserte Methoden für die automatische Interpretation von Fragmentspektren HLA-präsentierter Peptide.

Tabelle 3.4.: Übersicht über die Anzahl bekannter HLA-Liganden der verschiedenen HLA-Allotypen. Die Tabelle basiert auf einer Abfrage der Peptiddatenbank der Arbeitsgruppe Stevanović vom 20.02.2008. Von nicht aufgeführten HLA-Allotypen gibt es bislang keine natürlichen Liganden in dieser Datenbank.

> 100	50-100	10-50	<10
A*02(01)^a	A*01(01)	A*2601	A*3001
A*03(01)^b	A*11(01)	A*29(02)	A*33(03)
A*24	A*25	A*31(01)	B*4403
B*07(02)	A*26	A*32	B*53(01)
B*1501^b	A*2602	A*68	
B*18(01)	A*2603	B*08(01)	
B*3901	A*6601	B*1503	
B*4402	B*13(02)	B*1510	
B*49(01)	B*14(01/02)	B*4101	
B*51(01)	B*27	B*4501	
	B*35(03)	B*4701	
	B*37	B*50(01)	
	B*38		
	B*3801		
	B*3902		
	B*40(01)		
	B*57(01)		

^a > 500 bekannte Liganden

^b > 200 bekannte Liganden

3.2. Überlappung von HLA-Ligandomen

Die Ergebnisse aus 3.1 zeigen, dass sich HLA-Peptidmotive unterschiedlich stark ähneln können, meist aber sehr individuell sind. Dies wirft die Frage auf, ob die HLA-Ligandome der verschiedenen Allotypen entweder aufgrund der Ähnlichkeiten ihrer Peptidmotive überlappen oder aber sich aufgrund der individuellen Merkmale nicht überschneiden. Vor einer detaillierten Analyse wurde zunächst die technische sowie biologische Reproduzierbarkeit von Experimenten zur HLA-Peptidrepertoire-Analyse bestimmt. Damit sollte eine Verzerrung der Ergebnisse der Überlappungsanalysen ausgeschlossen bzw. abgeschätzt werden. Anschließend erfolgten Untersuchungen der Überschneidung des HLA-Ligandoms eines einzelnen HLA-Allels (HLA-A*02) mit anderen Ligandomen, der Überlappung der Subtyp-Ligandome eines HLA-Antigens (HLA-A*26) sowie der Schnittmenge zwischen verschiedenen, aber eng verwandten Antigenen (HLA-B*38, -B*39). Außerdem wurden die Überlappungen von neun Antigenen innerhalb des HLA-B44-Supertyps mit Hilfe von drei grundsätzlich unterschiedlichen, MS-basierten Methoden eingehend analysiert. Zum Vergleich wurde schließlich ein weiterer Supertyp, HLA-A3, hinzugezogen.

3.2.1. Reproduzierbarkeit von LC-MS/MS-Experimenten

Um die beobachtete Überlappung zwischen HLA-Ligandomen besser einschätzen zu können, wurde zunächst die Reproduzierbarkeit von LC-MS/MS-Experimenten untersucht. Dazu wurden von Peptideluaten verschiedener Kombinationen aus *Source* und Antikörper jeweils zwei bis drei LC-MS/MS-Experimente, wenn möglich direkt hintereinander, durchgeführt. Tabelle 3.5 zeigt eine Übersicht.

Bei allen Experimenten wurden die zu fragmentierenden Vorläufer-Ionen automatisch vom Messcomputer durch DDIS ausgewählt. Für jedes Experiment gibt es also eine Liste solcher Vorläufer-Ionen. In einem ersten Schritt wurden dann diese Listen zweier verschiedener Experimente miteinander verglichen unter Berücksichtigung von Retentionszeit und m/z -Wert der Ionen. Die Reproduzierbarkeit einer Messung wird dabei als Anteil der Spektren der einen Messung, die auch in der anderen Messung gefunden werden können, in Prozent angegeben. Beim Vergleich zweier Experimente wird dann die Reproduzierbarkeit als Mittelwert der beiden Einzelwerte der Messungen berechnet.

Da ein solcher Vergleich auch unterschiedliche Ionen erfasst, die zufällig eine ähnliche Retentionszeit und einen ähnlichen m/z -Wert besitzen, wurden in einem zweiten Schritt die zugehörigen Fragmentspektren ebenfalls verglichen

und die falsch positiven eliminiert. Dieser zweite Schritt ist sehr zeitintensiv, da es keinerlei Software-Unterstützung dafür gibt. Daher wurde er nur in einigen besonderen Fällen angewendet.

3.2.1.1. Bestimmung anhand der Parameter Retentionszeit und m/z -Wert

Um eine Liste der fragmentierten Vorläufer-Ionen mit Retentionszeit und m/z -Wert zu generieren, müssen die Daten zunächst prozessiert werden. Dabei kann entweder jedes Ion berücksichtigt werden oder nur solche, die einen Peptidfilter passieren. Dieser ist ein Algorithmus, der unter anderem anhand von Intensitäten, Peakverteilung und charakteristischen Fragment-Ionen entscheidet, ob das fragmentierte Ion ein Peptid ist oder ob es sich um Signale von Verunreinigungen oder des Lösungsmittels handelt. Da die Auswirkungen eines solchen Filters nicht kontrollierbar oder genau zu definieren sind, wird auf eine Anwendung verzichtet. Dies bedeutet aber auch, dass nicht alle Vorläufer-Ionen, die im Folgenden verglichen werden, automatisch Peptide sind.

Um die Listen von zwei verschiedenen Experimenten miteinander zu vergleichen, muss zunächst festgelegt werden, welche Abweichungen von Retentionszeit und m/z -Wert der Vorläufer-Ionen zwischen den beiden Messungen erlaubt sind. Dabei wurde in allen Fällen beim m/z -Wert eine Abweichung bis zu 0,4 noch als identisch betrachtet. Für die Wahl des Retentionszeitfensters hingegen wurden die Retentionszeiten mehrerer verschiedener Vorläufer in beiden Experimenten verglichen, um so die zeitliche Verschiebung zwischen den Messungen zu ermitteln. Zu beachten ist, dass diese Verschiebung der Retentionszeiten stark von der Reproduzierbarkeit der HPLC abhängt. Das hier verwendete HPLC-System „Ultimate“ zeigt bei direkt aufeinanderfolgenden Messungen bereits Verschiebungen von 2-4 min, wobei die Verschiebungen zu Beginn der Versuche stets geringer sind als gegen Ende. Bei Messungen in größerem zeitlichen Abstand kann diese Verschiebung leicht 10 min betragen. Die Reproduzierbarkeit eines LC-MS/MS-Experiments hängt also auch von der verwendeten HPLC und deren Reproduzierbarkeit ab.

Um den Einfluss der Größe des Retentionszeitfensters zu untersuchen, wurden drei Messungen der Probe C1R-A*2603 mit jeweils unterschiedlichen Zeitintervallen verglichen. Die erste Messung, aw_a2601_1, wurde etwa drei Wochen früher durchgeführt als die beiden anderen Messungen, nh_a2603_1 und nh_a2603_2. Dies schlägt sich auch in der Retentionszeit nieder. Durch Analyse verschiedener Vorläufer-Ionen wurde das benötigte Fenster zum Vergleich der letzten beiden Messungen auf 2 min festgelegt. Hingegen beträgt deren Verschiebung gegenüber dem ersten Versuch etwa 5 min.

Tabelle 3.5.: Übersicht über die zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit durchgeführten LC-MS/MS-Experimente

<i>Source</i>	AK	LC-MS/MS	Datum	% Probe
C1R-A*2603	W6/32	aw_a2603_1	23.02.07	30
		nh_a2603_1	14.03.07	30
		nh_a2603_2	14.03.07	30
RCC068_ZL	B1.23.2	nh_rcc068_7	15.03.07	20
		nh_rcc068_8	15.03.07	40
		nh_rcc068_9	15.03.07	40
RCC068_ZL	W6/32	nh_rcc068_10	19.03.07	20
		nh_rcc068_11	19.03.07	20
		nh_rcc068_12	19.03.07	20
Awells-Survivin	W6/32	aw_aw_su_1	19.02.07	33
		nh_awells_1	16.03.07	33
		nh_awells_2	16.03.07	33
JY	W6/32	nh_jy_4	08.09.04	16
	W6/32	nh_jy_5	08.09.04	16
Awells	B1.23.2	nh_awells_a	14.08.07	27
		nh_awells_b	22.08.07	18
		nh_awells_c	23.08.07	18
		nh_awells_d	27.08.07	18
BM15	B1.23.2	nh_bm15_a	14.08.07	27
		nh_bm15_b	22.08.07	15
		nh_bm15_c	22.08.07	15
		nh_bm15_d	27.08.07	15
EMJ	B1.23.2	nh_emj_a	14.08.07	27
		nh_emj_b	22.08.07	27
		nh_emj_c	23.08.07	27
		nh_emj_d	23.08.07	19

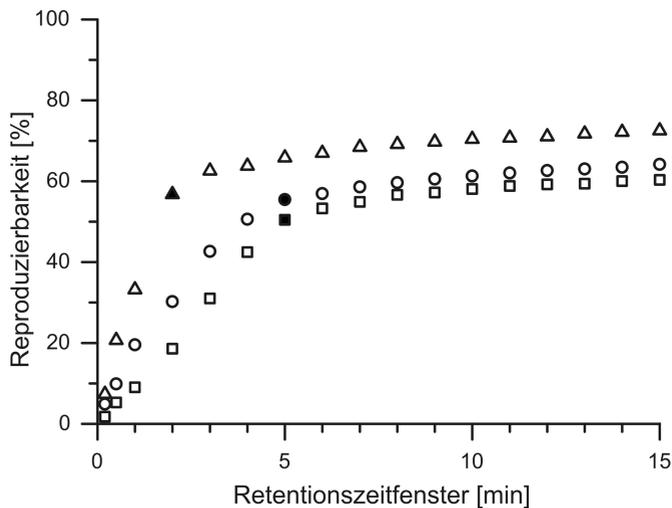


Abbildung 3.13.: Auswirkung des Retentionszeitfensters auf die Reproduzierbarkeit. Drei Messungen der C1R-A*2603-Probe wurden mit verschiedenen Retentionszeitfenstern verglichen: □ aw_a2603_1 & nh_a2603_1 (5 min), ○ aw_a2603_1 & nh_a2603_2 (5 min), △ nh_a2603_1 & nh_a2603_2 (2 min). In Klammern und in der Abbildung mit gefüllten Symbolen gekennzeichnet die durch Vergleich von Vorläufer-Ionen festgelegten Fenster.

Der Vergleich mit weiteren Retentionszeitfenstern zeigt, dass dieses Verfahren zur Festlegung des Fensters anhand der Verschiebung verschiedener Vorläufer-Ionen zwischen den Messungen sehr gut geeignet ist (Abbildung 3.13). Ist das Fenster zu klein gewählt, ist die Reproduzierbarkeit sehr gering. Sobald das Fenster sich dem passenden Wertes nähert, ergibt sich ein sprunghafter Anstieg der Reproduzierbarkeit. Vergrößert man das Fenster darüber hinaus noch weiter, erreicht der Wert eine „Sättigung“. Hier kommt die Zunahme nur noch durch falsch positive Übereinstimmungen der Vorläufer-Ionen zu Stande.

Der Vergleich der drei Messungen des C1R-A*2603-Eluats zeigt gute Reproduzierbarkeiten von 50-60%. Ähnliche Werte wurden in vielen weiteren Versuchen ermittelt (Tabelle 3.6). Dies bedeutet also, dass 50-60% der fragmentierten Vorläufer-Ionen aus einer Messung in einer zweiten Messung der gleichen Probe ebenfalls detektiert und fragmentiert werden.

Bei einer Reproduzierbarkeit von 60% sollten bei genügender Probenmenge möglichst drei Messungen durchgeführt werden. Damit steigt die Wahrscheinlichkeit, ein bestimmtes Peptid aus der Probe zu detektieren, auf über 90% (Tabelle 3.7).

Tabelle 3.6.: Reproduzierbarkeit von LC-MS/MS-Experimenten. Für jeden paarweisen Vergleich von Messungen derselben Probe sind das verwendete Retentionszeitfenster ΔRT sowie die Reproduzierbarkeit R angegeben.

Messungen		ΔRT [min]	R [%]
nh_rcc068_7	nh_rcc068_8	4	59,66
nh_rcc068_7	nh_rcc068_9	4	50,87
nh_rcc068_8	nh_rcc068_9	4	65,18
nh_rcc068_10	nh_rcc068_11	3	59,26
nh_rcc068_10	nh_rcc068_12	3	61,25
nh_rcc068_11	nh_rcc068_12	3	59,78
aw_aw_su_1	nh_awells_1	10	56,01
aw_aw_su_1	nh_awells_2	10	53,28
nh_awells_1	nh_awells_2	2	56,16
nh_jy_4	nh_jy_5	4	57,79

Tabelle 3.7.: Reproduzierbarkeit und Detektionswahrscheinlichkeit. Aufgeführt sind die Wahrscheinlichkeiten für die Detektion eines bestimmten Peptids bei einer bestimmten Reproduzierbarkeit und einer bestimmten Anzahl von Messungen.

Messungen	Reproduzierbarkeit		
	40%	50%	60%
1	40,00%	50,00%	60,00%
2	64,00%	75,00%	84,00%
3	78,40%	87,50%	93,60%
4	87,04%	93,75%	97,44%

3.2.1.2. Bestimmung anhand von Fragmentierungsmustern

Die bisherigen Analysen der Reproduzierbarkeit enthalten noch Falschpositive. Dies sind Vorläufer-Ionen, die einen ähnlichen m/z -Wert und eine ähnliche Retentionszeit besitzen, obwohl es sich um verschiedene Peptidsequenzen handelt. Dies zeigt sich nur durch Vergleich ihrer Fragmentspektren.

Die insgesamt zwölf Messungen der Proben von BM15, Awells und EMJ erfolgten in zufälliger Reihenfolge, wobei die erste Messung jeder Probe an einem anderen Tag durchgeführt wurde als die übrigen. Die Analyse anhand der Parameter Retentionszeit und m/z -Wert wurde für alle vergleichbaren (in der Retentionszeit nicht zu sehr verschobenen) Experimente vorgenommen. Die manuelle Überprüfung wurde jedoch nur für die zwei besten Messungen jeder Probe durchgeführt, da sie extrem zeitintensiv ist.

Standardmäßig wurde ein Retentionszeitfenster von 5 min gewählt, das für alle Vergleiche geeignet war. Außerdem wurden die Messungen nur bis zu dem Zeitpunkt verwendet, ab dem das Detergenz CHAPS eluiert. Er wurde anhand eines Massenchromatogramms ($m/z=615.4$) bestimmt. Dies erleichtert die manuelle Auswertung erheblich, da es weniger Vorläufer-Ionen in den Listen jedes Experiments gibt. Außerdem werden ab diesem Zeitpunkt nur noch sehr selten Peptide fragmentiert, sodass sie vernachlässigbar sind.

Tabelle 3.8 zeigt die Ergebnisse der automatisierten sowie der manuell überprüften Analyse der Reproduzierbarkeit. Die Überprüfung zeigt, dass die echte Reproduzierbarkeit etwa 15-25% unter dem anhand von Retentionszeit und m/z -Wert bestimmten Wert liegt.

Abbildung 3.14 zeigt die anhand von m/z -Wert und Retentionszeit mit ver-

Tabelle 3.8.: Einfluss von Falschpositiven auf die Reproduzierbarkeit. Die Reproduzierbarkeiten wurden mit einem Retentionszeitfenster von 5 min bestimmt. Drei der Vergleiche wurden manuell verifiziert (Rv).

Messungen	R [%]	Rv [%]
nh_bm15_b & nh_bm15_c	73,91	59,26
nh_awells_b & nh_awells_c	64,67	43,58
nh_awells_b & nh_awells_d	62,80	
nh_awells_c & nh_awells_d	63,38	
nh_emj_b & nh_emj_c	61,25	
nh_emj_b & nh_emj_d	53,60	
nh_emj_c & nh_emj_d	50,17	32,72

schiedenen Retentionszeitfenstern ermittelte Reproduzierbarkeit. Auch hier erreicht die Reproduzierbarkeit mit zunehmender Fenstergröße eine „Sättigung“. Der manuell verifizierte Wert liegt stets deutlich darunter. Die geringste Abnahme durch die Verifizierung tritt bei der BM15-Probe auf, die vermutlich die höchste Peptidkonzentration enthielt. Diese wurde nicht gemessen, eine Tendenz lässt sich aber anhand der Qualität der LC-MS/MS-Experimente abschätzen.

Sind zu einem bestimmten Zeitpunkt weniger Peptidsignale vorhanden als fragmentiert werden sollen, werden häufiger Lösungsmittel-, Detergenz- oder anderweitige Nichtpeptid-Signale zur Fragmentierung ausgewählt auf Kosten der Reproduzierbarkeit. Dies bietet eine mögliche Erklärung für die Abhängigkeit der Reproduzierbarkeit von der Peptidmenge. Diese beobachtete Tendenz sollte jedoch in weiteren Versuchen mit unterschiedlich großen Aliquots der gleichen Probe noch detaillierter analysiert werden.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Reproduzierbarkeit verschiedener Proben recht unterschiedlich sein kann und zwischen 30% und 60% schwankt. Bei peptidreichen Proben ist sie im Bereich von 50-60% zu erwarten. Dies bedeutet für zukünftige Experimente, dass zwischen einer größeren Anzahl an Experimenten zugunsten der Detektion maximal vieler Vorläufer-Ionen einerseits und einem genügend hohen Peptidgehalt pro Messung andererseits abgewogen werden muss. Zu beachten ist auch, dass selbst bei einer Reproduzierbarkeit von 30% die Wahrscheinlichkeit für die Detektion eines ganz bestimmten Peptids eben bei 30% liegt. Im Vergleich dazu liegt die beispielsweise innerhalb des HLA-B44-Supertyps beobachtete Überlappung von Peptidrepertoires mit etwa

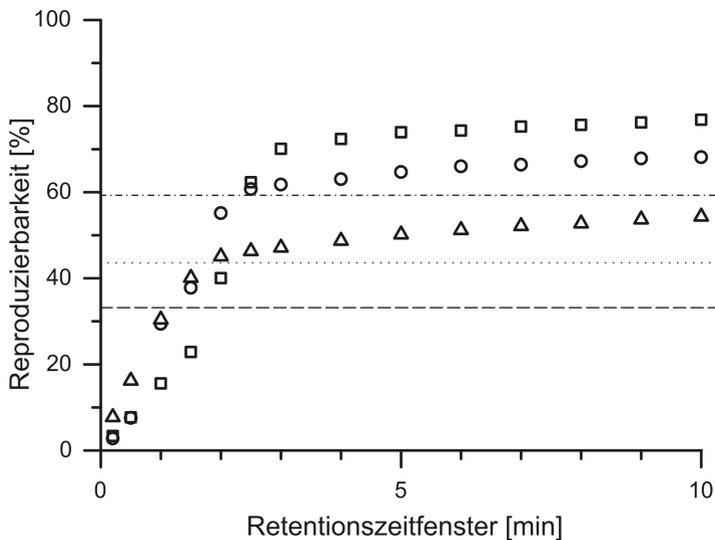


Abbildung 3.14.: Vergleich der Methoden zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit. Die Reproduzierbarkeit wurde für verschiedene Retentionszeitfenster anhand von m/z -Wert und Retentionszeit ermittelt: □ nh_bm15_b & nh_bm15_c, ○ nh_awells_b & nh_awells_c, △ nh_emj_c & nh_emj_d. Die Linien zeigen die nach manueller Verifizierung erhaltene Reproduzierbarkeit an: - - - BM15, ··· Awells, - · - EMJ.

3% eine ganze Größenordnung darunter (siehe 3.2.6).

In der Literatur gibt es nur wenige Berichte zur Reproduzierbarkeit von LC-ESI-MS/MS-Experimenten für die Identifikation von Peptiden. Meist handelt es sich um Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit von Proteinidentifikationen beispielsweise in tryptischen Verdau. Diese sind wesentlich einfacher, da in der Regel für jedes Protein mehrere Peptide detektiert werden, die zusammen die Identifikation des zugehörigen Proteins erlauben. In solchen Experimenten ist nicht relevant, wie reproduzierbar Peptide identifiziert werden, sondern Proteine. Dabei hängt die Reproduzierbarkeit stark vom verwendeten experimentellen System ab. So ist sie für *offline*-MALDI-Versuche generell besser als für *online*-ESI-Messungen, da bei MALDI das Eluat auf eine Platte aufgetragen wird und diese fast beliebig lange für Messungen verwendet werden kann. Es gibt hier also im Gegensatz zur ESI-Technik kaum eine zeitliche Einschränkung der Messzeit, wodurch die Probe eingehender analysiert werden kann. Doch selbst hier kann aufgrund kleiner Änderungen der HPLC-Retentionszeit, der Matrix-Kristallisation oder der Verlusten im Verlauf der Probenvorbereitung erwartet werden, dass bei Wiederholung des Experiments noch mehr Identifizierungen gelingen (Parker et al., 2004). Bei Verwendung der LC-ESI-MS/MS-Technik für einen unfraktionierten tryptischen Verdau von Hefe-Lysat konnten nur 35 von insgesamt 401 identifizierten Proteinen in jeder von drei Messungen gefunden werden. Betrachtet man nur die zur Fragmentierung ausgewählten Vorläufer-Ionen, so wurden 43 von insgesamt 544 Fragmentspektren bei allen drei Messungen aufgenommen. Damit fanden sich etwa 24% der Vorläufer-Ionen jeder Messung in den beiden anderen wieder (Yi et al., 2002). Bei Reduktion der Probenkomplexität durch eine zusätzliche eindimensionale SDS-PAGE vor der eigentlichen LC-MS/MS-Messung steigt die Reproduzierbarkeit der Proteinidentifikation auf 60-70% (Schirle et al., 2003). Im Vergleich dazu ist die Reproduzierbarkeit auf der Ebene von Peptidfragmentspektren in dem hier verwendeten experimentellen System mit 30-60% als nur noch wenig steigerbar einzuschätzen.

3.2.2. Reproduzierbarkeit von HLA-Peptid-Extraktionen

Zur Ermittlung der biologischen Reproduzierbarkeit wurden LCL721.45-Zellen, die zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet worden waren, von Andreas Weinzierl zur HLA-Peptid-Extraktion verwendet (Weinzierl, 2008). Die beiden Eluate wurden differentiell mit einer leichten und einer schweren Isotopenmarkierung modifiziert (H_4 -/ D_4 -NIC) und im Verhältnis 1:1 gemischt. Das mit dieser Mischung durchgeführte LC-MS-Experiment wurde hinsichtlich der Prä-

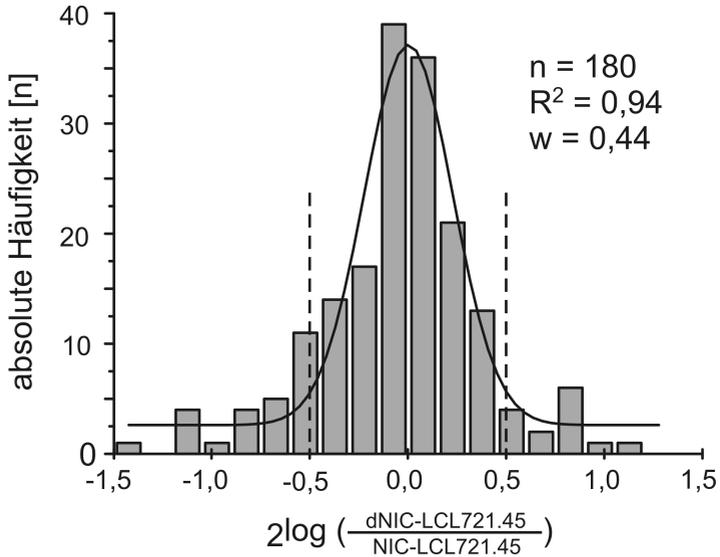


Abbildung 3.15.: Bestimmung der biologischen Reproduzierbarkeit. HLA-präsentierte Peptide wurden von zu zwei verschiedenen Zeitpunkten geernteten LCL721.45-Zellen extrahiert, differentiell modifiziert und in einem LC-MS-Experiment analysiert. Die Verhältnisse individueller Peptide in beiden Proben wurden logarithmisch in einem Histogramm aufgetragen. Dabei wurde die Breite der Balken so gewählt, dass R^2 bei der Anpassung einer Gauß-Funktion einen maximalen Wert erreicht. Die Daten wurden auf einen Mittelwert von $x_c = 0$ normiert. Angegeben sind außerdem die Anzahl der Verhältnisse n und die Halbwertsbreite w . Die gestrichelten Linien zeigen die Grenzen an, innerhalb derer 95% aller Werte liegen. D.h. 95% aller Peptide variierten nicht mehr als 1,4-fach zwischen beiden Proben. Die Daten wurden von Andreas Weinzierl zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3.9.: Biologische Replikate von Peptidextraktionen aus der Zelllinie BM15

	Extraktion 1	Extraktion 2	Extraktion 3
Datum	28.02.2005	17.07.2007	08.08.2007
Zellpellet	40 ml BM15	30 ml BM15	50 ml BM15
Antikörper	20 mg B1.23.2	30 mg B1.23.2	50 mg B1.23.2
dNIC	nein	ja	nein
LC-MS/MS	nh_bm15_1	nh_bmaw_3	nh_bm15_e
Sequenzen	123	65	51

sensation individueller Liganden auf beiden Proben analysiert. Die erhaltenen Peptidverhältnisse wurden logarithmiert und in einem Histogramm dargestellt (Abbildung 3.15). Mit Hilfe einer daran angepassten Gauß-Funktion lässt sich berechnen, dass 95% aller Peptide nicht mehr als 1,4-fach zwischen beiden Proben variierten.

Auch ein anderer Ansatz weist auf die hohe biologische Reproduzierbarkeit von Peptidextraktionen hin. Von drei Peptidextraktionen der B-LCL BM15 wurden drei LC-MS/MS-Messungen miteinander verglichen (Tabelle 3.9). Dabei wurden zunächst mehr als 100 Peptide aus nh_bm15_1 und mehr als 50 aus nh_bmaw_3 sequenziert. Peptide, die zunächst nur in einer der beiden Messungen gefunden worden waren, wurden dann auch in der anderen gezielt gesucht. Alle in diesen Messungen sequenzierten Peptide wurden schließlich gezielt in nh_bm15_e gesucht. Abbildung 3.16 zeigt das Ergebnis des Vergleichs der in den drei verschiedenen Messungen gefundenen Peptide. Von den 65 in nh_bmaw_3 sequenzierten Peptiden wurden 88% in mindestens einer der beiden anderen Messungen ebenfalls gefunden, die meisten davon sogar in allen drei. Von den 123 Peptiden aus nh_bm15_1 wurden mehr als die Hälfte zumindest in einem anderen Experiment gefunden, ein Viertel sogar in allen drei.

Zu beachten ist, dass es zwischen den beiden unmodifizierten Messungen eine Retentionszeitverschiebung von etwa 40 min gibt (nh_bm15_e früher), die die Zahl der in beiden Experimenten zu beobachtenden Peptiden von vornherein nach oben beschränkt. Ohne diese Verschiebung wäre die Überlappung sicher größer. Dies zeigt schon die Tatsache, dass von denjenigen Peptiden, die in nh_bm15_1 innerhalb der ersten 40 min eluieren, weniger als 10% in nh_bm15_e wiedergefunden werden, von denjenigen ab Minute 80 jedoch etwa 60%. Zu beachten ist außerdem, dass die in zwei einzelnen Messungen beob-

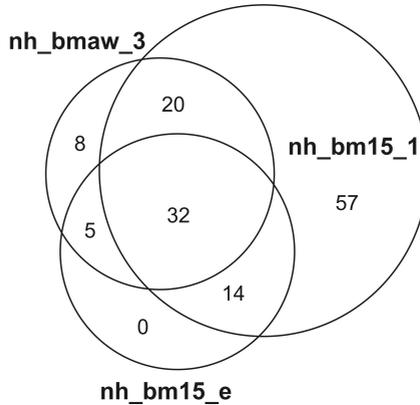


Abbildung 3.16.: Biologische Reproduzierbarkeit am Beispiel BM15. Das Venn-Diagramm zeigt die drei Messungen von drei verschiedenen BM15-Extraktionen und deren Überlappung – soweit möglich – proportional an. Die Diagramme wurden mit Hilfe der im Internet frei verfügbaren Programme *Venny*⁶ und *3Venn Applet*⁷ erstellt.

achtbare biologische Reproduzierbarkeit nicht größer sein kann als die technische Reproduzierbarkeit (50-60%). Denn selbst bei der wiederholten Messung biologisch völlig identischer Proben kann maximal die durch die technische Reproduzierbarkeit eingeschränkte Überlappung beobachtet werden.

3.2.3. Überlappung des HLA-A*02-Ligandoms mit anderen Ligandomen

HLA-A*0201 ist das Allel, für das die meisten natürlichen Liganden charakterisiert sind. Das Peptidmotiv zeigt in P2 und P Ω vor allem die Aminosäuren Leucin und Valin. Diese sind auch häufig bei anderen Allelen in Ankerpositionen zu finden (z.B. HLA-B*13). Daher könnte man vermuten, dass HLA-A*02-präsentierte Peptide auch des Öfteren auf anderen Allelen zu finden sind. Dem ist jedoch nicht so. Von 502 HLA-A*02-Liganden wurden nur 18 – also 3,6% – auch auf anderen Allelen gefunden (Tabelle 3.10 und Anhang A.2).

⁶<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>

⁷<http://www.cs.kent.ac.uk/people/staff/pjr/EulerVennCircles/EulerVennApplet.html>

Zwar war das Allel, mit dem die größte Überlappung beobachtet wurde, HLA-B*13. Ausgehend vom Peptidmotiv hätte man jedoch vermuten können, dass deutlich mehr Liganden überlappen. Allerdings konnten schon Barouch et al. (1995) feststellen, dass bereits die Peptidmotive und -repertoires verschiedener HLA-A*02-Subtypen sehr unterschiedlich sind. Schließlich könnte es sich bei einigen der Liganden, die auf recht unterschiedlichen Allelen gefunden werden (z.B RLDDAIHVL) und deren Sequenz eher Ausnahmen vom Peptidmotiv darstellen, um HLA-Cw-präsentierte Peptide, Artefakte oder falsch zugeordnete Peptide handeln.

Tabelle 3.10.: HLA-A*02-Liganden auf anderen Allelen

HLA	Peptide	Sequenzen
A*24	1	NYIDKVRFL
A*26	3	DVYSGTPTKV, EVIDFSHGL, SAVDFIRTL
A*29	1	NYIDKVRFL
A*32	1	KIFEMGPVFTL
B*0702	2	KVCNPIITKL, RVMAPRALL
B*13(02)	8	GLNDFIQKI, KVCNPIITKL, NYIDKVRFL, QLVDIIEKV, SAVDFIRTL, TAVALLRLL, RLASYLDRV, YLLPAIVHI
B*1501	1	KLIDRTESL
B*35	2	SAVDFIRTL, TAVALLRLL
B*3902	1	RLDDAIHVL
B*5101	1	SAPYGRITL
DR	2	DVELDDLKDEL, KMDPIISRV

3.2.4. Überlappung von Subtyp-Ligandomen: HLA-A*2601, -A*2602, -A*2603

Um die Überlappung der Peptidrepertoires verschiedener Subtypen des gleichen HLA-Antigens zu untersuchen, wurden die bisher bekannten Liganden von HLA-A*2601, -A*2602 und -A*2603 verglichen (Abbildung 3.17). Am stärksten überlappen die Ligandome von HLA-A*2602 und -A*2603. Jeweils etwa ein Viertel der Liganden wurde in Präparationen beider Subtypen identifiziert. In P2 der gemeinsamen Liganden kommt – wie aufgrund der Peptidmotive zu erwarten – vor allem Valin vor. PΩ wird von Leucin, Methionin und Phenylalanin

3. Ergebnisse und Diskussion

gebildet. Auffallend ist, dass kein für HLA-A*2601 charakteristisches Tyrosin darunter ist. Diese Eigenart von HLA-A*2601 trägt vermutlich mit dazu bei, dass 88% seiner Liganden auf keinem der anderen beiden Subtypen gefunden wurden. Das bisher einzige Peptid, das auf allen Subtypen gefunden wurde, zeigt ein Threonin in P2 und ein Leucin in P Ω – also Ankerreste, die bei allen drei Allelen recht dominant sind.

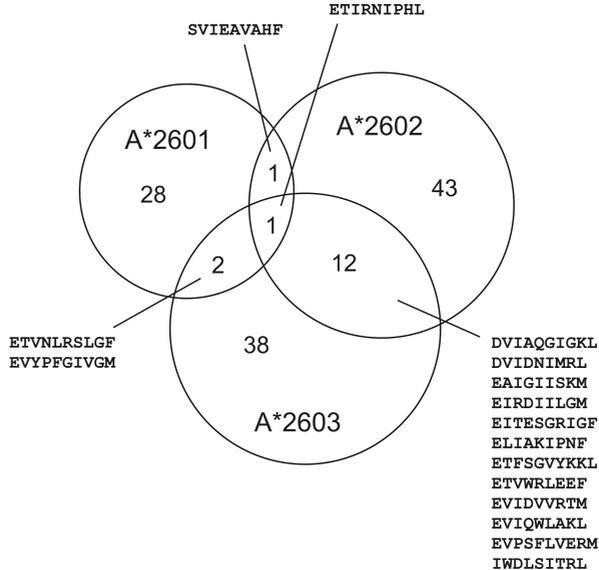


Abbildung 3.17.: Überlappung der Peptidrepertoire der HLA-A*26-Subtypen. Das Venn-Diagramm zeigt die drei Repertoire und deren Überlappung – soweit möglich – proportional an.

HLA-A*26-präsentierte Peptide wurden nur vereinzelt auf anderen Allelen gefunden. Einzig mit HLA-A*25 ist die Überlappung etwas stärker ausgeprägt. 18 von insgesamt 185 auf HLA-A*26, -A*2601, -A*2602 oder -A*2603 detektierten Peptiden konnten von den HLA-A*25⁺ sources RCC103_T und Ma-Mel-8a eluiert werden (Anhang A.8). Ein Blick auf die Primärsequenz von HLA-A*25 zeigt, dass sich HLA-A*25 von den HLA-A*26-Subtypen nur in den Resten unterscheidet, die für Tasche F eine Rolle spielen. Gegenüber HLA-A*2601

sind sieben Aminosäuren ausgetauscht, allerdings nicht der Rest, der die Größe der aufgenommenen Seitenketten beschränken kann. Asp₁₁₆ lässt hier große, aromatische Aminosäuren zu.

Koga et al. (2003) haben gezeigt, dass das gleiche Peptid aus dem ribosomalen Protein S2, S2₂₅₄₋₂₆₂, bei PBMCs aller drei HLA-A*26-Subtypen eine IFN- γ -Produktion hervorruft, die mehr oder weniger gut HLA-A*26⁺ Krebszellen lysieren kann (Koga et al., 2003). In einer Studie von Kawashima et al. (2005) wurden zwei neue HLA-A*2603-restringierte HIV-1-Epitope vorgestellt. CD8⁺ T-Zellen gegen Gag₁₆₉₋₁₇₇ (EVIPMFSAL) können sowohl in HLA-A*2601⁺ als auch in -A*2603⁺ Spendern gefunden werden. Dieses Peptid zeigt auch im Bindungstest eine gute Affinität zu beiden Subtypen. Das Env₆₃₋₇₂-Peptid (EVHNVWATHA) hingegen bindet erheblich besser an HLA-A*2603 und spezifische T-Zellen können nur in HLA-A*2603⁺ Spendern gefunden werden. Dies liegt vermutlich unter anderem daran, dass das kleine C-terminale Alanin für HLA-A*2603 prädestiniert ist, da dieser Subtyp die kleinste Tasche F aufweist. In der größeren Tasche von HLA-A*2601 kann die kleine Aminosäure vermutlich nicht genügend stabilisierende Wechselwirkungen eingehen. Kürzlich wurde nun auch gezeigt, dass Gag₁₆₉₋₁₇₇ auch bei HLA-A*2602⁺ Spendern ein – wenn auch subdominantes – Epitop darstellt (Kawashima et al., 2008).

Diese Beispiele belegen, dass es kreuzreaktive T-Zellen innerhalb der Subtypen des gleichen Antigens geben kann, aber sicher nicht geben muss. Ob ein Peptid von T-Zellen als Epitop erkannt wird, hängt also nicht nur von der Peptidsequenz ab, sondern auch vom präsentierenden Subtyp.

3.2.5. Überlappung über Antigengrenzen hinweg: HLA-B*3801, -B*3901, -B*3902

Um die Überlappung von HLA-Ligandomen innerhalb eines Antigens⁸ und über Antigengrenzen hinweg zu untersuchen, wurden die Liganden von HLA-B*3801, -B*3901 und -B*3902 analysiert (Abbildung 3.18). Schon bei den Peptidmotiven (Anhang 3.1.5) zeigt sich, dass HLA-B*3901 dem HLA-B*3801 – also einem anderen HLA-Antigen – erheblich ähnlicher ist als einem weiteren Subtyp „seines“ Antigens, HLA-B*3902. HLA-B*3901 und -B*3902 sind entsprechend ihrer Ankerreste in P2 unterschiedlichen Supertypen zuzuordnen.

Die zeigt sich auch bei den Liganden: HLA-B*3902 hat mit keinem der anderen beiden Allele gemeinsame Peptide. Die Repertoires von HLA-B*3801

⁸Mit Antigen werden die zweistellig angegebenen Allotypen bezeichnet (z.B. HLA-B*39). Zu einem Antigen gehören verschiedene Subtypen (z.B. HLA-B*3901 und -B*3902)

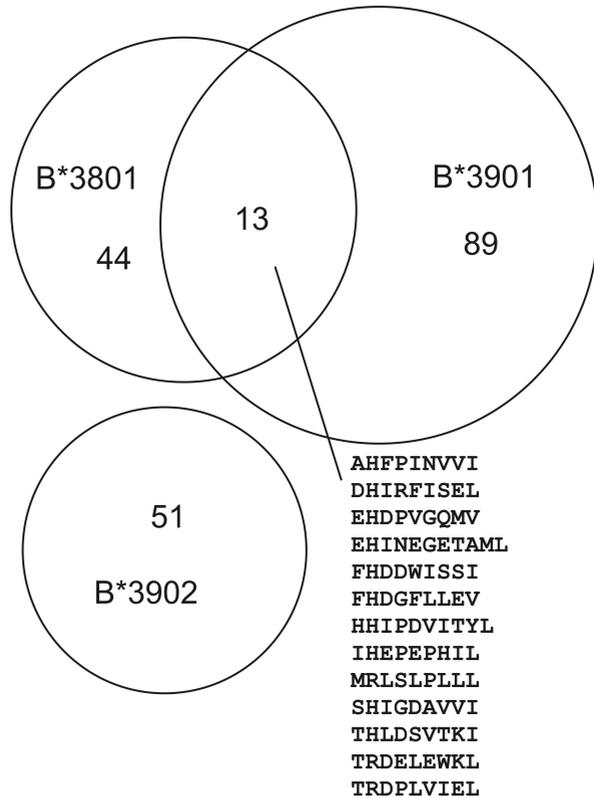


Abbildung 3.18.: Überlappung der Peptidrepertoires von HLA-B*3801, - B*3901 und -B*3902. Das Venn-Diagramm zeigt die drei Repertoires und deren Überlappung – soweit möglich – proportional an.

und -B*3901 hingegen überlappen deutlich: Etwa ein Viertel der HLA-B*3801-Liganden wurde auch auf HLA-B*3901 gefunden. Aus Perspektive des HLA-B*3901 sind es aufgrund der größeren Anzahl bekannter Liganden nur etwa ein Achtel. Die Peptide, die sowohl auf HLA-B*3801 als auch -B*3901 gefunden wurden, weisen im Einklang mit den Motiven beider Allotypen in P2 meist ein Histidin, seltener ein Arginin auf. P Ω wird vor allem von Leucin gebildet. Es stellt sich die Frage, wie sich die Überlappung – insbesondere von HLA-B*3801 und -B*3901 – entwickeln würde, wenn noch erheblich mehr Liganden sequenziert würden. Einen Anhaltspunkt bietet hier die Tatsache, dass nur ein Achtel der über 100 bekannten Peptide von HLA-B*3901 auch auf HLA-B*3801 gefunden wurde. Daher ist zu erwarten, dass die Überlappung mit zunehmender Ligandenzahl keinesfalls zunimmt und vermutlich sogar noch weiter abnimmt.

Für keinen der betrachteten Subtypen sind T-Zell-Epitope bekannt. Es kann nur gemutmaßt werden, dass HLA-B*3902-Epitope sicher keine T-Zell-Reaktionen in HLA-B*3801⁺ oder -B*3901⁺ Spendern hervorrufen. Dagegen könnte die Kreuzreaktivität zwischen HLA-B*3801 und -B*3901 deutlicher ausgeprägt sein, letzten Endes jedoch wie bei den HLA-A*26-Subtypen stark vom betrachteten Peptid und HLA-Molekül abhängen.

3.2.6. Überlappung von Peptidrepertoires innerhalb des HLA-B44-Supertyps

Um die Überlappung der Peptidrepertoires der neun HLA-Allotypen des HLA-B44-Supertyps zu untersuchen, wurden drei grundlegend unterschiedliche Methoden verwendet. Zunächst wurde eine sehr große Anzahl von HLA-Liganden von den verschiedensten Zelllinien und Geweben massenspektrometrisch sequenziert (siehe 3.1.6). In dieser Sammlung wurde dann nach solchen Peptiden gesucht, die auf mehr als einem Allotyp gefunden worden waren. Von den 670 Liganden des HLA-B44-Supertyps wurden lediglich 25 von mehr als einem Allotyp präsentiert. Von diesen 25 wurden wiederum nur zwei Peptide von mehr als zwei unterschiedlichen HLA-Molekülen isoliert (Abbildung 3.19). KEIFLRELI gehört zum HLA-Ligandom von drei Mitgliedern des Supertyps (HLA-B*4001, -B*4402, -B*4901), REIFLSQPILL zu vieren (HLA-B*4001, -B*4101, -B*4701, -B*4901).

Um auszuschließen, dass die fehlende Überlappung der Peptidrepertoires auf eine zu geringe Anzahl der sequenzierten Peptide zurückzuführen ist, wurden weitere Vergleiche vorgenommen, die nicht auf Peptidsequenzen, sondern auf Peptidsignalen und Fragmentspektren beruhen. Im Übrigen ist festzuhalten, dass von HLA-B*37 und HLA-B*4001 jeweils 60 Liganden bekannt sind. HLA-

3. Ergebnisse und Diskussion

B*1801				EASLLHQF EEFELLGKAY EEFGQAFSF NEITIPVTF SEIELFRVF SEVILHHEY TEFRNFVW				
	B*37							
		B*4001	REIFLSQPILL	AEDPLGAIHL KEIFLRELI KESTLHLVL SEIDQLFRIF SESPIVVVL		REIFLSQPILL	AEIRHVLVTL KEIFLRELI REIFLSQPILL TEITHAVVI	
			B*4101		AEAIRILAA KEYERFSKY NEDLRSWTA	REIFLSQPILL	REIFLSQPILL WEDEGVRAC	AEAAVAVA VEVPETPKA
				B*4402			AEFKQIRSI AEINNIKI KEIFLRELI	
					B*4501			REHAPFLVA
						B*4701	GEHGLIIRV REIFLSQPILL	
							B*4901	
								B*5001

Abbildung 3.19.: Promiskuitive HLA-Liganden des HLA-B44-Supertyps. Die Überlappung der HLA-Ligandome verschiedener Allotypen ist schematisch dargestellt. Peptidsequenzen, die auf zwei verschiedenen HLA-Allelen gefunden wurden, stehen in dem Feld, in dem sich Zeile und Spalte der beiden Allele kreuzen. Nur 25 der insgesamt 670 HLA-Liganden des Supertyps wurden auf mehr als einem Allel detektiert.

B*37 zeigt keinerlei Überschneidungen mit anderen Allotypen, HLA-B*4001 jedoch mit drei anderen. Schon dies macht einen Einfluss der Ligandenzahl eher unwahrscheinlich, auch wenn er nicht völlig auszuschließen ist.

Eine markierungsfreie massenspektrometrische Vorgehensweise – der *data-dependent ion selection*- (DDIS-)Ansatz – wurde eingesetzt, um die Überlappung der HLA-Ligandome von drei B-LCLs unabhängig vom Erfolg der Peptidsequenzierung zu untersuchen, die stark von Abundanz und Sequenz abhängig ist. Die verwendeten Zelllinien sind bezüglich des HLA-B-Locus homozygot. EMJ exprimiert HLA-B*4001, Awells HLA-B*4402 und BM15 HLA-B*4901. Die HLA-präsentierten Peptide wurden mit Hilfe des HLA-B,-C-spezifischen monoklonalen Antikörpers B1.23.2 isoliert. Mit jeder der drei Proben wurden mehrere LC-MS/MS-Experimente mit datenabhängiger Aufzeichnung (DDIS) durchgeführt. Dabei kontrolliert der Computer, welche der im Elektrospray der Probe auftretenden Vorläufer-Ionen für eine Fragmentierung ausgewählt werden. Die verschiedenen Messungen wurden direkt hintereinander und in zufälliger Reihenfolge der drei Proben ausgeführt. Die zur Fragmentierung ausgewählten Vorläufer-Ionen aus den verschiedenen Experimenten wurden anschließend verglichen (Abbildung 3.20). Insgesamt wurden 6159 Fragmentspektren aus sieben verschiedenen LC-MS/MS-Experimenten (jeweils zwischen 745 und 946 Spektren) für die Vergleiche herangezogen.

Bei Vergleichen von je zwei verschiedenen Zelllinien konnte lediglich eine Überlappung von unter 3% festgestellt werden. Vor allem die Überschneidung der Peptidrepertoires von HLA-B*4402 und -B*4901 war mit 0,6% sehr gering. Beim Vergleich aller drei Proben konnten im Durchschnitt nur 0,6% der Spektren einer Messung in den Messungen der anderen Proben wiedergefunden werden. Dabei ist zu beachten, dass der Anteil identischer Spektren in zwei LC-MS/MS-Experimenten mit derselben Probe bei nicht zu niedrigen Peptidmengen zwischen 50 und 60% liegt.

Vor allem die Überschneidung zwischen HLA-B*4901 und -B*4402 war extrem gering, während Fragmentspektren aus der HLA-B*4001-Probe etwas häufiger in den anderen beiden Proben gefunden wurden. Eine ähnliche Tendenz zeigt schon die Sammlung promiskuitiver Peptide (Abbildung 3.19). Möglicherweise spiegeln diese Beobachtungen das Ausmaß der Individualität der Peptidmotive wider. Während Isoleucin (HLA-B*4901) und aromatische Reste (HLA-B*4402) in P Ω eine Besonderheit ihres jeweiligen Allotyps sind, findet sich das die Tasche F von HLA-B*4001 dominierende Leucin auch unter den Liganden der anderen Allele.

Das dritte eingesetzte massenspektrometrische Verfahren basiert auf der differentiellen Modifikation der Peptide zweier Proben mittels Isotopenmarkie-

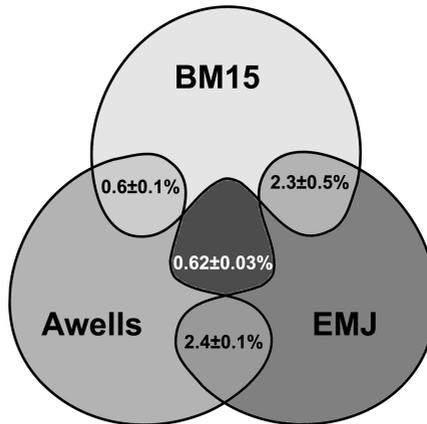


Abbildung 3.20.: Markierungsfreie Untersuchung der Überlappung der HLA-Ligandome von drei Allotypen des HLA-B44-Supertyps. Die markierungsfreie Analyse der Überlappung dreier Peptidrepertoires erfolgt anhand der in LC-MS/MS-Experimenten mittels DDIS fragmentierten Vorläufer-Ionen. Diese werden aufgrund von Retentionszeit, m/z -Wert und Fragmentspektrum verglichen. Die Überlappung ist in % als Mittelwert zusammen mit dessen Fehler angegeben ($M \pm SE$, $n = 8$ bei paarweisen Vergleichen, $n = 72$ beim dreifachen Vergleich).

3.2. Überlappung von HLA-Liganden

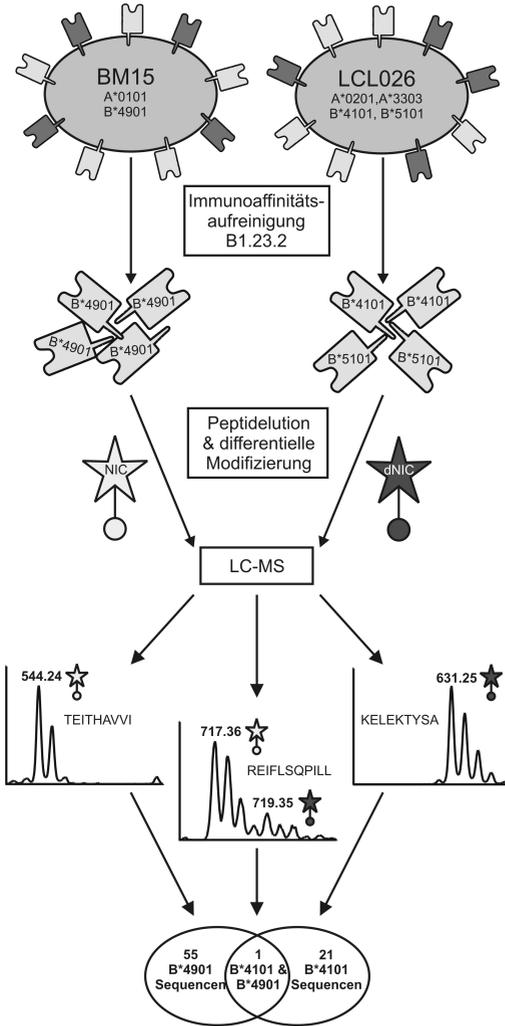


Abbildung 3.21.:

Vergleich zweier HLA-Ligandome mittels differentieller Modifizierung. Die von HLA-B*4901 und -B*4101 präsentierten Liganden wurden durch Isotopenmarkierung differentiell modifiziert und in einem LC-MS-Experiment analysiert. Darin wurden nur wenige Signalpaare, aber eine große Anzahl von Einzelsignalen gefunden. Viele Peptide konnten in LC-MS/MS-Experimenten sequenziert werden.

rung, dem dNIC-Ansatz (Weinzierl und Stevanovic, 2006). Es erlaubt den paarweisen Vergleich HLA-präsentierter Peptide, in diesem Fall von HLA-B*4901 und -B*4101, die von den B-LCLs BM15 und LCL026_ZL mit dem Antikörper B1.23.2 extrahiert wurden (Abbildung 3.21). Die Peptide der Zelllinie BM15 wurden mit der leichten Variante des Nicotinylierungsreagenz modifiziert, die der Zelllinie LCL026_ZL mit der 4 Da schwereren, deuterierten Form. Gleiche Mengen an Peptid von beiden Proben wurden gemischt und mittels LC-MS analysiert. Das LC-MS-Experiment ohne Fragmentierung wurde nach Paaren von Signalen mit 4 Da Unterschied durchsucht. Es wurden nur Signale berücksichtigt mit einer Intensität von mindestens 1000 cts/s, die eindeutig über dem Hintergrund liegt. Insgesamt wurden 513 Einzelsignale, aber nur 2 Signalkopiepaare detektiert (0,3%). Durch LC-MS/MS-Experimente mit den einzelnen, nicht vermischten Proben konnten die Sequenzen von 56 HLA-B*4901- und 22 HLA-B*4101-präsentierten Peptiden bestimmt werden. Nur eines dieser Peptide trat bei der LC-MS-Messung als Signalkopiepaar auf und war somit im Peptidrepertoire beider Allotypen vorhanden.

Damit führen alle drei methodisch sehr unterschiedlichen Ansätze zur gleichen Schlussfolgerung: Die HLA-Ligandome verschiedener Allotypen des HLA-B*44-Supertyps überlappen nur minimal.

3.2.7. HLA-A3: Ein anderer Supertyp zeigt andere Ligandomüberlappungen

Ausgehend von HLA-A*03 wurde die Überlappung von HLA-Ligandomen innerhalb eines weiteren Supertyps untersucht, um über den HLA-B44-Supertyp hinaus noch Anhaltspunkte für das Verhalten bei anderen Supertypen zu ermitteln. Dabei ist festzustellen, dass 26 der 283 HLA-A*03-Liganden – also knapp 10% – auch auf weiteren Allelen gefunden wurden. Die größte Überlappung gibt es innerhalb des Supertyps: HLA-A*03 hat mit HLA-A*11 16 Peptide gemein (Abbildung 3.22).

Die Betrachtung der HLA-Primärsequenzen zeigt sieben Aminosäure-Austausche zwischen HLA-A*03 und -A*11, von denen jedoch keiner direkt an Tasche F beteiligt ist. Trotzdem ist die zweithäufigste Aminosäure nach Lysin bei HLA-A*03 Tyrosin, bei HLA-A*11 jedoch Arginin. Tasche B unterscheidet sich nur in zwei Resten, darunter Position 9. Bei HLA-A*03 lässt das Phe₉ noch längere, aliphatische Seitenketten wie Leucin zu. Dieses kommt bei HLA-A*11 fast nicht mehr vor, da hier Tyr₉ den Platz in der Tasche so beschränkt, dass nur noch kurz-kettige Aminosäuren wie Threonin hineinpassen. Valin ist bei beiden Allelen in P2 prominent vertreten. Entsprechend sind unter den 16 auf beiden

Allelen gefundenen Liganden vor allem solche mit Valin in P2. Am C-Terminus befindet sich fast immer Lysin.

Besonders außergewöhnlich ist, dass das Allel, mit dem es die zweitgrößte Überlappung gibt, nicht zum HLA-A*03-Supertyp gehört und nicht einmal zu den HLA-A-Allelen: Sechs Peptide überlappen mit dem Repertoire von HLA-B*1501. Entsprechend der Gemeinsamkeiten der beiden Peptidmotive zeigen diese Peptide in PΩ keine basischen Reste, da diese nicht zu HLA-B*1501 passen würden, sondern aromatische und dabei vor allem Tyrosin. In P2 unterscheiden sich die beiden Allele nur in einer der dominanten Aminosäuren. Während die drei häufigsten Reste bei HLA-A*03 Leucin, Valin und Isoleucin sind, kommt bei HLA-B*1501 noch das Glutamin als dominanter Rest hinzu. Glutamin in P2 ist bei HLA-A*03 zwar sehr selten, kommt jedoch bei fünf Peptiden vor, darunter eines, das auch auf HLA-B*1501 zu finden ist. Insgesamt ist die Überlappung von HLA-A*03 und HLA-B*1501 mit unter 3% jedoch minimal.

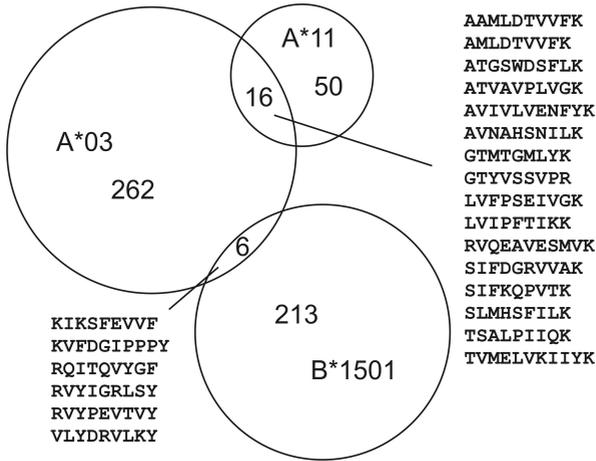


Abbildung 3.22.: Überlappung der Peptidrepertoires von HLA-A*03, -A*11 und -B*1501. Die meisten der HLA-B*1501-Liganden (160 von 219) wurden von Verena Meyer sequenziert. Das Venn-Diagramm zeigt die drei Repertoires und deren Überlappung – soweit möglich – proportional an.

Insgesamt sind 438 verschiedene Peptide bekannt, die von Mitgliedern des

HLA-A3-Supertyps präsentiert werden (Tabelle 3.11). Der Anteil der Peptide, die nur auf einem Allotyp präsentiert werden, ist dabei je nach Allel recht unterschiedlich. Allerdings sind bislang nur bei drei von sechs Supertypmitgliedern mehr als 50 Liganden bekannt, was für eine detailliertere Beurteilung nicht ausreicht. Es ist jedoch die Tendenz zu einer im Vergleich zum HLA-B44-Supertyp stärker ausgeprägten Überlappung zwischen den Allelen des HLA-A3-Supertyps zu erkennen.

Schon Kubo et al. (1994) haben in Bindungsstudien beobachtet, dass das Verhalten von Peptiden gegenüber HLA-A*03 und -A*11 recht unterschiedlich sein kann: Einige Peptide binden gut an beide Allele, andere nur an eines davon. In vielen Studien wurde in der Folgezeit die Kreuzreaktivität von T-Zellen innerhalb des HLA-A3-Supertyps untersucht. Tabelle 3.12 zeigt einige Beispiele für T-Zell-Epitope, die von verschiedenen Mitgliedern des HLA-A3-Supertyps restringiert sein können.

Insgesamt weisen also die bisher bekannten Liganden und T-Zell-Epitope darauf hin, dass Promiskuität innerhalb des HLA-A3-Supertyps – im Gegensatz zum HLA-B44-Supertyp – stärker vorhanden ist. Folglich lässt sich die Frage nach der Überlappung von Peptidreperitoires von Mitgliedern eines HLA-Supertyps nicht pauschal beantworten: Jeder Supertyp muss individuell analysiert werden. Erst dann lässt sich auch im Hinblick auf klinische Anwendungen die Frage beantworten, ob Immuntherapien mittels Peptidvakzinierungen bei den verschiedenen Supertypen durch Ligandomüberlappung und Kreuzreaktivität von T-Zellen vereinfacht werden können oder nicht.

3.2.8. Zusammenfassung und Ausblick

Eine gute technische Reproduzierbarkeit bei LC-MS/MS-Experimenten sowie eine sehr hohe biologische Reproduzierbarkeit bei HLA-Peptid-Extraktionen zeigen, dass die vorhandene Methodik sich gut für die Untersuchung von HLA-Ligandom-Überlappungen eignet. Während HLA-A*02 nur wenige Liganden mit anderen HLA-Allelen gemeinsam hat, ist die Überlappung zwischen den Subtypen des HLA-A*26-Antigens stärker ausgeprägt. Für ein weiteres Antigen, HLA-B*39, trifft dies hingegen nicht zu. Seine Subtypen weisen untereinander keine überlappenden Peptide auf. Dafür besteht jedoch eine Überlappung mit einem verwandten Antigen, HLA-B*38. Die Überlappung kann über Antigengrenzen hinweg also größer sein als innerhalb. Auch die Peptidreperitoires der zum HLA-B44-Supertyp gehörenden Allotypen enthalten kaum promiskuitiv präsentierte Peptide. Drei grundverschiedene MS-basierte Ansätze haben gezeigt, dass die Überlappung mit weniger als 3% sehr gering ist. Für einen an-

Tabelle 3.11.: Überlappung innerhalb des HLA-A3-Supertyps. Die Peptidmotive wurde basierend auf den in der internen Peptiddatenbank enthaltenen Liganden aufgestellt. Für HLA-A*03 und -A*66 siehe 3.1.

HLA	Überlappung		Peptidmotiv	
	Liganden	keine im HLA-A3-ST	P2	PQ
A*03(01)	283	257	16 A*11, 1 A*31, 1 A*68	L V I T K Y
A*11(01)	66	47	16 A*03, 2 A*31, 3 A*68	V T S I K R
A*31(01)	27	24	1 A*03, 2 A*11, 1 A*66	V Q Y R
A*33(03)	6	5	1 A*68	V S T F R
A*6601	52	48	1 A*31, 3 A*68	V L I T R
A*68	30	20	1 A*03, 3 A*11, 1 A*33, 3 A*66	V T I A R K

Tabelle 3.12.: Von verschiedenen Allelen des HLA-A3-Supertyps restringierte T-Zell-Epitope

Sequenz	Symbol	Position	HLA	Referenz
STLPEFTTVVRR	HBcAg	141-151	A*3101, A*6801	Missale et al. (1993)
LLGPGRPYR	TYRP2	197-206	A*03, A*3101, A*3301	Hogan et al. (1998); Wang et al. (1996, 1998)
EVISCKLIKRR	TYRP2	221-231	A*3301, A*6801	Lupetti et al. (1998)
ALNFPGSQK	SILV	87-95	A*03, A*1101	Kawashima et al. (1998)
AVFDRKSDAK	EBNA4	399-408	A*1101, A*6801	Levitsky et al. (2000)
ALLAVGATK	SILV	17-25	A*03, A*1101, A3101, A*6801	Hogan et al. (2005); Skjpper et al. (1996)
YLPFRNCPR	ACPP/ PAP	123-131	A*1101, A*3101, A*3301	Matsueda et al. (2005)
GIHKQKEKSR	ACPP/ PAP	216-225	A*1101, A*3101, A*3301	Matsueda et al. (2005)
GAAPLILSR	KLK3/ PSA	16-24	A*1101, A*3101, A*3301	Matsueda et al. (2005)
KVFRGNKVK	FOLH1/ PSMA	207-215	A*1101, A*3101, A*3301	Matsueda et al. (2005)
APAGRPSASR	IER3	47-56	A*11, A*31, A*33	Matsueda et al. (2007)
RSRRVLYPR	IER3	61-69	A*11, A*31, A*33	Matsueda et al. (2007)
VLYPRVYRR	IER3	65-73	A*31, A*33	Matsueda et al. (2007)

deren Supertyp hingegen, HLA-A3, gibt es erste Anhaltspunkte für eine stärker ausgeprägtere Promiskuität.

All diese Beispiele zeigen, dass Ligandome verschiedener HLA-Allele trotz ähnlicher Peptidmotive oder enger Verwandtschaft meist nicht überlappen. Pauschale Aussagen können jedoch nicht getroffen werden. Jedes Allel muss eigens analysiert werden. Dabei sollten verschiedene Methoden angewendet und insbesondere direkte Vergleiche von HLA-Peptidrepertoires verschiedener Allotypen durchgeführt werden, um beispielsweise auch weniger abundante Liganden erfassen zu können und damit die Aussagekraft der Ergebnisse deutlich zu erhöhen.

3.3. Analyse von HLA-Ligandomen nach Gesichtspunkten der Proteomik

Die Analysen von HLA-Ligandomen auf der einen und Proteomen auf der anderen Seite zeigen viele Ähnlichkeiten. In beiden Fällen werden große Datenmengen erzeugt und nach spezifischen Zusammenhängen und Auffälligkeiten durchsucht. In der Proteomik sind beispielsweise Biomarker, die spezifisch für ein Gewebe oder einen pathologischen Zustand sind, Gegenstand intensiver Untersuchungen. Proteinidentifizierungen im großen Stil verlangen ebenfalls nach zuverlässigen Markern, für die proteotypische Peptide geeignete Kandidaten sind. Doch nicht nur die Identifizierung von Proteinen, sondern auch deren Quantifizierung sowie die Verfolgung ihrer Lebenszyklen spielen in der Proteomik zunehmend eine Rolle.

Diese Konzepte der Proteomanalyse sollen im Folgenden auch auf die Untersuchung von HLA-Peptidrepertoires übertragen werden. So werden zunächst die Gewebs- sowie die Allotypspezifität der Peptide näher betrachtet. Abschließend werden einige Besonderheiten der Quellproteine von HLA-Liganden, die möglicherweise näheren Aufschluss über die Prinzipien der Antigenprozessierung geben, charakterisiert.

3.3.1. Gewebsspezifität

3.3.1.1. Auf Ligandom-Ebene

Um erste Erkenntnisse über die Gewebsspezifität von HLA-Liganden zu gewinnen, wurden Liganden miteinander verglichen, die auf demselben Allel jedoch auf verschiedenen Geweben, „Gewebszuständen“ und Gewebstypen präsentiert

wurden. Nur solche Allele wurden näher betrachtet, für die bereits viele Liganden bekannt sind: HLA-A*02 und -A*03. Doch selbst hier sind die Vergleiche zumeist wenig aussagekräftig, da die Ligandenzahlen nicht groß genug sind. Allerdings lassen sich erste Tendenzen beobachten, die in Zukunft systematisch zu untersuchen sind.

Verschiedene „Gewebszustände“ Zunächst wurden Tumor- und Normalgewebe des gleichen Patienten (RCC099) verglichen (Weinzierl et al., 2007). Es handelt sich also um Nierengewebe des gleichen Individuums, allerdings in unterschiedlichen „Zuständen“. Gleiches trifft auf das Tumorgewebe und die daraus abstammende Zelllinie von Patient RCC068 zu, die ebenfalls verglichen wurden (Tabelle 3.13). Die Daten von RCC068 stammen vor allem von Tobias Krüger.

Dabei können die Vergleiche auf HLA-A*02-präsentierte Peptide beschränkt oder für alle Klasse-I-Allelen zuweisbaren Peptide oder aber für alle insgesamt gefundenen Peptide (inklusive der nicht zuweisbaren) durchgeführt werden. Die Peptidzahl nimmt dabei in dieser Reihenfolge zu. Verfolgt man die Entwicklung der Überlappung, so erhält man Hinweise auf den Einfluss der Peptidanzahl auf das beobachtete Ausmaß der Überlappung von Ligandomen. Die größte Veränderung der Überlappung gibt es beim Anstieg der Ligandenzahl von 26 auf 86 (RCC068). Bei ausreichend großen Anzahlen (etwa ab 50) variiert die Überlappung nicht mehr so stark. Die genaue Festlegung einer Mindestzahl an Liganden für Überlappungsanalysen ist jedoch anhand der gegebenen, beschränkten Datenlage nicht möglich.

Diese Schwankungen könnten allerdings auch dadurch zustande kommen, dass die Ligandüberlappung vom betrachteten Allel abhängt. Doch auch diese Frage kann auf Grundlage der vorhandenen Daten nicht geklärt werden.

Insgesamt erwecken die Vergleiche der Gewebszustände von RCC068 und RCC099 den Eindruck, dass sich die Peptidrepertoires von Tumor- und Normalgewebe stärker ähneln als die von Tumor und Zelllinie. Zur weiteren Untersuchung wurden alle HLA-A*02-Liganden von Normalgeweben, Tumorgeweben und den davon abstammenden Zelllinien von RCC-Patienten miteinander verglichen (Abbildung 3.23). Die Ligandome verschiedener Patienten wurden dabei gepoolt, da die Ligandenzahlen sonst viel zu gering wären. Allerdings wird der Vergleich daher von interindividuellen Unterschieden zwischen den Patienten beeinflusst (siehe unten). Die bereits beobachtete Tendenz, dass Tumorgewebe dem Normalgewebe stärker ähnelt als den aus dem Tumorgewebe hervorgegangenen Zelllinien ist jedoch auch hier festzustellen. Sie war bereits

Tabelle 3.13.: Vergleich verschiedener „Zustände“ des gleichen Gewebes. Für je zwei verschiedenen Zustände (Tumor (_T), Normal (_N), Zelllinie (_ZL) sind für die Nierengewebe der Patienten RCC099 und RCC068 die Anzahl (LZ) an A*02- bzw. HLA-Klasse-I-präsentierten Liganden sowie die Gesamtpeptidzahl (alle) angegeben. Außerdem ist die Überlappung (Ü) mit dem jeweils anderen „Zustand“ aufgeführt.

	RCC068_ZL		RCC068_T		RCC099_T		RCC099_N	
	LZ	Ü	Ü	LZ	LZ	Ü	Ü	LZ
A*02	128	10%	54%	26	82	66%	81%	67
Klasse I	211	13%	69%	86	164	62%	84%	122
alle	245	11%	72%	101	173	62%	81%	133

zu erwarten, denn primäre Zellen verändern sich in der Zellkultur schon innerhalb weniger Tage so stark, sodass sie mit der *in vivo*-Situation nur noch wenig gemeinsam haben: während beispielsweise in primären B-Zellen Cathepsin G die Antigenprozessierung von MBP (*myelin basic protein*) dominiert, spielen in B-Zelllinien vor allem AEP (*asparaginyl endopeptidase*) und Cathepsin S eine Rolle (unveröffentlichte Daten, Christina Stöckle).

Verschiedene Individuen Um die bereits erwähnten Unterschiede zwischen gleichen Geweben verschiedener Individuen näher zu untersuchen, wurden die aus den primären Tumorgeweben verschiedener RCC-Patienten (alle klarzellige Nierenkarzinome mit Einordnung T3) extrahierten HLA-A*02-Liganden miteinander verglichen. Dabei wurden zunächst die Patienten RCC099, RCC115 und RCC068 betrachtet, da für diese die meisten HLA-A*02-Liganden bekannt sind (Abbildung 3.24(a)). Da die Peptidanzahl in allen drei Fällen aber sehr unterschiedlich ist (82, 39 bzw. 26 Peptide) wurden außerdem RCC116, RCC001 und RCC068 verglichen. Hier sind die Anzahlen bekannter HLA-A*02-Liganden mit 24, 25 bzw. 26 sehr ähnlich (Abbildung 3.24(b)). Auch mit HLA-A*03⁺ RCC-Patienten erfolgte ein Vergleich (Abbildung 3.24(c)).

Die Vergleiche zeigen wiederum, dass die Ligandenzahl die beobachtete Überlappung beeinflusst. Diese ist um so kleiner, je weniger Peptide eines HLA-Ligandoms bekannt sind. Auch ist zu berücksichtigen, dass die Messungen für RCC001 und RCC068 *offline* mittels Nanospray erfolgten. Dabei können in der Regel weniger Peptide sequenziert werden als bei *online*-LC-MS-Kopplung. Insgesamt zeigt sich der Trend, dass die Tumore verschiedener Individuen, ob-

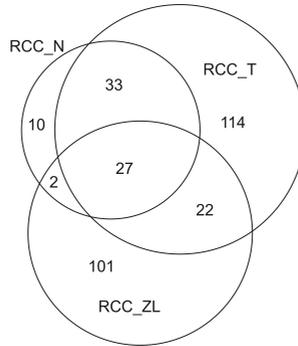


Abbildung 3.23.: Überlappung der HLA-A*02-Ligandome von Normalgewebe (_N), Tumorgewebe (_T) und daraus abstammenden Zelllinien (_ZL) der Gesamtheit aller RCC-Patienten.

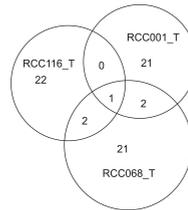
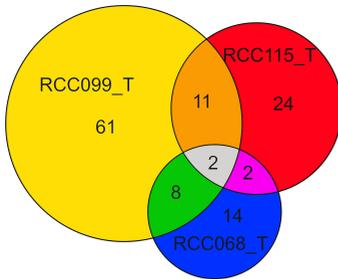
wohl sie aus dem gleichen Gewebe (Niere) stammen und im gleichen „Zustand“ (primärer Tumor) sind, nur wenig überlappen.

Interindividuelle Unterschiede sind auch bei verschiedenen B-LCLs zu erwarten. Diese wurden alle durch EBV-Transformation von B-Zellen hergestellt, stammen aber von verschiedenen Individuen (Abbildung 3.25). Im Vergleich zu den primären RCC-Geweben von Patienten scheint die Überlappung jedoch stärker ausgeprägt zu sein. Plausibel zu erklären wäre dies dadurch, dass RCCs zu den besonders heterogenen Tumoren gehören und dass sich die Zelllinien durch langjährige Zellkultur stärker angeglichen haben.

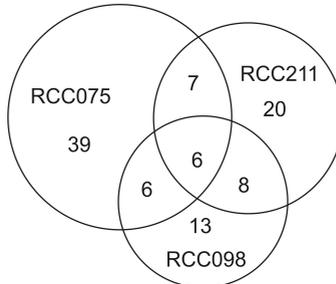
Verschiedene Ursprungsgewebe Bei HeLaP83.30 handelt es sich um eine Zelllinie, die aus Gebärmutterhalskrebs stammt, während RCC068_ZL aus Nierenkrebs stammt. Beide sind also im gleichen „Zustand“ – Krebszelllinien – aber aus verschiedenen Geweben und verschiedenen Individuen. Trotz dieser beiden bedeutenden Unterschiede ist die beobachtete Überlappung der 86 HLA-A*02-Peptide aus HeLaP83.30 und der 128 aus RCC068_ZL überraschend groß (Abbildung 3.26(a)).

Vergleicht man die Peptidrepertoires von A*03⁺, primären RCC- und CCA-Geweben, scheinen sich diese ebenfalls stärker zu ähneln (Abbildung 3.26(b)). Bei beiden handelt es sich um primäre Tumorgewebe (verschiedener Patienten), die sich in ihrem Ursprungsgewebe – Niere oder Dickdarm – unterscheiden.

3.3. Analyse von HLA-Ligandomen nach Gesichtspunkten der Proteomik



(a) A*02⁺ RCCs mit möglichst vielen (b) A*02⁺ RCCs mit möglichst ähnlichen Ligandenzahlen



(c) A*03⁺ RCCs

Abbildung 3.24.: Überlappung der Ligandome verschiedener RCC-Patienten

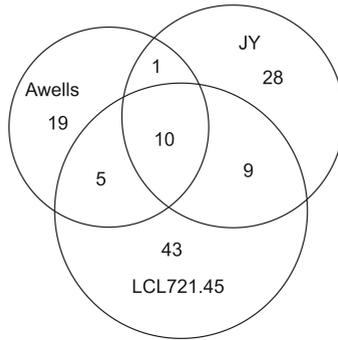


Abbildung 3.25.: Vergleich der HLA-A*02-Ligandome dreier B-LCLs

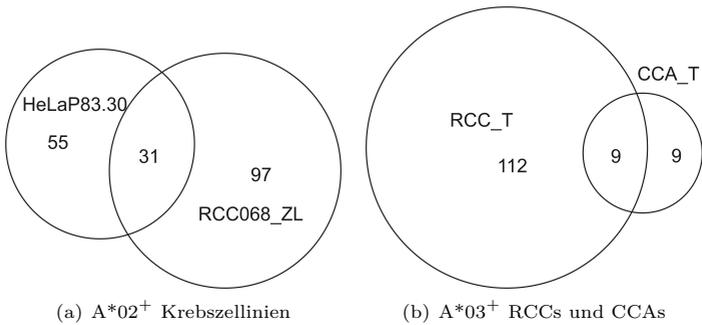


Abbildung 3.26.: Überlappung der Ligandome verschiedener Tumorarten

Verschiedene Gewebstypen Der Gewebstyp definiert sich durch eine gewisse Kombination von „Gewebzustand“ (primäres Tumor-/ Normalgewebe, Zelllinie), Ursprungsgewebe (Niere, Gebärmutterhals, B-Zellen, ...) und Entstehung (aus primärem Gewebe, durch EBV-Transformation,...). Die *Sources* der meisten HLA-A*02-präsentierten Peptide lassen sich in einen von drei Gewebstypen einordnen (Tabelle 3.14). Um genügend große Ligandenzahlen zu erreichen, wurden alle bekannten A*02-präsentierten Liganden gepoolt. Die Gruppe der primären Tumore enthält beispielsweise sowohl RCCs als auch CCAs von verschiedenen Patienten. Abbildung 3.27 zeigt, dass es trotz der vielen Unterschiede zwischen den drei Gruppen auch einen deutlichen Anteil an Liganden gibt, die bereits in allen drei detektiert wurden und somit sicher nicht gewebsspezifisch sind.

Tabelle 3.14.: Einteilung in Gewebstypen

Gewebstyp	Zustand	Ursprung	Entstehung	Beispiele
Krebszelllinie	Zelllinie	divers	aus primärem Gewebe	HeLaP83.30, RCC068_ZL
B-LCL	Zelllinie	B-Zellen	EBV-Transformation	Awells, JY, LCL721.45
Primäre Tumoren	Tumor	divers	<i>ex vivo</i>	RCC099_T, CCA172_T

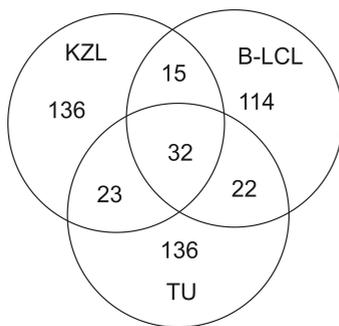


Abbildung 3.27.: Vergleich verschiedener Gewebstypen. Ein Großteil aller bekannten A*02-präsentierten Peptide kann in einen von drei Gewebstypen eingeteilt werden: Krebszelllinien (KZL), B-lymphoblastoide Zelllinie (B-LCL), primäres Tumorgewebe (TU)

3.3.1.2. Auf Transkriptom-Ebene

Auch auf Transkriptom-Ebene wurden Vergleiche verschiedener Gewebszustände, Ursprungsgewebe und Patienten angestellt. Dazu wurden die Expressionsdaten der Arbeitsgruppe Stevanović verwendet, die vor allem von Toni Weinschenk, Oliver Schoor und Mathias Schuler erstellt wurden.

Auf einem DNA Microarray zur Analyse der Genexpression werden zur Detektion der mRNA eines Gens meist mehrere sogenannte *probesets* verwendet. Einer *GeneID* sind also häufig mehrere *probesets* zugeordnet. Diese werden bei der Auswertung danach eingeteilt, ob sie ein Signal zeigen, d.h. ob eine komplementäre RNA in der Probe vorhanden war (*present*, P) oder nicht (*absent*, A). Die Vergleiche verschiedener Gewebe erfolgten auf Ebene der *GeneIDs*, da es vorkommen kann, dass *probesets* der gleichen *GeneID* unterschiedlich mit P und A klassifiziert sind. In die Analysen gingen alle *GeneIDs* ein, für die mindestens ein *probeset* ein Signal (P) zeigt. Verglichen wurden verschiedene „Gewebszustände“ (Zelllinie und Tumor bzw. Tumor und Normalgewebe desselben Patienten), die RCC-Tumorgewebe verschiedener Individuen sowie zwei Zelllinien mit unterschiedlichem Ursprungsgewebe.

Abbildung 3.28 zeigt das Ergebnis dieser Vergleiche. In jedem der betrachteten Gewebe zeigten zwischen 15000 und 20000 *probesets* ein Signal. Dies entspricht der Expression von 9000 und 12000 Genen. Alle Vergleiche zeigen sehr deutliche Überlappungen und nur wenig „spezifisch“ exprimierte Gene. Die Überschneidungen liegen stets zwischen 80 und 90%.

3.3.1.3. Zusammenfassende Betrachtung

Insgesamt scheinen sich verschiedene Gewebe auf Ligandom-Ebene stärker zu unterscheiden als auf Transkriptom-Ebene. Diese Beobachtung kann vorläufig jedoch lediglich als Tendenz gewertet werden, da die Ligandenzahlen die Aussagekraft der Ligandom-Analysen erheblich einschränken. Einige Vergleiche weisen bereits jetzt darauf hin, dass die Überschneidungen mit zunehmender Zahl bekannter Liganden ebenfalls wachsen werden. Der Untersuchung von HLA-Peptid-Repertoires sind zum jetzigen Zeitpunkt nur die abundantesten Liganden zugänglich. Im Rahmen einer Analyse können im besten Fall mehrere Hundert Sequenzen bestimmt werden; das HLA-Ligandom einer einzigen Zelle besteht jedoch vermutlich bereits aus einigen Zehntausend Peptiden. Genauere Aussagen erfordern systematische Vergleiche verschiedener Gewebe beispielsweise über den dNIC- oder den DDIS-Ansatz, wie dies im Fall des HLA-B44-Supertyps schon erfolgt ist.

3.3. Analyse von HLA-Ligandomen nach Gesichtspunkten der Proteomik

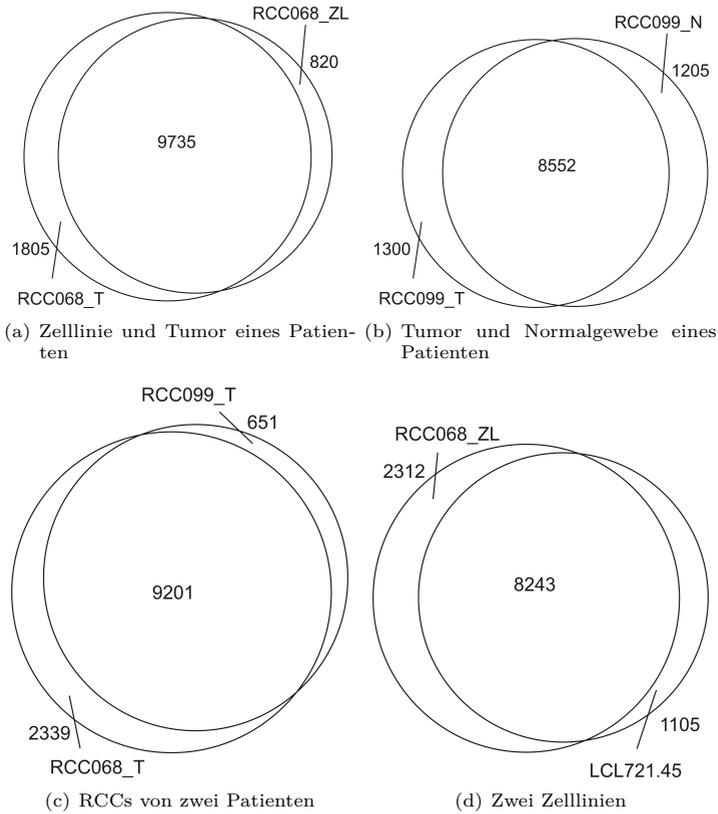


Abbildung 3.28.: Überlappung der Transkriptome verschiedener Gewebe. (a) und (b) verschiedene „Gewebeszustände“; (c) verschiedene Individuen; (d) verschiedene Ursprungsgewebe

Abzuwarten bleibt, ob sich das unterschiedliche Ausmaß der Überlappung verschiedener Gewebe auf Transkriptom- und Ligandomebene in zukünftigen Experimenten bestätigt. Dies ist auf Grundlage des bisherigen Wissensstandes zu allerdings erwarten. Beispielsweise haben Weinzierl et al. (2007) festgestellt, dass keine Korrelation zwischen Transkriptom und Ligandom besteht. Die Anzahl exprimierter Gene liegt ebenfalls im erwarteten Bereich, die Überlappung zwischen verschiedenen Geweben ist jedoch relativ groß. Bei der Analyse der Transkriptome zweier Zelllinien stellten Jongeneel et al. (2003) fest, dass die Anzahl von in einer oder beiden Zelllinien exprimierten Genen zwischen 10000 und 15000 lag. Davon kamen 8500 in beiden vor, während 6000 spezifisch für eine der Linien waren.

Insgesamt sind eher wenige gewebsspezifische Proteine und damit auch HLA-Liganden zu erwarten. So kalkulierte Denis Hochstrasser während des Workshops *Proteomics: From Technologies to Targets and Biomarkers* des Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Instituts an der Universität Tübingen (NMI) im Februar 2006: Von 23000 menschlichen Genen werden maximal 18000 in einer Zelle transkribiert. Davon werden etwa 2500 konstitutiv exprimiert (*housekeeping genes*) und 2000 sind für die Sekretion bestimmt. Die verbleibenden 13500 Gene kommen als zelltypspezifische Gene in Frage. Geht man von ungefähr 320 Zelltypen im menschlichen Körper aus, so ergeben sich durchschnittlich 42 „spezifische“ Gene pro Zelltyp.

Das HLA-Ligandom kann mehrere Peptide aus demselben Gen enthalten. Auch verschiedene Isoformen und posttranslationale Modifikationen, die möglicherweise zelltypspezifisch vorkommen können, tragen zur Diversität des Peptidrepertoires bei. Daher ist durchaus mit zelltypspezifischen Liganden zu rechnen. Ob sie auch gefunden werden, hängt ab von ihrer Abundanz sowie dem technischen Fortschritt in der Analytik insgesamt und speziell bei der Charakterisierung posttranslational modifizierter Peptide.

Für die klinische Anwendung haben die Fragen nach dem Vorkommen spezifischer HLA-Liganden und der Überlappung der HLA-Ligandome verschiedener Patienten große Bedeutung. So sollten für Peptidvakzinierungen nur tumorspezifische HLA-Liganden verwendet werden. Zeigen diese außerdem noch interindividuelle Unterschiede, würde dies unter anderem bedeuten, dass auch RCC-Patienten nicht mit denselben Peptiden geimpft werden können, obwohl sie an derselben Krebsart erkrankt sind. Diese kostspielige und aufwändige patientenspezifische Behandlung könnte hingegen umgangen werden, falls sich HLA-Liganden finden lassen, die z.B. auf allen Tumoren eines Gewebes oder sogar auf allen Tumoren von Patienten mit einem bestimmten HLA-Allel präsentiert werden. Folglich wird die Frage nach der Gewebsspezifität die Zukunft

der Immuntherapie entscheidend prägen.

3.3.2. Allotypische Peptide

Im Rahmen der *2nd Conference of the Consortium for Post-Genome Science (CPGS) „Genomes to Systems“* (Manchester, 2004) schlug Ruedi Aebersold die Verwendung *proteotypischer Peptide* zur Identifizierung sowie Quantifizierung von Proteinen vor (Ellis et al., 2004). Proteotypische Peptide sind experimentell bevorzugt beobachtbare Peptide, die ein Protein oder eine Proteinisoform eindeutig identifizieren. Sie könnten insbesondere dazu beitragen, die Strategien von Algorithmen für die Proteinidentifizierung anhand von MS-Daten zu verbessern (Küster et al., 2005). Ein Peptid wird als proteotypisch bezeichnet, wenn es in mehr als 50% aller Identifikationen des entsprechenden Proteins mittels eines bestimmten experimentellen Systems beobachtet wird (Mallick et al., 2007).

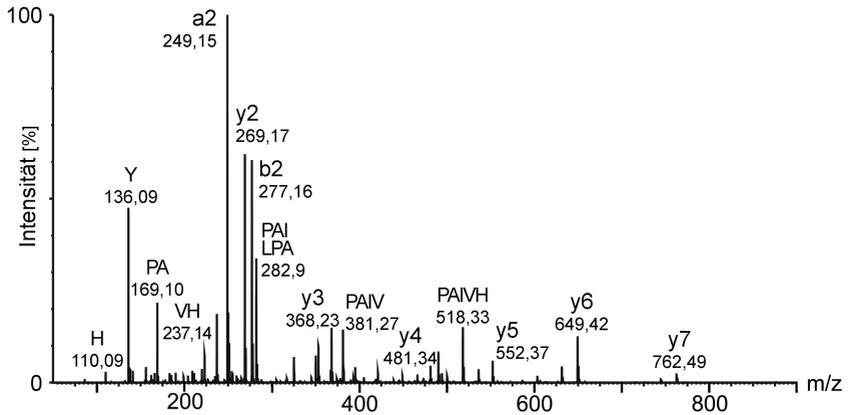
In Analogie zu den proteotypischen Peptiden werden *allotypische Peptide* als die Peptide definiert, die dominant im Peptidrepertoire eines MHC-Allotyps vorkommen und in den meisten Quellen, die dieses Allel exprimieren, detektierbar sind (Hillen und Stevanovic, 2006).

Die Suche nach allotypischen Peptiden wurde auf die Allele HLA-A*02 und -A*03 beschränkt, zwei der drei häufigsten HLA-Allele innerhalb der kaukasischen Population (Cao et al., 2001). Außerdem sind diese beiden Allele mit mehr als 500 bzw. 250 bekannten natürlichen Liganden bislang am besten charakterisiert. Mit Hilfe der internen HLA-Liganden-Datenbank wurden zunächst potentiell allotypische Peptide bestimmt, die bereits auf einer erheblichen Anzahl an *Sources* detektiert worden waren und die im Folgenden noch gezielter analysiert wurden (Tabelle 3.15).

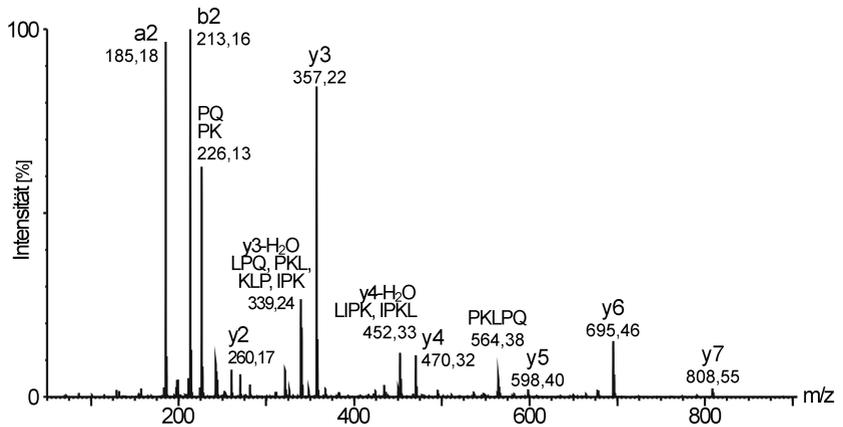
Dazu wurden als Erstes die 42 HLA-A*02⁺ und 18 HLA-A*0201⁺ bzw. 24 HLA-A*03⁺ und 2 HLA-A*0301⁺ *Sources* im Hinblick auf ihre Eignung für die Untersuchung auf allotypische Peptide analysiert. Es wurden im weiteren Verlauf nur solche *Sources* berücksichtigt, die folgende Kriterien erfüllen:

1. Bei der Immunpräzipitation zur Isolierung der HLA-Liganden wurden α HLA-Klasse-I-Antikörper (W6/32, BB7.2, GAP-A3) verwendet und mit den Eluaten wurden MS-Messungen durchgeführt.
2. Die Messungen wurden als LC-MS/MS-Experimente durchgeführt und nicht durch andere Verfahren wie Nanospray, um die Vergleichbarkeit der experimentellen Systeme zu gewährleisten.

3. Ergebnisse und Diskussion



(a) YLLPAIVHI, HLA-A*02



(b) VLIPKLPQL, HLA-A*02

Abbildung 3.29.: Referenzspektren für die Suche nach allotypischen HLA-A*02-Peptiden. Um schnell und einfach festzustellen, ob ein Fragmentspektrum mit dem richtigen m/z -Wert auch das gesuchte Peptid ist, werden Referenzspektren verwendet.

Tabelle 3.15.: Kandidaten für allotypische Peptide

A*02	[M+2H] ²⁺	A*03	[M+2H] ²⁺
AIVDKVPSV	464,30	KIADRFLLY	569,91
ALSDHHIYL	534,81	KLLNYAPLEK	594,92
ILMEHIHKL	567,33	QIFVKTLTGK	567,91
LLIENVASL	486,30		
NLLPKLHIV	523,82		
TLSDLRVYL	540,31		
VLIPKLPQL	510,87		
YLLPAIVHI	519,81		

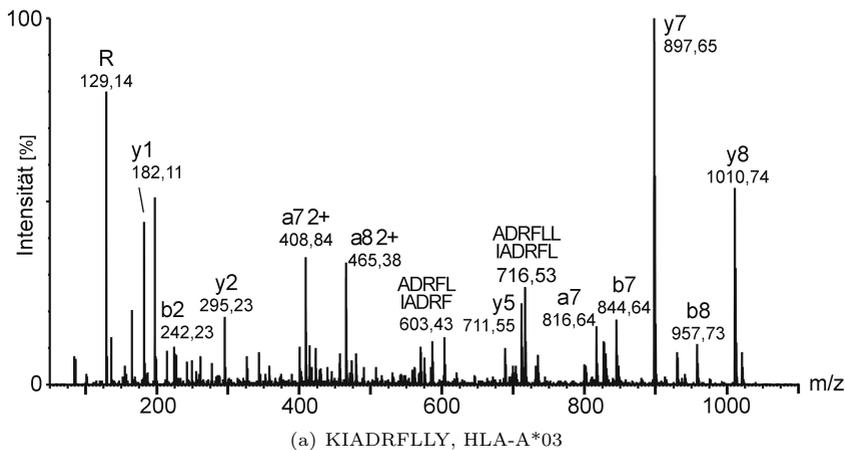


Abbildung 3.30.: Referenzspektrum für die Suche nach allotypischen HLA-A*03-Peptiden. Um schnell und einfach festzustellen, ob ein Fragmentspektrum mit dem richtigen m/z -Wert auch das gesuchte Peptid ist, werden Referenzspektren verwendet.

3. Die Messeinstellungen lagen innerhalb der üblichen Parameter.
4. Die Dateien sind technisch einwandfrei.
5. Die HLA-Liganden-Datenbank enthält mindestens zehn HLA-Klasse-I-Liganden, um zu gewährleisten, dass eine Klasse-I-Auswertung in ausreichendem Maße durchgeführt worden ist. Andernfalls kann die Detektion zumindest einiger allotypischer Peptide kaum erwartet werden.

Zur Suche nach allotypischen Peptiden wurden schließlich 26 HLA-A*02⁺ *Sources* und 11 HLA-A*03⁺ *Sources* verwendet (Tabelle 3.16). Die zugehörigen Messdaten wurden gezielt anhand der m/z -Werte und der bekannten Fragmentierungsmuster nach den potentiell allotypischen Peptiden durchsucht (Abbildung 3.29), sofern diese nicht schon im Rahmen der üblichen Auswertung gefunden worden waren.

Die Tabellen 3.17 und 3.18 zeigen das Ergebnis dieser erneuten, systematischen Analyse bereits vorhandener MS-Daten. Für jedes der potentiellen allotypischen Peptide ist die Anzahl der *Sources* angegeben, auf denen es detektiert wurde, sowie die daraus berechnete Dominanz. Diese ergibt sich aus dem Verhältnis der *Sources* mit Detektion zur Gesamtzahl der betrachteten *Sources*. Es zeigt sich, dass es sich bei den meisten der analysierten Peptide tatsächlich um allotypische Peptide handelt, die in mindestens 50% der *Sources* detektierbar sind. Lediglich die HLA-A*02-präsentierten Peptide ALSDHHIYL und LLIENVASL erreichen die 50%-Schwelle nicht. Dies könnte sich jedoch in Zukunft mit der Analyse weiterer A*02⁺ *Sources* ändern.

Umgekehrt zeigt die Analyse auch, dass die Detektion allotypischer Peptide sogar erwartet werden kann. In jeder der HLA-A*02⁺ *Sources* wurden im Durchschnitt fünf der acht untersuchten Peptide gefunden (Median = 5, Mittelwert = 5). Bei den HLA-A*03⁺ *Sources* ist dies noch deutlicher. Hier wurden meist alle drei der untersuchten Peptide detektiert (Median = 3, Mittelwert = 2.4). Vermutlich begünstigen die in HLA-A*03-Liganden häufiger vorkommenden basischen Aminosäuren eine Detektion gegenüber den hydrophoberen HLA-A*02-Peptiden durch eine effizientere Ionisierung.

Zu erwähnen ist, dass auch in *Sources*, die die oben genannten Kriterien nicht erfüllen, allotypische Peptide gefunden wurden. Beispielsweise wurden für HUVEC188 und SCC90 weniger als zehn HLA-Klasse-I-Peptide detektiert, in beiden Fällen ist aber YLLPAIVHI darunter. Für die ersten analysierten RCC-Gewebe wurde noch die Nanospray-Methode verwendet, bei der HPLC-Fractionen *offline* und manuell im Massenspektrometer gemessen wurden. Trotz der unterschiedlichen Methodik wurden auch hier einige der al-

Tabelle 3.16.: *Sources* für die Suche nach allotypischen Peptiden

A*02⁺	A*03⁺
Awells ^a	AML03
B-LCL 166	CCA172_T
CCA172_T	HO301 ^a
CML85 ^a	MZ7
DEM ^a	NCh359
HeLa P83.30	RCC098_T
Huvec 166	RCC100_N
JY ^a	RCC100_T
LCL721.45 ^a	RCC115_T
RCC026_ZL ^a	RCC135_T
RCC068_ZL	RCC211_T
RCC099_N	
RCC099_T	
RCC100_N	
RCC100_T	
RCC110_N	
RCC110_T	
RCC115_T	
RCC116_T	
RCC119_T	
RCC130_T	
RCC135_T	
RCC263_T	
RCC2733_ZL	
RCC399_T	

^a feintypisiert mit HLA-A*0201 bzw. HLA-A*0301

Tabelle 3.17.: Dominanz allotypischer Peptide

HLA- Peptid	Detektionen	Dominanz [%]	
A*02	YLLPAIVHI	20	76.9
	VLIPKLPQL	18	69.2
	NLLPKLHIV	17	65.4
	AIVDKVPSV	16	61.5
	TLSDLRVYL	14	53.8
	ILMEHIHKL	15	57.7
	ALSDHHIYL	12	46.2
	LLIENVASL	12	46.2
A*03	KIADRFLLY	8	72.7
	KLLNYAPLEK	8	72.7
	QIFVKTLTGK	7	63.6

lotypischen Peptide gefunden. Ein anderes Beispiel ist AML04, für das eine A*03-negative Typisierung eigentlich bekannt ist. Im LC-MS/MS-Experiment wurden alle drei der allotypischen HLA-A*03-Peptide gefunden. Daher ist es höchst wahrscheinlich, dass die gemessene Probe entweder gar nicht von AML04 stammte oder die Typisierung nicht zu AML04 gehört. Auch auf einer Mauszelllinie, die mit humanem TAP sowie HLA-A*03 transfiziert ist, wurden alle allotypischen HLA-A*03-Peptide gefunden.

Unterschiedliche Ernährungszustände, wie beispielsweise durch Mangelmedium oder Rapamycin induzierte Autophagie, scheinen die Präsentation allotypischer Peptide kaum zu beeinflussen (Müller, 2008). AIVDKVPSV, ALSDDHHIYL, ILMEHIHKL und YLLPAIVHI konnten beispielsweise in allen Fällen bei der Awells-Zelllinie gefunden werden. Experimente mit differentieller Modifizierung haben gezeigt, dass diese Peptide unter allen Bedingungen im Rahmen der Messgenauigkeit gleich stark präsentiert werden. Dies weist wiederum auf eine umfassende Eignung zur Charakterisierung von HLA-Allotypen hin.

Auch die Transfektion von Zellen scheint die allotypischen Peptide an der Zelloberfläche nicht deutlich zu beeinflussen. In Eluaten von mit Survivin transfizierten Awells-Zellen wurden alle der hier betrachteten Kandidaten für allotypische Peptide gefunden. Zellen, deren Antigenprozessierung gestört ist, präsentieren allotypische Peptide jedoch wie erwartet nicht mehr. So konnte auf der TAP1/2-deletierten Zelllinie LCL721.174 keines der acht HLA-A*02-

3.3. Analyse von HLA-Ligandomen nach Gesichtspunkten der Proteomik

Tabelle 3.18.: Detektion allotypischer Peptide in verschiedenen Sources

RCC099_T	+++++								
RCC099_N	+++++								
RCC068_ZL	+++++								
RCC026_ZL	+++++								
LCL721.70	+++++								
JY	+++++								
Huvec166	+++++								
HeLaP83.30	+++++								
DEM	+++++								
CML85	+++++								
CCA172_T	+++++								
B-LCL 166	+++++								
Awells	+++++								
AIVDKVPSV									
ALSDHHIYL									
ILMEHHKIL									
LLIENVASL									
NLLPKLHIV									
TLSDLRVYL									
VLLPKLPQL									
YLLPAIVHI									
RCC399_T									
RCC2733_ZL									
RCC263_T									
RCC135_T									
RCC130_T									
RCC119_T									
RCC116_T									
RCC115_T									
RCC110_T									
RCC110_N									
RCC100_T									
RCC100_N									
RCC211_T									
RCC135_T									
RCC115_T									
RCC100_T									
RCC100_N									
RCC098_T									
Nch359									
MZ7									
HO301									
CCA172_T									
AML03									
KIADRFLLY									
KLNNYAPLEK									
QIFVKTLTCK									

Kandidaten-Peptide gefunden werden. Dies weist darauf hin, dass alle acht über den klassischen TAP-abhängigen Antigenprozessierungsweg präsentiert werden.

Beim Vergleich von Tumor- und Normalgewebe von RCC099 und RCC100 – beide A*02⁺ und A*03⁺ – oder des A*02⁺ RCC110 (Weinzierl et al., 2007) wurden von den detektierten allotypischen Peptiden (Abbildung 3.18) bis auf eines alle im Rahmen der Messgenauigkeit etwa gleich stark präsentiert. Die einzige Ausnahme bildet ALSDHIIYL aus Aldolase A, das im Tumorgewebe von RCC099_T 10-fach und von RCC100_T sowie RCC110_T 4- bis 5-fach überpräsentiert wurde. Aldolase A wird vor allem während der embryonalen Entwicklung und später auch im adulten Muskelgewebe exprimiert. Bei verschiedenen Krebsarten wurde eine Überexpression von Aldolase A beobachtet (Asaka et al., 1994), darunter auch RCCs (Unwin et al., 2003), für die Aldolase A im Serum als Biomarker vorgeschlagen wurde (Takashi et al., 1993; Zhu et al., 1991).

Zusammenfassend ist das Konzept der allotypischen Peptide auf HLA-Liganden gut anwendbar. Es ermöglicht die Typisierung von Zelllinien und Geweben allein anhand der gefundenen Peptide. In Zukunft sollte die systematische Analyse allotypischer Peptide auch auf andere HLA-Allele wie HLA-B*1801 und -B*4402 ausgeweitet werden. Eine entscheidende Frage ist auch, ob die allotypischen Peptide stets in ähnlicher Menge auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Dies könnte beispielsweise durch differentielle Modifizierung verschiedener HLA-A*02⁺ Sources untersucht werden. Sollte sich diese Hypothese bestätigen lassen, wären die allotypischen Peptide nicht nur Marker für ihren jeweiligen HLA-Allotyp, sondern könnten auch als interne Standards für markierungsfreie Quantifizierungen dienen.

Möglicherweise übernehmen diese Peptide bei der Präsentation des Selbst an der Zelloberfläche noch eine besondere Funktion. So wurde bei Mäusen gezeigt, dass verschiedene Ly49-Rezeptoren auf NK-Zellen spezifisch für bestimmte MHC-Allele oder -Supertypen sind. Außerdem ist die Interaktion von Ly49I mit H2-K^d sogar abhängig vom gebundenen Peptid, da nur mit zwei von fünf getesteten Peptiden eine Bindung beobachtet wurde (Hanke et al., 1999; Lavender und Kane, 2006).

Beim Menschen wurde für den inhibitorischen NK-Zell-Rezeptor KIR3DL2 gezeigt, dass er spezifisch mit HLA-A3 und -A11 interagiert und dass diese Wechselwirkung peptidspezifisch ist (Hansasuta et al., 2004). Eine Peptidspezifität konnte auch bei der Inhibition der lytischen Funktion von NK-Zellen durch HLA-Cw*0304 oder HLA-B*2705 festgestellt werden (Malnati et al., 1995; Zappacosta et al., 1997), wobei vor allem die Positionen 7 und 8 des

Peptids eine wichtige Rolle spielen (Mandelboim et al., 1997; Peruzzi et al., 1996).

Möglicherweise kann also nur ein limitierter Satz an Peptiden in Verbindung mit ihrem präsentierenden MHC-Molekül von bestimmten NK-Zell-Rezeptoren erkannt werden und so die Funktion dieser Zellen beeinflussen.

Eine weitere denkbare biologische Funktion allotypischer Peptide könnte die Selektion sich entwickelnder T-Zellen im Thymus sein, die zur sogenannten zentralen Toleranz führt. Vorläuferzellen aus dem Knochenmark erreichen über den Blutstrom den Thymus, wo sie zunächst in den Cortex einwandern, um dort zu proliferieren. Können diese doppelt-negativen Thymocyten ($CD4^- CD8^-$) ihre T-Zell-Rezeptor-Gene erfolgreich umordnen, gehen sie ins doppelt-positive Stadium über ($CD4^+ CD8^+$). Sie sind auf Überlebenssignale angewiesen, die durch die Interaktion ihres T-Zell-Rezeptors mit Selbst-Peptid-MHC-Komplexen auf corticalen Thymusepithelzellen (cTECs) vermittelt werden (positive Selektion). Die überlebenden Zellen werden schließlich zu $CD4^+$ oder $CD8^+$ Zellen, die dann in die Medulla wandern, wo sie mit DCs sowie epithelialen Zellen (mTECs) wechselwirken. Ist die Affinität ihres T-Zell-Rezeptors für Selbst-Peptid-MHC-Komplexe zu hoch, führt dies zur Apoptose (negative Selektion). Die überlebenden Zellen verlassen sie schließlich naive T-Zellen den Thymus.

Entscheidend für die Selektion ist stets die Wechselwirkung zwischen T-Zell-Rezeptor und Peptid-MHC-Komplexen. Folglich sind sowohl die Avidität der Wechselwirkung als auch das MHC-präsentierte Peptidrepertoire von entscheidender Bedeutung. Über die Natur der präsentierten Peptide ist bislang wenig bekannt. Allotypische Peptide könnten als abundant und ubiquitär vorhandene Liganden möglicherweise eine besondere Rolle bei der positiven Selektion spielen, aber auch wichtig für die negative Selektion sein. Dies hängt allerdings davon ab, ob diese Liganden in den entsprechenden APCs überhaupt prozessiert und präsentiert werden, da die Antigenprozessierung in diesen Zellen nicht unbedingt der in der Peripherie entspricht (Murata et al., 2007). Außerdem birgt eine Beteiligung von in der Peripherie vorkommenden Peptiden an der positiven Selektion das Risiko, dass T-Zellen entstehen, die mit Selbst-Peptiden kreuzreagieren und so zu Autoimmunität führen können. Die Frage, ob im Thymus Peptide vorkommen, die in der Peripherie abundant präsentiert werden, ist also äußerst interessant und sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

3.3.3. Ligandenreiche Quellproteine

3.3.3.1. Analyse der Quellproteine des HLA-B44-Supertyps

BLAST-Suchen ergaben, dass das HLA-Ligandom des HLA-B44-Supertyps von mehr als 500 verschiedenen Quellproteinen abstammt. Aus 75 dieser Proteine entsteht mehr als nur ein einziges Peptid. Tabelle 3.19 zeigt einige Beispiele. So stammen drei verschiedene HLA-B*4001-restringierte Peptide aus MYL6 (*myosin, light polypeptide 6, alkali, smooth muscle and non-muscle*). Eines davon wurde auch auf HLA-B*4901 gefunden. Auf HLA-B*4901 und HLA-B*4402 werden außerdem weitere Längenvarianten gezeigt, während HLA-B*1801 ein völlig anderes Peptid präsentiert. Im Fall von VIM (*vimentin*) werden sechs ganz unterschiedliche Peptide sowie eine verlängerte Variante auf sechs verschiedenen Allotypen präsentiert. Fünf Liganden aus SPTBN1 (*spectrin, beta, non-erythrocytic 1*) und vier aus TLN1 (*talín 1*) werden jeweils von vier Mitgliedern des Supertyps an der Zelloberfläche gezeigt.

Im Idealfall sollte eine Zelle zumindest ein Peptid aus jedem ihrer Proteine oder sogar Proteinisofomen an ihrer Oberfläche präsentieren, um sicherzustellen, dass jegliche Änderungen in ihrem Inneren von T-Zellen entdeckt werden können. Die verschiedenen Allotypen des gleichen Supertyps scheinen dabei nicht notwendigerweise den oder die gleichen Liganden für das gleiche Protein zu verwenden, denn ihre Peptidrepertoires überlappen kaum. Stattdessen präsentieren die verschiedenen Allotypen ganz unterschiedliche Peptide, auch wenn alle zum gleichen Supertyp-Motiv passen. Es gibt sogar einige Beispiele wie AEFKEAFQL(F), das von HLA-B*4001 und -B*4402 in verschiedener Länge präsentiert wird. Vermutlich zeigt sich darin eine Anpassung der Liganden an die allotypspezifischen Vorlieben für den C-Terminus.

3.3.3.2. Abundante Quellproteine

Zu überprüfen war, ob ein Zusammenhang zwischen der Abundanz eines Proteins auf der einen und der Anzahl oder Häufigkeit daraus abstammender Liganden auf der anderen Seite besteht. Dazu wurde in der internen Datenbank nach Peptiden aus Proteinen gesucht, die in der Literatur als besonders reichlich in der Zelle vorhanden beschrieben sind.

Eine Zelle enthält etwa 2×10^9 Moleküle von etwa 23000 verschiedenen Proteinen (Yewdell et al., 2003). Mit 10^8 Kopien pro Zelle kommt Ubiquitin (*GeneID 7314*) besonders häufig vor (Yewdell, 2001). Zu den abundanten Spezies gehören außerdem HSC70 und Ribosomen mit je 10^7 , das Chaperon TRiC

Tabelle 3.19.: Verschiedene HLA-Alloypen des HLA-B44-Supertyps präsentieren mehrere verschiedene Peptide aus dem gleichen Quellprotein.

Gen-Symbol	Liganden präsentiert auf HLA-			
	B*1801	B*37	B*4001	B*4101
MYL6a	DEMNVKVL		AEFKEAFQL AEIRHVLVTL YEELVRMVL	B*4402 AEFKEAFQLF
VIM SPTBNI	LERKVESL DEKSITY DEMKVLVL EEASLLHQF	RETNLDLSP	REKLQEEML	EEIAFLKKL EEASLLHQF
TLN1	DEYSLVREL		SEAKPAAVAA	SEIEAKVRY

Gen-Symbol	Liganden präsentiert auf HLA-			
	B*4501	B*4701	B*4901	B*5001
MYL6a			AEIRHVLVTL YEELVRMV	
VIM SPTBNI	(M)EENFAVEA	KDLTSMRL	REYQDLLNV YEERVQAVV	
TLN1				QEISHLIEP

3. Ergebnisse und Diskussion

(*TCP-1-containing ring complex*) mit 2×10^6 , das Proteasom mit 2×10^5 sowie HLA-Klasse-I-Moleküle mit 10^5 Kopien pro Zelle (Yewdell, 2001).

Aus all diesen Proteinen stammen viele verschiedene HLA-Liganden ab, die auf unterschiedlichen HLA-Allelen auf einer Vielzahl von *Sources* präsentiert werden (Tabelle 3.20). Die Abundanz von Proteinen scheint also eine gewisse Rolle bei der Peptidpräsentation zu spielen. Allerdings ist die hier betrachtete Stichprobe noch viel zu klein für generelle Aussagen.

Tabelle 3.20.: HLA-Liganden aus abundanten Proteinen. Die Tabelle zeigt verschiedene abundante Quellproteine mit der Anzahl an gefundenen Liganden und präsentierenden Allelen sowie den *Sources*, von denen sie isoliert wurden. In einigen Fällen sind die Quellproteine zu Gruppen (diverse *GeneIDs*) zusammengefasst, von denen der häufigste Vertreter nochmals einzeln aufgeführt ist.

	<i>GeneID</i>	Peptide	HLA-I-Allele	<i>Sources</i>
Ubiquitin	7314	8	7	26
ribosomale Proteine	74 div.	149	34	80
RPS16	6217	5	4	10
proteasomale Proteine	22 div.	32	21	43
PSME3	10197	4	5	13
PSMD2	5708	5	4	5
MHC-I, A/B/C	3105-7	37	19	51
<i>chaperonin containing TCP1 subunits</i>	6 div.	18	11	20
CCT8	10694	6	6	7
HSC70	3312	7	9	11
<i>heat shock</i> -Proteine	13 div.	29	19	32
HSP90AA1	3320 ^a	5	4	7
HSP90AB1	3326 ^a	9	6	11

^a 4 Peptide können sowohl aus 3320 als auch aus 3326 stammen.

3.3.3.3. Umsatzraten von Quellproteinen

Ein Großteil der HLA-präsentierten Peptide wird vermutlich nicht aus abundanten Proteinen, sondern aus Proteinen mit hohe Umsatzraten (Milner et al., 2006) generiert. Die intrazelluläre Proteolyse von Proteinen und somit deren Umsatz und Halbwertszeiten hängen dabei von vielen Faktoren ab. Dazu gehö-

ren zunächst der betrachtete Zelltyp sowie die Oberflächenhydrophobizität, die N-terminale Aminosäure, bestimmte destabilisierende Domänen oder Motive und posttranslationale Modifikationen wie die Ubiquitinierung (Bohley, 1996).

Um Einblicke in den Zusammenhang zwischen der Halbwertszeit eines Proteins auf der einen und den daraus abstammenden HLA-Liganden auf der anderen Seite zu gewinnen, wurden in der Literatur beschriebene Proteine entsprechend ihrer Halbwertszeiten (HWZ) in vier Gruppen eingeteilt: 1. Proteine mit sehr hohem Umsatz (HWZ < 1 h); 2. Proteine mit hohem Umsatz (HWZ 1-24 h); 3. Proteine mit niedrigem Umsatz (HWZ 1-5 d); 4. Proteine mit sehr niedrigem Umsatz (HWZ > 5 d). Für jedes Protein wird dann die Anzahl bekannter natürlicher HLA-Klasse-I-Liganden aus der Datenbank ermittelt.

Abbildung 3.31(a) zeigt die Verteilung der Quellproteine auf die vier Gruppen entsprechend Anhang A.15. Hierbei wurden jedoch einige Quellproteine wie die verschiedenen Actine zusammengefasst, da die HWZ für die individuellen Actine nicht bekannt sind. Da zu diesen Quellproteingruppierungen mehrere Mitglieder gehören, können daraus auch mehr Peptide stammen. Daher zeigt Abbildung 3.31(a) die Verteilung der Quellproteine auf die verschiedenen HWZ-Gruppen, allerdings ohne die gruppierten Proteine. Auf den ersten Blick ist bereits festzustellen, dass sich die vier HWZ-Gruppen kaum unterscheiden. Zumindest mit den wenigen hier betrachteten Proteinen und der vorliegenden Einteilung zeigt sich kein Einfluss der HWZ auf das HLA-Ligandom.

3.3.4. Zusammenfassung und Ausblick

Insgesamt haben sich die Konzepte der Proteomanalyse auch für die Untersuchung von HLA-Ligandomen als angemessen erwiesen. Wie in der Proteomik spielt die Suche nach gewebspezifischen Biomarkern auch in der HLA-Ligandomik eine wichtige Rolle – besonders auch im Hinblick auf ihre klinische Anwendung in Diagnose und Therapie. Für HLA-A*02 und -A*03 konnten bereits einige spezifische Marker-Peptide, die allotypischen Peptide, definiert werden. Diese sind auch für andere Allotypen zu erwarten; ihre Charakterisierung erfordert viele weitere Untersuchungen.

Bei den Quellproteinen der HLA-Liganden zeigt sich, dass verschiedene Allotypen nicht dasselbe Peptid aus demselben Protein präsentieren, sondern in Anpassung an ihr jeweiliges Peptidmotiv ganz verschiedene Liganden. Auch gibt es Quellproteine, aus denen besonders viele HLA-Liganden stammen. Einige dieser Proteine gehören zu den abundantesten in der Zelle. Ein Einfluss der Halbwertszeit ist hingegen bislang nicht festzustellen.

Allerdings stellen die bisherigen Analysen nur den ersten Versuch einer Anwendung der Proteomik-Konzepte auf die HLA-Ligandomik dar. Sie weisen

3. Ergebnisse und Diskussion

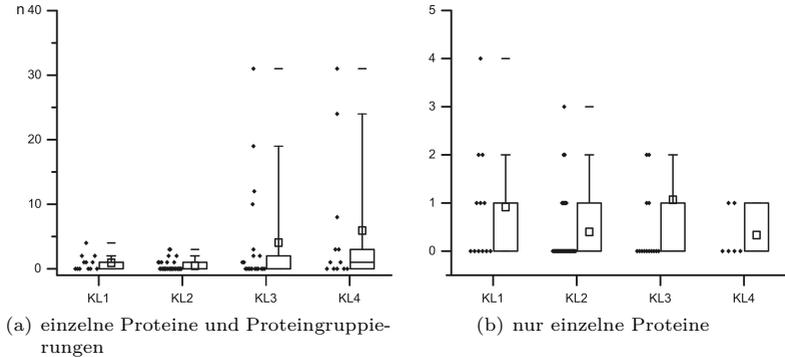


Abbildung 3.31.: HLA-Liganden aus Proteinen mit unterschiedlicher HWZ. Für verschiedene Proteine, die jeweils einer bestimmten Klassen zugeordnet werden, ist die Anzahl n der aus ihnen abstammenden Liganden dargestellt. Die Boxplots zeigen folgende Daten: \square gibt den Mittelwert an, $-$ den maximalen bzw. minimalen Wert. Die Box markiert das Intervall, innerhalb dessen 50% der Datenpunkte um den Mittelwert liegen. Die Whisker umfassen den Bereich zwischen 5% und 95% der Datenpunkte. Links neben jeder Box sind zusätzlich die einzelnen Datenpunkte gezeigt. Es wird zwischen vier Klassen von Proteinen unterschieden: KL1 (HWZ < 1 h), KL2 (HWZ 1-24 h), KL3 (HWZ 1-5 d), KL4 (HWZ > 5 d). Bei KL3 ist in (b) ein Datenpunkt mit dem Wert 10 nicht im Diagramm enthalten, er ging jedoch in die Berechnung des Boxplots ein.

zwar deutlich auf die Übertragbarkeit der Konzepte hin, sind aber bislang durch die im Vergleich zur Proteomik geringe Datenlage in ihrer Aussagekraft beschränkt. Zukünftige technische Entwicklungen, die besonders auch durch die intensive Forschung in der Proteomik angetrieben werden, können hoffentlich zur Erweiterung der Datenlage beitragen und somit tiefergehende, systematische Analysen erlauben.

3.4. Bedeutung der HLA-Ligandom-Analyse für die klinische Anwendung

Die Charakterisierung von HLA-Liganden ist Voraussetzung für viele klinische Anwendungen. Aufgrund ihrer Identifizierung auf molekularer Ebene mittels Massenspektrometrie ist bereits sicher, dass sie – im Gegensatz zu vorhergesagten T-Zellepitopen – *in vivo* bei der Antigenprozessierung entstehen können und auch präsentiert werden. Solche Peptide können beispielsweise in der Immuntherapie eingesetzt werden für Stimulation und Expansion spezifischer T-Zellen vor dem adoptiven Transfer oder für die Vakzinierung von Krebspatienten. Auch das *Immunomonitoring* – also die Detektion bereits vor Therapiebeginn existierender spezifischer T-Zellen und deren Verfolgung im Verlauf der Behandlung – erfordert das Wissen über HLA-präsentierte Peptide. Aufgrund des hohen Polymorphismus der HLA-Moleküle spielt dabei die Frage nach der Promiskuität und Spezifität der HLA-Liganden sowie der T-Zellepitop-Erkennung eine entscheidende Rolle. Die Antwort auf diese Frage wird zeigen, ob möglicherweise ganze Bevölkerungsgruppen auf die gleiche Behandlung ansprechen können oder ob für jeden Patienten eine individuelle Therapie erforderlich ist.

Im Folgenden werden daher zunächst aufgrund ihrer möglichen Tumorassoziation interessante Peptide auf ihr Potential getestet, tumorspezifische T-Zellantworten in Patienten zu induzieren. Außerdem wird die Frage nach der Promiskuität der T-Zellepitop-Erkennung innerhalb des HLA-B44-Supertyps umfangreich analysiert.

3.4.1. Kandidaten für Peptidvakzinierungen

Zwei Peptide, die bereits mittels MS auf molekularer Ebene in Eluaten von HLA-A*02⁺ Krebszelllinien detektiert worden waren (Hillen, 2004) (Tabelle 3.21), sollten nun auf eine Eignung als T-Zellepitope für Peptidvakzinierungen von Tumorpatienten hin überprüft werden.

3. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 3.21.: T-Zellepitopkandidaten aus potentiellen Tumorantigenen

Sequenz	HLA	GeneID	Gensymbol	Position	Stimulationen	
					aAPCs	DCs
LLDPGEHYC	A*0201	9180	OSMR	971-979	nein	ja
GLNEEIARV	A*0201	10403	NDC80	330-338	ja	ja

OSMR Das Peptid LLDPGEHYC aus dem OSMR (*oncostatin M receptor*) wurde bei LC-MS/MS-Experimenten in einem HLA-Peptid-Eluat von HeLa P83.30-Zellen gefunden (Hillen, 2004). Die ursprüngliche HeLa-Zelllinie war zu anderen Zwecken mit HLA-A*0201 und einem Teil des Proteins MSP1 des Malaria-Erregers Plasmodium transfiziert worden und wies außer HLA-A*0201 kaum endogene HLA-Expression auf (Idler, 2004).

OSMR bildet mit gp130 als Heterodimer einen OSM-Rezeptorkomplex (Typ-II-OSM-Rezeptor), der durch Oncostatin M (OSM) aktiviert wird (Mosley et al., 1996). OSM ist ein Mitglied der IL-6-Familie der Cytokine, das an die gp130-Untereinheit bindet und von Monocyten sowie aktivierten T-Zellen sezerniert wird. In bestimmten Zellen kann es Proliferation induzieren (Fibroblasten, Kaposi-Sarkom, glatte Muskelzellen), während es beispielsweise das Wachstum von Brustkrebs- oder Melanomzelllinien inhibiert (Liu et al., 1998). Metastasierende Melanomzelllinien unterdrücken daher die OSMR-Expression durch epigenetische Mechanismen (Lacrouette et al., 2007). OSMR-mRNA wird vor allem in Nervenzellen sowie Fibroblasten-, epithelialen und Tumorzelllinien exprimiert (Mosley et al., 1996). Immunhistochemisch wurde gezeigt, dass sowohl OSM als auch OSMR in vielen Ovarialkarzinomen exprimiert werden, was bei diesem Tumortyp möglicherweise eine autokrine Schleife darstellt (Savarese et al., 2002). Verstärkte OSMR-Expression kann auch bei vielen Zervixkarzinomen festgestellt werden, die mit einer ungünstigeren Prognose für die Patientinnen zusammenhängt (Ng et al., 2007). Dazu passt die Tatsache, dass es sich bei der HeLa-Zelllinie, auf der das Peptid aus OSMR entdeckt wurde, um eine Zervixkarzinomzelllinie handelt. Eine lösliche Form von OSMR (sOSMR) wird von bestimmten Tumorzelllinien exprimiert, wodurch sie sich vielleicht vor den statischen Auswirkungen von OSM durch dessen Neutralisation schützen (Diveu et al., 2006).

Die Expressionsdaten der Arbeitsgruppe Stevanović zeigen, dass das Protein OSMR in den meisten Normalgeweben nur wenig exprimiert wird (Abbildung 3.32(b)). Lediglich Lunge und Placenta weisen eine leicht erhöhte Ex-

pression gegenüber der Niere auf (Lunge 2,5, Placenta 2,1; normiert auf Niere 1,0). Auch in den Eierstöcken gibt es keine höhere Expression (0,7). Bei einigen RCC-Patienten (RCC070, RCC073, RCC098, RCC103, RCC130, RCC146, RCC190) zeigt jedoch das Tumorgewebe gegenüber dem Normalgewebe eine stärkere mRNA-Expression.

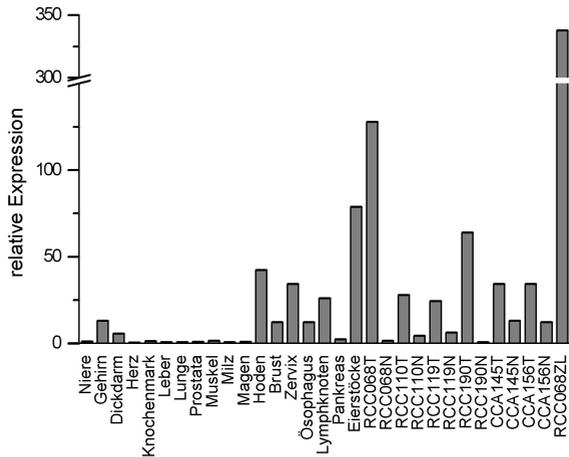
Daher wurde das Peptid LLDPGEHYC aus OSMR als potentielles tumorassoziiertes T-Zellepitop in Stimulationsexperimenten untersucht.

NDC80 Das Peptid GLNEEIARV wurde bereits auf zwei verschiedenen HLA-A*02 exprimierenden Krebszelllinien gefunden: RCC068_ZL und HeLaP83.30. Es entstammt dem Protein NDC80 (*NDC80 homolog, kinetochore complex component*), das auch als HEC (*highly expressed in cancer*) oder KNTC2 (*kinetochore associated 2*) bekannt ist.

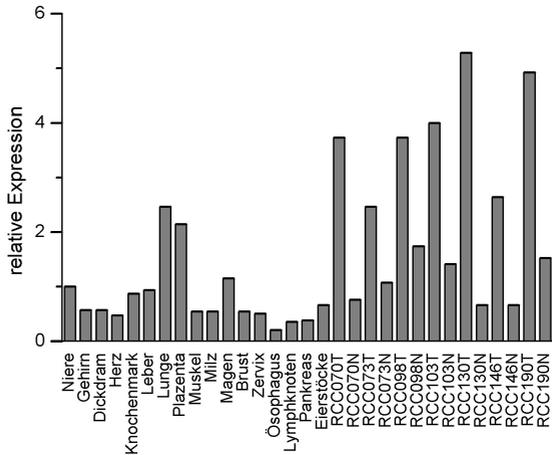
Diese nukleäre Protein wird vor allem während der S- und M-Phase in sich schnell teilenden Zellen wie beispielsweise Tumorzellen exprimiert, nicht aber in ausdifferenzierten Zellen. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Chromosomen-Segregation in der M-Phase des Zellzyklus (Chen et al., 1997) und ist Teil des Spindel-Checkpoints, der sicherstellt, dass die Trennung der Schwesterchromatiden vor der Zellteilung vollständig und korrekt abgeschlossen ist. Ein Defekt dieses Checkpoints kann zu Fehlern führen, die zur Tumorgenese beitragen (Martin-Lluesma et al., 2002). Für Brustkrebs wurde NDC80 als prognostischer Biomarker vorgeschlagen (Glinsky et al., 2005). Durch Depletion von NDC80 mittels RNA-Interferenz konnte in Mäusen das Wachstum von Adenocarcinomen *in vivo* inhibiert werden (Gurzov und Izquierdo, 2006). Immunhistochemisch konnte eine erhöhte NDC80-Expression im Tumorgewebe von Patienten mit Lungenkrebs (*non-small cell lung carcinomas*, NSCLC) festgestellt werden, die mit einer schlechteren Prognose einherging. Auch das Wachstum von NSCLC-Zellen konnte durch Behandlung mit siRNA oder einem NDC80 blockierenden Peptid eingeschränkt werden (Hayama et al., 2006).

Die Expressionsdaten zeigen eine massiv erhöhte Expression in einigen Tumoren wie RCCs und CCAs im Vergleich zum Normalgewebe an (RCC068_T 128,0, RCC068_N 1,4, RCC110_T 27,9, RCC110_N 4,3 u.a.; normiert auf Niere 1,0) (Abbildung 3.32(a)). In der Zelllinie RCC068_ZL liegt die mRNA-Expression fast 340-fach über der Normalniere. Demgegenüber kann die entsprechende mRNA in den meisten Normalgeweben nicht einmal detektiert werden. Eine Expression kann nur in Hoden (42,2), Gebärmutterhals (34,3), Speiseröhre (12,1), Lymphknoten (26,0) und Bauchspeicheldrüse (2,3) festgestellt werden.

3. Ergebnisse und Diskussion



(a) NDC80



(b) OSMR

Abbildung 3.32.: Relative mRNA-Expression der Gene der Kandidatenpeptide

Aus diesen Gründen wurde auch das Peptid GLNEEIARV aus NDC80 als potentielles tumorassoziiertes T-Zellepitop in Stimulationsexperimenten verwendet.

3.4.2. Antigen-spezifische Stimulation von CD8⁺ T-Zellen

3.4.2.1. Gewinnung von PBMCs, CD8⁺ T-Zellen und DCs aus gesunden Spendern

Eine Übersicht über die verwendeten Leukapherisate findet sich in Tabelle 3.22. Es wurden zunächst jeweils PBMCs isoliert, wobei die Zahl isolierter Zellen zwischen $8 \cdot 10^8$ und $2 \cdot 10^9$ variierte. Für Stimulationen mit artifiziellen antigen-präsentierenden Zellen (aAPCs) und Dendritischen Zellen (DCs) (L23, L26) wurden $8 \cdot 10^8$ PBMCs zur Separation von CD8⁺ T-Zellen mittels MACS verwendet, wobei die Ausbeute an CD8⁺ Zellen bei $1-2 \cdot 10^8$ Zellen lag. Nur bei L25 wurden statt der CD8⁺ T-Zellen PBMCs zur Stimulation mit DCs verwendet. Beim Adhärenzschritt zur Anreicherung der Monocyten wurden $3-5 \cdot 10^8$ PBMCs eingesetzt. Nach Induktion und Reifung konnten schließlich $1,5-3 \cdot 10^7$ reife DCs geerntet werden.

Eine Übersicht über die erfolgten T-Zell-Stimulationen bietet Tabelle 3.23.

Tabelle 3.22.: Leukapherisate für Stimulationsexperimente

Leukapherisat	HLA-Typisierung	Stimulation mit	
		aAPC	DC
L23	A2, B13, B60, Cw6	NDC80	NDC80
L25	A2, B13, B14, Cw6, Cw8	nein	NDC80, OSMR
L26	A1, A2, B7, B8, Cw7	NDC80	nein

3.4.2.2. OSMR-spezifische Stimulation

PBMCs aus L25 wurden mit OSMR₉₇₁₋₉₇₉-beladenen DCs in fünf Ansätzen (je $3 \cdot 10^6$ PBMCs, $5 \cdot 10^5$ DCs) stimuliert. Neun Tage nach der zweiten Restimulation wurden etwa 40% der Zellen jeder Stimulation mit HLA-A*0201:-OSMR₉₇₁₋₉₇₉-Tetramer gefärbt. Da kein Tetramer mit einer mutierten schweren Kette (siehe 3.4.2.3) zur Verfügung stand, gab es einen hohen unspezifischen Hintergrund. Es konnten keine populationstypischen Ansammlungen von Tetramer⁺ Zellen detektiert werden (Abbildung 3.33).

3. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 3.23.: Übersicht über die antigenspezifischen T-Zell-Stimulationen

Peptide	Stimulationen			getestete Leukapherisate
	HD-aAPC	LD-aAPC	DC	
NDC80 ₃₃₀₋₃₃₈	7/40	0/80	0/15	L23, L25, L26
OSMR ₉₇₁₋₉₇₉	—	—	0/5	L25
Melan-A	4/4	2/4	—	L23, L26

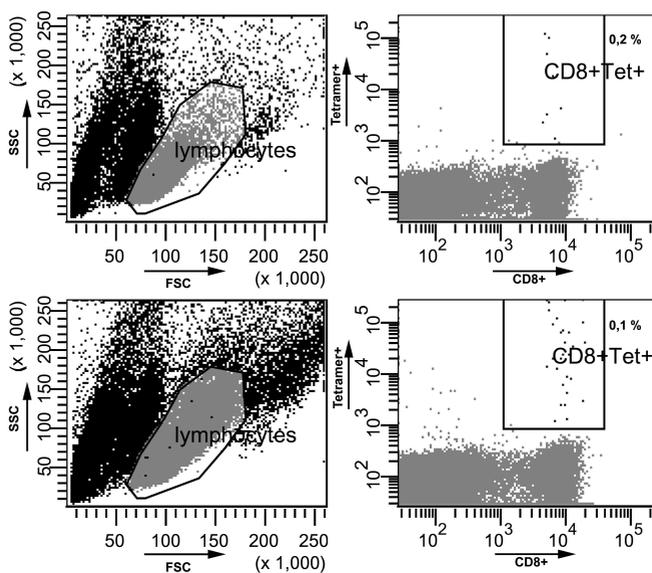


Abbildung 3.33.: Tetramer-Analyse der DC-Stimulation mit OSMR₉₇₁₋₉₇₉

3.4.2.3. NDC80-spezifische Stimulation

Zur NDC80-spezifischen Stimulation der CD8⁺ T-Zellen wurden sowohl aAPCs als auch autologe DCs verwendet. Die PBMCs aus L23 wurden auf beide Arten stimuliert, während bei L25 nur DCs, bei L26 hingegen nur aAPCs zum Einsatz kamen.

Insgesamt wurden mit NDC80 120 aAPC-Stimulationen mit je $1 \cdot 10^6$ CD8⁺ T-Zellen durchgeführt. 40 Stimulationen erfolgten mit *high density* (HD-) aAPCs (Beladung mit 20 nM MHC-Monomer) und 80 mit *low density* (LD-) aAPCs (Beladung mit 200 pM MHC-Monomer). Der Vorteil der HD-aAPCs liegt darin, dass die Zellen oft stärker stimuliert werden und daher auch niederfrequente antigenspezifische Zellen noch detektiert werden können. Aus Stimulationen mit LD-aAPCs hingegen können unter Umständen T-Zellen höherer Avidität gewonnen werden.

L23 Nach der ersten aAPC-Stimulation erfolgten stets noch zwei Restimulationen im Abstand von je einer Woche. Sechs Tage nach der zweiten Restimulation wurden die Zellen mittels Tetramerfärbung analysiert. Aus den Stimulationen der CD8⁺ T-Zellen von L23 wurden zwei vermutlich positive Reaktionen beobachtet (Abbildung 3.34(b)). Beide waren mit HD-aAPCs stimuliert worden, während sich unter den mit LD-aAPCs stimulierten Zellen keine Tetramer⁺ Populationen fanden (Abbildung 3.34(c)). Leider zeigten die Färbungen mit dem HLA-A*0201wt:NDC80-Tetramer einen hohen Hintergrund, der die Beurteilung der Populationen erschwerte (Abbildung 3.34(a)).

Als Positivkontrolle waren außerdem je zwei HD- und LD-aAPC-Stimulationen mit dem HLA-A*0201:MLANA-Tetramer (Melan-A, *GeneID* 2315, ELA-GIGILTV) parallel durchgeführt worden, wobei die HD-aAPC-Ansätze eindeutig Tetramer⁺ Populationen aufwiesen (Abbildung 3.34(d)). ELA-GIGILTV ist ein entsprechend der HLA-A*02-Anker optimiertes Peptidanalogs des T-Zellepitops MLANA_{26–35} (EAAGIGILTV), auf das die T-Zellen der meisten Spender gut reagieren sollten.

Bei den parallel durchgeführten zehn DC-Stimulationen der CD8⁺ T-Zellen von L23 ($1 \cdot 10^6$ CD8⁺ / Stimulation) wurden die erste Stimulation sowie die erste Restimulation mit peptidbeladenen autologen DCs ($5 \cdot 10^5$ DCs / Stimulation) durchgeführt, die zweite mit peptidbeladenen autologen PBMCs ($2 \cdot 10^6$ PBMCs / Stimulation) und die dritte schließlich nur mit $1 \mu\text{g/ml}$ NDC80-Peptid. Vor dieser dritten Restimulation wurden etwa 40% der Zellen aus jeder Stimulation entnommen und nach Tetramerfärbung mittels FACS analysiert. Es konnten keine Tetramer⁺ Populationen detektiert werden, da dies durch die starke un-

spezifische Hintergrundfärbung per se kaum möglich war (Abbildung 3.34(e)).

Unspezifische Hintergrundfärbung Wegen des enormen Hintergrundes wurde bei weiteren aAPC-Versuchen statt des HLA-A*0201wt:NDC80-Tetramers ein HLA-A*0201mut:NDC80-Tetramer für die Färbung eingesetzt. Bei diesem befindet an Position 245 der α -Kette des HLA-Moleküls statt eines Alanins ein Valin. Dadurch wird die Affinität der α_3 -Domäne zum CD8-Rezeptor der Zellen verringert, was zu einer geringeren unspezifischen Färbung führt.

Zur Verringerung des Hintergrundes wurde außerdem die Tetramer-Konzentration bei der Färbung variiert (10 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 2,5 $\mu\text{g/ml}$, 1,25 $\mu\text{g/ml}$). Dies reduzierte die unspezifische Färbung mit dem HLA-A*0201wt:NDC80-Tetramer etwas, hatte jedoch kaum Einfluss auf das HLA-A*0201mut:NDC80-Tetramer. Daher wurde für letzteres wieder die übliche Konzentration (5 $\mu\text{g/ml}$) an Tetramer bei der Färbung verwendet.

Um die vermuteten Tetramer⁺ Populationen der beiden HD-aAPC-Stimulationen trotz des Hintergrundes zu verifizieren und die DC-Stimulationen nochmals zu überprüfen, wurde außerdem eine intrazelluläre IFN- γ -Färbung in Kombination mit der Tetramerfärbung durchgeführt (Abbildung 3.4.2.3). Es konnten jedoch keine Tetramer⁺, IFN- γ produzierenden Zellen nachgewiesen werden. Sowohl die aAPC- wie auch die DC-Stimulationen waren also vermutlich nicht erfolgreich. Um dies zu überprüfen, wurde die aAPC-Stimulation mit L26 und der DC-Versuch mit L25 wiederholt.

L25 Die DC-Stimulation von PBMCs aus L25 erfolgte nach dem gleichen Muster wie die der PBMCs aus L23, bei der Färbung wurde aber das HLA-A*0201mut:NDC80-Tetramer verwendet. Dadurch gab es praktisch keine unspezifische Färbung mehr. Es konnten keine Tetramer⁺ Populationen in den Stimulationsansätzen detektiert werden.

L26 Die aAPC-Stimulationen wurden mit L26 wiederholt. Zum Färben wurde das Tetramer mit der mutierten schweren Kette verwendet. Wie schon bei den Stimulationen von L23 konnten positive Reaktionen nur in den HD-aAPC-Stimulationen festgestellt werden; dieses Mal jedoch erheblich eindeutiger, da der Hintergrund stark reduziert war (Abbildungen 3.34(f) und 3.34(g)). Alle vier Positivkontrollen (2 HD, 2 LD) zeigten deutliche Tetramer⁺ Populationen. Als *ex vivo*-Kontrollen wurden autologe PBMCs gefärbt, die nach der Isolierung sofort eingefroren worden waren. Es konnten keine antigenspezifischen CD8⁺ Zellen detektiert werden.

3.4. Bedeutung der HLA-Ligandom-Analyse für die klinische Anwendung

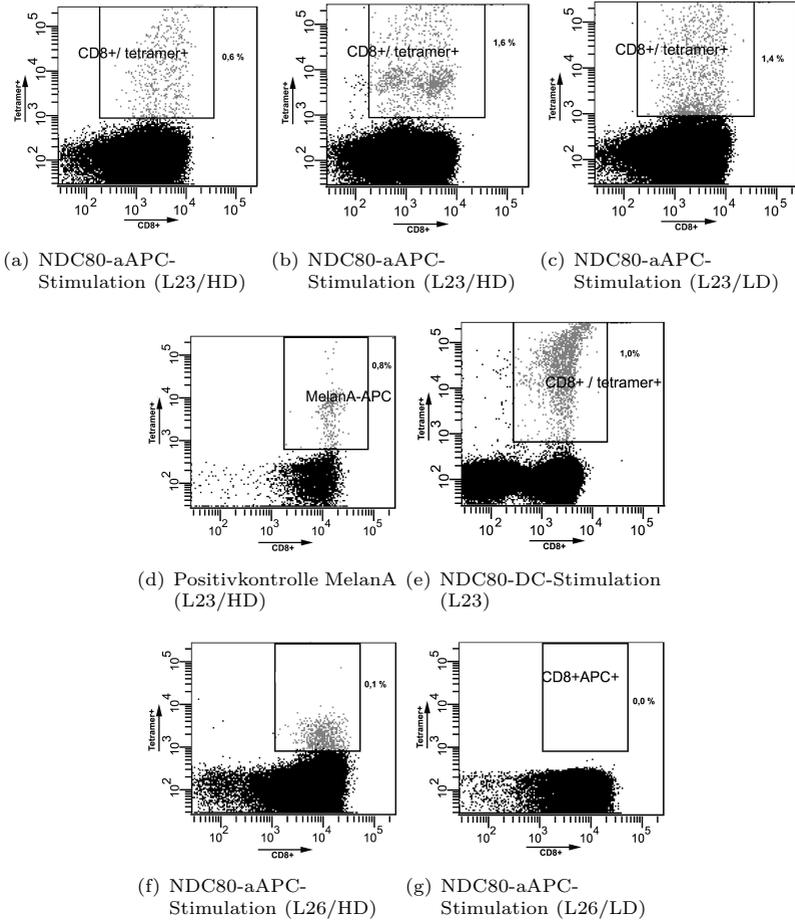


Abbildung 3.34.: Tetramer-Analyse der Stimulation mit HLA-A*0201:NDC80

3. Ergebnisse und Diskussion

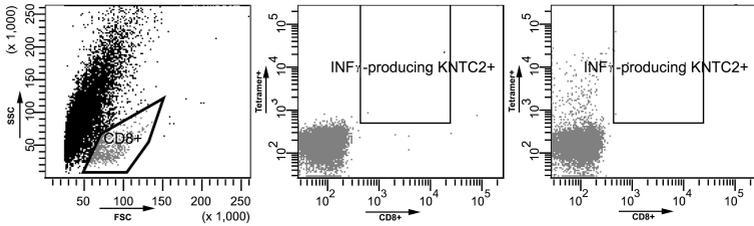


Abbildung 3.35.: IFN- γ -Produktion der mit HLA-A*0201:NDC80 stimulierten Zellen

Um die Tetramer⁺ Zellen weiter zu expandieren, wurden am dritten und siebten Tag nach der zweiten Restimulation die einzelnen Stimulationsansätze mit IL-2 gefüttert. Am elften Tag wurden die fünf positiven Stimulationen vereinigt und mit 5 μ g/ml NDC80₃₃₀₋₃₃₈-Peptid spezifisch stimuliert. Zwei Tage später wurden zusätzlich bestrahlte PBMCs von fremden Spendern (1116, 1127)⁹ als *feeder*-Zellen zugegeben, um die Zellen weiter zu expandieren. Damit die Tetramer⁺ Zellen nicht von unspezifischen Zellen überwachsen würden, sollte eine FACS-Sortierung durchgeführt werden. Leider war diese Sortierung aufgrund technischer Beeinträchtigungen nicht erfolgreich und es blieben keine Zellen für eine weitere Expansion übrig.

3.4.3. T-Zellepitop-Erkennung innerhalb des HLA-B44-Supertyps

Schon kleine allelische Unterschiede können zu einer starken Alloerkenntnis führen, wie HLA-B*4402 und -B*4403 zeigen (Fleischhauer et al., 1994). T-Zellen können diese beiden HLA-B*44-Subtypen leicht unterscheiden. Diese Spezifität ist vor allem auf unterschiedliche Konformationen des gleichen Peptids in der Bindungsfurche der beiden Subtypen zurückzuführen (Herman et al., 1999). Der Polymorphismus wirkt sich nicht nur auf die T-Zell-Erkennung, sondern auch auf das Peptidrepertoire aus (Macdonald et al., 2003). Auch für die Subtypen des HLA-A2-Supertyps wurden durch den Polymorphismus der HLA-Moleküle bedingte Änderungen des HLA-Ligandoms festgestellt (Barouch et al., 1995). Trotz Zugehörigkeit zum gleichen Supertyp wird also die T-Zell-Erkennung durch die verschiedenen Allotypen und deren unterschiedliche Peptidrepertoires beeinflusst. Dies sollte nun auch für den HLA-B44-Supertyp näher

⁹HLA-Typisierung: 1116: A11, B7, B13; 1127: A1, B8, B55

untersucht werden.

Ein sehr großer Teil der Bevölkerung ist mit EBV infiziert. Daher können EBV-spezifische T-Zellen häufig im IFN- γ -ELISPOT beobachtet werden, auch ohne den Infektionsstatus jedes einzelnen Spenders zu kennen. 130 Spender wurden mittels IFN- γ -ELISPOT auf T-Zellen untersucht, die spezifisch für ein HLA-B*40- und drei HLA-B*44-restringierte Epitope sind (Tabelle 3.24). Die Auswahl der Spender erfolgte zufällig. Einziges Kriterium war die Expression von genau einem Allel des HLA-B44-Supertyps. Von den insgesamt 240 ELISPOTS wurden 188 von Gabor Mester, 36 von Julia Makowski und 16 von Nina Hillen durchgeführt. Tabelle 3.25 und Abbildung 3.36 zeigen das Ergebnis.

In *ex vivo*-ELISPOTS mit VEITPYKPTW konnten lediglich in HLA-B44⁺ Donoren T-Zellantworten beobachtet werden. Um spezifische Memory-T-Zellen zu vermehren und bestehende, aber schwache Antworten besser sichtbar zu machen, wurden die folgenden ELISPOTS erst nach einer Präsensitivierung der PBMCs durchgeführt. Gegen zwei der drei nach Präsensitivierung getesteten Epitope zeigten sich nur in Donoren mit dem restringierenden Allel Reaktionen. EENLLDFVRF-spezifische T-Zellen wurden auch in zwei Donoren gefunden, die nicht das restringierende HLA-B*44 trugen, sondern ein anderes Allel des Supertyps. Dennoch sind die Unterschiede zwischen Spendern, die positiv oder negativ für HLA-B*44 sind, signifikant (Fisher-Test, $P = 6,5 \cdot 10^{-3}$).

Tabelle 3.24.: Epitope des HLA-B44-Supertyps für den Elispot

Sequenz	Protein	Position	SARB-Wert
AEGGVGWRHW	EBNA6	162 - 171	39,00
EENLLDFVRF	EBNA6	281 - 290	12,00
IEDPPFNSL	LMP2	200 - 208	0,13
VEITPYKPTW	EBNA4	657 - 666	0,16

Die Beobachtung, dass schon kleine allelische Unterschiede sich auf die T-Zell-Erkennung auswirken, bestätigt sich also auch für den HLA-B44-Supertyp. Schon die extrem geringfügige Überlappung der von den verschiedenen Allelen präsentierten Peptidrepertoires hatte dies vermuten lassen (3.2.6). Analysen der CD8⁺ T-Zellantworten mittels ELISPOT bestätigten diese Hypothese schließlich. Ein HLA-B*40- und zwei HLA-B*44-restringierte Peptide aus EBV-Proteinen erwiesen sich als immundominant, jedoch nur in Spendern mit dem passenden Allel des Supertyps. Als immundominant werden T-Zellantworten gegen ein bestimmtes CMV- oder EBV-Epitop bezeichnet, wenn sie in der

Tabelle 3.25.: Allotypspezifische Erkennung von EBV-Epitopen durch T-Zellen im IFN- γ -ELISPOT. Die T-Zell-Erkennung von EBV-Epitopen ist stark auf den zugehörigen Allotyp beschränkt.

Epitop	Anteil der reagierenden unter allen Spendern mit HLA-													P-Wert
	B*18	B*37	B*40	B*41	B*44	B*45	B*47	B*49	B*50					
AEGGVGWRHW	0/12	0/7	0/12	0/3	17/28	0/4	0/3	0/6	0/3	2,1·10 ⁻¹⁰				
EENLDFVRF	0/12	1/4	1/12	-	9/28	0/4	-	0/4	-	6,5·10 ⁻³				
IEDPPNSL	0/6	0/10	13/15	-	0/21	-	0/2	0/4	-	3,3·10 ⁻¹¹				
VEITPYKPTW	0/4	0/6	0/2	0/2	9/16	0/1	0/5	0/3	0/1	1,7·10 ⁻⁴				

3.4. Bedeutung der HLA-Ligandom-Analyse für die klinische Anwendung

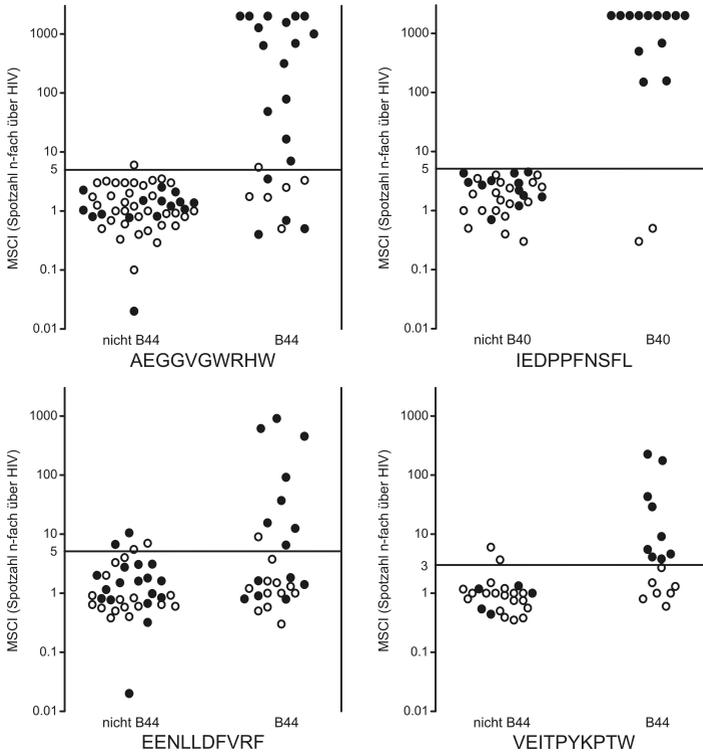


Abbildung 3.36.: Allotypspezifische Erkennung von EBV-Epitopen durch T-Zellen im IFN- γ -ELISPOT. EBV-spezifische CD8⁺ T-Zellen wurden entweder *ex vivo* oder nach Präsensitivierung anhand der IFN- γ -Produktion als Reaktion auf ein HLA-B*40-restringiertes sowie drei HLA-B*44-restringierte EBV-Epitope in Donoren mit genau einem der neun verschiedenen Antigene des HLA-B44-Supertyps. Die Donoren wurden jeweils in zwei Gruppen geteilt: solche mit dem restringierenden und solche mit einem der anderen Allele. Für jeden Donor ist der MSCI gezeigt (außer MSCI=0). MSCIs mit mehr als 10 Spots (●) sowie 10 und weniger Spots (○) werden unterschieden. Bei allen getesteten Epitopen gab es signifikant mehr positive T-Zellantworten in Donoren mit dem restringierenden Allel.

Mehrzahl der gesunden Spender messbar sind. In keinem der Donoren mit einem anderen Allel wurden T-Zellantworten beobachtet.

Sidney et al. (2003) haben einen SARB (*supermotif average relative binding*)-Wert vorgeschlagen als Maß für die Wahrscheinlichkeit, dass ein Peptid auf den meisten oder sogar allen HLA-Allelen bindet (Sidney et al., 2003). 13 von 14 Peptiden mit einem SARB-Wert von über 10 weisen nach Sidney et al. (2003) ein solches degeneriertes Bindungsverhalten auf. In dieser Arbeit jedoch zeigt selbst ein Peptid mit einem SARB von 39 keine promiskuitive T-Zell-Erkennung.

3.4.4. Zusammenfassung und Ausblick

Im Hinblick auf ihre klinische Anwendung in der Immuntherapie wurden zwei vielversprechende, molekular bereits charakterisierte HLA-A*02-Liganden daraufhin untersucht, ob sie T-Zellantworten *in vitro* induzieren können. Zum jetzigen Zeitpunkt ist dies für keines der beiden Peptide abschließend zu beantworten.

Für weitere OSMR-spezifische Stimulationen sollte ein HLA-A*0201mut:OSMR₉₇₁₋₉₇₉-Monomer rückgefaltet und als Tetramer zum Färben verwendet werden. Außerdem könnten neben DC- auch aAPC-Stimulationen durchgeführt werden. Das Beispiel von NDC80 (3.4.2.3) zeigt, dass diese erfolgreich sein können, während gleichzeitig Stimulationen mit DCs nicht funktionieren.

Als erfolgversprechender erwiesen sich die NDC80-spezifischen Stimulationen. *In vitro* ließen sich T-Zellen generieren, die von HLA-A*0201:NDC80-Tetramer angefärbt wurden. Da dies wiederholt nur mit HD-aAPCs gelungen ist, kann vermutet werden, dass die Frequenz der Vorläuferzellen im peripheren Blut sehr gering ist. In weiteren Experimenten muss nun die Expansion dieser antigenspezifischen Zellen wiederholt werden. In funktionellen Tests ist dann zu überprüfen, ob sie wirklich spezifisch HLA-A*0201mut:NDC80-Komplexe erkennen. Dies zeigt sich durch Cytokinsekretion (intrazelluläre IFN- γ -Färbung) und spezifische Lyse von Zielzellen, die diesen Komplex an der Oberfläche exprimieren (Cytotoxizitätsmessungen).

Eine weitere Frage, die sich im Rahmen klinischer Anwendungen stellt, wurde für den HLA-B44-Supertyp untersucht: Besteht aufgrund der Ähnlichkeit der HLA-Moleküle eines Supertyps die Möglichkeit, gleiche Peptide für viele Patienten mit den verschiedensten HLA-Allelen dieses Supertyps zu verwenden? Dies würde eine erhebliche Vereinfachung der Immuntherapie darstellen. Die Analyse der Promiskuität von T-Zell-Reaktionen beantwortet diese Frage für den HLA-B44-Supertyp jedoch eindeutig mit Nein.

4. Zusammenfassung

Die HLA-Ligandomik, die systematische Untersuchung von HLA-Peptidreper-toires im großen Stil, ist Grundvoraussetzung für zwei wichtige Forschungsfelder. Zum einen gewährt sie Einblicke in die fundamentalen Mechanismen und Prinzipien der Antigenprozessierung und -präsentation. Zum anderen erlaubt sie die Übertragung dieses Wissens auf klinische Anwendungen wie T-Zellepitopvorhersagen, Immundiagnostik oder peptidbasierte Immuntherapie.

Zunächst wurden die Peptidmotive von 18 HLA-Allelen – basierend auf knapp 2000 natürlichen Liganden – entweder neu aufgestellt oder aber überarbeitet und verfeinert. Diese Motive, die durch Anker, Hilfsanker und Längenverteilungen charakterisiert sind, zeigen, dass sich verschiedene Allele meist durch viele einzigartige Merkmale voneinander abheben.

Dies spiegelt sich auch in der geringen Überlappung der HLA-Peptidreper-toires verschiedener Allotypen wider. Diese wurde insbesondere für den HLA-B44-Supertyp eingehend mit Hilfe verschiedenster massenspektrometri-scher Methoden untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Mitglieder des Super-typs weniger als 3% ihrer Peptide gemeinsam haben. Diese HLA-Ligandom-Überschneidungen können allerdings im Einzelfall für kleine Gruppen von Sub-typen oder HLA-Antigenen sowie für andere Supertypen auch größer sein.

Die Proteomik und die HLA-Ligandomik sind durch gemeinsame Methoden sowie durch analog anwendbare Konzepte und Forschungsfragen eng verwandt. Dies wurde an den Beispielen Gewebsspezifität, allotypische Peptide und Quell-proteinanalysen näher betrachtet. So konnte etwa der HLA-A*02-Ligand YLL-PAIVHI bislang auf 77% aller HLA-A*02⁺ Sources detektiert werden und stellt somit ein „Markerpeptid“ für HLA-A*02 dar.

Schließlich wurde die Bedeutung der HLA-Ligandomik für die klinische An-wendung an zwei Beispielen verdeutlicht. Zum einen wurden Peptide aus potenti-ell tumor-assoziierten Antigenen zur *in vitro*-Stimulation von CD8⁺ T-Zellen verwendet. Zum anderen konnte anhand von vier HLA-B*44- bzw. HLA-B*40-restingierten EBV-T-Zellepitopen bei 130 Spendern gezeigt werden, dass es inner-halb des HLA-B44-Supertyps keine promiskuitive T-Zell-Epitoperkennung gibt. Peptidvakzinierungen werden also patienten- und allotypspezifisch erfol- gen müssen.

A. Anhang

A.1. HLA-A*02

Sequenz	GeneID	Source(n)
AAILGMHNL	29766	RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
AARPATSTL	1981	JY (A*0201, B*0702)
AIAPHAAV	60528	RCC026_ZL (A*0201, A*3303, B*4101, B*5101)
AIIPSKKL	6218	Awells (A*0201, B*4402)
AILKKVIQW	6500	RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
AIVDKVPSV	22820	Awells (A*0201, B*4402)
		B-LCL 166 (A*02, B*13, B*51)
		CCA061_T (A*02, A*03, B*15, B*35)
		DEM (A*0201, B*5701)
		HeLa P83.30 (A*0201)
		JY (A*0201, B*0702)
		LCL026_ZL (A*0201, A*3303, B*4101, B*5101)
		LCL721.45 (A*0201, B*5101)
		RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)
		RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
		RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
		RCC099_N (A*02, B*27, B*57)
		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
		RCC110_N (A*02, B*18, B*27)
		RCC110_T (A*02, B*18, B*27)
		RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
		RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
		RCC119_T (A*02, A*24, B*07, B44-Supertyp)
		THP-1 (A*02, A*23/24, B*51)
ALAAVVTEV		RCC013_T (A*02, A*24, B*07, B*40)
ALADGVQKV	8542	LCL721.45 (A*0201, B*5101)
		RCC013_T (A*02, A*24, B*07, B*40)
		RCC026_ZL (A*0201, A*3303, B*4101, B*5101)
		RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
		RCC099_N (A*02, B*27, B*57)
		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
		RCC110_N (A*02, B*18, B*27)
		RCC110_T (A*02, B*18, B*27)
		RCC130_T (A*02, A*24, B*07, B*44)
		RCC2733_ZL (A*01, A*02, B*07, B*49)
		THP-1 (A*02, A*23/24, B*51)

Sequenz	GeneID	Source(n)
ALADLDELLIRA	3339	RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
ALAEIAKAEI	6421	Awells (A*0201, B*4402)
		LCL026_ZL (A*0201, A*3303, B*4101, B*5101)
		LCL721.45 (A*0201, B*5101)
ALAGHQDGITFI	80344	JY (A*0201, B*0702)
ALANGIEEV	80833	RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)
ALANHLIKV	10938	RCC099_N (A*02, B*27, B*57)
		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
ALASHLIEA	30846	HeLa P83.30 (A*0201)
		RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)
		RCC099_N (A*02, B*27, B*57)
		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
		RCC100_T (A*02, A*03, B*07, B*18)
		RCC110_N (A*02, B*18, B*27)
ALASLIRSV	10404	RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
ALATLIHQV	50813	JY (A*0201, B*0702)
		LCL721.45 (A*0201, B*5101)
		RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
		RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
		RCC099_N (A*02, B*27, B*57)
		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
		RCC119_T (A*02, A*24, B*07, B44-Supertyp)
		RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101)
		RCC399_T (A*01, A*02, B*08, B*50)
ALCEENMRGV	1938	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
ALDKATVLL	27250	Awells (A*0201, B*4402)
ALDSQVPKV	89846	DEM (A*0201, B*5701)
ALFDGDPHL	23273	RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)
ALFDIESKV	2346	RCC099_N (A*02, B*27, B*57)
		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
ALFGALFLA	5360	RCC013_T (A*02, A*24, B*07, B*40)
ALFQRPPLI	1736	Awells (A*0201, B*4402)
		RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
ALGKIPQTV	54575	RCC099_N (A*02, B*27, B*57)
ALIEKLVEL	23649	LCL721.45 (A*0201, B*5101)
ALISNSHQL	4094	RCC110_T (A*02, B*18, B*27)
ALKDLINEA	5111	Awells (A*0201, B*4402)
ALLDIHRSI	9415	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
ALLDKLYAL	55272	Awells (A*0201, B*4402)
		LCL721.45 (A*0201, B*5101)
		RCC100_T (A*02, A*03, B*07, B*18)
		RCC119_T (A*02, A*24, B*07, B44-Supertyp)
ALLDRIVSV	23165	Awells (A*0201, B*4402)
ALLDVPTAAV		LCL721.174 (A*0201, B*5101)
ALLGKIEKV	2590	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)

A. Anhang

Sequenz	GeneID	Source(n)
ALLLDVPTAAV		LCL721.174 (A*0201, B*5101)
ALLLDVPTAAVQA		LCL721.174 (A*0201, B*5101)
ALLNIKVKL	3875	RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44) RCC013_T (A*02, A*24, B*07, B*40) RCC073_T (A*02, A*03, B*07, B*57) RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
ALLSSLARC	9562	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
ALMELFPKL	27340	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
ALMPVLNQV	118460	RCC099_N (A*02, B*27, B*57) RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
ALNEKLVNL	8665	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
ALNELLQHV	7094	HeLa P83.30 (A*0201) RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501) RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501) RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18) RCC399_M (A*01, A*02, B*08, B*50) RCC399_T (A*01, A*02, B*08, B*50)
ALPPVLTTV	23367	RCC026_ZL (A*0201, A*3303, B*4101, B*5101)
ALQEMVHQV	4739	RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501) RCC099_N (A*02, B*27, B*57) RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
ALSDHHIYL	226	Awells (A*0201, B*4402) B-LCL 166 (A*02, B*13, B*51) JY (A*0201, B*0702) LCL721.45 (A*0201, B*5101) RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44) RCC013_T (A*02, A*24, B*07, B*40) RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501) RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501) RCC099_N (A*02, B*27, B*57) RCC099_T (A*02, B*27, B*57) RCC100_T (A*02, A*03, B*07, B*18) RCC110_N (A*02, B*18, B*27) RCC110_T (A*02, B*18, B*27) RCC2733_ZL (A*01, A*02, B*07, B*49) RCC399_M (A*01, A*02, B*08, B*50) RCC399_T (A*01, A*02, B*08, B*50)
ALSDLEITL	10979	RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44) RCC026_ZL (A*0201, A*3303, B*4101, B*5101)
ALSNLEVKL	83706	LCL721.45 (A*0201, B*5101)
ALTELLAKI	894	LCL721.45 (A*0201, B*5101)
ALTPVVVL		RCC026_ZL (A*0201, A*3303, B*4101, B*5101)
ALTSVVVTL	1021	RCC026_ZL (A*0201, A*3303, B*4101, B*5101)
ALVDHVAEL	64005	DEM (A*0201, B*5701)
ALVVQVAEA	3074	LCL721.174 (A*0201, B*5101)

Sequenz	GeneID	Source(n)
ALWDKLFNL	23224	RCC073_T (A*02, A*03, B*07, B*57)
AMAPPSHLLL	27043	LCL721.174 (A*0201, B*5101)
AVLALVLAPAGA	8829	LCL721.174 (A*0201, B*5101)
AVLGAVVAV	3106	RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
AVSGAVNDSIKAI	2122	RCC399_T (A*01, A*02, B*08, B*50)
AVTLARQAGEVV	3612	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
DAILEELSA	79643	RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
DALDGLLQVQ	8178	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
DSSGHILVPG	84735	Awells (A*0201, B*4402)
DVASVIVTKL	6729	RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)
DVELDDDLGKDEL	10130	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501) THP-1 (A*02, A*23/24, B*51)
DVYSGTPTKV	7884	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
EAAEVILRV	10576	HeLa P83.30 (A*0201)
ELTLGEFLKL	332	HeLa P83.30 (A*0201)
ETAKLIEKL	1938	HeLa P83.30 (A*0201)
ETFEHPNVV	1021	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
ETIPGPDAAV	84153	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
ETYPDPVVR	16	HeLa P83.30 (A*0201)
EVGGEALGRLL	3043	RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
EVMGMVEEVVEV		RCC399_T (A*01, A*02, B*08, B*50)
EVIDFVSHGL	51104	HeLa P83.30 (A*0201)
EVSNTFVRL	10623	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
FAEGFVRAL	3725	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
FANERCLQL	54908	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
FASGLIHRV	200185	HeLa P83.30 (A*0201)
FASHVSPEV	26286	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
FAYDGKDYLTLL	3133	RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
FIADLVVGL	2023	C1R-A2 (A*0201)
FIIQGLRSV	3117	B-LCL 166 (A*02, B*13, B*51) DEM (A*0201, B*5701) JY (A*0201, B*0702)
FIWENIHTL	667	RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
FIYHGEVPQA	4261	RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
FLADPSAFVAA	6175	RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
FLASESLIKQI	4736	Awells (A*0201, B*4402)
FLDGNELTL	1192	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
FLDGNEMTL	25932	RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44) RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44) RCC099_N (A*02, B*27, B*57) RCC099_T (A*02, B*27, B*57)

A. Anhang

Sequenz	GeneID	Source(n)
FLDILNTLI	1769	RCC130_T (A*02, A*24, B*07, B*44)
FLDIYIFL		RCC130_T (A*02, A*24, B*07, B*44)
FLDPKAYL	221395	RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
		RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
FLDPNNIPKA	79053	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
FLDPRPLTV	1545	B-LCL 166 (A*02, B*13, B*51)
		RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
		RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
FLEAADNLRL	51504	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
FLEKLLPPV	11313	RCC099_N (A*02, B*27, B*57)
		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
FLFELPSRL	738	Awells (A*0201, B*4402)
FLFGEVHKA	55388	JY (A*0201, B*0702)
FLGENISNFL	8542	RCC013_T (A*02, A*24, B*07, B*40)
		RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
FLIETGPRGV	7145	RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
		RCC263_T (A*02, B*15, B*50)
FLIRESETL	4067	LCL721.45 (A*0201, B*5101)
FLITILDHL	8776	Awells (A*0201, B*4402)
FLITQLKML	4509	U937 (nicht bekannt)
FLITQLKMLNT	4509	U937 (nicht bekannt)
FLLDGFPRTV	204	Awells (A*0201, B*4402)
		HeLa P83.30 (A*0201)
FLLDKKIGV	10576	Awells (A*0201, B*4402)
		JY (A*0201, B*0702)
		LCL721.45 (A*0201, B*5101)
		RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)
		RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
		RCC099_N (A*02, B*27, B*57)
		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
		RCC263_T (A*02, B*15, B*50)
FLLDLSRSV	2853	RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
FLLEGIRSL	3071	JY (A*0201, B*0702)
FLLEKGYEV	2762	HeLa P83.30 (A*0201)
FLLGPRVLVA	10972	LCL721.174 (A*0201, B*5101)
		RCC099_N (A*02, B*27, B*57)
		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
FLLPDVIRI	54662	RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
FLQLLVLIK	64112	Awells (A*0201, B*4402)
FLTKQEILL	10519	LCL721.45 (A*0201, B*5101)
		RCC099_N (A*02, B*27, B*57)
		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
		JY (A*0201, B*0702)
FLTSVINRV		
FLVTVIHTL	10154	RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
FQDPVPLTV	8805	RCC026_ZL (A*0201, A*3303, B*4101, B*5101)

Sequenz	GeneID	Source(n)
FVHDLVLYL	1213	RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
FVNDIFERI	3017	HeLa P83.30 (A*0201)
		RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
GFVIPVIII		Awells (A*0201, B*4402)
GILCLQAHS	400073	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
GIMKKAYEL	6722	RCC099_N (A*02, B*27, B*57)
		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
		RCC110_N (A*02, B*18, B*27)
GLADKVYFL	790	HeLa P83.30 (A*0201)
GLATDVQTV	5691	CCA061_T (A*02, A*03, B*15, B*35)
		RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
GLDIDGIYRV	94134	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
GLFPWTPKL	10207	HeLa P83.30 (A*0201)
GLGACLGPRI	2318	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
GLIEILKKV	9141	JY (A*0201, B*0702)
		RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
GLIEKNIEL	1786	JY (A*0201, B*0702)
GLLPDVPSL	79143	RCC026_ZL (A*0201, A*3303, B*4101, B*5101)
GLNDFIQKI	6446	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
GLNEEIARV	10403	HeLa P83.30 (A*0201)
		RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
GLSERCAQY	226	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
GLTSTDLLFHL	23649	Awells (A*0201, B*4402)
GLVPFLVSV	3838	RCC013_T (A*02, A*24, B*07, B*40)
GQIEVVPEV	23469	RCC026_ZL (A*0201, A*3303, B*4101, B*5101)
GVDYDGEHHSV	4113	HeLa P83.30 (A*0201)
HACGVIATI	23585	HeLa P83.30 (A*0201)
HIENIVAV	26156	Awells (A*0201, B*4402)
		LCL721.45 (A*0201, B*5101)
		RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
		RCC110_T (A*02, B*18, B*27)
HLANIVERV	10346	LCL721.45 (A*0201, B*5101)
		RCC110_T (A*02, B*18, B*27)
HLAVERGKV	255239	Awells (A*0201, B*4402)
HLGPEGRSV	50626	RCC099_N (A*02, B*27, B*57)
HLINYIIFL	440026	LCL721.45 (A*0201, B*5101)
		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
HLLLLMIHV	23207	RCC399_T (A*01, A*02, B*08, B*50)
HLPETKFSEL	202	LCL721.45 (A*0201, B*5101)
HSAEILAEI	57019	HeLa P83.30 (A*0201)
HTANIQTLI	57082	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
HTINGHNAEV	3181	HeLa P83.30 (A*0201)
HVFDHPWETV	51012	HeLa P83.30 (A*0201)
HVGDIIKEV	4355	HeLa P83.30 (A*0201)
HVVDFNFRV	126308	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)

A. Anhang

Sequenz	GeneID	Source(n)
IALIENALI		RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
IAMATVTAL	226	RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
IARLPSTL	146909	JY (A*0201, B*0702)
IILDKLSIV		RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
IIMPHNIYL	6556	RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
IITKEVLAP		LCL721.174 (A*0201, B*5101)
ILADIVISA	10797	C1R-A2 (A*0201)
ILAPAGSLPKI	29914	LCL721.174 (A*0201, B*5101)
ILDKFTEEV	223	HeLa P83.30 (A*0201)
ILDKKVEKV	3326	HeLa P83.30 (A*0201)
		RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
ILDPHVLL	4927	Awells (A*0201, B*4402)
ILDQKINEV	4953	Awells (A*0201, B*4402)
		JY (A*0201, B*0702)
		RCC099_N (A*02, B*27, B*57)
		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
ILDTGTIQL	9027	RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)
		RCC099_N (A*02, B*27, B*57)
		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
ILFGHENRV	10681	RCC099_N (A*02, B*27, B*57)
ILHDDEVTV	6176	DEM (A*0201, B*5701)
		RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
		RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
		RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
ILHEIAVLEL	9262	LCL721.45 (A*0201, B*5101)
ILINDAGEVRL	11184	Awells (A*0201, B*4402)
ILLDERGQIKL	5609	Awells (A*0201, B*4402)
ILLSHLHYL	2078	RCC399_T (A*01, A*02, B*08, B*50)
ILMEHIHKL	6143	Awells (A*0201, B*4402)
		B-LCL 166 (A*02, B*13, B*51)
		CML85 (A*0201, A*1101, B*1501, B*27)
		DEM (A*0201, B*5701)
		JY (A*0201, B*0702)
		LCL721.45 (A*0201, B*5101)
		RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
		RCC099_N (A*02, B*27, B*57)
		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
		RCC100_T (A*02, A*03, B*07, B*18)
		RCC110_N (A*02, B*18, B*27)
		RCC110_T (A*02, B*18, B*27)
		RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
		RCC119_T (A*02, A*24, B*07, B44-Supertyp)
		RCC130_T (A*02, A*24, B*07, B*44)
ILNPDNSFEIL	821	RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
ILQAHLHSL	1015	CCA061_T (A*02, A*03, B*15, B*35)

Sequenz	GeneID	Source(n)
ILTDITKGV	1938	Awells (A*0201, B*4402) DEM (A*0201, B*5701) HeLa P83.30 (A*0201) Huvec 166 (A*02, B*13, B*51) JY (A*0201, B*0702) RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501) RCC099_N (A*02, B*27, B*57) RCC110_N (A*02, B*18, B*27)
ILYDIPDIRL	10667	Awells (A*0201, B*4402)
ILYPKTLFL	5530	RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
IMDATNILV	6774	RCC100_N (A*02, A*03, B*07, B*18) RCC100_T (A*02, A*03, B*07, B*18)
IMKMRKTL	8450	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
IMLEALERV	6637	Awells (A*0201, B*4402) HeLa P83.30 (A*0201) LCL721.45 (A*0201, B*5101) RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501) RCC110_N (A*02, B*18, B*27) RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18) RCC130_T (A*02, A*24, B*07, B*44) RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101) RCC2733_ZL (A*01, A*02, B*07, B*49)
IMRAGMSSL	908	RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
ITAPPSRVL	6319	JY (A*0201, B*0702) RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501) RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18) JY (A*0201, B*0702)
IVIEAIHTV		JY (A*0201, B*0702)
KAFQKIVVL	9689	HeLa P83.30 (A*0201)
KIADFGWSV	6790	LCL721.45 (A*0201, B*5101)
KIAQKALDL	3162	RCC110_T (A*02, B*18, B*27)
KIFEMGPVFTL	4513	AML04 (A*02, A*32, B*38, B*56) HeLa P83.30 (A*0201)
KILEDVVG	22974	Awells (A*0201, B*4402) LCL721.45 (A*0201, B*5101)
KILPTLEAV	3608	Awells (A*0201, B*4402) DEM (A*0201, B*5701)
KIYEGQVEV	6125	Awells (A*0201, B*4402) HeLa P83.30 (A*0201) LCL026_ZL (A*0201, A*3303, B*4101, B*5101) RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501) RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
KLAEVGRVYL	3674	CML85 (A*0201, A*1101, B*1501, B*27)
KLDAFVEGV	528	HeLa P83.30 (A*0201)
KLDPTKTTL	10397	RCC099_N (A*02, B*27, B*57) RCC099_T (A*02, B*27, B*57)

A. Anhang

Sequenz	GeneID	Source(n)
		RCC110_N (A*02, B*18, B*27)
		RCC110_T (A*02, B*18, B*27)
		RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
		RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101)
KLDQVIIHV	80896	RCC099_N (A*02, B*27, B*57)
		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
KLFDDKLQNC	114883	HeLa P83.30 (A*0201)
KLFNEFIQL	10885	HeLa P83.30 (A*0201)
KLGEIVTTI	375	Awells (A*0201, B*4402)
		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
KLGSVPVTV	9747	RCC099_N (A*02, B*27, B*57)
		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
KLHGVNINV	5936	Awells (A*0201, B*4402)
		LCL721.45 (A*0201, B*5101)
		RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
		RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
		RCC099_N (A*02, B*27, B*57)
		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
		RCC110_N (A*02, B*18, B*27)
		RCC110_T (A*02, B*18, B*27)
KLIDRTESL	4046	JY (A*0201, B*0702)
		LCL721.45 (A*0201, B*5101)
		RCC110_N (A*02, B*18, B*27)
KLLDEVTYL	1573	RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
KLLDLMPRL	92105	JY (A*0201, B*0702)
KLLDPEDISV	6711	LCL721.45 (A*0201, B*5101)
KLLDPEDVAVQL	7402	RCC099_N (A*02, B*27, B*57)
		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
KLLEGEESRISL	7431	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
KLLEKAFSI	9420	RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
KLLEPVLL	6217	JY (A*0201, B*0702)
KLLEPVLLL	6217	Awells (A*0201, B*4402)
		HeLa P83.30 (A*0201)
		JY (A*0201, B*0702)
		LCL721.45 (A*0201, B*5101)
		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
		RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
KLLHVFL	3426	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
KLSDLQTQL	5432	RCC110_T (A*02, B*18, B*27)
KLSEIDVAL	80303	RCC099_N (A*02, B*27, B*57)
		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
		RCC100_T (A*02, A*03, B*07, B*18)
		RCC110_N (A*02, B*18, B*27)
		RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
KLSELEAAL	3856	RCC099_T (A*02, B*27, B*57)

Sequenz	GeneID	Source(n)
KLWDPRTPCNA	9184	HeLa P83.30 (A*0201)
KLWEMDNMLI	93621	LCL721.45 (A*0201, B*5101) RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
KLYGKPIRV	10262	HeLa P83.30 (A*0201)
KMDASLGNLFA	10447	LCL721.174 (A*0201, B*5101)
KMDPIISRV	7832	CCA164_T (A*02, A*11, B*07, B*35) LCL721.45 (A*0201, B*5101)
KTIKLWNTL	10399	RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
KTRLINQVL	60592	RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
KTRVFAVVI	1292	RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
KVCNPIITKL	3312	RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
KVIEINPYL	5693	RCC099_T (A*02, B*27, B*57) RCC110_T (A*02, B*18, B*27)
KVKTLEVEI	83483	RCC099_N (A*02, B*27, B*57) RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
KVLERVNAV	5721	RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101)
KVLHETIKV	5932	CML85 (A*0201, A*1101, B*1501, B*27)
LAALPHSCL	8490	RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
LASVSTVL	3039	RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)
LATDFIQSL	9262	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
LAVHPSGVAL	9636	EMJ (A*0201, A*0301, B*4001)
LCRRIPYL	79882	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
LDVPTAAVQA	10437	LCL721.174 (A*0201, B*5101)
LIDDVHRL	6734	THP-1 (A*02, A*23/24, B*51)
LLAAWTARA	351	Huvec 166 (A*02, B*13, B*51) LCL721.174 (A*0201, B*5101) RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
LLAERDLYL	7052	RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
LLAPFCPHL	51520	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
LLAPPSRPA	2812	CML85 (A*0201, A*1101, B*1501, B*27)
LLAQUERLLV		Awells (A*0201, B*4402)
LLATLAAAML	79652	LCL721.174 (A*0201, B*5101)
LLDEEISRV	9444	RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
LLDHVLLTL	7094	RCC099_N (A*02, B*27, B*57) RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
LLDKDQAVAV	5591	DEM (A*0201, B*5701)
LLDPGEHYC	9180	HeLa P83.30 (A*0201)
LLDRFLATV	10983	B-LCL 166 (A*02, B*13, B*51) CML85 (A*0201, A*1101, B*1501, B*27) Huvec 166 (A*02, B*13, B*51) LCL721.45 (A*0201, B*5101) RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501) RCC099_N (A*02, B*27, B*57) RCC099_T (A*02, B*27, B*57) RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)

A. Anhang

Sequenz	GeneID	Source(n)		
LLDVPTAAV	10437	LCL721.174 (A*0201, B*5101)		
		RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)		
		RCC013_T (A*02, A*24, B*07, B*40)		
		RCC099_N (A*02, B*27, B*57)		
		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)		
		RCC110_N (A*02, B*18, B*27)		
LLFDRPMHV	4670	Awells (A*0201, B*4402)		
		JY (A*0201, B*0702)		
		LCL721.45 (A*0201, B*5101)		
		RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)		
		RCC099_N (A*02, B*27, B*57)		
		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)		
LLFSHVDHVIA	6546	LCL721.174 (A*0201, B*5101)		
		LLGELPRLLLL		
LLGPPPVGV	1604	HeLa P83.30 (A*0201)		
LLGPRLVLA	25792	JY (A*0201, B*0702)		
		10972	Awells (A*0201, B*4402)	
		HeLa P83.30 (A*0201)		
		Huvec 166 (A*02, B*13, B*51)		
		LCL721.174 (A*0201, B*5101)		
		RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)		
		RCC099_N (A*02, B*27, B*57)		
		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)		
		RCC110_N (A*02, B*18, B*27)		
		RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)		
		RCC263_T (A*02, B*15, B*50)		
		LLHPPPPPPPA	10048	LCL721.174 (A*0201, B*5101)
				LLIDDKGTIKL
		LLIENVASL	983	JY (A*0201, B*0702)
LCL721.45 (A*0201, B*5101)				
2876	Awells (A*0201, B*4402)			
B-LCL 166 (A*02, B*13, B*51)				
C1R-A2 (A*0201)				
CML85 (A*0201, A*1101, B*1501, B*27)				
DEM (A*0201, B*5701)				
HeLa P83.30 (A*0201)				
Huvec 166 (A*02, B*13, B*51)				
JY (A*0201, B*0702)				
LCL721.45 (A*0201, B*5101)				
RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501)				
RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)				
RCC099_N (A*02, B*27, B*57)				
RCC099_T (A*02, B*27, B*57)				
RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)				
RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)				
RCC399_T (A*01, A*02, B*08, B*50)				
U937 (nicht bekannt)				

Sequenz	GeneID	Source(n)
LLLDVPTAA	10437	LCL721.174 (A*0201, B*5101)
LLLDVPTAAV	10437	LCL721.174 (A*0201, B*5101)
LLLDVPTAAVQA	10437	Awells (A*0201, B*4402)
		LCL721.174 (A*0201, B*5101)
		RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
LLLEDLIRC	9968	HeLa P83.30 (A*0201)
LLLLSIVIL	1901	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
		RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
LLLPGELAKHAV	3017	Awells (A*0201, B*4402)
LLLSAEPVPA	974	LCL721.174 (A*0201, B*5101)
LLMEHTMVAF		Awells (A*0201, B*4402)
LLMKNCNGGAI	27068	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
LLMVLSPL	1213	RCC2733_ZL (A*01, A*02, B*07, B*49)
LLPPPPCPA	2519	HeLa P83.30 (A*0201)
LLREVG TAL	23348	JY (A*0201, B*0702)
LLSAEPVPA	974	LCL721.174 (A*0201, B*5101)
LLYPTTEITV	3675	RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
LMDHTIPEV	6386	RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
		RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
		RCC099_N (A*02, B*27, B*57)
		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
LMISRTPEV	3492	JY (A*0201, B*0702)
		LCL721.45 (A*0201, B*5101)
		RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101)
LMQQLHREL	200958	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
LMVDHVTEV	10011	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
LSLLGLYLKL	9675	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
LVLMLVLYLI	93183	RCC2733_ZL (A*01, A*02, B*07, B*49)
LVMAPRTVL	3106	JY (A*0201, B*0702)
LVRDVVSSL	56342	JY (A*0201, B*0702)
MADPNIRFL	340061	CML85 (A*0201, A*1101, B*1501, B*27)
MLDQTLLDLNEM	7170	HeLa P83.30 (A*0201)
MLDQTLLLEL	7168	RCC026_ZL (A*0201, A*3303, B*4101, B*5101)
MLERVIKNY	4103	Awells (A*0201, B*4402)
MSGLSAALLPV	51375	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
MVDG TLLLL	3133	RCC013_T (A*02, A*24, B*07, B*40)
NADAIVVKL	27044	Awells (A*0201, B*4402)
NLAEDIMRL	7431	HeLa P83.30 (A*0201)
		Huvec 166 (A*02, B*13, B*51)
		RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
NLAENISRV	5834	HeLa P83.30 (A*0201)
		RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
NLCPTRIEV	26010	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
NLLPKLHIV	1192	Awells (A*0201, B*4402)

A. Anhang

Sequenz	GeneID	Source(n)
		DEM (A*0201, B*5701)
		HeLa P83.30 (A*0201)
		Huvec 166 (A*02, B*13, B*51)
		JY (A*0201, B*0702)
		LCL721.45 (A*0201, B*5101)
		RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)
		RCC026_ZL (A*0201, A*3303, B*4101, B*5101)
		RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
		RCC099_N (A*02, B*27, B*57)
		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
		RCC100_N (A*02, A*03, B*07, B*18)
		RCC100_T (A*02, A*03, B*07, B*18)
		RCC110_N (A*02, B*18, B*27)
		RCC110_T (A*02, B*18, B*27)
		RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
		RCC119_T (A*02, A*24, B*07, B44-Supertyp)
		RCC399_T (A*01, A*02, B*08, B*50)
NLLPKLHVV	53405	RCC099_N (A*02, B*27, B*57)
NLLVPSSFLV	170572	Awells (A*0201, B*4402)
NLPIFLPRV	79083	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
NLYPFVKTV	471	Awells (A*0201, B*4402)
		LCL721.45 (A*0201, B*5101)
NMLPQIFRV	57102	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
NMVAKVDEV	4736	HeLa P83.30 (A*0201)
NTATIFHEL	29110	HeLa P83.30 (A*0201)
NTCPYVHNI	51728	HeLa P83.30 (A*0201)
		RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
NVRIATTAL	7805	JY (A*0201, B*0702)
NYIDKVRFL	7431	BER (A*0201, B*1302)
		RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
		RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
		RCC099_N (A*02, B*27, B*57)
		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
		RCC119_T (A*02, A*24, B*07, B44-Supertyp)
		RCC130_T (A*02, A*24, B*07, B*44)
		RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101)
		RCC263_T (A*02, B*15, B*50)
PIVFRPL	255101	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
QILTALAVSRI	259296	JY (A*0201, B*0702)
QLDDDLKVEL	11224	LCL721.45 (A*0201, B*5101)
		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
QLIDKVVWL	6397	Huvec 166 (A*02, B*13, B*51)
		LCL721.45 (A*0201, B*5101)
		RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)
		RCC099_N (A*02, B*27, B*57)

Sequenz	GeneID	Source(n)
		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
		RCC110_N (A*02, B*18, B*27)
		RCC110_T (A*02, B*18, B*27)
		RCC119_T (A*02, A*24, B*07, B44-Supertyp)
QLLEKVIEL	55862	LCL721.45 (A*0201, B*5101)
QLLSVDGRSL	4301	RCC399_T (A*01, A*02, B*08, B*50)
QLQEGKNVIGL	8407	LCL721.174 (A*0201, B*5101)
QLVDIIEKV	10197	Awells (A*0201, B*4402)
		HeLa P83.30 (A*0201)
		JY (A*0201, B*0702)
		LCL721.45 (A*0201, B*5101)
		RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
		RCC110_N (A*02, B*18, B*27)
		RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
		RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
QMFEGVARV	22998	HeLa P83.30 (A*0201)
QMQEKAKEI	6001	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
QVCAIHERV	8663	HeLa P83.30 (A*0201)
QVFPGLLERV	25814	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
RIGSGLKALL	79919	RCC2733_ZL (A*01, A*02, B*07, B*49)
RIIDVVYNA	6202	Awells (A*0201, B*4402)
		RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
RIIETLAL	10109	LCL721.45 (A*0201, B*5101)
RIRPTAVTL	25777	RCC100_N (A*02, A*03, B*07, B*18)
		RCC100_T (A*02, A*03, B*07, B*18)
RLAQHITYV	4176	Awells (A*0201, B*4402)
		JY (A*0201, B*0702)
		RCC399_T (A*01, A*02, B*08, B*50)
RLASRPLLL	5738	RCC100_N (A*02, A*03, B*07, B*18)
		RCC100_T (A*02, A*03, B*07, B*18)
		RCC119_T (A*02, A*24, B*07, B44-Supertyp)
RLASTLVHL	1213	RCC399_T (A*01, A*02, B*08, B*50)
RLASYLDKV	3857	RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
		RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
RLASYLDRV	3875	Awells (A*0201, B*4402)
		RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
		RCC099_N (A*02, B*27, B*57)
		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
		RCC100_T (A*02, A*03, B*07, B*18)
		RCC110_N (A*02, B*18, B*27)
		RCC110_T (A*02, B*18, B*27)
		RCC119_T (A*02, A*24, B*07, B44-Supertyp)
		RCC399_M (A*01, A*02, B*08, B*50)
RLDDAIHVL	6925	Awells (A*0201, B*4402)

A. Anhang

Sequenz	GeneID	Source(n)
RLDELGGVYL	6185	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40) RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501) RCC399_T (A*01, A*02, B*08, B*50)
RLFSSIVTV	54920	Awells (A*0201, B*4402)
RLPIHIVL	64005	LCL721.45 (A*0201, B*5101)
RLKKALI	3508	RCC119_T (A*02, A*24, B*07, B44-Supertyp)
RLAAALLL	9547	RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
RLLDGAFKL	23332	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
RLLDVLAFL	80781	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501) RCC099_N (A*02, B*27, B*57) RCC099_T (A*02, B*27, B*57) RCC130_T (A*02, A*24, B*07, B*44) RCC2733_ZL (A*01, A*02, B*07, B*49) RCC399_N (A*01, A*02, B*08, B*50)
RLLDVLAFLVL	80781	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
RLLDYVVNI	25959	Awells (A*0201, B*4402) RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44) RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501) RCC099_T (A*02, B*27, B*57) RCC100_N (A*02, A*03, B*07, B*18) RCC100_T (A*02, A*03, B*07, B*18) RCC119_T (A*02, A*24, B*07, B44-Supertyp) RCC130_T (A*02, A*24, B*07, B*44)
RLLEDGEDFNL	3875	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
RLLEVPVML	79763	LCL721.45 (A*0201, B*5101) RCC2733_ZL (A*01, A*02, B*07, B*49) RCC399_T (A*01, A*02, B*08, B*50)
RLHEMILV	1315	RCC399_T (A*01, A*02, B*08, B*50)
RLQLLLQL	683	CML85 (A*0201, A*1101, B*1501, B*27)
RLLSFVFLA	6746	Awells (A*0201, B*4402)
RLPEIYIQL	30844	Awells (A*0201, B*4402)
RLPQKLLL	8312	RCC119_T (A*02, A*24, B*07, B44-Supertyp)
RLQEDPPVGV	7320	DEM (A*0201, B*5701) RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
RLQEEINEV	121457	DEM (A*0201, B*5701)
RLQLKIIL	8701	RCC119_T (A*02, A*24, B*07, B44-Supertyp)
RLQMEQMQL	64793	RCC100_N (A*02, A*03, B*07, B*18) RCC100_T (A*02, A*03, B*07, B*18) RCC119_T (A*02, A*24, B*07, B44-Supertyp)
RLRLGGAAL	754	RCC100_N (A*02, A*03, B*07, B*18) RCC100_T (A*02, A*03, B*07, B*18)
RLWGEPVNL	8239	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501) RCC110_T (A*02, B*18, B*27) RCC130_T (A*02, A*24, B*07, B*44) RCC399_T (A*01, A*02, B*08, B*50)

Sequenz	GeneID	Source(n)
RLWNETVEL	55789	JY (A*0201, B*0702)
RLYPWGVVEV	4735	RCC099_N (A*02, B*27, B*57) RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
RMFGIPVVV	4522	HeLa P83.30 (A*0201)
RMFPGEVAL	9091	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
RMLDQTLDDLNM	7170	HeLa P83.30 (A*0201)
RMLPHAPGV	3065	Awells (A*0201, B*4402) HeLa P83.30 (A*0201) LCL721.45 (A*0201, B*5101) RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501) RCC099_N (A*02, B*27, B*57) RCC100_N (A*02, A*03, B*07, B*18) RCC100_T (A*02, A*03, B*07, B*18) RCC110_T (A*02, B*18, B*27)
RMSDLHVLL	3026	RCC026_ZL (A*0201, A*3303, B*4101, B*5101) RCC399_T (A*01, A*02, B*08, B*50)
RVFENIVAV	7185	LCL721.45 (A*0201, B*5101)
RVMAPRALL	3107	JY (A*0201, B*0702) RCC100_N (A*02, A*03, B*07, B*18) RCC100_T (A*02, A*03, B*07, B*18) RCC119_T (A*02, A*24, B*07, B44-Supertyp) RCC2733_ZL (A*01, A*02, B*07, B*49)
RVSDINFTL	55291	RCC399_T (A*01, A*02, B*08, B*50)
RVSELHLEV	11252	LCL026_ZL (A*0201, A*3303, B*4101, B*5101)
SAPYGRITL	23191	LCL721.45 (A*0201, B*5101) RCC263_T (A*02, B*15, B*50)
SAVDFIRTL	9263	BER (A*0201, B*1302) RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
SIFEVWVAI	777	RCC2733_ZL (A*01, A*02, B*07, B*49)
SIFGNVSAI	3757	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
SIIGRLLEV	5499	Awells (A*0201, B*4402) B-LCL 166 (A*02, B*13, B*51) CML85 (A*0201, A*1101, B*1501, B*27) HeLa P83.30 (A*0201) JY (A*0201, B*0702) LCL721.45 (A*0201, B*5101) RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501) RCC073_T (A*02, A*03, B*07, B*57) RCC099_N (A*02, B*27, B*57) RCC110_N (A*02, B*18, B*27) RCC119_T (A*02, A*24, B*07, B44-Supertyp) RCC399_M (A*01, A*02, B*08, B*50) RCC399_N (A*01, A*02, B*08, B*50) RCC399_T (A*01, A*02, B*08, B*50)
SIQRLLEV	5501	Awells (A*0201, B*4402)

Sequenz	GeneID	Source(n)
SILEEVKKL	51654	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)
SILHDVVEV	9552	LCL721.45 (A*0201, B*5101)
SIQQSIERLLV	4809	Awells (A*0201, B*4402)
SLAGGIIGV	3190	RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)
SLAQYLINV	5094	HeLa P83.30 (A*0201) LCL721.45 (A*0201, B*5101)
SLDKFLASVSTVL	3039	RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
SLDQPTQTV	8663	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
SLFAGGMLRV	54732	HeLa P83.30 (A*0201)
SLFEKGLKNV	26234	RCC099_N (A*02, B*27, B*57) RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
SLFGGSVKL	10015	RCC099_N (A*02, B*27, B*57)
SLFPGKLEV	2314	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
SLHDAIMIV	10574	HeLa P83.30 (A*0201) LCL721.45 (A*0201, B*5101)
SLIDKTTAA	6631	THP-1 (A*02, A*23/24, B*51)
SLIGHLQTL	1847	JY (A*0201, B*0702) LCL721.45 (A*0201, B*5101) RCC399_T (A*01, A*02, B*08, B*50)
SLIKQIPRI	4736	Awells (A*0201, B*4402) RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
SLINVGLISV	10541	RCC013_T (A*02, A*24, B*07, B*40)
SLITRLLV	5500	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
SLLEDFYKL	4076	HeLa P83.30 (A*0201) RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
SLLDIIEKV	7249	HeLa P83.30 (A*0201) RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501) RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
SLLDKIIGA	284119	HeLa P83.30 (A*0201) Huvec 166 (A*02, B*13, B*51) Huvec 188 (A*02, A*24, B*27, B*35) RCC026_ZL (A*0201, A*3303, B*4101, B*5101) RCC099_N (A*02, B*27, B*57) RCC099_T (A*02, B*27, B*57) RCC100_N (A*02, A*03, B*07, B*18) RCC100_T (A*02, A*03, B*07, B*18) RCC110_T (A*02, B*18, B*27)
SLLDRFLATV	10983	Awells (A*0201, B*4402) HeLa P83.30 (A*0201) Huvec 166 (A*02, B*13, B*51) LCL721.45 (A*0201, B*5101) RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501) RCC099_N (A*02, B*27, B*57) RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
SLLEEQKL	5253	Awells (A*0201, B*4402)

Sequenz	GeneID	Source(n)
SLLEKSLGL	9521	HeLa P83.30 (A*0201)
SLLENLEKI	3183	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40) RCC100_N (A*02, A*03, B*07, B*18) RCC100_T (A*02, A*03, B*07, B*18) RCC110_N (A*02, B*18, B*27) RCC110_T (A*02, B*18, B*27) RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
SLLGGDVVSV	1831	RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44) RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
SLHLGLALYGI	6319	HeLa P83.30 (A*0201) RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
SLLLPRL	2912	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
SLLPAILVEL	5518	RCC013_T (A*02, A*24, B*07, B*40)
SLPPDALVGL	10483	HeLa P83.30 (A*0201)
SLLSHVEQL	10459	HeLa P83.30 (A*0201)
SLMDHTIPEV	6386	RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
SLPKKLALL	28974	LCL721.174 (A*0201, B*5101)
SLQEIEIAFL	7431	RCC026_ZL (A*0201, A*3303, B*4101, B*5101)
SLRLLSLAG	146330	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40) HeLa P83.30 (A*0201) RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
SLSEKTVLL	966	Awells (A*0201, B*4402) HeLa P83.30 (A*0201) Huvec 166 (A*02, B*13, B*51) Huvec 188 (A*02, A*24, B*27, B*35) RCC099_N (A*02, B*27, B*57) RCC099_T (A*02, B*27, B*57) RCC100_T (A*02, A*03, B*07, B*18) RCC110_T (A*02, B*18, B*27)
SLSILVLLL	64220	JY (A*0201, B*0702)
SLVQIVTTL	148545	HeLa P83.30 (A*0201)
SLWGQPAEA	1287	LCL721.174 (A*0201, B*5101)
SLYALHVKA	79001	LCL721.174 (A*0201, B*5101)
SLYGGTITI	56254	RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)
SLYREILFL	10260	LCL721.45 (A*0201, B*5101)
SMPDFDLHL	79026	RCC026_ZL (A*0201, A*3303, B*4101, B*5101)
STADVQHC	23511	HeLa P83.30 (A*0201)
STMYPGLPSRL	10097	CML85 (A*0201, A*1101, B*1501, B*27)
STSDIITRI	5130	HeLa P83.30 (A*0201) RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
SVAGKIHTV	11037	RCC099_N (A*02, B*27, B*57) RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
SVASTITGV	123	RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)
SVFAGVVGV	2982	RCC013_T (A*02, A*24, B*07, B*40)
SVSPVVRVAV	1938	HeLa P83.30 (A*0201)

A. Anhang

Sequenz	GeneID	Source(n)
SVTEHPSPSPL	3183	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501) U937 (nicht bekannt)
SYAEALREV	525	RCC263_T (A*02, B*15, B*50)
TAHLMVVVVL	138805	RCC2733_ZL (A*01, A*02, B*07, B*49)
TAVALLRLL	9761	BER (A*0201, B*1302)
TIIDSKSKSV		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
TIIDTKGV TAL	64425	THP-1 (A*02, A*23/24, B*51) LCL721.45 (A*0201, B*5101) U937 (nicht bekannt)
TIPEAFRGV	1192	HeLa P83.30 (A*0201)
TLADIARL	57523	Huvec 166 (A*02, B*13, B*51) RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501) RCC099_N (A*02, B*27, B*57) RCC099_T (A*02, B*27, B*57) RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18) RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
TLADLVHHV	8295	Awells (A*0201, B*4402) JY (A*0201, B*0702) LCL721.45 (A*0201, B*5101) RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501) RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501) RCC099_N (A*02, B*27, B*57) RCC099_T (A*02, B*27, B*57) RCC100_N (A*02, A*03, B*07, B*18) RCC100_T (A*02, A*03, B*07, B*18) RCC110_N (A*02, B*18, B*27) RCC399_T (A*01, A*02, B*08, B*50)
TLADVLYHV	9070	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
TLAEIAKVEL	4841	LCL721.45 (A*0201, B*5101)
TLAQRVKEV	550	RCC099_N (A*02, B*27, B*57)
TLDDLIAAV	54882	RCC013_T (A*02, A*24, B*07, B*40)
TLFDYEVRL	29128	Awells (A*0201, B*4402) CML85 (A*0201, A*1101, B*1501, B*27) LCL721.45 (A*0201, B*5101)
TLFPGKVHSL	11180	Awells (A*0201, B*4402)
TLGALTVIDV	55567	RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
TLIDLPGITKV	1785	RCC099_N (A*02, B*27, B*57) RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
TLIDLPGITRV	4599	Awells (A*0201, B*4402) CML85 (A*0201, A*1101, B*1501, B*27) JY (A*0201, B*0702) LCL721.45 (A*0201, B*5101)
TLIEDILGV	26133	RCC013_T (A*02, A*24, B*07, B*40)
TLDDLVLGPVTA		Awells (A*0201, B*4402)
TLLEDGTFKV	57407	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)

Sequenz	GeneID	Source(n)
TLLGHEFVL	996	LCL721.45 (A*0201, B*5101)
TLLHAGGLARA	392617	Awells (A*0201, B*4402)
TLLNVIKSV	3708	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501) RCC099_N (A*02, B*27, B*57)
TLLPLRVFL	202018	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501) RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
TLLTAIVKL	163	HeLa P83.30 (A*0201)
TLMDILPRI	124997	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
TLPEDFIRV		CML85 (A*0201, A*1101, B*1501, B*27)
TLSDLRVYL	140809	Awells (A*0201, B*4402) CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40) CML85 (A*0201, A*1101, B*1501, B*27) HeLa P83.30 (A*0201) Huvec 166 (A*02, B*13, B*51) Huvec 188 (A*02, A*24, B*27, B*35) JY (A*0201, B*0702) RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501) RCC099_T (A*02, B*27, B*57) RCC110_T (A*02, B*18, B*27) RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18) RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37) RCC130_T (A*02, A*24, B*07, B*44) RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101) RCC2733_ZL (A*01, A*02, B*07, B*49)
TLTSKLYSL	29796	Awells (A*0201, B*4402)
TLVDFPLHL	8567	HeLa P83.30 (A*0201)
TLWGIQKEL	3939	Awells (A*0201, B*4402)
TLWVDPYEV	694	RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44) RCC026_ZL (A*0201, A*3303, B*4101, B*5101) RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
TLYEAVREV	4736	Awells (A*0201, B*4402) RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
TMLARLASA	1464	RCC100_T (A*02, A*03, B*07, B*18)
TSYNKHIIQV	55102	RCC399_T (A*01, A*02, B*08, B*50)
TTFEHDIQAL	6711	RCC263_T (A*02, B*15, B*50)
TTSRVLKVL	1499	RCC099_N (A*02, B*27, B*57) RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
TTVEIFNKL	55737	HeLa P83.30 (A*0201)
TVARPSVPA	1604	HeLa P83.30 (A*0201)
TVGLIRNL	1499	RCC399_T (A*01, A*02, B*08, B*50) U937 (nicht bekannt)
VADTVARVL	10769	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
VAIPLVTLAVV		RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
VALEFALHL	91768	RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
VLADALKSI	6210	Awells (A*0201, B*4402)

A. Anhang

Sequenz	GeneID	Source(n)
VLADQVWTL	4968	RCC099_N (A*02, B*27, B*57)
VLAEVPTQL	8904	RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
VLALFVYVA	203547	Awells (A*0201, B*4402)
VLAPRVLRA	5954	LCL721.174 (A*0201, B*5101)
VLATLVLLL		RCC013_T (A*02, A*24, B*07, B*40)
VLAVLGAVVAV	3106	LCL721.45 (A*0201, B*5101)
VLDDKLVFV	196527	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
		RCC100_T (A*02, A*03, B*07, B*18)
		RCC110_N (A*02, B*18, B*27)
VLDELKNMKC	23191	RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
VLFGLLREV	9785	RCC099_N (A*02, B*27, B*57)
		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
		RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
VLFHNPLSL	963	LCL721.45 (A*0201, B*5101)
VLFRGGPRGLLAVA	6745	LCL721.174 (A*0201, B*5101)
		RCC099_N (A*02, B*27, B*57)
		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
		RCC110_N (A*02, B*18, B*27)
VLFRGGPRGSLAVA	6745	RCC099_N (A*02, B*27, B*57)
		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
		RCC110_N (A*02, B*18, B*27)
VLIDYQRNV	7514	CML85 (A*0201, A*1101, B*1501, B*27)
		LCL721.45 (A*0201, B*5101)
		RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
		RCC399_T (A*01, A*02, B*08, B*50)
VLIETLVTL	191	C1R-A2 (A*0201)
VLIGEFLEKV	8731	LCL721.45 (A*0201, B*5101)
VLIPKLPQL	94103	Awells (A*0201, B*4402)
		B-LCL 166 (A*02, B*13, B*51)
		CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)
		CML85 (A*0201, A*1101, B*1501, B*27)
		DEM (A*0201, B*5701)
		HeLa P83.30 (A*0201)
		JY (A*0201, B*0702)
		LCL721.45 (A*0201, B*5101)
		RCC026_ZL (A*0201, A*3303, B*4101, B*5101)
		RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
		RCC099_N (A*02, B*27, B*57)
		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
		RCC110_T (A*02, B*18, B*27)
		RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
		RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
		RCC119_T (A*02, A*24, B*07, B44-Supertyp)

Sequenz	GeneID	Source(n)
		RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101)
		RCC2733_ZL (A*01, A*02, B*07, B*49)
		U937 (nicht bekannt)
VLLGKVYVV	54800	RCC099_N (A*02, B*27, B*57)
VLLKARLVPA	165215	Awells (A*0201, B*4402)
		LCL721.174 (A*0201, B*5101)
VLLPLRVTL	84803	RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
VLMDRLPSL	9875	JY (A*0201, B*0702)
VLPEHVSVL	9852	LCL721.45 (A*0201, B*5101)
VLPKLYVKL	6231	U937 (nicht bekannt)
VLQTRKYLA	5251	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
VLSLLSSVAL	27148	RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
VLSSRLAFA	3125	RCC099_N (A*02, B*27, B*57)
		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
		RCC110_T (A*02, B*18, B*27)
		RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101)
		RCC399_T (A*01, A*02, B*08, B*50)
VLVDRTIYI	10247	RCC399_T (A*01, A*02, B*08, B*50)
VLWDRTFSL	6772	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
		RCC100_N (A*02, A*03, B*07, B*18)
VMAPRALL	3106	JY (A*0201, B*0702)
VMSDKIVQV	3836	HeLa P83.30 (A*0201)
		RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
		RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
		RCC099_N (A*02, B*27, B*57)
		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
VMLDVPIRL	9462	RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
		RCC2733_ZL (A*01, A*02, B*07, B*49)
VVHTPETSU	9123	HeLa P83.30 (A*0201)
VVKPPGSSL	8314	JY (A*0201, B*0702)
VVMVPLVGL	8195	U937 (nicht bekannt)
YAEVGRVL	26057	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
YALPHAILRL	60	RCC399_T (A*01, A*02, B*08, B*50)
YAYDGKDYI	3105	HeLa P83.30 (A*0201)
		LCL721.45 (A*0201, B*5101)
YAYDGKDYIAL	3105	HeLa P83.30 (A*0201)
		LCL721.45 (A*0201, B*5101)
		RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
		RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
YAYDGKDYIAL	3135	HeLa P83.30 (A*0201)
		LCL721.45 (A*0201, B*5101)
		RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
		RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
YIHELWFAF	51761	RCC399_T (A*01, A*02, B*08, B*50)
YIVPCLHEV	112399	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)

A. Anhang

Sequenz	GeneID	Source(n)
YLADTVQKL	54937	JY (A*0201, B*0702) RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
YLDIKGLLDV	6500	Awells (A*0201, B*4402) C1R-A2 (A*0201) RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
YLDNGVVVAV	1642	RCC013_T (A*02, A*24, B*07, B*40)
YLDPAQRGV	84326	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
YLFERIKEL	84928	RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
YLFGERLLEC	84365	HeLa P83.30 (A*0201)
YLGRLAHEV	23521	Awells (A*0201, B*4402)
YLHDFLKYL	9643	HeLa P83.30 (A*0201)
YLIPLLERL	1656	Awells (A*0201, B*4402) CML85 (A*0201, A*1101, B*1501, B*27) JY (A*0201, B*0702) RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501) RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
YLITLLEHL	699	Awells (A*0201, B*4402)
YLLDLHSYL	10299	RCC073_T (A*02, A*03, B*07, B*57)
YLLEKSRVAV	4628	RCC099_N (A*02, B*27, B*57)
YLLPAIVHI	1655	Awells (A*0201, B*4402) B-LCL 166 (A*02, B*13, B*51) C1R-A2 (A*0201) CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40) CML85 (A*0201, A*1101, B*1501, B*27) DEM (A*0201, B*5701) HeLa P83.30 (A*0201) Huvec 166 (A*02, B*13, B*51) Huvec 188 (A*02, A*24, B*27, B*35) JY (A*0201, B*0702) LCL721.45 (A*0201, B*5101) RCC013_T (A*02, A*24, B*07, B*40) RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501) RCC099_N (A*02, B*27, B*57) RCC099_T (A*02, B*27, B*57) RCC110_N (A*02, B*18, B*27) RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18) RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37) RCC119_T (A*02, A*24, B*07, B44-Supertyp) RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101) RCC263_T (A*02, B*15, B*50) RCC2733_ZL (A*01, A*02, B*07, B*49) RCC399_T (A*01, A*02, B*08, B*50) SCC90 (A*02)
YLLPKDIKL	387496	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501) RCC099_N (A*02, B*27, B*57)

A.2. Überlappende HLA-A*02-Liganden

Sequenz	GeneID	Source(n)
		RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
YLPEDFIRV	3656	Huvec 166 (A*02, B*13, B*51) RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
YLPELLQTV	8507	RCC026_ZL (A*0201, A*3303, B*4101, B*5101)
YLTAIELEL	3012	LCL721.45 (A*0201, B*5101)
YMAELIERL	51053	Awells (A*0201, B*4402)
YVDPVITSI	4233	RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44) RCC013_T (A*02, A*24, B*07, B*40)

Nur A*02⁺ oder A*0201⁺ *Sourcen* sind berücksichtigt. Sequenzen ohne *GeneID* sind nicht in humanen Proteindatenbanken zu finden, d.h. es handelt sich um ESTs oder nicht-menschliche Proteine.

A.2. Überlappende HLA-A*02-Liganden

Sequenz	GeneID	HLA	Source(n)
NYIDKVRFL	7431	B*1302	BER (A*0201, B*1302)
		A*24	CCA060_T (A*24, B*18, B*44)
		n.a.	Ma-Mel-8a (A*25, B*14)
		A*29	RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
		A*29	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
		n.a.	RCC099_N (A*02, B*27, B*57)
		n.a.	RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
		A*24	RCC119_T (A*02, A*24, B*07, B44-Supertyp)
		A*29	RCC121_T (A*26, A*29, B*35, B*45)
		A*24	RCC130_T (A*02, A*24, B*07, B*44)
		n.a.	RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101)
		n.a.	RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
		A*24	RCC231_T (A*24, B*35, B*37)
		A*02	RCC263_T (A*02, B*15, B*50)
		A*24	RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
SAVDFIRTL	9263	B*1302	BER (A*0201, B*1302)
		A*26	NCh361 (A*26, B*38)
		A*02	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
		B*35	RCC231_T (A*24, B*35, B*37)
KVCNPIITKL	3312	n.a.	HO301 (A*0301, B*1402)
		B*0702	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
		A*02	RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
		B*13	RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
TAVALLRLL	9761	B*1302	BER (A*0201, B*1302)
		A*02	RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
		B*35	RCC231_T (A*24, B*35, B*37)
RLDDAIHVL	6925	A*0201	Awells (A*0201, B*4402)
		B*3902	C1R-B3902 (B*3902)
		A*02	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)

A. Anhang

Sequenz	GeneID	HLA	Source(n)
DVELDDLKDEL	10130	A*26	NCh361 (A*26, B*38)
		n.a.	C1R-B3801 (B*3801)
		A*02	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
DVYSGTPTKV	7884	DR	THP-1 (A*02, A*23/24, B*51)
		A*2602	C1R-A2 (A*0201)602 (A*2602)
		A*02	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
EVIDFSHGL	51104	A*2603	C1R-A2 (A*0201)603 (A*2603)
		A*0201	HeLa P83.30 (A*0201)
		A*02	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
GLNDFIQKI	6446	A*02	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
		B*13	RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
ILDPHVLL	4927	A*0201	Awells (A*0201, B*4402)
		A*2603	C1R-A2 (A*0201)603 (A*2603)
		A*32	AML01 (A*01, A*32, B*0801, B*1402)
KIFEMGPVFTL	4513	n.a.	AML03 (A*03, A*32, B*35)
		n.a.	AML04 (A*02 A*32, B*38, B*56)
		A*0201	HeLa P83.30 (A*0201)
KLIDRTESEL	4046	A*0201	JY (A*0201, B*0702)
		A*0201	LCL721.45 (A*0201, B*5101)
		A*02	RCC110_N (A*02, B*18, B*27)
KMDPIISRV	7832	B*1501	SPL-SPACH (A*3101, B*1501)
		DR	CCA164_T (A*02, A*11, B*07, B*35)
QLVDIIEKV	10197	A*0201	LCL721.45 (A*0201, B*5101)
		A*0201	Awells (A*0201, B*4402)
		A*0201	HeLa P83.30 (A*0201)
		A*0201	JY (A*0201, B*0702)
		A*0201	LCL721.45 (A*0201, B*5101)
		A*02	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
		A*02	RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
		A*02	RCC110_N (A*02, B*18, B*27)
		A*02	RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
		A*02	RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
RLASYLDRV	3875	B*13	RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
		A*0201	Awells (A*0201, B*4402)
		A*02	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
		A*02	RCC099_N (A*02, B*27, B*57)
		A*02	RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
		A*02	RCC100_T (A*02, A*03, B*07, B*18)
		A*02	RCC110_N (A*02, B*18, B*27)
		A*02	RCC110_T (A*02, B*18, B*27)
		A*02	RCC119_T (A*02, A*24, B*07, B44-Supertyp)
		B*13	RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
RVMAPRALL	3107	A*02	RCC399_M (A*01, A*02, B*08, B*50)
		A*0201	JY (A*0201, B*0702)
		B*0702	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)

A.2. Überlappende HLA-A*02-Liganden

Sequenz	GeneID	HLA	Source(n)
		A*02	RCC100_N (A*02, A*03, B*07, B*18)
		A*02	RCC100_T (A*02, A*03, B*07, B*18)
		A*02	RCC119_T (A*02, A*24, B*07, B44-Supertyp)
		A*02	RCC2733_ZL (A*01, A*02, B*07, B*49)
		n.a.	RCC377_M (A*01, A*03, B*07)
SAPYGRITL	23191	B*5101	LCL721.45 (A*0201, B*5101)
		A*02	RCC263_T (A*02, B*15, B*50)
YLLPAIVHI	1655	A*0201	Awells (A*0201, B*4402)
		n.a.	B-LCL 166 (A*02, B*13, B*51)
		A*0201	C1R-A2 (A*0201)
		A*02	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)
		A*0201	CML85 (A*0201, A*1101, B*1501, B*27)
		A*0201	DEM (A*0201, B*5701)
		A*0201	HeLa P83.30 (A*0201)
		A*02	Huvec 166 (A*02, B*13, B*51)
		A*02	Huvec 188 (A*02, A*24, B*27, B*35)
		A*0201	JY (A*0201, B*0702)
		A*0201	LCL721.45 (A*0201, B*5101)
		A*02	RCC013_T (A*02, A*24, B*07, B*40)
		A*02	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
		A*02	RCC099_N (A*02, B*27, B*57)
		A*02	RCC099_T (A*02, B*27, B*57)
		A*02	RCC110_N (A*02, B*18, B*27)
		A*02	RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
		A*02	RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
		A*02	RCC119_T (A*02, A*24, B*07, B44-Supertyp)
		A*02	RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101)
		B*13	RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
		A*02	RCC263_T (A*02, B*15, B*50)
		A*02	RCC2733_ZL (A*01, A*02, B*07, B*49)
		A*02	RCC399_T (A*01, A*02, B*08, B*50)
		A*02	SCC90 (A*02)

A.3. HLA-A*03

Sequenz	GeneID	Source
AAAPASVPAQAPK	6159	U937 (nicht bekannt)
AALVASGVALY	5032	RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
AAMLDTVVVFK	10213	TTA3_A3 (A*03) U937 (nicht bekannt)
AAVAIAKAMAK	1984	U937 (nicht bekannt)
AIIDHIFASK	127933	AML03 (A*03, A*32, B*35) RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
AILSKFLYY	26098	AML03 (A*03, A*32, B*35)
AIMGNPKVK	3047	AML03 (A*03, A*32, B*35)
AIYATIPVYK	53981	AML03 (A*03, A*32, B*35)
AIYKRVLK	55193	HO301 (A*0301, B*1402)
ALFLTLTTK	4513	HO301 (A*0301, B*1402)
ALKNPPINTK	10092	RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101) RCC377_T (A*01, A*03, B*07)
ALLDGSNVVFK	10471	HO301 (A*0301, B*1402) RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
ALLGVIIAK	26762	RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
ALLPWPFRNK	7185	HO301 (A*0301, B*1402)
ALPALVMSK	6124	U937 (nicht bekannt)
ALPSRILLWK	54587	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40) LCA002_T (A*03, B*08, B*40) RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18) RCC377_N (A*01, A*03, B*07) RCC377_T (A*01, A*03, B*07)
ALRPSTSRSLY	7431	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801) U937 (nicht bekannt)
AMLDTPVVFK	10213	HO301 (A*0301, B*1402) RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001) RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801) TTA3_A3 (A*03)
AMWKVGFVK	3674	AML03 (A*03, A*32, B*35)
AMYDKGPFVRK	1728	RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
ASILAAFSKATS	204	U937 (nicht bekannt)
ATANQIILK	10150	RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
ATDPNIGR	5591	RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
ATGSWDSFLK	2782	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801) RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
ATTRVEKLQY	284058	AML03 (A*03, A*32, B*35)
ATVAVPLVVK	79139	HO301 (A*0301, B*1402)
ATYGKPVHH	66480	TTA3_A3 (A*03)
AVAEMKLQY	80765	HO301 (A*0301, B*1402)
AVAIKAMAK	1984	RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
AVALPLQTK	5356	RCC211_T (A*03, B*13, B*35)

Sequenz	GeneID	Source
AVFPKPFVEK	9677	RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
AVFPNEDGSLQK	50865	RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
AVIGADSVTLK	55813	AML03 (A*03, A*32, B*35)
AVIVLVENFYK	140576	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801) RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
AVLKGVHSHK	6147	U937 (nicht bekannt)
AVLQKQPQLY	5394	HO301 (A*0301, B*1402)
AVMDGNVITAK	1428	AML03 (A*03, A*32, B*35)
AVMGAYVLLK	90701	HO301 (A*0301, B*1402)
AVNAHSNILK	10989	RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001) RCC377_T (A*01, A*03, B*07)
AVYGMNLNTPK	4677	AML03 (A*03, A*32, B*35)
AYEQVAKALK	1192	U937 (nicht bekannt)
DYQSIKLIY		AML03 (A*03, A*32, B*35)
ELKTKGLQLK		HO301 (A*0301, B*1402)
ELVKIYYK	51110	RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
ESYEALPQH	1786	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
FLDHVRTSF	4641	RCC100_N (A*02, A*03, B*07, B*18)
FPNSPKWTSK	4316	RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
FSVAFQALRT	55262	U937 (nicht bekannt)
FVKTLTGK	6233	HO301 (A*0301, B*1402)
FVQMMTAK	801	RCC100_N (A*02, A*03, B*07, B*18) RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18) RCC377_M (A*01, A*03, B*07) RCC377_T (A*01, A*03, B*07) U937 (nicht bekannt)
FVYPGNPLRH	84498	AML03 (A*03, A*32, B*35)
GLAPSIRTK	3371	NCh359 (A*03, A*32, B*07, B*35)
GLASFKSFLK	8490	RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001) RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
GLFEVGAGWIGK	3295	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801) RCC211_T (A*03, B*13, B*35) RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
GLFEVGAGWIK		RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
GLMGFIVYK	9556	RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
GLNVSSIRK	84324	U937 (nicht bekannt)
GLPSQKTASLK	23076	U937 (nicht bekannt)
GLTDVILYH	10492	RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
GLYEFFRAK	10523	AML03 (A*03, A*32, B*35) RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
GLYTKGSTWK	349565	AML03 (A*03, A*32, B*35)
GMKGLNLLKK	4064	HO301 (A*0301, B*1402)
GSYNKVFLAK	5714	RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
GTLPHPLQR	6337	RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
GTMTGMLYK	10431	HO301 (A*0301, B*1402) RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)

A. Anhang

Sequenz	GeneID	Source
GTWDSFLEK	6817	AML03 (A*03, A*32, B*35)
GTYPAPAEVPK	1645	RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
GTYQPLSTR	9277	HO301 (A*0301, B*1402)
GTYVSSVPR	3111	RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101)
		RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
GVADKILKK	9111	HO301 (A*0301, B*1402)
		RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
		RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
GVHGGLINK	5216	LCA010_T (A*03, A*29, B*35, B*44)
		RCC377_T (A*01, A*03, B*07)
GVLAWVKEK	9235	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
		RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
GVLKKVIRH	3371	NCh359 (A*03, A*32, B*07, B*35)
HLEDIVRQK	9320	RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
		RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
HQPCHKVTQYK	6166	U937 (nicht bekannt)
HTLDSYRILQK	1643	HO301 (A*0301, B*1402)
HAIPTGVK	4512	AML03 (A*03, A*32, B*35)
		HO301 (A*0301, B*1402)
IINSSITTK	7203	HO301 (A*0301, B*1402)
IIFYFARKANMK	7412	RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
IYKGGTSR	2934	LCA010_T (A*03, A*29, B*35, B*44)
		RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
ILENIQRNK	2068	HO301 (A*0301, B*1402)
		RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
		RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
ILNSWNISK		RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
ILSSLMLEK		HO301 (A*0301, B*1402)
IQVIRSIGVY	6476	U937 (nicht bekannt)
ISLKQAPLVH	12757	TTA3_A3 (A*03)
IVAGSLITK	55660	HO301 (A*0301, B*1402)
		RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
		RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
IVALILSTK	527	RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
		RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
KAHLGTALK	6228	U937 (nicht bekannt)
KIADMGHLKY	5111	HO301 (A*0301, B*1402)
KIADRFLLY	8543	AML03 (A*03, A*32, B*35)
		CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)
		EMJ (A*0201, A*0301, B*4001)
		HO301 (A*0301, B*1402)
		MZ7 (A*03, A*26, B*07, B*38)
		NCh359 (A*03, A*32, B*07, B*35)
		RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
		RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)

Sequenz	GeneID	Source
		RCC100_N (A*02, A*03, B*07, B*18)
		RCC100_T (A*02, A*03, B*07, B*18)
		RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101)
		RCC182_T (A*03, A*30, B*07, B*40)
		RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
		RCC377_M (A*01, A*03, B*07)
		RCC377_T (A*01, A*03, B*07)
		TTA3_A3 (A*03)
		U937 (nicht bekannt)
KIFVGGIK	3178	U937 (nicht bekannt)
KIIAFVLEGK	10618	RCC377_T (A*01, A*03, B*07)
KIKSFEVVF	10628	RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
KILNLRFLGK	6829	AML03 (A*03, A*32, B*35)
KLADFGLAR	983	RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
KLCNIFSTKF	7153	AML03 (A*03, A*32, B*35)
KLDFVNAKK	6749	AML03 (A*03, A*32, B*35)
KLFDHAVSKF	2182	HO301 (A*0301, B*1402)
		NCh359 (A*03, A*32, B*07, B*35)
		RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
		RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
		RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
		RCC377_T (A*01, A*03, B*07)
KLFDKLLEY	8539	HO301 (A*0301, B*1402)
		RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
		TTA3_A3 (A*03)
KLFQQIMHY	55823	AML03 (A*03, A*32, B*35)
KLFVGGGLK	10949	U937 (nicht bekannt)
KLIDIVSSQK	1111	AML03 (A*03, A*32, B*35)
		HO301 (A*0301, B*1402)
KLIKDGLIIRK	6143	HO301 (A*0301, B*1402)
KLITEDVQ GK	6189	U937 (nicht bekannt)
KLLKSKNLTD AI	23644	HO301 (A*0301, B*1402)
KLLNYAPLEK	5441	AML03 (A*03, A*32, B*35)
		CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)
		HO301 (A*0301, B*1402)
		NCh359 (A*03, A*32, B*07, B*35)
		RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
		RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
		RCC100_N (A*02, A*03, B*07, B*18)
		RCC100_T (A*02, A*03, B*07, B*18)
		RCC182_T (A*03, A*30, B*07, B*40)
		RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
		RCC377_M (A*01, A*03, B*07)
		RCC377_T (A*01, A*03, B*07)
		TTA3_A3 (A*03)

A. Anhang

Sequenz	GeneID	Source
KLLPSVVLK	1839	NCh359 (A*03, A*32, B*07, B*35)
KLPGGSYMAK	3127	RCC100_N (A*02, A*03, B*07, B*18) RCC100_T (A*02, A*03, B*07, B*18)
KLPNSVLGK	30844	RCC100_T (A*02, A*03, B*07, B*18)
KLSQMILDK	5717	HO301 (A*0301, B*1402)
KLTYIYIQK		RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001) RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
KLYDIDVAK	6147	U937 (nicht bekannt)
KLYEMILKR	10123	RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
KMTLISPIL	23030	AML03 (A*03, A*32, B*35)
KMWNIAITY	158326	AML03 (A*03, A*32, B*35)
KMYEEHLKRM	2079	HO301 (A*0301, B*1402)
KQYDHPNIVK	14158	TTA3_A3 (A*03)
KSFPGVPLQH	12572	TTA3_A3 (A*03)
KSLDQAISRF	26999	RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
KTFWIPLSH	241452	TTA3_A3 (A*03)
KTNALLSLK		U937 (nicht bekannt)
KTYGEIFEK	4718	AML03 (A*03, A*32, B*35) RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001) RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
KTYIPPKGETK	15289	TTA3_A3 (A*03)
KVADIALHY	12469	TTA3_A3 (A*03)
KVANIILSY	80208	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40) HO301 (A*0301, B*1402) RCC100_N (A*02, A*03, B*07, B*18) RCC100_T (A*02, A*03, B*07, B*18) RCC377_T (A*01, A*03, B*07)
KVAPAPAVVK	6130	U937 (nicht bekannt)
KVATVPGLTK	19989	TTA3_A3 (A*03)
KVAVATPAK	4691	U937 (nicht bekannt)
KVFDGIPPPY	23521	HO301 (A*0301, B*1402)
KVFERAVQY	22984	AML03 (A*03, A*32, B*35)
KVFQEPLFY	1514	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
KVMQQNLVY	10491	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
KVNIPIIAK	23157	HO301 (A*0301, B*1402)
KVSASPLLY	7037	HO301 (A*0301, B*1402)
KVSDYILQH	23245	NCh359 (A*03, A*32, B*07, B*35)
KVTEGSFVYK	2665	RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
KVTGSLSSAK	2237	U937 (nicht bekannt)
KVWSDPFGRK	389203	AML03 (A*03, A*32, B*35) HO301 (A*0301, B*1402)
KVYENYPTY	7913	HO301 (A*0301, B*1402) RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
KVYNIQIRY	3937	AML03 (A*03, A*32, B*35) HO301 (A*0301, B*1402)

Sequenz	GeneID	Source
		RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
		RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
		RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
		TTA3_A3 (A*03)
LIMIFLGLY	51495	AML03 (A*03, A*32, B*35)
LLSLTTQLVK	23107	AML03 (A*03, A*32, B*35)
LLTTMGDRF	10398	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)
LPAGGGLQTK		AML03 (A*03, A*32, B*35)
LTGPVMPVR	6137	RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
LVFPSEIVGK	6201	HO301 (A*0301, B*1402)
		RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
		RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
		RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
		RCC377_M (A*01, A*03, B*07)
LVIPFTIKK	2316	HO301 (A*0301, B*1402)
NLSEIHVAF	57102	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)
NVIRDAVTY	8294	AML03 (A*03, A*32, B*35)
		CCA061_T (A*02, A*03, B*15, B*35)
		RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
PSRILLWK	54587	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)
		LCA002_T (A*03, B*08, B*40)
QAQADSLTVY	26167	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
QGFNRRVVF	4627	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)
QIASFILLR	55303	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
QIDSPNGK	7412	RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
QIDSPLSGK	7412	RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101)
QIFVKTLTGK	6233	AML03 (A*03, A*32, B*35)
		CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)
		HO301 (A*0301, B*1402)
		NCh359 (A*03, A*32, B*07, B*35)
		RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
		RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
		RCC100_N (A*02, A*03, B*07, B*18)
		RCC100_T (A*02, A*03, B*07, B*18)
		RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
		RCC377_T (A*01, A*03, B*07)
		TTA3_A3 (A*03)
QISIPFLLK	64855	RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
QIYIKLVK	8295	RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
QLQESGGGLVK		HO301 (A*0301, B*1402)
QLQLLLLK	64780	U937 (nicht bekannt)
QLYDKGLVY	3376	HO301 (A*0301, B*1402)
QLYEIIVTPLY	1441	HO301 (A*0301, B*1402)
QLYWSPRKL	6235	AML03 (A*03, A*32, B*35)
		CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)

A. Anhang

Sequenz	GeneID	Source
		RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
		U937 (nicht bekannt)
QMVERQGQLK	6522	HO301 (A*0301, B*1402)
QTYVVGITEK	23020	HO301 (A*0301, B*1402)
		RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
QVAERALYY	5527	HO301 (A*0301, B*1402)
RAFSSLGLLK	7369	RCC100_N (A*02, A*03, B*07, B*18)
		RCC182_T (A*03, A*30, B*07, B*40)
RAVHSCMILLK	389690	HO301 (A*0301, B*1402)
RAYPHVFTK	27089	AML03 (A*03, A*32, B*35)
RIATGSFLK	67054	TTA3_A3 (A*03)
RIFAPNHVAK	6142	HO301 (A*0301, B*1402)
		MaCa32 (A*03, B*35, B*51)
RIFEPPPPK	1665	AML03 (A*03, A*32, B*35)
RIFQEPTEPK	6241	HO301 (A*0301, B*1402)
RIHFPLATY	7277	HO301 (A*0301, B*1402)
		RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
		RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
		RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
		TTA3_A3 (A*03)
RIIDLVLQK	10526	RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
RIEETLALK	10109	HO301 (A*0301, B*1402)
		RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
RILFFNTPK	5714	RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
RILSGVVTK	6205	HO301 (A*0301, B*1402)
		RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
		RCC377_T (A*01, A*03, B*07)
RIYGGLTSK	18571	TTA3_A3 (A*03)
RLFKDQLVY	25793	HO301 (A*0301, B*1402)
RLFPPLRQR	337867	RCC100_N (A*02, A*03, B*07, B*18)
		RCC100_T (A*02, A*03, B*07, B*18)
		RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
		U937 (nicht bekannt)
RLFTDVLH	8507	AML03 (A*03, A*32, B*35)
		HO301 (A*0301, B*1402)
RLFVGSIPK	10236	HO301 (A*0301, B*1402)
		NCh359 (A*03, A*32, B*07, B*35)
		RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
		RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
		RCC100_T (A*02, A*03, B*07, B*18)
		U937 (nicht bekannt)
RLKDGVLAY	22984	HO301 (A*0301, B*1402)
		U937 (nicht bekannt)
RLLEMILNK	1646	RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
RLLLPGLAK	3017	U937 (nicht bekannt)

Sequenz	GeneID	Source
RLLPGNATISK	54625	HO301 (A*0301, B*1402)
RLLQKVLAY	55095	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
RLNELWLHH		HO301 (A*0301, B*1402)
RLPVLQAVVK		HO301 (A*0301, B*1402)
RLSDTLIFY	147991	AML03 (A*03, A*32, B*35)
RLSFPNLFK	9907	RCC377_T (A*01, A*03, B*07)
RLSSLRASTSK	6194	U937 (nicht bekannt)
RLVTPRVLQHK	6194	U937 (nicht bekannt)
RMFDMGFY	11325	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
RQIPYTMK	5250	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
		RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
		RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
		TTA3_A3 (A*03)
RQITQVYGF	5515	NCh359 (A*03, A*32, B*07, B*35)
RSFPWQSLEAK	55199	AML03 (A*03, A*32, B*35)
RSYSDPPLK	3185	HO301 (A*0301, B*1402)
		RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101)
		TTA3_A3 (A*03)
RTAHVILRY	267	AML03 (A*03, A*32, B*35)
		HO301 (A*0301, B*1402)
RTAVPSFLT	84248	HO301 (A*0301, B*1402)
RTFTWLVGK	4641	RCC100_N (A*02, A*03, B*07, B*18)
RTGPPMGSRF	7458	HO301 (A*0301, B*1402)
		RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
	72772	TTA3_A3 (A*03)
RTNWPNTGK	9276	AML03 (A*03, A*32, B*35)
RTYLPVSQVSR	126789	HO301 (A*0301, B*1402)
RVAPAHGLFLK	5683	HO301 (A*0301, B*1402)
RVASVMQEY	7072	NCh359 (A*03, A*32, B*07, B*35)
RVFPDKGYSF	4297	RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
RVFPWFVSK	1938	HO301 (A*0301, B*1402)
RVFSGLVSTGLK		RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
	20280	TTA3_A3 (A*03)
RVFVVGVMGTMK	30846	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
RVHAYIISY		RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
		RCC377_M (A*01, A*03, B*07)
RVKGGPISK	953	HO301 (A*0301, B*1402)
RVKTNVVPK	22913	U937 (nicht bekannt)
RVLNKLGGVK	475	RCC100_N (A*02, A*03, B*07, B*18)
		RCC100_T (A*02, A*03, B*07, B*18)
RVLPPYPTH	10813	AML03 (A*03, A*32, B*35)
		HO301 (A*0301, B*1402)
RVLQALEGLK	6223	U937 (nicht bekannt)
RVQEAVESMVK	84908	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)
		HO301 (A*0301, B*1402)

A. Anhang

Sequenz	GeneID	Source
		RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
		RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
		RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
RVYIGRLSY	6429	AML03 (A*03, A*32, B*35)
		HO301 (A*0301, B*1402)
RVYPEVTVY	3123	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)
RVYVGSIIY	22827	AML03 (A*03, A*32, B*35)
		HO301 (A*0301, B*1402)
SAYGSVKAY	302	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)
SIFDGRVVAK	54499	NCh359 (A*03, A*32, B*07, B*35)
		RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
		U937 (nicht bekannt)
SIFKQPVTK	8932	HO301 (A*0301, B*1402)
		RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
SIGERDLIFH	8914	MZ7 (A*03, A*26, B*07, B*38)
		RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
SILRNPTVTK	6627	AML03 (A*03, A*32, B*35)
SIRDTPAKNAQK	4869	U937 (nicht bekannt)
SIRGNRIY	6632	U937 (nicht bekannt)
SITSVFITK	8295	RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
SIYVYKVLK	3018	AML03 (A*03, A*32, B*35)
SLAEILLKK	10526	RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
SLFPNSPKWTSK	4316	HO301 (A*0301, B*1402)
		RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
		RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
SLFSRLFVK	378	RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
SLIGYLITKK	120892	RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
SLKQAPLVH	1211	U937 (nicht bekannt)
SLLQPETPLK		HO301 (A*0301, B*1402)
SLLSGALAGALAK		RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
SLLSLVTGLK		CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)
		HO301 (A*0301, B*1402)
		RCC073_T (A*02, A*03, B*07, B*57)
		RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
		RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
SLLTSSKQQLQK	123	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
		RCC100_T (A*02, A*03, B*07, B*18)
		RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
		RCC377_T (A*01, A*03, B*07)
SLMHSFILK	83658	AML03 (A*03, A*32, B*35)
		CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)
		RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
		RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
		RCC100_N (A*02, A*03, B*07, B*18)
		RCC100_T (A*02, A*03, B*07, B*18)

Sequenz	GeneID	Source
		RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101)
		RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
		RCC377_T (A*01, A*03, B*07)
		U937 (nicht bekannt)
SLWDRILIFH	2180	HO301 (A*0301, B*1402)
		RCC073_T (A*02, A*03, B*07, B*57)
		RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
		RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
		RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
		RCC377_M (A*01, A*03, B*07)
SLYASSPGGVYATR	7431	RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
		RCC377_T (A*01, A*03, B*07)
SLYKKLEIK	6549	NCh359 (A*03, A*32, B*07, B*35)
SSFSGLLRK	51278	HO301 (A*0301, B*1402)
SSYPVCVSK	4938	RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
SVAKTILKR	55233	RCC100_N (A*02, A*03, B*07, B*18)
		RCC100_T (A*02, A*03, B*07, B*18)
		RCC182_T (A*03, A*30, B*07, B*40)
SVDPKNYPK	3553	AML03 (A*03, A*32, B*35)
		U937 (nicht bekannt)
SVLSPLLNK	2059	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
SVNLKVSPK	11168	U937 (nicht bekannt)
SVYDSVLQK	23345	RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
SVYVLRQK	84188	RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
SVYVYKVLK	3017	HO301 (A*0301, B*1402)
		RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
		RCC100_T (A*02, A*03, B*07, B*18)
TARDAVCEQVF	83758	RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
TIAPALVSK	2023	HO301 (A*0301, B*1402)
TLADILLYY	9521	RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
TLADLLALR	8701	RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
TMCPHILRY	3646	AML03 (A*03, A*32, B*35)
		HO301 (A*0301, B*1402)
TSALPIQK	123	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
		RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
		RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
		RCC377_M (A*01, A*03, B*07)
TVAGGAWTYK	6168	HO301 (A*0301, B*1402)
TVAVPLVGK	79139	RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
TVISLVTGLK		HO301 (A*0301, B*1402)
TVMELVKIHYK	51110	RCC073_T (A*02, A*03, B*07, B*57)
		RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
		RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
TVSDAILRY	29916	HO301 (A*0301, B*1402)
		RCC211_T (A*03, B*13, B*35)

A. Anhang

Sequenz	GeneID	Source
VAVGRALYY	1642	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)
VLESVARIVK	493856	AML03 (A*03, A*32, B*35)
VLFGKALNPK	8714	RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
VLKANIISY		HO301 (A*0301, B*1402)
VLRDNIQGITK	8294	HO301 (A*0301, B*1402)
VLYDRVLKY	6730	RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001) RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18) RCC211_T (A*03, B*13, B*35) RCC377_T (A*01, A*03, B*07)
VLYQPLFDK	4673	HO301 (A*0301, B*1402)
VSAPRVGGK	6152	U937 (nicht bekannt)
VTLTLVILSY	390323	RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
VTYNYPVHY	55754	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)
VTYVPVTTTFK	6160	U937 (nicht bekannt)
VVATVMCRR	3106	RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
VVCEYIVKK	1968	AML03 (A*03, A*32, B*35) HO301 (A*0301, B*1402)
VVIINSTAVR	7399	AML03 (A*03, A*32, B*35)
VVLGQFLVLK	8815	HO301 (A*0301, B*1402) RCC211_T (A*03, B*13, B*35)
VVMVNQGLTK	891	HO301 (A*0301, B*1402)
VVNVKPLTGK	90488	HO301 (A*0301, B*1402) RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001) RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101)
VVSSLLVLK	69550	TTA3_A3 (A*03)
WKLQRSLLLK		AML03 (A*03, A*32, B*35)
YLADFLLLK	10786	RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)

Nur A*03⁺ oder A*0301⁺ *Sourcen* sind berücksichtigt. Sequenzen ohne *GeneID* sind nicht in humanen Proteindatenbanken zu finden, d.h. es handelt sich um ESTs oder nicht-menschliche Proteine.

A.4. HLA-A*26

Sequenz	GeneID	Source(n)
AAFPGASLY	9802	NCh361 (A*26, B*38)
DLIEHFSQF	10949	NCh361 (A*26, B*38)
DLIEKLLNY	5441	MZ7 (A*03, A*26, B*07, B*38)
DSFPMEIRQY	6772	NCh361 (A*26, B*38)
DTGILDSIGRF	4155	NCh361 (A*26, B*38)
DTISPTLGF	402	NCh361 (A*26, B*38)
DTISPYSRM	8560	RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
DTLDKVFTY	2181	NCh361 (A*26, B*38)
DTVHHMLLF	5066	RCC121_T (A*26, A*29, B*35, B*45) RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
DVAEGDLIEHF	10949	NCh361 (A*26, B*38)
DVAGIADY	57494	NCh361 (A*26, B*38)
DVFNEKGWNY	10135	NCh361 (A*26, B*38)
DVIAQGIGKL	6181	NCh361 (A*26, B*38)
DVIERVIQY	25836	NCh361 (A*26, B*38) RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
DVIRLIMQY	55234	MZ7 (A*03, A*26, B*07, B*38) NCh361 (A*26, B*38) RCC121_N (A*26, A*29, B*35, B*45) RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
DVISNIETF	6662	NCh361 (A*26, B*38)
DVKDYIQEY	57674	RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
DVLESVNL	1173	NCh361 (A*26, B*38)
DVLQKIKY	54869	NCh361 (A*26, B*38)
DVVDFQKY	8564	RCC121_T (A*26, A*29, B*35, B*45)
DVVFLITKY	1213	RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
DVYNHFLLY	6830	RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
EAIQILKY	55164	NCh361 (A*26, B*38)
EIAEAYLGY	3303	NCh361 (A*26, B*38)
EIAGHIMEF	9698	RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
EIIGKRGIIGY	10632	NCh361 (A*26, B*38) RCC121_T (A*26, A*29, B*35, B*45) RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
EIKDILIQY	6217	RCC121_T (A*26, A*29, B*35, B*45)
EIKDKLLNY	83594	RCC121_T (A*26, A*29, B*35, B*45)
EIRDILGM	10594	MZ7 (A*03, A*26, B*07, B*38)
EIYGGDSRF	23451	NCh361 (A*26, B*38)
ELIAKIPNF	6418	NCh361 (A*26, B*38) RCC121_T (A*26, A*29, B*35, B*45) RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
ELQQLFNL	57633	RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
ELVKRILNF	7913	NCh361 (A*26, B*38)
ESIDRTVMYY	6519	RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)

A. Anhang

Sequenz	GeneID	Source(n)
ETADTLLALRY	9945	NCh361 (A*26, B*38)
ETADTLMGLRY	2673	NCh361 (A*26, B*38) RCC121_T (A*26, A*29, B*35, B*45)
ETFDAGLQAF	6709	NCh361 (A*26, B*38)
ETIAKLVKY	2673	RCC121_T (A*26, A*29, B*35, B*45)
ETTEAACRY		RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
ETVNIWTHF	79957	NCh361 (A*26, B*38)
ETVRELTEF	5467	NCh361 (A*26, B*38)
ETVVRLEEF	3122	NCh361 (A*26, B*38)
EVAATEIKM	4670	NCh361 (A*26, B*38) RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
EVAAVLLHF	10640	NCh361 (A*26, B*38)
EVAEHVQYM	51053	RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
EVFDKTYQF	88745	NCh361 (A*26, B*38)
EVFPLAMNY	595	NCh361 (A*26, B*38)
EVFPLAMNYL	595	MZ7 (A*03, A*26, B*07, B*38)
EVFPLKVFYGY	9204	RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
EVIDLMIKEY	55274	NCh361 (A*26, B*38)
EVIEQILHY		MZ7 (A*03, A*26, B*07, B*38)
EVIKNFIQY	51386	NCh361 (A*26, B*38)
EVIPPMKEF	4712	NCh361 (A*26, B*38)
EVIPPYYSY	51567	NCh361 (A*26, B*38)
EVIPYTPAM	3162	NCh361 (A*26, B*38)
EVKKEVAFF	51593	RCC121_T (A*26, A*29, B*35, B*45)
EVNGLISMY	9343	NCh361 (A*26, B*38)
EVRQGLKAY	10539	RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
EVSTLVSKY	11336	RCC121_T (A*26, A*29, B*35, B*45)
EVTELLARY	5434	NCh361 (A*26, B*38) RCC121_T (A*26, A*29, B*35, B*45) RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
EVVAGIKEY	9643	RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
EVVAGIKEYF	9643	MZ7 (A*03, A*26, B*07, B*38) NCh361 (A*26, B*38)
EVVERVLTf	26263	NCh361 (A*26, B*38) RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
EVVRETGEY	9810	RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
EVVRKILL	4650	RCC121_T (A*26, A*29, B*35, B*45) RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
EVVSEPRFSF	5708	NCh361 (A*26, B*38)
GVIEKLLTSY	7812	MZ7 (A*03, A*26, B*07, B*38) NCh361 (A*26, B*38)
ISTPVIRTF	23196	NCh361 (A*26, B*38)
MTHNLLLNy	3065	RCC121_T (A*26, A*29, B*35, B*45)
MVKDVIgSY	4692	RCC121_T (A*26, A*29, B*35, B*45) RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)

Sequenz	GeneID	Source(n)
MVTEIRLKY	23450	RCC121_T (A*26, A*29, B*35, B*45)
QTPDFTPTKY	23051	NCh361 (A*26, B*38)
QVAEIVSKY	3685	NCh361 (A*26, B*38) RCC121_T (A*26, A*29, B*35, B*45)
SAVDFIRTL	9263	NCh361 (A*26, B*38)
SSVPGVRLI	7431	NCh361 (A*26, B*38)
SVIEAVAHF	23304	NCh361 (A*26, B*38)
SVVDAIGISRF	164832	NCh361 (A*26, B*38)
SVVDLINHY	5296	NCh361 (A*26, B*38)
SVVELINHY	5295	NCh361 (A*26, B*38)
SVVSVISRF	1603	NCh361 (A*26, B*38)
TLIDIMTRF	3098	MZ7 (A*03, A*26, B*07, B*38) RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
TTIDIGVKY	1266	MZ7 (A*03, A*26, B*07, B*38) NCh361 (A*26, B*38)
TVTEVLLKY	54700	RCC121_T (A*26, A*29, B*35, B*45)
VLPKLYVKL	6231	RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
VTYNYPVHY	55754	RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
YVQDRVPSY	64844	RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)

Nur A*26⁺ *Sourcen* sind berücksichtigt. Sequenzen ohne *GeneID* sind nicht in humanen Proteindatenbanken zu finden, d.h. es handelt sich um ESTs oder nicht-menschliche Proteine.

A.5. HLA-A*2601 aus MGAR

Sequenz	GeneID
DIPENVDTL	6133
DSFPMERQY	6772
DTISPTLGF	402
DVIERVIQY	25836
DVITIIDRSF	4288
DVLESVNLL	1173
DVVQELLKY	57602
EIKIIGKY	23045
EIKDILIQY	6217
ETADTLMGLRY	2673
ETFNTPAMY	60
ETFPGV TAL	3140
ETIDVHSGYDI	6307
ETIRNIPHL	55142
ETVNLRS LGF	202
EVFQTKIQEF	8379
EVFTGGIGSY	64282
EVIPPYYSY	51567
EVISSVSEL	23195
EVLEYNAIGGKY	2224
EVNGLISMY	9343
EVQEIVSVY	23231
EVTELLARY	5434
EVVENLLNY	2908
EVSSEPF R SF	5708
EVY PFGIVGM	7812
MIFIAAKDL	440279
SVIDIINKY	23228
SVIDSAELQAY	5591
SVIEAVAHF	23304
SVVEA IPEF	9750
TTIDIGVKY	1266

A.6. HLA-A*2602 aus C1R-A*2602

Sequenz	GeneID
DAADKAAVVKF	10949
DLIKEMRQF	6723
DSVPPTAISHF	9188
DTAGMILGWKF	55486
DTVKKIESF	5903
DVAEEIANY	6711
DVAEGDLIEHF	10949
DVIAQGIGKL	6181
DVIDNIMRL	7942
DVYSGTPTKV	7884
EAIGIISKM	9918
EASAAGLIRSF	10072
EAYNAVVRV	91010
EIRDILGM	10594
EITESGRIGF	3689
EIYGGSDSRF	23451
EIYSKTTRF	5982
ELIAKIPNF	6418
ETFSGVYKKL	6201
ETIRNIPHL	55142
ETPRVPGF	25885
ETRPAGDGTF	3105
ETVWRLEEF	3122
EVAEVKISHF	259266
EVAGHLRTY	23225
EVASNVPKV	51441
EVIDVVRM	6872
EVIGASDLLL	4976
EVIQWLAKL	10983
EVISHIGKL	53407
EVISSLEKY	9441
EVLRLDITL	51297
EVNEWFTKY	51154
EVPSFLVERM	54903
EVSPNLVRY	4719
EVSSISSKF	23607
EVVAGIKEY	9643
EVVDVMVIGRL	10243
EVVELLIKY	2553
HFDLSVIEL	8318
HTADISSHF	1847

Sequenz	GeneID
HTPAGAAVSAM	118
HVPAGLLALF	124491
IVADHVASY	3117
IWDLISITRL	EST
LAADFEIGHF	4673
MTVSIIDRF	891
MVKDLINRM	3069
NVAEVDKVTGRF	6227
SIPDIKTAF	10139
SVIDARFNFF	27042
SVIEAVAHF	23304
TFDVAPSRL	23420
TVIDQIPFL	8493
TVIEEHLGKF	285855
VVFTDEMAHF	847
YVQDRVPSY	64844

A.7. HLA-A*2603 aus C1R-A*2603

Sequenz	GeneID
DIIDYFRKM	3937
DLIEHFSQF	10949
DLIEKLLNY	5441
DTISPYSRM	8560
DVIAQGIGKL	6181
DVIDNIMRL	7942
DVISSIRNF	401505
DVKDYLRNM	9236
DVMKDFEEM	1345
EAIGIISKM	9918
EIRDILGM	10594
EITESGRIGF	3689
ELIAKIPNF	6418
ELIERIPEL	4171
ETAFCMRQ	
ETFSGVYKKL	6201
ETIRNIPHL	55142
ETREAYANI	4261
ETVNLRLSLGF	202
ETVWRLEEF	3122
EVAEHVQYM	51053
EVAPPRLYM	7297
EVFPDQFIHL	3074
EVFPLKVFGY	9204
EVFPPFRLM	23225
EVFTGHMGKL	506
EVGPKFRGV	25980
EVIDFSHGL	51104
EVIDVVRTM	6872
EVIFKALTGF	27348
EVIGLLGGRY	114803
EVIKELAQI	5496
EVIPALPRL	83696
EVIQGLLKKF	83593
EVIQWLAKL	10983
EVISKLYAV	10694
EVISQHLVSY	7175
EVISTLLEKM	4650
EVNPNTRVM	29095
EVPSFLVERM	54903
EVVERVLTTF	26263
EVYPPFGIVGM	7812

Sequenz	GeneID
FFDPSLLHLL	94005
HVINTPLQTM	54903
ILDPHVLL	4927
ITESGRIGF	3689
IWDLSITRL	
LYDPVISKL	10445
SVIDGRFEGF	102
TFDDIVHSF	2194
TFDVAPSRLDF	23420
YFDPANGKF	1938
YVKDIYAYL	891

Sequenzen ohne *GeneID* sind nicht in humanen Proteindatenbanken zu finden, d.h. es handelt sich um ESTs oder nicht-menschliche Proteine.

A.8. Überlappung von HLA-A*25 und HLA-A*26

Sequenz	HLA	Source(n)
DLIKEMRQF	A*25	Ma-Mel-8a (A*25, B*14)
	A*2602	C1R-A*2602 (A*2602)
DTVKKIESF	A*25	RCC103_T (A*11, A*25, B*15, B*44)
	A*2602	C1R-A*2602 (A*2602)
DVAEGDLIEHF	A*26	NCh361 (A*26, B*38)
	A*25	RCC103_T (A*11, A*25, B*15, B*44)
	A*2602	C1R-A*2602 (A*2602)
DVIAQGIGKL	A*25	Ma-Mel-8a (A*25, B*14)
	A*26	NCh361 (A*26, B*38)
	A*2603	C1R-A*2603 (A*2603)
	A*2602	C1R-A*2602 (A*2602)
DVIRLIMQY	A*25	Ma-Mel-8a (A*25, B*14)
	A*25	RCC103_T (A*11, A*25, B*15, B*44)
	A*26	MZ7 (A*03, A*26, B*07, B*38)
	A*26	NCh361 (A*26, B*38)
	A*26	RCC121_N (A*26, A*29, B*35, B*45)
	A*26	RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
DVISSIRNF	A*25	Ma-Mel-8a (A*25, B*14)
	A*2603	C1R-A*2603 (A*2603)
DVKDYIQEY	A*25	RCC103_T (A*11, A*25, B*15, B*44)
	A*26	RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
EIAGHIMEF	A*25	RCC103_T (A*11, A*25, B*15, B*44)
	A*26	RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
EIIGKRGIIGY	A*25	Ma-Mel-8a (A*25, B*14)
	A*26	NCh361 (A*26, B*38)
	A*26	RCC121_T (A*26, A*29, B*35, B*45)
	A*26	RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
ELIAKIPNF	A*25	Ma-Mel-8a (A*25, B*14)
	A*26	NCh361 (A*26, B*38)
	A*26	RCC121_T (A*26, A*29, B*35, B*45)
	A*26	RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
	A*2602	C1R-A*2602 (A*2602)
	A*2603	C1R-A*2603 (A*2603)
ELVKRILNF	A*25	Ma-Mel-8a (A*25, B*14)
	A*26	NCh361 (A*26, B*38)
ETFDAGLQAF	A*25	RCC103_T (A*11, A*25, B*15, B*44)
	A*26	NCh361 (A*26, B*38)
ETVNLRSLGF	A*25	RCC103_T (A*11, A*25, B*15, B*44)
	A*2601	MGAR
	A*2603	C1R-A*2603 (A*2603)
EVFPLKVFY	A*25	RCC103_T (A*11, A*25, B*15, B*44)
	A*26	RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)

A. Anhang

Sequenz	HLA	Source(n)
EVIDLMIKEY	A*2603	C1R-A*2603 (A*2603)
	A*25	RCC103_T (A*11, A*25, B*15, B*44)
	A*26	NCh361 (A*26, B*38)
EVIDVVRTM	A*25	Ma-Mel-8a (A*25, B*14)
	A*2603	C1R-A*2603 (A*2603)
	A*2602	C1R-A*2602 (A*2602)
GVIEKLLTSY	A*25	Ma-Mel-8a (A*25, B*14)
	A*26	MZ7 (A*03, A*26, B*07, B*38)
	A*26	NCh361 (A*26, B*38)
SVIDGRFEGF	A*25	Ma-Mel-8a (A*25, B*14)
	A*2603	C1R-A*2603 (A*2603)

A.9. HLA-A*6601 aus LCL721.221-A*6601

Sequenz	GeneID
AVVPFLPLQR	27433
DIIPNPQER	3326
DIQRMHLR	2778
DIMDSSLTRR	2224
DLIGQDLNSR	EST
DLVDFSPVYR	23233
DQNPDAALR	11316
DTIEIITDR	3181
DVRMGGSFR	10276
DVVSFKFLNR	5500
EIFGTIGMR	3276
EINEDIAKR	10130
EIPDRLQFR	5709
ELADFIRER	
ELFAGKPVLR	81614
ELFHQQGTPR	4001
ELIQDITQR	4478
ELPIVTPALR	3838
ELPSWILMR	9551
EPVEVVAPR	142
ESFPGSFRGR	83879
ETAPRTIFQR	25814
ETIGEILKK	3190
ETIPGPDAKVR	84153
ETQLPVSVFR	23020
EVAPGALGTR	
EVAQLIQGGR	51660
EVCGFAPYER	25873
EVISLSQVTPK	4976
EVLKETVSQR	1639
EVQDTSGGTTALR	1642
EVSAEVRER	11130
EVSPPNLRGR	114134
EVTDYAIAR	4175
EVTDYAIARR	4175
EVVEDSLRQR	56255
EVVPEPVAR	1633
EVVTGVIGQR	2983
EVVYRFTAR	11004
EVYPVGIFQKR	10459
FVVEKVLDR	11335

Sequenz	GeneID
HVYDGKFLAR	590
SLFAGGMLR	54732
STVGGWVSTR	8540
SVCSGLLGPR	64951
SVIDYQTHFR	51014
SVISTDPLKR	2175
TVFDAKRLIGR	3303
YIIGLLQQR	26234
YTITEGSLR	6375
YVITDLTQLR	3656
YVVEKVLDR	10951

Sequenzen ohne *GeneID* sind nicht in humanen Proteindatenbanken zu finden, d.h. es handelt sich um ESTs oder nicht-menschliche Proteine.

A.10. HLA-B*38

Sequenz	GeneID	Source
AHDDGRWSL	6624	NCh361 (A*26, B*38)
AHDQNSNLL	7052	RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
AHPTLTGSAHP		CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)
AHSNEILIF	23588	RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
AHVDLIEKL	5441	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)
		NCh361 (A*26, B*38)
DHDPVDKIVL	3181	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)
		NCh361 (A*26, B*38)
		RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
DHHQEVIGF	23196	NCh361 (A*26, B*38)
DHINDIIKI	8826	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)
		NCh361 (A*26, B*38)
		RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
DHIREILNI	717	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)
DHMRFISEL	23191	NCh361 (A*26, B*38)
DRDGTIIHL	5777	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)
EHAANDVSF	6772	RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
EHAGVISVL	10542	NCh361 (A*26, B*38)
		RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
EHAHLIVVL	23457	NCh361 (A*26, B*38)
EHSVIDTTL	5202	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)
		NCh361 (A*26, B*38)
FHNELLTQL	10458	NCh361 (A*26, B*38)
GHFEKPLFL	10908	NCh361 (A*26, B*38)
GHYEVAELL	8658	NCh361 (A*26, B*38)
HHGEEEVETF		CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)
		RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
HHHTDGAYF	1460	RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
HHSDDGSVSL	6892	RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
HHSNILLTF	23224	RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
HHSVPVEGF	3108	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)
		RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
IHDDFVTF	165	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)
		NCh361 (A*26, B*38)
		RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
IHDLDNISF	5690	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)
		NCh361 (A*26, B*38)
IHDPTGLNLV	23166	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)
IHETTFNSI	60	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)
IHIPINNI	23480	NCh361 (A*26, B*38)
IHLIDPNTL	51068	NCh361 (A*26, B*38)
MHLRQYELL	2778	NCh361 (A*26, B*38)
MRFLAATFL	10577	RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)

Sequenz	GeneID	Source
NHEEEISTL	3880	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)
NKTAIGDYL	9266	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)
QHEGTVNIF	5803	NCh361 (A*26, B*38)
RHDDYLVML	51637	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)
RHVEVFELL	8777	NCh361 (A*26, B*38)
SHDLTLVNL	80820	NCh361 (A*26, B*38)
SHFVSDVVI	10399	NCh361 (A*26, B*38)
SHIGDAVVI	5111	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40) NCh361 (A*26, B*38) RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
SHLDYDITL	26043	NCh361 (A*26, B*38)
SHSDYLLTI	8835	NCh361 (A*26, B*38)
SHSPFGLDSF	51780	NCh361 (A*26, B*38)
SHSQLMQLI	11047	NCh361 (A*26, B*38)
THDDSHLVSL	256364	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)
THDEAINVL	8777	RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
THDEAVQAL	6641	RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
THEQAILRL	6185	RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
THHLFVIFV	1536	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)
THSLPVVVI	6774	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40) NCh361 (A*26, B*38) RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
THVDVSVVM		CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)
TRDELEWKL	79031	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40) NCh361 (A*26, B*38)
TRDPLVIEL	51303	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40) RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
TRIPKIQQL	3309	RCC307_T (A*24, A*26, B*13, B*38)
VHILDTFET	23588	NCh361 (A*26, B*38)
VHLVRSF	79778	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)
YHGSDQLQL	7280	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)
YQDLLNVKL	2670	NCh361 (A*26, B*38)
YQFTGIKKY	84833	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)

Nur B*38⁺ *Sourcen* sind berücksichtigt. Sequenzen ohne *GeneID* sind nicht in humanen Proteindatenbanken zu finden, d.h. es handelt sich um ESTs oder nicht-menschliche Proteine.

**A.11. HLA-B*3801 aus
C1R-B*3801**

Sequenz	GeneID
AHFPINVVI	6133
DHDPVDKIVL	3181
DHHQEVIGF	23196
DHINDIIKI	8826
DHIRFISEL	26999
EHAGVISVL	10542
EHDVPVGMV	1434
EHDWVPVHNNF	5597
EHINEGETAML	682
EHSLVIDTL	5202
ERFFSDKETF	83440
ERLQIDEQL	2332
FHDDSMKSF	8208
FHDDWISSI	55759
FHDGFLLEV	79959
FHDHALMII	4513
FHDHALMIF	4513
FHDPESAQQHF	26036
FHEGDVITL	6455
FHQDPPLMF	2990
FHVEPGLQRL	29128
GHDPHLLYTL	5876
HHDESVLTNVF	11124
HHIPDVITYL	2222
HHIYLEGTLL	226
HHSNILLTF	23224
IHDGMNLEL	59286
IHDLDNISF	5690
IHDMFPLHL	283373
IHEPEPHIL	1163
IHEPEPHILF	1163
IHETTFNSI	60
IHLIDPNTL	51068
MHIQDPASQRL	65220
MHLRQYELL	2778
MRLSLPLL	51237
NHDKLIPLL	23420
NHDKLIPLLL	23420
NHDVQVILF	80153
NKTAIGDYL	9266
RHDDYLVML	51637

Sequenz	GeneID
SHDDIVTEF	996
SHIGDAVVI	5111
SRDPVQLNL	7094
THDELIQLVL	80223
THDGSVYFW	26118
THFLQPIYL	103
THLDSVTKI	79184
THQDVHLGETL	51377
THSIPENTNF	4087
THVRDWVMW	2113
TRDELEWKL	79031
TRDPLVIEL	51303
YHDIAQQAF	8661
YHEDIHTYL	890
YHNEVEIEKL	8243
YHSDEYIKF	3066

A.12. HLA-B*3901 aus C1R-B*3901

Sequenz	GeneID
AHAEKLQL	10460
AHCPKAEVL	24148
AHDDGRWSL	6624
AHDVDPIEL	6130
AHFDGLIFV	80204
AHFPHPQC	23065
AHFPINVVI	6133
AHVSGRVVM	1173
AQCPIVERL	6193
ARDETEFYL	6165
DHASIQMNV	6227
DHDFWVVL	1314
DHFSRPVGL	54849
DHIRFISEL	26999
DHTVGFIL	23511
DRMVGQVL	1968
EHDPHVLLA	24148
EHDVPGQMV	1434
EHINEGETAML	682
EHSLPTLGL	1889
ERADLIAYL	54205
ERIPDVAAL	10159
ERLGLPGLAL	9420
ERNDLIVFL	81533
ERSLPLCL	10437
FHDDWISSI	55759
FHDGFLLLEV	79959
FHDHALMIIFL	4513
FHTTPNTSL	699
FRDSGLLGL	159491
FRNIPGITL	6124
GHLEKAVVL	8553
GHSDLVRCL	23246
GRAPGGLSL	3726
HHFDRIAQM	126308
HHGRFIMSL	6713
HHIPDVITYL	2222
HHMGGMAGL	6729
HHYSGNNIEL	6156
HKDMIRWIL	23304
HRDLPIKL	2058

Sequenz	GeneID
HRFPTVAV	3613
HRVEEEHVIL	3658
IHAGQPVKV	9343
IHDGFGFML	3930
IHEPEPHIL	1163
IHHPTPIQI	51428
IHINIGALEL	1655
IHSPVVNEL	51602
KHDVGAYML	5591
LHYGLPVVV	1499
LRDAVLLVF	375
LRSGVIVRL	23165
MRDPIRILV	1973
MRFLGLVVC	3988
MRLGSIFGL	5708
MRLSLPLLL	51237
MRPLDIVEL	93621
MRVPAQLL	3514
MRVPAQLLGL	3514
MRYNEKELQAL	55111
NHFDLSVIEL	8318
NRDISILQC	10434
NRHYYSITI	10213
QHEEFVTSL	10523
QHQSGIVQL	14
QHSDKIIRL	7272
QRDVVIMLL	326624
RHAEPGFSL	9088
RHVDAHATL	9908
SHIGDAVVI	5111
SHITPSTQQHL	7009
SHLEVAKSL	23089
SHLVATVTV	23225
SHSFVVNLL	6713
SHSHVGYTL	84941
SHSSVILKM	904
SHVQIPVML	5305
SRAGLQFPV	3012
SRDELLQVL	11261
SRLGLPLLL	79042
SRMPGELVL	113251
THAGAHLDL	10946
THAGVRLYF	9631
THDLLDICL	642
THLDSVTKI	79184

A. Anhang

Sequenz	GeneID
THTTPVLL	2002
THVDSHGHNVF	4171
TRALLLPLL	4811
TRATEGMVVA	5695
TRDELEWKL	79031
TRDPLVIEL	51303
TRDQFLDTL	9918
TREEGTPLTL	26155
TRLPTPVLL	64210
TRYLGDLSGGQVL	3162
VHCGIIEPLM	3838
VHMPKHPEL	6204
WHDSDWIL	79009
YKDGTELEL	3930
YKIEKIETI	51430
YRDWFSSQL	9415

A.13. HLA-B*3902 aus C1R-B*3902

Sequenz	GeneID
AKFSRPAQL	7317
AKID EKTAEL	83540
AKIHPIIA	201595
AKLRDFITL	124930
FKIHQP YTL	11218
FKSKIMSEL	55752
FKVKPFVV	10525
FQDEINWRL	8237
GKFLKPLLI	9415
GQDVGRYQV	6748
GQWKKGFVL	26135
IKFPLPHRV	6142
KKEEQVISL	6208
KKFENEIIL	1794
KKFGDFITL	6713
KKGDVVIVL	5315
KKIENLEAL	5510
KKIGDILRL	24148
KKIKDLPSL	4939
KKLETAVNL	7416
KKLPPLPSL	55004
KKSDVETIF	22913
KKTDEIVAL	984
KQFGNILIL	6611
LQDHPWLL	47
MKLHYVAVL	57045
QKESTLHLVL	6233
QQDYFPKAL	5905
RKADVEEEFL	4288
RKDGVFLYF	9349
RKDLYANTVL	60
RKFDIDIRL	5287
RKFGAQFKL	11273
RKFLETVEL	4736
RKFSLKTVL	1453
RKMGPYPII	6130
RKPDYERL	4173
RKQMVIDVL	6229
RKSDGIYII	3921
RKSSLTEL	8409
RLDDAIHVL	6925

Sequenz	GeneID
RQAPPHIEL	11217
SKFPTQISL	8805
SQDARFYAL	811
VKELVQNLL	6874
VQCPHPQIL	1380
YKDHQTITI	4172
YKLDKQHTF	8662
YKLDNQFEL	6734
YKVDLESKL	153527
YQLELR TTL	3119

A.14. Der HLA-B44-Supertyp

Sequenz	GeneID	Source(n)
HLA-B*18		
DEMNVKVL	4637	RCC110_N (A*02, B*18, B*27)
DEVKFLTV	307	RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)
EERADLLAY	54205	RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
HELPLPHSV	2034	RCC100_N (A*02, A*03, B*07, B*18)
HLA-B*1801		
AETHIVLLF	84061	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
DDFHIVVY	10927	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
DEAAFLERL	800	RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)
DEAPVLDVRY	23186	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
DEDVLRVYQF	23759	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
DEEKFITIF	308	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
DEFKEETF	22820	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
DEFHNPLAY	9785	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
DEFIHKITL	91860	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
DEFKIGELF	5591	CCA060_T (A*24, B*18, B*44)
DEFKVVVVV	22820	RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)
DEFLHINDF	8672	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
DEFLWREQF	54461	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
DEFTHLYTL	811	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
DEGKVIRF	51663	RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)
DEGRLVLEF	6646	CCA060_T (A*24, B*18, B*44)
DEHHFVAV	60496	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
DEHIYPYMY	4221	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
DEHLITFF	23020	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
DEHLQLISL	5984	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
DEHYLTF	114883	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
DEIGLPKIFY	8826	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
DEIVRINGY	10083	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
DEKLLYDTF	10262	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
DEKSITY	5339	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
DELEIHEGMKF	3329	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
DELELHQRF	10771	RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)
DELEQKRAL	6470	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
DELHYLEVY	55737	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
DELIVQHY	60412	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
DELQPLEL	6773	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
DEMKVLVL	6711	RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)
DEMLSRGF	1973	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
DENELKEFF	9908	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
DENILWLDY	5315	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)

Sequenz	GeneID	Source(n)
DENLMHISY	445	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
DEPLKHWFEF	3117	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
DEQALEDDHF	5935	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
DERKLRFTFY	6194	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
DERKMAEQY	4629	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
DERLVYTSF	771	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
DETEAVKRY	51593	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
DETLVHSSF	10106	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
DEVDIKSRAY	79068	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
DEVELIHF	11198	RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)
DEVFHDIAIY	8671	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
DEVKFLTVL	307	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
DEVKLPACL	284119	RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)
DEVQVVRGHY	6154	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
DEVRTLTY	3276	RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)
DEWLKPELF	51071	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
DEYDFYRSF	5394	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
DEYIYRHFF	9236	CCA060_T (A*24, B*18, B*44)
DEYLIPQQGF	1956	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
DEYQFVERL	740	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
DEYSLVREL	7094	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
EEAPVLMHY	5742	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
EEASLLHQF	6711	RCC103_T (A*11, A*25, B*15, B*44)
EEFELLGKAY	8663	Awells (A*0201, B*4402)
EEFGQAFSF	3113	LCL721.220-Tapasin /B44-WT (B*4402)
EEFRHVIWA	2117	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
EEHEVAVL	8519	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
EEIEGFRY	54606	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
EEIFNLKF	2969	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
EELEQKYTY	6772	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
EELFARKF	1213	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
EELQQKVS	6774	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
EEMEFQRF	54107	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
EERIVELF	6774	RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)
EERVINEEY	5928	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
EEVLIPDQKY	26224	RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)
FEAPIKLVF	81502	CCA060_T (A*24, B*18, B*44)
HEALLYVVL	23231	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
HEIAHNAAF	8560	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
HEMILKL	57674	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
HERTFLEAY	58533	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
IDQTALAVY	7174	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
LEHEYIQNF	22919	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
LERKVESL	7431	RCC110_N (A*02, B*18, B*27)
LETGQLIIM	8237	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)

Sequenz	GeneID	Source(n)
MEHAMETMMF	6281	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
MEKIWHHTF	58	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
MENLFINRF	240	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
NEADVHGIYF	1356	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
NEFEATQKL	4783	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
NEFLTREL	6188	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
NEFPVPEQF	10487	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
NEFSLKGVDf	2113	RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)
NEITIPVTF	3315	LCL721.220-Tapasin /B44-WT (B*4402)
NENDIRVMF	10659	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
NEVEAVKV	5034	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
NEVEKTMFY	83861	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
NEVLTKTY	4673	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
NEVTTEIRF	1293	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
NEVVTREY	6160	RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
NEYESRSLW	114883	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
NEYPSRVAf	10652	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
SEEEIREAF	801	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
SEELLREHY	4832	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
SEFTGVWKY	10016	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
SEIELFRVF	23020	Awells (A*0201, B*4402)
SELISTRf	51646	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
SEREAIEVF	2633	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
SETELKDTY	5708	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
SEVESTHEY	4076	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
SEVILHHEY	23020	Awells (A*0201, B*4402)
TEETLKESF	4691	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
TEFRNFIVW	51637	LCL721.220-Tapasin /B44-WT (B*4402)
TEKVLAAVY	226	RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)
TELLLKEGF	27044	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
TENDIRVMF	10658	RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)
TERELKVAY	25959	RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)
TERIIAVSF	7145	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
TEVKSIVEM	1915	RCC189_T (A*02, B*0702, B*1801)
VEAIFSKY	3183	RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)
VEFSSGLKMSL	498	RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
YEYKFGFEL	10628	RCC098_T (A*01, A*03, B*0702, B*1801)
HLA-B*37		
ADQLRFSYL	5770	CCA136_T (A*01, A*30, B*37, B*49)
ADSLRLQQL	6709	RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
ADVLKVEVF	3692	CCA136_T (A*01, A*30, B*37, B*49)
AELERAAAL	163033	RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
AELLRGLSL	26234	RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
AEMLRISf	1477	CCA136_T (A*01, A*30, B*37, B*49)

Sequenz	GeneID	Source(n)
FELQRNFQL	51147	RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
GDHQRFSTF	114899	RCC231_T (A*24, B*35, B*37)
HDFLKYDFF	6836	RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
HDFPRALIF	90634	RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
HDYMKQMTF	116496	RCC231_T (A*24, B*35, B*37)
IESKIYKM	1453	RCC231_T (A*24, B*35, B*37)
KDFLPAGYLL	10343	RCC231_T (A*24, B*35, B*37)
KDFLRIAGL	122786	RCC231_T (A*24, B*35, B*37)
KDLPHWNKL	50484	RCC231_T (A*24, B*35, B*37)
KDVLSVAF	10399	RCC231_T (A*24, B*35, B*37)
KEALPKAAF	3550	RCC231_T (A*24, B*35, B*37)
KENPLQFKF	5962	RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)
KESEVFYEL	3091	RCC231_T (A*24, B*35, B*37)
KESPLLFKF	4478	RCC119_T (A*02, A*24, B*07, B44 supertype)
LDLQRNYIF	375387	RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
MDLLHKNM	3493	RCC231_T (A*24, B*35, B*37)
QDLNRIFPL	5552	RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
QDVARVLGF	9240	RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
RDALHLGF	678	RCC231_T (A*24, B*35, B*37)
RDFNHINV	6133	RCC231_T (A*24, B*35, B*37)
RDLSHLGI	57714	RCC231_T (A*24, B*35, B*37)
RDSIINF	9879	RCC231_T (A*24, B*35, B*37)
RDSIVAEI	11316	RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
RDTYVSSF	6917	RCC231_T (A*24, B*35, B*37)
RDVKVSLF	28978	RCC231_T (A*24, B*35, B*37)
REGLIVGF	738	RCC231_T (A*24, B*35, B*37)
RELPAWVSF	23344	RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
RELYHVISF	5430	RCC231_T (A*24, B*35, B*37)
RENLRIAL	3105	RCC231_T (A*24, B*35, B*37)
RETNLDSLPL	7431	RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
SDDATCRLF	2782	RCC231_T (A*24, B*35, B*37)
SDHIHIAL	55611	RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
SDLERVTSI	79618	RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
SDLKRINGF	26355	RCC231_T (A*24, B*35, B*37)
SDLKRSLGF	84647	RCC231_T (A*24, B*35, B*37)
SDMPRAHSF	6452	RCC231_T (A*24, B*35, B*37)
SELIRNVTL	9343	RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
SEYARPHVM	473	RCC231_T (A*24, B*35, B*37)
TDGKVFQF	6152	RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
TDLIRELSL	246721	RCC231_T (A*24, B*35, B*37)
TDLMLRKEI		RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
TDNQRIEFL	5034	RCC231_T (A*24, B*35, B*37)
TDNQKRLFF	7145	RCC231_T (A*24, B*35, B*37)
TELERKLTFF	9236	RCC231_T (A*24, B*35, B*37)
TELLRYYML	27131	RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)

Sequenz	GeneID	Source(n)
VDDFKKAF	284119	CCA136_T (A*01, A*30, B*37, B*49)
VDISLTGDP	1071	RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
VELPHINLL	54707	RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
VESLLQKF	56339	RCC231_T (A*24, B*35, B*37)
WENPRVLSF	4940	RCC231_T (A*24, B*35, B*37)
YDLLRNTNF	1859	RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
YDSIIYRM	10159	RCC116_T (A*01, A*02, B*27, B*37)
YEVSQDKD	55748	RCC115_T (A*02, A*03, B*15, B*18)
HLA-B*40		
REKIVEVMF	10097	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)
TELLIRKL	3020	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)
HLA-B*4001		
AEDPLGAIHL	5341	Awells (A*0201, B*4402)
AEEDHVDLSL	1026	EMJ (A*0201, A*0301, B*4001)
AEELLRIGL	10694	EMJ (A*0201, A*0301, B*4001)
AEERWEVVV	2968	EMJ (A*0201, A*0301, B*4001)
AEFKAEAFQL	4637	EMJ (A*0201, A*0301, B*4001)
AEIRHVLVTL	4637	BM15 (A*0101, B*4901)
AEPPEVEVL	11335	RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
AEPLEIHL	4809	EMJ (A*0201, A*0301, B*4001)
FEMPYVVRL	10419	EMJ (A*0201, A*0301, B*4001)
GEDSSFLVVRL	4927	EMJ (A*0201, A*0301, B*4001)
GEFAKVLEL	5518	EMJ (A*0201, A*0301, B*4001)
GEGDFLAEGGGV	2243	RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
GEHEIDYILL	3422	EMJ (A*0201, A*0301, B*4001)
GEITGEVHM	2317	RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
GEITGEVRM	2316	CCA172_T (A*02, A*03, B*38, B*40)
GEPPIGRGTKVIL	3326	EMJ (A*0201, A*0301, B*4001)
GESDDSLRL	6227	RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
GEVLDILTRL	10211	EMJ (A*0201, A*0301, B*4001)
GEVQDLLVRL	11176	EMJ (A*0201, A*0301, B*4001)
HEDKIRVVV	10938	RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
HELLERIGL	54440	EMJ (A*0201, A*0301, B*4001)
IEHLLPLFL	5518	EMJ (A*0201, A*0301, B*4001)
IEQEIRILL	10730	EMJ (A*0201, A*0301, B*4001)
IEVDGKQVEL	387	RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
IEVDPDTKEML	6218	EMJ (A*0201, A*0301, B*4001)
KEEGAGLGFSL	3603	EMJ (A*0201, A*0301, B*4001)
KEFNEDGALAVL	10492	EMJ (A*0201, A*0301, B*4001)
KEFNFPPEAVL	22870	EMJ (A*0201, A*0301, B*4001)
KEIAEAYDVL	3337	EMJ (A*0201, A*0301, B*4001)
KEIDEVGDLLQL	9517	EMJ (A*0201, A*0301, B*4001)
KEIFLRELI	3320	Awells (A*0201, B*4402)

Sequenz	GeneID	Source(n)
KEYDDLQAL	55813	EMJ (A*0201, A*0301, B*4001)
KEMDLSVRL	4790	EMJ (A*0201, A*0301, B*4001)
KEPDRIVGEFL	6713	EMJ (A*0201, A*0301, B*4001)
KEPEINTTL	221154	RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
KESTLHLVL	6233	Awells (A*0201, B*4402)
KETEAWDFL	56160	EMJ (A*0201, A*0301, B*4001)
LESLDQLEL	9532	RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
NEFPEPIKL	7879	EMJ (A*0201, A*0301, B*4001)
RECLPLIIFL	6191	EMJ (A*0201, A*0301, B*4001)
REFNEEGALSVL	10236	EMJ (A*0201, A*0301, B*4001)
REIFLSQPILL	5499	BM15 (A*0101, B*4901)
REIITSILL	2185	EMJ (A*0201, A*0301, B*4001)
REINDCIGGTVL	26156	EMJ (A*0201, A*0301, B*4001)
REKLQEEML	7431	RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
REVELDPDIQL	84056	EMJ (A*0201, A*0301, B*4001)
REWGEELQAVL	50628	EMJ (A*0201, A*0301, B*4001)
SEDKKNIIL	1072	RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
SEIDQLFRIF	983	Awells (A*0201, B*4402)
SESPIVVVL	23478	EMJ (A*0201, A*0301, B*4001)
SEVQDRVML	51646	RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
TEARFGAQL	3880	RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
TEHGVEVVL	10044	RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
TEIDEKEYISL	10197	EMJ (A*0201, A*0301, B*4001)
TEITHAVVI	8663	BM15 (A*0101, B*4901)
TESGLNVTL	5093	RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
YEELVRMVL	4637	RCC075_T (A*03, B*0702, B*4001)
YEIDDERL	26153	EMJ (A*0201, A*0301, B*4001)
HLA-B*4101		
AEAAVVAVA	280636	LCL026_ZL (A*0201, A*3301, B*4101, B*5101)
AEAIRILAA	30968	LCL026_ZL (A*0201, A*3301, B*4101, B*5101)
AEHPIVIVC	57647	WIL-JON (A*02, A*29, B*1503, B*4101)
AEIKDIKDEIA	121457	LCL026_ZL (A*0201, A*3301, B*4101, B*5101)
IEEDKWRVA	134429	WIL-JON (A*02, A*29, B*1503, B*4101)
KEAIETIVA	2778	LCL026_ZL (A*0201, A*3301, B*4101, B*5101)
KEAPAPPKA	6147	NN026_ZL (A*0201, A*3301, B*4101, B*5101)
KEDKPPLAP	11273	LCL026_ZL (A*0201, A*3301, B*4101, B*5101)
KEEDVLKFLAA	3921	LCL026_ZL (A*0201, A*3301, B*4101, B*5101)
KEFEKEISA	1062	LCL026_ZL (A*0201, A*3301, B*4101, B*5101)
KEIEGIFHA	6566	LCL026_ZL (A*0201, A*3301, B*4101, B*5101)
KELEKTYSA	4000	LCL026_ZL (A*0201, A*3301, B*4101, B*5101)
KEMPVKVEA	10526	LCL026_ZL (A*0201, A*3301, B*4101, B*5101)
KEYDLPDA	83538	RCC026_ZL (A*0201, A*3301, B*4101, B*5101)
KEYERFSKY	7919	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
NEDLRSWTA	3105	RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501)

A. Anhang

Sequenz	GeneID	Source(n)
REAPPVVP	699	LCL026_ZL (A*0201, A*3301, B*4101, B*5101)
REAQSFISA	140890	LCL026_ZL (A*0201, A*3301, B*4101, B*5101)
REAQSLISA	9295	LCL026_ZL (A*0201, A*3301, B*4101, B*5101)
RECTIATA	7555	WIL-JON (A*02, A*29, B*1503, B*4101)
REEFPTLQA	7916	WIL-JON (A*02, A*29, B*1503, B*4101)
REIAGSLEA	22796	LCL026_ZL (A*0201, A*3301, B*4101, B*5101)
REIEELLAEA	83892	LCL026_ZL (A*0201, A*3301, B*4101, B*5101)
REIFLSQPILL	5499	BM15 (A*0101, B*4901)
REILTELEA	90678	LCL026_ZL (A*0201, A*3301, B*4101, B*5101)
REIQEAIAVA	54870	WIL-JON (A*02, A*29, B*1503, B*4101)
RELEVQHPA	10694	LCL026_ZL (A*0201, A*3301, B*4101, B*5101)
RETEVTFVP	9632	WIL-JON (A*02, A*29, B*1503, B*4101)
REVLRTVET	57217	LCL026_ZL (A*0201, A*3301, B*4101, B*5101)
SEAKPAAVAA	7094	LCL026_ZL (A*0201, A*3301, B*4101, B*5101)
SEYLRVEDTL	10628	WIL-JON (A*02, A*29, B*1503, B*4101)
TEIEKSISA	608	LCL026_ZL (A*0201, A*3301, B*4101, B*5101)
VEVPETPKA	10916	RCC263_T (A*02, B*15, B*50)
WEDEGVRAC	2778	BM15 (A*0101, B*4901)
YEDRQVPEA	1731	WIL-JON (A*02, A*29, B*1503, B*4101)
YEEGPGKNLP	1350	LCL026_ZL (A*0201, A*3301, B*4101, B*5101)
YEQSYIIP	203102	WIL-JON (A*02, A*29, B*1503, B*4101)
YEQNDRLTP	4478	WIL-JON (A*02, A*29, B*1503, B*4101)
HLA-B*44		
EEASLLHQF	6711	RCC103_T (A*11, A*25, B*15, B*44)
EEIDLRSVGGW	81622	RCC130_T (A*02, A*24, B*07, B*44)
HLA-B*4402		
AEAAGLHKVF	7155	Awells (A*0201, B*4402)
AEADKTIKVY	5356	Awells (A*0201, B*4402)
AEAERVGLHKVF	7153	Awells (A*0201, B*4402)
AEAFEAIIPRAL	10694	Awells (A*0201, B*4402)
AEAIRKIGF	196743	Awells (A*0201, B*4402)
AEAIYVTRHLF	348995	Awells (A*0201, B*4402)
AEDLNTRVAYW	51014	Awells (A*0201, B*4402)
AEDMETKIKNY	1340	Awells (A*0201, B*4402)
AEDPLGAIHL	5341	Awells (A*0201, B*4402)
AEEKAIVQQW	9521	Awells (A*0201, B*4402)
AEEKATGKLF	57118	Awells (A*0201, B*4402)
AEEKQTKSF	3069	Awells (A*0201, B*4402)
AELFARKF	1213	Awells (A*0201, B*4402)
AELPHIHAF	552900	Awells (A*0201, B*4402)
AESDLSRQY	2975	Awells (A*0201, B*4402)
AEFKEAFQLF	4637	Awells (A*0201, B*4402)
AEFKQIRSI	2185	Awells (A*0201, B*4402)

Sequenz	GeneID	Source(n)
AEGIHTGQFVY	6132	Awells (A*0201, B*4402)
AEGPRLAI	8079	Awells (A*0201, B*4402)
AEHDVTVKY	135293	Awells (A*0201, B*4402)
AEIGEGAYGKVF	1021	Awells (A*0201, B*4402)
AEIIRFLTNY	3071	Awells (A*0201, B*4402)
AEIISRRGF	103	Awells (A*0201, B*4402)
AEINNIKI	7153	Awells (A*0201, B*4402)
AEIPADPKLY	81704	LCL721.220-Tapasin /B44-WT (B*4402)
AEIRIIPAKKY	1718	Awells (A*0201, B*4402)
AEIRSLVTW	3433	LCL721.220-Tapasin /B44-WT (B*4402)
AEITDKLGLHSL	375	Awells (A*0201, B*4402)
AEKAPTNIYV	6118	Awells (A*0201, B*4402)
AEKEVKGAVY	1642	Awells (A*0201, B*4402)
AEKLITQTF	10726	Awells (A*0201, B*4402)
AELDRQIKSF	6709	Awells (A*0201, B*4402)
AELLEGKLRVF	7185	Awells (A*0201, B*4402)
AELMQTLRF	51650	Awells (A*0201, B*4402)
AEMAQNAVRL	1499	Awells (A*0201, B*4402)
AEMGKGSFRY		Awells (A*0201, B*4402)
AEPYGKIKNY	9782	Awells (A*0201, B*4402)
AESLIAKKI	10576	Awells (A*0201, B*4402)
AESLLTMEY	55793	Awells (A*0201, B*4402)
AESRRVLLL	1059	Awells (A*0201, B*4402)
AETPDIKLF	6193	Awells (A*0201, B*4402)
AETPQAKKI	9221	Awells (A*0201, B*4402)
AEVDNRSPQKF	79596	Awells (A*0201, B*4402)
AEVLDLRRLY	25885	Awells (A*0201, B*4402)
AEVLGLILRY	5591	Awells (A*0201, B*4402)
AEYNSDLHQF	699	Awells (A*0201, B*4402)
DEALIGKKF	1106	Awells (A*0201, B*4402)
DEIERKFDKW	26121	Awells (A*0201, B*4402)
DENSVIKSF		Awells (A*0201, B*4402)
DEQTPHISW	1033	Awells (A*0201, B*4402)
EDWIRGVEW	55250	Awells (A*0201, B*4402)
EEAEIRKY	142	Awells (A*0201, B*4402)
EEAQFETKKLY	9403	Awells (A*0201, B*4402)
EEDAALFKAW	3662	Awells (A*0201, B*4402)
EEFDARWVTY	9377	Awells (A*0201, B*4402)
EEFELLGKAY	8663	Awells (A*0201, B*4402)
EEFGQAFSF	3113	LCL721.220-Tapasin /B44-WT (B*4402)
EEFGRAFSF	3113	Awells (A*0201, B*4402)
EEFGRFASF	3122	Awells (A*0201, B*4402)
EEFQKELSQW	24144	LCL721.220-Tapasin /B44-WT (B*4402)
EEIAFLKKL	7431	Awells (A*0201, B*4402)
EEIAILSKKL		Awells (A*0201, B*4402)

Sequenz	GeneID	Source(n)
EEIAIIPSKKL	6218	Awells (A*0201, B*4402)
EEIAHPSQKL		Awells (A*0201, B*4402)
EEIREAFRVF	801	Awells (A*0201, B*4402)
EEKSIDLIQKW	5130	Awells (A*0201, B*4402)
EELDAQFPEGY		Awells (A*0201, B*4402)
EELGFRPEY	142	Awells (A*0201, B*4402)
EELPHIHAF	552900	LCL721.220-Tapasin /B44-WT (B*4402)
EEMPATKGGFSF	9972	Awells (A*0201, B*4402)
EENTNILKF	29766	Awells (A*0201, B*4402)
EEPTVIKKY	27131	Awells (A*0201, B*4402)
EEQKNLHFF	29959	Awells (A*0201, B*4402)
EEQSHPARLY	10641	Awells (A*0201, B*4402)
EESLLSLIRNW	161176	Awells (A*0201, B*4402)
EEVHDLERKY	4673	Awells (A*0201, B*4402)
EEVRQGLKAY	10539	Awells (A*0201, B*4402)
EEWLPRELW	4913	Awells (A*0201, B*4402)
FEQVLQFGCSA		Awells (A*0201, B*4402)
GEASRLAHY	3017	Awells (A*0201, B*4402)
GEAVVNRVF	5698	Awells (A*0201, B*4402)
GEWASGGVRSF	25824	Awells (A*0201, B*4402)
GEWIRQNGGW	597	Awells (A*0201, B*4402)
HEAEVLKQL	3925	Awells (A*0201, B*4402)
HEIEALKSF	4898	Awells (A*0201, B*4402)
IEDPQIQAHW	9440	Awells (A*0201, B*4402)
IEHGITNW	58	Awells (A*0201, B*4402)
IENPALLRW	4710	Awells (A*0201, B*4402)
KEIFLRELI	3320	Awells (A*0201, B*4402)
KESTLHLVL	6233	Awells (A*0201, B*4402)
LEGNPDTHSW	9898	Awells (A*0201, B*4402)
MEPSTAARAW	1650	Awells (A*0201, B*4402)
MEQVIFKYL	10096	Awells (A*0201, B*4402)
NEDNGIIFAF	6124	Awells (A*0201, B*4402)
NEIEDTFRQF	9296	Awells (A*0201, B*4402)
NEILGSLRW	23195	Awells (A*0201, B*4402)
NEITIPVTF	3315	LCL721.220-Tapasin /B44-WT (B*4402)
NELNIIHKF	26121	Awells (A*0201, B*4402)
NENPLRALY	5058	Awells (A*0201, B*4402)
QEAASLLGKKY	4678	Awells (A*0201, B*4402)
QEAGIKTAF	10606	Awells (A*0201, B*4402)
QEDLRTFSW	10146	Awells (A*0201, B*4402)
QEGHLEVTQY	83715	Awells (A*0201, B*4402)
QEHVKFSFW	6653	Awells (A*0201, B*4402)
QEKNPLPSKETI	7114	LCL721.220-Tapasin /B44-WT (B*4402)
QELDSTDGAKVF	6729	Awells (A*0201, B*4402)
QELIGKKEY	55320	Awells (A*0201, B*4402)

Sequenz	GeneID	Source(n)
QELQEINRVY	302	Awells (A*0201, B*4402)
SEAGSHIIQRMV	3106	Awells (A*0201, B*4402)
SEAPSGESRKF	8663	Awells (A*0201, B*4402)
SEASRLAHY	8340	Awells (A*0201, B*4402)
SEDNRIILW	79084	Awells (A*0201, B*4402)
SEEAIEIRKY	142	Awells (A*0201, B*4402)
SEFELLRSY	8723	Awells (A*0201, B*4402)
SEFFRSWKY	2023	Awells (A*0201, B*4402)
SEFIDSQRVW	10594	Awells (A*0201, B*4402)
SEGYPGKRY	6472	Awells (A*0201, B*4402)
SEIDQLFRIF	983	Awells (A*0201, B*4402)
SEIEAKVRY	7094	Awells (A*0201, B*4402)
SEIELFRVF	23020	Awells (A*0201, B*4402)
SEINKPNFY	30836	Awells (A*0201, B*4402)
SEMPAAKRL	2962	Awells (A*0201, B*4402)
SENLLGKQF	4288	Awells (A*0201, B*4402)
SENPAKRLY	114049	Awells (A*0201, B*4402)
SEPDFVAKF	55017	Awells (A*0201, B*4402)
SEPDFVAKFY	55017	Awells (A*0201, B*4402)
SEPEIRKWK	1211	Awells (A*0201, B*4402)
SEPIHVRKY	9156	Awells (A*0201, B*4402)
SESAQSKML		Awells (A*0201, B*4402)
SESLLRGIYAY	1973	Awells (A*0201, B*4402)
SESPIVVVL	23478	EMJ (A*0201, A*0301, B*4001)
SETDMVRQI	738	Awells (A*0201, B*4402)
SEVDLTRSF	51292	Awells (A*0201, B*4402)
SEVILHHEY	23020	Awells (A*0201, B*4402)
TEAAHPIRLF	10594	Awells (A*0201, B*4402)
TEFRNFIVW	51637	LCL721.220-Tapasin /B44-WT (B*4402)
TELPKAEKW		Awells (A*0201, B*4402)
TEVTGHRW	682	Awells (A*0201, B*4402)
VEDELVKKY	9031	Awells (A*0201, B*4402)
VEIYDRREY		Awells (A*0201, B*4402)
YEILATHPTW	23420	Awells (A*0201, B*4402)
HLA-B*45		
EEAKKFLAP	7520	RCC121_T (A*26, A*29, B*35, B*45)
HLA-B*4501		
AEAIRILAA	30968	LCL026_ZL (A*0201, A*3301, B*4101, B*5101)
AEAVFRAITIA	1400	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
AELATRALP	3728	RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
AEMPQNYRP	7706	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
EEHPTLLTEA	58	RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
EEMPQVHTP	4172	RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501)

Sequenz	GeneID	Source(n)
EENARLFHP	6470	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
EENFAVEA	7431	RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
EENKLIYTP	23568	RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
EERPPTLSA	56672	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
EERPWLWVV	821	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
GEPRFISVGY	3106	RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
KEYERFSKY	7919	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
LEEDSAREI		RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
MEDIKILIA	3091	RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
MEEHLEEP	10146	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
MEENFAVEA	7431	RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
METVWITLP	4513	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
NEDLRSWTA	3105	RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
NEIKDSVVA	1938	RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
QEGVEVRVA	80146	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
QENSSDFQSNIA	3187	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
QEQSFVIRA	3689	RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
REAEFTKXIA	9789	RCC068_ZL (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
REHAPFLVA	57104	RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
VEHPSLTSP	3123	RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
VEPDHFVKVA	3958	RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
VEREVEQV		RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
HLA-B*4701		
ADRILDVGF	8886	RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101)
GEHGLIIRV	4898	BM15 (A*0101, B*4901)
HDKEIFFHY	7812	RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101)
IDFLSHHL	8660	RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101)
IDIKGPSL	79026	RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101)
KDKLKDATERY	23499	RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101)
KDLLTRHKL	51719	RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101)
KDLTSMVRL	6711	RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101)
LDFLWHNM	10607	RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101)
MDMRVPAQL	3514	RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101)
RDFEFPSEM	54102	RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101)
RDFLFPHL	25782	RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101)
RDFLTLELKL	115361	RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101)
RDLALEYYV	8540	RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101)
RDLKAVKY	998	RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101)
RDLLHPSL	51065	RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101)
RDLLIRTHM	10801	RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101)
RDLMLMSHL	8663	RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101)
RDLQAPLQSF	968	RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101)
RDMDIIMKL	83732	RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101)
RDMMANFHL	22980	RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101)

Sequenz	GeneID	Source(n)
RDVALQIHF	1647	RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101)
RDVYLTMYML	80305	RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101)
REIFLSQPILL	5499	BM15 (A*0101, B*4901)
YDFLIREGY	6871	RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101)
YDLGLTTKM	4332	RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101)
YDYP5IAHL	3688	RCC135_T (A*02, A*03, B*4701, B*5101)
HLA-B*49		
FEYDFLLQRI	4321	CCA136_T (A*01, A*30, B*37, B*49)
GEFIIGRVI	3987	CCA136_T (A*01, A*30, B*37, B*49)
GEHTLLVTV	389541	RCC2733_ZL (A*01, A*02, B*07, B*49)
REANLQALI	29978	RCC2733_ZL (A*01, A*02, B*07, B*49)
REFLFNAI	6241	RCC2733_ZL (A*01, A*02, B*07, B*49)
RESFPMILV	22808	RCC2733_ZL (A*01, A*02, B*07, B*49)
RESFSLVQV	7917	RCC2733_ZL (A*01, A*02, B*07, B*49)
REYQDLLNV	1674	CCA149_T (A*01, A*24, B*08, B*49)
TENPGSIRI	7286	CCA136_T (A*01, A*30, B*37, B*49)
HLA-B*4901		
AEAQQLITI	1314	BM15 (A*0101, B*4901)
AEAYLGKKV	3309	M18 (A*2902, B*4901)
AEAYLGKTV	3312	BM15 (A*0101, B*4901)
AEAYVLFY	23032	BM15 (A*0101, B*4901)
AEDFYDCRV	3113	BM15 (A*0101, B*4901)
AEDPAGLKV	8458	BM15 (A*0101, B*4901)
AEFIKFTVI	2969	BM15 (A*0101, B*4901)
AEFKQIRSI	2185	Awells (A*0201, B*4402)
AEFQELLKV	131076	BM15 (A*0101, B*4901)
AEGTFPGKI	1340	BM15 (A*0101, B*4901)
AEHIKSLLI	65123	BM15 (A*0101, B*4901)
AEIAQLMSL	3320	BM15 (A*0101, B*4901)
AEIEHFIHI	476	BM15 (A*0101, B*4901)
AEIHKQLKI	56254	BM15 (A*0101, B*4901)
AEINNIKI	7153	Awells (A*0201, B*4402)
AEIPGVRSV	51015	BM15 (A*0101, B*4901)
AEIRHVLVT	4637	BM15 (A*0101, B*4901)
AEIRHVLVTL	4637	BM15 (A*0101, B*4901)
AEIRRFSSV	84058	BM15 (A*0101, B*4901)
AEIVTKTI	23020	BM15 (A*0101, B*4901)
AEKLEIYV	10492	BM15 (A*0101, B*4901)
AEKLGSAVI	1072	BM15 (A*0101, B*4901)
AELSEFTTV	7378	M18 (A*2902, B*4901)
AERIFSEV	996	BM15 (A*0101, B*4901)
AERWIVNLI	3646	BM15 (A*0101, B*4901)
AESDKPVVI	202	BM15 (A*0101, B*4901)

Sequenz	GeneID	Source(n)
AETGKVVII	23225	BM15 (A*0101, B*4901)
AEVDDQLTI	55746	BM15 (A*0101, B*4901)
AEVGRVLQV	51603	BM15 (A*0101, B*4901)
AEVLEAHTI	57169	BM15 (A*0101, B*4901)
AEVRALLGV	9284	BM15 (A*0101, B*4901)
AEVYRILSV	25926	BM15 (A*0101, B*4901)
AEYDNFFQHL	23332	BM15 (A*0101, B*4901)
AEYGEIKNI	9939	M18 (A*2902, B*4901)
FEDGQKIVV	5573	BM15 (A*0101, B*4901)
FEHHGQVRL	2966	BM15 (A*0101, B*4901)
FEIPVIKI	23586	BM15 (A*0101, B*4901)
FERDAFDTL	29780	BM15 (A*0101, B*4901)
FESLPATHI	9219	BM15 (A*0101, B*4901)
FESPNILRI	197259	BM15 (A*0101, B*4901)
FETIVKQQI	4599	BM15 (A*0101, B*4901)
FEVILTRI	23191	BM15 (A*0101, B*4901)
FEWENKVTV	1315	BM15 (A*0101, B*4901)
GEAVGARLI	10528	BM15 (A*0101, B*4901)
GEHGLHIRV	4898	BM15 (A*0101, B*4901)
GEIRTITV	55696	BM15 (A*0101, B*4901)
GEISTIDKV	5033	M18 (A*2902, B*4901)
GELPEHAKI	1964	BM15 (A*0101, B*4901)
GESKDLLFI	1642	BM15 (A*0101, B*4901)
GEWPDQPRI	222194	BM15 (A*0101, B*4901)
GEYPKLLRL	10466	BM15 (A*0101, B*4901)
HEAEPVRTL	253461	BM15 (A*0101, B*4901)
HECASINRI	5499	BM15 (A*0101, B*4901)
HEEDFFLYI	11337	BM15 (A*0101, B*4901)
HEGDIILKI	9414	BM15 (A*0101, B*4901)
HEGFVRGI	25879	BM15 (A*0101, B*4901)
HEHIEILTV	28985	BM15 (A*0101, B*4901)
HELPEFNLI	5822	BM15 (A*0101, B*4901)
HELPKYGVKV	6125	BM15 (A*0101, B*4901)
HESGASIKI	3190	BM15 (A*0101, B*4901)
IEDDRAAMVI	23347	BM15 (A*0101, B*4901)
IEDGKVVTV	10726	BM15 (A*0101, B*4901)
IEDRPMPKL	701	BM15 (A*0101, B*4901)
IEHVIIPRI	51382	BM15 (A*0101, B*4901)
IEIERILSV	4643	BM15 (A*0101, B*4901)
IELPNIQKV	8237	BM15 (A*0101, B*4901)
IENGHIFTV	8452	BM15 (A*0101, B*4901)
IESKHEVTI	7328	BM15 (A*0101, B*4901)
IEYAKPTRL	3191	BM15 (A*0101, B*4901)
IEYQFVERL	7188	BM15 (A*0101, B*4901)
KEAELRTWI	1265	BM15 (A*0101, B*4901)

Sequenz	GeneID	Source(n)
KEDVRILKV	2185	BM15 (A*0101, B*4901)
KEFDGKSLV	3326	BM15 (A*0101, B*4901)
KEFDGKSLVSV	3326	BM15 (A*0101, B*4901)
KEFEGKTLV	3320	BM15 (A*0101, B*4901)
KEFSPFGTI	26986	BM15 (A*0101, B*4901)
KEIEELTKI	10579	BM15 (A*0101, B*4901)
KEIFLRELI	3320	Awells (A*0201, B*4402)
KEIGDIAGV	2959	BM15 (A*0101, B*4901)
KEKVPGITI	54901	BM15 (A*0101, B*4901)
KELEHLSHI	80145	BM15 (A*0101, B*4901)
KELKLLQTI	1063	BM15 (A*0101, B*4901)
KEMVANWDSL	51520	M18 (A*2902, B*4901)
KEVFLAQPV		BM15 (A*0101, B*4901)
LEDRGIRKI	51602	BM15 (A*0101, B*4901)
LEEQASRQI	11004	BM15 (A*0101, B*4901)
LEHIFRAI	23180	BM15 (A*0101, B*4901)
LELEAPLKI	5499	BM15 (A*0101, B*4901)
LELLFQHPV	60676	BM15 (A*0101, B*4901)
LESHWVWV	9415	BM15 (A*0101, B*4901)
LESPPALV	9368	BM15 (A*0101, B*4901)
LEVDHIRTI	6646	BM15 (A*0101, B*4901)
LEVIPRTLI	7203	BM15 (A*0101, B*4901)
LEVIVDRPL	9752	BM15 (A*0101, B*4901)
MEDGGVKLL	51622	BM15 (A*0101, B*4901)
MEFKAVQQV	51371	BM15 (A*0101, B*4901)
QEALNLFKSI	2778	BM15 (A*0101, B*4901)
QEIEELTKI	6867	BM15 (A*0101, B*4901)
QEIFERILFI	55633	BM15 (A*0101, B*4901)
QEKLGTRI	382	BM15 (A*0101, B*4901)
QETELSQRI	29781	BM15 (A*0101, B*4901)
QETSVIHKI	55279	BM15 (A*0101, B*4901)
QEVDLQQLI	1687	BM15 (A*0101, B*4901)
QEVFEKATFI	4691	BM15 (A*0101, B*4901)
QEWDGLVRI	27292	BM15 (A*0101, B*4901)
QEYAQVIKM	1964	BM15 (A*0101, B*4901)
QEYPDLIHI	6672	BM15 (A*0101, B*4901)
READFFWSL	8837	BM15 (A*0101, B*4901)
REAEDMVQKV	8379	BM15 (A*0101, B*4901)
REAFTKSI	9789	M18 (A*2902, B*4901)
REAESFTQL	25871	M18 (A*2902, B*4901)
REAPSPLMI	23476	BM15 (A*0101, B*4901)
REDQINRLI	6129	BM15 (A*0101, B*4901)
REFDKRFTSV	171586	BM15 (A*0101, B*4901)
REFGNLTRM	27089	BM15 (A*0101, B*4901)
REFQTSAI	518	BM15 (A*0101, B*4901)

Sequenz	GeneID	Source(n)
REGDLLFTV	8668	BM15 (A*0101, B*4901)
REHHEPVM	1612	BM15 (A*0101, B*4901)
REHTALLKI	6165	BM15 (A*0101, B*4901)
REIFLSQPILL	5499	BM15 (A*0101, B*4901)
REIGGGEGAGAVI	4170	BM15 (A*0101, B*4901)
REIGTLATV	51225	BM15 (A*0101, B*4901)
REIQTAVRL	3017	BM15 (A*0101, B*4901)
RELPLTLWV	8809	BM15 (A*0101, B*4901)
REMIPFAVV	10801	BM15 (A*0101, B*4901)
REMLQQSKI	3320	BM15 (A*0101, B*4901)
RESVDHLTI	3376	BM15 (A*0101, B*4901)
REYIEHTSSI	55845	BM15 (A*0101, B*4901)
SEALEAARI	6134	BM15 (A*0101, B*4901)
SEELKTHI	2547	BM15 (A*0101, B*4901)
SEFDFFERL	64218	BM15 (A*0101, B*4901)
SEFKAMDSI	1495	BM15 (A*0101, B*4901)
SEGGPPLRI	23013	BM15 (A*0101, B*4901)
SEGGQLRSI	81609	BM15 (A*0101, B*4901)
SEIDQINKV	984	BM15 (A*0101, B*4901)
SEIDQLFRI	983	BM15 (A*0101, B*4901)
SEIESVKI	79682	BM15 (A*0101, B*4901)
SEIRHLLTL	57050	BM15 (A*0101, B*4901)
SEMHSFIQI	3428	BM15 (A*0101, B*4901)
SENPVPLTV	57470	M18 (A*2902, B*4901)
SETDTSLI	908	M18 (A*2902, B*4901)
SETPTFAKV	81620	BM15 (A*0101, B*4901)
TEALPVKLI	6241	BM15 (A*0101, B*4901)
TEDSPGLKV	10952	BM15 (A*0101, B*4901)
TEDVPMILV	5906	BM15 (A*0101, B*4901)
TEFRSLVI	4683	BM15 (A*0101, B*4901)
TEIDEKEYI	10197	M18 (A*2902, B*4901)
TEIREHTSI	2185	BM15 (A*0101, B*4901)
TEITHAVVI	8663	BM15 (A*0101, B*4901)
TEIVNPLRI	1540	BM15 (A*0101, B*4901)
TEKQYIATI	23165	BM15 (A*0101, B*4901)
TELGVKTTLD	7337	BM15 (A*0101, B*4901)
TEVDKILKV	51202	BM15 (A*0101, B*4901)
VEDLSLIFTRV	64434	BM15 (A*0101, B*4901)
VEDPVRKV	8669	BM15 (A*0101, B*4901)
VEFRDFLKI	6793	BM15 (A*0101, B*4901)
VEGPSQAKI	2316	BM15 (A*0101, B*4901)
VEGRDVVALI	3099	BM15 (A*0101, B*4901)
VEIEEGGVKVV	1731	BM15 (A*0101, B*4901)
VEIQTPKI	1615	BM15 (A*0101, B*4901)
VEKIDFDSV	27335	BM15 (A*0101, B*4901)

Sequenz	GeneID	Source(n)
VENLPRTVI	51255	BM15 (A*0101, B*4901)
VESIISPKV	5885	BM15 (A*0101, B*4901)
VESPVICKI	27248	BM15 (A*0101, B*4901)
VETSRVVHI	9782	BM15 (A*0101, B*4901)
VEVGRVAYV	9045	BM15 (A*0101, B*4901)
WEDEGVRAC	2778	BM15 (A*0101, B*4901)
WEMDNMLIQI	93621	BM15 (A*0101, B*4901)
YEDISRGL	973	BM15 (A*0101, B*4901)
YEELVRMV	4637	BM15 (A*0101, B*4901)
YEERVQAVV	6711	M18 (A*2902, B*4901)
YEETRGVLKV	8294	BM15 (A*0101, B*4901)
YEITEQRKI	6128	CCA136_T (A*01, A*30, B*37, B*49)
YEMEVSQRL	83752	BM15 (A*0101, B*4901)
YENPVVSR	5033	BM15 (A*0101, B*4901)
YETPTGIKV	58485	BM15 (A*0101, B*4901)
YEYDRKWGI	4065	BM15 (A*0101, B*4901)

HLA-B*50		
AELRHVMTNL	801	RCC399_T (A*01, A*02, B*08, B*50)
AEWVIKSKP	93663	RCC263_T (A*02, B*15, B*50)
KEAPPMEKPP	6209	RCC399_T (A*01, A*02, B*08, B*50)
KEFPGFLEN	6281	RCC399_M (A*01, A*02, B*08, B*50)
QEISHLIEP	7094	RCC263_T (A*02, B*15, B*50)
REHAPFLVA	57104	RCC068_T (A*02, A*29, B*1501, B*4501)
REHPLWQAA	54863	RCC399_T (A*01, A*02, B*08, B*50)
REIVHLQA	10382	RCC399_T (A*01, A*02, B*08, B*50)
VEVPETPKA	10916	RCC263_T (A*02, B*15, B*50)

HLA-B*5001		
AEAAVVAVA	280636	LCL026_ZL (A*0201, A*3301, B*4101, B*5101)
AEVDAAMAA	3181	RCC190_T (A*02, A*23, B*2707, B*5001)
FEQEMATAA	60	RCC190_T (A*02, A*23, B*2707, B*5001)
GEFGGFSV	5928	RCC190_T (A*02, A*23, B*2707, B*5001)
HEYPWILSA	1314	RCC190_T (A*02, A*23, B*2707, B*5001)
IESRTLAI	123	RCC190_T (A*02, A*23, B*2707, B*5001)
LEYEDHKSA	10236	RCC190_T (A*02, A*23, B*2707, B*5001)
TEVSKTPEA	10916	RCC190_T (A*02, A*23, B*2707, B*5001)
VEEEPRPAA	2037	RCC190_T (A*02, A*23, B*2707, B*5001)

unbekannter Allotyp des HLA-B44-Supertyps		
DEINFLRAL	3853	CCA060_T (A*24, B*18, B*44)
DEINFLRALY	3853	CCA060_T (A*24, B*18, B*44)
DERTFHIFY	4628	RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)
EEIAFLKKL	7431	Awells (A*0201, B*4402)
EEIKEILRF	6519	RCC119_T (A*02, A*24, B*07, B44-Supertyp)

Sequenz	GeneID	Source(n)
EEIREAFRVF	801	Awells (A*0201, B*4402)
EEVKLIKMK	2512	RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)
IETIINTF	6280	RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)
LEGLTVVY	22818	RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)
NELPTVAF	54552	RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)
NENSLFKSL	1213	RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)
NEQDLGIQY	1495	RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)
SEAGSHTLQW	3106	RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)
SEVKFTVTF	3957	RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)
VESPLSVSF	64777	RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)
VEVLLNYAY	10625	RCC001_T (A*02, A*68, B*18, B*44)
VEYRIKISF	396	CCA060_T (A*24, B*18, B*44)

A.15. Halbwertszeiten von Quellproteinen

Symbol/ Name	GeneID	Peptide	Referenz
Klasse 1			
AMD1	262	0	
FOS	2353	0	
IRF7	3665	0	Prakash und Levy (2006)
MYCN (N-myc)	4613	0	Cohn et al. (1990)
MYOD1	4654	0	Reynaud et al. (2000)
MAPK4 (ERK3)	5596	0	Coulombe et al. (2003)
MYC	4609	1	
Sgk1	6446	1	Arteaga et al. (2006)
TP53	7157	1	
CIITA	4261	2	Schnappauf et al. (2003)
ODC1	4953	2	
CCND1	595	4	
Klasse 2			
ADRA2C	152	0	Cayla et al. (1999)
AKT1	207	0	Arteaga et al. (2006)
BCL2	596	0	
G6PD	2539	0	
GCK	2645	0	
GGT1	2678	0	
BRF1	2972	0	
HMGCR	3156	0	
INSR	3643	0	
IRF3	3661	0	Prakash und Levy (2006)
MRE11A	4361	0	Xu et al. (2004)
PCK1	5105	0	
PTGS2 (COX-2)	5743	0	
RAF1	5894	0	Xu et al. (2003)
SLC2A1 (GLUT1)	6513	0	

A.15. Halbwertszeiten von Quellproteinen

Symbol/ Name	GeneID	Peptide	Referenz
SLC2A3 (GLUT3)	6515	0	
SLC10A2	6555	0	Xia et al. (2004)
TAT	6898	0	
TDO2	6999	0	
TK1	7083	0	
Sgk2	10110	0	Arteaga et al. (2006)
IL24 (MDA-7)	11009	0	Oida et al. (2005)
p185erbB2		0	Xu et al. (2003)
CAD	790	1	
CENPE	1062	1	
NQO1	1728	1	Siegel et al. (2001)
NR3C1	2908	1	
IRF7	3665	1	Prakash und Levy (2006)
MCL1	4170	2	
SDS	10993	2	
HSPA1A	3303	3	
"polymerase (RNA) I polypeptide"		3	
Klasse 3			
ARG2	384	0	
ATP2A3	489	0	
CTSB	1508	0	
DPP4	1803	0	
FH	2271	0	
GPT	2875	0	
MAOA	4128	0	
OAT	4942	0	
RAF1	5894	0	Schumacher et al. (1998)
Rab9	9367	0	Ganley und Pfeffer (2006)
calpains		0	
GAPDH	2597	1	
IRF3	3661	1	Prakash und Levy (2006)
CAT	847	2	
PKM2	5315	2	
"protein disulfide isomerase"		3	
ALDOA	226	10	
"tubulin"		12	
äctins"		19	
"proteasome"		31	
Klasse 4			
ARSA	410	0	
CPS1	1373	0	
CTSD	1509	0	
LOC341651	341651	0	
"troponin"		0	
CAD	790	1	

A. Anhang

Symbol/ Name	GeneID	Peptide	Referenz
GUSB	2990	1	
"cytochrome b"		3	
"tropomyosin"		3	
"hemoglobin"		8	
"histone"		24	
"myosin"		31	

Ist keine Referenz angegeben, stammen die Informationen zur HWZ aus Bohley (1996).

Die in Anführungszeichen aufgeführten Begriffe wurden anstelle einzelner *GeneIDs* zur Suche in der internen Datenbank verwendet.

B. Literaturverzeichnis

- A. L. Ackerman and P. Cresswell. Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nat. Immunol.*, 5(7):678–684, 2004.
- N. L. Anderson and N. G. Anderson. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics*, 1(11):845–867, 2002.
- M. F. Arteaga, L. Wang, T. Ravid, M. Hochstrasser, and C. M. Canessa. An amphipathic helix targets serum and glucocorticoid-induced kinase 1 to the endoplasmic reticulum-associated ubiquitin-conjugation machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103(30):11178–11183, 2006.
- M. Asaka, T. Kimura, T. Meguro, M. Kato, M. Kudo, T. Miyazaki, and E. Alpert. Alteration of aldolase isozymes in serum and tissues of patients with cancer and other diseases. *J. Clin. Lab Anal.*, 8(3):144–148, 1994.
- C. J. Barnstable, W. F. Bodmer, G. Brown, G. Galfre, C. Milstein, A. F. Williams, and A. Ziegler. Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens—new tools for genetic analysis. *Cell*, 14(1):9–20, 1978.
- D. Barouch, T. Friede, S. Stevanovic, L. Tussey, K. Smith, S. Rowland-Jones, V. Braud, A. McMichael, and H. G. Rammensee. HLA-A2 subtypes are functionally distinct in peptide binding and presentation. *J. Exp. Med.*, 182(6):1847–1856, 1995.
- A. E. Berger, J. E. Davis, and P. Cresswell. Monoclonal antibody to HLA-A3. *Hybridoma*, 1(2):87–90, 1982.
- C. R. Berkers, M. Verdoes, E. Lichtman, E. Fiebiger, B. M. Kessler, K. C. Anderson, H. L. Ploegh, H. Ovaa, and P. J. Galardy. Activity probe for in vivo profiling of the specificity of proteasome inhibitor bortezomib. *Nat. Methods*, 2(5):357–362, 2005.
- P. J. Bjorkman, M. A. Saper, B. Samraoui, W. S. Bennett, J. L. Strominger, and D. C. Wiley. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*, 329(6139):506–512, 1987.
- J. A. Bluestone, S. Jameson, S. Miller, and R. Dick. Peptide-induced conformational changes in class I heavy chains alter major histocompatibility complex recognition. *J. Exp. Med.*, 176(6):1757–1761, 1992.
- W. M. Bodnar, R. K. Blackburn, J. M. Krise, and M. A. Moseley. Exploiting the complementary nature of LC/MALDI/MS/MS and LC/ESI/MS/MS for increased proteome coverage. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 14(9):971–979, 2003.

- P. Bohley. Surface hydrophobicity and intracellular degradation of proteins. *Biol. Chem.*, 377(7-8):425–435, 1996.
- F. Boisgerault, I. Khalil, V. Tieng, F. Connan, T. Tabary, J. H. Cohen, J. Choppin, D. Charron, and A. Toubert. Definition of the HLA-A29 peptide ligand motif allows prediction of potential T-cell epitopes from the retinal soluble antigen, a candidate autoantigen in birdshot retinopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93(8):3466–3470, 1996.
- M. Bouvier and D. C. Wiley. Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of MHC class I molecules. *Science*, 265(5170):398–402, 1994.
- J. Bubenik. MHC class I down-regulation: tumour escape from immune surveillance? (review). *Int. J. Oncol.*, 25(2):487–491, 2004.
- S. Buchsbaum, E. Barnea, L. Dassau, I. Beer, E. Milner, and A. Admon. Large-scale analysis of HLA peptides presented by HLA-Cw4. *Immunogenetics*, 55(3):172–176, 2003.
- S. R. Burrows, R. A. Elkington, J. J. Miles, K. J. Green, S. Walker, S. M. Haryana, D. J. Moss, H. Dunckley, J. M. Burrows, and R. Khanna. Promiscuous CTL recognition of viral epitopes on multiple human leukocyte antigens: biological validation of the proposed HLA A24 supertype. *J. Immunol.*, 171(3):1407–1412, 2003.
- J. C. L. Slingluff, G. Yamshchikov, P. Neese, H. Galavotti, S. Eastham, V. H. Engelhard, D. Kittlesen, D. Deacon, S. Hibbitts, W. W. Grosh, G. Petroni, R. Cohen, C. Wiernasz, J. W. Patterson, B. P. Conway, and W. G. Ross. Phase I trial of a melanoma vaccine with gp100(280-288) peptide and tetanus helper peptide in adjuvant: immunologic and clinical outcomes. *Clin. Cancer Res.*, 7(10):3012–3024, 2001.
- J. C. L. Slingluff, G. R. Petroni, G. V. Yamshchikov, D. L. Barnd, S. Eastham, H. Galavotti, J. W. Patterson, D. H. Deacon, S. Hibbitts, D. Teates, P. Y. Neese, W. W. Grosh, K. A. Chianese-Bullock, E. M. Woodson, C. J. Wiernasz, P. Merrill, J. Gibson, M. Ross, and V. H. Engelhard. Clinical and immunologic results of a randomized phase II trial of vaccination using four melanoma peptides either administered in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in adjuvant or pulsed on dendritic cells. *J. Clin. Oncol.*, 21(21):4016–4026, 2003.
- K. Cao, J. Hollenbach, X. Shi, W. Shi, M. Chopek, and M. A. Fernandez-Vina. Analysis of the frequencies of HLA-A, B, and C alleles and haplotypes in the five major ethnic groups of the United States reveals high levels of diversity in these loci and contrasting distribution patterns in these populations. *Hum. Immunol.*, 62(9): 1009–1030, 2001.
- P. Carninci, T. Kasukawa, S. Katayama, J. Gough, M. C. Frith, N. Maeda, R. Oyama, T. Ravasi, B. Lenhard, C. Wells, R. Kodzius, K. Shimokawa, V. B. Bajic, S. E. Brenner, S. Batalov, A. R. Forrest, M. Zavolan, M. J. Davis, L. G. Wilming, and

- V. A. et. al. The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science*, 309 (5740):1559–1563, 2005.
- P. Cascio, C. Hilton, A. F. Kisselev, K. L. Rock, and A. L. Goldberg. 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. *EMBO J.*, 20(10):2357–2366, 2001.
- C. Cayla, S. Schaak, C. Roquelaine, C. Gales, F. Quinchon, and H. Paris. Homologous regulation of the alpha2C-adrenoceptor subtype in human hepatocarcinoma, HepG2. *Br. J. Pharmacol.*, 126(1):69–78, 1999.
- E. Celis, J. Fikes, P. Wentworth, J. Sidney, S. Southwood, A. Maewal, M. F. del Guercio, A. Sette, and B. Livingston. Identification of potential CTL epitopes of tumor-associated antigen MAGE-1 for five common HLA-A alleles. *Mol. Immunol.*, 31(18):1423–1430, 1994.
- G. Chelvanayagam. A roadmap for HLA-A, HLA-B, and HLA-C peptide binding specificities. *Immunogenetics*, 45(1):15–26, 1996.
- H. S. Chen, T. Rejtar, V. Andreev, E. Moskovets, and B. L. Karger. Enhanced characterization of complex proteomic samples using LC-MALDI MS/MS: exclusion of redundant peptides from MS/MS analysis in replicate runs. *Anal. Chem.*, 77(23): 7816–7825, 2005.
- Y. Chen, D. J. Riley, P. L. Chen, and W. H. Lee. HEC, a novel nuclear protein rich in leucine heptad repeats specifically involved in mitosis. *Mol. Cell Biol.*, 17(10): 6049–6056, 1997.
- W. C. Cho and C. H. Cheng. Oncoproteomics: current trends and future perspectives. *Expert. Rev. Proteomics*, 4(3):401–410, 2007.
- S. Cloosen, J. Arnold, M. Thio, G. M. Bos, B. Kyewski, and W. T. Germeraad. Expression of tumor-associated differentiation antigens, MUC1 glycoforms and CEA, in human thymic epithelial cells: implications for self-tolerance and tumor therapy. *Cancer Res.*, 67(8):3919–3926, 2007.
- S. L. Cohn, H. Salwen, M. W. Quasney, N. Ikegaki, J. M. Cowan, C. V. Herst, R. H. Kennett, S. T. Rosen, J. A. DiGiuseppe, and G. M. Brodeur. Prolonged N-myc protein half-life in a neuroblastoma cell line lacking N-myc amplification. *Oncogene*, 5(12):1821–1827, 1990.
- G. L. Corthals, V. C. Wasinger, D. F. Hochstrasser, and J. C. Sanchez. The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research. *Electrophoresis*, 21 (6):1104–1115, 2000.
- P. Coulombe, G. Rodier, S. Pelletier, J. Pellerin, and S. Meloche. Rapid turnover of extracellular signal-regulated kinase 3 by the ubiquitin-proteasome pathway defines a novel paradigm of mitogen-activated protein kinase regulation during cellular differentiation. *Mol Cell Biol.*, 23(13):4542–4558, 2003.

- B. Dahlmann, T. Ruppert, L. Kuehn, S. Merforth, and P. M. Kloetzel. Different proteasome subtypes in a single tissue exhibit different enzymatic properties. *J. Mol. Biol.*, 303(5):643–653, 2000.
- M. P. Davenport, K. J. Smith, D. Barouch, S. W. Reid, W. M. Bodnar, A. C. Willis, D. F. Hunt, and A. V. Hill. HLA class I binding motifs derived from random peptide libraries differ at the COOH terminus from those of eluted peptides. *J. Exp. Med.*, 185(2):367–371, 1997.
- A. de Jong. Contribution of mass spectrometry to contemporary immunology. *Mass Spectrom. Rev.*, 17(5):311–335, 1998.
- J. F. de la Mora, G. J. V. Berkel, C. G. Enke, R. B. Cole, M. Martinez-Sanchez, and J. B. Fenn. Electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 35(8):939–952, 2000.
- M. F. del Guercio, J. Sidney, G. Hermanson, C. Perez, H. M. Grey, R. T. Kubo, and A. Sette. Binding of a peptide antigen to multiple HLA alleles allows definition of an A2-like supertype. *J. Immunol.*, 154(2):685–693, 1995.
- J. Dengjel, P. Decker, O. Schoor, F. Altenberend, T. Weinschenk, H. G. Rammensee, and S. Stevanovic. Identification of a naturally processed cyclin D1 T-helper epitope by a novel combination of HLA class II targeting and differential mass spectrometry. *Eur. J. Immunol.*, 34(12):3644–3651, 2004.
- J. Dengjel, O. Schoor, R. Fischer, M. Reich, M. Kraus, M. Müller, K. Kreymborg, F. Altenberend, J. Brandenburg, H. Kalbacher, R. Brock, C. Driessen, H. G. Rammensee, and S. Stevanovic. Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102(22):7922–7927, 2005.
- J. Derbinski, A. Schulte, B. Kyewski, and L. Klein. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat. Immunol.*, 2(11):1032–1039, 2001.
- J. Derbinski, S. Pinto, S. Rosch, K. Hexel, and B. Kyewski. Promiscuous gene expression patterns in single medullary thymic epithelial cells argue for a stochastic mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105(2):657–662, 2008.
- M. DiBrino, K. C. Parker, J. Shiloach, M. Knierman, J. Lukszo, R. V. Turner, W. E. Biddison, and J. E. Coligan. Endogenous peptides bound to HLA-A3 possess a specific combination of anchor residues that permit identification of potential antigenic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90(4):1508–1512, 1993.
- M. DiBrino, K. C. Parker, D. H. Margulies, J. Shiloach, R. V. Turner, W. E. Biddison, and J. E. Coligan. Identification of the peptide binding motif for HLA-B44, one of the most common HLA-B alleles in the Caucasian population. *Biochemistry*, 34(32):10130–10138, 1995.

- T. P. Dick, T. Ruppert, M. Groettrup, P. M. Kloetzel, L. Kuehn, U. H. Koszinowski, S. Stevanovic, H. Schild, and H. G. Rammensee. Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands. *Cell*, 86(2):253–262, 1996.
- C. Diveu, E. Venereau, J. Froger, E. Ravon, L. Grimaud, F. Rousseau, S. Chevalier, and H. Gascan. Molecular and functional characterization of a soluble form of oncostatin M/interleukin-31 shared receptor. *J. Biol. Chem.*, 281(48):36673–36682, 2006.
- B. Domon and R. Aebersold. Mass spectrometry and protein analysis. *Science*, 312(5771):212–217, 2006.
- A. R. Dongre, S. Kovats, P. deRoos, A. L. McCormack, T. Nakagawa, V. Paharkova-Vatchkova, J. Eng, H. Caldwell, I. J. R. Yates, and A. Y. Rudensky. In vivo MHC class II presentation of cytosolic proteins revealed by rapid automated tandem mass spectrometry and functional analyses. *Eur. J. Immunol.*, 31(5):1485–1494, 2001.
- I. A. Doytchinova, P. Guan, and D. R. Flower. Identifying human MHC supertypes using bioinformatic methods. *J. Immunol.*, 172(7):4314–4323, 2004.
- M. E. Dudley, J. R. Wunderlich, J. C. Yang, R. M. Sherry, S. L. Topalian, N. P. Restifo, R. E. Royal, U. Kammula, D. E. White, S. A. Mavroukakis, L. J. Rogers, G. J. Gracia, S. A. Jones, D. P. Manganelli, M. M. Pelletier, J. Gea-Banacloche, M. R. Robinson, D. M. Berman, A. C. Filie, A. Abati, and S. A. Rosenberg. Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.*, 23(10):2346–2357, 2005.
- T. Dumrese, S. Stevanovic, F. H. Seeger, N. Yamada, Y. Ishikawa, K. Tokunaga, M. Takiguchi, and H. Rammensee. HLA-A26 subtype A pockets accommodate acidic N-termini of ligands. *Immunogenetics*, 48(5):350–353, 1998.
- P. Edman and G. Begg. A protein sequenator. *Eur. J. Biochem.*, 1(1):80–91, 1967.
- B. Ehring, T. H. Meyer, C. Eckerskorn, F. Lottspeich, and R. Tampe. Effects of major-histocompatibility-complex-encoded subunits on the peptidase and proteolytic activities of human 20S proteasomes. Cleavage of proteins and antigenic peptides. *Eur. J. Biochem.*, 235(1-2):404–415, 1996.
- D. I. Ellis, S. O’Hagan, W. B. Dunn, M. Brown, and S. Vaidyanathan. From genomes to systems. *Genome Biol.*, 5(11):354, 2004.
- V. H. Engelhard, J. L. Strominger, M. Mescher, and S. Burakoff. Induction of secondary cytotoxic T lymphocytes by purified HLA-A and HLA-B antigens reconstituted into phospholipid vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 75(11):5688–5691, 1978.

- V. H. Engelhard, M. Altrich-Vanlith, M. Ostankovitch, and A. L. Zarlring. Post-translational modifications of naturally processed MHC-binding epitopes. *Curr. Opin. Immunol.*, 18(1):92–97, 2006.
- K. Falk, O. Rötzschke, K. Deres, J. Metzger, G. Jung, and H. G. Rammensee. Identification of naturally processed viral nonapeptides allows their quantification in infected cells and suggests an allele-specific T cell epitope forecast. *J. Exp. Med.*, 174(2):425–434, 1991a.
- K. Falk, O. Rötzschke, S. Stevanovic, G. Jung, and H. G. Rammensee. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*, 351(6324):290–296, 1991b.
- K. Falk, O. Rötzschke, B. Grahovac, D. Schendel, S. Stevanovic, G. Jung, and H. G. Rammensee. Peptide motifs of HLA-B35 and -B37 molecules. *Immunogenetics*, 38(2):161–162, 1993.
- K. Falk, O. Rötzschke, M. Takiguchi, V. Gnau, S. Stevanovic, G. Jung, and H. G. Rammensee. Peptide motifs of HLA-B58, B60, B61, and B62 molecules. *Immunogenetics*, 41(2-3):165–168, 1995a.
- K. Falk, O. Rötzschke, M. Takiguchi, V. Gnau, S. Stevanovic, G. Jung, and H. G. Rammensee. Peptide motifs of HLA-B38 and B39 molecules. *Immunogenetics*, 41(2-3):162–164, 1995b.
- K. Fleischhauer, D. Avila, F. Vilbois, C. Traversari, C. Bordignon, and H. J. Wallny. Characterization of natural peptide ligands for HLA-B*4402 and -B*4403: implications for peptide involvement in allorecognition of a single amino acid change in the HLA-B44 heavy chain. *Tissue Antigens*, 44(5):311–317, 1994.
- S. Fong, C. D. Tsoukas, J. L. Pasquali, R. I. Fox, J. E. Rose, D. Raiklen, D. A. Carson, and J. H. Vaughan. Fractionation of human lymphocyte subpopulations on immunoglobulin coated Petri dishes. *J. Immunol. Methods*, 44(2):171–182, 1981.
- I. G. Ganley and S. R. Pfeffer. Cholesterol accumulation sequesters Rab9 and disrupts late endosome function in NPC1-deficient cells. *J. Biol. Chem.*, 281(26):17890–17899, 2006.
- G. V. Glinsky, O. Berezovska, and A. B. Glinskii. Microarray analysis identifies a death-from-cancer signature predicting therapy failure in patients with multiple types of cancer. *J. Clin. Invest*, 115(6):1503–1521, 2005.
- J. Gotter, B. Brors, M. Hergenbahn, and B. Kyewski. Medullary epithelial cells of the human thymus express a highly diverse selection of tissue-specific genes colocalized in chromosomal clusters. *J. Exp. Med.*, 199(2):155–166, 2004.
- T. A. Groothuis, A. C. Griekspoor, J. J. Neijssen, C. A. Herberts, and J. J. Neefjes. MHC class I alleles and their exploration of the antigen-processing machinery. *Immunol. Rev.*, 207:60–76, 2005.

- B. D. W. Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 69(3):89–95, 2001.
- P. Guermonprez and S. Amigorena. Pathways for antigen cross presentation. *Springer Semin. Immunopathol.*, 26(3):257–271, 2005.
- I. C. Guerrero and O. Kleiner. Application of mass spectrometry in proteomics. *Biosci. Rep.*, 25(1-2):71–93, 2005.
- E. N. Gurzov and M. Izquierdo. RNA interference against Hec1 inhibits tumor growth in vivo. *Gene Ther.*, 13(1):1–7, 2006.
- S. P. Gygi, B. Rist, S. A. Gerber, F. Turecek, M. H. Gelb, and R. Aebersold. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat. Biotechnol.*, 17(10):994–999, 1999.
- S. P. Gygi, G. L. Corthals, Y. Zhang, Y. Rochon, and R. Aebersold. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97(17):9390–9395, 2000.
- S. P. Gygi, B. Rist, T. J. Griffin, J. Eng, and R. Aebersold. Proteome analysis of low-abundance proteins using multidimensional chromatography and isotope-coded affinity tags. *J. Proteome. Res.*, 1(1):47–54, 2002.
- T. Hanke, H. Takizawa, C. W. McMahon, D. H. Busch, E. G. Pamer, J. D. Miller, J. D. Altman, Y. Liu, D. Cado, F. A. Lemonnier, P. J. Bjorkman, and D. H. Raulet. Direct assessment of MHC class I binding by seven Ly49 inhibitory NK cell receptors. *Immunity.*, 11(1):67–77, 1999.
- P. Hansasuta, T. Dong, H. Thananchai, M. Weekes, C. Willberg, H. Aldemir, S. Rowland-Jones, and V. M. Braud. Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific. *Eur. J. Immunol.*, 34(6):1673–1679, 2004.
- P. E. Harris, F. Lupu, B. Hong, E. F. Reed, and N. Suciuc-Foca. Differentiation-stage specific self-peptides bound by major histocompatibility complex class I molecules. *J. Exp. Med.*, 177(3):783–790, 1993.
- P. M. Harrison, A. Kumar, N. Lang, M. Snyder, and M. Gerstein. A question of size: the eukaryotic proteome and the problems in defining it. *Nucleic Acids Res.*, 30(5):1083–1090, 2002.
- J. S. Haurum, G. Arsequell, A. C. Lellouch, S. Y. Wong, R. A. Dwek, A. J. McMichael, and T. Elliott. Recognition of carbohydrate by major histocompatibility complex class I-restricted, glycopeptide-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 180(2):739–744, 1994.
- S. Hayama, Y. Daigo, T. Kato, N. Ishikawa, T. Yamabuki, M. Miyamoto, T. Ito, E. Tsuchiya, S. Kondo, and Y. Nakamura. Activation of CDCA1-KNTC2, members of centromere protein complex, involved in pulmonary carcinogenesis. *Cancer Res.*, 66(21):10339–10348, 2006.

B. Literaturverzeichnis

- J. Herman, V. Jongeneel, D. Kuznetsov, and P. G. Coulie. Differences in the recognition by CTL of peptides presented by the HLA-B*4402 and the HLA-B*4403 molecules which differ by a single amino acid. *Tissue Antigens*, 53(2):111–121, 1999.
- H. D. Hickman, A. D. Luis, W. Bardet, R. Buchli, C. L. Battson, M. H. Shearer, K. W. Jackson, R. C. Kennedy, and W. H. Hildebrand. Cutting edge: class I presentation of host peptides following HIV infection. *J. Immunol.*, 171(1):22–26, 2003.
- H. D. Hickman, A. D. Luis, R. Buchli, S. R. Few, M. Sathiamurthy, R. S. VanGundy, C. F. Giberson, and W. H. Hildebrand. Toward a definition of self: proteomic evaluation of the class I peptide repertoire. *J. Immunol.*, 172(5):2944–2952, 2004.
- N. Hillen. *Charakterisierung und Quantifizierung HLA-A*0201-präsentierter Peptide*. Diplomarbeit, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Interfakultäres Institut für Zellbiologie/ Abteilung Immunologie, Dezember 2004.
- N. Hillen and S. Stevanovic. Contribution of mass spectrometry-based proteomics to immunology. *Expert. Rev. Proteomics*, 3(6):653–664, 2006.
- S. Hofmann, M. Gluckmann, S. Kausche, A. Schmidt, C. Corvey, R. Lichtenfels, C. Huber, C. Albrecht, M. Karas, and W. Herr. Rapid and sensitive identification of major histocompatibility complex class I-associated tumor peptides by Nano-LC MALDI MS/MS. *Mol. Cell Proteomics.*, 4(12):1888–1897, 2005.
- K. T. Hogan, D. P. Eisinger, I. S. B. Cupp, K. J. Lekstrom, D. D. Deacon, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, V. H. Engelhard, J. C. L. Slingluff, and M. M. Ross. The peptide recognized by HLA-A68.2-restricted, squamous cell carcinoma of the lung-specific cytotoxic T lymphocytes is derived from a mutated elongation factor 2 gene. *Cancer Res.*, 58(22):5144–5150, 1998.
- K. T. Hogan, J. N. Sutton, K. U. Chu, J. A. Busby, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, and J. C. L. Slingluff. Use of selected reaction monitoring mass spectrometry for the detection of specific MHC class I peptide antigens on A3 supertype family members. *Cancer Immunol. Immunother.*, 54(4):359–371, 2005.
- S. Hu, J. A. Loo, and D. T. Wong. Human body fluid proteome analysis. *Proteomics*, 6(23):6326–6353, 2006.
- D. F. Hunt, I. J. R. Yates, J. Shabanowitz, S. Winston, and C. R. Hauer. Protein sequencing by tandem mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 83(17):6233–6237, 1986.
- D. F. Hunt, R. A. Henderson, J. Shabanowitz, K. Sakaguchi, H. Michel, N. Sevilir, A. L. Cox, E. Appella, and V. H. Engelhard. Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. *Science*, 255(5049):1261–1263, 1992.

- I. Idler. *Untersuchungen zur zellulären und humoralen Immunantwort gegen das Merozoitenoberflächenprotein-1 des Malariaerregers Plasmodium falciparum*. Doktorarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Zentrum für Molekulare Biologie, November 2004.
- L. J. Jensen, J. Saric, and P. Bork. Literature mining for the biologist: from information retrieval to biological discovery. *Nat. Rev. Genet.*, 7(2):119–129, 2006.
- C. V. Jongeneel, C. Iseli, B. J. Stevenson, G. J. Riggins, A. Lal, A. Mackay, R. A. Harris, M. J. O’Hare, A. M. Neville, A. J. Simpson, and R. L. Strausberg. Comprehensive sampling of gene expression in human cell lines with massively parallel signature sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100(8):4702–4705, 2003.
- T. Kanaseki, N. Blanchard, G. E. Hammer, F. Gonzalez, and N. Shastri. ERAAP synergizes with MHC class I molecules to make the final cut in the antigenic peptide precursors in the endoplasmic reticulum. *Immunity.*, 25(5):795–806, 2006.
- I. B. Kastrup, S. Stevanovic, G. Arsequell, G. Valencia, J. Zeuthen, H. G. Rammensee, T. Elliott, and J. S. Haurum. Lectin purified human class I MHC-derived peptides: evidence for presentation of glycopeptides in vivo. *Tissue Antigens*, 56(2):129–135, 2000.
- Y. Kawakami, P. F. Robbins, and S. A. Rosenberg. Human melanoma antigens recognized by T lymphocytes. *Keio J. Med.*, 45(2):100–108, 1996.
- I. Kawashima, V. Tsai, S. Southwood, K. Takesako, E. Celis, and A. Sette. Identification of gp100-derived, melanoma-specific cytotoxic T-lymphocyte epitopes restricted by HLA-A3 supertype molecules by primary in vitro immunization with peptide-pulsed dendritic cells. *Int. J. Cancer*, 78(4):518–524, 1998.
- Y. Kawashima, M. Satoh, S. Oka, and M. Takiguchi. Identification and characterization of HIV-1 epitopes presented by HLA-A*2603: comparison between HIV-1 epitopes presented by A*2601 and A*2603. *Hum. Immunol.*, 66(11):1155–1166, 2005.
- Y. Kawashima, M. Satoh, S. Oka, T. Shirasaka, and M. Takiguchi. Different immunodominance of HIV-1-specific CTL epitopes among three subtypes of HLA-A*26 associated with slow progression to AIDS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 366(3):612–616, 2008.
- J. H. Kessler and C. J. Melief. Identification of T-cell epitopes for cancer immunotherapy. *Leukemia*, 21(9):1859–1874, 2007.
- M. Kinter and N. E. Sherman. Collisionally induced dissociation of protonated peptide ions and the interpretation of product ion spectra. In *Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry*, Wiley-Interscience series on mass spectrometry, book chapter 4, pages 64–116. Wiley, 2000.

- A. F. Kisselev, T. N. Akopian, and A. L. Goldberg. Range of sizes of peptide products generated during degradation of different proteins by archaeal proteasomes. *J. Biol. Chem.*, 273(4):1982–1989, 1998.
- D. M. Koelle, H. B. Chen, M. A. Gavin, A. Wald, W. W. Kwok, and L. Corey. CD8 CTL from genital herpes simplex lesions: recognition of viral tegument and immediate early proteins and lysis of infected cutaneous cells. *J. Immunol.*, 166(6): 4049–4058, 2001.
- M. Koga, S. Shichijo, A. Yamada, J. Ashihara, H. Sawamizu, J. Kusukawa, and K. Itoh. Identification of ribosomal proteins S2 and L10a as tumor antigens recognized by HLA-A26-restricted CTL. *Tissue Antigens*, 61(2):136–145, 2003.
- W. Kolch, C. Neususs, M. Pelzing, and H. Mischak. Capillary electrophoresis-mass spectrometry as a powerful tool in clinical diagnosis and biomarker discovery. *Mass Spectrom. Rev.*, 24(6):959–977, 2005.
- J. O. Koopmann, J. Albring, E. Huter, N. Bulbuc, P. Spee, J. Neefjes, G. J. Hammerling, and F. Momburg. Export of antigenic peptides from the endoplasmic reticulum intersects with retrograde protein translocation through the Sec61p channel. *Immunity.*, 13(1):117–127, 2000.
- P. Krausa, I. M. Brywka, D. Savage, K. M. Hui, M. Bunce, J. L. Ngai, D. L. Teo, Y. W. Ong, D. Barouch, C. E. Allsop, and . Genetic polymorphism within HLA-A*02: significant allelic variation revealed in different populations. *Tissue Antigens*, 45 (4):223–231, 1995.
- T. Krüger, O. Schoor, C. Lemmel, B. Kraemer, C. Reichle, J. Dengjel, T. Weinschenk, M. Müller, J. Hennenlotter, A. Stenzl, H. G. Rammensee, and S. Stevanovic. Lessons to be learned from primary renal cell carcinomas: novel tumor antigens and HLA ligands for immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.*, 54(9):826–836, 2005.
- B. Küster, M. Schirle, P. Mallick, and R. Aebersold. Scoring proteomes with proteotypic peptide probes. *Nat. Rev. Mol Cell Biol.*, 6(7):577–583, 2005.
- R. T. Kubo, A. Sette, H. M. Grey, E. Appella, K. Sakaguchi, N. Z. Zhu, D. Arnott, N. Sherman, J. Shabanowitz, H. Michel, and . Definition of specific peptide motifs for four major HLA-A alleles. *J. Immunol.*, 152(8):3913–3924, 1994.
- J. Kunisawa and N. Shastri. The group II chaperonin TRiC protects proteolytic intermediates from degradation in the MHC class I antigen processing pathway. *Mol. Cell*, 12(3):565–576, 2003.
- A. Lacreusette, J. M. Nguyen, M. C. Pandolfino, A. Khammari, B. Dreno, Y. Jacques, A. Godard, and F. Blanchard. Loss of oncostatin M receptor beta in metastatic melanoma cells. *Oncogene*, 26(6):881–892, 2007.

- K. J. Lavender and K. P. Kane. Cross-species dependence of Ly49 recognition on the supertype defining B-pocket of a class I MHC molecule. *J. Immunol.*, 177(12):8578–8586, 2006.
- P. J. Lehner and P. Cresswell. Recent developments in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.*, 16(1):82–89, 2004.
- C. Lemmel and S. Stevanovic. The use of HPLC-MS in T-cell epitope identification. *Methods*, 29(3):248–259, 2003.
- C. Lemmel, S. Weik, U. Eberle, J. Dengjel, T. Kratt, H. D. Becker, H. G. Rammensee, and S. Stevanovic. Differential quantitative analysis of MHC ligands by mass spectrometry using stable isotope labeling. *Nat. Biotechnol.*, 22(4):450–454, 2004.
- P. Lescuyer, D. Hochstrasser, and T. Rabilloud. How shall we use the proteomics toolbox for biomarker discovery? *J. Proteome. Res.*, 6(9):3371–3376, 2007.
- V. Levitsky, D. Liu, S. Southwood, J. Levitskaya, A. Sette, and M. G. Masucci. Supermotif peptide binding and degeneracy of MHC: peptide recognition in an EBV peptide-specific CTL response with highly restricted TCR usage. *Hum. Immunol.*, 61(10):972–984, 2000.
- B. N. Lilley and H. L. Ploegh. Viral modulation of antigen presentation: manipulation of cellular targets in the ER and beyond. *Immunol. Rev.*, 207:126–144, 2005.
- J. Liu, N. Hadjokas, B. Mosley, Z. Estrov, M. J. Spence, and R. E. Vestal. Oncostatin M-specific receptor expression and function in regulating cell proliferation of normal and malignant mammary epithelial cells. *Cytokine*, 10(4):295–302, 1998.
- C. J. Luckey, J. A. Marto, M. Partridge, E. Hall, F. M. White, J. D. Lippolis, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, and V. H. Engelhard. Differences in the expression of human class I MHC alleles and their associated peptides in the presence of proteasome inhibitors. *J. Immunol.*, 167(3):1212–1221, 2001.
- O. Lund, M. Nielsen, C. Kesmir, A. G. Petersen, C. Lundegaard, P. Worning, C. Sylvester-Hvid, K. Lamberth, G. Roder, S. Justesen, S. Buus, and S. Brunak. Definition of supertypes for HLA molecules using clustering of specificity matrices. *Immunogenetics*, 55(12):797–810, 2004.
- C. Lundegaard, O. Lund, C. Kesmir, S. Brunak, and M. Nielsen. Modeling the adaptive immune system: predictions and simulations. *Bioinformatics.*, 23(24):3265–3275, 2007.
- R. Lupetti, P. Pisarra, A. Verrecchia, C. Farina, G. Nicolini, A. Anichini, C. Bordignon, M. Sensi, G. Parmiani, and C. Traversari. Translation of a retained intron in tyrosinase-related protein (TRP) 2 mRNA generates a new cytotoxic T lymphocyte (CTL)-defined and shared human melanoma antigen not expressed in normal cells of the melanocytic lineage. *J. Exp. Med.*, 188(6):1005–1016, 1998.

- W. Macdonald, D. S. Williams, C. S. Clements, J. J. Gorman, L. Kjer-Nielsen, A. G. Brooks, J. McCluskey, J. Rossjohn, and A. W. Purcell. Identification of a dominant self-ligand bound to three HLA B44 alleles and the preliminary crystallographic analysis of recombinant forms of each complex. *FEBS Lett.*, 527(1-3):27–32, 2002.
- W. A. Macdonald, A. W. Purcell, N. A. Mifsud, L. K. Ely, D. S. Williams, L. Chang, J. J. Gorman, C. S. Clements, L. Kjer-Nielsen, D. M. Koelle, S. R. Burrows, B. D. Tait, R. Holdsworth, A. G. Brooks, G. O. Lovrecz, L. Lu, J. Rossjohn, and J. McCluskey. A naturally selected dimorphism within the HLA-B44 supertype alters class I structure, peptide repertoire, and T cell recognition. *J. Exp. Med.*, 198(5): 679–691, 2003.
- R. Maier, K. Falk, O. Röttschke, B. Maier, V. Gnau, S. Stevanovic, G. Jung, H. G. Rammensee, and A. Meyerhans. Peptide motifs of HLA-A3, -A24, and -B7 molecules as determined by pool sequencing. *Immunogenetics*, 40(4):306–308, 1994.
- P. Mallick, M. Schirle, S. S. Chen, M. R. Flory, H. Lee, D. Martin, J. Ranish, B. Raught, R. Schmitt, T. Werner, B. Kuster, and R. Aebersold. Computational prediction of proteotypic peptides for quantitative proteomics. *Nat. Biotechnol.*, 25(1):125–131, 2007.
- M. S. Malnati, M. Peruzzi, K. C. Parker, W. E. Biddison, E. Ciccone, A. Moretta, and E. O. Long. Peptide specificity in the recognition of MHC class I by natural killer cell clones. *Science*, 267(5200):1016–1018, 1995.
- O. Mandelboim, S. B. Wilson, M. Vales-Gomez, H. T. Reyburn, and J. L. Strominger. Self and viral peptides can initiate lysis by autologous natural killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94(9):4604–4609, 1997.
- M. Mann and O. N. Jensen. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat. Biotechnol.*, 21(3):255–261, 2003.
- M. Mann, R. C. Hendrickson, and A. Pandey. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu. Rev. Biochem.*, 70:437–473, 2001.
- D. H. Margulies, A. L. Ramsey, L. F. Boyd, and J. McCluskey. Genetic engineering of an H-2Dd/Q10b chimeric histocompatibility antigen: purification of soluble protein from transformant cell supernatants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 83(14):5252–5256, 1986.
- S. Martin-Lluesma, V. M. Stucke, and E. A. Nigg. Role of Hec1 in spindle checkpoint signaling and kinetochore recruitment of Mad1/Mad2. *Science*, 297(5590):2267–2270, 2002.
- E. Martinez-Naves, L. D. Barber, J. A. Madrigal, C. M. Vullo, C. Clayberger, S. C. Lyu, R. C. Williams, C. Gorodezky, T. Markow, M. L. Petzl-Erler, and P. Parham. Interactions of HLA-B*4801 with peptide and CD8. *Tissue Antigens*, 50(3):258–264, 1997.

- S. Matsueda, H. Takedatsu, A. Yao, M. Tanaka, M. Noguchi, K. Itoh, and M. Harada. Identification of peptide vaccine candidates for prostate cancer patients with HLA-A3 supertype alleles. *Clin. Cancer Res.*, 11(19 Pt 1):6933–6943, 2005.
- S. Matsueda, H. Takedatsu, T. Sasada, K. Azuma, Y. Ishihara, Y. Komohara, M. Noguchi, S. Shichijo, K. Itoh, and M. Harada. New peptide vaccine candidates for epithelial cancer patients with HLA-A3 supertype alleles. *J. Immunother. (1997.)*, 30(3):274–281, 2007.
- M. Matsumura, D. H. Fremont, P. A. Peterson, and I. A. Wilson. Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. *Science*, 257(5072):927–934, 1992.
- L. M. McKenzie, J. Pecon-Slattery, M. Carrington, and S. J. O'Brien. Taxonomic hierarchy of HLA class I allele sequences. *Genes Immun.*, 1(2):120–129, 1999.
- E. Milner, E. Barnea, I. Beer, and A. Admon. The turnover kinetics of major histocompatibility complex peptides of human cancer cells. *Mol Cell Proteomics*, 5(2):357–365, 2006.
- T. Minami, S. Matsueda, H. Takedatsu, M. Tanaka, M. Noguchi, H. Uemura, K. Itoh, and M. Harada. Identification of SART3-derived peptides having the potential to induce cancer-reactive cytotoxic T lymphocytes from prostate cancer patients with HLA-A3 supertype alleles. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2006.
- G. Missale, A. Redeker, J. Person, P. Fowler, S. Guilhot, H. J. Schlicht, C. Ferrari, and F. V. Chisari. HLA-A31- and HLA-Aw68-restricted cytotoxic T cell responses to a single hepatitis B virus nucleocapsid epitope during acute viral hepatitis. *J. Exp. Med.*, 177(3):751–762, 1993.
- M. Müller. *HLA-Ligandom- und Expressions-Analyse von Tumor- und Autophagie-assoziierten Antigenen in soliden Tumoren und Zelllinien*. Doktorarbeit, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Interfakultäres Institut für Zellbiologie/ Abteilung Immunologie, 2008.
- M. Montoya and M. D. Val. Intracellular rate-limiting steps in MHC class I antigen processing. *J. Immunol.*, 163(4):1914–1922, 1999.
- B. Mosley, C. D. Imus, D. Friend, N. Boiani, B. Thoma, L. S. Park, and D. Cosman. Dual oncostatin M (OSM) receptors. Cloning and characterization of an alternative signaling subunit conferring OSM-specific receptor activation. *J. Biol. Chem.*, 271(51):32635–32643, 1996.
- S. Murata, K. Sasaki, T. Kishimoto, S. Niwa, H. Hayashi, Y. Takahama, and K. Tanaka. Regulation of CD8+ T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science*, 316(5829):1349–1353, 2007.

- J. J. Neefjes, F. Momburg, and G. J. Hammerling. Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science*, 261(5122):769–771, 1993.
- G. Ng, D. Winder, B. Muralidhar, E. Gooding, I. Roberts, M. Pett, G. Mukherjee, J. Huang, and N. Coleman. Gain and overexpression of the oncostatin M receptor occur frequently in cervical squamous cell carcinoma and are associated with adverse clinical outcome. *J. Pathol.*, 212(3):325–334, 2007.
- F. Nimmerjahn, S. Milosevic, U. Behrends, E. M. Jaffee, D. M. Pardoll, G. W. Bornkamm, and J. Mautner. Major histocompatibility complex class II-restricted presentation of a cytosolic antigen by autophagy. *Eur. J. Immunol.*, 33(5):1250–1259, 2003.
- A. K. Nussbaum, T. P. Dick, W. Keilholz, M. Schirle, S. Stevanovic, K. Dietz, W. Heinemeyer, M. Groll, D. H. Wolf, R. Huber, H. G. Rammensee, and H. Schild. Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95(21):12504–12509, 1998.
- Y. Oida, B. Gopalan, R. Miyahara, S. Inoue, C. D. Branch, A. M. Mhashilkar, E. Lin, B. N. Bekele, J. A. Roth, S. Chada, and R. Ramesh. Sulindac enhances adenoviral vector expressing mda-7/IL-24-mediated apoptosis in human lung cancer. *Mol Cancer Ther.*, 4(2):291–304, 2005.
- P. Osterloh, K. Linkemann, S. Tenzer, H. G. Rammensee, M. P. Radsak, D. H. Busch, and H. Schild. Proteasomes shape the repertoire of T cells participating in antigen-specific immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103(13):5042–5047, 2006.
- E. G. Pamer, J. T. Harty, and M. J. Bevan. Precise prediction of a dominant class I MHC-restricted epitope of *Listeria monocytogenes*. *Nature*, 353(6347):852–855, 1991.
- P. Parham and F. M. Brodsky. Partial purification and some properties of BB7.2. A cytotoxic monoclonal antibody with specificity for HLA-A2 and a variant of HLA-A28. *Hum. Immunol.*, 3(4):277–299, 1981.
- K. C. Parker, M. A. Bednarek, and J. E. Coligan. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J. Immunol.*, 152(1):163–175, 1994.
- K. C. Parker, D. Patterson, B. Williamson, J. Marchese, A. Graber, F. He, A. Jacobson, P. Juhasz, and S. Martin. Depth of proteome issues: a yeast isotope-coded affinity tag reagent study. *Mol Cell Proteomics*, 3(7):625–659, 2004.
- S. Pascolo, M. Schirle, B. Guckel, T. Dumrese, S. Stumm, S. Kayser, A. Moris, D. Wallwiener, H. G. Rammensee, and S. Stevanovic. A MAGE-A1 HLA-A A*0201 epitope identified by mass spectrometry. *Cancer Res.*, 61(10):4072–4077, 2001.

- D. N. Perkins, D. J. Pappin, D. M. Creasy, and J. S. Cottrell. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 20(18):3551–3567, 1999.
- M. Peruzzi, K. C. Parker, E. O. Long, and M. S. Malnati. Peptide sequence requirements for the recognition of HLA-B*2705 by specific natural killer cells. *J. Immunol.*, 157(8):3350–3356, 1996.
- B. Peters, H. H. Bui, S. Frankild, M. Nielson, C. Lundegaard, E. Kostem, D. Basch, K. Lamberth, M. Harndahl, W. Fleri, S. S. Wilson, J. Sidney, O. Lund, S. Buus, and A. Sette. A community resource benchmarking predictions of peptide binding to MHC-I molecules. *PLoS. Comput. Biol.*, 2(6):e65, 2006.
- O. Planz, T. Dumrese, S. Hulpusch, M. Schirle, S. Stevanovic, and L. Stitz. A naturally processed rat major histocompatibility complex class I-associated viral peptide as target structure of borna disease virus-specific CD8+ T cells. *J. Biol. Chem.*, 276(17):13689–13694, 2001.
- A. Prakash and D. E. Levy. Regulation of IRF7 through cell type-specific protein stability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 342(1):50–56, 2006.
- K. Prilliman, M. Lindsey, Y. Zuo, K. W. Jackson, Y. Zhang, and W. Hildebrand. Large-scale production of class I bound peptides: assigning a signature to HLA-B*1501. *Immunogenetics*, 45(6):379–385, 1997.
- K. R. Prilliman, K. W. Jackson, M. Lindsey, J. Wang, D. Crawford, and W. H. Hildebrand. HLA-B15 peptide ligands are preferentially anchored at their C termini. *J. Immunol.*, 162(12):7277–7284, 1999.
- M. F. Princiotta, D. Finzi, S. B. Qian, J. Gibbs, S. Schuchmann, F. Buttgerit, J. R. Bennink, and J. W. Yewdell. Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity*, 18(3):343–354, 2003.
- A. W. Purcell, J. J. Gorman, M. Garcia-Peydro, A. Paradela, S. R. Burrows, G. H. Talbo, N. Laham, C. A. Peh, E. C. Reynolds, J. A. L. de Castro, and J. McCluskey. Quantitative and qualitative influences of tapasin on the class I peptide repertoire. *J. Immunol.*, 166(2):1016–1027, 2001.
- S. B. Qian, J. R. Bennink, and J. W. Yewdell. Quantitating defective ribosome products. *Methods Mol Biol.*, 301:271–281, 2005.
- H. Rammensee, J. Bachmann, N. P. Emmerich, O. A. Bachor, and S. Stevanovic. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics*, 50(3-4):213–219, 1999.
- H. G. Rammensee, J. Bachmann, and S. Stevanovic. *MHC Ligands and Peptide Motifs*. Molecular Biology Intelligence Unit. Landes Bioscience, Austin, Texas, U.S.A., 1 edition, 1997.

- H. G. Rammensee, T. Weinschenk, C. Gouttefangeas, and S. Stevanovic. Towards patient-specific tumor antigen selection for vaccination. *Immunol. Rev.*, 188:164–176, 2002.
- N. Rebai and B. Malissen. Structural and genetic analyses of HLA class I molecules using monoclonal xenoantibodies. *Tissue Antigens*, 22(2):107–117, 1983.
- J. Reinders, U. Lewandrowski, J. Moebius, Y. Wagner, and A. Sickmann. Challenges in mass spectrometry-based proteomics. *Proteomics*, 4(12):3686–3703, 2004.
- C. A. Reis, L. David, M. Seixas, J. Burchell, and M. Sobrinho-Simoes. Expression of fully and under-glycosylated forms of MUC1 mucin in gastric carcinoma. *Int. J. Cancer*, 79(4):402–410, 1998.
- E. Reits, A. Griekspoor, J. Neijssen, T. Groothuis, K. Jalink, P. van Veelen, H. Janssen, J. Calafat, J. W. Drijfhout, and J. Neefjes. Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I. *Immunity*, 18(1):97–108, 2003.
- E. A. Reits, J. W. Hodge, C. A. Herberts, T. A. Groothuis, M. Chakraborty, E. K. Wansley, K. Camphausen, R. M. Luiten, A. H. de Ru, J. Neijssen, A. Griekspoor, E. Mesman, F. A. Verreck, H. Spits, J. Schlom, P. van Veelen, and J. J. Neefjes. Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *J. Exp. Med.*, 203(5):1259–1271, 2006.
- E. G. Reynaud, M. P. Leibovitch, L. A. Tintignac, K. Pelpel, M. Guillier, and S. A. Leibovitch. Stabilization of MyoD by direct binding to p57(Kip2). *J. Biol. Chem.*, 275(25):18767–18776, 2000.
- O. Rötzschke, K. Falk, S. Stevanovic, G. Jung, P. Walden, and H. G. Rammensee. Exact prediction of a natural T cell epitope. *Eur. J. Immunol.*, 21(11):2891–2894, 1991.
- O. Rötzschke, K. Falk, K. Deres, H. Schild, M. Norda, J. Metzger, G. Jung, and H. G. Rammensee. Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells. *Nature*, 348(6298):252–254, 1990.
- O. Rötzschke, K. Falk, S. Stevanovic, G. Jung, and H. G. Rammensee. Peptide motifs of closely related HLA class I molecules encompass substantial differences. *Eur. J. Immunol.*, 22(9):2453–2456, 1992.
- O. Rötzschke, K. Falk, S. Stevanovic, V. Gnau, G. Jung, and H. G. Rammensee. Dominant aromatic/aliphatic C-terminal anchor in HLA-B*2702 and B*2705 peptide motifs. *Immunogenetics*, 39(1):74–77, 1994.
- J. Ruppert, J. Sidney, E. Celis, R. T. Kubo, H. M. Grey, and A. Sette. Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A2.1 molecules. *Cell*, 74(5):929–937, 1993.

- M. A. Saper, P. J. Bjorkman, and D. C. Wiley. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *J. Mol Biol.*, 219(2):277–319, 1991.
- T. M. Savarese, C. L. Campbell, C. McQuain, K. Mitchell, R. Guardiani, P. J. Quisenberry, and B. E. Nelson. Coexpression of oncostatin M and its receptors and evidence for STAT3 activation in human ovarian carcinomas. *Cytokine*, 17(6):324–334, 2002.
- E. Schiffer, H. Mischak, and J. Novak. High resolution proteome/peptidome analysis of body fluids by capillary electrophoresis coupled with MS. *Proteomics*, 6(20):5615–5627, 2006.
- R. F. Schipper, C. A. van Els, J. D’Amaro, and M. Oudshoorn. Minimal phenotype panels. A method for achieving maximum population coverage with a minimum of HLA antigens. *Hum. Immunol.*, 51(2):95–98, 1996.
- M. Schirle, W. Keilholz, B. Weber, C. Gouttefangeas, T. Dumrese, H. D. Becker, S. Stevanovic, and H. G. Rammensee. Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T cell-independent approach. *Eur. J. Immunol.*, 30(8):2216–2225, 2000.
- M. Schirle, M. A. Heurtier, and B. Kuster. Profiling core proteomes of human cell lines by one-dimensional PAGE and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Mol. Cell Proteomics.*, 2(12):1297–1305, 2003.
- F. Schnappauf, S. B. Hake, M. M. C. Carvajal, S. Bontron, B. Lisowska-Groszpiere, and V. Steimle. N-terminal destruction signals lead to rapid degradation of the major histocompatibility complex class II transactivator CIITA. *Eur. J. Immunol.*, 33(8):2337–2347, 2003.
- J. Schneider, V. Brichard, T. Boon, K. H. M. zum Buschenfelde, and T. Wolfel. Overlapping peptides of melanocyte differentiation antigen Melan-A/MART-1 recognized by autologous cytolytic T lymphocytes in association with HLA-B45.1 and HLA-A2.1. *Int. J. Cancer*, 75(3):451–458, 1998.
- C. Schumacher, C. L. Cioffi, H. Sharif, W. Haston, B. P. Monia, and L. Wennogle. Exposure of human vascular smooth muscle cells to Raf-1 antisense oligodeoxynucleotides: cellular responses and pharmacodynamic implications. *Mol Pharmacol.*, 53(1):97–104, 1998.
- F. H. Seeger, M. Schirle, W. Keilholz, H. G. Rammensee, and S. Stevanovic. Peptide motif of HLA-B*1510. *Immunogenetics*, 49(11-12):996–999, 1999.
- U. Seifert, C. Maranon, A. Shmueli, J. F. Desoutter, L. Wesoloski, K. Janek, P. Henklein, S. Diescher, M. Andrieu, S. H. de la, T. Weinschenk, H. Schild, D. Laderach, A. Galy, G. Haas, P. M. Kloetzel, Y. Reiss, and A. Hosmalin. An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope. *Nat. Immunol.*, 4(4):375–379, 2003.

- T. Serwold, F. Gonzalez, J. Kim, R. Jacob, and N. Shastri. ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature*, 419 (6906):480–483, 2002.
- S. B. Shahar, A. Komlosch, E. Nadav, I. Shaked, T. Ziv, A. Admon, G. N. DeMartino, and Y. Reiss. 26 S proteasome-mediated production of an authentic major histocompatibility class I-restricted epitope from an intact protein substrate. *J. Biol. Chem.*, 274(31):21963–21972, 1999.
- X. Z. Shen, A. E. Lukacher, I. R. Williams, and K. E. Bernstein. Expression of angiotensin converting enzyme changes MHC class I peptide presentation by modifying C-termini of peptide precursors. *J. Biol. Chem.*, 2008.
- A. Sickmann, M. Bluggel, M. Kulke, H. Kremmin, A. Marx, K. Reske, and H. E. Meyer. Identification of major histocompatibility complex class II-associated peptides derived from freshly prepared rat Langerhans cells using MALDI-PSD and Edman degradation. *Analyst*, 125(4):569–573, 2000.
- J. Sidney, M. F. del Guercio, S. Southwood, V. H. Engelhard, E. Appella, H. G. Rammensee, K. Falk, O. Rötzschke, M. Takiguchi, R. T. Kubo, H. M. Grey, and A. Sette. Several HLA alleles share overlapping peptide specificities. *J. Immunol.*, 154(1):247–259, 1995.
- J. Sidney, H. M. Grey, R. T. Kubo, and A. Sette. Practical, biochemical and evolutionary implications of the discovery of HLA class I supermotifs. *Immunol. Today*, 17(6):261–266, 1996a.
- J. Sidney, H. M. Grey, S. Southwood, E. Celis, P. A. Wentworth, M. F. del Guercio, R. T. Kubo, R. W. Chesnut, and A. Sette. Definition of an HLA-A3-like supermotif demonstrates the overlapping peptide-binding repertoires of common HLA molecules. *Hum. Immunol.*, 45(2):79–93, 1996b.
- J. Sidney, S. Southwood, V. Pasquetto, and A. Sette. Simultaneous prediction of binding capacity for multiple molecules of the HLA B44 supertype. *J. Immunol.*, 171(11):5964–5974, 2003.
- D. Siegel, A. Anwar, S. L. Winski, J. K. Kepa, K. L. Zolman, and D. Ross. Rapid polyubiquitination and proteasomal degradation of a mutant form of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1. *Mol Pharmacol.*, 59(2):263–268, 2001.
- J. C. Skipper, D. J. Kittlesen, R. C. Hendrickson, D. D. Deacon, N. L. Harthun, S. N. Wagner, D. F. Hunt, V. H. Engelhard, and J. C. L. Slingluff. Shared epitopes for HLA-A3-restricted melanoma-reactive human CTL include a naturally processed epitope from Pmel-17/gp100. *J. Immunol.*, 157(11):5027–5033, 1996.
- R. D. Smith, J. A. Loo, C. G. Edmonds, C. J. Barinaga, and H. R. Udseth. New developments in biochemical mass spectrometry: electrospray ionization. *Anal. Chem.*, 62(9):882–899, 1990.

- J. C. Solheim, B. M. Carreno, J. D. Smith, J. Gorka, N. B. Myers, Z. Wen, J. M. Martinko, D. R. Lee, and T. H. Hansen. Binding of peptides lacking consensus anchor residue alters H-2Ld serologic recognition. *J. Immunol.*, 151(10):5387–5397, 1993.
- M. Sospedra, X. Ferrer-Francesch, O. Dominguez, M. Juan, M. Foz-Sala, and R. Pujol-Borrell. Transcription of a broad range of self-antigens in human thymus suggests a role for central mechanisms in tolerance toward peripheral antigens. *J. Immunol.*, 161(11):5918–5929, 1998.
- C. Southan. Has the yo-yo stopped? An assessment of human protein-coding gene number. *Proteomics*, 4(6):1712–1726, 2004.
- S. Stevanovic. Identification of tumour-associated T-cell epitopes for vaccine development. *Nat. Rev. Cancer*, 2(7):514–520, 2002.
- S. Stevanovic. Antigen processing is predictable: From genes to T cell epitopes. *Transpl. Immunol.*, 14(3-4):171–174, 2005.
- S. Stevanovic and H. Schild. Quantitative aspects of T cell activation–peptide generation and editing by MHC class I molecules. *Semin. Immunol.*, 11(6):375–384, 1999.
- L. Stoltze, T. P. Dick, M. Deeg, B. Pommerl, H. G. Rammensee, and H. Schild. Generation of the vesicular stomatitis virus nucleoprotein cytotoxic T lymphocyte epitope requires proteasome-dependent and -independent proteolytic activities. *Eur. J. Immunol.*, 28(12):4029–4036, 1998.
- L. Stoltze, M. Schirle, G. Schwarz, C. Schroter, M. W. Thompson, L. B. Hersh, H. Kalbacher, S. Stevanovic, H. G. Rammensee, and H. Schild. Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nat. Immunol.*, 1(5):413–418, 2000.
- W. J. Storkus, I. H. J. Zeh, R. D. Salter, and M. T. Lotze. Identification of T-cell epitopes: rapid isolation of class I-presented peptides from viable cells by mild acid elution. *J. Immunother.*, 14(2):94–103, 1993.
- M. Takashi, T. Sakata, and K. Kato. Use of serum gamma-enolase and aldolase A in combination as markers for renal cell carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.*, 84(3):304–309, 1993.
- H. Takedatsu, S. Shichijo, K. Katagiri, H. Sawamizu, M. Sata, and K. Itoh. Identification of peptide vaccine candidates sharing among HLA-A3+, -A11+, -A31+, and -A33+ cancer patients. *Clin. Cancer Res.*, 10(3):1112–1120, 2004.
- K. Tanaka and M. Kasahara. The MHC class I ligand-generating system: roles of immunoproteasomes and the interferon-gamma-inducible proteasome activator PA28. *Immunol. Rev.*, 163:161–176, 1998.

- S. Tenzer, L. Stoltze, B. Schonfisch, J. Dengjel, M. Müller, S. Stevanovic, H. G. Rammensee, and H. Schild. Quantitative analysis of prion-protein degradation by constitutive and immuno-20S proteasomes indicates differences correlated with disease susceptibility. *J. Immunol.*, 172(2):1083–1091, 2004.
- C. J. Thorpe and P. J. Travers. Prediction of an HLA-B44 binding motif by the alignment of known epitopes and molecular modeling of the antigen binding cleft. *Immunogenetics*, 40(4):303–305, 1994.
- R. E. Toes, A. K. Nussbaum, S. Degermann, M. Schirle, N. P. Emmerich, M. Kraft, C. Laplace, A. Zwinderman, T. P. Dick, J. Muller, B. Schonfisch, C. Schmid, H. J. Fehling, S. Stevanovic, H. G. Rammensee, and H. Schild. Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J. Exp. Med.*, 194(1):1–12, 2001.
- R. D. Unwin, R. A. Craven, P. Harnden, S. Hanrahan, N. Totty, M. Knowles, I. Eardley, P. J. Selby, and R. E. Banks. Proteomic changes in renal cancer and co-ordinate demonstration of both the glycolytic and mitochondrial aspects of the Warburg effect. *Proteomics*, 3(8):1620–1632, 2003.
- T. D. Veenstra, T. P. Conrads, and H. J. Issaq. What to do with “one-hit wonders“? *Electrophoresis*, 25(9):1278–1279, 2004.
- R. F. Wang, E. Appella, Y. Kawakami, X. Kang, and S. A. Rosenberg. Identification of TRP-2 as a human tumor antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 184(6):2207–2216, 1996.
- R. F. Wang, S. L. Johnston, S. Southwood, A. Sette, and S. A. Rosenberg. Recognition of an antigenic peptide derived from tyrosinase-related protein-2 by CTL in the context of HLA-A31 and -A33. *J. Immunol.*, 160(2):890–897, 1998.
- M. P. Washburn, D. Wolters, and I. J. R. Yates. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat. Biotechnol.*, 19(3):242–247, 2001.
- V. C. Wasinger, S. J. Cordwell, A. Cerpa-Poljak, J. X. Yan, A. A. Gooley, M. R. Wilkins, M. W. Duncan, R. Harris, K. L. Williams, and I. Humphery-Smith. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*, 16(7):1090–1094, 1995.
- T. Weinschenk, C. Gouttefangeas, M. Schirle, F. Obermayr, S. Walter, O. Schoor, R. Kurek, W. Loeser, K. H. Bichler, D. Wernet, S. Stevanovic, and H. G. Rammensee. Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. *Cancer Res.*, 62(20):5818–5827, 2002.
- A. O. Weinzierl. *Neue Ansätze in der Tumorummunologie: Implikationen aus der massenspektrometrischen Analyse von HLA-Liganden*. Doktorarbeit, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Interfakultäres Institut für Zellbiologie/ Abteilung Immunologie, 2008.

- A. O. Weinzierl and S. Stevanovic. LC-MS Based Protein and Peptide Quantification Using Stable Isotope Labels: From ICAT in General to differential N-terminal Coding (dNIC) in Special. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 23, 2006.
- A. O. Weinzierl, C. Lemmel, O. Schoor, M. Müller, T. Krüger, D. Wernet, J. Hennenlotter, A. Stenzl, K. Klingel, H. G. Rammensee, and S. Stevanovic. Distorted relation between mRNA copy number and corresponding major histocompatibility complex ligand density on the cell surface. *Mol Cell Proteomics*, 6(1):102–113, 2007.
- A. O. Weinzierl, D. Rudolf, N. Hillen, S. Tenzer, P. van Endert, H. Schild, H. G. Rammensee, and S. Stevanovic. Features of TAP-independent MHC class I ligands revealed by quantitative mass spectrometry. *Eur. J. Immunol.*, angenommen, 2008.
- T. Wenzel, C. Eckerskorn, F. Lottspeich, and W. Baumeister. Existence of a molecular ruler in proteasomes suggested by analysis of degradation products. *FEBS Lett.*, 349(2):205–209, 1994.
- M. Wilm and M. Mann. Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal. Chem.*, 68(1):1–8, 1996.
- V. H. Wysocki, G. Tsaprailis, L. L. Smith, and L. A. Breci. Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation. *J. Mass Spectrom.*, 35(12):1399–1406, 2000.
- X. Xia, M. Roundtree, A. Merikhi, X. Lu, S. Shentu, and G. Lesage. Degradation of the apical sodium-dependent bile acid transporter by the ubiquitin-proteasome pathway in cholangiocytes. *J. Biol. Chem.*, 279(43):44931–44937, 2004.
- L. Xu, J. L. Eiseman, M. J. Egorin, and D. Z. D’Argenio. Physiologically-based pharmacokinetics and molecular pharmacodynamics of 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin and its active metabolite in tumor-bearing mice. *J. Pharmacokinetic. Pharmacodyn.*, 30(3):185–219, 2003.
- M. Xu, R. J. Myerson, C. Hunt, S. Kumar, E. G. Moros, W. L. Straube, and J. L. R. Roti. Transfection of human tumour cells with Mre11 siRNA and the increase in radiation sensitivity and the reduction in heat-induced radiosensitization. *Int. J. Hyperthermia*, 20(2):157–162, 2004.
- J. Yague, M. Ramos, J. Vazquez, A. Marina, J. P. Albar, and J. A. L. de Castro. The South Amerindian allotype HLA-B*3909 has the largest known similarity in peptide specificity and common natural ligands with HLA-B27. *Tissue Antigens*, 53(3):227–236, 1999.
- N. Yamada, Y. Ishikawa, T. Dumrese, K. Tokunaga, T. Juji, T. Nagatani, K. Miwa, H. G. Rammensee, and M. Takiguchi. Role of anchor residues in peptide binding to three HLA-A26 molecules. *Tissue Antigens*, 54(4):325–332, 1999.

- J. W. Yewdell. Not such a dismal science: the economics of protein synthesis, folding, degradation and antigen processing. *Trends Cell Biol.*, 11(7):294–297, 2001.
- J. W. Yewdell and A. Lev. Self-reporting peptides illuminate the MHC groove. *Nat. Chem. Biol.*, 3(4):201–202, 2007.
- J. W. Yewdell and C. V. Nicchitta. The DRiP hypothesis decennial: support, controversy, refinement and extension. *Trends Immunol.*, 27(8):368–373, 2006.
- J. W. Yewdell, E. Reits, and J. Neefjes. Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.*, 3(12):952–961, 2003.
- E. C. Yi, M. Marelli, H. Lee, S. O. Purvine, R. Aebersold, J. D. Aitchison, and D. R. Goodlett. Approaching complete peroxisome characterization by gas-phase fractionation. *Electrophoresis*, 23(18):3205–3216, 2002.
- F. Zappacosta, F. Borrego, A. G. Brooks, K. C. Parker, and J. E. Coligan. Peptides isolated from HLA-Cw*0304 confer different degrees of protection from natural killer cell-mediated lysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94(12):6313–6318, 1997.
- C. Zhang, A. Anderson, and C. DeLisi. Structural principles that govern the peptide-binding motifs of class I MHC molecules. *J. Mol. Biol.*, 281(5):929–947, 1998.
- Y. Y. Zhu, M. Takashi, K. Miyake, and K. Kato. An immunochemical and immunohistochemical study of aldolase isozymes in renal cell carcinoma. *J. Urol.*, 146(2):469–472, 1991.

C. Publikationen

- N. Hillen**, G. Mester, C. Lemmel, A. O. Weinzierl, M. Müller, D. Wernet, J. Hennenlotter, A. Stenzl, H.-G. Rammensee und S. Stevanovic. Drastic differences in ligand presentation and T cell epitope recognition among HLA molecules of the HLA-B44 supertype. *Eingereicht*.
- M. Feldhahn, P. Thiel, M. M. Schuler, **N. Hillen**, S. Stevanovic, H.-G. Rammensee und O. Kohlbacher. EpiToolKit - A web server for computational immunomics. *Eingereicht*.
- A. O. Weinzierl, D. Rudolf, **N. Hillen**, S. Tenzer, P. van Endert, H. Schild, H.-G. Rammensee and S. Stevanovic. Features of TAP-independent MHC class I ligands revealed by quantitative mass spectrometry. *Eur. J. Immunol.*, *angenommen*.
- A. Beck, **N. Hillen**, A. Dolashki, S. Stevanovic, B. Salvato, W. Voelter und P. Dolashka-Angelova. Oligosaccharide structure of a functional unit RvH1-b of *Rapana venosa* hemocyanin using HPLC/electrospray ionization mass spectrometry. *Biochimie*, 89(8):938-949, 2007.
- N. Hillen** and S. Stevanovic. Contribution of mass spectrometry-based proteomics to immunology. *Expert. Rev. Proteomics*, 3(6):653-664, 2006.

D. Akademische Lehrer

Prof. Albert, Prof. Ammermann, Prof. Bardele, Dr. Bayer, Prof. Bisswanger, Prof. Bock, Prof. Bohley, Prof. Cramer, Prof. Christen, Prof. Dringen, Prof. Duszenko, Prof. Eisele, Prof. Engels, PD Dr. Falk, Prof. Gauglitz, Dr. Griesbeck, Prof. Grossmann, Dr. Günzl, Prof. Häfelinger, Prof. Hamprecht, Prof. Hartl, Prof. Jäger, Prof. Jung, Prof. Jürgens, Dr. Kalbacher, PD Dr. Klein, Prof. Lindner, Prof. Madeo, Prof. Maier, PD Dr. Maier, Prof. Mayer, Prof. Mecke, Prof. Müller, Prof. Neubert, Prof. Neupert, Prof. Ninnemann, Prof. Oberhammer, Prof. Pommer, Prof. Probst, Prof. Rammensee, Prof. Reutter, Prof. Saalmüller, Dr. Sarrazin, Prof. Schendel, Prof. Schild, Prof. Schöffl, Prof. Schott, Prof. Schwarz, PD Dr. Steinle, Prof. Stevanovic, PD Dr. Stoeva, Prof. Strähle, PD Dr. Verleysdonk, Prof. Voelter, Prof. Voigt, Prof. Wagner, Prof. Weber, Prof. Weser, Prof. Wohlleben, Prof. Zimmermann, Prof. Zeller