

Aus dem Interfakultären Institut für Zellbiologie der
Universität Tübingen
Abteilung Immunologie

**Netzwerkanalysen von Quellproteinen aus
HLA-Liganden von Primärtumoren und Metastasen des
Nierenzellkarzinoms:
Ein neuer Ansatz zur Identifikation von
tumorassoziierten Antigenen und Peptiden**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

vorgelegt von

Klatt, Martin Gunther

2017

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Stevanović

2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Klein

3. Berichterstatter: Professor Dr. M. Schmitz

Tag der Disputation: 06.02.2017

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Die T-Zelle: Funktion und Dysfunktion bei Tumorerkrankungen	9
1.1.1	Das HLA-Molekül als Grundlage der spezifischen Immunantwort.....	10
1.1.2	Erkennung und Elimination von Tumorzellen durch Interaktion von T-Zell-Rezeptor und HLA-Molekül.....	13
1.1.3	Immunescape und T-Zell-Erschöpfung (T-cell exhaustion)	18
1.2	Das Nierenzellkarzinom: Genese und Therapieansätze	23
1.2.1	Entstehung und Einteilung	23
1.2.2	Metastasierung	26
1.2.3	Lokale und systemische Therapie des Nierenzellkarzinoms	27
1.3	Immuntherapie von Karzinomen: Peptidvakzinierung zwischen Checkpoint-Modulatoren und T-Zell-Rezeptor imitierenden Antikörpern	28
1.3.1	Peptidvakzinierung	28
1.3.2	Checkpoint-Modulatoren.....	32
1.3.3	T-Zell-Rezeptor imitierende Antikörper (TCR mimic antibodies)	35
1.4	Zielsetzung der Arbeit	37
2	Material und Methoden	39
2.1	Vom Gewebe zum Peptid	39
2.1.1	Auswahl von Patienten und Gewebeproben	39
2.1.2	Isolierung von HLA-Liganden aus Gewebeproben mittels Immunpräzipitation und Ultrazentrifugation.....	40
2.1.2.1	Herstellung des Gewebelysats	40
2.1.2.2	Vorbereitung der Agarosesäule durch Kopplung mit HLA spezifischen Klasse I und Klasse II Antikörpern.....	41
2.1.2.3	Isolierung von HLA-Komplexen aus Gewebelysaten mittels Affinitätschromatographie	42
2.1.2.4	Dissoziation von HLA-Liganden von HLA-Peptid-Komplexen mittels Ultrafiltration	43
2.2	Vom unbekanntem Peptid zum Frequenzspektrum mit Hilfe der Massenspektrometrie.....	44
2.2.1	Elektrospray-Ionisation (ESI).....	44
2.2.2	Orbitrap Massenspektrometer	48
2.2.3	Kopplung von Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie.....	54
2.3	Vom Frequenzspektrum zum identifizierten Peptid und dessen Netzwerken	56
2.3.1	Prozessierung der Rohdaten und Annotation von Fragmentspektren	56
2.3.2	Interpretation von Fragmentspektren.....	58
2.3.3	Externe Validierung und Annotation von HLA-Liganden	60
2.3.4	Netzwerkanalyse von HLA-Liganden	62

2.4	Von Netzwerken zu Epitopen und Antigenen für Peptidvakzinen	66
2.4.1	Auswahl von HLA-Liganden als Kandidaten für Vakzinierungspeptide.....	66
2.4.2	Literaturrecherche zur Validierung der Immunogenität	67
2.4.3	Abschätzung der Immunogenität von Nonamer-Peptiden über das <i>in silico</i> Vorhersagemodell der Immune Epitope Database	67
2.4.4	Abschätzung der Immunogenität von Ursprungsproteinen über das <i>in silico</i> Vorhersagemodell VaxiJen.....	68
3	Ergebnisse	70
3.1	Analysierte Gewebeproben.....	72
3.2	Identifikation von HLA-Liganden der Klasse I und II aus Nierengewebe. 73	
3.2.1	Aspekte der manuellen Evaluation der Peptidspektren	73
3.2.2	Anzahl identifizierter HLA-Liganden aus Gewebeproben.....	76
3.2.3	Validierung identifizierter HLA-Liganden durch internen Datenbankabgleich und Literaturrecherche.....	79
3.2.4	Zuordnung der Peptide zu HLA-Allelen gemäß der Typisierung	80
3.3	Gewebespezifische Verteilung von HLA-Liganden und Quellproteinen ..	81
3.3.1	Überlappung von Quellproteinen aus Nierengewebe mit Antigenen aus mononukleären Blut- und Knochenmarkzellen.....	81
3.3.2	Überlappung von Quellproteinen aus unterschiedlichen Gewebeentitäten ..	82
3.4	Netzwerkanalysen von Quellproteinen aus HLA-Liganden	84
3.4.1	Vergleich der biologischen Funktionen aus Netzwerkanalysen von Tumor-, Metastasen-, und Normalgewebe für HLA-Klasse I	85
3.4.2	Vergleich der biologischen Funktionen aus Netzwerkanalysen von Tumor-, Metastasen-, und Normalgewebe für HLA-Klasse II.....	87
3.4.3	Identifikation von in die Karzinogenese des klarzelligen Nierenzellkarzinoms involvierten biologischen Prozessen durch Netzwerkanalysen.....	89
3.4.4	Identifikation von tumorassoziierten Antigenen und HLA-Liganden aus karzinogenen biologischen Prozessen der Netzwerkanalysen.....	95
3.5	Evaluation der Immunogenität von tumorassoziierten Quellproteinen und HLA-Liganden aus Netzwerkanalysen	98
3.5.1	Validierung der Immunogenität durch Literaturrecherche	99
3.5.2	Abschätzung der Wahrscheinlichkeit für eine Immunantwort gegen HLA- Liganden über das IEDB immunogenicity prediction tool.....	99
3.5.3	Abschätzung der Wahrscheinlichkeit für eine Immunantwort gegen Quellproteine über den VaxiJen v2.0-Server	103
4	Diskussion.....	105
4.1	Diskussion der Methodik: Probenauswahl und Peptidgewinnung	105
4.1.1	Auswahl von Gewebeproben.....	105
4.1.2	Manuelle Evaluation von Peptidspektren	106
4.2	Diskussion der Ergebnisse: Peptidausbeute, Abgleich mit PBMCs und Verteilung der Quellproteine in unterschiedlichen Gewebesubtypen	108

4.2.1	Anzahl identifizierter HLA-Liganden	108
4.2.2	Überlappung von Quellproteinen aus Nierengewebe mit Proteinen aus mononukleären Blut- und Knochenmarkzellen.....	108
4.2.3	Verteilung der Quellproteine aus HLA-Liganden zwischen Tumoren, Metastasen und Normalgewebe.....	111
4.3	Diskussion der Ergebnisse: Netzwerkanalysen von Quellproteinen aus HLA-Liganden und Vergleich zwischen Gewebesubtypen.....	112
4.3.1	Netzwerkanalysen aus Quellproteinen	112
4.3.2	Überschneidung der Ergebnisse aus Netzwerkanalysen zwischen Tumoren, Metastasen und Normalgewebe.....	114
4.4	Diskussion der Ergebnisse: Identifikation von biologischen Prozessen aus Netzwerkanalysen mit Funktion für die Karzinogenese des klarzelligem Nierenzellkarzinoms sowie Ableitung von tumorassoziierten Antigenen und HLA-Liganden für individualisierte Peptidvakzinen	116
4.4.1	Identifikation von tumorassoziierten und tumorspezifischen Prozessen aus Netzwerkanalysen von malignen Gewebeproben.....	116
4.4.2	Identifikation von tumorassoziierten Antigenen aus in Netzwerkanalysen detektierten tumorspezifischen Prozessen	122
4.5	Diskussion der Ergebnisse: Evaluation der Immunogenität von tumorassoziierten Quellproteinen und HLA-Liganden aus Netzwerkanalysen und deren Einfluss auf die Entwicklung von Peptidvakzinen.....	133
4.5.1	Validierung der Immunogenität durch Literaturrecherche.....	133
4.5.2	Abschätzung der Wahrscheinlichkeit für eine Immunantwort gegen HLA-Liganden über das IEDB immunogenicity prediction tool.....	134
4.5.3	Abschätzung der Wahrscheinlichkeit für eine Immunantwort gegen Quellproteine über den VaxiJen v2.0-Server	135
4.5.4	Entwicklung neuer individualisierter Peptidvakzinen auf Grundlage der identifizierten biologischen Prozesse und der involvierten tumorassoziierten Antigene	136
5	Zusammenfassung	140
	Literaturverzeichnis	142
	Anhang	167
	Erklärung zum Eigenanteil	227
	Publikation	229
	Danksagung	230
	Lebenslauf	232

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
AFP	alpha-Fetoprotein
APC	adenomatous polyposis coli protein
BATF	basic leucine zipper transcription factor
BCAR1	breast cancer anti-estrogen resistance protein 1
bcl-2	B-cell lymphoma 2
BMMC	bone marrow mononuclear cell
BrCN	Bromcyan
β 2m	beta-2-Mikroglobulin
CA9	carbonic anhydrase 9
CALR	Calreticulin
ccRCC	clear cell renal cell carcinoma
CD	cluster of differentiation
CD36	platelet glycoprotein 4
CEA	carcinoembryonales Antigen
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CID	collision-induced dissociation
COL1A1	collagen alpha-1 (I) chain
CRM	charge residue model
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	epidermal growth factor receptor
EGLN3	egl nine homolog 3
ELISpot	Enzyme Linked Immuno Spot
ENO1	Enolase 1
ENPEP	glutamyl aminopeptidase
EPAS1	endothelial PAS domain-containing protein 1
ErbB2	receptor tyrosine-protein kinase erbB-2
ESI	Elektrospray-Ionisation
FA	Fluoressigsäure
FACS	fluorescence activated cell sorting
FDR	false discovery rate
FFT	fast Fourier transform
FGFR	fibroblast growth factor receptor
FN1	fibronectin
FWHM	full width at half maximum
GITR	glucocorticoid-induced TNFR family related gene
GRB2	growth factor receptor-bound protein 2
HCD	higher-energy collisional dissociation
hCG- β	humanes Choriogonadotropin
HCl	Hydrogenchlorid, Salzsäure
Her2	siehe ErbB2
HIF	hypoxia inducible factor
HIF1A	hypoxia-inducible factor 1-alpha
HIV	human immunodeficiency virus

HLA	human leukocyte antigen
HPLC	high performance liquid chromatography
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IEDB	Immune Epitope Database
IEM	Ion Evaporation Model
IGFBP3	insulin-like growth factor-binding protein 3
IL	Interleukin
IPN	interne Probennummer
ITPR3	inositol 1,4,5-triphosphate receptor type 3
LAT	linker of activation of T cells
LC	liquid chromatography
LCK	Leukocyte C-terminal Src kinase
LOX	Lysyl-Oxidase
LTQ	linear trap quadrupole
MAGE	melanoma associated antigen
MC	mononuclear cell
MDSC	myeloid derived supressor cell
MHC	major histocompatibility complex
MMP-7	matrix metalloproteinase 7
mRNA	messenger ribonucleic acid
MS	mass spectrometry
mTOR	mammilian target of rapamycin
MUC1	Mucin-1
M Φ	Makrophage
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumbikarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NRP2	neuropilin-2
ODS	Octadecadimethylsilyl
PAX2	paired box protein Pax-2
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	phosphate buffered saline
PD-1	programmed death protein 1
PD-L1	programmed death-ligand
PDGFR	platelet derived growth factor receptor
PEG	Polyethylenglykol
PFN1	profilin-1
PLOD2	Procollagen-lysin,2-oxoglutarat 5-Dioxygenase 2
ppm	parts per million
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
Q-TOF	quadrupole time of flight
RAGE	renal tumor antigen
RCC	renal cell carcinoma
rpm	revolutions per minute
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
TAA	tumorassoziertes Antigen

TCR	T-Zell-Rezeptor
TCRm	TCR mimic antibody
TFA	Trifluoressigsäure
TGF- β	transforming growth factor- β
TGFB1	transforming growth factor beta-1
TGFBI	transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3
THBS1	thrombospondin-1
THBS2	thrombospondin-2
TIL	tumor infiltrating lymphocyte
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
UICC	Union internationale Contre le Cancer
VEGFA	vascular endothelial growth factor A
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
VHL	von-Hippel-Lindau Protein
WT1	Wilms tumor protein 1
ZAP70	ζ -chain associated protein kinase of 70 kDa

1 Einleitung

1.1 Die T-Zelle: Funktion und Dysfunktion bei Tumorerkrankungen

Auch im 21. Jahrhundert gibt es immer wieder Berichte von „Wunderheilungen“ von Krebspatienten. In der medizinischen Literatur werden derartige Fälle wissenschaftlicher als spontane Remissionen bezeichnet und wurden z.B. von Everson im Zeitraum von 1900 und 1960 für verschiedene Tumorarten in 176 Fällen beschrieben.¹ Ähnliche Übersichtsarbeiten publizierten Challis et al. für die Jahre 1900 bis 1987 für 489 Fälle unterschiedlicher Karzinomentitäten² und Lokich et al. für die Zeit von 1967 bis 1997 für 60 Patienten mit metastasierten Nierenzellkarzinomen.³

Keinesfalls aber sind diese Beschreibungen eine Entdeckungen der Neuzeit: Bereits aus dem Mittelalter gibt es Überlieferungen wie die des Heiligen Peregrinus Laziosi, dessen die Haut durchbrechender Knochentumor nach einer fieberhaften Infektion der offenen Wunde sich gänzlich zurückbildete.⁴ Dieser Rückgang von Karzinomen durch Infektionen wurde sogar schon aus den Zeiten der Ägypter durch den Papyrus Ebers überliefert. Darin wird berichtet, dass der Arzt Imothep ca. 2600 v. Chr. über die Anlage von Breiumschlägen und anschließende Inzisionen durch den Umschlag eine Entzündungsreaktion verursachte und nach deren Abklingen sich auch der Tumor oftmals verkleinert hatte.⁵ Diese historischen Beschreibungen legen aus unserer heutigen Sicht nahe, dass eine Entzündungsreaktion des Körpers über die Aktivierung des Immunsystems in der Lage ist, Tumorzellen zu zerstören und Karzinome teilweise gänzlich aufzulösen.

Erstmals wurde dieses Vorgehen 1893 systematisch durch William Coley am Memorial Hospital in New York City etabliert und angewandt. Durch Zufall erkannte der junge Chirurg, dass bei Patienten mit ausgeprägten fieberhaften Erysipelen durch Streptococcus pyogenes und gleichzeitig vorhandenen Knochentumoren es in einigen Fällen zu einem Rückgang oder sogar Verschwinden der malignen Tumore kam.⁴ Diese Beobachtung veranlasste ihn dazu, gezielt Patienten mit Knochentumoren mit Mixturen aus initial lebenden und später abgetöteten Bakterien species (Streptococcus pyogenes und Serratia marcescens) zu behandeln. Über viele Jahre wurde diese Therapie als

„Coley’s vaccine“ für die Therapie von Tumorpatienten eingesetzt und William Coley daher rückwirkend als der Begründer der Immuntherapie von Krebserkrankungen angesehen.

Auf der Suche nach der Erklärung für den Rückgang der Karzinome wird rasch deutlich, dass diese mit der starken Immunreaktion assoziiert sind, welche dem Rückgang meist offensichtlich vorausging. Bereits Paul Ehrlich postulierte 1909, dass das Immunsystem Tumorwachstum unterdrücken kann.⁶ Dieser Gedanke wurde von Burnet und Thomas aufgegriffen und dadurch signifikant gestützt, dass diese beiden Wissenschaftler im Mausmodell nachweisen konnten, dass Thymus-abhängige Zellen (heute bekannt als T-Zellen) tumorspezifische Antigene erkennen⁷ und auch im gesunden Patienten transformierte Zellen identifizieren und zerstören können.⁸ Die Vorstellung, dass patrouillierende T-Zellen entartete Zellen detektieren und zerstören können und somit den menschlichen Organismus teilweise vor der Entstehung von Karzinomen beschützen können, wurde als die Hypothese der Immunosurveillance aufgestellt und letztlich von Dunn et al. 2004 abschließend verifiziert.⁹

Unter anderem aus dieser Entwicklung wurde der enorme Stellenwert von T-Zellen für die Bekämpfung von Tumorerkrankungen deutlich. Zusätzlich dient die Effektivität von Peptidvakzinierungsstrategien, z.B. für Kopf-Hals-Tumoren¹⁰, von Interleukin-2 (IL-2) Therapien¹¹, von durch dendritische Zellen vermittelten Therapien¹² und insbesondere von Therapien mittels Checkpoint-Inhibitoren mit deren Stimulation der T-Zell-Funktion als Beweis für den hohen Stellenwert von T-Zellen in der Bekämpfung und Therapie von Karzinomzellen.

Wie T-Zellen im Detail entartete Zellen erkennen können und wie deren Funktion bei der Abwehr von Tumorzellen limitiert wird, soll Gegenstand der folgenden Unterkapitel sein.

1.1.1 Das HLA-Molekül als Grundlage der spezifischen Immunantwort

Die einzigartige Funktion von T-Zellen besteht darin, dass diese Zellen des Immunsystems in der Lage sind, andere Zellen als „körpereigen“ oder „körperfremd“ einzuordnen. Diese Fähigkeit ermöglicht es Ihnen zusätzlich, virusbefallene oder maligne entartete Zellen zu detektieren und zu eliminieren.

Die Grundlage aller dieser Funktionen bilden die so genannten MHC (major histocompatibility complex)- oder HLA (human leukocyte antigen)-Komplexe wie sie für den menschlichen Organismus genannt werden. Diese Proteine, welche von hochpolymorphen Genloci auf dem Chromosom 6 codiert werden, können gemäß ihrer Eigenschaften in eine HLA-Klasse I und eine HLA-Klasse II unterteilt werden.

Die Aufgabe der Proteine der HLA-Klasse I besteht darin, Peptide von ca. 8-11 Aminosäuren Länge aus intrazellulären Antigenen oder über die sogenannte Kreuzpräsentation aus exogenen Antigenen den zytotoxischen CD8-positiven T-Zellen auf der Zelloberfläche zu präsentieren. HLA-Klasse II-Komplexe dagegen präsentieren Peptide mit einer Länge von ca. 13-17 Aminosäuren aus überwiegend mittels Endozytose internalisierten extrazellulären Antigenen für CD4-positive T-Helfer-Zellen.

Zur besseren Vorstellung der räumlichen Ausrichtung dieser beiden Komplexe und den darauf präsentierten Peptiden dienen die folgenden Abbildungen:

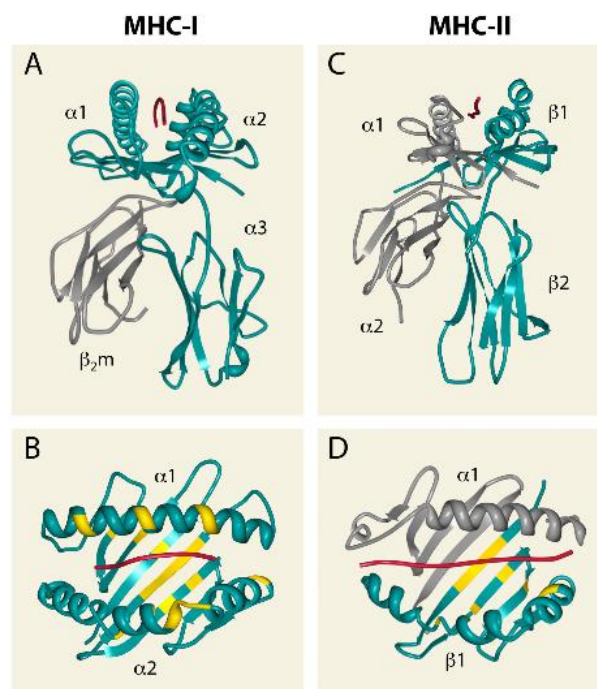


Abbildung 1. Aufbau der HLA-Klasse I und II-Komplexe. Die Bilder A und B zeigen einen HLA-Klasse I-Komplex, das Peptid ist in rot dargestellt, die gelben Abschnitte des Proteins kennzeichnen hochpolymorphe Anteile. Analog gilt dies für die Bilder C und D für HLA-Klasse II; nach Blum et al. 2013¹³.

Abbildung 1 illustriert hierbei anschaulich, dass der HLA-Komplex I aus drei α -Untereinheiten und dem β 2-Mikroglobulin besteht (kurz β 2m). Über die transmembranöse Domäne der α 3-Untereinheit ist das Molekül in der Zellmembran verankert.

Der HLA-Klasse II-Komplex weist einen sehr ähnlichen Aufbau auf, wobei hier zwei α - und zwei β -Domänen das Protein bilden und sowohl die Untereinheiten α 2 als auch β 2 über einen transmembranösen Anteil verfügen. Zusätzlich veranschaulicht die Aufsicht der Bilder 1B und 1D sehr schön wie die Peptide nicht kovalent gebunden in die oberen Taschen der Komplexe eingebettet sind und dass besonders in den Bereichen mit großer Nähe zu den Peptiden ein hoher Polymorphismus in der Aminosäuresequenz der Proteine besteht. Diese Vielfältigkeit der codierenden HLA-Gene führt zu einer extrem hohen Anzahl an unterschiedlichen HLA-Genloci und somit Allelen in der Bevölkerung. Dies ist die Grundlage für die hohe Diversität von HLA-Liganden, da jedes HLA-Molekül, welches einem Allel zugeordnet ist, bestimmte Peptide bei der Präsentation auf dem Komplex bevorzugt, was unter dem Begriff HLA-Restriktion bekannt ist.

Die Auswahl der HLA-Liganden wird dabei über die physikalisch-chemischen Eigenschaften von Aminosäuren an definierten Stellen des Peptides bestimmt. So werden z.B. auf dem Genprodukt des HLA-Allels B*07 bevorzugt Peptide präsentiert, welche an zweiter Stelle der Aminosäuresequenz ein Prolin und an neunter Stelle Leucin tragen, weswegen Aminosäuren in diesen Positionen als Ankeraminosäuren bezeichnet werden.

Auf diese Weise gelingt es dem menschlichen Organismus aus der Kombination von HLA-Molekül und präsentiertem Peptid ein Repertoire von hochspezifischen HLA-Peptid-Komplexen zu generieren, welche dem körpereigenen Immunsystem als eine Art „Ausweis“ dienen, da Zellen, welche diese HLA-Liganden in Verbindung mit den passenden HLA-Molekülen präsentieren, nicht von T-Zellen attackiert und zerstört werden.

Kommt es z.B. durch maligne Entartung oder durch Virusbefall einer Zelle zu Veränderungen der auf der Zelloberfläche präsentierten Peptide, so kann dies, wenn diese HLA-Liganden von T-Zellen mit ihren Rezeptoren erkannt werden, zur Zerstörung der Zelle mit den „falschen“, d.h. körperfremden HLA-Liganden

führen. Die Tatsache, dass alle kernhaltigen Zellen des Menschen HLA-Klasse I-Moleküle tragen verdeutlicht wie ubiquitär dieses hochspezifische Sicherheitssystem des Körpers zum Einsatz kommt.

Wie soeben angedeutet geht die Transformation von gutartigen in maligne Zellen mit Veränderungen der HLA-präsentierten Peptide einher¹⁴, da sich durch Mutationen oder Veränderungen der Expression von Genen nicht nur das Proteom sondern folglich auch das Peptidom und HLA-Ligandom der Zellen ändert. Wie es nach einer derartigen malignen Entartung im Detail dazu kommt, dass diese Zellen durch das Immunsystem erkannt und zerstört werden, soll im Folgenden erläutert werden.

1.1.2 Erkennung und Elimination von Tumorzellen durch Interaktion von T-Zell-Rezeptor und HLA-Molekül

Wie bereits im vorangegangenen Kapitel erläutert, besitzt jede kernhaltige Zelle des Menschen HLA-Komplexe der Klasse I, auf welchen Peptide in Verbindung mit HLA-Molekülen dem Immunsystem präsentiert werden. HLA-Komplexe der Klasse II sind dagegen primär auf Zellen des Immunsystems, nämlich dendritischen Zellen, B-Lymphozyten und CD4-positiven T-Helferzellen vorhanden. Im Rahmen der Karzinogenese kann es jedoch zur aberranten Expression dieser Proteine kommen, was u.a. für das Nierenzellkarzinom gezeigt werden konnte.¹⁵ Das Vorhandensein dieser HLA-Komplexe bildet nun die Grundlage für die Erkennung der entarteten Zellen durch das Immunsystem und insbesondere durch T-Zellen.

Die im Knochenmark gebildeten und im Thymus gereiften T-Lymphozyten besitzen als Gegenstück zum HLA-Molekül einen T-Zell-Rezeptor (TCR) mit einer Struktur, welche in Verbindung mit je einem Peptid sowie einem HLA-Molekül in Abbildung 2 dargestellt wird. Der Aufbau des T-Zell-Rezeptors besteht als α : β -Heterodimer aus einer α - und einer β -Kette, welche ihrerseits jeweils in eine konstante und variable Domäne unterteilt werden können. Hierbei dient die variable Domäne dazu, die Kombination aus HLA-Molekül und präsentiertem Peptid hochspezifisch zu erkennen. Die konstante Domäne

dagegen ist für die Signalübertragung in das Innere der Zelle zuständig, was später näher erläutert werden wird.

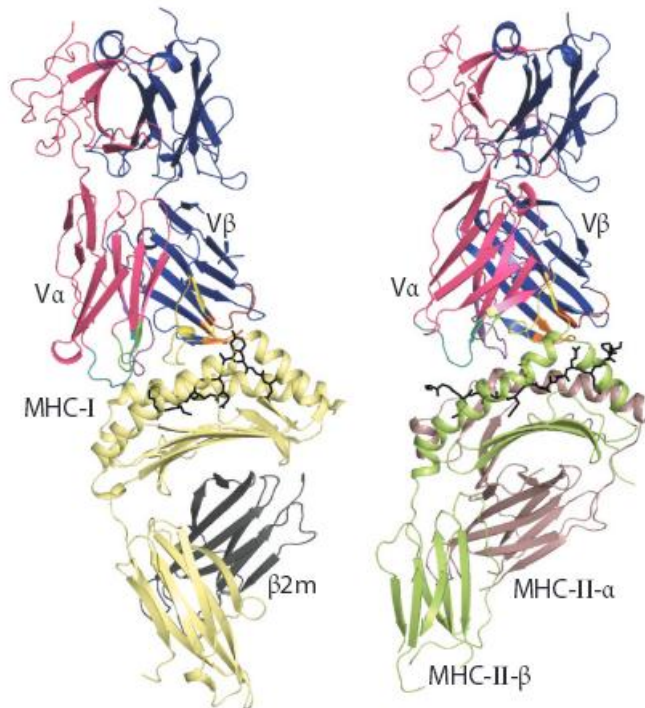


Abbildung 2. Interaktion von T-Zell-Rezeptor, Peptid und HLA-Molekül. Auf der linken Seite ist die physikalische Anordnung zwischen TCR, Peptid und HLA-Molekül für Klasse I und rechts für Klasse II abgebildet. Im oberen Teil befindet sich der TCR, wobei die variablen Regionen dem MHC-Komplex im unteren Teil zugewandt sind. Hierbei wird deutlich, dass für Klasse II das Peptid auf Grund seiner Länge über die eigentlichen Bindungsstellen am N- und C-Terminus hinausragt. Insgesamt ist die Interaktion für beide Klassen in den Grundzügen jedoch sehr ähnlich; nach Rossjohn et al. 2014.¹⁶

Erkennt nun der TCR den HLA-Liganden auf seinem zugehörigen HLA-Molekül, wird die T-Zelle aktiviert, vorausgesetzt das Peptid ist ausreichend immunogen und es sind notwendige kostimulatorische Signale wie z.B. das Protein CD80 oder CD86, welches vom CD28-Molekül auf der T-Zelle erkannt wird, vorhanden. Eine ausführliche Erläuterung dieser Prozesse würde über den Rahmen dieser Arbeit deutlich hinausgehen, es wird aber bereits jetzt deutlich, dass die Aktivierung einer T-Zelle ein hochkomplexer Prozess ist, welcher viele

unterschiedliche Signale benötigt. Daher wird die Gesamtheit der involvierten Proteine an den beiden Zellmembranen zwischen Antigen-präsentierender und T-Zelle als immunologische Synapse bezeichnet.¹⁷

Ist die Aktivierung der T-Zelle an der immunologischen Synapse gelungen, so wird, wie in Abbildung 3 gezeigt, über die vorhandenen Rezeptoren eine second messenger vermittelte Signalkaskade in Gang gesetzt.

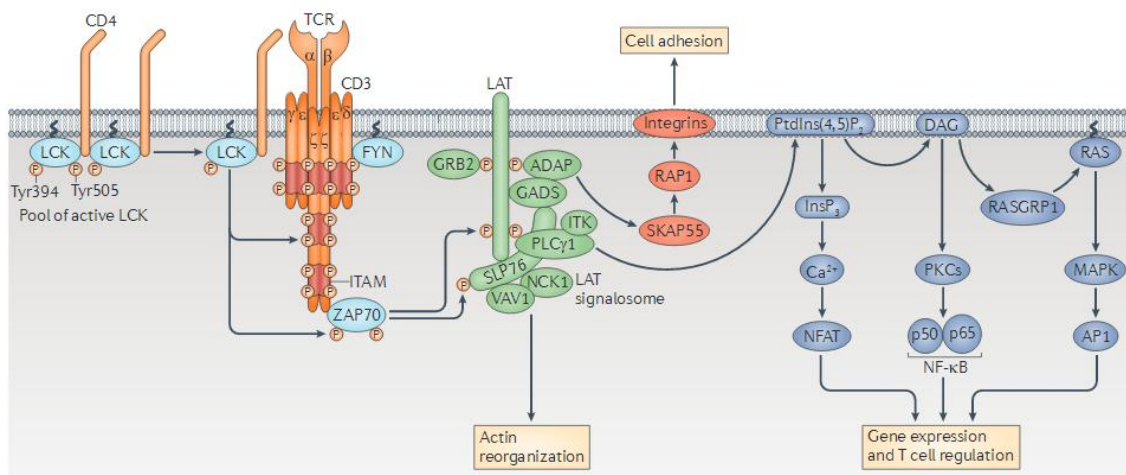


Abbildung 3. Die T-Zell-Rezeptor-Signalkaskade. Über die erfolgreiche Bindung des TCR durch den Peptid-HLA-Komplex wird eine Signalkaskade ausgelöst, welche über Aktinreorganisation und Veränderungen der Genexpression die T-Zelle aktiviert; nach Brownlie et al. 2013.¹⁸

Als entscheidendes Molekül dient hierbei das T-Zell-spezifische CD3-Protein, welches direkt mit dem TCR assoziiert ist und aus einer γ -, einer δ -, einer ϵ -, und zwei ζ -Polypeptidketten besteht, wobei insbesondere die hauptsächlich intrazellulären ζ -Ketten die Signaltransduktion vermitteln. Hierzu wird initial die Proteinkinase LCK aktiviert, die ihrerseits über Phosphorylierungen der Ketten des CD3-Moleküls eine weitere Proteinkinase, nämlich ZAP70 (ζ -chain associated protein kinase of 70 kDa) in den aktiven Zustand versetzt. Durch dessen Phosphorylierungen kann der linker of activation of T cells (LAT) einen Proteinkomplex formen, der über zahlreiche second messenger schließlich die

Aktivierung der T-Zelle durch die Reorganisation der Aktinstruktur und über die NF- κ B vermittelte Veränderungen der Genexpression bewirkt.¹⁸

Diese Umprogrammierung der T-Zelle führt letztlich unter anderem dazu, dass diese als zytotoxische Effektorzelle aktiv wird und über die Sekretion von Perforin und Granzym B die detektierte Tumorzelle zerstört. Hierbei wirken die eben genannten Perforine und Granzyme synergistisch, indem durch die Perforine Löcher in die Zellmembran der zu zerstörenden Zelle gebohrt werden, wodurch die Granzyme in die Tumorzelle eindringen können, um den programmierten Zelltod, die Apoptose, auszulösen.¹⁹

In der folgenden Abbildung 4 werden die wichtigsten Punkte bei der spezifischen Erkennung und Zerstörung von Tumor-Zellen durch zytotoxische T-Zellen nochmals illustriert. Das CD8-Molekül, welches die zytotoxische T-Zelle charakterisiert, bindet unspezifisch das HLA-Klasse I-Protein auf der Oberfläche der Tumorzelle. Zusätzlich erkennt der TCR die Verbindung von Peptid und HLA-Molekül als nicht typisch für eine gesunde Gewebszelle und über die notwendige Kostimulation durch das Rezeptor/Ligandenpärchen CD28 auf der T-Zelle und CD80 oder CD86 auf der Tumorzelle wird die intrazelluläre Signalkaskade der T-Zelle aktiviert, was zur Ausschüttung von Perforinen und Granzymen führt. Diese Enzyme durchdringen ihrerseits die Zellmembran der Tumorzelle und lösen die gewünschte Apoptose aus.

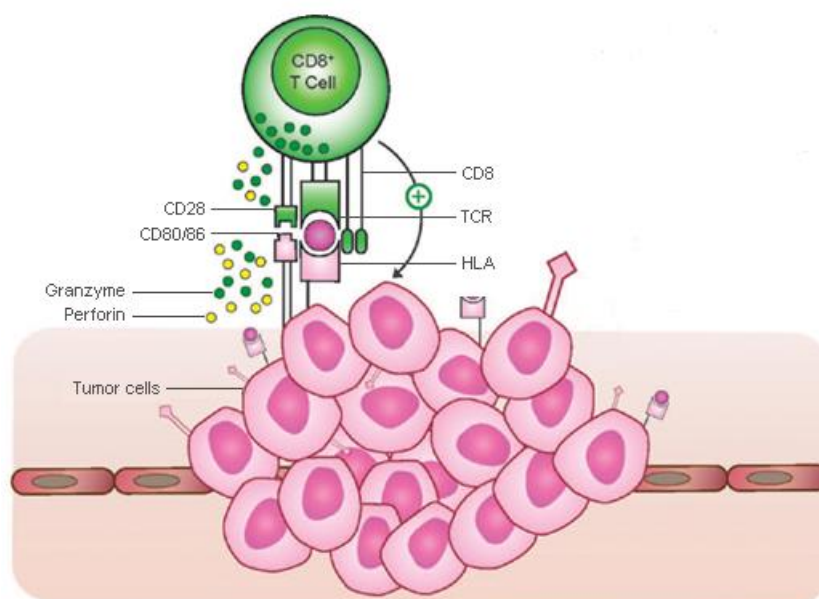


Abbildung 4. Die Erkennung und Zerstörung von Tumorzellen durch zytotoxische T-Zellen. Entscheidend für die erfolgreiche spezifische Elimination der Tumorzelle über Perforine und Granzyme ist die Ausbildung einer funktionellen immunologischen Synapse. Hierbei sind die unspezifische Bindung des CD8-Moleküls an den HLA-Komplex, die Erkennung des HLA-Peptid-Komplexes durch den TCR und die Aktivierung der kostimulatorischen Liganden CD28 sowie CD80/CD86 auf der Gegenseite essentiell; nach Monzajeb et al. 2013.²⁰

Auch wenn dieser Prozess für die Tumorabwehr entscheidend und in dieser Arbeit sicherlich der wichtigste ist, sollte dennoch betont werden, dass viele weitere Mechanismen ebenfalls zur Bekämpfung von maligne entarteten oder infizierten Zellen beitragen. Hierbei kommt es zu dem gewohnten Zusammenspiel zwischen angeborener und erworbener Immunität, wobei insbesondere die Antikörperproduktion über CD4-positive T-Helferzellen ebenfalls in dieser Arbeit einen wichtigen Stellenwert einnimmt, da auch Peptide der HLA-Klasse II analysiert wurden. Die Synergismen der unterschiedlichen Zellen des Immunsystems werden in Abbildung 5 verdeutlicht.

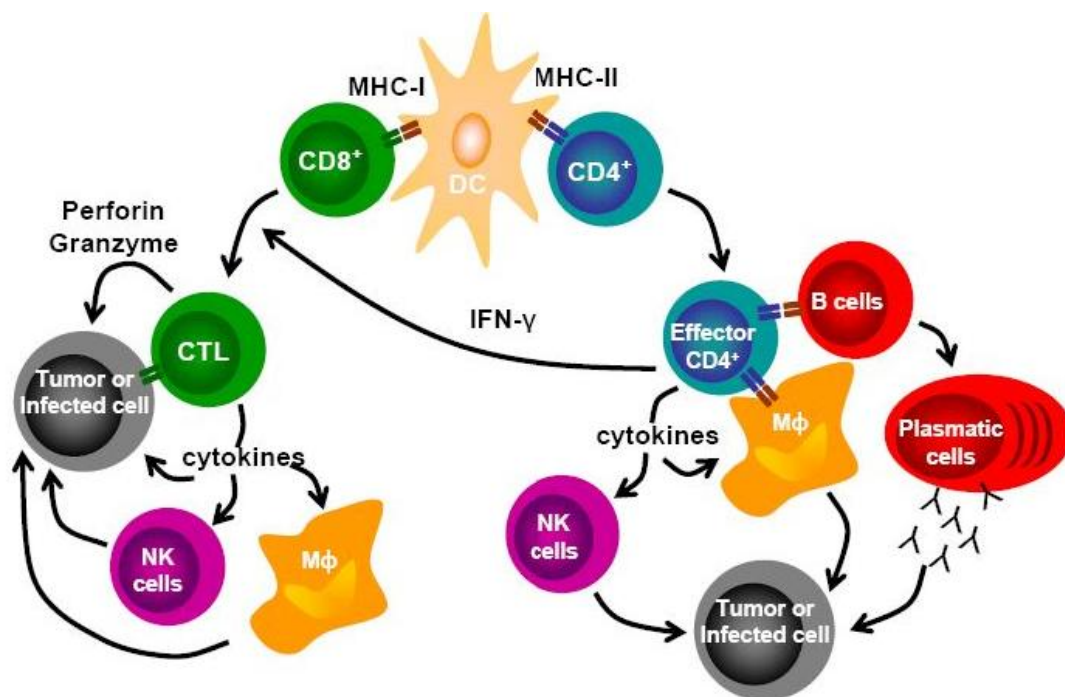


Abbildung 5. Das Zusammenspiel von Zellen der angeborenen und erworbenen Immunität bei der Bekämpfung von Tumorzellen. Im Zentrum steht die antigenpräsentierende dendritische Zelle (DC), welche sowohl über MHC-Klasse I wie Klasse II Peptide präsentieren kann. Auf der linken Seite wird der HLA-Ligand von einer CD8-positiven T-Zelle erkannt, welche dann als zytotoxischer T-Lymphozyt (CTL) direkt die Tumorzelle attackiert und zusätzlich Makrophagen ($M\Phi$) und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) aktiviert. Auf der rechten Seite wird über MHC-Klasse II präsentierte Peptide eine CD4-positive T-Helferzelle stimuliert, welche ihrerseits eine B-Zelle dazu bringt, sich zu einer antikörperproduzierenden Plasmazelle umzuwandeln. Zusätzlich aktiviert die Helferzelle direkt Makrophagen für die Zerstörung der Tumorzellen sowie indirekt - über begleitend ausgeschüttete Zytokine - natürliche Killerzellen für die gleiche Funktion; nach Pacheco et al. 2012.²¹

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sowohl über HLA-Klasse I- und HLA-Klasse II-Komplexe in Verbindung mit deren HLA-Liganden T-Zellen aktiviert werden, welche sowohl direkt als auch indirekt über die Produktion von Antikörpern und die Rekrutierung von Zellen des angeborenen Immunsystems (NK-Zellen und Makrophagen) die Tumorzellen angreifen.

Inwieweit diese Mechanismen von Seiten des Tumors umgangen werden und wo die Grenzen der Effektivität der T-Zellen in ihrer Tumorbekämpfung liegen, soll nun im folgenden Kapitel dargelegt werden.

1.1.3 Immunescape und T-Zell-Erschöpfung (T-cell exhaustion)

Über die beschriebenen Mechanismen der Bekämpfung von Tumorzellen gelingt es dem menschlichen Organismus, im Sinne der Immunosurveillance das Wachstum von Karzinomen zu verhindern.

Insgesamt stellt sich die Interaktion von Krebszellen und dem Immunsystem als komplexer dynamischer Prozess dar, der unter dem Begriff des Immunoeditings zusammengefasst werden kann.⁹ Die Dynamik wird hierbei durch drei funktionell unterschiedliche Phasen beschrieben: Elimination, Equilibrium und Escape („three Es of cancer immunoediting“).⁹

Die Phase der Elimination wurde bereits im vorangegangenen Kapitel besprochen. In dieser Phase gelingt es dem Immunsystem, die Tumorzellen ausreichend zu zerstören ohne ein Wachstum zu ermöglichen. Durch die ständige Auseinandersetzung mit dem Immunsystem und dem dadurch entstehenden evolutionären Druck zur Selektion und Mutation entwickeln die maligne entarteten Zellen jedoch genetische und epigenetische Veränderungen, welche vermehrt dazu führen, dass das Immunsystem diese Zellen nicht mehr erkennen oder zerstören kann. Beispiele hierfür sind z.B. eine verminderte Antigenpräsentation durch die Down-Regulation von HLA-Genen oder die Expression von immunsuppressiven Liganden wie PD-L1 (programmed death-ligand 1). Auch verschiedene Zytokine sind an der Beeinflussung des Immunsystems beteiligt, so dass z.B. das Interleukin-12 die Zerstörung der Tumorzellen durch T-Zellen fördert, während Interleukin-23 diese unterdrückt.²² Dennoch hält der Organismus die Entwicklung der Karzinome oft lange Zeit in Schach und erreicht eine Art steady-state zwischen Elimination und Escape, in welchem der Tumor als „schlafend“ und die allgemeine Situation als Equilibrium bezeichnet wird.²³ Sichtbare Malignome sind in dieser Phase noch nicht vorhanden.

Durch weitere immunmodulatorische und immunsuppressive Mechanismen sowie den Erwerb zusätzlicher Mutationen, welche die Selektion eines Tumorzellklons fördern, gelingt es jedoch den Karzinomzellen, dieses Gleichgewicht zu Gunsten der Karzinogenese zu kippen. Die Mechanismen sind hierbei ähnlich wie in der Phase des Übergangs von Elimination zu Equilibrium. Insgesamt lassen sich die am Immunescape beteiligten Strategien der Karzinomzellen in vier unterschiedliche Gruppen einteilen:

1. Veränderungen der malignen Zellen selbst: Hierbei nutzen die Tumorzellen vor allem zwei Herangehensweisen, um den zytotoxischen, Apoptose fördernden Mechanismen der CD8-positiven T-Zellen zu entkommen. Zum einen wird über die vermehrte Expression von bcl-2 (B-cell lymphoma 2) und STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) der versuchten Induktion der Apoptose entgegengewirkt.

Um zusätzlich die Erkennung der Tumorzellen durch T-Zellen zu verhindern, durch welche der Angriff durch Perforine und Granzyme ermöglicht wird, ist vor allem die Verminderung der Präsentation von HLA-Liganden auf ihren Komplexen von essentieller Bedeutung für den Immunescape. Dies wird u.a. durch die verminderte Expression der HLA-Gene per se und durch die Kompromittierung der Präsentation von Peptiden auf den HLA-Molekülen erreicht, wodurch die Tumorzellen der Erkennung und Zerstörung durch die spezifischen zytotoxischen T-Zellen entkommen.²⁴

2. Durch Zytokine vermittelte Immunsuppression: Die Umgebung um einen Tumor, das „tumor microenvironment“ ist oft geprägt von einem immunsuppressiven Milieu. Dieses wird unter anderem dadurch gebildet, dass Tumorzellen verschiedene Zytokine freisetzen, welche letztlich alle den Versuch der Zerstörung durch Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems unterdrücken. Die wichtigsten Vertreter sind VEGF (vascular endothelial growth factor), TGF- β (transforming growth factor- β), Galectin-1 und IDO (Indolamin-2,3-Dioxygenase).²⁵
3. Durch Zellen vermittelte Immunsuppression: Ergänzend zu den freigesetzten Zytokinen rekrutieren die Karzinomzellen immunmodulatorische Zellen in das Microenvironment. Insbesondere regulatorische T-Zellen (T_{regs}) sind von besonderer Bedeutung. Diese sezernieren einerseits immunsuppressive Zytokine wie IL-10 (Interleukin-10) oder TGF- β und exprimieren andererseits modulierende Liganden wie CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4) oder PD-1 (programmed death protein 1), welche über den von Tumorzellen exprimierten PD-L1 (programmed death-ligand 1)-Rezeptor aktiviert werden und somit die Apoptoserate in regulatorischen T-Zellen vermindert wird.²⁶

Unterstützend zu den regulatorischen T-Zellen wirken auch MDSCs (myeloid derived suppressor cells) als heterogene Gruppe der myeloischen Zellen u.a. über TGF- β immunsuppressiv auf T-Lymphozyten ein.²⁷

4. Modulierende Liganden auf Tumorzellen und zytotoxischen T-Zellen: Wie bereits bei den regulatorischen Zellen erwähnt, existieren Moleküle auf der Oberfläche von T-Lymphozyten (u.a. CTLA-4 und PD-1), welche die Regulation dieser Zellen immens beeinflusst. Dies nutzen die Tumorzellen durch die Expression von PD-L1, dem Liganden dieser Rezeptoren, wodurch sowohl die zytotoxischen T-Zellen besonders stark supprimiert als auch regulatorische T-Zellen wie bereits beschrieben aktiviert werden.²⁸

Über diese Vielzahl an Mechanismen, welche sich ausschließlich auf die Regulation des Immunsystems beschränken, erreichen die entarteten Zellen somit in der Phase des Escape Unabhängigkeit von der Suppression durch das Immunsystem und können beinahe ungehindert proliferieren, wodurch das Karzinom letztlich klinisch manifest wird. Abbildung 6 fasst die drei Phasen des Immunoeditings nochmals übersichtlich zusammen:

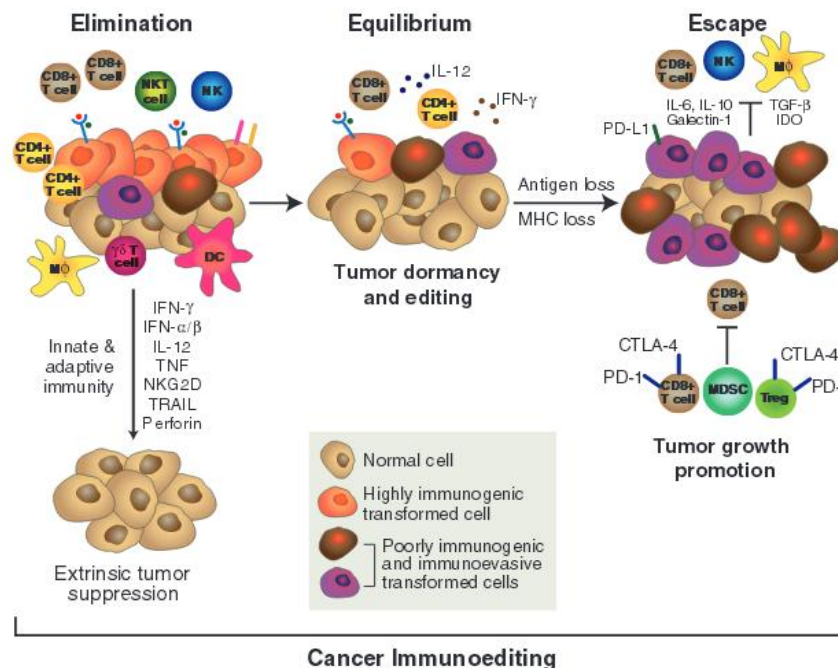


Abbildung 6. Die drei Phasen des Immunoediting von Tumoren: Elimination, Equilibrium und Escape. In der ersten Phase, der Elimination, gelingt es den Zellen des angeborenen (u.a. Makrophagen und NK-Zellen) sowie des erworbenen Immunsystems (v.a. T-Zellen), Tumorzellen zu zerstören und ggf. vollständig zu eliminieren (links im Bild). In manchen Fällen kommt es zum Übergang in ein Gleichgewicht zwischen Tumorzerstörung und Wachstum, der Tumor ist schlafend, d.h. im Equilibrium (Mitte). Durch weitere genetische Veränderungen und Modulationen der Tumorzellen wird letztlich der Zustand des Escape erreicht, in welchem durch eine Vielzahl von immunsuppressiven Mechanismen (siehe Text) die Karzinomzellen dem Immunsystem entkommen und es gezielt in Schach halten (rechts im Bild); nach Schreiber et al. 2011.²⁹

Entdeckt wurde dieser Prozess bei chronischen viralen Infekten, wie z.B. HIV-Infektionen, bei welchen sich die T-Zellen durch die ständige Entzündungsreaktion und Auseinandersetzung mit den Viren ab einem gewissen Punkt erschöpfen und sich die Viren schließlich vermehrt ausbreiten können. Vermittelt wird dies durch die Überexpression des Transkriptionsfaktors BATF (Basic leucine zipper transcription factor), welcher sonst bei geringer Expression unter anderem die Differenzierung der zytotoxischen T-Zellen fördert.³⁰ Durch die Aktivierung von PD-1 in T-Zellen kommt es nun, wie im HIV-Modell gezeigt wurde, zu einer Überexpression von BATF in T-Zellen und letztlich zum Verlust ihrer Effektorfunktion gegenüber HI-Viren.³¹ Analog zu den chronischen viralen Infekten konnte gezeigt werden, dass insbesondere T-Zellen mit hoher PD-1-Expression, welche Tumorzellen umgeben, häufig erschöpfte T-Zellen darstellen und somit indirekt ebenfalls den Immunescape widerspiegeln.³²

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass es dem Immunsystem und insbesondere T-Zellen möglich ist, effektiv Tumorzellen zu eliminieren und dass andererseits eine Vielzahl von Mechanismen von Seiten der entarteten Zellen angewandt werden, um diese Funktion der T-Zellen zu unterdrücken und somit ihr eigenes Überleben zu sichern.

1.2 Das Nierenzellkarzinom: Genese und Therapieansätze

1.2.1 Entstehung und Einteilung

Betrachtet man sämtliche Karzinome, welche im Bereich des Nierenbeckens auftreten können, so stellt das Nierenzellkarzinom mit 90 % aller Tumoren den bei weitem größten Anteil dar. In Bezug auf alle malignen Erkrankungen nimmt das Nierenzellkarzinom bereits seit etwa einer Dekade bei einer Gesamtinzidenz von 9 auf 100.000 Einwohner als die sechsthäufigste Tumorentität bei Männern und zehnthäufigste bei Frauen einen sehr konstanten Anteil von 2 - 3 % ein.³³ In Bezug auf die Europäische Union entspricht dies 84.400 Neuerkrankungen und 34.700 verstorbenen Patientin pro Jahr.

Bei der Geschlechterverteilung finden sich vermehrt männliche Patienten in einem Verhältnis von 1,5 : 1 zu den weiblichen Erkrankten. Die Altersverteilung des Nierenzellkarzinoms ist eingipflig und hat den höchsten Anteil zwischen dem sechzigsten und siebzigsten Lebensjahr.³³ Als die häufigsten Risikofaktoren für die Entwicklung eines Nierenzellkarzinoms konnten Nikotinkonsum, Übergewicht und Bluthochdruck identifiziert werden, was die höhere Prävalenz dieser Erkrankung in finanziell besser gestellten Nationen erklärt.³⁴

Mit ca. 50 % hat das Nierenzellkarzinom eine sehr hohe Rate für eine zufällige Detektierung dieses Tumors mit Hilfe von - aus anderen Gründen durchgeführten - Ultraschall- oder computertomographischen Untersuchungen. Dies hat dazu geführt, dass diese Erkrankung inzwischen immer häufiger in früheren Stadien diagnostiziert werden kann.³⁵ Aus diesem Grund findet sich bei diesem lange symptomarmen Karzinom nur noch sehr selten die klassische bekannte Symptomtrias aus blutigem Urin, Flankenschmerz und tastbarem abdominellem Tumor.

Entsprechend seiner Größe und Ausbreitung wird das Nierenzellkarzinom analog aller anderen soliden Tumore außerhalb des Gehirns nach dem TNM- sowie dem UICC-System (Union internationale Contre le Cancer) eingeteilt. Das TNM-System dient dabei in erster Linie der Beschreibung der Größe und Ausbreitung des Primärtumors (T=Tumor), dem Befall von Lymphknoten (N=Node=Lymphknoten) und dem Vorhandensein von Metastasen (M=Metastase), d.h. es ist eine rein anatomische Beschreibung. Das UICC-

Schema teilt dagegen die Tumoren an Hand der TNM-Klassifikation in Risikogruppen für das Überleben der Erkrankung ein und leitet hieraus auch Therapieempfehlungen ab. Wie diese Therapien in Abhängigkeit der Stadien aussehen, soll in einem späteren Kapitel erläutert werden. Tabelle 1 liefert eine Übersicht über das Überleben in Abhängigkeit der einzelnen Stadien.

Tabelle 1. 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit des TNM- oder UICC-Stadiums

<i>UICC-Stadium</i>	<i>TNM-Stadium</i>			<i>5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit</i>
I	T1	N0	M0	94 %
II	T2	N0	M0	90 %
III	T1-T3	N0, N1	M0	63 %
IV	T4	N0, N1	M0	28 %
	alle T	alle N	M1	<10 %

Tabelle 1. 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit der TNM- und UICC-Stadien. Aus den TNM-Stadien (Mitte) lassen sich direkt die UICC-Stadien (links) ableiten, welche mit den Überlebenswahrscheinlichkeiten der rechten Spalte direkt korrelieren; nach Ficarra et al. 2002.³⁶

Bezüglich des Mechanismus der Entstehung der Nierenzellkarzinome auf pathophysiologischer Ebene ist in erster Linie der Verlust des Tumorsuppressorgens VHL (von-Hippel-Lindau Protein) zu erwähnen, welcher bei sporadischen Nierenzellkarzinomen einen Anteil von 50 - 60 % ausmacht. Vermittelt wird dieser Funktionsverlust z.B. durch die Deletion des kurzen Armes des Chromosoms 3, wo der Genlocus des VHL-Gens zu finden ist³⁷ oder somatischen Mutationen bzw. Hypermethylierungen des Genes, was einer funktionellen Abschaltung entspricht.³⁸

Durch den Funktionsverlust des VHL-Proteins wird HIF (hypoxia inducible factor) nicht wie gewohnt im Inneren der Zelle abgebaut und vermittelt somit als Transkriptionsfaktor die Expression von Genen wie VEGF (vascular endothelial

growth factor), welche die Angiogenese vermehrt fördern und so z.B. das Tumorwachstum begünstigen.³⁹ Doch auch die Aktivierung verschiedener Rezeptoren für Wachstumsfaktoren ist bei der Entstehung des Nierenzellkarzinoms ein entscheidender Schritt, was wiederum später für die Therapie dieses Tumors relevant sein wird. Zu diesen Wachstumsfaktoren gehören insbesondere EGFR (epidermal growth factor receptor)⁴⁰, FGFR (fibroblast growth factor receptor)⁴¹ und PDGFR (platelet derived growth factor receptor)⁴².

Natürlich lässt sich das Nierenzellkarzinom aber nicht nur in Bezug auf seine Makroskopie oder Entstehung einteilen. Die histologische Subklassifizierung dieses Karzinoms kennt folgende vier Unterteilungen⁴³:

- klarzelliges Nierenzellkarzinom: Diese Entität stellt 80 - 90 % der Nierenzellkarzinome, gehört zu niedriger malignen Wachstumsformen und ist gekennzeichnet durch eine besonders starke Vaskularisierung
- papilläres Nierenzellkarzinom: Die mit 10 - 15 % zweithäufigste Unterart ist ebenfalls als weniger aggressiv einzustufen und zeigt mikroskopisch vor allem kleine Zellen mit blassem Zytoplasma
- chromophobes Nierenzellkarzinom: Mit 3 - 5 % aller Nierenzellkarzinome ist diese malignere Form eher selten vertreten und bildet deutlich größere Zellen als die weniger malignen Varianten
- Ductus-Bellini-Karzinom: Diese mit 0,6 % seltene Variante ist insofern auch in der Entstehung besonders, da sie als einzige von den Zellen des Sammelrohres der Niere ausgeht.

Um die Vergleichbarkeit innerhalb dieser Arbeit zu erhöhen, wurden trotz der vier möglichen Subklassen ausschließlich klarzellige Nierenzellkarzinome untersucht. Ob die hier erarbeiteten Ergebnisse auf die weiteren Subtypen übertragen werden können, muss in weiteren Arbeiten geklärt werden.

1.2.2 Metastasierung

Um die Karzinogenese eines Tumors vollständig zu beleuchten, muss auch immer berücksichtigt werden, ob und wie es zu einer Metastasierung dieses Karzinoms kommt. Die involvierten Prozesse sind unter den Karzinomentitäten häufig ähnlich, sollen aber hier speziell für das Nierenzellkarzinom kurz erläutert werden.

Grundsätzlich sind bei Erstdiagnose ca. 25 % aller Nierenzellkarzinome bereits metastasiert.⁴⁴ Im Verlauf der Erkrankung entwickeln sich bei etwa 30 % der Patienten nachträglich Metastasen⁴⁵, was sich prognostisch im Vergleich zu primären Metastasen als günstig herausgestellt hat.⁴⁶ Prinzipiell metastasiert das Nierenzellkarzinom sowohl lymphogen als auch hämatogen. Die lokale lymphogene Metastasierung erfolgt meist in pararenale, paraaortale oder inguinale Lymphknotenstationen, die hämatogene Streuung dagegen findet sich meistens in der Lunge mit etwa 50 - 60 %, dicht gefolgt von Leber und Knochen mit 30 - 40 % und seltener mit ca. 5 % in die Nebenniere, die kontralaterale Niere oder das Gehirn.⁴⁷ Die einzelnen Angaben von unterschiedlichen Studien über die exakten Werte der Häufigkeitsverteilung schwanken jedoch sehr, die Reihenfolge bleibt dagegen fast immer identisch.

Bezüglich der Pathophysiologie der Metastasierung sind es beim Nierenzellkarzinom und insbesondere beim klarzelligen Subtyp zwei Prozesse, welche als fundamentale Bestandteile - wie auch bei der Karzinogenese - die Metastasierung begünstigen und sich synergistisch verstärken. In erster Linie benötigt die erfolgreiche Streuung von Tumorzellen einen Mechanismus, über welchen sie in neues Gewebe eindringen kann und dadurch Platz für die zelluläre Motilität erhält. Hierbei kommt die enzymatische Spaltung von extrazellulärem Gewebe, insbesondere von Kollagenen, zum Tragen. Dabei sind unterschiedliche Proteine beteiligt, welche vor allem wenn sie überexprimiert werden, die Invasion der Karzinomzellen begünstigen: die Matrix-Metalloproteinase 7 (MMP-7)⁴⁸, die Lysyl-Oxidase (LOX)⁴⁹ und die Procollagen-lysin,2-oxoglutarat 5-Dioxygenase 2 (PLOD2)⁵⁰.

Wenn diese Enzyme schließlich das Gewebe soweit erweicht haben, dass sich die Zellen besser bewegen und somit leichter metastasieren können, wird

dieser Prozess nochmals unterstützt, indem über die massive Angiogenese des Nierenzellkarzinoms Anschluss an das bestehende Blutsystem geschaffen und eine hämatogene Streuung ermöglicht wird. Bei der Neubildung von Blutgefäßen ist in erster Linie das Protein VEGF als stärkster Induktor dieses Prozesses involviert.³⁹ Insbesondere bei der makroskopischen Betrachtung des sehr weichen und stark vaskularisierten klarzelligen Nierenzellkarzinoms werden diese beiden Mechanismen klinisch deutlich.

1.2.3 Lokale und systemische Therapie des Nierenzellkarzinoms

Wenn nun nach der beschriebenen Entstehung und Metastasierung von Nierenkarzinomen die Frage nach der Therapie aufkommt, lässt sich vereinfacht sagen, dass zunächst alle Nierenzellkarzinome ohne Fernmetastasen oder mit chirurgisch entfernbaren Metastasen operiert werden sollten, falls dies anatomisch und aus Sicht des Allgemeinzustand des Patienten möglich ist. Hierüber lassen sich die besten Heilungsraten mit 5-Jahresüberlebensraten in frühen Stadien von über 90 % erzielen, wie bereits vorher in dieser Arbeit dargelegt wurde.⁵¹

Für metastasierte oder andere inoperable Situationen stehen neben palliativer Resektion des Tumors auch eine Vielzahl von Systemtherapien zur Verfügung, welche unterschiedliche Wirkansätze aufweisen. Lange Zeit galt die unspezifische Immuntherapie mit Interleukin-2 und Interferon alpha als das Mittel der Wahl für die Systemtherapie des Nierenzellkarzinoms, da eine Chemotherapie nur marginale Erfolge erbracht hatte.

Die Erkenntnis, dass die Signaltransduktion für Wachstumsfaktoren eine signifikante Rolle in der Karzinogenese des Nierenzellkarzinoms einnimmt, führte zur Etablierung von Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKIs) wie Sunitinib, Sorafenib oder Pazopanib in der Tumorthherapie mit deutlich verbesserten Überlebensraten, wenn gleich diese im Mittel bei einer 2-Jahres-Überlebensrate von etwa 50 % bei einer mittleren Risikokonstellation liegen.^{52,53,54}

Als weitere zielgerichtete Therapien stehen die mTOR (mammalian target of rapamycin)-Inhibitoren Everolimus und Temsirolimus sowie der anti-VEGF-Antikörper Bevacizumab als anti-angiogenetisches Medikament zur

Verfügung.^{55, 56, 57} Die neueren Entwicklungen im Bereich der Checkpoint-Inhibitoren, auf welche später eingegangen werden wird, haben vor kurzem auch zur Zulassung von Nivolumab, einem anti-PD-1-Antikörper für die Systemtherapie des Nierenzellkarzinoms, geführt⁵⁸, was indirekt erneut die Immunogenität dieses Tumors unterstreicht.

Welche weiteren möglichen Immuntherapien für Karzinome per se zur Verfügung stehen oder sich in klinischer Entwicklung befinden, soll die Einführung zu dieser Arbeit abschließen.

1.3 Immuntherapie von Karzinomen: Peptidvakzinierung zwischen Checkpoint-Modulatoren und T-Zell-Rezeptor imitierenden Antikörpern

1.3.1 Peptidvakzinierung

Eine moderne Tumorthherapie bedient sich heutzutage vieler unterschiedlicher Werkzeuge und Ansätze, welche grundsätzlich in fünf große Gruppen eingeteilt werden können: operative Therapie, Strahlentherapie, Chemotherapie, zielgerichtete Therapie („targeted therapy“) und die Immuntherapie, wobei die letzten beiden Gruppen teilweise ineinander übergehen.

Alle diese Maßnahmen sind in der Lage, Karzinome in Abhängigkeit ihres Stadiums vollständig zu entfernen und Patienten im Idealfall zu heilen. Als lokale Maßnahmen zur Entfernung von Tumorzellen dienen im Allgemeinen die Operation und die lokale Strahlentherapie. Diesen beiden Ansätzen steht als dritte große Gruppe die Chemotherapie entgegen, welche dann zum Einsatz kommt, wenn eine lokale Therapie z.B. auf Grund von anatomischen Begebenheiten oder dem vorangeschrittenen Stadium der Erkrankung keinen kurativen Ansatz darstellt oder vor bzw. nach einer Operation oder Bestrahlung der Tumor erst verkleinert oder noch vermeintliche Tumorreste bekämpft werden sollen. Dennoch gibt es natürlich auch Karzinomentitäten, wie z.B. Leukämien, welche a priori einer Chemotherapie zugeführt werden und über diesen Therapieansatz auch geheilt werden können.

Allen diesen drei breit etablierten Herangehensweisen (operative Therapie, Strahlentherapie und Chemotherapie) ist jedoch eines gemeinsam: Die Unspezifität bei der Zerstörung oder Entfernung der malignen Zellen. Immer

wenn eine dieser drei Methoden angewandt wird, geht auch ein nicht unerheblicher Anteil von gutartigen Zellen zu Grunde. Teilweise führt dies entweder über die Entfernung oder Zerstörung von gesundem Gewebe zur Einschränkung oder sogar zum Verlust einer bestimmten Organfunktion.

Durch die Entwicklung zielgerichteter Therapien sollte der Versuch unternommen werden, dieses Problem zu umgehen. Durch bereits erwähnte Tyrosinkinase-Inhibitoren wurde dies teilweise mit sehr großem Erfolg erreicht, denn so wurde z.B. im Jahr 2003 die Therapie der chronisch myeloischen Leukämie, welche durch das Fusionsprotein bcr-abl, einer überaktiven Tyrosinkinase, charakterisiert wird, durch die Etablierung des TKIs Imatinib revolutioniert und die Ergebnisse für das Gesamtüberleben deutlich verbessert.⁵⁹

Eine weitere zielgerichtete Therapie, und gleichzeitig eine Form der Immuntherapie, stellt die große Klasse der therapeutischen Antikörper dar. Bereits 1997 wurde mit Rituximab, ein anti-CD20-Antikörper, erstmals ein Antikörper für die Tumorthherapie der non-Hodgkin-Lymphome beim Menschen zugelassen.⁶⁰ Aktuell sind laut Paul-Ehrlich-Institut in Deutschland 48 Antikörper für die Therapie unterschiedlichster Krankheiten zugelassen, was die enorme Entwicklung auf dem Gebiet dieser Therapieform widerspiegelt.⁶¹

Trotz dieser vielen positiven Entwicklungen ist es bisher dennoch nicht gelungen, Therapien für Krebspatienten besonders in metastasierten Stadien zu entwickeln, welche einerseits effektiv die Krankheit bekämpfen und andererseits ein hohes Maß an Sicherheit und Verträglichkeit liefern, was oft bei fortgeschrittenen Erkrankungen einen limitierenden Faktor darstellen kann. Durch die Unspezifität der Chemotherapie sind Nebenwirkungen wie z.B. Störungen des Magen-Darm-Traktes, Neutropenien, Thrombopenien und Anämien mit deutlicher Einschränkung des täglichen Lebens und teilweise lebensbedrohlichen Infekten keine Seltenheit. Dieses Nebenwirkungsprofil wurde durch zielgerichtete Therapien zwar verbessert, es bleiben aber z.B. für die TKIs sehr häufig nicht kontrollierbare Diarrhöen oder Hautveränderungen als Nebenwirkung, die eine Therapie unmöglich machen. Für die

Antikörpertherapien zeigen sich ebenfalls teils lebensbedrohliche pseudo-allergische Reaktionen im Sinne eines Zytokin-Freisetzungssyndroms.

Auf der Suche nach einer Therapie, welche die eben genannten Kriterien der Spezifität und der Verträglichkeit erfüllt, wurde schließlich die Idee der Peptidvakzinierung entwickelt. Das Vorgehen ist in Anbetracht der in Kapitel 1.1 vorgestellten Mechanismen einfach: Spezifische, auf einem Tumor präsentierte, Peptide werden einem Patienten zusammen mit Immunstimulantien unter die Haut gespritzt, dendritische Zellen nehmen diese Peptide auf, präsentieren sie ihrerseits den T-Lymphozyten, welche dann durch ihre Aktivierung sowohl über Perforine und Granzyme als auch über die Aktivierung von B-Zellen und Bildung von Antikörpern gegen das geimpfte Epitop die Tumorzellen zerstören. Optimale Zielstrukturen für eine derartige Therapie stellen hierbei diejenigen Peptide dar, welche exklusiv oder besonders stark auf den entarteten Zellen präsentiert werden. Funktionell können die verwendeten Peptide nach Art ihrer Antigene, von welchen diese abstammen, in vier unterschiedliche Gruppen unterteilt werden:

- Aktivierungsantigene sind Proteine, welche in gesunden Zellen codiert sind, aber nicht exprimiert werden. Während der Karzinogenese werden diese aktiviert und stellen somit ideale tumorspezifische Zielstrukturen dar und werden insgesamt als cancer/testis antigene bezeichnet. Hierzu zählen z.B. die MAGE-Familie (melanoma associated antigen)⁶², RAGE (renal tumor antigen)⁶³ oder NY-ESO-1⁶⁴.
- Eine weitere Gruppe sind die Differenzierungsantigene, welche für bestimmte Gewebe spezifisch sind und oft als Tumormarker verwendet werden. Dies bedeutet, dass diese Antigene zwar nicht tumorspezifisch sind, aber dort vermehrt exprimiert werden und zumindest einen Organtropismus der Immunantwort gewährleisten. Beispiele sind hierfür das PSA (Prostata-spezifisches Antigen)⁶⁵ oder AFP (alpha-Fetoprotein)⁶⁶.
- Die Überexpressionsantigene sind diejenigen mit der geringsten Spezifität, da sie auch in weiteren, gesunden Geweben, aber vor allem

- auf den Karzinomzellen vorhanden sind, wie z.B. EGFR⁶⁷ oder WT1 (Wilms tumor protein 1)⁶⁸.
- Als besondere Gruppe sind abschließend die mutierten Antigene zu erwähnen, wobei deren Relevanz noch nicht abschließend geklärt werden konnte. Durch ihre maximale Spezifität durch mutierte Peptide, welche exklusiv auf Tumorzellen präsentiert werden, stellen sie willkommene Zielstrukturen für eine Vakzinierung dar. Ob sie aber in ausreichender Anzahl auf der Zelle vorhanden sind und ob ein klinischer Effekt von ihnen zu erwarten ist, ist bisher nicht bekannt. Immunantworten gegen diese mutierten Peptide wurden jedoch bereits detektiert und publiziert.⁶⁹

Viele klinische Studien mit Peptidvakzinierungen wurden bereits durchgeführt oder sind im Gange. Für das Nierenzellkarzinom wurden initial erfreuliche Ergebnisse mit Hinweisen auf ein verbessertes Gesamtüberleben detektiert⁷⁰, welche sich in einer Phase III-Studie leider nicht bestätigen ließen (Daten nicht publiziert). Dagegen liegt eine Mehrzahl weiterer Studien vor, welche die Effektivität dieses Therapieansatzes bei sehr guter Verträglichkeit und verlängertem Gesamtüberleben dokumentieren, z.B. für Kopf-Hals-Tumoren¹⁰ oder das Blasenkarzinom⁷¹.

Dennoch wurde immer wieder die Effektivität dieser Therapie in Frage gestellt, insbesondere im Sinne des Modells des Immunoeditings, wobei das Argument zum Tragen kommt, dass eine T-Zell-Antwort, selbst wenn sie initiiert werden konnte, durch das immunsuppressive Microenvironment der Karzinome wieder unterdrückt werden würde. Vor diesem Hintergrund erscheint es sinnvoll, Peptidvakzinierungen z.B. als adjuvante Therapie nach Operationen einzusetzen, um Tumorrezidive oder metachrone Metastasierungen zu vermeiden. Daten für das Ovarial- und Mammakarzinom belegen diese Überlegungen auch wenn die Ergebnisse erst in sehr kleinen Fallzahlen vorliegen. Dennoch zeigte eine Vakzinierung mit MUC1 (Mucin-1), ErbB2 (auch bekannt als Her2) und CEA (carcinoembryonales Antigen) bei 14 Patientinnen nach erfolgreich abgeschlossener Tumortherapie mit hohem Rezidivrisiko das

Vorliegen einer spezifischen Immunreaktion und eine sich abzeichnende Verbesserung des Gesamtüberlebens, da nach mindestens 8 Jahren keine der behandelten Patientinnen verstorben war.

Ein weiterer Grund für die sicherlich noch nicht optimierten Ergebnisse der Peptidvakzinierung könnte auch die Auswahl an Tumorantigenen darstellen, da in der Phase des Beginns der klinischen Studien die Untersuchung des HLA-Ligandoms noch nicht so weit fortgeschritten war und das Wissen um möglicherweise potentere und weniger offensichtliche Antigene fehlte. Die Idee der Peptidvakzinierung ist somit sicherlich immer noch aktuell und von hoher klinischer Relevanz, denn auch komplette Remissionen selbst bei weit fortgeschrittenen hochmalignen Tumoren, wie dem cholangiozellulären Karzinom, wurden beschrieben.⁷²

Zusätzlich erbrachte die Immuntherapie per se in den vergangenen Jahren herausragende Verbesserungen, welche sich besonders im Feld der Checkpoint-Inhibitoren zeigten, auf welche nun eingegangen werden soll und deren therapeutisches Potential eine gute Ergänzung zur Peptidvakzinierung darstellen könnte.

1.3.2 Checkpoint-Modulatoren

Wie bereits in Kapitel 1.1.3 dargestellt, existieren unterschiedliche Mechanismen des Immunescape bei Tumorerkrankungen. Eine zentrale Rolle nehmen hierbei die co-inhibitorischen Proteine der Immuncheckpoints ein, welche als Rezeptoren auf T-Zellen im Normalfall als physiologische Bremse der Immunreaktion angesehen werden können, um überschießende Abwehrreaktionen zu verhindern. Im Fall der Karzinome nutzen maligne Zellen genau jenen Mechanismus, um die evozierte Immunantwort zu unterdrücken.

Die prominentesten Vertreter dieser inhibitorischen Proteine stellen CTLA-4, PD-1, PD-L1 dar, aber auch aktivierende, d.h. ko-stimulatorische Proteine wie OX40 oder GITR (glucocorticoid-induced TNFR family related gene) sind Gegenstand der aktuellen Forschung.

Neben den eben genannten Vertretern dieser beiden Gruppen gibt es noch eine große Anzahl weiterer Modulatoren von Immuncheckpoints, welche in

Abbildung 7 zusammengestellt wurden und teilweise schon als therapeutische Zielstrukturen genutzt werden oder als potentielle Kandidaten dienen. Selbstverständlich sollten inhibitorische Moleküle mit blockierenden Antikörpern, und stimulierende Liganden mit aktivierenden Antikörpern reguliert werden, um den gewünschten Effekt, die Stimulation des Immunsystems, für die Tumorthherapie zu erhalten.

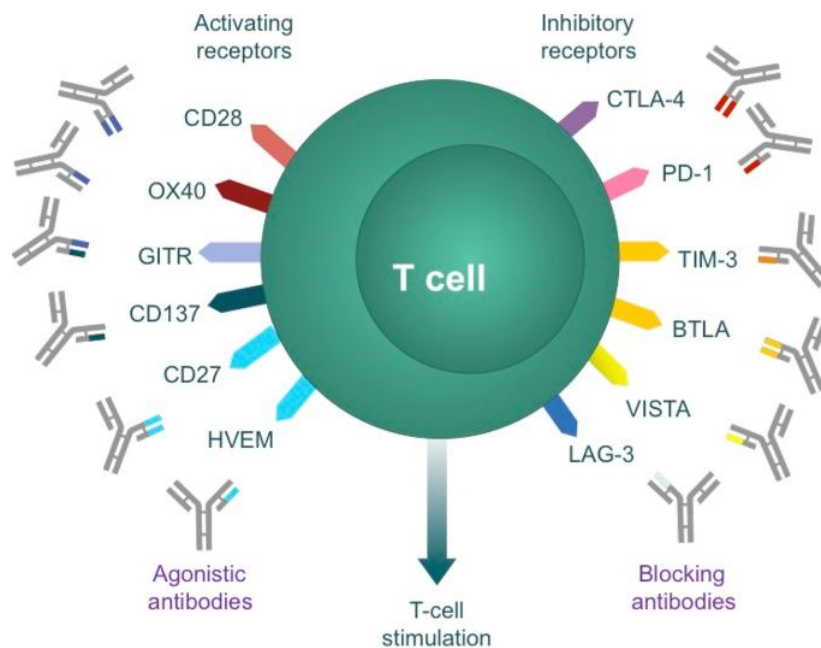


Abbildung 7. Aktivierende und inhibierende Rezeptoren für Immun-Checkpoints an T-Zellen. Links sind die ko-stimulierenden, rechts die ko-inhibierenden Liganden aufgeführt, welche therapeutisch links dementsprechend aktiviert und rechts gehemmt werden sollten, um eine T-Zell-Stimulation zu erreichen; nach Mellman et al. 2011.⁷³

Insgesamt sind die Ergebnisse über die Blockade der Moleküle CTLA-4, PD-1 und PD-L1 als Durchbruch in der Tumorthherapie zu werten. Insbesondere bei der Therapie des malignen Melanoms konnte in weit fortgeschrittenen Stadien über die Blockade von CTLA-4 und PD-1 mit den Antikörpern Ipilimumab (gegen CTLA-4) sowie Nivolumab und Pembrolizumab (beide gegen PD-1)

durchschnittlich eine Verdopplung der Überlebenszeit erzielt werden mit einer Vielzahl von Langzeit-Überlebenden.⁷⁴

Doch auch für andere Karzinomentitäten wie das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom⁷⁵ oder das Nierenzellkarzinom⁷⁶ zeigen sich überzeugende Ergebnisse. Weitere Studien für beinahe jede erdenkliche Karzinomart sind aktuell Mittelpunkt der klinisch-onkologischen Tumorforschung. Hierbei dominieren die Antikörper gegen inhibitorische Immuncheckpoints nicht zuletzt wegen der erschreckenden Ergebnisse für einen stimulierenden anti-CD28-Antikörper bei dessen Phase I-Testung es zu unvorhergesehenen Todesfällen in Folge von Zytokin-Stürmen kam.⁷⁷ Studien zu den kostimulatorischen Liganden OX40 oder GITR sind aber unbeachtet dessen vorangetrieben worden und befinden sich in der Phase II bis III ihrer Entwicklung.

Dennoch stellt diese Form der Therapie keine Musterlösung für die Heilung von Krebs dar. Zum einen zeigt sich sehr deutlich, dass das Ansprechen auf eine derartige Therapie sehr variabel ist, sowohl in Bezug auf Patienten bei der Therapie einer Karzinomentität als auch zwischen den unterschiedlichen Entitäten. Die Erklärung hierfür liegt für die erste Gruppe von Patienten wohl an einem bereits zu stark immunsuppressivem Mikromilieu oder erschöpften T-Zell-Populationen, welche das unterschiedliche Ansprechen z.B. in der Gruppe von Melanompatienten erklären. Besonders vor dem Hintergrund der sehr hohen Kosten dieser Therapie wird es sicherlich eine Herausforderung für die Forschung der kommenden Jahre sein wie dieses Ansprechen vorhergesagt werden kann. Dass unterschiedliche Tumorarten grundsätzlich verschieden auf eine derartige Checkpoint-Blockade reagieren, ist am ehesten auf die deutlich variierende Immunogenität zurückzuführen.

Insgesamt bietet dieser neue Therapieansatz eine faszinierende Methode zur Tumorthherapie mit vielversprechenden Ergebnissen. Ein zusätzliches Potential liefert jedoch die Kombination von Checkpoint-Inhibitoren mit der bereits erwähnten Peptidvakzinierung, denn aus biologischer Sicht wären hier synergistische Effekte leicht vorstellbar, indem das durch die Checkpoint-Blockade wiedererstärkte Immunsystem durch die zeitgleiche oder nachfolgende Gabe von Peptidvakzinen spezifisch auf die Aufrechterhaltung

einer suffizienten Tumorantwort ausgerichtet wird und im Idealfall wieder den Status eines Equilibriums im Sinne des Immunoeditings erreicht. Erste Daten im Mausmodell bestätigen diese Vorstellung für die bcr-abl-positive lymphatische Leukämie, in welcher die postulierten synergistischen Effekte der Kombination von Checkpoint-Inhibition und Peptidvakzinierung, in diesem Fall als Monotherapie gegen bcr-abl, nachweisbar waren.⁷⁸

1.3.3 T-Zell-Rezeptor imitierende Antikörper (TCR mimic antibodies)

Nach der Vorstellung der Peptidvakzinierung mit ihrer hohen möglichen Spezifität und der Checkpoint-Blockade mit beeindruckender Effektivität, soll als Ausblick und mögliche Weiterentwicklung der Peptidvakzinierung die Therapieform der T-Zell-Rezeptor imitierenden Antikörper (TCR mimic antibodies, TCRm) vorgestellt werden.

Die Idee Tumorzellen über ihre teils hochspezifischen HLA-Liganden zu detektieren und zu zerstören, erscheint weiterhin als verlockende Therapiemöglichkeit. Wie bei der Peptidvakzinierung aber bereits gezeigt wurde, sind oft das bereits durch die Erkrankungen geschwächte Immunsystem oder die immunsuppressiven Mechanismen der Karzinome der limitierende Faktor. Um dies zu umgehen, wird im Ansatz der TCRms versucht, wie der Name bereits suggeriert, einen T-Zell-Rezeptor zu imitieren, welcher therapeutisch gesehen als monoklonaler Antikörper einen definierten HLA-Komplex mit beladenem Peptid spezifisch erkennt und über die Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität, Komplement-vermittelt aber auch unabhängig vom Immunsystem Tumorzellen zerstören kann.⁷⁹ Hierdurch ist dieser Therapieansatz im Vergleich zur Vakzinierung nicht so strikt abhängig von T-Lymphozyten auch wenn die Zerstörung der Tumorzellen immer noch meistens das Immunsystem benötigt.

Gegenüber herkömmlichen monoklonalen Antikörpern besitzt der TCRm-Antikörper den großen Vorteil, dass er intrazelluläre Zielstrukturen über deren HLA-präsentierte Epitope zielgerichtet angreifen kann. Ein Nachteil besteht an der deutlich geringeren Dichte an exprimierten HLA-Molekülen im Vergleich zu z.B. der Expression des EGFR. So liegt die übliche Häufigkeit eines HLA-

präsentierten Epitops pro Zelle bei etwa 100 - 1.000, für typische Oberflächenantigene bei ca. 20.000 - 500.000 pro Zelle.⁸⁰

Die Auswahl der möglichen Zielstrukturen erfolgt analog zu denen der Peptidvakzinierung. So wurden z.B. viele grundlegende Arbeiten zu TCRs mit den Antikörpern ESK1 und ESKM durchgeführt, deren Spezifität gegen ein Peptid aus WT1 gerichtet ist, welches auf dem HLA-A*02-Subtyp präsentiert wird und auch in klinischen Studien bereits positive Ergebnisse bei der Therapie von Leukämien gezeigt hat.⁸¹ Andere TCRs wie RL6A gegen die p68 RNA helicase, RL4B gegen hCG- β (humanes Choriogonadotropin) und RL1B gegen Her2 werden in Brustkrebsmodellen getestet⁸² sowie 8F4 im Rahmen der akuten myeloischen Leukämie⁸³. Eine bekannte Hürde bei der Therapie mit TCRs aber auch bei Peptidvakzinierung stellt die Downregulation der HLA-Moleküle auf Tumorzellen dar.⁸⁴ Möglicherweise lässt sich dies durch die parallele Applikation von Interferon- γ antagonisieren, da dieses Zytokin seinerseits die HLA-Expression heraufregulieren kann.⁸⁵

Insgesamt sind die TCRs somit eine sehr junger Therapieansatz dessen Potential sicherlich noch nicht ausgeschöpft ist und in Zukunft eine mögliche Ergänzung zur Peptidvakzinierung darstellt.

Zusammenfassend bilden die drei vorgestellten Immuntherapien reizvolle sowie elegante Ansätze. Ähnlich zur Peptidvakzinierung bieten TCRs hohe Spezifität und Sicherheit bei der Therapie, werden aber durch das Immunoediting des Tumors beeinflusst. Dieses wird durch Checkpoint-Modulatoren effizient umgangen, das immunsuppressive Milieu der Karzinome kann aber nicht in allen Fällen effektiv durchbrochen werden. Ein großes Potential besteht weiterhin in Kombinationstherapien wie z.B. von Peptidvakzinierung oder TCRs mit Checkpoint-Inhibition. Die Verbindung von spezifischer und unspezifischer Immuntherapie betont die Stärken beider Ansätze und könnte auch in gestaffelter Applikation mit initialer Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren, gefolgt von einer Peptidvakzinierung als Erhaltungstherapie ein neues Therapiekonzept für die Behandlung vieler Malignome darstellen.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Grundlage für Peptidvakzinierungen liegt in der ausführlichen Analyse von HLA-Liganden, um tumorspezifische Antigene und Peptide detektieren zu können, welche später gegebenenfalls als Impfpeptide Verwendung finden. In den vergangenen Jahren zeigten die durchgeführten Vakzinierungsstudien noch nicht den Erfolg, den man sich von diesem Ansatz erhofft hatte.

Eine mögliche Ursache liegt in der Vorauswahl der eingesetzten Peptide. Durch die enorme Entwicklung der massenspektrometrischen Analyse von Peptiden und somit auch von HLA-Liganden vervielfachte die Ausbeute an identifizierten potentiellen Zielstrukturen. Andererseits wurde hierdurch die Auswahl der einzusetzenden Peptide deutlich erschwert. Während früher über die Durchsicht der Zielantigene biologisch sinnvolle HLA-Liganden für die weitere Testung ausgesucht werden konnten, verbietet sich dies heute bereits durch deren bloße Anzahl.

Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit einer systematischen Methodik zur Evaluation potentieller tumorassoziierter Antigene und hieraus abgeleiteter HLA-Liganden für Peptidvakzinierungen. Als Werkzeugzeug für diese Fragestellung wurden Netzwerkanalysen ausgewählt, da diese in der Lage sind, funktionelle Gemeinsamkeiten innerhalb großer Gruppen von Antigenen herauszuarbeiten. Hieraus ergeben sich schließlich die zwei zentralen Fragestellungen dieser Arbeit:

1. Kann für das Nierenzellkarzinom über die systematische Netzwerkanalyse einer großen Anzahl von HLA-Liganden analog zu vorangegangenen Arbeiten auf der HLA-Liganden und mRNA-Ebene, eine funktionelle Gemeinsamkeit zwischen Tumoren und deren Metastasen im Gegensatz zu einem korrespondierenden Normalgewebe festgestellt werden?
2. Lassen sich aus möglichen Gemeinsamkeiten, z.B. durch übermäßig involvierte Signalwege, neue tumorassozierte Antigene und somit auch HLA-Liganden identifizieren, welche für Peptidvakzinierungen geeignet sind?

Diese Fragen sollen anhand von Gewebeproben von metastasierten Nierenzellkarzinomen beantwortet werden. Auf der anderen Seite soll der hier entwickelte Algorithmus allgemein auf weitere Karzinomentitäten übertragbar sein, um in anschließenden Arbeiten neue Einblicke in das HLA-Ligandom anderer Karzinome zu erlangen.

2 Material und Methoden

2.1 Vom Gewebe zum Peptid

Für die spätere massenspektrometrische Analyse ist es zwingend notwendig, Gewebeproben in ihre Einzelteile aufzuschließen und hieraus die zu untersuchenden HLA-Liganden zu isolieren. Zusammengefasst geschah dies durch die schrittweise Zerkleinerung des Gewebes, das Aufbrechen von Zellmembranen und die Trennung von HLA-Komplexen mit den assoziierten Peptiden von sämtlichen anderen Bestandteilen der Zellen. Die Einzelschritte dieser Methode werden in den folgenden Unterkapiteln beschrieben.

2.1.1 Auswahl von Patienten und Gewebeproben

Insgesamt erfolgte in dieser Arbeit die HLA-Ligandomanalyse von 17 Gewebeproben, welche von sechs Patienten gewonnen wurden. Die Gewebeentnahme wurde durch die Klinik für Urologie am Universitätsklinikum Tübingen durchgeführt. Angestrebt wurde die Bereitstellung von drei unterschiedlichen Gewebeentitäten aus demselben Patienten: primäres Nierenzellkarzinom, Metastase und gesundes Nierengewebe.

Um eine mögliche Infiltration durch Tumorausläufer zu minimieren, wurde das gesunde Gewebe mit größtmöglichem Abstand zum Primärtumor entnommen. Falls möglich, erfolgte die Entnahme aller drei Proben während einer einzigen Operation. In manchen Fällen erfolgte die Gewinnung von Metastasen zweizeitig, da zum Zeitpunkt der Nephrektomie noch keine Metastasen detektiert werden konnten. Im Anschluss an die Operation erfolgte die primäre Konservierung der Resektate in flüssigem Stickstoff bei ca. -196 °C sowie die weitere Aufbewahrung bis zur Verwendung bei -80 °C.

Eine in dieser Arbeit verwendete vermeintliche Metastase (RCC210M) wurde nach ihrer Aufarbeitung histologisch als Nebennierenrindenadenom klassifiziert, dementsprechend in der Folge als nicht maligne Probe gewertet und als RCC210A geführt. Somit standen insgesamt vier komplette Triplets aus primärem Karzinom, Metastase und gesundem Gewebe zur Verfügung (RCC70, RCC329, RCC377, RCC399). Ergänzt wurden diese durch eben genanntes Triplett, in welchem das metastatische Gewebe durch ein Adenom ersetzt war

(RCC210) und ein Duplett aus zwei Metastasen von unterschiedlichen Lokalisationen von einem einzelnen Patienten (RCC297).

Zusätzlich wurde den Studienteilnehmern perioperativ 10 ml EDTA-Blut zur HLA-Typisierung entnommen. Die Analyse wurde im Zentrum für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt.

Alle Patienten willigten nach ausführlicher Aufklärung über Durchführung und Zielsetzung der Studie uneingeschränkt in die Teilnahme ein. Zur Studie „T-Zellepitope für die Immuntherapie des Nierenzellkarzinoms liegt ein positives Votum der Ethikkommission Tübingen unter der Nummer 438/2004V vor.

2.1.2 Isolierung von HLA-Liganden aus Gewebeproben mittels Immunpräzipitation und Ultrazentrifugation

Die Extraktion der HLA-Peptid-Komplexe erfolgte in mehreren Schritten. Sie umfasste erstens die Lyse der Gewebszellen und das in Lösung Bringen von membranständigen Proteinen mit anschließender Entfernung von Zelldetritus. Zweitens die Herstellung einer BrCN-aktivierten Sepharosesäule mit Kopplung von HLA-spezifischen Antikörpern und drittens die Affinitätschromatographie mit Isolierung und konsekutiver Elution von HLA-Komplexen und den darin gebundenen Peptiden. Abschließend wurden die HLA-Liganden mittels Ultrazentrifugation von ihren Proteinkomplexen getrennt.

2.1.2.1 Herstellung des Gewebelysats

Zur Konservierung von Proteinen und Peptiden wurden die folgenden Schritte in einem Kühlraum bei 4 °C sowie in Zentrifugen der gleichen Temperatur durchgeführt. Jede Probe wurde gewogen und mit gleichem Volumen eines doppelt konzentrierten Aufschlusspuffers versetzt (zur Vereinfachung wurde eine identische Dichte bei Puffer und Gewebe angenommen). Die Pufferlösung beinhaltete PBS, 0,6%ige CHAPS-Lösung und Proteasominhibitoren (cOmplete™, Roche).

Im noch gefrorenen Zustand wurde das Gewebe mit einem Skalpell möglichst gut zerteilt und nach weiterer Zugabe von zwei Volumenäquivalenten der Ausgangsmenge mit einem Potter (Heidolph; RZR2020) homogenisiert. Nach

weiterer Verdopplung des nun vorhandenen Volumens mittels PBS entstand somit ein homogenes Gewebelysat in einfach konzentriertem Lysepuffer.

Zur optimalen Einwirkung des Lysepuffers wurde die Lösung nun unter kontinuierlichem leichtem Rühren (Magnetrührer RCT basic, IKA) für eine Stunde inkubiert und anschließend dreimal für 20 Sekunden bei einem Tastgrad von 50 %, mit Pausen von mindestens 40 Sekunden zur Abkühlung der Proben, sonifiziert (Sonifier 250, Branson Ultrasonics). Ziel dieses Schrittes war das Aufschließen der Zellmembranen sowie intrazellulärer Membranverbände. Im Anschluss erfolgte erneut eine einstündige Inkubation auf dem Magnetrührer (RCT basic, IKA).

Die Trennung von Zelldetritus und in Lösung gegangener Proteine wurde durch eine zunächst 20-minütige Zentrifugation bei 4000 rpm (Heraeus Instruments, Megafuge 1.0 R) gewährleistet. Der hieraus gewonnene Überstand wurde in mehrere 2 ml große Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und nochmals für 90 Minuten bei 13 000 rpm zur Elimination von Restpartikel zentrifugiert (Biofuge 13, Heraeus). Abschließend wurde der zweite Überstand sterilfiltriert (Sartolab-P20 plus; Porengröße 0.2 µm), um somit ein möglichst reines Gewebelysat zu erhalten.

2.1.2.2 Vorbereitung der Agarosesäule durch Kopplung mit HLA spezifischen Klasse I und Klasse II Antikörpern

Als stationäre Phase der folgenden Affinitätschromatographie wurde mit Bromcyan aktivierte Agarose mit dem Handelsnamen CNBr-aktivierte SepharoseTM 4B (Amersham Pharmacia Biotech) verwendet. Zunächst wurden pro 1 mg später verwendetem Antikörper 40 mg lyophilisierte Sepharose mit 1 mM HCl für 30 Minuten in einem 15 ml Falcon Tube gewaschen, um Zusätze des Herstellers zu entfernen.

Nach dem Abzentrifugieren der Sepharose für 4 min bei 4 °C und 300 rpm ohne Bremse (Heraeus Instruments, Megafuge 1.0 R) wurde diese in Kopplungspuffer (bestehend aus 0,5 M NaCl und 0,1 M NaHCO₃ sowie eingestelltem pH von 8,3 mittels NaOH) wieder aufgenommen und pro Gramm Gewebe 1 mg Antikörper zugesetzt. Bei Proben mit einer Masse von weniger

als 1 g wurden auf Grund der Handhabbarkeit dennoch 40 mg Sepharose und 1 mg Antikörper als Mindestmenge verwendet.

Bei den verwendeten Antikörpern handelte es sich um den HLA-Klasse I Antikörper W6/32, welcher als Zielantigene HLA-A, HLA-B und HLA-C spezifisch erkennt und bindet⁸⁶, sowie den Antikörper L243, der eine Spezifität für alle Untergruppen des HLA-DR Komplexes aufweist.⁸⁷ Beide Antikörper gehören der Antikörperklasse IgG_{2a} an.

Die Sepharose, der Kopplungspuffer sowie die Antikörper wurden insgesamt 2 Stunden bei Raumtemperatur in einem Rotator inkubiert. Zu Beginn und am Ende dieser Inkubationszeit wurde nach erneuter Zentrifugation mit 300 rpm für 4 Minuten bei 4 °C ohne Bremse photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm über die Absorptionsrate die relative Antikörper- bzw. Proteinkonzentration im Überstand bestimmt. Nach dieser Zeit wurde eine Kopplungseffizienz von mindestens 95 % gefordert, welche stets eingehalten werden konnte.

Nach erfolgreicher Kopplung des Antikörpers an die BrCN-Sepharose wurden verbliebene reaktive Imidocarbamat-Reste mittels 0,2 M Glycin-Lösung innerhalb einer Stunde bei Raumtemperatur im Rotator abgesättigt und somit blockiert. Es folgten zwei Waschschriffe, bei welchen die Sepharose im Anschluss an erneutes Abzentrifugieren unter oben genannten Einstellungen und Absaugen des Überstandes jeweils wieder in PBS aufgenommen wurde. Die derart präparierte Sepharose konnte anschließend in Minisäulen (Pierce Spin Columns 900 µl, Thermo Fischer Scientific) für die Affinitätschromatographie überführt werden. Eine Äquilibration der Säulen wurde über 1 Stunde mittels Lysepuffer bei einer Flussrate von 1 ml/min durchgeführt.

2.1.2.3 Isolierung von HLA-Komplexen aus Gewebelysaten mittels Affinitätschromatographie

Durch das Zusammenführen von Gewebelysate und der mit Antikörpern gekoppelten Sepharosesäule gelang schließlich die Extraktion der HLA-Komplexe mit den daran gebundenen Peptiden. Die nachfolgenden Schritte wurden alle im Kühlraum bei 4 °C durchgeführt.

Hierzu wurden zwei in 2.1.2.2 hergestellte Säulen - eine versehen mit HLA-Klasse I und eine mit HLA-Klasse II spezifischen Antikörpern - in ein zyklisches System geschaltet, so dass das Gewebelysat bzw. die nunmehr noch vorhandene Lösung aus unterschiedlichen Proteinen kontinuierlich für mindestens 12 Stunden mit einer Flussrate von 1 ml/min mittels einer peristaltischen Pumpe (Peristaltische Pumpe P-1, Amersham Pharmacia Biotech) über die Säulen gepumpt wurde. Es folgten zwei Waschschrirte, der erste mit PBS für 30 Minuten und ein weiterer mit destilliertem Wasser für 60 Minuten.

Die Elution der HLA-Peptid-Komplexe erfolgte, nachdem die Säulen beinahe trocken laufen gelassen wurden, siebenmal mit 60 µl 0,2%iger TFA, wobei bei der ersten Elution 10 µl 10%ige TFA zugesetzt wurde. Zur Vermeidung einer Kontamination mit Polyethylenglykol (PEG) wurde die TFA mit einer Hamiltonspritze (Mikroliterspritze Hamilton Gastight Syringe, CS-Chromatographie Service GmbH) aufgetragen und das Eluat nach 20-minütiger Inkubationsdauer in mit 0,2%iger TFA vorgewaschene Centrikons (Zentrifugalkonzentratoren Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units, 10 kDa, Millipore) überführt.

2.1.2.4 Dissoziation von HLA-Liganden von HLA-Peptid-Komplexen mittels Ultrafiltration

Für die endgültige Gewinnung der HLA-Liganden wurden Zentrifugalkonzentratoren (s.o.) eingesetzt. Durch die nicht kovalente Bindung der Peptide an ihren jeweiligen HLA-Peptid-Komplex konnten mittels Ultrafiltration diese beiden Komponenten voneinander getrennt werden. Die eingesetzten Filter wurden mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa gewählt, so dass die Peptide mit einer vermuteten Masse von ca. 1,1 kDa für Klasse I und 2,5 kDa für Klasse II problemlos den Filter passierten. Andere Komponenten des Komplexes (α - und β -Untereinheiten beider HLA-Komplexe, β_2 -Mikroglobulin sowie schwere und leichte Kette der IgG-Antikörper) mit einer minimalen Masse von 12 kDa für β_2 -Mikroglobulin wurden dagegen zurückgehalten. Auch möglicherweise unspezifisch gebundene Proteine konnten hierbei aussortiert werden.

Anschließend erfolgte die Ultrafiltration bei 10.000 rpm und 4 °C (Biofuge 13, Heraeus) im Dauerbetrieb bis zur endgültigen Filtration des gesamten Volumens sowie die Konservierung der Proben bei -80 °C.

Zur Volumenreduktion in Hinblick auf die massenspektrometrische Analyse wurden die gefrorenen Proben abschließend lyophilisiert (Vaco5, ZIRBUS), so dass mittels Sublimation das vorhandene Lösungsmittel eliminiert wurde. Die Aufbewahrung bis zur weiteren Verarbeitung fand bei -20 °C statt.

2.2 Vom unbekanntem Peptid zum Frequenzspektrum mit Hilfe der Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist ein essentieller Bestandteil der naturwissenschaftlichen Analytik und hat im Bereich der Proteomik in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen.

Zusammengefasst ist das Massenspektrometer in der Lage, die Masse-zu-Ladung-Verhältnisse ionisierter Moleküle in der Gasphase zu bestimmen. Im ersten Schritt erzeugt eine Ionenquelle die notwendigen geladenen Teilchen, ein Massenanalysator trennt im Anschluss die Ionen gemäß ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/q bzw. m/z) auf, um diese abschließend mit einem Detektor qualitativ an Hand des m/z -Wertes sowie quantitativ in Bezug auf ihre relative Menge zu registrieren.

Hierbei ist darauf zu achten, dass besonders die Ionisation bei der Analyse von Biomolekülen wie Peptiden oder Proteinen sehr schonend gewählt werden sollte, da die Gefahr von Bindungsbrüchen während der Ionisation sehr hoch ist. Alle folgenden Experimente wurden daher mit der Elektrospray-Ionisation (ESI) durchgeführt. Als Messinstrument wurde ein LTQ-Orbitrap-Hybrid-Massenspektrometer (Typ LTQ Orbitrap XL, Thermo Fisher Scientific) verwendet. Im Folgenden werden diese Form der Ionisation sowie eben genanntes Massenspektrometer näher erläutert.

2.2.1 Elektrospray-Ionisation (ESI)

Unter den unterschiedlichen Möglichkeiten zur Ionisierung von Molekülen zählt die Elektrospray-Ionisation zu den schonendsten und ist somit für die Analyse von vergleichbar fragilen Peptiden das Mittel der Wahl. Das Charakteristikum

dieser Methode ist das Versprühen von Ionen über eine sehr enge Kapillare aus der flüssigen Phase in die Gasphase unter Einwirkung eines elektrischen Feldes, wie in Abbildung 8 dargestellt.

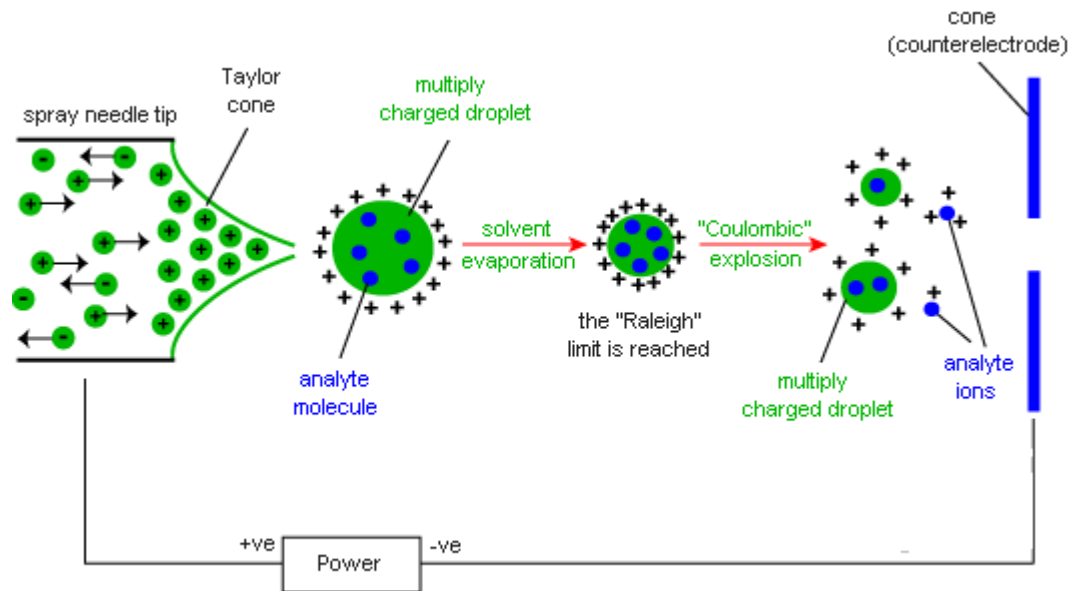


Abbildung 8. Mechanismus der Elektrospray-Ionisation. An der Spitze der Metallkapillare bilden sich mehrfach geladene Tröpfchen. Durch Verdunstung der Flüssigkeit konzentrieren sich die Ladungen innerhalb des Partikels auf, bis es nach Erhaltung des Rayleigh-Limits zu Coulomb-Explosionen kommt und die freigesetzten Ionen von der Gegenelektrode detektiert werden können; Quelle: <http://www.bris.ac.uk/nerclsmf/images/esi2.gif>.

Im Detail bedeutet dies, dass sich nach Aufnahme und Einspritzen der Probe im Konus der verwendeten Metallkapillare je nach Lösungsmittel gleichsinnig positiv oder negativ geladene Teilchen aufkonzentrieren und einen so genannten Taylor-Kegel bilden.⁸⁸ Aus diesem Kegel treten dadurch an der Spitze der Kapillare ca. 10 µm durchmessende Tröpfchen aus und bilden ein Aerosol in der Gasphase. Durch die im elektrischen Feld zwischen den Elektroden entstehende Wärme verdunstet nun Flüssigkeit aus diesem Tröpfchen, wodurch sich dessen Volumen verringert und die Ladungsdichte an der Oberfläche zunimmt. Ab einem gewissen Punkt, der Rayleigh-Grenze, überschreitet die Abstoßungsenergie der gleichsinnig geladenen Teilchen an

der Oberfläche die Oberflächenspannung des Tröpfchens und dieses zerfällt unter einer Coulomb-Explosion in noch kleinere Partikel von wenigen Nanometern Größe.^{89,90}

Für den abschließenden Übergang der einzelnen Ionen in die Gasphase existiert bisher keine eindeutige Lehrmeinung. Zwei Modelle werden jedoch favorisiert, welche in Abbildung 9 illustriert werden:

- Das Modell des geladenen Rückstands (Charge Residue Model, CRM) nach Dole postuliert, dass während der Coulomb-Explosionen derart kleine Partikel mit ca. 1 nm Durchmesser entstehen, so dass diese letztlich nur ein einzelnes ionisiertes Molekül enthalten können.^{91,92}
- Das Ionenemissionsmodell (Ion Evaporation Model, IEM) nach Iribarne und Thomson dagegen ist der Ansicht, dass bereits vor den Coulomb-Explosionen aus größeren Tropfen mit hoher Ladungsdichte einzelne Ionen in die Gasphase emittiert werden können.⁹³

In jedem Fall gelangen die auf einem der skizzierten Wege entstandenen ionisierten Peptide letztlich in der Gasphase in das Massenspektrometer.⁹⁴

Zur Optimierung des gesamten Ionisationsprozesses wird gemäß den Forschungsergebnissen von John B. Fenn (Nobelpreis für Chemie, 2002) zwischen der Metallkapillare und der Gegenelektrode, der Interface-Platte, ein Spannungspotential von 2-3 kV angelegt.⁹⁵ Die Entstehung des Ionensprays im elektrischen Feld wird dabei durch ein koaxial zur Kapillare eingebrachtes nebulizer gas (Stickstoffgas) unterstützt. Im Gegensatz zur späteren Analyse der Peptide im Hochvakuum findet die Ionisation bei Atmosphärendruck statt. Damit keine Neutralteilchen aus diesem Bereich in das Vakuum gesaugt werden und die Analyse beeinträchtigen, wird am Übergang zum Massenspektrometer, der Mikroöffnung mit ca. 100 µm Durchmesser, eine lokale Druckerhöhung provoziert.

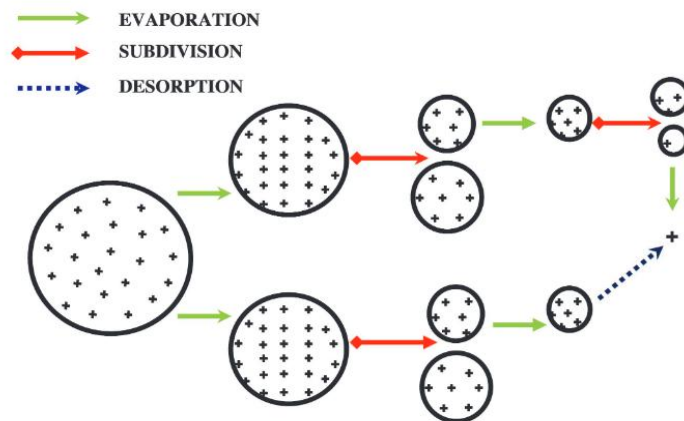


Abbildung 9. Modelle der Ionenbildung bei Elektrospray-Ionisation. Skizzierung der beiden etablierten Hypothesen zur Entstehung von gasförmigen Ionen aus geladenen Tropfen. Im oberen Teil des Bildes das Modell des geladenen Rückstands, im unteren Teil das Ionenemissionsmodell; nach Nguyen et al. 2007.⁹⁶

Diese entsteht durch das Einbringen eines curtain gas (erhitztes Stickstoffgas) senkrecht zur Flugrichtung der Ionen.⁹⁷ Ein zusätzlicher Effekt des curtain gas ist die Verbesserung der Evaporation des Lösungsmittels und damit die raschere Volumenreduktion der Tröpfchen durch seine Wärme und den Gegenstrom zu den Ionen.

Ein weiteres Charakteristikum der Elektrospray-Ionisation sind typische Übersichtsspektren mit Serien von teilweise Dutzenden Ionensignalen, welche sich lediglich in der Anzahl angelagerter Protonen unterscheiden und dem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis gemäß der Formel $m/z = (M + nH^+)/n$ folgen, wobei M die Masse des Peptids und n die Anzahl der angelagerten Protonen (H^+) beschreibt. Die Bildung solcher mehrfach geladener Ionen $[M + nH^+]^{n+}$ ist häufig bei der Anwendung der ESI zu finden und die Ursache des eben geschilderten Phänomens. Im Massenbereich von etwa 0,8 bis 2 kDa, in welchem die meisten Peptide detektiert werden, finden sich überwiegend zwei- und dreiwertige Ionensignale, die über charakteristische Isotopenabstände, z.B. 0,5 Da bei zweifach geladenen Ionen, detektiert werden können und somit die Identifizierung erleichtern.

2.2.2 Orbitrap Massenspektrometer

Im Jahr 2000 publizierte Alexander Makarov seine Weiterentwicklung bisher vorhandener Ionenfallen-Massenspektrometer, das Orbitrap Massenspektrometer.⁹⁸ Seit 2005 sind Orbitrap Massenspektrometer kommerziell erhältlich. Alle Messungen für diese Arbeit wurden auf einem LTQ-Orbitrap-Hybrid-Massenspektrometer (Typ LTQ Orbitrap XL, Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Insgesamt lassen sich folgende fünf Hauptbestandteile der LTQ Orbitrap XL unterscheiden: Die Ionenquelle, die lineare Ionenfalle, die C-Trap, der Orbitrap Massenanalysator und die HCD-Kollisionszelle wie sie in Abbildung 10 gezeigt werden. Im Folgenden wird der Weg eines Moleküls durch das Massenspektrometer beschrieben.

Nachdem das Analysat wie unter 2.2.1 beschrieben mittels der ESI-Ionenquelle in gasförmige Ionen überführt wurde, werden diese durch drei Quadrupole geleitet. Die ersten beiden werden als Führungs- und Transportquadrupol bezeichnet. Die Hauptfunktion dieser beiden Quadrupole ist neben dem Transport eine Vorselektion der Ionen nach deren Masse.

Ein Quadrupol besteht aus zwei sich parallel gegenüberliegenden Dipolen, welche meist quadratisch, d.h. mit identischem Abstand zwischen jedem einzelnen Pol angeordnet werden.

Die Flugbahn eines Ions durch den Quadrupol kann durch ein elektromagnetisches Feld, welches über die Dipole durch Anlegen einer Gleich- und überlagerten Wechselspannung erzeugt wird, beeinflusst werden.

Insgesamt bewegt sich somit das Ion auf einer Sinuskurve mittig durch den Quadrupol. Die beschriebene Kurve ist bei konstant gehaltener Spannung und angelegtem Vakuum (im Führungsquadrupol $p = 10^{-2}$ mbar und Transportquadrupol $p = 10^{-5}$ mbar) im Idealfall lediglich von der Masse des Ions abhängig. Umgekehrt kann somit durch die Wahl der Amplitude der Wechselspannung bestimmt werden, ob ein Ion seiner Masse entsprechend den Quadrupol passieren kann oder auf Grund eines zu starken Ausschlags mit den Metallstäben kollidiert und damit absorbiert wird.

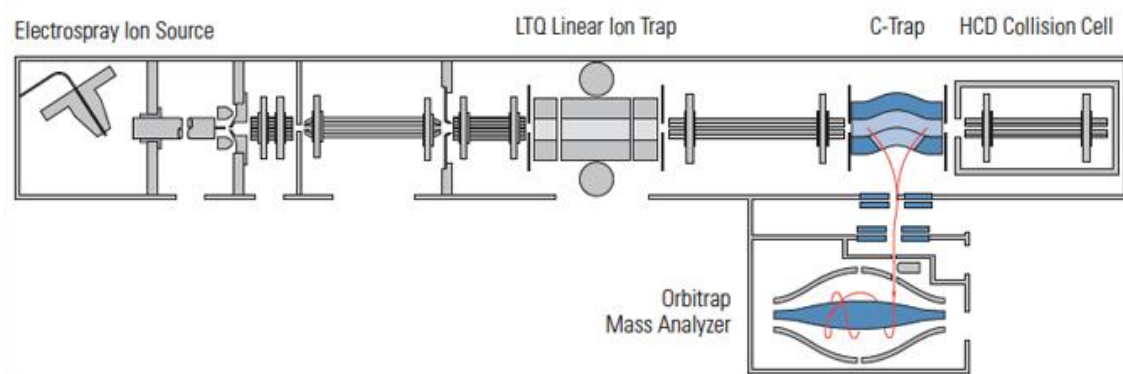


Abbildung 10. Schematischer Aufbau der LTQ Orbitrap XL. Das Analysat passiert die Hauptkomponenten der Orbitrap in der Reihenfolge Ionenquelle (Electrospray Ion Source), lineare Ionenfalle (LTQ Linear Ion Trap), C-Trap und Orbitrap Massenanalysator (Orbitrap Mass Analyzer). Die HCD Kollisionszelle (HCD Collision Cell) wurde für Analysen in dieser Arbeit nicht verwendet; Quelle: http://planetorbitrap.com/data/fe/image/LTQXL_Schema%281%29.png.

Als dritter Quadrupol wird der Speicherquadrupol passiert. Dieser dient nicht nur, wie der Name suggeriert, der Speicherung entstandener Gasionen, sondern auch als Kollisionskammer. Bei diesem zur Peptidanalyse essentiellen Bestandteil eines Massenspektrometers werden die einströmenden Ionen ebenfalls im Vakuum ($p = 10^{-3}$ mbar) unter dem Einfluss einer Beschleunigungsspannung von ca. 15 - 60 V mit Edelgasmoleküle, z.B. Argon oder Helium zur Kollision gebracht. Die hierbei übertragene kinetische Energie wird teilweise in Schwingungsenergie übertragen, was zu Brüchen der Peptidbindungen vornehmlich zwischen dem Carbonylkohlenstoff- und dem Amidstickstoffatom und zur Entstehung von Fragmentionen führt, was als collision-induced dissociation (CID) bezeichnet wird.

Im Gegensatz zu den ersten beiden Quadrupolen funktioniert dieser dritte Speicherquadrupol aber auch als die eigentliche Ionenfalle. Die Grundlagen für die Fokussierung und somit Speicherung von geladenen Teilchen in einem elektromagnetischen Feld wurde bereits 1923 durch Kingdon gelegt.⁹⁹ Für die praktische Umsetzung verwendet die lineare Ionenfalle der Orbitrap einen

Quadrupol, welcher durch zwei Isolatorringe in drei Teile geteilt wird, sowie endständige Endkappenelektroden nach folgendem Schema:

Ähnlich dem Führungs- und Transportquadrupol werden Ionen mittels der beiden Dioden des Quadrupols durch die angelegte Gleich- sowie die überlagerte Hochfrequenzwechselfrequenz von ca. 1 MHz in der Ebene des Quadrupols (x-y-Ebene) fokussiert. Zeitgleich wirkt eine defokussierende Kraft zwischen den Endkappenelektroden (z-Achse). Im Moment des Phasenwechsels werden die fokussierenden und defokussierenden Kräfte ausgetauscht und die Ionen in Bezug auf die z-Achse ausgerichtet. Wählt man die Wechselfrequenz der Spannung hoch genug, so werden die defokussierenden Kräfte minimiert und es gelingt eine dreidimensionale Speicherung der Ionen innerhalb des Speicherquadrupols. Schließlich können die so gespeicherten Ionen durch Erhöhung der Amplitude der Wechselstromspannung aus der Ionenfalle wieder herausgeschleudert und vom Detektor analysiert werden. Dieser benutzt hierzu Sekundärelektronenvervielfacher (SEV), wobei aus den auftreffenden Ionen mittels einer vorgeschalteten Konversionsdynode sekundäre Ionenströme erzeugt werden, die wiederum durch weitere Dynoden amplifiziert werden können, um die Detektion zu erleichtern.¹⁰⁰

Die letzte Besonderheit des Speicherquadrupols liegt in der Möglichkeit die passierenden Ionen mit einer minimalen Zeitverzögerung weiterzugeben. Dies ist unter anderem notwendig, da die kontinuierliche Produktion von Gasionen aus der Elektrospray-Ionisation im Widerspruch zur pulsartigen Analyse in der Orbitrap steht. Daher wurde am Ende des Speicherquadrupols eine Ringelektrode installiert, an welcher eine geringe Gleichstromspannung angelegt werden kann. Das entstehende Potential dieser Spannung bewirkt ein Abbremsen der ankommenden Ionen, so dass sich diese aufkonzentrieren und nach 10 - 400 ms in der Lage sind, über einen elektrischen Impuls die Linse am Ende des Quadrupols zu öffnen. Die bei der Öffnung entstehende Ladungsdifferenz zum Raum hinter der Linse resultiert in einer hohen Stromstärke, so dass die akkumulierten Ionen rasch (100 - 200 ns) in das nächste Kompartiment, die C-Trap, weitergeleitet werden.^{100,101}

Die C-Trap selbst ist eine leicht gekrümmte, aber dennoch als linear einzustufende Ionenfalle, woher sich ihr Name ableitet. Zum Weitertransport der Ionen werden Linsensysteme verwendet, wodurch die C-Trap in der Lage ist, die Ionen entweder in Richtung der HCD-Kollisionskammer oder in den Orbitrap Massenanalysator abzulenken. Die eben erwähnte HCD-Kollisionskammer ist für hochenergetische Kollisionen (higher-energy collisional dissociation, HCD) vorgesehen und wird im Rahmen dieser Arbeit nicht verwendet.

Somit gelangen die Ionen ausschließlich in den Orbitrap Massenanalysator, dessen Aufbau in Abbildung 11 dargestellt wird. Zentral befindet sich eine spindelförmige Elektrode, welche von einer zylindrischen, in der Mitte durch einen Isolerring getrennten, Elektrode umgeben wird. Zwischen den beiden Elektroden entsteht ein elektrostatisches Feld, in welches die Ionen tangential zur spindelförmigen Elektrode mit einer gewissen Geschwindigkeit eingebracht werden. Beim Eintritt in die Orbitrap wirkt somit zum einen die Anziehungskraft der axialen Elektrode im elektrostatischen Feld als auch die Tangentialgeschwindigkeit direkt auf die Ionen ein. Aus dem Gleichgewicht beider Kräfte resultiert eine oszillierende Flugbahn mit einem durch die Tangentialgeschwindigkeit definierten Radius r um die axiale Elektrode in Richtung der z-Achse.

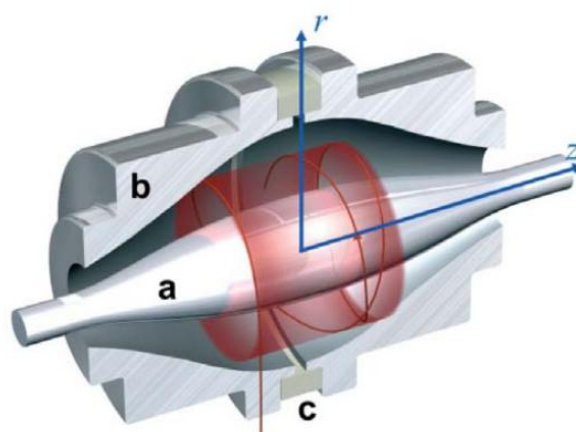


Abbildung 11. Längsschnitt durch einen Orbitrap Massenanalysator. Im Inneren der Orbitrap befindet sich zentral eine spindelförmige Elektrode (a), welche von einer zylindrischen äußeren Elektrode (b) umgeben wird. Zwischen den beiden Elektroden entsteht ein elektrostatisches Feld (roter Zylindermantel). Die äußere Elektrode wird durch einen Keramikring (c) in zwei Hälften unterteilt. Werden Ionen tangential zur inneren Elektrode in die Orbitrap eingebracht, bewegen sich diese oszillierend (rote Linie) mit einem definierten Radius (blaue r-Achse) um die spindelförmige Elektrode (blaue z-Achse) im rot unterlegten elektrostatischen Feld zwischen den Elektroden; nach Scigelova et al. 2006.¹⁰²

Da die Amplitude dieser Oszillation für alle Ionen identisch ist und es sich um harmonische Oszillationen handelt¹⁰³, lässt sich das Ladung-zu-Masse-Verhältnis der Ionen nach folgender Formel berechnen^{98,100}:

$$\omega = \sqrt{\frac{z}{m} k}$$

ω = Kreisfrequenz der Oszillation

m = Masse

z = Ladung

k = Feldkrümmung.

Da die Feldkrümmung durch die Elektroden konstant gehalten wird, ist das Ladung-zu-Masse-Verhältnis somit direkt proportional zur Kreisfrequenz der Oszillation der Ionen.

Die Messung bzw. Berechnung dieser Frequenz wird durch den räumlichen Aufbau der Orbitrap erleichtert. Die Halbierung der äußeren Elektrode begünstigt die Entstehung so genannten Spiegelströme, die sich aus der axialen Bewegung der Ionen ergeben und mit Hilfe eines Differenzverstärkers an den äußeren Elektroden detektiert werden können. Die so in einem definierten Zeitintervall erhaltenen Stromstärken werden abschließend unter Verwendung einer schnellen Fourier-Transformation zur Entzerrung der

überlagerten Signale (fast Fourier transform, FFT) in deren einzelne Masse-zu-Ladung-Verhältnisse in Form eines Massenspektrums umgerechnet.^{104,105}

Unter den hiermit gegebenen technischen Voraussetzungen sind unterschiedliche Messmethoden denkbar. Bei einer „high-high“-Strategie wird versucht, die bestmögliche Massengenauigkeit und Auflösung zu erzielen. Hierfür wird die Massenanalyse der Vorläufer- aber auch der Fragmentionen in der Orbitrap durchgeführt. Die Fragmentierung selbst findet dabei notwendiger Weise in der HCD-Kollisionskammer statt. Der Nachteil dieser Methode ist der hohe Zeitaufwand der Messung und somit die Gefahr einer geringeren Detektionsrate von Peptiden. Im Gegensatz dazu findet bei der „high-low“-Methode ausschließlich die Messung der Vorläuferionen in der Orbitrap statt. Fragmentionen dagegen werden in der linearen Ionenfalle LTQ (linear trap quadrupole) erzeugt und gemessen. Für das Zugeständnis einer geringeren Auflösung gelingt in diesem Setting jedoch die Messung durch den Einsatz zweier Massenanalytoren deutlich schneller und letztlich auch sensitiver.¹⁰⁶ Für die Analyse von HLA-Liganden sind die letzteren Einstellungen deutlich attraktiver, da bei begrenzter Verfügbarkeit und Menge der Gewebeproben eine möglichst hohe Sensitivität und Ausbeute erzielt werden sollte. Dementsprechend wurden alle Proben dieser Arbeit nach der „high-low“-Methode analysiert.

Hierfür wurden Vorläuferionen für 500 ms gepoolt und anschließend in der Orbitrap im MS-Modus für 1 s analysiert (MS¹). Aus dem Übersichtsscan der gemessenen Ionen wurden mittels einer Steuerungssoftware die fünf Peptide mit der höchsten Signalintensität für die Fragmentierung und den MS/MS-Scan (MS²) in der linearen Ionenfalle ausgewählt. Ein solches Vorgehen mit Vorselektion der zu fragmentierenden Ionen wird als datenabhängige Akquisition oder zielgerichtete Massenspektrometrie bezeichnet.

Zusammenfassend liegt das Auflösungsvermögen der LTQ Orbitrap XL bei diesem Vorgehen zwischen 7.500 und 100.000 FWHM (full width at half maximum), welches als $R = m/\Delta m$ berechnet wird und angibt, bei welchem Massenunterschied zwei Massen noch als getrennt erkannt werden können. Das bedeutet, dass z.B. bei einer FWHM von 10.000 ein Peptid mit einer Masse

von 1.000 Da von einem Peptid mit der Masse $1.000 \pm 0,1$ Da unterschieden werden kann. Das endgültige Auflösungsvermögen der Orbitrap wird durch die Verweildauer in der Ionenfalle definiert. Für diese Arbeit wurde eine Auflösungsvermögen von $R = 60.000$ verwendet. Bei einem $m/z = 400$ resultiert hierfür eine nötige Verweildauer in der Orbitrap von 1 s bei einer Massengenauigkeit von < 5 ppm.^{100,107}

2.2.3 Kopplung von Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie

Für die vorgesehene Messung der Peptidgemische aus HLA-Liganden ergibt sich jedoch ein weiteres Problem. Die Vielzahl der vorhandenen Moleküle, insbesondere mit sehr ähnlicher Masse, macht eine direkte Analyse im Massenspektrometer durch die limitierte parallele Messung und Fragmentierung der Peptide sehr ineffizient. Daher hat sich in der Proteomik die Kopplung der Massenspektrometrie mit der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography, HPLC), die so genannte LC-MS-Kopplung etabliert. Das Ziel dieser Herangehensweise ist es, die Probe durch die Chromatographie aufzutrennen und durch langsame Elution Messungen in kleineren Aliquots zu ermöglichen. Somit werden außerdem weitere Parameter generiert, die in ihrer Kombination (Masse, Retentionszeit, Fragmentspektrum) zur verbesserten Identifizierung der Peptide beitragen.

Die stationäre Phase der verwendeten Säulen bildet ein Kieselgel, welches initial mit Octadecadimethylsilylgruppen (ODS-Gruppen) modifiziert wurde. Bei dieser „Silanisierung“ wird durch das Einbringen von aliphatischen Alkylketten mit 18 Kohlenstoffatomen (daher C18-Säule) das Kieselgel hydrophober. Ziel dieser Modifikation ist es, hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Peptiden und der C18-Säule zu erleichtern. Dementsprechend erfolgt die Elution der Peptide mit unpolaren Lösungsmittel wie z.B. Acetonitril (ACN). Durch die kontinuierliche Steigerung der Acetonitril-Konzentration gelingt die schrittweise Elution der Peptide gemäß ihrer Polarität, welche durch die Seitenketten der beteiligten Aminosäuren determiniert wird. Ein weiterer Vorteil besteht in der Verwendung von geringen Flüssigkeitsmengen während des

gesamten Vorgangs der HPLC, da hierdurch eine Aufkonzentrierung der Peptide gelingt, welche die Detektion im Massenspektrometer erleichtert. Aus diesem Grund wird bei der beschriebenen LC-MS-Kopplung eine HPLC mit besonders geringem Volumenfluss (200 - 1.000 nl/min), die so genannte nano-HPLC verwendet.

Für die Messung der Proben wurde als HPLC die Nano-LC 2D (Eksigent) verwendet. Zu Beginn wurde die gesamte HPLC für 30 Minuten mit Lösungsmittel B (80 % ACN, 0,1 % FA) mit einer Flussrate von 20 µl/min gewaschen und anschließend für 40 Minuten mit Lösungsmittel A (2 % ACN, 0,1 % FA) äquilibriert. Zeitgleich wurde über einen zweiten Kanal die eigentliche Mikro-Kapillar-Trennsäule (fused-silica-Mikro-Kapillarsäule, Dionex/LC Packings) mit Lösungsmittel B für 30 Minuten gewaschen und für 40 Minuten mit 92%igem Lösungsmittel A äquilibriert.

Die zu messende lyophilisierte Probe wird nun in 25 µl Lösungsmittel A resuspendiert, abzentrifugiert und ein 5 µl Aliquot zur Messung in die Probenschleife injiziert. Zur Entsalzung und Aufkonzentrierung wird die Probe von dort über 30 Minuten auf eine ebenfalls C18-modifizierte Kieselgel-Vorsäule geladen. Im direkten Anschluss gelangt die Probe auf die eigentliche Trennsäule, von welcher sie nach der Elution in eine Metallkapillare geleitet wird, die wie bereits beschrieben als Ionenquelle dient.

Der Elutionsgradient startet mit einem Anteil von 8 % Lösungsmittel B, welcher innerhalb von 95 Minuten auf 55 % gesteigert wird, entsprechend einem Anteil von Acetonitril von 8,24 % auf 44,9 %. Die Flussrate beträgt hierbei konstant 300 nl/min. Nach erfolgreicher Elution wird kurzfristig der Anteil des Lösungsmittel B auf 100 % gesteigert (80 % ACN), um noch verbleibende Peptide von der Säule zu waschen. Die beschriebenen Einstellungen der HPLC, insbesondere der Elutionsgradient wurden von Nina Hillen etabliert und von Marc Günder und Oliver Drews auf das LC-MS/MS Verfahren mit der Orbitrap angepasst.^{100,108,109}

2.3 Vom Frequenzspektrum zum identifizierten Peptid und dessen Netzwerken

Durch die deutlich erhöhte Sensitivität und Messgeschwindigkeit moderner Massenspektrometer haben sich die generierten Datenvolumina dieser Methodik rasant vergrößert. Während noch vor ca. 10 Jahren eine Auswertung von Fragmentspektren durch manuelle Analyse und Annotation üblich war, sind inzwischen computergestützte Auswertungsverfahren das Mittel der Wahl. Sowohl die Prozessierung als auch die anschließende Annotation der Fragmentspektren findet softwarebasiert statt. Hierbei sind die Kriterien der Verarbeitung so zu wählen, dass sie eine gute Qualität bei noch überschaubarem Datenvolumen generieren. Derart gewonnene Peptide dienen im Anschluss als Grundlage für Netzwerkanalysen, welche im Rahmen dieses Kapitels erläutert werden.

2.3.1 Prozessierung der Rohdaten und Annotation von Fragmentspektren

Die Gesamtheit aller in einer Messung generierten Übersichtsscans und besonders der Fragmentspektren werden als Rohdaten in einer Raw-Datei hinterlegt. Diese dient als Grundlage für die nachfolgende Prozessierung mit dem Thermo Proteome Discoverer (v1.3 Thermo Fischer). Diese Auswertungssoftware nutzt den MASCOT-Server (v2.2.04, Matrix Science) zur Annotation der bereitgestellten Fragmentspektren. Die Basis der MASCOT-Software bildet der MOWSE-Algorithmus (MOlecular Weight SEarch). Dieser gleicht die übermittelten Massen des Gesamtpeptides und der zugehörigen Fragmente gezielt mit einer Proteindatenbank ab und ordnet den Massenspektren mit einer gewissen berechneten Wahrscheinlichkeit ein Peptid oder mehrere mögliche Peptide zu.¹¹⁰

Für diese Arbeit wurde als Datenbank ausschließlich die UniProtKB/SwissProt (www.uniprot.org, release: 27. September 2013) mit der Taxonomie 9606: Homo sapiens gewählt. Zusätzlich wurden die Voreinstellungen für die Prozessierung derart festgelegt, dass eine Massenungenauigkeit von ≤ 3 ppm für Vorläuferionen und von 0,5 Da für Fragmentationen zulässig war. Dynamische Modifikationen wurden ausschließlich für die Oxidation von Methionin zugelassen.

Die oben erwähnte Zuordnung von Peptiden zu Fragmentspektren geschieht mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit. Als Maß hierfür dient der *Ion Score* S , welcher sich von der Wahrscheinlichkeit p ableitet, dass die eben getroffene Zuordnung zwischen Fragmentspektrum und Peptidsequenz der Datenbank rein zufällig passiert. Die Berechnung des Ion Scores gelingt über folgende Formel:

$$S = (-10) \cdot \log(p)$$

Dies bedeutet, dass ein Ion Score von 20 mit einer Wahrscheinlichkeit von 1 % einhergeht, dass das die Zuordnung zufällig geschehen ist. Dennoch wurden Ion Scores bis minimal 10 Punkte (Rate für zufälliges Matching von 10 %) akzeptiert, da zur Validierung der Peptide zusätzliche Kriterien eingesetzt wurden und hierdurch gleichzeitig die Sensitivität und Ausbeute der Ergebnisse deutlich verbessert werden konnte. Bis zu 10 unterschiedliche Peptide konnten einem Fragmentspektrum zugeordnet werden, welche zur besseren Übersicht mit einem Rang von 1 bis 10 nach absteigendem Ion Score versehen wurden. Ein weiteres klassisches Qualitätskriterium der massenspektrometrischen Proteomik ist die Rate an falsch positiven und falsch negativen Ergebnissen.¹¹¹ Über die Rate an falsch positiv identifizierten Peptiden (false discovery rate, FDR) lässt sich die Güte einer automatischen Annotation sehr genau und streng regulieren. Die FDR wird über Analysen gegenüber einer Köderdatenbank (so genannte decoy database) abgeschätzt. Eine vorherige Suche wird dabei mit den gleichen Filtereinstellungen wie zuvor erneut durchgeführt. Als Zieldatenbank dient jedoch nicht die ursprünglich verwendete, sondern eine in ihren Proteinsequenzen (meist im FASTA-Format) entweder exakt gedrehte oder perturbierte Datenbank.¹¹² Gibt es für dieses Fragmentspektrum auch in der Köderdatenbank positive Suchergebnisse, werden diese im Gegensatz zu den ursprünglichen „richtig positiven“ (true positive, TP) als falsch positiv (false positive, FP) eingestuft. Die FDR berechnet sich dann hieraus wie folgt:

$$FDR = FP/(TP + FP)$$

Der übliche cut-off wird bei 5 % gesetzt, d.h. dass bei 100 ursprünglich identifizierten Peptiden maximal 5 aus Köderdatenbanken stammen dürfen. Dennoch konnte gezeigt werden, dass eine Verschärfung der FDR auf 1 % die Anzahl von nicht identifizierten, bekannten Peptiden, d.h. die Rate an falsch negativen Ergebnissen, deutlich ansteigen lässt.¹¹³

Auf Grund der geringen Probenmengen und somit zu erwartenden geringerer Ausbeute an Peptiden sowie zusätzlicher späterer Validierungsschritte wurde zu Gunsten einer höheren Sensitivität auf einen FDR-cut-off bei der Prozessierung der Proben dieser Arbeit verzichtet.

2.3.2 Interpretation von Fragmentspektren

Trotz der automatischen Annotation durch den Proteome Discoverer ist es notwendig die Mechanismen der Entstehung von Fragmentspektren aufzuzeigen, da deren Verständnis einen entscheidenden Beitrag zur weiteren Validierung der Peptide liefert.

Die in der Ionenquelle erzeugten Peptide der HLA-Klasse I weisen meistens durch die Anlagerung von zwei Protonen eine doppelt positive Ladung auf. Bei Ionen der HLA-Klasse II sind auch dreiwertige Ionen häufig vorhanden. Typischerweise findet die Anlagerung der Protonen primär am N-Terminus der Peptide statt. Aber auch basische Seitenketten von Aminosäuren, wie sie bei Arginin, Lysin und Histidin vorliegen, besitzen die Tendenz, Protonen aufzunehmen. Dennoch unterscheiden sich diese Mechanismen dahingehend, dass ein N-terminal aufgenommenes Proton häufig durch interne Solvatisierung seine Position ändert und zu den Carbonylsauerstoffatomen der Peptidbindungen gelangen kann.¹¹⁴ Somit entsteht eine formal identische Gruppierung von Ionen, welche sich allerdings intern durch die Lokalisation der Protonen innerhalb des Rückgrats des Peptides unterscheiden. Die Protonen, die an einer basischen Seitenkette aufgenommen werden, verbleiben dagegen in der Regel auch nach Fragmentierung an derselben Aminosäure.

Kommt es zur Fragmentierung der doppelt positiven Vorläuferionen durch inelastische Zusammenstöße mit dem Kollisionsgas, sind die Peptidbindungen mit vorhandenem Proton auf Grund ihres höheren Energieniveaus die

bevorzugten Bruchstellen. Durch die ungleiche Verteilung der Protonen in den Vorläuferionen zerfallen die Peptide in jeweils zwei unterschiedliche Bruchstücke, aus denen sich anschließend die Peptidsequenz rekonstruieren lässt.^{115,116} Diese Bruchstücke können entweder wie in den meisten Fällen beide einfach positiv geladen sein oder eines doppelt positiv und eines neutral. Im letzten Fall ist die Detektion des neutralen Teilchens jedoch leider nicht möglich, da der Massenanalysator wie oben beschrieben die entstandenen Ionen über vervielfachte Elektronenflüsse detektiert.

Die Nomenklatur der Fragmentionen funktioniert wie folgt: Beinhaltet ein Fragment den N-Terminus des Peptides, so wird es den a-, b-, oder c-Ionen zugeteilt, die korrespondierenden x-, y-, oder z-Ionen tragen den C-Terminus wie in Abbildung 12 zu sehen ist.¹¹⁷ Zusätzlich werden die Ionen mit einem Index versehen, der die Anzahl der im Fragment enthaltenen Aminosäure widerspiegelt.

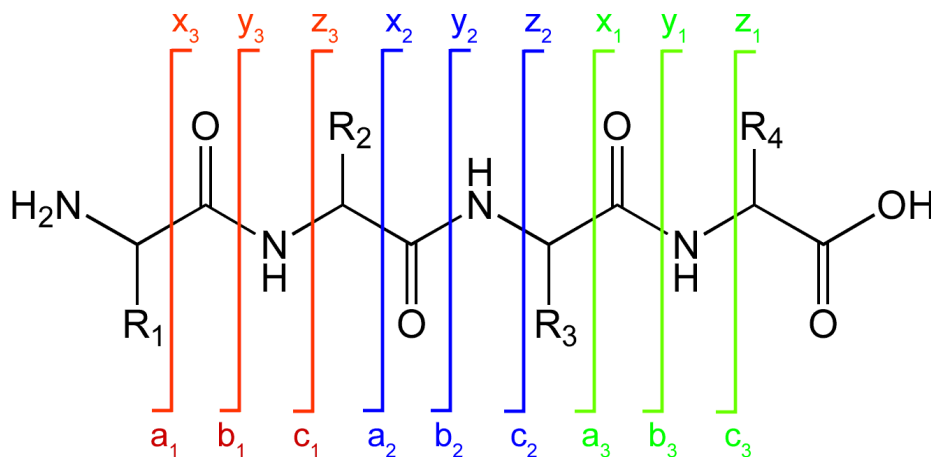


Abbildung 12. Darstellung und Nomenklatur für Fragmentionen. R1-R4 entspricht den Seitenketten der beteiligten Aminosäuren. Die Nomenklatur der Ionen entspricht der im Text beschriebenen; Bild: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/fb/Peptide_fragmentation.gif.

Unter allen hier aufgezeigten Ionen wird bei der CID-Fragmentierung die Bildung von y- und korrespondierenden b-Ionen begünstigt. Verlieren b-Ionen auf Grund ihrer geringen Stabilität die CO-Gruppe, entsteht mit einer

Massendifferenz $\Delta m = 28$ Da das dazugehörige α -Ion. Weitere häufige spontane Umwandlungen sind die Abspaltung von Wasser mit $\Delta m = 18$ Da bei hydrophilen Aminosäuren wie Serin (S), Threonin (T), Glutaminsäure (D) und Asparaginsäure (E) sowie der Verlust von Ammoniak $\Delta m = 17$ Da bei den basischen Aminosäuren Asparagin (N), Glutamin (Q), Arginin (R) und Lysin (K). Interne Fragmente durch Verlust von C- und N-Terminus wurden bei der durchgeführten Arbeit äußerst selten detektiert. Auch der Spezialfall eines Immoniumions, welches als internes Fragment mit nur einer Aminosäure aus einem γ - und einem α -Bruch entsteht, spielte bei der Auswertung keine relevante Rolle.

Sehr charakteristisch dagegen ist die Bildung intensiver γ -Ionen-Signale durch Brüche vor den Aminosäuren Prolin, Asparaginsäure und etwas schwächer Glutaminsäure.¹¹⁸ Diese Eigenschaft kann insbesondere bei der manuellen Bewertung von automatisch annotierten Fragmentspektren berücksichtigt werden. Die Massen der 20 klassischen proteinogenen Aminosäuren als Teil einer Peptidbindung, als Immoniumion sowie als γ_1 -Ion zeigt Tabelle 2.

Die explizite Auswertung der Fragmentspektren fand über den Proteome Discoverer statt. Die über die Software vorgeschlagenen Annotationen wurden hierbei für jedes Fragmentspektrum gesichtet und unter Zusammenschau von Plausibilität der Annotation, charakteristischen Peptidbrüchen und der Massengenauigkeit entschieden, ob die Annotation und somit das Peptid akzeptiert oder verworfen wurde. Auf diese Art wurden manuell über 100.000 Fragmentspektren gesichtet und evaluiert.

2.3.3 Externe Validierung und Annotation von HLA-Liganden

Eine zusätzliche Validierung der manuell ausgewählten Peptide wurde über eine laborinterne Datenbank sichergestellt. Diese Datenbank besteht aus HLA-Liganden, welche in vorherigen Experimenten aus mononukleären peripheren Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs), mononukleären Knochenmarkzellen (bone marrow mononuclear cells, BMNCs) sowie aus gesundem und karzinomatösem Nierengewebe isoliert und nach strengen Gütekriterien (FDR 5 % und Ion Score ≥ 20) ausgewählt wurden.

Tabelle 2. Liste proteinogener Aminosäuren und deren Massen

<i>Aminosäure mit Drei- und Einbuchstabencode</i>			<i>Immoniumion [Da]</i>	<i>Masse im Peptid [Da]</i>	<i>y₁-Ion [Da]</i>
Glycin	Gly	G	30,03	57,02	76,04
Alanin	Ala	A	44,04	71,04	90,05
Serin	Ser	S	60,04	87,03	106,05
Prolin	Pro	P	70,07	97,05	116,07
Valin	Val	V	72,08	99,07	118,08
Threonin	Thr	T	74,06	101,05	120,07
Cystein	Cys	C	76,02	103,00	122,03
Leucin	Leu	L	86,10	113,08	132,10
Isoleucin	Ile	I	86,10	113,08	132,10
Asparagin	Asn	N	87,06	114,04	133,06
Asparaginsäure	Asp	D	88,04	115,03	134,04
Glutamin	Gln	Q	101,07	128,06	147,08
Lysin	Lys	K	101,11	128,09	147,11
Glutaminsäure	Glu	E	102,05	129,04	148,06
Methionin	Met	M	104,05	131,04	150,06
Histidin	His	H	110,07	137,06	156,08
Phenylalanin	Phe	F	120,08	147,07	166,09
Arginin	Arg	R	129,11	156,10	175,12
Tyrosin	Tyr	Y	136,08	163,07	182,08
Tryptophan	Trp	W	159,09	186,08	205,10

Tabelle 2. Liste der 20 proteinogenen Aminosäuren mit Nomenklatur sowie Angabe der Massen als Immoniumion, in der Peptidbindung und als y₁-Ion. Die Beschreibung der Nomenklatur erfolgt im ganzen Namen, Drei- sowie Einbuchstabencode. Werte der Massen nach Drews 2011.¹⁰⁰

Die Experimente, welche in diese Datenbank einfließen, wurden vor allem von Daniel Kowalewski, Heiko Schuster, Nico Trautwein, Armin Rabsteyn und Moreno Di Marco durchgeführt und die Ergebnisse freundlicher Weise zur Verfügung gestellt.

Für Peptide, welche nicht auf diese Art validiert werden konnten, erfolgte eine Internetrecherche, in der ein weiterer großer Anteil der Peptide in anderen Veröffentlichungen wiedergefunden werden konnte und daher ebenfalls akzeptiert wurde. Der kleine Anteil noch verbliebener Peptide wurde abschließend auch akzeptiert, da über 95 % der Peptide mit den ersten beiden Methoden validiert werden konnten, was für eine hohe Güte der manuellen Evaluation sprach.

Diese Peptide wurden schließlich über die laborintern entwickelte Software SYFPEITHI (www.syfpeithi.de) an Hand ihrer Ankeraminosäuren und weiterer Hilfsanker den durch die HLA-Typisierung identifizierten HLA-Allelen zugeordnet.¹¹⁹ Hierbei wurde für eine akzeptierte Annotation ein Score von mindestens 60% des für ein bestimmtes Allel möglichen Maximalwertes gefordert, z.B. 24 von 40 möglichen Punkten für Peptide, welche auf HLA-A*01 präsentiert werden. Für die auf www.syfpeithi.de bisher noch nicht verfügbaren Allele wurde ein laborinterner Algorithmus nach Vorbild von SYFPEITHI mit denselben Kriterien verwendet. Für Peptide, bei welchen eine Annotation zu mehreren Allelen formal möglich war, wurde dies mit Mehrfachangaben gekennzeichnet. Nicht annotierte Peptide wurden mit dem Kürzel n.a. (not assigned) versehen. HLA-Klasse II-Peptide wurden unabhängig von der HLA-Typisierung allgemein mit dem Kürzel DR versehen.

2.3.4 Netzwerkanalyse von HLA-Liganden

Die große Menge an identifizierten HLA-präsentierten Peptiden ermöglicht nun eine systematische Analyse des theoretischen Zusammenwirkens dieser Liganden in Netzwerken. Auch wenn keine direkte physikalische Interaktion zwischen den einzelnen Peptiden besteht, kann dennoch postuliert werden, dass der Nachweis der Zugehörigkeit von mehreren Peptiden zu einer bestimmten biologischen Funktion oder einem Signalweg Rückschlüsse auf das

biologische Verhalten einer Zelle oder eines Gewebes zulässt. Da auf Grund der nicht vorhandenen Interaktion von HLA-Liganden untereinander keine Tools für eine direkte Analyse zur Verfügung stehen, bezieht sich im Folgenden die gesamte Netzwerkanalyse auf die Proteine, welche eindeutig einem Peptid zugeordnet werden konnten und die den Proteinen zu Grunde liegenden Gene. Aufgrund eines hohen Anteils an Tumor infiltrierenden Lymphozyten im Gewebe des Nierenzellkarzinoms¹²⁰ wurde vor der Netzwerkanalyse ein Abgleich sämtlicher in den Geweben identifizierter Peptide mit allen laborintern identifizierten HLA-Liganden von PBMCs und BMMCs durchgeführt. Peptide, die sowohl in Gewebeproben als auch auf Proben der mononukleären Blutzellen gefunden wurden, wurden als potentielle Kontamination mit HLA-Liganden von Tumor und Gewebe infiltrierenden Immunzellen von der Netzwerkanalyse ausgeschlossen. Den so erhaltenen Peptiden wurde zur weiteren Bearbeitung nach Anwendung des BLAST-Algorithmus (<http://www.uniprot.org/blast/>) das Gensymbol ihres Ursprungsproteins entsprechend der UniProt-Datenbank zugeordnet.

Die Netzwerkanalysen wurden über die online-verfügbare Software GeneMania (www.genemania.org) durchgeführt, wobei von 6 verfügbaren Organismen den Gewebeproben entsprechend Homo sapiens ausgewählt.

Der Algorithmus dieser Software bearbeitet eine Suchliste von Proteinen (query list oder input list) derart, dass diese Liste durch eine definierte Anzahl von Proteinen (für diese Arbeit 20), die funktionell in enger Beziehung zur Suchliste stehen, ergänzt wird. Die Kategorien für eine funktionelle Ähnlichkeit beinhalten Proteininteraktion, gemeinsame Proteindomänen, Signaltransduktion, Koexpression, Kolo-kalisierung, genetische Interaktion und vorhergesagte Interaktion. Die Datengrundlage hierfür bieten Datensets aus Gene Expression Omnibus (GEO)¹²¹, BioGRID¹²², I2D¹²³, Memorial Sloane-Kettering Cancer Center, Human Protein Reference Database¹²⁴, HumanCyc¹²⁵, Systems Biology Network Center New York, IntAct¹²⁶, MINT¹²⁷, NCI-Nature Pathway Interaction Database¹²⁸ und Reactome¹²⁹.

Die Stärke der vorhandenen Interaktionen wird über verschiedene Gewichtungen wiedergegeben, wobei sich die Gewichtung daran orientiert,

welche Netzwerke aus den vorhandenen Genen generiert werden können und wie viele der Gene bereits in der ursprünglichen Suchliste vorhanden waren. Dies bedeutet, dass eine Gewichtung umso stärker ist, je mehr ein Gen zur Generierung einer nachgewiesenen biologischen Funktion innerhalb des Netzwerkes beiträgt. Zusätzlich kann die Gewichtung beeinflusst werden, indem bestimmte biologische Funktionen oder Eigenschaften bevorzugt in die Analyse eingehen. Neben der automatisch gewichteten Analyse kann auch eine Gewichtung nach biologischem Prozess (biological process based), molekularer Funktion (molecular function based) oder zellulärer Komponente (cellular component based) erfolgen. Zusätzlich werden bis zu 10 relevante Attribute, z.B. biologische Funktionen, Signalwege, Gen-Medikament-Interaktionen oder involvierte Erkrankungen im Netzwerk angezeigt.^{130,131}

Zur Veranschaulichung wurde eine Analyse mit den Genen EPAS1, HIF1A und EGLN3 mit oben genannten Einstellungen (20 zusätzliche Gene und 10 Attribute) mit automatischer Gewichtung durchgeführt. Wie auch später wurden alle möglichen Attribute und hinterlegte Interaktionen zur Bildung des Netzwerkes zugelassen. Die Ergebnisse werden als Netzwerk mit allen relevanten Interaktionen in Abbildung 13 dargestellt:

Die Proteine der eingegebenen Suchliste werden schwarz-grau gestreift dargestellt (EPAS1, HIF1A und EGLN3), ergänzte Proteine sind grau unterlegt (im Beispiel u.a. VHL, VEGFA). Die Interaktionen sind wie in der Abbildung dargestellt farbig codiert. Die Stärke der Interaktionen wird über die Größe der Kreise der Proteine veranschaulicht.

Neben der Visualisierung der Gen- und Proteininteraktionen liefert die Analyse eine Liste an biologischen Funktionen und Signalwegen, welche durch die in der Netzwerkanalyse verwendeten Proteine vermehrt repräsentiert werden. Die Anordnung der Ergebnisse erfolgt nach statistischer Bewertung im Sinne einer false discovery rate (FDR). Im verwendeten Beispiel ist eines der besten Ergebnisse die „zelluläre Antwort auf Hypoxie“ (cellular response to hypoxia) mit einer FDR von $4,41 \cdot 10^{-51}$. Die in diesem biologischen Prozess involvierten Gene können im Netzwerk zusätzlich farbig unterlegt werden.

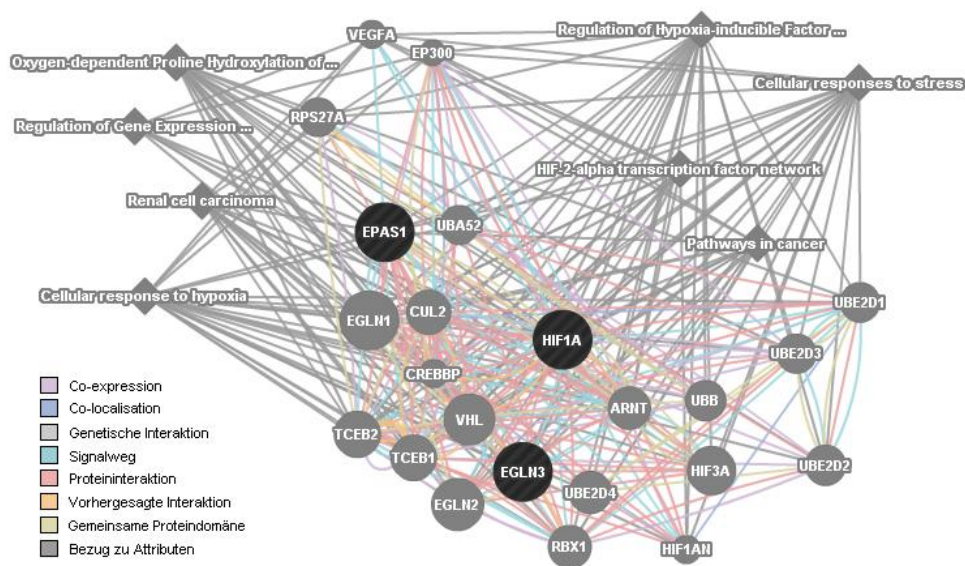


Abbildung 13. Netzwerkanalyse durch die GeneMania-Software. Die Proteine der Suchliste sind schwarz-grau gestreift, zusätzliche Proteine grau unterlegt. Alle Proteine werden durch Kreise symbolisiert deren Größe die Stärke der Interaktion symbolisiert. Attribute des Netzwerkes sind durch Rauten gekennzeichnet. Die Verbindungen zwischen den Proteinen sind gemäß der Legende farbig codiert.

Somit errechnet der Algorithmus von GeneMania biologische Prozesse, welche signifikant vermehrt in einem Netzwerk von Genen bzw. Proteinen vorhanden sind. Zusammenfassend wurden somit alle HLA-Liganden einer Gewebeprobe mit Peptiden aus PBMCs und BMMCs abgeglichen, überlappende Ergebnisse aussortiert und nach Zuordnung der Gensymbole von Ursprungproteinen zu den korrespondierenden Liganden die Liste dieser Gensymbole in die GeneMania-Software eingespeist. Die Analysen erfolgten mit 20 zusätzlichen Genen, 10 Attributen und in 4 möglichen Gewichtungen. Nach Abschluss der Analysen für eine Gewebeprobe wurden die Ergebnisse aller 4 Gewichtungsmethoden gepoolt, mehrfach vorhandene Resultate auf diejenigen mit der niedrigsten FDR reduziert und allen Ergebnissen nach aufsteigenden FDR ein Rang zugeteilt, so dass Rang 1 der niedrigsten und somit besten FDR entsprach.

2.4 Von Netzwerken zu Epitopen und Antigenen für Peptidvakzinen

Die über die Netzwerkanalysen identifizierten biologischen Prozesse dienen in den abschließenden Schritten dieser Arbeit als Grundlage für eine wissensgesteuerte Auswahl an potentiellen Antigenen und T-Zell-Epitopen. Ob die gewählten HLA-Liganden und Quellproteine tatsächlich immunogen sind, wird in dieser Arbeit nicht für alle potentiellen Vakzinierungspeptide untersucht. Für einen Teil der HLA-Liganden sind T-Zell-Aktivierungen bereits nachgewiesen worden, für die verbleibenden wird die Wahrscheinlichkeit für die Immunogenität dieser Peptide und deren Quellproteinen alternativ über unterschiedliche bioinformatische Ansätze abgeschätzt, wie im Folgenden dargelegt werden wird.

2.4.1 Auswahl von HLA-Liganden als Kandidaten für Vakzinierungspeptide

Die Ergebnisse der Netzwerkanalysen stellen eine Vielzahl biologischer Prozesse und Mechanismen dar, die wie bereits erwähnt für jede Gewebeprobe einzeln abschließend in einem Ranking aufgelistet werden. Anschließend erfolgt die Auswahl von tumorspezifischen Netzwerken über Überlappungsanalysen z.B. mittels Venn-Diagrammen zwischen Proben aus Tumoren oder Metastasen gegenüber Normalgeweben.

Ergänzt wird die Auswahl dadurch, dass neben der Tumorspezifität der biologischen Prozesse auch eine Assoziation zur Karzinogenese gegeben sein sollte. Diese Rolle innerhalb der Karzinogenese wird über den aktuellen Stand der Forschung ermittelt und durch Literaturverweise gestützt.

Als drittes Kriterium für eine Auswahl als relevanter tumorassoziierter Prozess wird ein bestimmter Rang innerhalb der Ergebnisse einer Gewebeprobe gefordert. Dieser liegt für Netzwerkanalysen für HLA-Klasse I unter den besten 10 und für HLA-Klasse II unter den Top 30-Resultaten der Netzwerkanalysen einer Gewebeprobe.

Werden somit die drei Gütekriterien (Tumorspezifität, hoher Stellenwert in der Karzinogenese und hohes Ranking innerhalb der Ergebnisse einer Netzwerkanalyse) erfüllt, wird ein Prozess oder Mechanismus als tumorassoziert definiert und die involvierten Quellproteine mit ihnen zu Grunde

liegenden HLA-Liganden als mögliche tumorassoziierte Antigene und Epitope angesehen. Aus den derart ausgewählten Prozessen erfolgt in einem abschließenden Schritt analog zur Filterung der biologischen Mechanismen eine Selektion von Quellproteinen mit deren HLA-Liganden, welche zum einen eine bekannte Rolle in der Karzinogenese unterschiedlicher Tumoren aufweisen, aber vor allem auf maligne Gewebeproben restringiert sind. Zusammenfassend werden somit Proteine ausgewählt, welche erstens aus tumorassoziierten Prozessen stammen, zweitens selbst eine Tumorrestriktion aufweisen und drittens einen Teil einer essentiellen Funktion in der Karzinogenese darstellen.

2.4.2 Literaturrecherche zur Validierung der Immunogenität

Um nun weiter zu klären, ob es sich bei den gewählten Quellproteinen und HLA-gebundenen Peptiden tatsächlich um immunogene Strukturen handelt, wurden unterschiedliche Methoden angewandt. Eine sehr einfache, aber effektive Vorgehensweise stellt die ausführliche Literaturrecherche über Literaturdatenbanken wie „PubMed“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) oder „Web of Science“ (<https://webofknowledge.com/>) dar.

Über Eingabe des entsprechenden Proteins oder der Peptidsequenz in Verbindung mit Schlagwörtern wie „t-cell response“, „immunogenicity“, „immunogenic“ oder „peptide vaccination“ lassen sich entsprechende Arbeiten detektieren. Die Ergebnisse hierzu werden später in Tabelle 5 aufgeführt.

2.4.3 Abschätzung der Immunogenität von Nonamer-Peptiden über das *in silico* Vorhersagemodell der Immune Epitope Database

Da über diesen einfachen, aber sehr begrenzten Ansatz nur für einen Teil der Quellproteine oder Peptide suffiziente T-Zell-Antworten nachweisbar waren, wurden weitere Methoden zur Abschätzung einer Immunantwort verwendet. Eine ausführliche Testung aller vorgeschlagenen Peptide mittels T-Zell-Assays hätte den Rahmen dieser Arbeit gesprengt, weshalb auf Vorhersagemodelle zur Immunogenität zurückgegriffen wurde.

Zunächst erfolgt die Analyse auf Ebene der Peptide. Ein passendes Tool stellt die gut etablierte Immune Epitope Database (IEDB) unter

<http://tools.iedb.org/immunogenicity/> als Online-Plattform zur Verfügung und wird als „T cell class I pMHC immunogenicity predictor“ bezeichnet.¹³² Diese Software wurde für Nonamer-Peptide implementiert und wird daher in dieser Arbeit auch nur für deren Analyse verwendet. Grundlage für den Analysealgorithmus sind sowohl die Positionen einzelner Aminosäuren in der Peptidsequenz aber auch deren chemische Eigenschaften. Hierbei ist zu betonen, dass jedoch gerade nicht die Ankeraminosäuren, sondern die Positionen vier bis sechs ausschlaggebend an der Immunogenität eines Peptides beteiligt sind.¹³²

Nach Einfügen eines Peptid-Nonamers in die Eingabemaske des Online-Tools kann eine HLA-Restriktion hinzugefügt werden, welche allerdings keine signifikant abweichenden Werte im Vergleich zu Analysen ohne Zuordnung des Peptides zu einem HLA-Allel liefert. Der daraufhin durch den Algorithmus berechnete einheitslose Wert gibt ein Maß für die Immunogenität des Peptides an, wobei keine direkten Grenzwerte publiziert sind, welche bei ihrer Überschreitung eine hochgradige Wahrscheinlichkeit für die Auslösung einer T-Zell-Antwort repräsentieren.

Aus der grundlegenden Arbeit von Calis et. al gruppieren sich jedoch die Vorhersagewerte einer Gruppe von immunogenen Peptiden um einen Mittelwert von etwa 0,09, so dass als Grenzwert für eine positive Vorhersage 0,1 festgelegt wird, wobei im Umkehrschluss ein Unterschreiten dieses Wertes die Immunogenität eines Peptides nicht ausschließt.¹³² Eben erwähnter Mittelwert von 0,09 wird zusätzlich als Qualitätskriterium für die Bewertung einer Gruppe von Nonameren herangezogen, um deren Potential für die Auslösung einer Immunantwort abzuschätzen, wie dies ebenfalls von Calis et. al publiziert wurde.¹³²

2.4.4 Abschätzung der Immunogenität von Ursprungsproteinen über das *in silico* Vorhersagemodell VaxiJen

Da das soeben beschriebene Vorgehen nur für den Teil der Ergebnisse, für welchen Nonamere als HLA-Liganden identifiziert werden konnten, praktikabel

ist, stellt ein Vorhersagemodell zur Abschätzung der Immunogenität von Proteinen eine gute Alternative dar.

Hierbei lassen sich zu allen verwendeten Quellproteinen Aussagen über die mögliche Funktion als Antigen treffen. Hierfür wird das bestens geeignete Online-Tool VaxiJen verwendet, welches auf folgendem Server frei zugänglich ist: <http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>.¹³³

Die Grundlage dieses Vorhersagemodelles bildet ein komplexer mathematischer Algorithmus, welcher Peptidsequenzen aus dem Quellprotein in Matrizen übersetzt und hierbei insbesondere die physikalisch-chemischen Eigenschaften der involvierten Aminosäuren ähnlich dem Vorhersagemodell für Peptide berücksichtigt. Ein Alignment der Peptidsequenz z.B. an Bindemotive bekannter HLA-Typen findet hierbei nicht statt.¹³³

In der Erstbeschreibung dieser Software wurden drei Vorhersagemodelle, für Tumoren sowie für virale und bakterielle Infektionen, eingeführt. Dementsprechend wird in dieser Arbeit das Tumormodell gewählt, welches zusätzlich die besten Vorhersagewerte liefert. Analog zur Software der IEDB berechnet der VaxiJen-Server nach Eingabe des Quellproteins einen einheitslosen Wert, der nach Überschreitung eines Grenzwertes das Protein als Antigen bezeichnet. Dieser Grenzwert wird zu Gunsten einer erhöhten Sensitivität von ursprünglich empfohlenen 0,5 auf 0,45 festgelegt, sämtliche potentielle tumorassoziierte Antigene getestet und bei Überschreitung des Grenzwertes als Antigen deklariert.

Sowohl für den T cell class I pMHC immunogenicity predictor für Nonamer-Peptide als auch für die VaxiJen-Software für Antigene wurden zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse Vorhersagewerte für Positivkontrollen berechnet. Diese Positivkontrollen stellen Epitope und Antigene aus vorangegangenen Arbeiten aus unserem Labor dar, in welchen die Immunogenität der untersuchten Moleküle über T-Zell-Assays wie ELISpot oder intrazelluläre Zytokinfärbungen bestätigt und publiziert wurde.^{134,135,136,137}

3 Ergebnisse

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse eines neuen Ansatzes zur Identifikation von tumorassoziierten Antigenen und korrespondierenden HLA-Liganden für das Nierenzellkarzinom mittels Netzwerkanalysen dargelegt. Die einzelnen Arbeitsschritte dieses Algorithmus werden zur besseren Übersicht in Abbildung 14 dargestellt.

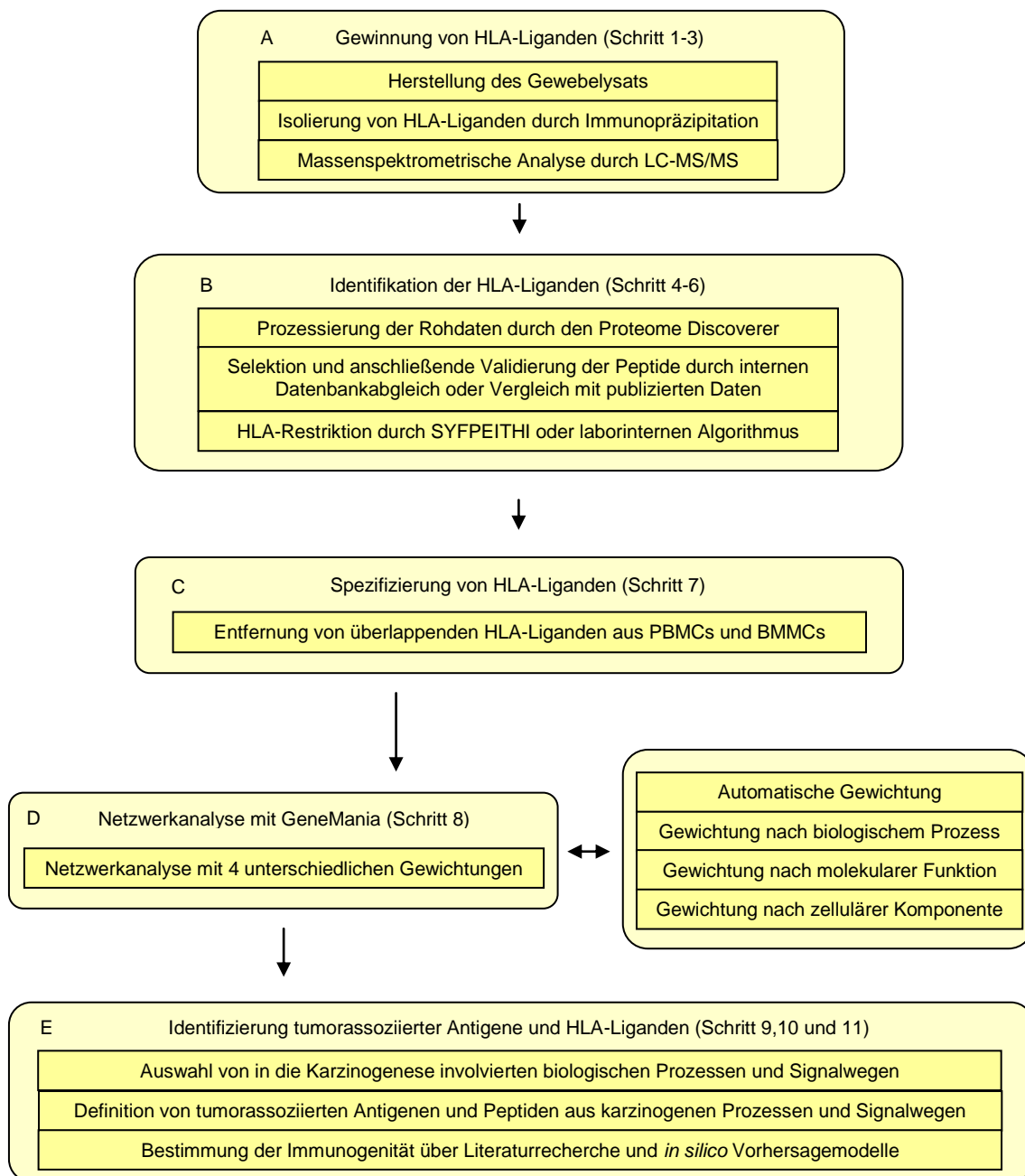


Abbildung 14. Flussdiagramm zur Identifizierung von tumorassoziierten Proteinen und HLA-Liganden aus malignem und gutartigem Nierengewebe durch Netzwerkanalysen. (A) Isolation von HLA-Liganden und massenspektrometrische Analyse. (B) Prozessierung der Rohdaten durch den Proteome discoverer, manuelle Auswahl der annotierten Spektren, Validierung durch interne und externe HLA-Liganden sowie HLA-Restriktion über SYFPEITHI oder einen laborinternen Algorithmus. (C) Spezifizierung der HLA-Liganden für Nierengewebe durch Aussortieren von HLA-Liganden, welche auch auf PBMCs und BMMCs nachgewiesen wurden. (D) Netzwerkanalyse von HLA-Liganden einer Gewebeprobe mittels GeneMania in vier möglichen Gewichtungsmethoden. (E) Identifizierung von in die Karzinogenese des Nierenzellkarzinoms involvierten biologischen Prozessen und Signalwegen, Deduktion von tumorassoziierten Proteinen und HLA-Liganden sowie Abschätzung deren Immunogenität; nach Klatt et al. 2016.¹³⁸

Kurz zusammengefasst wurden HLA-Liganden aus Gewebeproben von Nierenzellkarzinomen, deren Metastasen und gesundem Nierengewebe gewonnen. Um eine Kontamination mit Peptiden aus Tumor infiltrierenden Immunzellen zu vermeiden, wurden aus diesen Proben diejenigen Peptide aussortiert, welche ebenfalls aus mononukleären Blutzellen isoliert wurden. Derart entstandene Listen aus Liganden von HLA-Klasse I und II wurden als „nierenspezifisch“ eingestuft.

Diese optimierten Listen wurden Netzwerkanalysen unterzogen und so identifizierte signifikante Signalwege und biologische Prozesse nach ihrer Verteilung zwischen Tumor-, Normal- und Metastasengewebe untersucht. Hierdurch konnten essentielle Prozesse der Karzinogenese des Nierenzellkarzinoms in den Netzwerkanalysen detektiert und zusätzlich neue Mechanismen postuliert werden, welche zur Tumorentstehung beitragen.

Aus jenen Prozessen wiederum konnten etablierte tumorassoziierte Antigene sowie HLA-Liganden bestätigt, aber auch eine große Zahl neuer Antigene identifiziert werden. Daher bietet dieser Algorithmus eine neue Möglichkeit zur

Entwicklung individueller Peptidvakzinen zur Therapie des Nierenzellkarzinoms, welche die biologischen Prozesse der einzelnen Tumorproben berücksichtigt. Alle Experimente und Arbeitsschritte wurden bis auf die Einstellungen und Messungen der HPLC und des Massenspektrometers vom Verfasser der Arbeit selbstständig ausgeführt. Die zur Validierung und Spezifizierung der identifizierten HLA-Liganden bereitgestellten Peptidlisten zum einen aus Nierenzellkarzinomproben, aber auch aus mononukleären Blutzellen wurden von unterschiedlichen Doktoranden und Diplomanden des Interfakultären Instituts für Zellbiologie in Tübingen freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3.1 Analytierte Gewebeprouben

In dieser Arbeit wurden insgesamt 17 Gewebeprouben analysiert. Vier Triplets (RCC70, RCC329, RCC377 und RCC399) bestehend aus Tumor-, Metastasen- und Normalgewebe konnten vollständig für diese Arbeit verwendet werden. Für das Triplet RCC210 stellte sich die postulierte Metastase im Nachhinein als Adenom der Nebenniere heraus, weswegen die Probe als nicht-maligne eingestuft wurde. Für das Nierenzellkarzinom RCC297 standen lediglich zwei Proben, ausschließlich aus Metastasen, zur Verfügung.

Die beiden letztgenannten Probensammlungen (RCC210 und RCC297) wurden dennoch - bis auf den funktionellen Vergleich der drei Gewebeentitäten - analog zu den vollständigen Triplets analysiert. Eine Übersicht über die verwendeten Gewebeprouben zeigt Tabelle 3.

Alle Proben wurden histologisch als klarzellige Nierenzellkarzinome klassifiziert und weisen eine geringe Differenzierung auf (Grading G2-3). Zusätzlich zeigen alle Nierenzellkarzinome, die sich histologisch als metastasierend erwiesen haben, mindestens ein T3-Stadium, d.h. ein lokal infiltratives Wachstum bis in die Nierenvene oder darüber hinaus. Zu betonen ist, dass 70 % der analysierten Proben eine Masse von weniger als 1 g und 29 % aller Proben sogar von weniger als 0,25 g aufwiesen. Dennoch konnte eine suffiziente Analyse der Proben gewährleistet werden.

Tabelle 3. Charakteristika der Gewebeproben

<i>IPN</i>	<i>ST</i>	<i>TNM-Stadium</i>	<i>HLA-Typisierung</i>	<i>Masse der Proben [g]</i>
RCC70	N, T, M	pT3a pN1 M1 G2	A*01, A*02, B*07, B*08	2,64 ; 1,19 ; 0,14
RCC329	N, T, M	pT3c pN0 M1 G2	A*02, A*32, B*14, B*35	0,53 ; 0,86 ; 0,23
RCC377	N, T, M	pT3b pN1 M1 G3	A*01, A*03, B*07	0,17 ; 0,17 ; 0,74
RCC399	N, T, M	pT3b pN2 M1 G3	A*01, A*02, B*08, B*50	0,31 ; 0,43 ; 1,02
RCC210	N, T, A	pT1b pN0 M0 G2	A*01, A*24, B*08, B*51	1,35 ; 3,00 ; 0,99
RCC297	M1, M2	pT3b pN1 M1 G2	A*03, A*29, B*35, B*44	0,38 ; 0,25

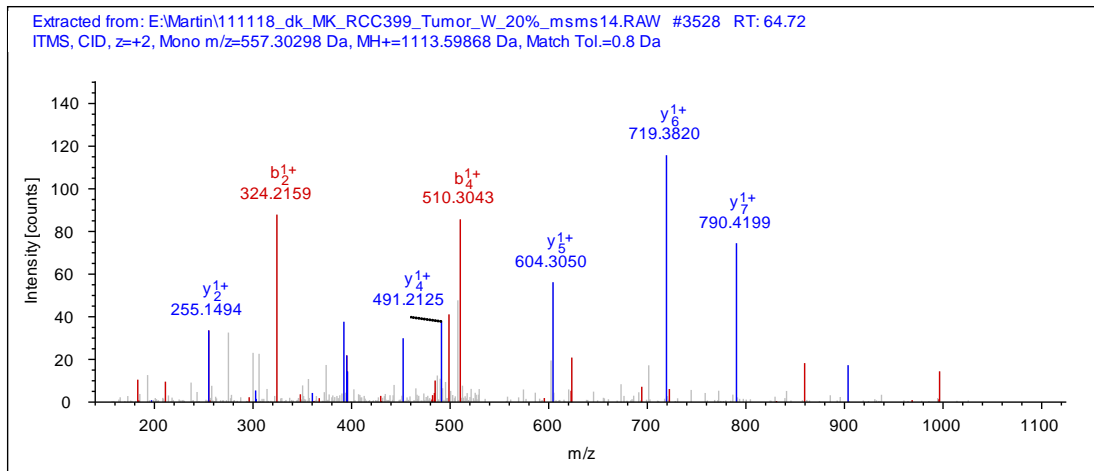
Tabelle 3. Charakteristika der verwendeten Gewebeproben. Alle Proben beschreiben histologisch klarzellige Nierenzellkarzinome. Abkürzungen: IPN, interne Probennummer; ST, Subtypen; N, Normalgewebe; T, Tumorgewebe; M, Metastasengewebe; A, Adenom; nach Klatt et al. 2016.¹³⁸

3.2 Identifikation von HLA-Liganden der Klasse I und II aus Nierengewebe

Die Identifikation von HLA-gebundenen Peptiden aus Gewebelysaten stellte die Grundlage dieser Arbeit dar. Die automatisierte Verarbeitung der Rohdaten erfolgte über den Proteome Discoverer ohne Einschränkung durch den Ion Score, den Rang oder die FDR für die vorgeschlagenen Peptide zugunsten einer höheren Ausbeute bei verbesserter Sensitivität.

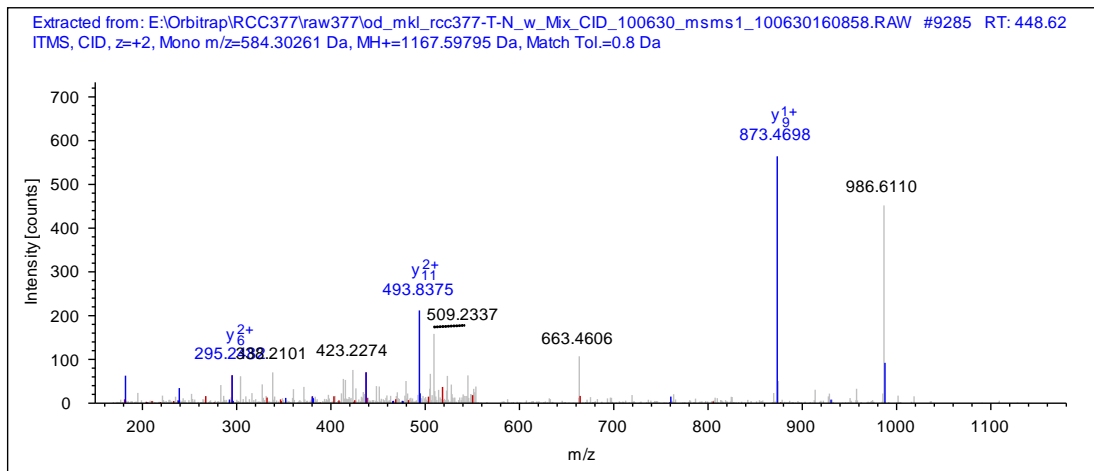
3.2.1 Aspekte der manuellen Evaluation der Peptidspektren

Es erfolgte die manuelle Bewertung von über 100.000 Fragmentspektren und vorgeschlagenen Peptidannotationen. Zur Verdeutlichung der erhöhten Sensitivität aber auch teilweise Spezifität sollen wenige Beispiele für die manuelle Evaluation von Peptidspektren gegeben werden. Um ein Gefühl für ein richtig annotiertes Peptid zu erhalten, folgt nun das Spektrum eines hoch scorenden Peptids mit eindeutiger Annotation durch vollständige klare y- und b-Ionenserien:

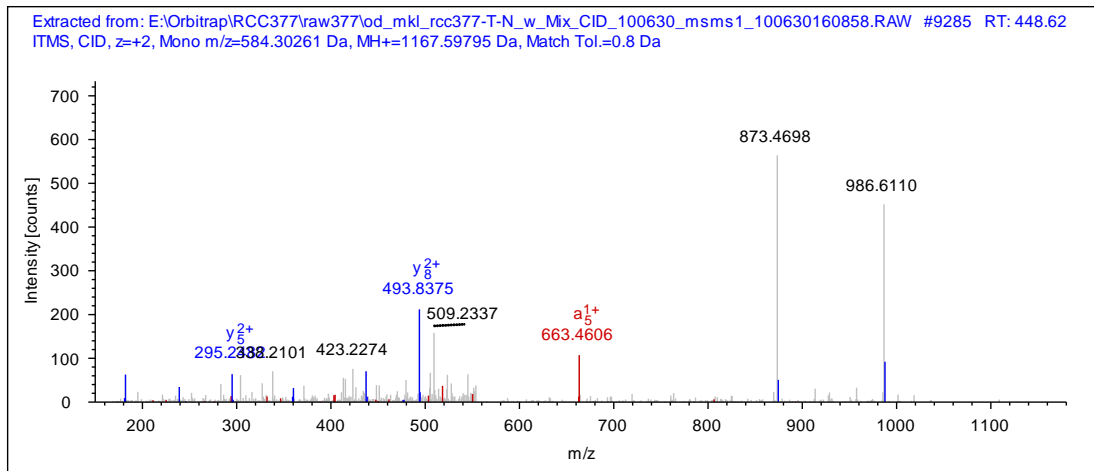


TLADLVHHV (Ion Score 52, Rang 1, ppm = -0,25)

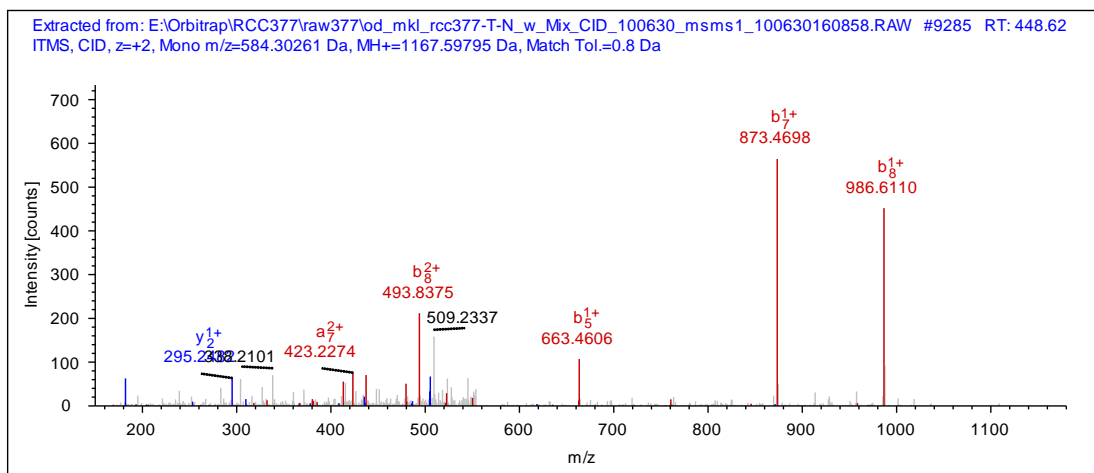
Ein Beispiel für die notwendige kritische Bewertung der Einordnung durch den Rang zeigen folgende drei Spektren, da der Rang ausschließlich den Ion Score berücksichtigt und die reale Annotation des Peptidspektrums nicht in die Bewertung mit eingeschlossen wird:



AGGLGINLASAD (Ion Score 19, Rang 1, ppm = 1,80)



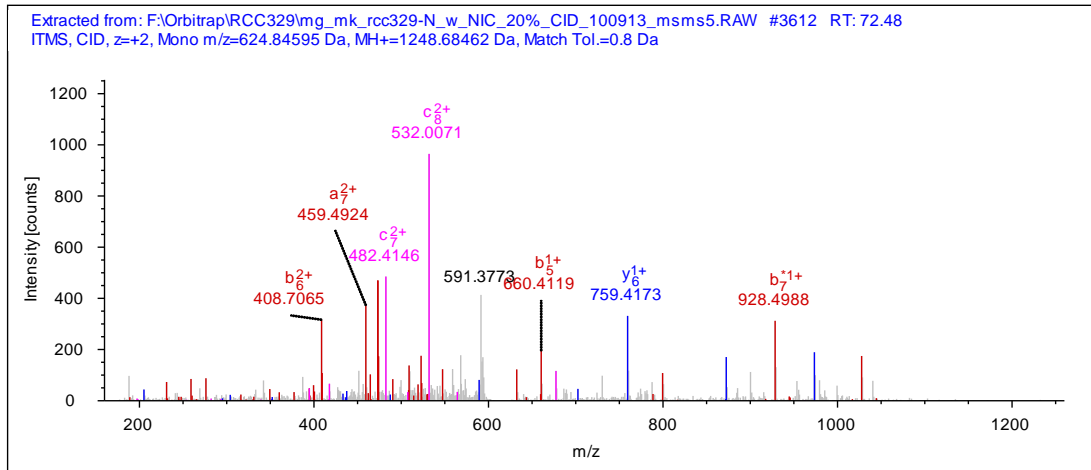
AIRQIDDID (Ion Score 16, Rang 2, ppm = 1,81)



STDHIPILY (Ion Score 15, Rang 3, ppm = -1,60)

An den ersten beiden Spektren wird hierbei deutlich, dass keine passende Serie an Ionen annotiert werden kann. Im dritten Spektrum dagegen zeigt sich eine gute Annotation einer b-Ionenreihe mit Abdeckung der dominanten Peaks sowie ein fast exakt zu einem N-terminalem Tyrosin passendes y₁-Ion mit einem gemessenen Peak von 182,088 Da bei errechneter Masse von 182,081 Da. Unabhängig von diesen Kriterien wird ebenso deutlich, dass die ersten beiden Peptidvorschläge keine sinnvolle HLA-Restriktion zulassen, STDHIPILY dagegen mit Glutaminsäure an Position 3 und Tyrosin an Position 9 klassische Ankeramino-säuren für eine HLA-A*01-Restriktion aufweist.

Als abschließender Beleg für die Relevanz einer manuellen Evaluation der Annotation von Fragmentspektren unabhängig vom Ion Score soll beispielhaft folgendes Spektrum dienen:



KTIGLREVW (Ion Score 10, Rang 2, ppm = -0,16)

Bei diesem Peptid lassen sich erneut trotz niedrigem Ion Score und einem Rang von 2 dennoch fortlaufende Serien für y- und b-Ionen identifizieren. Auch eine HLA-Zuordnung zum Motiv von A*32 gelingt eindeutig.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die manuelle Evaluation, wenn sie kritisch durchgeführt wird, sehr gute Ergebnisse liefert. Insbesondere mit einer Ion Score unabhängigen Bewertung der Peptidspektren ließ sich die Effizienz der Analysen deutlich steigern. Für HLA-Klasse I gelangen 40 % und für HLA-Klasse II 35 % aller Peptididentifikationen bei einem Ion Score von weniger als 20, wobei fast alle Ergebnisse nachträglich über Peptide aus strengen automatischen Auswertungen eindeutig verifiziert werden konnten.

3.2.2 Anzahl identifizierter HLA-Liganden aus Gewebeproben

Durch die systematische Analyse von 17 Gewebeproben aus gesundem, karzinomatösem und metastatischem (sowie in einem Fall adenomatösem) Gewebe von insgesamt 6 Patienten mit histologisch gesichertem klarzelligem Nierenzellkarzinom (clear cell renal cell carcinoma, ccRCC) konnte eine Vielzahl von HLA-Liganden isoliert werden:

Für HLA-Klasse I ergab sich eine Gesamtzahl von 1.910 unterschiedlichen Peptiden aus 1.411 korrespondierenden Ursursungsproteinen. Bei einer Beschränkung der Auswertung auf Peptide mit einem Ion Score von mindestens 20 Punkten wäre die Ausbeute mit 1.146 distinkten Peptiden aus 820 Proteinen deutlich geringer ausgefallen. Eine Auswertung ohne Beschränkung wurde demnach favorisiert. Die Anzahl der identifizierten Peptide pro Patient variierte zwischen 415 und 633 bei einem Mittelwert von 509 HLA-Liganden. Eine Übersicht der Anzahl der aus den jeweiligen Gewebeproben isolierten HLA-Liganden und deren Ursursungsproteinen gibt Abbildung 15.

Die nach weiteren laborinternen Optimierungen automatisiert analysierten und über eine Datenbank zur Verfügung gestellten Peptide aus HLA-Komplexen von Blut- und Knochenmarkzellen umfassten bei 30 gesunden Blut- und 5 Knochenmarkspendern insgesamt 17.940 Peptide aus 7.567 Proteinen. Dies verdeutlicht die enorme Dynamik bei der Verbesserung der massenspektrometrischen Analytik von Peptiden und Proteinen in den vergangenen Jahren.

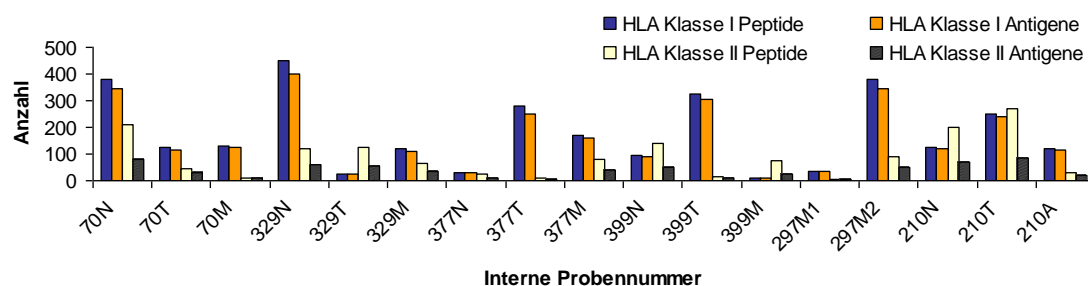


Abbildung 15. Anzahl von isolierten HLA-Liganden und korrespondierenden Antigenen aus Nierengewebeproben. Für alle Patienten konnten unabhängig von der vorhandenen Anzahl oder Masse der Gewebeproben mindestens 400 Klasse I- und 100 Klasse II-Peptide identifiziert werden; nach Klatt et al. 2016.¹³⁸

In Bezug auf HLA-Klasse II wurden zusammenfassend 805 eindeutige Peptide mit einer Streubreite von 96 bis 497 Liganden pro Patient bei einem Mittelwert von 252 Peptiden isoliert. Die Verteilung der Ausbeute pro Probe ist ebenfalls in Abbildung 15 aufgeführt. In der Kontrollgruppe, für Klasse II Peptide bestehend

aus 20 Blut- und 10 Knochenmarkspendern, konnten 4.240 HLA-Liganden aus 1.235 Proteinen in Experimenten außerhalb dieser Arbeit identifiziert werden. Insgesamt zeigte sich als interner Qualitätsstandard, dass pro Patient unabhängig von Probenzahl und Masse der zur Verfügung stehenden Proben mindestens 400 HLA-Klasse I und 100 HLA-Klasse II Liganden identifiziert werden konnten.

In Anbetracht der teilweise sehr kleinen Gewebeproben wurde im Anschluss geprüft, ob eine Korrelation zwischen Masse und identifizierten Liganden besteht. Während für HLA-Klasse I mittels linearer Regression ein Zusammenhang bei einem Spearman Koeffizienten von $r = 0,21$ ausgeschlossen werden kann, zeigt sich für HLA-Klasse II ein leichter Trend bei einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,79$ (Abbildung 16 A und B).

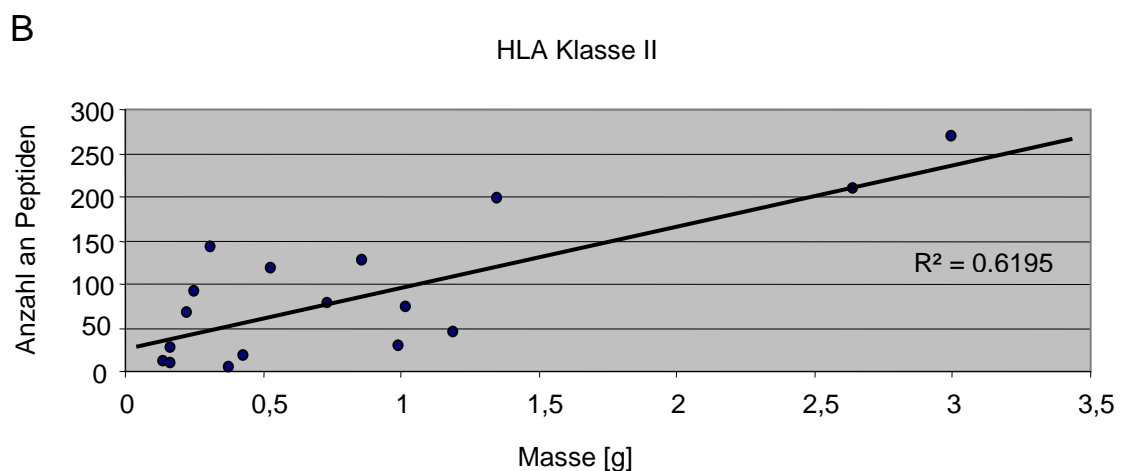
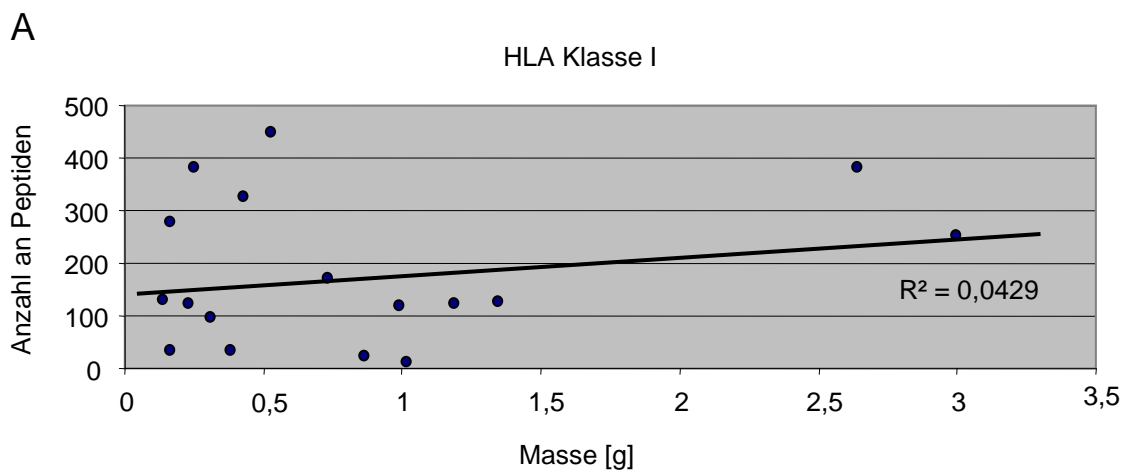


Abbildung 16. Korrelation zwischen isolierten HLA-Liganden und Probenmasse. (A) Für HLA-Klasse I zeigt sich mittels linearer Regression kein Zusammenhang zwischen Masse einer Probe und identifizierten Peptiden. (B) Für HLA-Klasse II zeigt sich ein Trend für eine lineare Korrelation zwischen Probenmasse und Peptidausbeute mit Korrelationskoeffizient $r = 0,79$; nach Klatt et al. 2016.¹³⁸

3.2.3 Validierung identifizierter HLA-Liganden durch internen Datenbankabgleich und Literaturrecherche

Trotz der ausführlichen und akribischen Evaluation von Fragmentspektren und der Zuordnung zu Peptiden genügt diese Methodik nicht den offiziellen Kriterien wie z.B. einer FDR von 0,05 oder weniger. Da alle folgenden Analysen entscheidend von der Richtigkeit dieser HLA-Liganden abhängig waren, wurden zusätzliche Schritte zur Validierung dieser Peptide durchgeführt.

Zuerst erfolgte ein laborinterner Datenbankabgleich. Die hierfür verwendeten Datensätze entstammten unabhängigen Experimenten zur Identifizierung von HLA-Liganden aus Nierenzellkarzinomen und gesunden Nierengewebe ähnlich der Vorgehensweise in dieser Arbeit. Die Auswahl bzw. Verifizierung der Peptide in diesen Versuchen wurde jedoch automatisiert mit einer FDR von 5 % und Ion Score von mindestens 20 durchgeführt. Dies entspricht den Kriterien für publizierbare Daten bei automatisierter Auswertung.

Der Überlappungsbereich der automatisiert und manuell identifizierten Peptide betrug für HLA-Liganden der Klasse I 90 %, für Klasse II konnten 88 % aller Peptide nochmals verifiziert werden, wie die Abbildungen 17A und 17B zeigen. In einem weiteren Schritt wurde für die noch verbleibenden Peptide eine Literaturrecherche durchgeführt. Zusätzliche 8 % der Peptide bezogen auf die ursprüngliche Gesamtzahl wurden auf diese Weise in Publikationen für beiden HLA-Klassen bestätigt und ebenfalls in den Abbildungen 17A und 17B illustriert.

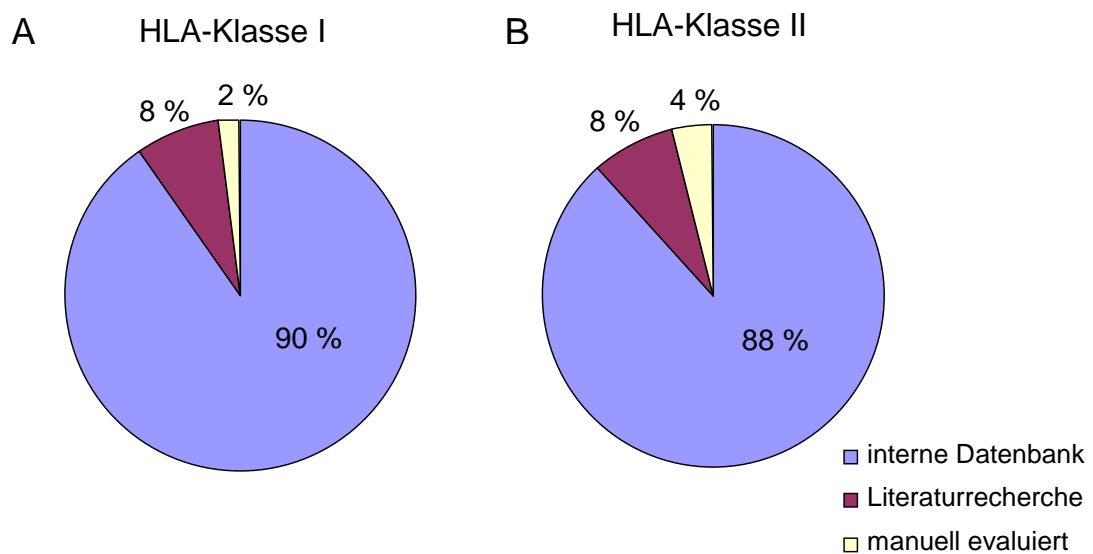


Abbildung 17. Zusätzliche Validierung identifizierter Peptide. Verwendet wurden analog der Legende eine interne Peptiddatenbank sowie Literaturdaten. Ein kleiner Anteil verblieb ohne weitere Bestätigungsmöglichkeit. Prozentuale Anteile der Validierung für (A) HLA-Klasse I und (B) HLA-Klasse II; nach Klatt et al. 2016.¹³⁸

Insgesamt wurden somit über 95 % aller Peptide zusätzlich durch unabhängige Daten verifiziert. Die weniger als 5 % verbleibenden Liganden wurden dennoch in die weitere Analyse mit eingeschlossen, da durch den hohen Grad an Bestätigungen die ursprüngliche Methodik als valide angesehen wird.

3.2.4 Zuordnung der Peptide zu HLA-Allelen gemäß der Typisierung

Abschließend erfolgte die Beurteilung auf welchen HLA-Allelen die einzelnen Peptide präsentiert werden. Die Annotation wurde wie bereits beschrieben über die Software SYFPEITHI durchgeführt. Ein Score von 60 % des Maximalwertes für ein Allel war hierbei der geforderte Schwellenwert.

Bei Liganden, die nicht auf diese Weise zugeordnet werden konnten, wurde in den laborinternen aber auch externen Datenbanken nach den Peptiden gesucht und die dortige HLA-Typisierung mit der vorliegenden verglichen. Für den Fall einer eindeutigen Überschneidung wurde das Peptid dem Allel, welches in

beiden Proben vorlag, zugewiesen. Gelang auf diese Weise ebenfalls keine Zuordnung, so wurde das Peptid nicht in die endgültige Analyse aufgenommen. Für HLA-Klasse II wurden alle Peptide als HLA-DR klassifiziert, da eine Zuordnung zu Subklassen nur sehr schwierig möglich ist.

Eine Zusammenstellung aller HLA-Liganden für Klasse I und Klasse II mit ihrer HLA-Annotation befindet sich im Anhang dieser Arbeit.

3.3 Gewebespezifische Verteilung von HLA-Liganden und Quellproteinen

Nach Identifikation einer großen Anzahl von HLA-spezifischen Peptiden und ihren Ursprungsproteinen soll nun deren Verteilung zwischen Nierengewebe und Blutzellen, aber auch innerhalb der unterschiedlichen Arten von Gewebe (Tumor, Metastase und Normalgewebe) analysiert werden.

3.3.1 Überlappung von Quellproteinen aus Nierengewebe mit Antigenen aus mononukleären Blut- und Knochenmarkzellen

Insbesondere Peptide, welche sowohl aus Nierengewebe als auch aus Zellen des Immunsystems isoliert werden können, stellen eine interessante Gruppierung dar, denn das analysierte Nierengewebe ist kein homogener epithelialer Zellverband, sondern besteht aus einer sehr heterogenen Mischung von Zellen. Hierunter fallen auch das Gewebe infiltrierende Abwehrzellen, u.a. Lymphozyten, welche im Falle von malignem Gewebe als Tumor infiltrierende Lymphozyten (tumor infiltrating lymphocytes, TILs) bezeichnet werden.

Der Überlappungsbereich von Peptiden aus Gewebeproben und der großen Anzahl von HLA-Liganden, die aus PBMCs und BMDCs isoliert wurden, repräsentiert möglicherweise auf der Liganden-Ebene diese TILs und andere Immunzellen. Ein gewisser Anteil dieser Überschneidung ist allerdings auch auf housekeeping enzymes, d.h. Proteine, welche die Basis der meisten Zellarten bilden und daher in beinahe jeder Zellart auffindbar sind, zurückzuführen.

Die Auswertung wurde jedoch nicht an den Liganden, sondern mit ihren Ursprungsproteinen durchgeführt, da zwischen den Blut- und Gewebeproben keine gleichmäßige Ausbeute an Peptiden derselben HLA-Allele gewährleistet

werden konnte und damit ein direkter Vergleich nicht möglich ist. Dennoch sollte erwähnt werden, dass alle HLA-Allele, welche in den Gewebeproben vertreten waren ebenso auf den Blutproben identifiziert werden konnten.

Die Analyse der gemeinsamen Ursprungsproteine zwischen Gewebe- und Blut- bzw. Knochenmarkproben wurde mit der BioVenn-Software durchgeführt und erbrachte eine besonders hohe Überschneidung für HLA-Klasse I mit 78,6 % (1.109 Proteine) und mit 53,9 % (111 Proteine) einen ebenfalls deutlichen Überlappungsbereich für HLA-Klasse II, wie dies in Abbildung 18 zu sehen ist.

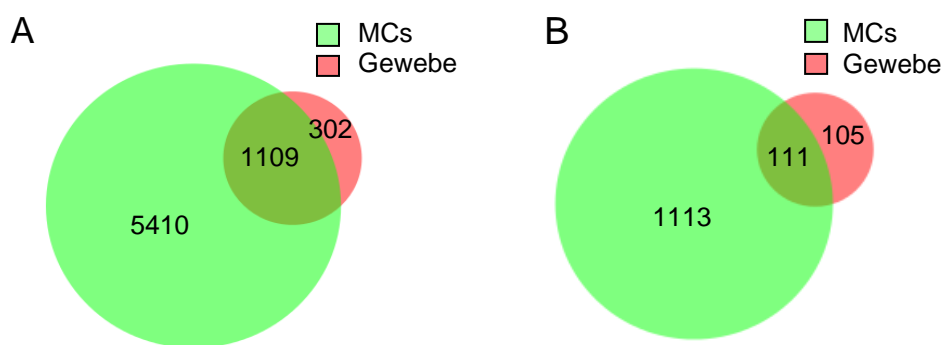


Abbildung 18. Überlappung von Ursprungsproteinen aus Gewebeproben und mononukleären Blutzellen. (A) Überschneidungsbereich für HLA-Klasse I und (B) für Klasse II. MCs steht für mononuclear cells, die Vereinigung von PBMCs und BMMCs; nach Klatt et al. 2016.¹³⁸

Dieser große Anteil an Überschneidung von Ursprungsproteinen bzw. HLA-Liganden wurde in der weiteren Analyse berücksichtigt.

3.3.2 Überlappung von Quellproteinen aus unterschiedlichen Gewebeentitäten

Trotz der nun bekannten starken Überlappung von Ursprungsproteinen aus Gewebeproben und Immunzellen erfolgte im nächsten Schritt vorerst unbeachtet dieser Tatsache die Untersuchung der Verteilung von Proteinen aus den drei untersuchten Gewebespezifitäten Tumor, Metastase und Normalgewebe.

Hierbei wurden keine spezifischen Verteilungsmuster zwischen den drei Gewebeentitäten festgestellt. Insbesondere eine vermutete Ähnlichkeit zwischen tumorösem und metastatischem Gewebe im Sinne eines hohen Überlappungsgrades zeigte sich nicht. Um nun auszuschließen, dass der postulierte Effekt dadurch verschleiert wird, dass TILs durch ihre eingebrachten Peptide und deren Ursprungsproteine die Verteilung fehlerhaft beeinflussen, wurde die gleiche Analyse nach Aussortieren überlappender Proteine aus Blut- und Gewebeproben wiederholt. Derart überarbeitete Proben werden im Verlauf dieser Arbeit als „nierenspezifisch“ definiert. Erneut zeigte sich jedoch, dass die Verteilung der Proteine unter den drei Gewebearten auch nach Entfernung der vermeintlichen aus TILs stammenden Proteine sehr homogen ist (Abbildung 19).

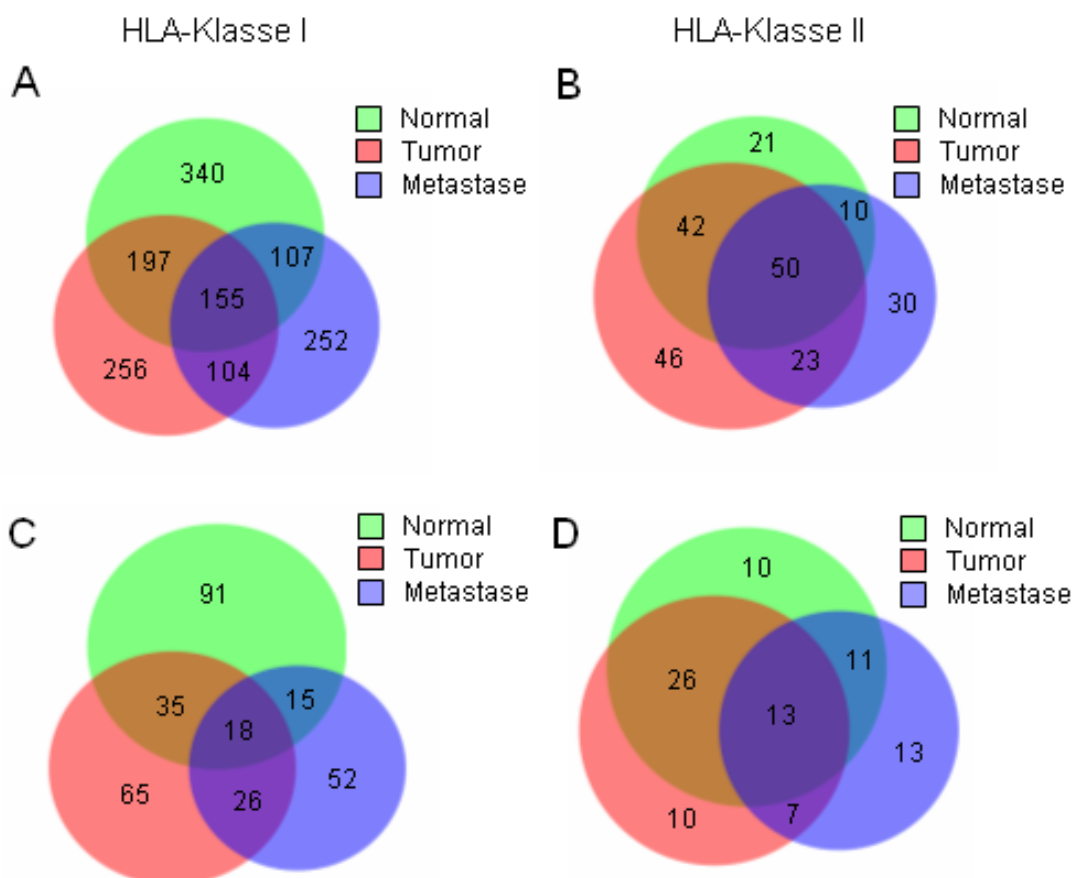


Abbildung 19. Überlappung von Proteinen aus Gewebeproben zwischen unterschiedlichen Gewebesubtypen. Initial wurden für HLA-Klasse I über 2.000 Proteine auf ihre Verteilung analysiert: 799 aus Normalgeweben, 712 aus

Tumoren und 618 aus Metastasen. Analog für HLA-Klasse II etwa 400 Proteine mit 123 aus Normal-, 161 aus Tumor- und 113 aus Metastasengewebe. Durch das Aussortieren von sich überschneidenden Proteinen aus Immunzellen reduzierten sich die Gesamtzahlen auf 302 für Klasse I und 90 für Klasse II. Die linke Spalte zeigt die Ergebnisse für Klasse I, die rechte Spalte für Klasse II. Zusätzlich zeigen (A) und (B) die Verteilung vor sowie (C) und (D) die Verteilung nach der Eliminierung möglicher Proteine aus TILs; nach Klatt et al. 2016.¹³⁸

3.4 Netzwerkanalysen von Quellproteinen aus HLA-Liganden

Nachdem die gewebespezifische Verteilung der Quellproteine keine signifikanten Unterschiede zeigen konnte, stellt sich nun die Frage, ob funktionelle Veränderungen, die offensichtlich zwischen den Proteomen von Tumor, Metastase und Normalgewebe vorliegen, sich auf das HLA-Ligandom übertragen lassen.

Hierzu wurden Netzwerkanalysen der einzelnen Gewebeproben angefertigt. Da solche Analysen jedoch nur für Proteine oder Gene etabliert sind, wurden für die Auswertung die Ursprungsproteine der HLA-Liganden verwendet. Um besonders auf funktioneller Ebene einer möglichen Verfälschung durch TILs vorzubeugen, wurden alle Liganden wie bereits beschrieben mit Peptiden aus PBMCs und BMMCs abgeglichen und übereinstimmende Peptide aussortiert. Diese Proben wurden wiederum als „nierenspezifisch“ definiert. Eine Selektion auf Ebene der Proteine wie in 3.3.2 konnte nicht durchgeführt werden, da die so generierten Listen für eine Netzwerkanalyse in ihrer Größe nicht ausreichende gewesen wären.

Die Analysen wurden nach den im Methodenteil beschriebenen Einstellungen mit der GeneMania-Software durchgeführt. Die Ergebnisse aller 4 Gewichtungsmethoden wurden gepoolt, mehrfach vorhandene Resultate auf diejenigen mit der niedrigsten FDR reduziert und allen Ergebnissen nach aufsteigenden FDR ein Rang zugeteilt, so dass Rang 1 der niedrigsten und somit besten FDR entsprach.

3.4.1 Vergleich der biologischen Funktionen aus Netzwerkanalysen von Tumor-, Metastasen-, und Normalgewebe für HLA-Klasse I

Um eine optimale Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden die vergleichenden Analysen nur für vollständige Triplets durchgeführt. Trotzdem wurden für weiterführende Untersuchungen alle Gewebeproben einer Netzwerkanalyse unterzogen.

Für HLA-Klasse I konnten insgesamt für gutartige Gewebeproben 217, für Tumorproben 209 und für Metastasen 557 biologische Prozesse und Signalwege mit einer FDR von weniger als 0,05 detektiert werden. Als Kontrollgruppe für die Verteilung der Ergebnisse der Netzwerkanalyse dienten die pro Gewebeprobe isolierten HLA-Liganden vor und nach dem Ausschluss von überlappenden Liganden aus PBMCs und BMMCs.

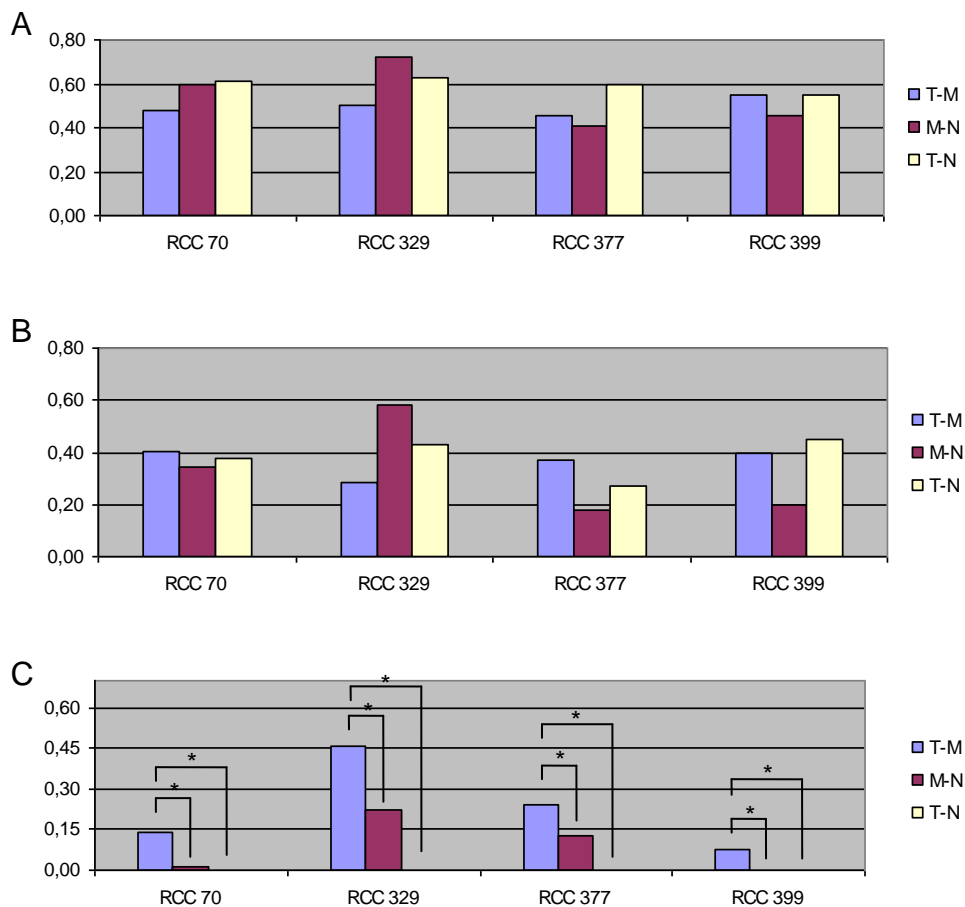
Analog zu den Ergebnissen von korrespondierenden Ursprungproteinen zeigten sich für die Peptide keine signifikanten Unterschiede in den Überschneidungen von Tumor- mit Metastasengewebe im Vergleich zu Normal- mit Metastasen- oder Tumor- mit Normalgewebe wie in den Abbildungen 20A und 20B veranschaulicht wird.

Im Gegensatz hierzu ergab die Analyse der signifikant involvierten Netzwerke ausgeprägte Überlappungen mit bis zu 46 % (RCC329) zwischen Proben aus Tumoren und deren Metastasen. Auch wenn z.B. für Probe RCC399 nur eine Überschneidung von 7 % aller biologischen Prozesse und Signalwege vorlag, so stellte dieses Ergebnis dennoch den höchsten Wert innerhalb der Probe dar. Die zweitgrößte Schnittmenge an biologischen Funktionen mit einem Höchstwert von bis zu 22 % für RCC329 zeigten die Subtypen von Normal- und Metastasengewebe. Hierbei lag die Schnittmenge nach Analyse mittels abhängigem t-Test jedoch immer signifikant ($p = 0,03$) unter derjenigen von Tumoren mit Metastasen.

Das deutlichste Resultat erbrachte der Vergleich von Tumor- mit Normalgewebe. In allen vier Triplettanalysen konnte innerhalb der Proben eines Patienten kein einziger biologischer Prozess identifiziert werden, welcher in beiden Gewebeunterarten vorlag. Dieses Ergebnis ist ebenso im Vergleich zur

Überlappung zwischen Tumor und Metastase auf dem 5 %-Niveau im abhängigen t-Test signifikant ($p = 0,02$) (Abbildung 20C).

Nur nach dem Zusammenführen der Ergebnisse aller vorliegenden Gewebeproben und erneuter Überlappung lassen sich exklusiv zwischen Tumoren und Normalgewebe 5 und zwischen allen drei Gewebeentitäten 16 gemeinsame Funktionen bzw. Prozesse identifizieren, was Abbildung 20D veranschaulicht. Diese beinhalteten ausschließlich Grundfunktionen einer Zelle wie: Zellkontakte bilden (cell junction organization), Transportprozesse von Aminosäuren (neutral amino acid transport) und Proteinen (protein localization to membrane), Antigenprozessierung und -präsentation (antigen processing and presentation) und Chromosomen betreffende Prozesse (nuclear chromosome). Insgesamt sind die 21 Ergebnisse der Schnittmenge untereinander stark redundant, so dass die fünf eben genannten Funktionen die einzigen nachgewiesenen Ähnlichkeiten zwischen diesen beiden Subgruppen darstellen.



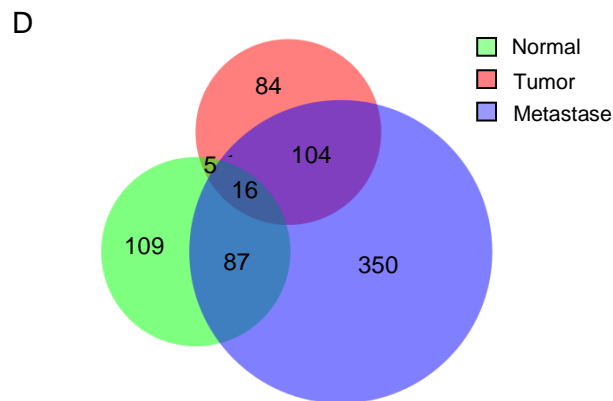


Abbildung 20. Vergleich von Gewebesubtypen bezüglich HLA-Ligandom und biologischen Prozessen für HLA-Klasse I. Die Ordinate zeigt den Grad der Überlappung von Tumor- zu Metastasen-, Metastasen- zu Normal- und Tumor- zu Normalgewebe für (A) HLA-Liganden (B) HLA-Liganden nach Ausschluss von Liganden von PBMCs und BMDCs sowie (C) biologische Prozesse aus Netzwerkanalysen. (D) Venn-Diagramm für Schnittmengen von zellulären Funktionen aller gesammelten Ergebnisse. * $p < 0,05$; nach Klatt et al. 2016.¹³⁸

3.4.2 Vergleich der biologischen Funktionen aus Netzwerkanalysen von Tumor-, Metastasen-, und Normalgewebe für HLA-Klasse II

Die Analyse der Netzwerke aus HLA-Liganden der Klasse II und deren Antigenen wurde analog zu HLA-Klasse I durchgeführt. Insgesamt wurden für gutartige Gewebeproben 527, für Tumormproben 419 und für Metastasen 484 signifikant verstärkte zelluläre Funktionen und Signalwege identifiziert. Eine identisch aufgebaute Kontrollgruppe aus HLA-Liganden zeigte wie für Klasse I für die Überschneidungen zwischen den Geweben keine signifikanten Unterschiede wie die Abbildungen 21A und 21B zeigen.

Im Unterschied zur HLA-Klasse I wurden für die Ergebnisse der Netzwerkanalysen keine signifikanten Unterschiede in der Überlappung zwischen Tumoren, Metastasen und Normalgeweben deutlich. Auch wenn in der Probe RCC329 Tumor und Metastase innerhalb der Patientenproben sowie absolut die höchste Überschneidung zeigten und in RCC377 die Überlappung

zwischen Tumor und Normalgewebe ebenfalls sowohl innerhalb des Patienten als auch absolut den niedrigsten Wert annahm, waren dies nur singuläre Werte, welche sich durch die anderen Proben für HLA-Klasse II nicht bestätigen ließen (Abbildung 21C).

Konsequenterweise ergab sich nach Zusammenführen aller Ergebnisse aus den Netzwerkanalysen pro Gewebeart im Venn-Diagramm das Bild einer homogenen Verteilung. Insbesondere zeigte sich der Überlappungsbereich zwischen allen drei Gewebetypen mit 187 biologischen Funktionen (44,6 % einer maximal möglichen Überschneidung) am stärksten ausgeprägt, was die Abbildung 21D gut illustriert. Dieser hatte in der Analyse von HLA-Klasse I mit 21 Prozessen den kleinsten Anteil (7,7 % des möglichen Maximalwertes).

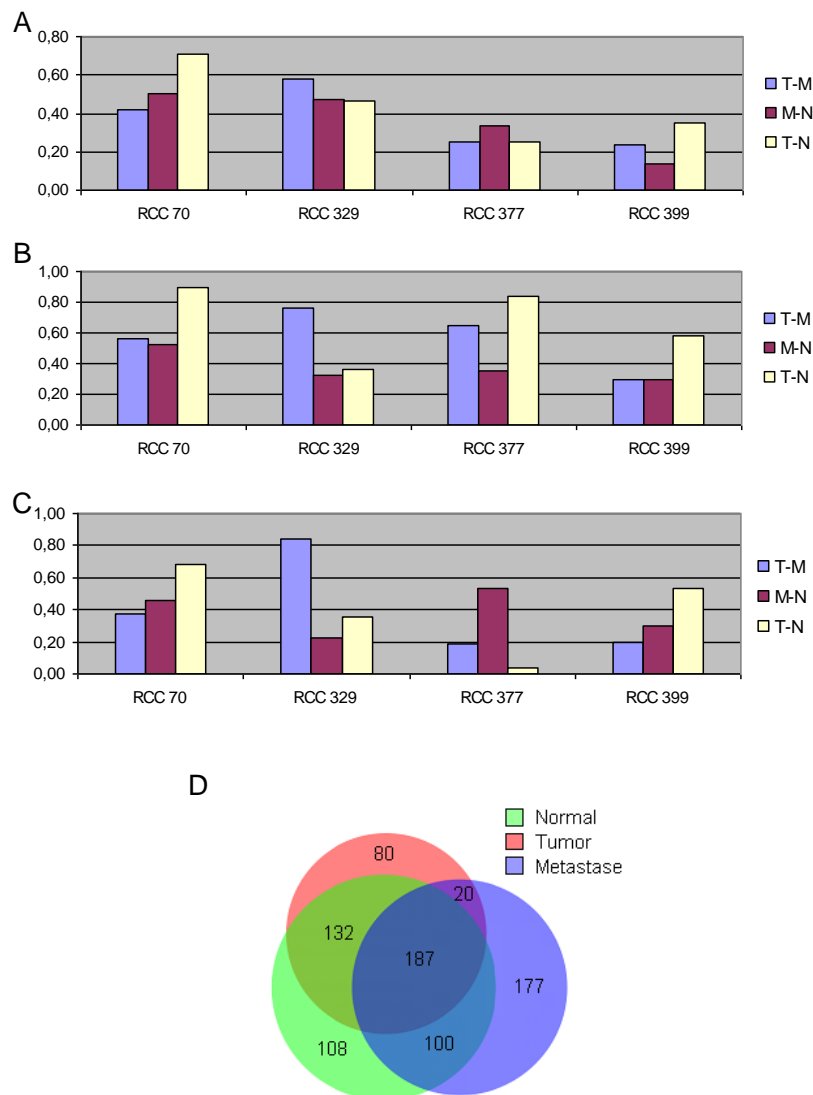


Abbildung 21. Vergleich von Gewebesubtypen bezüglich HLA-Ligandom und biologischen Prozessen für HLA-Klasse II. Die y-Achse zeigt den Grad der Überlappung von Tumor- zu Metastasen-, Metastasen- zu Normal- und Tumor- zu Normalgewebe für (A) HLA-Liganden (B) HLA-Liganden nach Ausschluss von Liganden von PBMCs und BMMCs sowie (C) biologische Prozesse aus Netzwerkanalysen. (D) Venn-Diagramm für Schnittmengen von zellulären Funktionen aller gesammelter Ergebnisse; nach Klatt et al. 2016.¹³⁸

3.4.3 Identifikation von in die Karzinogenese des klarzelligen Nierenzellkarzinoms involvierten biologischen Prozessen durch Netzwerkanalysen

Nachdem eindeutige Unterschiede in der Verteilung von biologischen Funktionen insbesondere für HLA-Klasse I nachgewiesen werden konnten, wurden nun die Ergebnisse aller Netzwerkanalysen auf Prozesse hin untersucht, welche Teile der Karzinogenese darstellen. Hierbei wurde besonders auf die Verteilung dieser Vorgänge zwischen malignen und nicht-malignen Proben geachtet.

Zusammenfassend konnten sowohl für HLA-Klasse I wie auch für Klasse II je neun Mechanismen detektiert werden, die entweder bereits in der Karzinogenese des klarzelligen Nierenzellkarzinoms etabliert sind oder eine sinnvolle Ergänzung darstellen, da sie bei der Entstehung von Tumoren und Metastasen anderer maligner Erkrankungen involviert sind.

Als einer der wichtigsten Faktoren in der Entstehung des klarzelligen Nierenzellkarzinoms konnte die zelluläre Antwort auf Hypoxie (cellular response to hypoxia) in gut einem Drittel aller malignen Gewebeproben nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden verschiedene Signalwege identifiziert, deren Aktivierung ebenfalls einen Teil der Karzinogenese des Nierenzellkarzinoms darstellen, z.B. der EGFR- (epidermal growth factor receptor), PDGFR- (platelet derived growth factor receptor) oder FGFR- (fibroblast growth factor receptor) Signalweg. Der für HLA-Klasse I insgesamt am häufigsten hervorgehobene Mechanismus war die Organisation der extrazellulären Matrix (extracellular matrix organization), welcher in 73 % aller malignen Gewebeproben signifikant vermehrt auftrat. Dieses Ergebnis wurde häufig von Prozessen wie

Kollagenkatabolismus (collagen catabolism) oder der positiven Regulation der zellulären Beweglichkeit (positive regulation of cellular motility) begleitet, wobei alle diese Mechanismen im Metastasierungsprozess eine wichtige Rolle spielen. Auch die Degranulation von Blutplättchen wurde als maligner Prozess aufgeführt, da im Ovarialkarzinom hierdurch eine Förderung der Angiogenese nachgewiesen werden konnte. Insgesamt wurden alle in die Karzinogenese involvierten Mechanismen für HLA-Klasse I ausschließlich in malignen Gewebeproben nachgewiesen.

Bezüglich HLA-Klasse II war die Entwicklung von Blutgefäßen (blood vessel development) der am häufigsten detektierte karzinogene Prozess, nämlich in 8 von 11, d.h. 73 % aller malignen Gewebeproben. Insbesondere für das klarzellige Nierenzellkarzinom ist dies ein beinahe pathognomonischer Prozess. Auch die Proliferation von Epithelien (epithelial cell proliferation) kennzeichnet einen Vorgang, welcher allgemein für die Entstehung von Karzinomen unabdingbar ist.

Insgesamt vier der neun Ergebnisse für HLA-Klasse II waren ebenfalls für HLA-Klasse I identifiziert worden: Kollagenkatabolismus (collagen catabolism), Bindung von Wachstumsfaktor- und aus Blutplättchen entstammender Wachstumsfaktorrezeptor (growth factor und platelet-derived growth factor receptor binding) sowie die positive Regulation der zellulären Beweglichkeit (positive regulation of cellular motility). Diese Überschneidungen sind ein weiteres Indiz für die Folgerichtigkeit dieser Analysen.

Im Gegensatz zur Beschränkung dieser karzinogenen Prozesse auf maligne Gewebeproben für HLA-Klasse I, waren in einer Probe (RCC399N) neben der Entwicklung von Blutgefäßen auch der Wachstumsfaktorsignalweg signifikant vertreten. Mögliche Erklärungen für dieses Ergebnis und auch die Erläuterung der anderen Mechanismen werden ausführlich im Diskussionskapitel gegeben. Abschließend sollte noch betont werden, dass alle Prozesse, welche mindestens zweimal identifiziert wurden, sowohl im Tumor- als auch im Metastisengewebe vertreten waren. Dies zeigt deren Stellenwert nicht nur für die Entwicklung des Karzinoms, sondern auch für dessen Metastasierung.

Zusätzlich wurde deutlich, dass die identifizierten Prozesse teilweise mit sehr niedrigen FDR-Werten (bis zu $1,1 \cdot 10^{-31}$ oder $7,7 \cdot 10^{-22}$) detektiert wurden. Wenige Ergebnisse dagegen lagen im niedrig signifikanten Bereich vor (FDR = 0,028). Insgesamt wiesen zwei Ergebnisse eine FDR zwischen 0,05 und 0,01, zwei weitere Prozesse eine FDR zwischen 0,01 und 0,001 und alle 14 verbleibenden Mechanismen eine FDR von weniger als 0,001 auf.

Außerdem befanden sich diese besonders signifikant verstärkten Prozesse für HLA-Klasse I vor allem unter den hochrangigen Ergebnissen, d.h. sie stellten die Mechanismen dar, welche innerhalb einer Probe relativ gesehen besonders gute FDR-Werte aufwiesen. Für HLA-Klasse I lagen die Ränge für jeweils mindestens eine Probe unter den besten 10, für HLA-Klasse II unter den besten 30 Ergebnissen. Alle Ergebnisse inklusive der Ränge sowie der FDR sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4. Mit Karzinogenese und Metastasierung assoziierte Prozesse

<i>Signalweg oder biologischer Prozess</i>	<i>Anzahl von Gewebeprobe mit identifiziertem Prozess (rel. Häufigkeit in %)</i>	<i>Beste FDR für Prozess</i>	<i>Bester Rang für Prozess</i>	<i>Tumor assoziierte Antigene innerhalb der Prozesse und Signalwege</i>
HLA-Klasse I				
extracellular matrix organization	8 (72,7 %)	7,71·E-22	1	COL1A1, FN1, LOX, MMP7, PLOD2
cellular response to hypoxia	4 (36,4 %)	1,05·E-31	4	CA9, EGLN3, VEGFA
collagen catabolic process	4 (36,4 %)	4,14·E-18	1	COL1A1, MMP7
platelet degranulation	4 (36,4 %)	3,20·E-7	5	FN1, VEGFA
fibroblast growth factor receptor signaling pathway	4 (36,4 %)	2,84·E-6	3	EGFR, GRB2, ITPR3
platelet-derived growth factor binding	3 (27,3 %)	4,86·E-9	3	COL1A1
epidermal growth factor receptor signaling pathway	3 (27,3 %)	2,84·E-6	2	BCAR1, EGFR, GRB2, ITPR3, TGFB1
growth factor binding	3 (27,3 %)	7,39·E-5	9	COL1A1, IGFBP3
positive regulation of cell motility	2 (18,2 %)	2,80·E-3	7	APC, EGFR, BCAR1, VEGFA

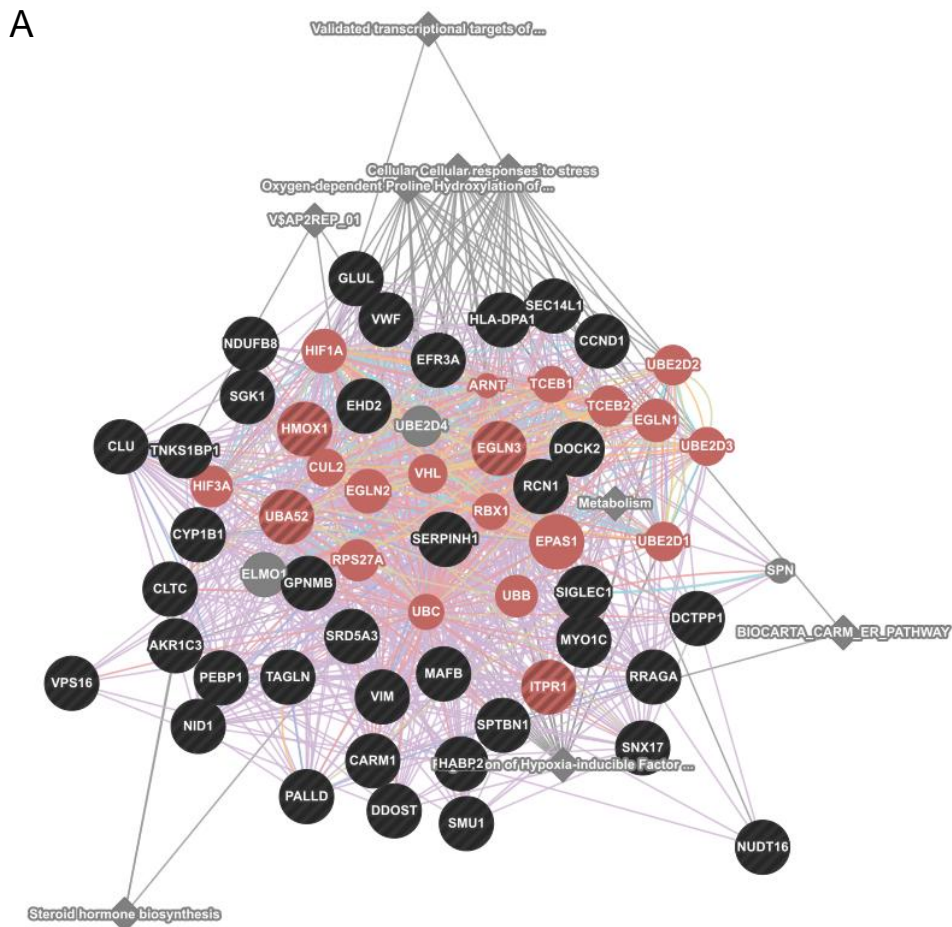
HLA-Klasse II				
blood vessel development	8 (72,7 %)	2,96·E-7	20	COL1A1, ENPEP, TGFBI, THBS1, VEGFA
growth factor binding	4 (36,4 %)	5,08·E-5	19	CD36, COL1A1, NRP2, THBS1
carbohydrate catabolic process	3 (27,3 %)	1,12·E-18	7	ENO1
collagen catabolic process	3 (27,3 %)	1,85·E-5	17	COL1A1
epithelial cell proliferation	3 (27,3 %)	1,12·E-3	28	PAX2, TGFB1, THBS1, VEGFA
positive regulation of cell motility	3 (27,3 %)	2,70·E-7	17	CALR, COL1A1, NRP2, PFN1, THBS1, VEGFA
platelet-derived growth factor binding	3 (27,3 %)	2,96·E-6	21	COL1A1
epithelial to mesenchymal transition	1 (9,1 %)	1,85·E-2	26	THBS1, TGFB1
mesenchymal to epithelial transition	1 (9,1 %)	2,80·E-2	14	PAX2

Tabelle 4. Mit Karzinogenese und Metastasierung assoziierte biologische Prozesse aus Netzwerkanalysen. Einschlusskriterium für die Aufnahme in die Liste war die bekannte Rolle innerhalb der Tumorentstehung oder im Metastasierungsprozess. Zusätzlich wurde für HLA-Klasse I eine FDR < 0,01 und mindestens eine Probe mit einem Rang unter den besten 10 sowie für HLA-Klasse II eine FDR < 0,05 und eine Platzierung unter den 30 am stärksten involvierten Prozessen gefordert; nach Klatt et al. 2016.¹³⁸

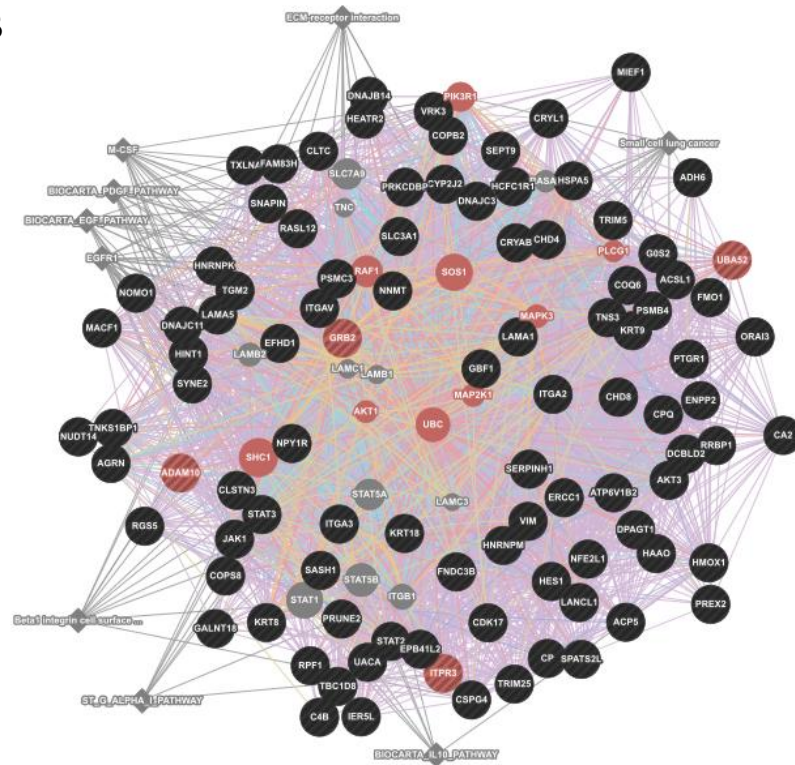
Abkürzungen: APC, adenomatous polyposis coli protein; BCAR1, breast cancer anti-estrogen resistance protein 1; CA9, carbonic anhydrase 9; CALR, Calreticulin; CD36, Platelet glycoprotein 4; COL1A1, collagen alpha-1 (I) chain; EGFR, epidermal growth factor receptor; EGLN3, egl nine homolog 3; ENO1, Enolase 1; ENPEP, glutamyl aminopeptidase; FN1, fibronectin; GRB2, growth factor receptor-bound protein 2; IGFBP3, insulin-like growth factor-binding protein 3; ITPR3, inositol 1,4,5-triphosphate receptor type 3; LOX, protein-lysine 6-oxidase; MMP7, matrilysin; NRP2, neuropilin-2; PAX2, paired box protein Pax-2; PFN1, profilin-1; PLOD2, procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2; TGFB1, transforming growth factor beta-1; TGFBI, transforming

growth factor-beta-induced protein ig-h3; THBS1, thrombospondin-1; THBS2, thrombospondin-2; VEGFA, vascular endothelial growth factor A.

Zur Veranschaulichung dieser Ergebnisse wurden beispielhaft 3 Netzwerkanalysen ausgewählt (RCC329M, RCC399T und RCC297M2), welche jeweils einen der folgenden Prozesse repräsentieren: response to hypoxia, epidermal growth factor signaling pathway und extracellular matrix organization. Die beteiligten Gene bzw. Proteine dieser identifizierten Funktionen oder Signalwege sind in den Beispielen der Abbildungen 22A - C jeweils rot unterlegt. Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass etablierte intrazelluläre Mechanismen der Karzinogenese und der Metastasierung hochspezifisch im HLA-Ligandom maligner Gewebeproben konserviert und über Peptide dem Immunsystem präsentiert werden.



B



C

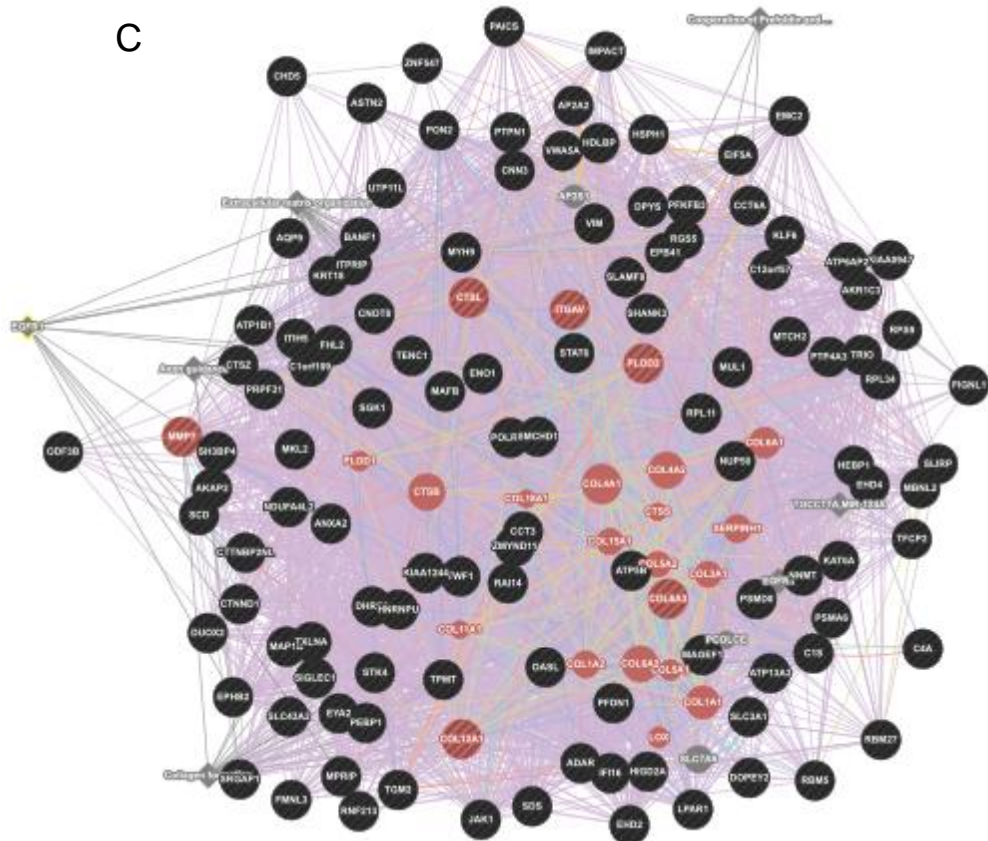


Abbildung 22. Netzwerkanalysen von drei Gewebeproben mit detektieren biologischen Prozessen der Karzinogenese. Alle Gene, die an der Bildung des dargestellten Unternetzwerks, d.h. einem besonderen biologischen Prozess oder Funktion beteiligt sind, sind rot unterlegt. Quellproteine sind gestreift, ausgefüllte Kreise entsprechen hinzugefügten Genen zur Komplettierung der Netzwerkanalyse. Die einzelnen Proben zeigen: (A) RCC329M: response to hypoxia (FDR = 9,10 E-29), (B) 399T: epidermal growth factor signaling pathway (FDR = 2,84 E-06), (C) RCC297M2: extracellular matrix organization (FDR = 3,37 E-14); nach Klatt et al. 2016.¹³⁸

3.4.4 Identifikation von tumorassoziierten Antigenen und HLA-Liganden aus karzinogenen biologischen Prozessen der Netzwerkanalysen

In einem weiteren Analyseschritt wurde anschließend untersucht, ob aus den Signalwegen und Mechanismen, welche spezifisch und verstärkt in malignen Gewebeproben identifiziert wurden, etablierte tumorassoziierte Antigene nachgewiesen und zusätzlich neue abgeleitet werden können.

Durch die Analyse der Quellproteine der in 3.4.3 beschriebenen und in die Karzinogenese involvierten Mechanismen konnten mehrere tumorassoziierte Antigene identifiziert werden, welche bis auf zwei Ausnahmen ausschließlich auf malignen Gewebeproben nachgewiesen wurden und in Tabelle 4 aufgeführt sind. Hierbei handelte es sich um die HLA-Klasse II Antigene COL1A1 und PAX2, welche jeweils einmalig in Nierennormalgewebe detektiert wurden. Eine mögliche Ursache hierfür ist die Präsentation von Peptiden auf HLA-Klasse II-Komplexen durch antigenpräsentierende Zellen, welche die entsprechenden tumorassoziierten Antigene vorher im malignen Gewebe aufgenommen haben. Die ausführliche Diskussion dieses Phänomens wird in späteren Kapiteln erfolgen. Des Weiteren lag in Einklang mit der Auswertungsmethodik keine Überschneidung zwischen Peptiden aus TAAs und PBMCs oder BMMCs vor, was den tumorspezifischen Charakter dieser Liganden nochmals unterstreicht. Die Liste der ermittelten tumorassoziierten Antigene beinhaltet etablierte Proteine sowohl für die immunhistochemische Charakterisierung des

klarzelligen Nierenzellkarzinoms als auch für dessen Karzinogenese, wie z.B. EGFR, VEGFA, IGFBP3, EGLN3, CA9, PAX2 und MMP7 (für Abkürzungen siehe Tabelle 4).^{40,48,139,140,141,142,143,144}

Zusätzlich konnte eine große Anzahl von neuen TAAs und deren korrespondierenden HLA-Liganden für Klasse I und II identifiziert werden (Tabelle 4 und 5), welche alle im Sinne ihrer Identifikation in Bezug zu karzinogenen Prozessen stehen: LOX und PLOD2 mit hohem Metastasierungspotential^{50, 145, 146}, GRB2, ITPR3 und BCAR1 als Teile des EGFR-Signalwegs¹⁴⁷ sowie anderer Wachstumsrezeptorsignalwege aber auch ENPEP, NRP2, TGFBI, THBS1 und THBS2, welche essentielle Bestandteile der Angiogenese darstellen.¹⁴⁸

Bemerkenswerterweise wurden von den 24 in Tabelle 4 genannten HLA-Liganden 16 jeweils nur einmalig in einer Gewebeprobe nachgewiesen. Aus den Netzwerkanalysen wurde dennoch ersichtlich, dass andere Antigene, welche im selben biologischen Prozess aktiv sind, auch in dieser Probe vorhanden sind, aber vermutlich aus Gründen der Sensitivität nicht detektiert wurden. Ein Beispiel hierfür zeigt die Analyse von RCC297M2 aus Abbildung 22C: Das hier abgebildete Netzwerk verwendete zur Bildung des Subnetzwerkes Organisation der extrazellulären Matrix (extracellular matrix organization) nicht nur Quellproteine, sondern auch hinzugefügte Proteine, welche in der Darstellung rot und flächig ausgefüllt erscheinen. Unter diesen wurde LOX identifiziert (im Bild das zweitunterste der roten Proteine etwas rechts der Mitte), welches seinerseits in den Gewebeproben RCC377M und RCC377T in derselben Funktion wiedergefunden werden konnte. Analoge Ereignisse konnten ebenso für die Proteine BCAR1, CA9, COL1A1, EGFR, ENPEP, FN1, NRP2, PAX2, PLOD2, TGFBI, THBS1, THBS2 und VEGFA dokumentiert werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich für jeden Patienten, unabhängig von der Anzahl und der Größe der vorhandenen Gewebeproben, 6 bis 11 Signalwege oder biologische Prozesse identifizieren ließen, welche beinahe ausschließlich in bösartigen Geweben auftraten. Aus diesen Vorgängen wiederum konnte eine Mischung von 15 bis 20 teilweise gut

etablierten, aber auch aus neuen tumorassoziierten Antigenen und HLA-Liganden der Klasse I und II herausgearbeitet werden, von welchen für 3 bis 6 bereits T-Zell-Antworten in vitro oder in vivo nachgewiesen werden konnten, wie die Tabellen 4 und 5 belegen.

Tabelle 5. Tumorassoziierte Antigene und HLA-Liganden abgeleitet von karzinogenen biologischen Prozessen aus Netzwerkanalysen.

<i>Antigen</i>	<i>HLA-Ligand</i>	<i>HLA-Restriktion</i>	<i>Anzahl maligner Gewebeproben mit gesuchtem Antigen (Frequenz in %)</i>	<i>Publikation einer Immunantwort gegen das Antigen</i>
FN1	RPAQGVVTTL	B*07	7 (63,6 %)	nein
IGFBP3	RPTLWAAAL	B*07, B*35	6 (54,5 %)	ja ¹⁴⁹
COL1A1	RLPIIDVAPLDVGAPD	DR	4 (36,4 %)	nein
ENPEP	AVHQFDSVKRISNSG	DR	3 (27,3 %)	nein
PAX2	APGHTIVPSTASPPVSSA	DR	3 (27,3 %)	ja ¹⁵⁰
TGFBI	VSGGIGALVRLKSLQGD	DR	3 (27,3 %)	nein
EGLN3	NPHEVQPSY	B*35	2 (18,2 %)	ja ¹⁵¹
LOX	QPRTPILLI	B*07	2 (18,2 %)	nein
PLOD2	KVFAGYYTK	A*03	2 (18,2 %)	nein
	RPHHDASTF	B*07		
APC	QQIEKDIL	B*08	1 (9,1 %)	nein
BCAR1	KPFDPARTPLVL	B*07	1 (9,1 %)	nein
CA9	SPRAAEPVQL	B*07	1 (9,1 %)	ja ¹⁴⁹
CALR	GGGYVKLFPNSLDQT	DR	1 (9,1 %)	nein
CD36	VPYPVTTTTV	B*51	1 (9,1 %)	nein
EGFR	SPSTSRTPLL	B*07	1 (9,1 %)	ja ¹⁵²
ENO1	TIAPALVSK	A*03	1 (9,1 %)	ja ¹⁵³
GRB2	QNWYKAEL	B*08	1 (9,1 %)	nein
ITPR3	DILIRTEL	B*08	1 (9,1 %)	nein
MMP7	YFPDGGPNTL	B*35	1 (9,1 %)	ja ^{149,70}
NRP2	EGQYARLISPPVH	DR	1 (9,1 %)	nein
PFN1	VPGKTFVNITPAEVGVL	DR	1 (9,1 %)	nein
TGFB1	TPLERAQHL	B*08	1 (9,1 %)	nein
THBS1	SPAFRIEDANLIPP	DR	1 (9,1 %)	nein
THBS2	SRGTLLEGPGLSQR	DR	1 (9,1 %)	nein
VEGFA	APAARAPQAL	B*07	1 (9,1 %)	ja ¹⁴⁹

Tabelle 5. Tumorassoziierte Antigene und HLA-Liganden abgeleitet von karzinogenen biologischen Prozessen aus Netzwerkanalysen. Darstellung von insgesamt 26 HLA-Liganden aus HLA-Klasse I und II, von welchen die korrespondierenden Antigene in 32 % der Fälle bereits als immunogen in vitro oder in vivo beschrieben wurden; nach Klatt et al. 2016.¹³⁸

Tabelle 6. Anzahl tumorassoziierter Prozesse und Antigene in malignen Gewebeproben

<i>Proben</i>	<i>RCC70</i>	<i>RCC210</i>	<i>RCC297</i>	<i>RCC329</i>	<i>RCC377</i>	<i>RCC399</i>
Tumorassozierte Prozesse HLA-Klasse I	6	4	4	2	6	4
Tumorassozierte Prozesse HLA-Klasse II	2	2	7	5	1	7
<i>Tumorassozierte Prozesse kombiniert</i>	<i>8</i>	<i>6</i>	<i>11</i>	<i>7</i>	<i>7</i>	<i>11</i>
Tumorassozierte Antigene HLA-Klasse I	12	10	8	7	14	11
Tumorassozierte Antigene HLA-Klasse II	6	6	9	8	1	9
<i>Tumorassozierte Antigene kombiniert</i>	<i>18</i>	<i>16</i>	<i>17</i>	<i>15</i>	<i>15</i>	<i>20</i>

Tabelle 6. Anzahl tumorassoziierter Prozesse und Antigene in malignen Gewebeproben. Für jeden Satz maligner Patientenproben konnten zwischen 6 und 11 tumorassozierte Funktionen und daraus abgeleitet 15 - 20 tumorassozierte Antigene abgeleitet werden; nach Klatt et al. 2016.¹³⁸

3.5 Evaluation der Immunogenität von tumorassozierten Quellproteinen und HLA-Liganden aus Netzwerkanalysen

Für die Verwendung identifizierter HLA-Liganden und ihrer zugehörigen Quellproteine als Peptide für Vakzinierung ist die Frage nach der Immunogenität dieser Strukturen essentiell, d.h. handelt es sich bei den Proteinen und Peptiden tatsächlich um Antigene und Epitope, welche in der Lage sind, T-Zell-Antworten zu provozieren. Im Vorhinein sei gesagt, dass eine endgültige Klärung dieser Frage den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde. Insofern wurde für die Beantwortung nicht der Goldstandard, d.h. die *in vitro* Analyse von T-Zellen nach Exposition mit dem entsprechenden Epitop oder Antigen durchgeführt, sondern nach Methoden gesucht, die Immunogenität der isolierten HLA-Liganden und Quellproteine abzuschätzen.

3.5.1 Validierung der Immunogenität durch Literaturrecherche

Als einfachster Weg für den Nachweis, dass einzelne Peptide dieser Arbeit Immunantworten evozieren können, dienten bereits durchgeführte Experimente und publizierte Daten unterschiedlicher Arbeitsgruppen. Wie bereits vorher erwähnt zeigt Tabelle 5, dass für 8 von 25 Quellproteinen, d.h. 32 % aller postulierten tumorassoziierten Antigene, bereits T-Zell-Antworten dokumentiert wurden. Hierbei ist zu betonen, dass der Großteil dieser Ergebnisse von *in vivo* Experimenten mit RCC-Patienten stammt, was die Qualität dieser Daten nochmals unterstreicht. Auch ist der Anteil von einem Drittel positiver Ergebnisse hervorzuheben, da die Immunogenität der HLA-Liganden einen von der Herangehensweise der Identifizierung der tumorassoziierten Antigene unabhängigen Faktor darstellt.

3.5.2 Abschätzung der Wahrscheinlichkeit für eine Immunantwort gegen HLA-Liganden über das IEDB immunogenicity prediction tool

Da über die Literaturrecherche nur ein Drittel aller potentieller Epitope und Antigene verifiziert werden konnte, stellten *in silico* Modelle zur Abschätzung der Immunogenität von HLA-Liganden eine hervorragende Ergänzung dar. Um die Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten, wurden wie bereits beschrieben Peptid-Nonamere aus laborinternen Publikationen verwendet, deren Funktion als Epitop bereits mittels *in vitro* Experimenten verifiziert werden konnte.

Die berechneten Vorhersagewerte für die experimentell ermittelten Nonamere sowie deren Positivkontrollen sind in Tabelle 7A aufgeführt. Als Schwellenwert für die Bewertung eines Peptids als Epitop diente ein Erfahrungswert aus der ursprünglichen Publikation dieses Tools und wurde bei 0,1 festgelegt. Für die Peptide aus Netzwerkanalysen konnte hierdurch gezeigt werden, dass 37,5 % der analysierten HLA-Liganden dieses Kriterium erfüllen. Im Gegensatz zeigte die Kontrollgruppe einen Anteil von 22,2 % Nonamer-Peptiden, welche den Schwellenwert von 0,1 überschritten. Bei strenger Betrachtung der Daten von Calis et al. in der Erstbeschreibung dieses Vorhersagemodells ist jedoch nicht die Rate an positiven Treffern, sondern vielmehr der Mittelwert der Gesamtheit

der Peptide ausschlaggebend für eine Bewertung der Immunogenität.¹³² Für den Mittelwert ist ein Ergebnis um 0,090 erstrebenswert.

In der vorliegenden Arbeit erreichte die Versuchsgruppe mit HLA-Liganden aus Netzwerkanalysen einen Mittelwert von 0,088, wohingegen die Positivkontrollen im Mittel bei -0,031 lagen. Trotz des auffallend geringen Wertes für die sicher immunogenen Peptide unterstreicht das Ergebnis dennoch das hohe Potential der postulierten Epitope für die Auslösung einer T-Zell vermittelten Immunantwort.

Tabelle 7A. Vorhersage der Immunogenität von potentiellen T-Zell-Epitopen

Versuchsgruppe					
<i>Quellprotein</i>	<i>HLA-Ligand</i>	<i>Immunantwort in T-Zell-Assay</i>	<i>T-Zell Erkennungs-Score IEDB</i>	<i>Epitop</i>	
IGFBP3	RPTLWAAAL	ja	0,30985	ja	
LOX	QPRTPILLI	nein	0,1545	ja	
PLOD2	KVFAGYYTK	nein	0,12645	ja	
CD36	VPYPVTTTTV	nein	0,11982	ja	
TGFB1	TPLERAQHL	nein	0,10552	ja	
PLOD2	RPHHDASTF	nein	-0,01546	nein	
ENO1	TIAPALVSK	ja	-0,03262	nein	
EGLN3	NPHEVQPSY	ja	-0,06361	nein	
Kontrollgruppe (Positivkontrolle)					
<i>Quellprotein</i>	<i>HLA-Ligand</i>	<i>Immunantwort in T-Zell-Assay</i>	<i>T-Zell Erkennungs-Score IEDB</i>	<i>Epitop</i>	
RASGRF1	AAANIIRTL	ja	0,32743	ja	
GUCY1A3	SVFAGVVG	ja	0,20387	ja	
CTDP1	YLNKEIEEA	ja	0,14668	ja	
SLC1A5	FVFPGELL	ja	0,13825	ja	
PRUNE2	ALFDGDPHL	ja	0,12374	ja	
APLP2	HGYENPTYK	ja	0,11341	ja	
MET	YVDPVITSI	ja	0,09762	nein	
PLIN2	VMAGDIYSV	ja	0,0939	nein	
HDAC1	RMLPHAPGV	ja	0,06401	nein	
PLIN2	SVASTITGV	ja	0,06187	nein	
MUC1	STAPPVHNV	ja	0,05312	nein	
HDAC1	LPHAPGVQM	ja	0,03813	nein	
SLX1A	LPPPHVPL	ja	0,03325	nein	
ASUN	SILEDPPSI	ja	0,00229	nein	
ABCA6	ILDEKPVII	ja	0,00011	nein	

DMXL1	SSSGLHPPK	ja	-0,01579	nein
FAF1	FTAEFSSRY	ja	-0,03766	nein
CCND1	LLGATCMFV	ja	-0,04238	nein
CDCA7L	YGVDNVKEY	ja	-0,06982	nein
APOL1	ALADGVQKV	ja	-0,11688	nein
MMSET	KAMEAASSL	ja	-0,1176	nein
TMED4	QLLDKVEQI	ja	-0,1356	nein
RGS5	LAALPHSCL	ja	-0,14993	nein
SEMA4A	FLFQLLQLL	ja	-0,20404	nein
TBC1D22A	APLQRSQSL	ja	-0,41991	nein
DNMBP	KPRQSSPQL	ja	-0,49363	nein
PARP3	DLDVKKMPL	ja	-0,51894	nein

Tabelle 7B. Vorhersage der Immunogenität von potentiellen T-Zell-Antigenen

Versuchsgruppe

<i>Quellprotein</i>	<i>HLA-Ligand</i>	<i>Immunantwort in T-Zell-Assay</i>	<i>VaxiJen Score</i>	<i>Antigen</i>
VEGFA	APAARAPQAL	ja	0,7937	ja
APC	QQIEKDIL	nein	0,6596	ja
GRB2	QNWYKAEL	nein	0,655	ja
PAX2	APGHTIVPSTASPPVSSA	ja	0,648	ja
BCAR1	KPFDPARTPLVL	nein	0,5716	ja
FN1	RPAQGVVTTL	nein	0,5632	ja
TGFB1	TPLERAQHL	nein	0,5545	ja
PFN1	VPGKTFVNITPAEVL	nein	0,5534	ja
ENO1	TIAPALVSK	ja	0,5449	ja
ITPR3	DILIRTEL	nein	0,516	ja
LOX	QPRTPILLI	nein	0,5119	ja
NRP2	EGQYARLISPPVH	nein	0,5088	ja
EGLN3	NPHEVQPSY	ja	0,5079	ja
THBS2	SRGTLLEGLPGLSQR	nein	0,5037	ja
ENPEP	AVHQFDSVKRISNSG	nein	0,5025	ja
IGFBP3	RPTLWAAAL	ja	0,4987	ja
PLOD2	KVFAGYYTK	nein	0,4977	ja
PLOD2	RPHHDASTF	nein	0,4977	ja
TGFBI	VSGGIGALVRLKSLQGD	nein	0,4812	ja
EGFR	SPSTSRTPLL	ja	0,4751	ja
CA9	SPRAAEPVQL	ja	0,4706	ja
MMP7	YFPDGPNTL	ja	0,4528	ja
THBS1	SPAFRIEDANLIPP	nein	0,4111	nein
COL1A1	RLPIIDVAPLDVGAPD	nein	0,4054	nein
CALR	GGGYVKLFPNSLDQT	nein	0,4052	nein
CD36	VPYPVTTTV	nein	0,3816	nein

Kontrollgruppe

<i>Quellprotein</i>	<i>HLA-Ligand</i>	<i>Immunantwort in T-Zell-Assay</i>	<i>VaxiJen Score</i>	<i>Antigen</i>
PLIN2	VMAGDIYSV	ja	0,6912	ja
PLIN2	SVASTITGV	ja	0,6912	ja
HDAC1	RMLPHAPGV	ja	0,6681	ja
HDAC1	LPHAPGVQM	ja	0,6681	ja
VCPIP1	ASAAASGGLLK	ja	0,637	ja
CTDP1	YLNKEIEEA	ja	0,631	ja
APOL1	ALADGVQKV	ja	0,5973	ja
MMSET	KAMEAASSL	ja	0,5972	ja
MMSET	SLLEQGLVEA	ja	0,5972	ja
METTL7A	VIYNEQMASK	ja	0,5899	ja
PARP3	DLDVKKMPL	ja	0,5851	ja
ZFAND5	SASVQRADTSL	ja	0,585	ja
MBL2	TEGQFVDLTGNRLTYT	ja	0,5827	ja
ASUN	SILEDPPSI	ja	0,5687	ja
DGKZ	ALRNQATMVQK	ja	0,5677	ja
WDR45L	RVYNTDPLKEK	ja	0,5634	ja
CDCA7L	YGYDNVKEY	ja	0,5611	ja
RAB5A	SPNIVIALSGNKADLA	ja	0,5594	ja
TBC1D22A	APLQRSQSL	ja	0,5561	ja
PRUNE2	ALFDGDPHL	ja	0,5494	ja
RASGRF1	AAANIIRTL	ja	0,5396	ja
KDM2B	SPRPPLGSSL	ja	0,5346	ja
CLSTN1	HRSFVDLSHGHNLANPHP	ja	0,5303	ja
DNMBP	KPRQSSPQL	ja	0,5221	ja
GUCY1A3	SVFAGVVG	ja	0,5218	ja
KLF2	KTYTKSSHLK	ja	0,5159	ja
MUC1	STAPPVHNV	ja	0,5125	ja
FAF1	FTAEFSSRY	ja	0,51	ja
DMXL1	SSSGLHPPK	ja	0,5081	ja
RGS5	LAALPHSCL	ja	0,5074	ja
PDIA4	GYPTIKILKGQAVDYEG	ja	0,4808	ja
APLP2	HGYENPTYK	ja	0,4744	ja
VAMP2	DIMRVNVDKVLERDQKL	ja	0,4631	ja
VAMP2	VDKVLERDQKLSELDDR	ja	0,4631	ja
CCND1	LLGATCMFV	ja	0,4607	ja
CELSR1	SPTSSRTSSL	ja	0,457	ja
MMP7	SQDDIKGIQKLYGKRS	ja	0,4528	ja
MET	YVDPVITSI	ja	0,446	nein
TMED4	QLLDKVEQI	ja	0,428	nein
CTSH	LPSQAFEYILYNKG	ja	0,4217	nein
SEMA4A	FLFQLLQLL	ja	0,4198	nein
TFRC	NSVIIVDKNGRLV	ja	0,4192	nein
TFRC	RVEYHFLSPYVSPK	ja	0,4192	nein
SLX1A	LPPPHVPL	ja	0,4054	nein
SLX1A	LAHVGPR	ja	0,4054	nein

MTCH2	GVLGTVVHGK	ja	0,4021	nein
IL4R	DAGSYKAQINQRNFE	ja	0,3998	nein
KDELR2	VPVGGLSFLVNHDFSPL	ja	0,3765	nein
ABCA6	ILDEKPVII	ja	0,3652	nein
SLC1A5	FVFPGELL	ja	0,1567	nein
SLC1A5	APVGIMFLVAGKIVE	ja	0,1567	nein
TP53I11	AVFDGAQVTSK	ja	0,1292	nein

Versuchsgruppe

Anteil positiver Epitope	0,375
Mittelwert IEDB-Score	0,088
Anteil positiver Antigene	0,840

Kontrollgruppe (Positivkontrolle)

Anteil positiver Epitope	0,222
Mittelwert IEDB-Score	-0,031
Anteil positiver Antigene	0,717

Tabelle 7A und 7B. Vorhersage der Immunogenität von potentiellen T-Zell-Epitopen und Antigenen. Die Tabelle 7A zeigt die Ergebnisse der IEDB-Software und die abschließende Bewertung als Epitop für Nonamer-Peptide der Versuchs- und Kontrollgruppe. Die Tabelle 7B illustriert analog die Ergebnisse des VaxiJen-Algorithmus für die Bewertung der Immunogenität von Quellproteinen für ihre mögliche Funktion als Antigene; nach Klatt et al. 2016.¹³⁸

3.5.3 Abschätzung der Wahrscheinlichkeit für eine Immunantwort gegen Quellproteine über den VaxiJen v2.0-Server

Um letztendlich eine Vorhersagemethode bereitzustellen, welche in der Lage ist, für alle postulierten tumorassoziierten Antigene eine Vorhersage zu deren Immunogenität zu treffen, wurde der VaxiJen v2.0-Server verwendet, welcher im Folgenden der Einfachheit halber als VaxiJen-Server bezeichnet wird.

Der Vorteil dieser Vorhersagemethode liegt darin, dass die eingespeisten Quellproteine im Gegensatz zu den Peptiden unabhängig von HLA-Restriktion und Peptidlänge sind. Unter Verwendung des Tumor-Vorhersagemodells konnte bei einem Schwellenwert von 0,45, wie Tabelle 7B zu entnehmen ist, für die Experimentalgruppe in 84 % der Fälle die Bewertung des Quellproteins als Antigen erzielt werden. Bei den Positivkontrollen wurde der Schwellenwert für diese positive Vorhersage nur für 71,7 % der Quellproteine erreicht.

Insbesondere im Vergleich zu den Positivkontrollen zeigt sich somit wie für die Peptide auch auf Ebene der Quellproteine, dass die Wahrscheinlichkeit für die Immunogenität der postulierten tumorassoziierten Antigene durchaus hoch einzuschätzen ist, auch wenn diese hierdurch nicht gesichert wird. Zusammenfassend bietet dieser Algorithmus somit einen neuartigen Ansatz für die Entwicklung verbesserter, individualisierter Peptidvakzinen, welche synergistisch gegen entscheidende biologische Funktionen von Karzinomen und deren Metastase gerichtet sind und zum Teil mit hoher Wahrscheinlichkeit oder bereits nachgewiesener Maßen in der Lage sind, eine T-Zell vermittelte Immunantwort auszulösen.

4 Diskussion

In diesem Kapitel sollen die verwendeten Materialien und Methoden sowie die hieraus erarbeiteten Ergebnisse nochmals analysiert und daraus Möglichkeiten zur Verbesserung aufgezeigt, Schlussfolgerungen gezogen und Ausblicke gegeben werden. Hierbei wird insbesondere auf das primäre Ziel dieser Arbeit, den funktionellen Vergleich von Tumor-, Metastasen- und Normalgewebe durch Netzwerkanalysen ihres HLA-Ligandoms sowie auf das sekundäre Ziel, die Identifikation von aus den Netzwerkanalysen abgeleiteten tumorassoziierten Antigenen, Bezug genommen.

4.1 Diskussion der Methodik: Probenauswahl und Peptidgewinnung

4.1.1 Auswahl von Gewebeproben

Vollständige Triplets bestehend aus Tumor-, Normal- und Metastasengewebe von einem einzigen Patienten sind sehr rar. Somit stellten die vier zur Verfügung stehenden Triplets eine gute Basis für diese Arbeit dar, wobei eine größere Anzahl wünschenswert gewesen wäre. Unglücklicherweise stellte sich die in der Bildgebung als Nebennierenmetastase imponierende Raumforderung der Probe RCC210 im Nachhinein histologisch als Adenom, d.h. als gutartige tumoröse Veränderung heraus. In Bezug auf die primäre Zielsetzung der Arbeit, der funktionellen vergleichenden Analyse der Triplets, konnte diese Probe somit nicht weiter verwendet werden. Dennoch wurden alle Analysen für die Tumorprobe und das korrespondierende Normalgewebe durchgeführt. Analog wurde bei den zwei einzelnen Metastasen des RCC297 vorgegangen. Hintergrund hierfür ist vor allem das sekundäre Ziel dieser Arbeit, die Identifikation von neuen tumorassoziierten Antigenen abgeleitet aus Netzwerkanalysen und daraus die Entwicklung neuer individualisierter Cocktails für Peptidvakzinierungen.

Bezüglich Masse und Volumen der Proben ist hervorzuheben, dass die größte der Proben 3 g wog, wohingegen 70 % aller Proben eine Masse von weniger als 1 g und 29 % von weniger als 0,25 g aufwiesen. Trotz des geringen Volumens und Masse dieser Proben konnten ausreichend HLA-Liganden für die weiterführenden Analysen identifiziert werden. Dies steht im deutlichen

Widerspruch zu der früheren Annahme, dass eine suffiziente Analyse bezüglich HLA-präsentierter Peptide nur ab einer Probengröße von 5 g möglich ist.^{154,155} Auch wenn in der weiteren Entwicklung der Analytik postuliert wurde, dass bereits ab einer Mindestmenge von 1 g Gewebe eine sinnvolle Analyse möglich ist¹⁵⁶, so muss auch diese Aussage klar revidiert werden. Die Erklärung für die offensichtlich nun effizientere Identifikation von HLA-Liganden ist sicherlich in der deutlich gesteigerten Sensitivität der massenspektrometrischen Analyse zu sehen. So konnten z.B. aus der gleichen Gewebeprobe RCC399 bei 13,8 g verwendeter Probenmenge und analoger Peptidisolierung durch die Analyse mit einem Q-TOF Ultima-Massenspektrometer 68 HLA-Liganden isoliert werden.¹⁵⁷ In dieser Arbeit wurden aus den Resten dieser Probe mit einer Masse von 0,43 g über 350 Klasse I HLA-Liganden isoliert, d.h. unter Verwendung von 3 % der ursprünglichen Gewebemenge wurde die Ausbeute an Liganden auf über 500 % gesteigert. Dies unterstreicht nochmals die hohe Sensitivität und Effizienz der eingesetzten Methode.

4.1.2 Manuelle Evaluation von Peptidspektren

Durch die rasante Entwicklung der Massenspektrometrie in den letzten Jahren ist die Anzahl von identifizierten HLA-Liganden pro Einzelexperiment rapide angestiegen.^{135,136,137} Vor diesem Hintergrund gewinnt die automatisierte Auswertung von Fragmentspektren immer mehr an Bedeutung. Ein cut-off für die Rate an falsch positiv identifizierten Peptiden (FDR) ist dabei das meistverwendete Maß für die automatische Bewertung und Analyse von Peptidannotationen.¹⁵⁸ Dennoch ist die manuelle Evaluation von Peptidspektren als Goldstandard anzusehen.¹⁵⁹

Insbesondere auf Grund der Neueinstellung des Massenspektrometers während der Durchführung der Experimente für diese Arbeit, konnten bei den durchgeführten Messungen keine zufriedenstellenden Ergebnisse unter Anwendung eines FDR-Filters erzielt werden. Um eine ausreichende Sensitivität zu gewährleisten, erfolgte die gesamte Auswertung von über 100.000 Fragmentspektren mittels manueller Evaluation. Der Nachteil dieser Methode liegt mit ihrer Zeitintensivität auf der Hand.

Andererseits konnte hierbei verdeutlicht werden, dass auch andere Parameter zur Bewertung der Qualität für die automatische Zuordnung eines Peptids zu einem Fragmentspektrum, wie z.B. der Ion Score des Mascot-Servers nicht zwingend als Ausschlusskriterium ab einem gewissen Schwellenwert herangezogen werden sollten. Dies beruht auf der Tatsache, dass 40 % aller identifizierten Peptide für HLA-Klasse I und 35 % für HLA-Klasse II einen Ion Score von unter 20 aufwiesen und dennoch später deutlich über 95 % aller HLA-Klasse I und II Peptide nachträglich in unabhängigen Experimenten unter automatisierten Auswertungskriterien mit einer FDR < 0,05 ebenfalls detektiert werden konnten. Dies belegt, dass der Grenzwert für den Ion Score, welcher normalerweise bei 20 angesetzt wird, bei manueller Evaluation der automatisch annotierten Peptide zu Gunsten einer besseren Peptidausbeute bis auf einen Minimalwert von 10 ausgedehnt werden kann.

Falls es der Datenumfang eines Experimentes zulässt, ist somit eine manuelle Evaluation der bereits durch eine Software (z.B. den Proteome Discoverer) annotierten Fragmentspektren einer reinen Filter-basierten automatisierten Auswertung in Bezug auf die Ausbeute der HLA-Liganden vorzuziehen. Auf Grund der immer weiter steigenden Zahlen von identifizierten Peptiden pro Experiment ist dieses Vorgehen jedoch wahrscheinlich schwer umsetzbar. Außerdem ist bei der manuellen Bewertung der Fragmentspektren ein nie auszuschließender vom Auswertenden abhängiger Bias zu berücksichtigen.

Einen möglichen Mittelweg stellt insbesondere für die Identifizierung von HLA-Liganden folgendes Vorgehen dar: In einem ersten Schritt werden alle Peptide unabhängig von ihrem Ion Score oder FDR akzeptiert und in einem weiteren Auswertungsschritt durch ein zweites unabhängiges Kriterium validiert. Bei bekannter HLA-Typisierung wäre hierbei eine HLA-Restriktion das Mittel der Wahl, d.h. es werden nur Peptide akzeptiert, welche eindeutig einem HLA-Bindemotiv passend zur Typisierung zugeordnet werden können. Trotz einer gewissen Vorselektion möglicher identifizierter Peptide könnte es sich lohnen, diese Methode bei manuell nicht auswertbaren Analysen anzuwenden.

4.2 Diskussion der Ergebnisse: Peptidausbeute, Abgleich mit PBMCs und Verteilung der Quellproteine in unterschiedlichen Gewebesubtypen

4.2.1 Anzahl identifizierter HLA-Liganden

Durch die Anwendung der manuellen Auswertung konnte in dieser Arbeit eine sehr große Gesamtanzahl von HLA-Liganden identifiziert werden, wie sie zum Zeitpunkt der Datenerhebung nach unserem Wissen noch nie für das Nierenzellkarzinom beschrieben wurde. Inzwischen konnten in laborinternen Experimenten jedoch noch deutlich höhere Ausbeuten erzielt werden.

Im Mittel wurden pro Patient etwa 500 HLA-Klasse I (Streubreite 415 bis 633, Standardabweichung 87) und 250 HLA-Klasse II Liganden (Streubreite 96 bis 497, Standardabweichung 147) detektiert. Hierbei fällt auf, dass den recht konstanten Ergebnissen der HLA-Klasse I breiter streuende Ergebnisse der Klasse II gegenüberstehen.

Damit im Einklang zeigen sich die Ergebnisse der HLA-Klasse I von der Masse der verwendeten Proben unabhängig, wohingegen für HLA-Klasse II zumindest ein Trend für die Korrelation von Masse und Anzahl identifizierter Peptide aufgezeigt werden kann. In vorausgegangenen Untersuchungen war stets kein Zusammenhang zwischen Masse und identifizierten HLA-Liganden gesehen worden.¹⁵ Dies kann u.a. darauf zurückzuführen sein, dass die HLA-Expression und somit die Präsentation von Peptiden im Rahmen der Immunevasion herunterreguliert wird.¹⁶⁰ Die jeweils geringste Ausbeute an HLA-Klasse II Peptiden innerhalb der drei Gewebesubtypen eines Patienten ließ sich mit einer Ausnahme (RCC377M) für Proben aus Metastasen feststellen. Dies lässt sich am besten dadurch erklären, dass Veränderungen des HLA-Klasse II-Komplexes mit konsekutiv beeinträchtigter Präsentation besonders in Metastasen ein häufig beobachtetes Phänomen darstellen.¹⁶¹

4.2.2 Überlappung von Quellproteinen aus Nierengewebe mit Proteinen aus mononukleären Blut- und Knochenmarkzellen

Bei der Analyse von Gewebeproben ist grundsätzlich davon auszugehen, dass es sich hierbei nicht um homogenes Material handelt. Meist wird der für das Organ spezifische Anteil, wie auch im Fall der Nieren, von den Epithelien

gebildet, welche die eigentlich zu untersuchende Zellart darstellen, da von ihnen die Karzinogenese ausgeht. Im speziellen Fall der klarzelligen Nierenkarzinome entstehen die Tumoren im Bereich des Tubulusepithels. Zusätzlich zu dieser Zellart finden sich dennoch auch immer andere Zelltypen, die am histologischen Aufbau der Niere beteiligt sind: Podozyten, Mesangiumzellen sowie Endothelien und Zellen der glatten Muskulatur aus den in großer Zahl vorhandenen Blutgefäßen.

Eine getrennte Analyse dieser unterschiedlichen Zellpopulationen ist wenn überhaupt nur unter sehr großem Aufwand, z.B. durch eine Lyse mit anschließender Fluoreszenz-aktivierter durchflusszytometrischer Zellsortierung (fluorescence activated cell sorting, FACS) möglich und wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Ebenso bilden diese Zellen untereinander eine funktionelle Einheit, bei der Niere auf mikroskopischer Ebene als Nephron definiert, so dass eine getrennte Analyse dieser Zellen nicht zwingend notwendig erscheint. Im Gegensatz hierzu stehen lymphozytäre Zellen, welche im Rahmen der Entzündungsreaktion, die durch ein Karzinom hervorgerufen wird, in das Gewebe einwandern¹⁶² und die Prognose verschiedener Karzinome beeinflussen können.^{163,164} Auch für das Nierenzellkarzinom ist eine Infiltration durch zytotoxische, aber auch für regulatorische T-Zellen beschrieben.¹²⁰

Bereits Virchow beschrieb 1881 Entzündungsreaktionen im Rahmen der Krebsentstehung.¹⁶⁵ Inwiefern Karzinome auf dem Boden einer chronischen Entzündung entstehen oder ob es zur Entzündungsreaktion durch den vorhandenen Tumor kommt, ist nicht abschließend geklärt. Beide Modelle sind jedoch biologisch sinnvoll und etabliert¹⁶⁶, weswegen die Entzündungsreaktion als eine der *Hallmarks of Cancer* in der überarbeiteten Version von Hanahan und Weinberg beschrieben wird.¹⁶⁷ Dadurch, dass der Tumor seinerseits versucht durch immunsuppressive Mechanismen vor allem zytotoxischen T-Zellen zu unterdrücken¹⁶⁸, wird deutlich, dass tumorinfiltrierende Lymphozyten funktionell klar vom Nierengewebe, egal ob gutartig oder maligne entartet, abgegrenzt werden müssen. Insbesondere für die weiterführende Netzwerkanalyse wäre der Einfluss einer funktionell deutlich unterschiedlich ausgerichteten Zellpopulation von großem Nachteil.

Aus diesem Grund erfolgte ein Abgleich von HLA-Liganden, die aus PBMCs und BMMCs isoliert wurden, mit den Liganden aus den Gewebeproben. Ziel dieses Schrittes war es, eine mögliche Kontamination der Peptidlisten durch Ergebnisse aus tumorinfiltrierenden Lymphozyten und anderen Immunzellen, welche hoch wahrscheinlich ist, zu bereinigen. Im weiteren Verlauf werden diese Proben nach dieser Bearbeitung als „nierenspezifisch“ bezeichnet. Die mit über 75 % aller Liganden äußerst hohe Überschneidung für HLA-Klasse I und eine über 50%ige Überlappung für HLA-Klasse II-Liganden ist sicherlich nicht ausschließlich auf fälschlicherweise aus Lymphozyten identifizierte Peptide zurückzuführen. Vielmehr beinhaltet die Überschneidung ebenfalls nicht unerhebliche Anteile von Peptiden aus Haushaltsprotein (housekeeping enzymes), welche ubiquitär in unterschiedlichen Geweben und Zellpopulationen nachweisbar sind und ebenso auf HLA-Komplexen präsentiert werden.

Ebenfalls ist zu betonen, dass durch die Verbesserung der laborinternen Methoden die zur Verfügung stehende Anzahl von Peptiden aus PBMCs und BMMCs diejenige aus Gewebeproben um das 5-fache übertraf, was für die Generierung von nierenspezifischen Proben in Bezug auf eine besonders effiziente Aussortierung als Vorteil gewertet werden kann. Die hierbei wahrscheinlich vollzogene Elimination von Haushaltsproteinen lässt sich schwer vermeiden und ist für die weitere Analyse insofern weniger relevant, da für die im Verlauf aus den Daten identifizierten tumorassoziierten Antigene und Peptide eine gleichzeitige Präsentation der Liganden auf Lymphozyten nicht wünschenswert ist. Dies bedeutet, dass ein postuliertes Antigen nicht sinnvoll für eine Vakzinierung eingesetzt werden kann, wenn es gleichzeitig auf z.B. CD8+ T-Zellen präsentiert wird, da durch periphere Toleranzentwicklung bis hin zur Anergie keine suffiziente Immunantwort gegen dieses Epitop erzielt werden kann. Das Aussortieren von HLA-Liganden aus PBMCs und BMMCs stellt somit in jedem Fall einen sinnvollen Schritt für die weitere funktionelle Analyse der Gewebeproben dar.

4.2.3 Verteilung der Quellproteine aus HLA-Liganden zwischen Tumoren, Metastasen und Normalgewebe

Die vergleichende Analyse des Proteoms zwischen malignen sowie nicht-malignen Gewebeproben ist häufig Gegenstand von Publikationen. Meist steht hierbei die Identifikation von möglichen Biomarkern, z.B. als prognostische oder diagnostische Faktoren im Vordergrund.^{169, 170} Globale Vergleiche zwischen dem Proteom von Tumoren, Metastasen und Normalgewebe sind dagegen selten. Dennoch konnte in diesen Arbeiten, wie vom biologischen Verhalten dieser Gewebearten zu erwarten war, gezeigt werden, dass sich Tumoren und Normalgewebe in Bezug auf das gesamte Proteom deutlich unterscheiden, wohingegen das Proteom von Tumoren und deren Metastasen eine hohe Ähnlichkeit aufweist.^{171, 172} Für das Nierenzellkarzinom konnten identische Ergebnisse für das HLA-Ligandom¹⁵⁷ und im Fall des Magen- sowie des Mammakarzinoms für die mRNA-Ebene bestätigt werden.^{173,174} In Anbetracht aller dieser Daten wäre auch für das HLA-Ligandom sowie dessen Quellproteine in dieser Arbeit eine analoge Verteilung zu erwarten.

Die Analyse der Verteilung der identifizierten Quellproteine zeigte jedoch für beide HLA-Klassen eine homogene Verteilung zwischen allen drei Gewebeentitäten. Um auszuschließen, dass dieser Effekt durch den hohen Anteil an überlappenden Quellproteinen aus Gewebeproben sowie PBMCs und BMDCs begünstigt oder sogar verursacht wird, wurde die Analyse nach Ausschluss dieser überlappenden Proteine wiederholt. Auch für diese nierenspezifischen Daten konnte das erwartete Ergebnis nicht bestätigt werden. Die Ursache für die Divergenz kann nicht vollständig geklärt werden. Entweder weisen die Ergebnisse dieser Arbeit eine zu niedrige Sensitivität auf und der zu erwartende Effekt wird nicht detektiert oder die Ergebnisse für das Proteom sowie für mRNA lassen sich nicht auf HLA-Liganden und deren Quellproteine übertragen. Als Einschränkung für die letztere Erklärung spricht das Ergebnis vorhergegangener Analysen zum Nierenzellkarzinom, die den postulierten Effekt nachweisen konnten¹⁵⁷, wobei diese Arbeiten bei deutlich schlechterer Sensitivität für nur zwei Patienten durchgeführt wurden. Als Argumente für die

Richtigkeit der hier gezeigten Ergebnisse sprechen die im Vergleich merklich höhere Peptidausbeute und die doppelte Probenzahl.

Die biologische Erklärung für die Diskrepanz zwischen den Resultaten für das Proteom und das HLA-Ligandom liegt in der Antigen-Prozessierung. Auch wenn die Frage, ob das gesamte Proteom als HLA-Ligandom präsentiert wird, noch nicht abschließend geklärt ist, suggerieren die bisherigen Daten, dass zwar eine große, aber keine komplette Übereinstimmung zwischen diesen beiden Gruppen herrschen kann. Die Hauptursache hierfür ist der ständige Abbau von Antigenen durch Proteasen, denn nur wenn ein Antigen schnell genug prozessiert wird, entgeht es dem Abbau durch Proteasen. Andererseits werden Antigene, welche in geringerer Menge intrazellulär vorhanden sind, signifikant langsamer prozessiert und dadurch nicht immer präsentiert.^{175,176}

Die Zusammenschau dieser Daten legt nahe, dass selbst wenn die Kongruenz von Proteom und HLA-Ligandom nicht gegeben ist, dennoch eine homogene Verteilung von Quellproteinen aus dem HLA-Ligandom zwischen Tumor-, Metastasen- und Normalgewebe, obwohl sie im Gegensatz zu bisherigen Ergebnissen steht, durchaus möglich ist.

4.3 Diskussion der Ergebnisse: Netzwerkanalysen von Quellproteinen aus HLA-Liganden und Vergleich zwischen Gewebesubtypen

4.3.1 Netzwerkanalysen aus Quellproteinen

Das primäre Ziel dieser Arbeit stellt der funktionelle Vergleich von Tumoren, Metastasen und Normalgewebe durch Netzwerkanalysen aus Quellproteinen von HLA-Liganden dar. Alle Analysen wurden auf der Proteinebene durchgeführt, da die verfügbaren Tools für Netzwerkanalysen eine Eingabe auf dieser oder der Genebene vorsehen.

Auf Grund der stetigen Zunahme von Datenvolumina in Experimenten der Proteomik gewinnen Netzwerkanalysen immer mehr an Wichtigkeit, denn sie bieten die Möglichkeit trotz einer großer Anzahl von Datenpunkten Systeme und Funktionen zu detektieren, welche nicht auf den ersten Blick ersichtlich sind.^{177, 178} Derart detektierte biologische Funktionen können zur näheren Beschreibung eines Gewebes verwendet werden, wobei sie den

experimentellen Nachweis, z.B. für die Aktivierung eines Signalweges nicht ersetzen.

Netzwerkanalysen dienen somit in erster Linie der Generierung von Hypothesen oder wie in dieser Arbeit einer näheren Charakterisierung einer Probe, was in beiden Fällen dennoch zur Identifizierung weiterer Ergebnisse führen kann. Insgesamt bieten Netzwerkanalysen den Vorteil, komplexe Datensätze zu bewerten und biologische Prozesse in ihrer Gesamtheit zu beschreiben.

In dieser Arbeit erfolgte die Generierung von nierenspezifischen Eingabelisten (input lists) für die Netzwerkanalyse über den Abgleich und das Aussortieren von überlappenden Peptiden aus Gewebeproben und PBMCs sowie BMMCs. Alle auf den Gewebeproben vorhandenen HLA-Allele waren ebenfalls auf mononukleären Zellen präsent, so dass die Vergleichbarkeit auf Peptidebene gewährleistet war. Aus den nach dem Abgleich verbliebenen HLA-Liganden leiteten sich Quellproteine ab, die als Eingabelisten für die Netzwerkanalysen mittels der GeneMania-Software dienten.

Insgesamt wurde jede Analyse mit vier unterschiedlichen Gewichtungen, d.h. mit einer Favorisierung bestimmter Prozesse durchgeführt: automatische Gewichtung für ein Netzwerk mit maximaler Interaktionsstärke, sowie Gewichtungen nach biologischem Prozess, molekularer Funktion und zellulärer Komponente. Das Ziel dieser mehrfachen Analyse war es, eine möglichst hohe Ausbeute an signifikant verstärkten biologischen Prozessen zu detektieren. Alle Ergebnisse einer Gewebeprobe wurden nach Güte der FDR sortiert und doppelte Resultate aussortiert.

Für HLA-Klasse I wurden für Tumor- und Normalgewebe je ca. 200 biologische Prozesse und für Metastasen 500 Ergebnisse identifiziert. Eine eindeutige Ursache für diese 2,5-fach höhere Ausbeute lässt sich nicht eruieren. Als Hypothese kann angenommen werden, dass für den Prozess der Metastasierung mehr biologische Funktionen als für die Karzinomentstehung alleine benötigt werden und daher deren Anzahl zunimmt. Für HLA-Klasse II ist die Verteilung der Ergebnisse mit 400 - 500 Prozessen pro Gewebesubtyp konstanter.

Insgesamt lieferte die große Anzahl an identifizierten signifikant verstärkten biologischen Prozessen eine exzellente Grundlage für die funktionelle Differenzierung von Tumoren, Metastasen und Normalgewebe des Nierenzellkarzinoms.

4.3.2 Überschneidung der Ergebnisse aus Netzwerkanalysen zwischen Tumoren, Metastasen und Normalgewebe

Für die funktionelle Charakterisierung der Gewebeproben unter besonderer Berücksichtigung ihrer histologischen Subtypen wurde zunächst die Verteilung aller identifizierter Prozesse zwischen Tumoren, Metastasen und Normalgewebe bestimmt. Hierfür standen vier vollständige Gewebetriplets zur Verfügung: RCC70, RCC329, RCC377 und RCC399. Als Kontrollgruppe dienten nierenspezifische HLA-Liganden, welche analog zu ihren Quellproteinen eine homologe Verteilung unter den drei analysierten Gewebesubtypen aufwiesen, wie Abbildung 19 zeigte.

Im klaren Kontrast hierzu zeigen sich deutliche Unterschiede besonders innerhalb der Gewebeproben eines Patienten konstant über alle vier Patienten: Die stärkste Überschneidung von biologischen Prozessen zeigt sich für Proben aus Tumoren und deren Metastasen mit z.B. bis zu 46 % aller Vorgänge für RCC329. Diese deutliche funktionelle Ähnlichkeit zwischen Tumoren und ihren Metastasen lässt sich z.B. auf Transkriptomebene für das Leber- oder Kolonkarzinom sehr gut nachweisen.^{179,180} Auch wenn z.B. für das RCC399 nur eine Überlappung von 7 % zwischen diesen beiden Modalitäten nachgewiesen wurde, so stellt dieser Wert immer noch die stärkste Überlappung zwischen zwei Gewebesubtypen innerhalb dieses Patienten dar. Die hohe Streubreite zwischen den vier Patientenproben lässt sich über die intratumorale Heterogenität des klarzelligen Nierenzellkarzinoms erklären¹⁸¹: Innerhalb einer Tumorprobe lassen sich genetisch diverse Subklone abgrenzen. Postulieren wir eine große Ähnlichkeit zwischen der Metastase und dem Subklon aus welchem diese entstanden ist, so kann die Größe des Klons den späteren Ähnlichkeitsgrad determinieren, da der Vergleich zur Tumorprobe mit allen vorhandenen Subklonen geschieht.

Die zweithöchste Ähnlichkeit für biologische Funktionen wiesen Metastasen und Normalgewebe auf, wobei die prozentuale Überlappung im abhängigen t-Test signifikant niedriger war im Vergleich zur Ähnlichkeit von Tumoren zu Metastasen. Dennoch zeigt die Probe RCC329 eine Identität von 29 % bezüglich der biologischen Prozesse zwischen Metastase und Normalgewebe. In anderen Proben fällt die Ähnlichkeit mit bis zu 0 % deutlich niedriger aus. Eine Erklärung hierfür könnte eine mehr oder weniger starke mesenchymal-epitheliale Transition sein, welche nach Ablösung der Metastasen vom Primärtumor ein gewisses „Homing“ dieser Zellen ausdrückt und für Metastasen des klarzelligeren Nierenzellkarzinoms beschrieben wurde.¹⁸²

Die deutlichsten funktionellen Unterschiede zeigten sich jedoch zwischen Tumor- und Normalgewebe, denn zwischen den beiden Entitäten konnte in keinem der vier Patienten eine gemeinsame biologische Funktion detektiert werden. Dieses Ergebnis zeigt damit eine signifikant niedrigere Ähnlichkeit im Vergleich zu Tumor- und Metastasengewebe.

Auch in der gemeinsamen Überlappungsanalyse aller identifizierten Prozesse in den drei Gewebesubtypen zeigten sich lediglich 5 identische Ergebnisse zwischen Tumor- und Normalproben sowie 16 überlappende Ergebnisse in allen drei Gewebearten. Bei näherer Betrachtung sind die beschriebenen Prozesse allerdings in ihrer Beschreibung teilweise redundant, so dass letztlich 5 Basisfunktionen die einzigen Gemeinsamkeiten von malignen und nicht-malignen Geweben bilden: die Bildung von Zellkontakten (cell junction organization), Transportprozesse von Aminosäuren (neutral amino acid transport) und Proteinen (protein localization to membrane), Antigenprozessierung und -präsentation (antigen processing and presentation) und Chromosomen betreffende Prozesse (nuclear chromosome).

Die Ergebnisse der Netzwerkanalysen für HLA-Klasse II dagegen zeigen keine klaren Tendenzen für eine funktionelle Ähnlichkeit zwischen Tumoren und Metastasen oder Unterschiede bezüglich Normal- und Tumorgewebe. Nur in zwei Einzelfällen weisen erstens im RCC329 die Tumor- und Metastasenprobe mit 82 % die höchste Überschneidung innerhalb der Proben dieses Patienten auf und zweitens waren im RCC377 Tumor- und Normalgewebe zueinander mit

nur 4 % Überlappung sehr unterschiedlich. Insgesamt zeigt sich für HLA-Klasse II insbesondere nach Zusammenführen aller Prozesse pro Gewebesubtyp eine sehr einheitliche Tendenz, indem 187 biologische Prozesse (44,6 % von einer möglichen kompletten Übereinstimmung) in allen drei Gewebearten detektiert werden konnten und dies den größten Überlappungsbereich darstellt. Im Vergleich dazu waren für HLA-Klasse I nur 7,7 % einer maximalen Übereinstimmung, d.h. 16 Prozesse in allen drei Gewebesubtypen, vertreten.

Insgesamt lässt sich somit konstatieren, dass das primäre Ziel dieser Arbeit, die funktionelle Charakterisierung von Tumoren, Metastasen und Normalgeweben durch Netzwerkanalysen zumindest für HLA-Klasse I voll erfüllt werden konnte. Besonders in Anbetracht der sehr gleichmäßigen Verteilung der für die Netzwerkanalysen eingesetzten HLA-Liganden und deren korrespondierenden Quellproteine wird durch die klaren Ergebnisse nochmals die Stärke der Netzwerkanalysen deutlich: Durch die Identifikation von funktionellen Gemeinsamkeiten innerhalb einer scheinbar heterogenen Liste von Proteinen gelingt es, Gewebeproben zu charakterisieren und differenzieren. Dass dies für die HLA-Klasse II nicht gelingt, ist wohl dadurch zu erklären, dass durch die Prozessierung der Antigene des wenig variablen Extrazellulärraumes sehr uniforme Eingabelisten resultieren.

Dennoch wird im Verlauf der Diskussion gezeigt werden, dass auch mit Ergebnissen der HLA-Klasse II das sekundäre Ziel, die Identifikation von neuen tumorassozierten Antigenen, vollständig erreicht wird.

4.4 Diskussion der Ergebnisse: Identifikation von biologischen Prozessen aus Netzwerkanalysen mit Funktion für die Karzinogenese des klarzelligen Nierenzellkarzinoms sowie Ableitung von tumorassozierten Antigenen und HLA-Liganden für individualisierte Peptidvakzinen

4.4.1 Identifikation von tumorassozierten und tumorspezifischen Prozessen aus Netzwerkanalysen von malignen Gewebeproben

Durch die unterschiedliche quantitative Verteilung von funktionellen Prozessen zwischen Tumoren, Metastasen und Normalgeweben kommt zwangsläufig die Vermutung auf, dass sich auch qualitative Unterschiede in Bezug auf diese

Gewebeentitäten determinieren lassen. Aus diesem Grund ist die Frage, ob sich aus den generierten Netzwerkanalysen tumorassoziierte Antigene und HLA-Liganden ableiten lassen, als sekundäres Ziel dieser Arbeit definiert worden.

Diese Fragestellung konnte jedoch ausschließlich durch die Durchsicht der einzelnen Ergebnisse der Netzwerkanalysen und den Abgleich mit bekannten Prozessen der Karzinogenese im Allgemeinen und des klarzelligen Nierenzellkarzinoms im Speziellen beantwortet werden. Eine Vorauswahl der zu analysierenden Prozesse wurde bereits durch die Überlappungsanalyse der Venn-Diagramme zwischen Tumor- und Metastasengewebe getroffen. Zusätzlich sind aber auch Prozesse, die ausschließlich in Tumoren oder Metastasen identifiziert wurden, näher zu betrachten sowie die Ergebnisse der Überlappung mit Normalgewebe auf karzinogene Prozesse zu überprüfen.

Zusammenfassend konnten durch dieses Vorgehen sowohl für HLA-Klasse I wie auch für HLA-Klasse II neun Vorgänge bzw. Signalwege identifiziert werden, die nach allgemeinem Wissensstand zur Karzinogenese beitragen. Vier dieser neun Ergebnisse (collagen catabolism, growth factor und platelet-derived growth factor receptor binding sowie positive regulation of cellular motility) konnten für beide HLA-Klassen identifiziert werden, was die innere Validität der Daten nochmals unterstreicht und wie bereits angedeutet die fehlende differentielle quantitative Verteilung der Ergebnisse der Netzwerkanalyse für HLA-Klasse II relativiert.

Besonders zu betonen ist die teilweise äußerst hohe Signifikanz der Ergebnisse, so wurden 4 Prozesse mit einer FDR zwischen 10^{-17} und 10^{-31} detektiert. Doch auch die restlichen Funktionen wiesen eindeutige Werte auf: Die FDR von nur zwei Unternetzwerken lag zwischen 0,05 und 0,01, weitere zwei zwischen 0,01 und 0,001 und alle verbleibenden Ergebnisse konnten mit einer FDR von weniger als 0,001 detektiert werden.

Der folgende Abschnitt zeigt eine Auflistung aller detektierten tumorassoziierten Funktionen und Signalwege gemäß Tabelle 4 sowie deren Bewertung in Bezug auf die Karzinogenese und den Metastasierungsprozess allgemein oder speziell für das klarzellige Nierenzellkarzinom:

1. *Extrazelluläre Matrixorganisation (extracellular matrix organization)*: Die Neuordnung der extrazellulären Matrix spielt besonders im Rahmen der Metastasierung eine herausragende Rolle. So fördert der Abbau von extrazellulärer Matrix, z.B. durch Metalloproteinasen die Progression und Invasion eines Karzinoms¹⁸³ und der dadurch entstehende mechanische Stress in der direkten Umgebung des Tumors (tumor microenvironment) die Metastasierung.^{184,185}

2. *Zellantwort auf Hypoxie (cellular response to hypoxia)*: Die Hypoxie, welche in Tumoren durch ihr stetiges Wachstum entsteht, vermittelt zwei essentielle Mechanismen der Karzinogenese. Erstens fördert sie die Angiogenese, eines der wichtigsten Charakteristika und ein entscheidender Prognosefaktor des klarzelligen Nierenzellkarzinoms¹⁸⁶ und zweitens die Rekrutierung von regulatorischen T-Zellen, welche ihrerseits die Angiogenese fördern und immunsuppressiv auf zytotoxische T-Zellen wirken.¹⁸⁷

3. *Kollagenabbau (collagen catabolic process)*: Ähnlich wie der Umbau der extrazellulären Matrix steht auch der Kollagenkatabolismus in enger Beziehung zur Entstehung von Metastasen. Besonders die Bildung von Knochenmetastasen, wie für das Mammakarzinom gezeigt wurde, wird durch diesen Vorgang unterstützt.¹⁸⁸

4. *Degranulation von Blutplättchen (platelet degranulation)*: Dieser etwas untypische Vorgang für die Karzinogenese steht immer mehr im Interesse der Forschung. Für das Ovarialkarzinom konnte belegt werden, dass die Adhäsion und Degranulation von Blutplättchen am Tumor zu einer Steigerung der Überlebensfähigkeit und der Angiogenese führt.¹⁸⁹

5. *Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor-Signalweg (fibroblast growth factor receptor signaling pathway)*: Wie auch viele andere Tyrosinkinase ist der FGFR in die Karzinogenese diverser Tumorarten involviert. Neben seiner essentiellen Rolle für Entzündungs- und Reparaturprozesse besteht die

Funktion dieses Signalweges unter anderem in der Induktion von Angiogenese über einen VEGF-unabhängigen Weg.¹⁹⁰

6. *Blutplättchen abhängiger Wachstumsfaktor-Signalweg (platelet-derived growth factor binding)*: Neben der Verstärkung des Wachstums von Endothelien für Blutgefäße fördert dieser Signalweg auch die Zellproliferation allgemein.¹⁹¹ Seine Rolle für das RCC wird auch dadurch deutlich, dass das Tumorstadium im Mausmodell durch seine Blockade unterdrückt werden kann.⁴²

7. *Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor-Signalweg (epidermal growth factor receptor signaling pathway)*: Der EGFR-Signalweg ist einer der wichtigsten pathways in der Entstehung von Karzinomen und eines der am häufigsten attackierten Zielmoleküle bei der Behandlung mit Tyrosinkinaseinhibitoren oder blockierenden Antikörpern, z.B. für das Lungenkarzinom.¹⁹² Die biologische Eigenschaft des EGFR-Rezeptors konzentriert sich bei der Karzinogenese in erster Linie auf Proliferationssignale für Zellen epithelialen Ursprungs. Insbesondere für das Nierenzellkarzinom stellt er ein Wachstums- aber auch ein Migrationssignal dar.¹⁹³

8. *Bindung von Wachstumsfaktoren (growth factor binding)*: Dieser Prozess bietet lediglich den Sammelbegriff für alle in dieser Arbeit verwendeten Signalwege von Wachstumsfaktoren. Für die einzelnen Eigenschaften wird auf den Eintrag des jeweiligen spezifischen Signalwegs verwiesen.

9. *Positive Regulation der Zellbeweglichkeit (positive regulation of cell motility)*: Für die Entstehung von Metastasen ist es unabdingbar, dass Zellen die Fähigkeit erlangen, sich eigenständig fortzubewegen. Diese Eigenschaft wird hierbei von verschiedenen Faktoren, wie z.B. der extrazellulären Matrix, Chemokingradienten oder Wachstumssignalen getriggert.¹⁹⁴ So führt etwa die Überexpression des EGFR zu einer Stimulation der Zellbeweglichkeit.¹⁹⁵

10. *Entstehung von Blutgefäßen (blood vessel development)*: Dieser Prozess wird im Rahmen der Entwicklung von Karzinomen mit Neo-Angiogenese zusammengefasst und stellt beinahe einen pathognomonischen Faktor für die Entstehung des klarzelligigen Nierenzellkarzinoms mit seiner äußerst starken Vaskularisation dar.¹⁹⁶ Wie bereits gezeigt, führen eine Vielzahl von Prozessen insbesondere die Hypoxie und die Aktivierung des VEGFR-Signalweges zur Verstärkung der Angiogenese. Umgekehrt stellt die Blockade der Gefäßneubildung einen guten therapeutischen Ansatz für das Nierenzellkarzinom dar.¹⁹⁷

11. *Abbau von Kohlenhydraten (carbohydrate catabolic process)*: Der Warburg-Effekt beschreibt eine Hypothese zur Veränderung des Metabolismus in Krebszellen. In erster Linie wird hierbei der Abbau von Glukose nicht mehr wie üblich oxidativ durchgeführt, sondern anaerob, was zu einer vermehrten Produktion von Laktat führt. Da diese anaerobe Glykolyse jedoch energetisch weniger effektiv ist als die aerobe, lässt sich in Tumorzellen kompensatorisch ein vermehrter Abbau von Glukose beobachten.¹⁹⁸ Um diesen Prozess zu begünstigen, ist im Nierenzellkarzinom ein entscheidendes Enzym der nicht nur in der Leber, sondern auch in der Niere stattfindenden Glukoneogenese, die Fructose-1,6-bisphosphatase 1, regelhaft homozygot deletiert.¹⁹⁹ Aus diesem Grund ist der vermehrte Abbau von Kohlenhydraten, definitiv auch als Funktion der Karzinogenese zu werten.

12. *Proliferation von Epithelien (epithelial cell proliferation)*: Dieses Merkmal ist - so es sich um eine nicht mehr regulierte Proliferation mit Gewebeinvasion handelt - die Definition eines Karzinoms. Erneut kann dieser Effekt von unterschiedlichen Mechanismen getriggert werden. Der häufigste ist jedoch die übermäßige Aktivierung von Wachstumsrezeptor-Signalwegen, wie z.B. EGFR oder PDGFR.²⁰⁰

13. *Epithelial-mesenchymale-Transition (epithelial to mesenchymal transition)*: Dieser Prozess beschreibt die Umprogrammierung einer Zelle von einer

epithelialen zu einer mesenchymalen Zelle, d.h. einer Zelle mit der Eigenschaft, sich aus dem Zellverband zu lösen, auszuwandern und invasiv in andere Gewebe vorzudringen. Insofern wird dieser Prozess als Grundvoraussetzung für die Metastasierung angesehen.²⁰¹ Für Zelllinien von Nierenzellkarzinomen konnte gezeigt werden, dass der EGFR-Signalweg diese Transition induzieren kann.²⁰²

14. Mesenchymal-epitheliale Transition (mesenchymal to epithelial transition): Im Gegensatz zum vorher beschriebenen Mechanismus beschreibt dieser Prozess ein gewisses „homing“ der Zellen. Nachdem Metastasen in anderes Gewebe vorgedrungen sind und ihre Wanderung beendet haben, setzt die mesenchymal-epitheliale Transition ein. Auch wenn dieser Vorgang die vorhandenen Zellen zum Teil weniger aggressiv werden lässt, so ist er dennoch typisch für metastasierende Zellen und kann auch als therapeutisches Ziel zur Verhinderung von Metastasierung angegangen werden.²⁰³

Zusammenfassend wurden somit 14 Mechanismen detektiert, welche alle zur Karzinogenese und Metastasierung beitragen und im HLA-Ligandom der Gewebeproben dieser Arbeit kodiert sind. Lediglich zwei dieser Prozesse konnten auch auf einer einzelnen nicht maligne Gewebeprobe (RCC399N) für HLA-Klasse II wiedergefunden werden: die Entwicklung von Blutgefäßen und allgemein Wachstumsfaktorrezeptorensignalwege.

Zwei mögliche Erklärungen können hierfür gefunden werden. Die erste ergibt sich aus klassischen Mechanismen der Immunantwort. Extrazelluläre Antigene könnten im Bereich des Tumors von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen, anschließend prozessiert und nachdem die Zellen in Normalgewebe weitergewandert waren, auf HLA-Klasse II-Komplexen präsentiert worden sein. Eine weitere Erklärung ergibt sich aus den Komorbiditäten des Patienten, von welchem die Gewebeprobe RCC399 abstammt. Auf Grund eines über viele Jahre bekannten Diabetes mellitus Typ 2 und erhöhten Serumkreatininwerten kann angenommen werden, dass der Patient zusätzlich unter einer diabetischen Nephropathie litt. Im Rahmen dieser

Erkrankung kommt es unter anderem zu einer abnormalen erhöhten Angiogenese in Nierengewebe²⁰⁴ bei gleichzeitig nachgewiesener Involvierung des epidermalen und transformierenden Wachstumsrezeptorsignalweges beta (EGFR und TGFB-Signalweg).^{205,206}

Bis auf die Prozesse der mesenchymal-epithelialen und der epithelial-mesenchymalen Transition wurden alle biologischen Mechanismen mindestens dreimal, d.h. in mindestens 25 % aller malignen Proben nachgewiesen und betonen die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse dieser Arbeit. Die Tatsache, dass die Organisation der extrazellulären Matrix sowie die Entwicklung von Blutgefäßen jeweils in dreiviertel aller malignen Proben nachgewiesen werden konnte, zeigt die zentrale Stellung dieser Prozesse. Beides erscheint biologisch sinnvoll, da zum einen bereits makroskopisch die extrem hohe Vaskularisation des klarzelligigen Nierenzellkarzinoms imponiert sowie andererseits bis auf das RCC210 alle Tumore dieser Arbeit bereits ein invasives Wachstum inklusive Fernmetastasierung aufweisen, was einen Umbau der extrazellulären Matrix notwendig macht.

Insgesamt konnten durch die Kombination der Ergebnisse beider HLA-Klassen für jeden Patienten dieser Arbeit unabhängig von der Anzahl der bereitgestellten Proben zwischen 6 und 11 in die Karzinogenese und Metastasierung involvierte Prozesse identifiziert werden.

4.4.2 Identifikation von tumorassoziierten Antigenen aus in Netzwerkanalysen detektierten tumorspezifischen Prozessen

Allen in den Netzwerkanalysen identifizierten biologischen Vorgängen liegen selbstverständlich eine Vielzahl von involvierten Proteinen zu Grunde. Die Anzahl der Proteine, die diese Prozesse definieren, variiert hierbei zwischen ca. 15 und über 200 Proteinen. Diejenigen Komponenten eines Vorganges, die von diesen etwa 15 bis knapp 300 Proteinen in der aktuellen Netzwerkanalyse detektiert wurden, werden wie in Abbildung 22 dargestellt rot unterlegt. Die hierbei gekennzeichneten Antigene eines bereits als tumorspezifisch identifizierten Prozesses werden anschließend unabhängig davon, ob diese als tumorassoziiert etabliert sind, auf ihre Verteilung zwischen Tumor-, Metastasen-

und Normalgewebe hin untersucht und nach für maligne Proben spezifischen Antigenen gefahndet.

Auf diese Weise gelingt die Identifikation von bekannten, aber auch neuen tumorassoziierten Antigenen und den dazu korrespondierenden HLA-Liganden. Hierbei werden Proteine auch dann als tumorassoziierte Antigene gewertet, wenn diese nur einmalig in Normalgewebe detektiert wurden, zusätzlich eine höhere Detektionsfrequenz in malignen Gewebeproben vorlag und für das Antigen ausschließlich korrespondierende HLA-Klasse II-Liganden detektiert wurden.

Für zwei Antigene lag dieser Fall vor: COL1A1 und PAX2 wurden je einmal als HLA-Klasse II-Quellprotein in der Gewebeprobe RCC399N identifiziert und mindestens dreimal auf malignen Gewebeproben. Insbesondere die Tatsache, dass es sich um HLA-Klasse II-Peptide im Normalgewebe handelt, lässt die Erklärung zu, dass diese Antigene ursprünglich in malignem Gewebe von antigenpräsentierenden Zellen (Monozyten, Makrophagen, B-Zellen oder dendritischen Zellen) phagozytiert, prozessiert und nach Einwanderung in Normalgewebe auf diesen Zellen präsentiert wurden. Dies steht nicht im Widerspruch zur Verwendung nierenspezifischer Proben, da die im Blut auf PBMCs präsentierten Peptide einem anderen Antigen-Repertoire entstammen als diejenigen, die in diesem Mechanismus beschrieben werden. Alle anderen als tumorassoziierte Antigene identifizierte Proteine wurden ausschließlich auf malignen Gewebeproben gefunden und niemals - gemäß der Verwendung nierenspezifischer Proben - auf PBMCs oder BMDCs.

Tabelle 4 zeigt die Zusammenstellung aller tumorspezifischer biologischer Prozesse und den darin involvierten Proteinen, die als tumorassoziiert identifiziert wurden. Neben der Tatsache, dass deren Peptide ausschließlich auf HLA-Komplexen von Tumoren und Metastasen präsentiert wurden, sollen nun - analog den biologischen Prozessen im vorangegangenen Kapitel - die einzelnen Antigene bezüglich ihrer Funktion in der Entstehung von Karzinomen und deren Metastasen in alphabetischer Reihenfolge näher beleuchtet werden:

1. *Adenomatous polyposis coli protein (APC)*: Das APC-Protein hat eine große Bedeutung als Tumorsuppressorgen, insbesondere bei der Entstehung des Kolonkarzinoms.^{207, 208} Auch im Nierenzellkarzinom wurde der für Tumorsuppressorgene in der Karzinogenese typische Verlust der Heterozygotie (loss of heterozygosity) in ca. 40 % der Fälle beschrieben.^{209,210} Diese hohe Mutationsrate kann dazu führen, dass die falsch produzierten Proteine einem vermehrten Abbau durch das Proteasom zugeführt werden und hierdurch eine Präsentation der Peptide mittels HLA-Komplexen vermehrt erfolgt. Funktionell führt der Verlust des APC-Genprodukts intrazellulär zu einer Akkumulation von β -Catenin und dadurch zu einem Effekt ähnlich der Aktivierung des Wnt-Signalweges mit konsekutiver Aktivierung von c-Myc, einem der potentesten Proto-Onkogene.^{211,212}

2. *Breast cancer anti-estrogen resistance protein 1 (BCAR1)*: Insbesondere für die Entstehung und Prognose des nicht-kleinzelligen Bronchiakarzinoms und des Mammakarzinoms ist das BCAR1-Protein von großer Bedeutung.^{213,214} Ein möglicher Grund hierfür ist seine wichtige Funktion bei der Zellmigration.²¹⁵ Neuere Arbeiten betonen vor allem die Assoziation von Mutationen des BCAR1-Genes mit dem Pankreaskarzinom.²¹⁶

3. *Carbonic anhydrase 9 (CA9)*: In mehrerer Hinsicht ist die Carboanhydrase 9 für das Nierenzellkarzinom von essentieller Bedeutung. In gesundem Nierengewebe lässt sich im Gegensatz zum Nierenzellkarzinom immunhistochemisch CA9 nicht nachweisen, was die Tumorspezifität dieses Proteins belegt.²¹⁷ Zusätzlich ist der Verlust der Expression von CA9 auf Nierenzellkarzinomgewebe mit einer schlechten Prognose assoziiert.²¹⁸ Daten der ARISER-Studie von 2015 zeigen somit die Notwendigkeit der regelhaften Untersuchung von Nierenresektaten beim Nierenzellkarzinom.²¹⁹ Jene Eigenschaften machen dieses Protein zu einem häufigen Zielobjekt für mögliche Tumortherapien. So wurden bereits in Peptidvaksinierungsstudien T-Zell-Antworten gegen dieses Antigen dokumentiert.¹⁴⁹ Aktuell werden z.B. in einer Phase III-Studie Lutetium-177-gekoppelte Antikörper gegen CA9 als eine

mögliche Radioimmuntherapie klinisch getestet.²²⁰ Molekularpathologisch liegt die Funktion der Hypoxie-induzierten Carboanhydrase 9 in der Förderung der Angiogenese.²²¹

4. *Calreticulin (CALR)*: Insgesamt ist die Rolle von Calreticulin in der Karzinogenese noch nicht in seiner vollen Tiefe geklärt. Bisher bekannt ist, dass die Überexpression dieses Genes zur Entstehung und Metastasierung sowohl des Ösophagus- als auch des Pankreaskarzinoms durch die Förderung der Zellbeweglichkeit beiträgt.^{222, 223} Zum anderen führt die Präsentation von Calreticulin an der Zelloberfläche zu einer verstärkten Immunantwort gegen diese tumorös veränderte Zelle.²²⁴ Diese beiden Aspekte unterstreichen das Potential dieses Antigens für eine zielgerichtete immunologische Therapie-strategie.

5. *Platelet glycoprotein 4 (CD36)*: Das CD36-Molekül ist ein multifunktionelles Glykoprotein, welches als Rezeptor für eine Vielzahl von Liganden, z.B. Thrombospondin 1 und 2 dient, welche ebenfalls als tumorassoziierte Antigene in dieser Arbeit identifiziert wurden. Die Funktion dieses Proteins ist somit eng mit der ihrer Liganden verknüpft. Und obwohl für die Aktivierung dieses Rezeptors ein proapoptotischer Effekt im Mammakarzinom gezeigt werden konnte²²⁵, zählt CD36 dennoch zu den Tumorstammzellmarkern im Glioblastom²²⁶, was wiederum die Tumorspezifität dieses Proteins unterstreicht.

6. *Collagen alpha-1 (I) chain (COL1A1)*: Insbesondere die Analyse von Genprofilen von Tumoren geben immer wieder Hinweise auf die Rolle dieses Kollagensubtyps bei der Karzinogenese. So findet sich eine Überexpression von COL1A1 in Karzinomen beinahe jeden Ursprungs, u.a. beim Magen- und Kolonkarzinom.^{227,228} Ebenso wurde für das Nierenzellkarzinom in Screening-untersuchungen COL1A1 als tumorassoziiertes Antigen identifiziert²²⁹, dessen Überexpression mit einer schlechten Prognose assoziiert ist.²³⁰

7. *Epidermal growth factor receptor (EGFR)*: Es muss kaum betont werden, dass diese Rezeptor-Tyrosinkinase eine der wichtigsten in Bezug auf Tumorsignalwege darstellt. Folgerichtig wurden in den letzten Jahren mehrere Tumorthérapien entwickelt, die eine Blockade dieses Rezeptors zum Ziel haben. Tyrosinkinaseinhibitoren wie Gefitinib oder Erlotinib werden z.B. erfolgreich in der Therapie des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms sowie des Pankreaskarzinoms eingesetzt.^{231,232}

Ebenfalls ist die Antikörper vermittelte Blockade des EGFR u.a. für das kolorektale Karzinom etabliert.²³³ Und auch wenn für das Nierenzellkarzinom noch keine zielgerichtete Therapie für diesen Tyrosinkinase-Rezeptor zugelassen ist, so spielt er in der Onkogenese eine wichtige Rolle, denn nach der Aktivierung dieses Signalweges durch Hypoxie führt seine Blockade im Tierexperiment zu einem deutlichem Rückgang des Tumorwachstums.^{234,235} Doch letztlich auch mittels Peptidvakzinierung gegen EGFR ist eine Verlängerung des Gesamtüberlebens, z.B. für Patienten mit intrazerebralen Tumoren, zu erzielen.²³⁶

8. *Egl nine homolog 3 (EGLN3)*: Die Rolle von EGLN3 in der Karzinogenese ist besonders im Rahmen der Hypoxie etabliert und unterhält das Tumorwachstum über die Destabilisierung von p27¹⁴³. Zusätzlich zeigen neuere Arbeiten, dass bei einem Verlust von EGLN3 der EGFR-Signalweg stimuliert wird.²³⁷ Außerdem konnte für das Nierenzellkarzinom sowohl eine Überexpression dieses Proteins²³⁸ als auch dessen Immunogenität¹⁵¹ gezeigt werden.

9. *Enolase 1 (ENO1)*: Dieses Enzym wurde vor allem durch Proteomanalysen von Karzinomen als tumorassoziiertes Antigen identifiziert. So wurden z.B. für nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome Autoantikörper gegen dieses Antigen nachgewiesen.²³⁹ Neben seiner Rolle für das Tumorwachstum und die Invasivität wird in letzter Zeit die Relevanz in Bezug auf die Glykolyse und den Warburg-Effekt betont.²⁴⁰

10. *Glutamyl aminopeptidase (ENPEP)*: Durch seine etablierte Funktion im Renin-Angiotensin-System wurde dieses Enzym nicht primär mit der Karzinogenese verknüpft. Dennoch wurde bereits 2004 demonstriert, dass ENPEP entscheidend bei der Neovaskularisation von Tumoren involviert ist und dass dessen Blockade in Tumormodellen zu einem Wachstumsrückgang führt.²⁴¹

11. *Fibronectin (FN1)*: Fibronectin stellt einen essentiellen Bestandteil der extrazellulären Matrix dar. Dennoch ist es kein reines Strukturprotein, sondern auch in Signalkaskaden eingebunden. So wird die Zellproliferation und Invasion von malignen Zellen des Gallenblasenkarzinoms über Fibronectin und schließlich den mTOR-Signalweg gesteuert.²⁴² Auch zur epithelial-mesenchymalen Transition trägt Fibronectin bei, wie u.a. für das Mammakarzinom gezeigt werden konnte.²⁴³ Auf Grund dieser und weiterer Funktionen von Fibronectin wird nochmals deutlich wie bedeutend die Interaktion von Tumorzellen mit der extrazellulären Matrix, z.B. auch über die Steuerung von Adhäsion²⁴⁴, für deren Fähigkeit zur Metastasierung ist.

So ist es wenig verwunderlich, dass eine hohe Expression von Fibronectin im klarzelligem Nierenzellkarzinom aber auch in anderen Unterformen dieses Karzinoms mit einer höheren Rate an Metastasen und einem geringer Gesamtüberleben korreliert.^{245,246}

12. *Growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2)*: Als Adapterprotein stellt GRB2 die entscheidende Verbindung zwischen dem EGFR und SOS dar und ist somit ein wichtiger Bestandteil des EGFR-Signalweges. Insofern lassen sich alle Tumorassoziationen des EGFR-Proteins zu großen Teilen auch auf GRB2 übertragen. Unabhängig davon ist insbesondere für das Mammakarzinom eine häufige Überexpression für GRB2 beschrieben²⁴⁷ und dass durch dessen Hemmung das Tumorstadium inhibiert werden kann.²⁴⁸

13. *Insulin-like growth factor-binding protein 3 (IGFBP3)*: Die Rolle von IGF-bindenden Proteinen in Bezug auf das Zellwachstum ist nicht a priori definiert.

Im Fall von IGFBP3 wurde zunächst eine Überexpression des Proteins in Nierenzellkarzinomen nachgewiesen und somit ein onkogenes Potential vermutet.²⁴⁹ Zweifelsohne führt andererseits die im klarzelligen Nierenzellkarzinom meist vorherrschende Hypoxie über die Aktivierung von HIF-abhängigen Genen zur gesteigerten Expression von IGFBP3, welches allerdings trotz der insgesamt stark onkogenen Wirkung von HIF in diesem Setting als Tumorsuppressor wirkt.²³⁸

In jedem Fall lässt sich jedoch zweifelsfrei feststellen, dass HLA-präsentierte Peptide aus IGFBP3 sinnvolle Ziele für Immuntherapien darstellen, da bereits in klinischen Studien für das Nierenzellkarzinom eine immunogene Wirkung von Peptidvakzinen aus IGFBP3 nachgewiesen werden konnte, wodurch die exakte Funktion dieses Proteins innerhalb der Karzinogenese eher zweitrangig erscheint.¹⁴⁹

14. Inositol 1,4,5-triphosphate receptor type 3 (ITPR3): Obwohl nicht sehr viele Arbeiten zu diesem Protein und seiner Rolle in der Karzinogenese vorhanden sind, gibt es dennoch eindeutige Tendenzen, die ITPR3 insbesondere mit aggressiven Verläufen und Metastasierung von verschiedenen Tumoren in Verbindung bringen. So wurde für ITPR3 erstens eine erhöhte Expression für das Kolonkarzinom²⁵⁰, das papilläre Schilddrüsenkarzinom²⁵¹ und das Melanom²⁵², zweitens ein positiver Einfluss auf das Zellwachstum des Mammakarzinoms²⁵³ und drittens eine erhöhte Mutationsrate in Metastasen von Kopf-Hals-Tumoren nachgewiesen.²⁵⁴

15. Protein-lysine 6-oxidase (LOX): Das Enzym LOX hat seinen festen Platz in der Umgestaltung der extrazellulären Matrix während der Invasion von Tumorzellen. Dennoch wurde seine Rolle für das Nierenzellkarzinom bisher nicht näher beleuchtet. Für das Mammakarzinom dagegen wurde sehr ausführlich in mehreren Arbeiten aufgezeigt wie LOX über Auflösung der Matrix mit Hilfe von Wasserstoffperoxid zur Metastasierung beiträgt.^{255,256} Doch auch für andere häufige Karzinomentitäten wie das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom oder das Kolonkarzinom ist die Wichtigkeit von LOX für Proliferation und

Metastasierung von Tumorzellen etabliert.^{257,258} Besonders interessant ist die Hypoxie-abhängige Expression von LOX und wie durch seine Sezernierung über Tumorzellen eine vor allem ossäre Metastasierung gebahnt und bei Inhibierung von LOX verhindert werden kann.²⁵⁹

16. *Matrilysin (MMP7)*: Ähnlich wie die Protein-lysine 6-oxidase hat Matrilysin vorwiegend die Aufgabe, extrazelluläre Matrix aufzulösen. Hieraus lässt sich demnach gut nachvollziehen, dass eine Überexpression im Nierenzellkarzinom die Metastasierung, aber auch die Angiogenese fördert⁴⁸. Erhöhte Plasmalevel von MMP7 korrelieren daher bei diesen Patienten mit einer höheren Rate an Metastasierung und einem schlechteren Gesamtüberleben.²⁶⁰ Somit war es nahe liegend eine Vakzinierungsstrategie gegen Epitope aus diesem Protein zu entwickeln, wobei sich schnell eine eindeutige Immunogenität der eingesetzten Peptide zeigte.²⁶¹

17. *Neuropilin-2 (NRP2)*: Als ein Rezeptor für VEGFA ist Neuropilin-2 direkt in die Angiogenese involviert. Zusätzlich fällt ihm die Aufgabe der Förderung der zellulären Motilität zu, welche im Rahmen der Metastasierung relevant wird. Während für das klarzellige Nierenzellkarzinom nur eine Überexpression von NRP2 auf dem mRNA-Level nachgewiesen werden konnte²⁶², so konnte zum Beispiel für das Melanom, das hepatozelluläre Karzinom und das Osteosarkom die direkte Wirkung von NRP2 auf Tumorwachstum und Zellmigration sowie die Möglichkeit der Hemmung dieser Mechanismen von verschiedenen Arbeitsgruppen herausgestellt werden.^{263,264,265}

18. *Paired box protein Pax-2 (PAX2)*: Für die Entwicklung der Niere ist PAX2 ein wichtiger Transkriptionsfaktor. Im Rahmen der immunhistologischen Differenzierung von Karzinomen stellt er einen etablierten Marker für das klarzellige Nierenzellkarzinom dar.²⁶⁶ Induziert durch Hypoxie und den Verlust des von Hippel-Lindau Tumorsuppressors²⁶⁷ fördert PAX2 sowohl die epithelial-mesenchymale, aber auch die mesenchymal-epitheliale Transition.^{268,269} Von entscheidender Bedeutung ist jedoch erneut die Tatsache, dass bereits T-Zell-

Antworten gegen ein Epitop aus PAX2 gesichert werden konnten, die eine onkolytische Wirkung gegenüber Zellen der Kolonkarzinomzelllinie SW480 aufwiesen.¹⁵⁰

19. *Profilin-1 (PFN1)*: Die Funktion von Profilin-1 in der Karzinogenese muss zu Recht kontrovers diskutiert werden. Einerseits werden für dieses Proteine hemmende Effekte auf Zellmigration und Tumorwachstum für das Mamma- oder das Pankreaskarzinom beschrieben.^{270,271} Andererseits werden für das Magenkarzinom gegenteilige Ergebnisse publiziert, da hier das Silencing von PFN1 zu einer Hemmung des Tumorwachstums führt.²⁷² Für das Nierenzellkarzinom existieren ebenfalls eindeutige Daten, welche sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene ein vermehrtes Tumorwachstum durch PFN1 in Verbindung mit einer schlechteren Prognose belegen.^{273,274,275}

20. *Procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2 (PLOD2)*: Analog zu LOX ist PLOD2 ein durch Hypoxie induziertes Enzym, welches Kollagene der extrazellulären Matrix quervernetzt. Hieraus erklärt sich die Wichtigkeit dieses Enzyms für Metastasierung, wie es für das Mammakarzinom und das Osteosarkom publiziert wurde.^{50,146} Wie neuere Daten zeigen wird die Metastasierung über veränderte Quervernetzungen vermittelt und teilweise über micro-RNAs gesteuert.^{276,277} Insgesamt lässt sich festhalten, dass die exakte Funktion von PLOD2 weiterhin Gegenstand intensiver Forschung ist.

21. *Transforming growth factor beta-1 (TGFB1)*: Die Funktionen von TGFB1 sind äußerst vielfältig. Zum Beispiel fördert dieses Protein im Bereich der Regeneration von Geweben das Knochenwachstum.²⁷⁸ Auf immunologischer Seite induziert TGFB1 regulatorische T-Zellen, steuert die Differenzierung von Th₁- und Th₁₇-Zellen und kontrolliert somit die T-Zell Toleranz.²⁷⁹ Auch in Bezug auf die Karzinogenese des Nierenzellkarzinoms vermittelt TGFB1 eine Vielzahl von Mechanismen: Zum einen steuert es die zelluläre Adhäsion sowie den Umbau der extrazellulären Matrix über die Induktion von Proteinen wie FN1, COL1A1 oder TGFBI, was in einem reduzierten Gesamtüberleben resultiert.²⁴⁵

Des Weiteren vermittelt der Wachstumsfaktor in Verbindung mit EGFR die mesenchymal-epitheliale Transition in der Nierenzellkarzinom-Zelllinie HK-2.²⁸⁰ Auch zusammen mit dem notch-Signalweg fördert TGFB1 in gegenseitiger Verstärkung die Aggressivität und damit die Invasion und Migration von Nierenzellkarzinomzellen.²⁸¹ Nicht zuletzt die Metastasierung - insbesondere die ossäre Filialisierung - wird durch die vermehrte Expression von TGFB1 unterhalten.²⁸²

22. *Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3 (TGFB1)*: Wie durch den Namen bereits impliziert wird, induziert der Transkriptionsfaktor TGFB1 TGFB1. Im Falle des Nierenzellkarzinoms führt außerdem die Expression des von Hippel-Lindau Proteins zur Unterdrückung von TGFB1 und somit der für dieses Karzinom typische Verlust des VHL-Tumorsuppressors zur vermehrten Expression von TGFB1.²⁸³ Funktionell führt diese Überexpression zu einer vermehrten Adhäsion, Invasion und Migration von malignen Zellen und vermittelt somit analog zu TGFB1 durch seine Wirkung eine verkürzte mittlere Überlebenszeit für Patienten mit Nierenzellkarzinom.^{284,285}

23. *Thrombospondin-1 (THBS1)*: Als Ligand für CD36 vermittelt Thrombospondin-1 sowohl pro- als auch antiangiogenetische Effekte abhängig vom jeweiligen Tumormikromilieu.²⁸⁶ Auch in Bezug auf die Proliferation von Nierenzellkarzinomzellen finden sich widersprüchliche Publikationen.^{287,288} Die exakte Rolle von Thrombospondin-1 in der Karzinogenese des Nierenzellkarzinoms ist zum aktuellen Zeitpunkt somit noch nicht abschließend geklärt. Dennoch sprechen viele Indizien für die Tumorassoziation dieses Proteins, weshalb dieses Antigen in die Liste der möglichen tumorassoziierten Antigene aufgenommen wurde.

24. *Thrombospondin-2 (THBS2)*: Ähnlich zu Thrombospondin-1 wird die Funktion von Thrombospondin-2 in Bezug auf die Karzinogenese kontrovers diskutiert. Einerseits ist eine anti-angiogenetische Wirkung dieses Proteins in vielen Arbeiten zum Beispiel zum nicht-kleinzelligen Bronchial- oder zum

Kolonkarzinom belegt.^{289,290} Dennoch zeigt sich eine deutliche Überexpression dieses Gens sowohl für das Magenkarzinom als auch das sehr von der Angiogenese abhängige klarzellige Nierenzellkarzinom.^{238,291}

Am Beispiel des Pankreaskarzinoms lassen sich diese erneut divergenten Befunde wohlmöglich erklären. Für diese Tumorentität konnte zunächst eine inhibitorische Wirkung auf die Karzinogenese durch THBS2 nachgewiesen werden.²⁹² Bei einer differenzierteren Betrachtung der involvierten Zellen wird jedoch deutlich, dass aus Zellen des Tumormikroenvironments sezerniertes THBS2 die Invasion von Karzinomzellen fördert.²⁹³ Somit ließe sich postulieren, dass die gemessene Überexpression dieses Proteins in Tumorproben eigentlich aus Zellen des Mikromilieus stammt und hierüber das karzinogene Potential von Thrombospondin-2 vermittelt wird. Vor diesem Hintergrund und wegen der Tatsache, dass mit THBS1, THBS2 und CD36 so stark funktionell verwobene Proteine spezifisch in Tumorproben detektiert wurden, erfolgte auch für THBS2 die Einstufung als tumorassoziiertes Antigen.

25. Vascular endothelial growth factor A (VEGFA): Kaum ein anderes Protein ist mehr in die Karzinogenese des Nierenzellkarzinoms involviert und wurde häufiger als Zielstruktur therapeutisch genutzt als VEGFA. Erste Arbeiten zeigten die Tumorassoziation dieses Proteins über eine vermehrte Expression im Nierenzellkarzinom und verdeutlichten seine Funktion im Rahmen der Angiogenese.^{39,294} Erhöhte Serumlevel von VEGFA sind des Weiteren mit einer Verschlechterung der Prognose bei Patienten mit Nierenzellkarzinomen vergesellschaftet.²⁹⁵ Konsequenterweise wurden unterschiedliche Therapie-strategien gegen VEGFA entwickelt: Tyrosinkinaseinhibitoren, Antikörper und letztlich auch Peptidvakzinen zeigten jeweils effektive antiproliferative Antworten und sind teilweise als Therapien des metastasierten Nierenzellkarzinoms zugelassen.^{149,296,297,298}

Insgesamt bilden die beschriebenen tumorassoziierten Antigene somit eine funktionell sehr homogene Gruppe von Proteinen, welche die Prozesse der Karzinogenese des Nierenzellkarzinoms oder anderer maligner Tumoren

exzellente beschreiben und durch ihre zusätzliche Tumorspezifität wohlmöglich sehr wirksame Zielstrukturen für Vakzinierungen darstellen.

Es lässt sich somit bereits jetzt feststellen, dass das zweite Ziel dieser Arbeit erfolgreich umgesetzt werden konnte. Eine weitere Diskussion der identifizierten tumorassoziierten Antigene und deren HLA-Liganden in Bezug auf ihre Immunogenität und Anwendungsmöglichkeiten für Peptidvakzinierungen soll im Folgenden die Diskussion abrunden und einen Ausblick auf die klinische Anwendbarkeit dieser Arbeit im Sinne der translationalen Forschung geben.

4.5 Diskussion der Ergebnisse: Evaluation der Immunogenität von tumorassoziierten Quellproteinen und HLA-Liganden aus Netzwerkanalysen und deren Einfluss auf die Entwicklung von Peptidvakzinen

4.5.1 Validierung der Immunogenität durch Literaturrecherche

Verschiedene Ansätze sollten in dieser Arbeit belegen, dass die identifizierten HLA-Liganden und deren Quellproteine als Epitope und Antigene wirksame Agentien für eine mögliche T-Zell vermittelte Immuntherapie darstellen.

Die Bestätigung der Wirksamkeit über bereits publizierte Daten stellte hierbei sicherlich eine sehr valide Methode dar, da zum einen die jeweiligen Arbeiten einem Peer-Review-Prozess unterlagen und die nachgewiesenen Ergebnisse größtenteils aus Vakzinierungsstudien zum Nierenzellkarzinom stammten. Der Nachweis einer Immunogenität bei Karzinompatientin *in vivo* kann somit als Goldstandard gewertet werden.

Für 4 der 6 über Literaturrecherche bestätigten Immunantworten konnte dieser Standard gewährleistet werden. Die zwei verbleibenden HLA-Liganden zeigten ihre Wirksamkeit bei *in vitro* Experimenten. Trotz dieser scheinbar geringen Ausbeute über die Literaturrecherche muss hierbei betont werden, dass die Auswahl der Quellproteine auf Basis der Netzwerkanalysen stattfand und somit die Immunogenität in keinem Fall eine Voraussetzung für die Selektion darstellte. Vor diesem Hintergrund erscheint die Rate an publizierten HLA-Liganden als sehr zufriedenstellend, da sich die postulierten Epitope und Antigene in einem nicht unerheblichen Teil mit bisher publizierten

immunogenen HLA-Liganden für das Nierenzellkarzinom überschneiden. Dennoch ist diese Methode natürlich nicht in der Lage, eine generelle Aussage über die Effektivität der übrigen Peptide im Rahmen von Vakzinierungen zu geben.

4.5.2 Abschätzung der Wahrscheinlichkeit für eine Immunantwort gegen HLA-Liganden über das IEDB immunogenicity prediction tool

Um die Frage der Immunogenität weiterer Epitope besser abschätzen zu können, wurden zwei Vorhersage-Algorithmen verwendet. Das erste ist die Epitop-Vorhersage-Software der IEDB. Diese wurde eingeführt um Vorhersagen für Peptid-Nonamere zu treffen und auch wenn eine weitere Nutzung über Nonamere hinaus vom Anbieter als möglich eingestuft wurde, so wurde dennoch aus Gründen der Genauigkeit der Algorithmus nur für die originär implementierte Fragestellung verwendet.

Obwohl wie bei der Literaturrecherche erneut mit ca. 30 % nur ein Teil der identifizierten tumorassoziierten HLA-Liganden getestet werden konnte, so zeigten sich dennoch sehr positive Ergebnisse. Der Anteil der Epitope, welche als HLA-Liganden bewertet wurden, lag für diese Arbeit bei 37,5 %, was trotz des scheinbar geringen Wertes durchaus nicht als negativ zu bewerten ist. Es muss betont werden, dass der Schwellenwert für die Entscheidung für oder gegen die Einschätzung als Epitop frei festgelegt wurde, da die grundlegenden Arbeiten hierfür keinen Wert vorschlagen. Der Vergleich mit den Positivkontrollen bestätigt nur zusätzlich den positiven Trend, da mit 22,2 % deutlich weniger Peptide als Epitope eingestuft wurden.

Zusätzlich bezieht sich die von Calis et al. ursprünglich publizierte Vorgehensweise - wie bereits im früheren Teil dieser Arbeit dargelegt - auf die Bewertung der HLA-Liganden als Gruppe. Das hierbei sehr positive Ergebnis von 0,088 ist nicht nur im Vergleich zu den Positivkontrollen ein signifikantes, sondern erreicht zusätzlich das Niveau, welches für HLA-Liganden aus Tumorproben von Calis et al. für die Bewertung als Epitope im Tumor-Vorhersagemodell gefordert wird.¹³²

Trotz der ermutigenden Ergebnisse liegen die Schwächen dieses Vorhersagemodells auf der Hand: Die Methodik lässt sich, wie auch in diesem Fall, leider nicht auf alle identifizierten Peptide anwenden und selbst wenn dies gewährleistet ist, sind es letztlich dennoch nur Vorhersagen, welche die Aussage, dass es sich bei den HLA-Liganden um Epitope handelt, stützt, aber niemals abschließend klären kann. Eine zusätzliche Analyse mittels anderen frei verfügbaren Vorhersage-Tools wie z.B. CTL-Pred oder kommerziell erhältlichen wie z.B. EpiQuest-T wäre demnach nicht zielführend gewesen. Um jedoch für alle postulierten HLA-Liganden und deren Quellproteinen eine Vorhersage für die Immunogenität treffen zu können, wurde das im Folgenden zu diskutierende zweite Vorhersagemodell in diese Arbeit aufgenommen.

4.5.3 Abschätzung der Wahrscheinlichkeit für eine Immunantwort gegen Quellproteine über den VaxiJen v2.0-Server

Der offensichtliche Vorteil des VaxiJen-Algorithmus liegt in seiner Abschätzung der Immunogenität nicht für Peptide, sondern für gesamte Proteine. Hierdurch gelang es, für alle identifizierten postulierten tumorassoziierten Antigene einen Vorhersagewert für deren Immunogenität zu ermitteln.

Die Tatsache, dass der Schwellenwert für die Bewertung eines Proteins als Antigen auf 0,45 erniedrigt wurde, hängt mit der Verwendung des Tumormodells auf dem VaxiJen-Server zusammen. Betrachtet man in der ursprünglichen Arbeit von Doytchinova et al.¹³³ die Plots zur Beschreibung der Sensitivität und Spezifität ihres Modells so wird deutlich, dass bei Erniedrigung des Schwellenwertes bei nicht zu großen Verlusten der Spezifität die Sensitivität dieser Methode deutlich hinzugewinnt. Zusätzlich soll die verminderte Spezifität durch den Vergleich mit den Positivkontrollen etwas ausgeglichen werden.

Die derart berechnete Rate an Antigenen aus der Menge der Quellproteine spricht für die Qualität dieses Ansatzes mit 84 % gegenüber knapp 72 % bei den Positivkontrollen. Dies bestätigt in absoluten wie relativen Zahlen das große Potential für die Immunogenität der identifizierten tumorassoziierten Proteine. Zusätzlich fällt bei näherer Betrachtung der Vorhersagewerte für die

experimentelle Gruppe auf, dass der Mittelwert des VaxiJen-Scores mit 0,52 im Vergleich zu den Positivkontrollen mit 0,49 nicht nur die Kontrollgruppe übertrifft, sondern auch die Grenze von 0,5 als Goldstandard für die positive Bewertung eines Proteins im Rahmen des Tumovorhersagemodells übersteigt. Auch der minimale Wert von 0,38 für ein Quellprotein aus der experimentellen Gruppe zeigt insgesamt die Homogenität in Bezug auf die Vorhersagen für die Immunogenität dieser Gruppe.

Natürlich muss nochmals betont werden, dass die Vorhersagemodelle sowohl für HLA-Liganden als auch für Quellproteine niemals *in vitro*-Experimente ersetzen können bevor diese Strukturen als Agenzien z.B. in Vakzinierungsstudien *in vivo* eingesetzt werden dürfen. Dennoch konnte das Postulat der Immunogenität der identifizierten Peptide und Proteine stark unterstützt werden und für fast alle Zielstrukturen aus Tabelle 5 eine positive Bewertung aus einem der drei Methoden zur Abschätzung der Immunogenität gewonnen werden. Die in dieser Arbeit angewandte Methodik zeigt somit ihr großes Potential für die Entdeckung von neuen, tumorassoziierten und vor allem immunogenen Strukturen.

4.5.4 Entwicklung neuer individualisierter Peptidvakzinen auf Grundlage der identifizierten biologischen Prozesse und der involvierten tumorassoziierten Antigene

Zum Ende der Diskussion dieser Arbeit soll nun das bisher Erläuterte zusammengebracht und der Stellenwert und die Neuartigkeit des Ansatzes aufgezeigt werden.

Bisherige Strategien zur Identifikation tumorassoziierten Antigene für das Nierenzellkarzinom oder andere Malignome verfolgten häufig die Strategie, über Analysen auf mRNA-Ebene Gene zu identifizieren, welche eine Überexpression in Tumor- im Vergleich zu Normalgewebe aufwiesen.²⁹⁹ Peptide von Genprodukten dieser Ergebnisse werden anschließend auf ihre Immunogenität über unterschiedliche T-Zell-Assays hin untersucht. Analog zu dieser Arbeit wurden ebenfalls Versuche unternommen über die Analyse des HLA-Ligandoms Peptide und korrespondierende Proteine zu identifizieren, die

ausschließlich in malignen Gewebeproben vorhanden sind oder quantitativ in höherem Maße auf Karzinomzellen präsentiert werden.¹⁵⁷

Bei dem in dieser Arbeit gewählten Ansatz liegt der Fokus auf dem funktionellen Zusammenwirken der Proteine bei biologischen Prozessen der Karzinogenese. Die durchgeführten Netzwerkanalysen verdeutlichen hierbei die Tatsache, dass mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen werden kann, dass nicht nur diejenigen Proteine aus einem biologischen Prozess für eine individualisierte Peptidvakzinierung verwendet werden können, deren Peptide tatsächlich in einer Probe detektiert wurden, sondern auch diejenigen, welche ein Teil des biologischen Prozesses sind und in anderen malignen Gewebeproben nachweisbar waren. Ein gutes Beispiel zeigt Abbildung 14C mit dem Prozess „Organisation der extrazellulären Matrix“: Diese Netzwerkanalyse zeigt neben den roten und zusätzlich gestreiften Genen, welche die initial eingespeisten Proteine repräsentieren, auch komplett in rot unterlegt Proteine, die Teile des Prozesses darstellen und diesen ergänzen. Eines dieser Gene ist im Beispiel RCC297M2 LOX im mittleren unteren Bereich der Abbildung 14C. Dieses Protein wurde ebenso in den Proben RCC377M und RCC377T identifiziert und war in allen Fällen Teil derselben biologischen Prozesse.

Dies führt zu der Annahme, dass sobald ein biologischer Prozess mittels Netzwerkanalysen detektiert werden kann, weitere Proteine dieses Pathways, welche einmalig mit ihrem HLA-Liganden identifiziert werden konnten, als mögliche Kandidaten für eine Peptidvakzinierung gelten können. Analog zum Antigen LOX wurden folgende tumorassoziierte Proteine sowohl direkt in Tumorproben aber auch als ergänzende Proteine einer Netzwerkanalyse detektiert: BCAR1, CA9, COL1A1, EGFR, ENPEP, FN1, NRP2, PAX2, PLOD2, TGFBI, THBS1, THBS2 und VEGFA.

Wenn daher 18 von 24 der in Tabelle 3 aufgeführten möglichen Vakzinierungspeptide nur in einer einzigen malignen Gewebeprobe gefunden werden konnten, ist es dennoch denkbar, dass weitere Peptide aus Antigenen einer gemeinsamen biologischen Funktion in derselben Tumorprobe auffindbar gewesen wären, wenn die Sensitivität hoch genug gewesen wäre. Einschränkend gilt aber auch hier, dass es sich hierbei um eine Vermutung

handelt, welche noch nicht sicher belegt werden kann. Die Ergebnisse laborinterner ähnlicher Untersuchungen des Nierenzellkarzinoms legen jedoch nahe, dass viele der gefundenen Peptide bzw. ihre korrespondierenden Antigene in höherer Frequenz in Tumorproben auffindbar sind und diese These somit stützen.

Wie bereits in den Ergebnissen verdeutlicht, würde man bei einem derartigen Vorgehen die Anzahl der möglichen Antigene pro Tumorprobe deutlich erhöhen können und wäre z.B. im Fall dieser Arbeit somit - unabhängig von der zur Verfügung gestellten Anzahl oder Größe der Proben - in der Lage, stets zwischen 15 und 20 tumorassoziierte Antigene (siehe Tabelle 6) als Grundlage für einen Vakzinecocktail benennen zu können. Aus den identifizierten Antigenen könnten dann z.B. entweder bereits isolierte HLA-Liganden passend zur jeweiligen HLA-Typisierung des Patienten verwendet werden oder mögliche Epitope über die Analyse der Aminosäuresequenz des tumorassoziierten Antigens über SYFPEITHI vorgeschlagen werden.

Darüber hinaus belegen bereits publizierte Daten, dass gegen ein Drittel der identifizierten Antigene Immunantworten in Tumorpatienten hervorgerufen werden konnten.^{70,149,150,151,152,153} Zusätzlich stützen die Vorhersagemodelle für die Immunogenität der übrigen detektierten Peptide und Proteine die Vorstellung, dass auch diese Strukturen in der Lage sind, T-Zellen zu aktivieren. Die Sorge, dass die verwendeten Peptide einer peripheren Toleranz unterliegen, erscheint möglich, aber andererseits unwahrscheinlich. So konnte zum Beispiel für die chronisch lymphatische Leukämie gezeigt werden, dass HLA-Liganden, welche nicht auf gesunden PBMCs oder BMMCs präsentiert werden, eine zusätzliche höhere Wahrscheinlichkeit aufweisen, eine Immunantwort hervorrufen zu können.³⁰⁰ Und eben jene nicht vorhandene Präsentation auf mononukleären Blutzellen stellte eine der Grundvoraussetzungen für die Auswahl der tumorassoziierten HLA-Liganden in dieser Arbeit dar.

Insgesamt bringt das Design von potentiellen Vakzinierungscocktails wie sie in dieser Arbeit beschrieben wurden mehrere Vorteile mit sich: Erstens werden auf diese Weise Vakzinen gebildet, welche funktionell gegen eine spezielle

biologische Funktion gerichtet sind, die für die Karzinogese des Tumors eine wichtige Rolle spielt.

Zweitens sind die Vakzinen personalisiert, was in Anbetracht der hohen interindividuellen Diversität von Tumorantigenen innerhalb des klarzelligen Nierenzellkarzinoms, welche wiederum zuletzt in laborinternen Versuchen unterstrichen wurde, zu einem verbesserten Ansprechen führen soll.

Und drittens ist die hohe Anzahl an Peptiden eines Cocktails als positiv zu werten, da Arbeiten zur T-Zell-Erschöpfung bei Checkpoint-Inhibition belegen konnten, dass eine möglichst heterogene Antwort gegen HLA-Liganden in Tumorpatienten von Vorteil ist, da bei Immunantworten gegen eine geringere Anzahl von Epitopen die Erschöpfung von T-Zellen begünstigt wird.³⁰¹ Hierbei ist jedoch zu betonen, dass die Daten für Patienten unter Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren erhoben wurden, was wiederum eine Kombination dieser beiden Therapiestrategien nahe legt.

5 Zusammenfassung

In den vergangenen Jahren wurden viele Versuche unternommen, Immuntherapien für das Nierenzellkarzinom zu etablieren. Obwohl es immer wieder gelang, potentiell effektive Therapien zu entwickeln, konnten in klinischen Studien selten Überlebensvorteile für Patienten erreicht werden. Erst durch die Entwicklung der Checkpoint-Inhibitoren konnte ein nachhaltiger Anti-Tumor-Effekt über T-Zell-Antworten in der Therapie des Nierenzellkarzinoms etabliert werden. Die Idee einer Peptidvakzinierung alleine oder in Kombination mit Checkpoint-Inhibitoren bleibt hiervon allerdings unberührt, da die Eigenschaft von Peptidvakzinen Immunantworten auszulösen, bestens etabliert ist. Dennoch fehlt es an neuen Ansätzen, personalisierte Vakzine-Cocktails mit hoher Effektivität zu generieren.

Um dieses Problem zu lösen, wurden in dieser Arbeit die HLA-Ligandome aus Tumoren und Metastasen sowie gesundem Nierengewebe von sechs Patienten mit Nierenzellkarzinomen isoliert. Nachdem die detektierten Peptide mit HLA-Liganden von mononukleären Blutzellen abgeglichen wurden und hierdurch „nierenspezifische“ Peptide herausgefiltert werden konnten, wurden mit den zu den Peptiden korrespondierenden Ursprungsproteinen Netzwerkanalysen durchgeführt.

Hierdurch demarkierten sich biologische Prozesse und Signalwege, welche die funktionellen Eigenschaften von malignen und nicht-malignen Gewebeproben widerspiegeln. Auffällig war hierbei insbesondere die komplette Divergenz der Ergebnisse für Tumoren und deren korrespondierenden Normalgeweben: Funktionell konnte auf der Ebene der Ursprungsproteine von HLA-Liganden keine einzige Gemeinsamkeit zwischen diesen beiden Gewebeentitäten festgestellt werden, was deren gegensätzliche biologischen Eigenschaften bestens belegt.

Die qualitative Analyse der malignen Gewebeproben identifizierte des Weiteren gemeinsame Signalwege und biologische Prozesse, welche eng mit der Karzinogenese und Metastasierung des klarzelligen Nierenzellkarzinoms verknüpft sind, wie z.B. Angiogenese, Signalwege für den epidermalen oder

den Fibroblasten-Wachstumsrezeptor sowie die Umorganisation der extrazellulären Matrix.

Über diese Prozesse und die darin involvierten Proteine gelang schließlich die Bestätigung etablierter aber auch die Identifikation neuer tumorassoziierter Antigene für das Nierenzellkarzinom. Die HLA-Liganden dieser Proteine zeigen in Anbetracht ihrer gemeinsamen Funktion in biologischen Prozessen beim Einsatz als Kandidaten für Peptidvakzinierungen möglicherweise synergistische Wirkungen. Beispiele für diese Antigene sind VEGFA, ENPEP, EGFR, LOX oder PLOD2.

Auf diese Weise konnten für jeden Patienten dieser Arbeit potentielle personalisierte Vakzinierungscocktails bestehend aus 15 bis 20 HLA-Klasse I sowie HLA-Klasse II-Peptiden benannt werden, wobei bereits für ein Drittel dieser Antigene Immunantworten in Tumorpatienten publiziert wurden. Zusätzlich zeigten diejenigen HLA-Liganden und Proteine, für welche noch keine Immunantworten veröffentlicht wurden, eine hohe Vorhersagewahrscheinlichkeit für deren Immunogenität.

Zusammenfassend ist es somit in dieser Arbeit erstmals gelungen, einen Algorithmus zu entwickeln, mit welchem das HLA-Ligandom von Gewebeproben funktionell analysiert und darüber mögliche tumorassozierte Antigene für Peptidvakzinierungen abgeleitet werden können.

Insbesondere durch die möglichen synergistischen Effekte dieser individualisierten Vakzinierungsstrategie gegen essentielle biologische Prozesse der Karzinogenese kann dieser Ansatz zu einer verbesserten Effektivität von Peptidvakzinierungen führen und bietet sich darüber hinaus für eine Kombination mit Checkpoint-Inhibitoren im Sinne einer Kombination von spezifischer und unspezifischer Immuntherapie an.

Literaturverzeichnis

- ¹ Everson TC. Spontaneous regression of cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1964; 114:721-35.
- ² Challis GB, Stam HJ. The spontaneous regression of cancer. A review of cases from 1900 to 1987. *Acta Oncol* 1990; 29:545-50.
- ³ Lokich J. Spontaneous regression of metastatic renal cancer - Case report and literature review. *Am J Clin Oncol-Canc* 1997; 20:416-8.
- ⁴ Hopton Cann SA, van Netten JP, van Netten C. Dr William Coley and tumour regression: a place in history or in the future. *Postgrad Med J* 2003; 79:672-80.
- ⁵ Ebbel B. *The papyrus ebers: The greatest Egyptian medical documents*. London: Oxford University Press; 1937.
- ⁶ Ehrlich P. Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 1909; 5: 273–290.
- ⁷ Old LJ, Boyse EA. Immunology of Experimental Tumors. *Annu Rev Med* 1964; 15:167-86.
- ⁸ Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 1970; 13:1-27.
- ⁹ Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:329-60.
- ¹⁰ Yoshitake Y, Nishimura Y, Nakamura Y, Shinohara M. A clinical trial of multiple peptides vaccination for advanced head and neck cancer patients induced immune responses and prolonged OS. *Oncoimmunology* 2015; 4:e1022307.
- ¹¹ Hughes T, Klairmont M, Broucek J, Iodice G, Basu S, Kaufman HL. The prognostic significance of stable disease following high-dose interleukin-2 (IL-2) treatment in patients with metastatic melanoma and renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 2015; 64:459-65.
- ¹² Amin A, Dudek AZ, Logan TF, Lance RS, Holzbeierlein JM, Knox JJ, Master VA, Pal SK, Miller WH, Jr., Karsh LI, et al. Survival with AGS-003, an autologous dendritic cell-based immunotherapy, in combination with sunitinib in unfavorable risk patients with advanced renal cell carcinoma (RCC): Phase 2 study results. *J Immunother Cancer* 2015; 3:14.
- ¹³ Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P. Pathways of antigen processing. *Annu Rev Immunol* 2013; 31:443-73.
- ¹⁴ Rammensee HG, Weinschenk T, Gouttefangeas C, Stevanovic S. Towards patient-specific tumor antigen selection for vaccination. *Immunol Rev* 2002; 188:164-76.

- ¹⁵ Dengjel J, Nastke MD, Gouttefangeas C, Gitsioudis G, Schoor O, Altenberend F, Muller M, Kramer B, Missiou A, Sauter M, et al. Unexpected abundance of HLA class II presented peptides in primary renal cell carcinomas. *Clin Cancer Res* 2006; 12:4163-70.
- ¹⁶ Rossjohn J, Gras S, Miles JJ, Turner SJ, Godfrey DI, McCluskey J. T cell antigen receptor recognition of antigen-presenting molecules. *Annu Rev Immunol* 2015; 33:169-200.
- ¹⁷ Huppa JB, Davis MM. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:973-83.
- ¹⁸ Brownlie RJ, Zamoyska R. T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded. *Nat Rev Immunol* 2013; 13:257-69.
- ¹⁹ Pipkin ME, Lieberman J. Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Curr Opin Immunol* 2007; 19:301-8.
- ²⁰ Monjazez AM, Zamora AE, Grossenbacher SK, Mirsoian A, Sckisel GD, Murphy WJ. Immunoediting and antigen loss: overcoming the achilles heel of immunotherapy with antigen non-specific therapies. *Front Oncol* 2013; 3:197.
- ²¹ Pacheco R, Contreras F, Prado C. Cells, Molecules and Mechanisms Involved in the Neuro-Immune Interaction. *Cell interaction*; Chapter six. DOI: 10.5772/48367.
- ²² Teng MW, Vesely MD, Duret H, McLaughlin N, Towne JE, Schreiber RD, Smyth MJ. Opposing roles for IL-23 and IL-12 in maintaining occult cancer in an equilibrium state. *Cancer Res* 2012; 72:3987-96.
- ²³ Wu X, Peng M, Huang B, Zhang H, Wang H, Huang B, Xue Z, Zhang L, Da Y, Yang D, et al. Immune microenvironment profiles of tumor immune equilibrium and immune escape states of mouse sarcoma. *Cancer Lett* 2013; 340:124-33.
- ²⁴ Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002; 3:991-8.
- ²⁵ Mocellin S, Wang E, Marincola FM. Cytokines and immune response in the tumor microenvironment. *J Immunother* 2001; 24:392-407.
- ²⁶ Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev* 2010; 236:219-42.
- ²⁷ Gaborilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2009; 9:162-74.
- ²⁸ Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol* 2011; 29:235-71.
- ²⁹ Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 2011; 331:1565-70.

- ³⁰ Kurachi M, Barnitz RA, Yosef N, Odorizzi PM, Dilorio MA, Lemieux ME, Yates K, Godec J, Klatt MG, Regev A, et al. The transcription factor BATF operates as an essential differentiation checkpoint in early effector CD8+ T cells. *Nat Immunol* 2014; 15:373-83.
- ³¹ Quigley M, Pereyra F, Nilsson B, Porichis F, Fonseca C, Eichbaum Q, Julg B, Jesneck JL, Brosnahan K, Imam S, et al. Transcriptional analysis of HIV-specific CD8+ T cells shows that PD-1 inhibits T cell function by upregulating BATF. *Nat Med* 2010; 16:1147-51.
- ³² Crespo J, Sun H, Welling TH, Tian Z, Zou W. T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol* 2013; 25:214-21.
- ³³ Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 2013; 49:1374-403.
- ³⁴ Levi F, Ferlay J, Galeone C, Lucchini F, Negri E, Boyle P, La Vecchia C. The changing pattern of kidney cancer incidence and mortality in Europe. *BJU Int* 2008; 101:949-58.
- ³⁵ Gill IS, Aron M, Gervais DA, Jewett MA. Clinical practice. Small renal mass. *N Engl J Med* 2010; 362:624-34.
- ³⁶ Ficarra V, Righetti R, Pilloni S, D'Amico A, Maffei N, Novella G, Zanolla L, Malossini G, Mobilio G. Prognostic factors in patients with renal cell carcinoma: retrospective analysis of 675 cases. *Eur Urol* 2002; 41:190-8.
- ³⁷ Kovacs G, Wilkens L, Papp T, de Riese W. Differentiation between papillary and nonpapillary renal cell carcinomas by DNA analysis. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81:527-30.
- ³⁸ Gnarr JR, Tory K, Weng Y, Schmidt L, Wei MH, Li H, Latif F, Liu S, Chen F, Duh FM, et al. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet* 1994; 7:85-90.
- ³⁹ Takahashi A, Sasaki H, Kim SJ, Tobisu K, Kakizoe T, Tsukamoto T, Kumamoto Y, Sugimura T, Terada M. Markedly increased amounts of messenger RNAs for vascular endothelial growth factor and placenta growth factor in renal cell carcinoma associated with angiogenesis. *Cancer Res* 1994; 54:4233-7.
- ⁴⁰ Weber KL, Doucet M, Price JE, Baker C, Kim SJ, Fidler IJ. Blockade of epidermal growth factor receptor signaling leads to inhibition of renal cell carcinoma growth in the bone of nude mice. *Cancer Res* 2003; 63:2940-7.
- ⁴¹ Sonpavde G, Willey CD, Sudarshan S. Fibroblast growth factor receptors as therapeutic targets in clear-cell renal cell carcinoma. *Expert Opin Investig Drugs* 2014; 23:305-15.

- ⁴² Xu L, Tong R, Cochran DM, Jain RK. Blocking platelet-derived growth factor-D/platelet-derived growth factor receptor beta signaling inhibits human renal cell carcinoma progression in an orthotopic mouse model. *Cancer Res* 2005; 65:5711-9.
- ⁴³ Muglia VF, Prando A. Renal cell carcinoma: histological classification and correlation with imaging findings. *Radiol Bras* 2015; 48:166-74.
- ⁴⁴ Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 2007; 57:43-66.
- ⁴⁵ Jones J, Otu H, Spentzos D, Kolia S, Inan M, Beecken WD, Fellbaum C, Gu X, Joseph M, Pantuck AJ, et al. Gene signatures of progression and metastasis in renal cell cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11:5730-9.
- ⁴⁶ O'Dea M J, Zincke H, Utz DC, Bernatz PE. The treatment of renal cell carcinoma with solitary metastasis. *J Urol* 1978; 120:540-2.
- ⁴⁷ Ritchie AW, Chisholm GD. The natural history of renal carcinoma. *Semin Oncol* 1983; 10:390-400.
- ⁴⁸ Miyata Y, Iwata T, Ohba K, Kanda S, Nishikido M, Kanetake H. Expression of matrix metalloproteinase-7 on cancer cells and tissue endothelial cells in renal cell carcinoma: prognostic implications and clinical significance for invasion and metastasis. *Clin Cancer Res* 2006; 12:6998-7003.
- ⁴⁹ Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, Dornhofer N, Kong C, Le QT, Chi JT, Jeffrey SS, Giaccia AJ. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature* 2006; 440:1222-6.
- ⁵⁰ Gilkes DM, Bajpai S, Wong CC, Chaturvedi P, Hubbi ME, Wirtz D, Semenza GL. Procollagen lysyl hydroxylase 2 is essential for hypoxia-induced breast cancer metastasis. *Mol Cancer Res* 2013; 11:456-66.
- ⁵¹ Ljungberg B, Bensalah K, Canfield S, Dabestani S, Hofmann F, Hora M, Kuczyk MA, Lam T, Marconi L, Merseburger AS, et al. EAU guidelines on renal cell carcinoma: 2014 update. *Eur Urol* 2015; 67:913-24.
- ⁵² Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, Negrier S, Chevreau C, Solska E, Desai AA, et al. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007; 356:125-34.
- ⁵³ Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O, Oudard S, Negrier S, Szczylik C, Kim ST, et al. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007; 356:115-24.
- ⁵⁴ Motzer RJ, Hutson TE, Cella D, Reeves J, Hawkins R, Guo J, Nathan P, Staehler M, de Souza P, Merchan JR, et al. Pazopanib versus sunitinib in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2013; 369:722-31.
- ⁵⁵ Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S, Grunwald V, Thompson JA, Figlin RA, Hollaender N, et al. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet* 2008; 372:449-56.

- ⁵⁶ Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, Staroslawska E, Sosman J, McDermott D, Bodrogi I, et al. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007; 356:2271-81.
- ⁵⁷ Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P, Ravaud A, Bracarda S, Szczylik C, Chevreau C, Filipek M, Melichar B, Bajetta E, et al. Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet* 2007; 370:2103-11.
- ⁵⁸ Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, George S, Hammers HJ, Srinivas S, Tykodi SS, Sosman JA, Procopio G, Plimack ER, et al. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 2015; 373:1803-13.
- ⁵⁹ O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, Cornelissen JJ, Fischer T, Hochhaus A, Hughes T, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003; 348:994-1004.
- ⁶⁰ Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, White CA, Bodkin D, Schilder RJ, Neidhart JA, Janakiraman N, Foon KA, Liles TM, Dallaire BK, et al. IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997; 90:2188-95.
- ⁶¹ <http://www.pei.de/DE/arzneimittel/immunglobuline-monoklonale-antikoerper/monoklonale-antikoerper/monoklonale-antikoerper-node.html> [Zugriff 20.07.16]
- ⁶² Van den Eynde B, Peeters O, De Backer O, Gaugler B, Lucas S, Boon T. A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *J Exp Med* 1995; 182:689-98.
- ⁶³ Coulie PG, Van Pel A. Defined antigens recognized by T lymphocytes on human tumors. *Curr Opin Oncol* 1993; 5:1043-8.
- ⁶⁴ Jager E, Jager D, Karbach J, Chen YT, Ritter G, Nagata Y, Gnjatich S, Stockert E, Arand M, Old LJ, et al. Identification of NY-ESO-1 epitopes presented by human histocompatibility antigen (HLA)-DRB4*0101-0103 and recognized by CD4(+) T lymphocytes of patients with NY-ESO-1-expressing melanoma. *J Exp Med* 2000; 191:625-30.
- ⁶⁵ Wei C, Storzynsky E, McAdam AJ, Yeh KY, Tilton BR, Willis RA, Barth RK, Looney RJ, Lord EM, Frelinger JG. Expression of human prostate-specific antigen (PSA) in a mouse tumor cell line reduces tumorigenicity and elicits PSA-specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother* 1996; 42:362-8.
- ⁶⁶ Sun L, Guo H, Jiang R, Lu L, Liu T, He X. Engineered cytotoxic T lymphocytes with AFP-specific TCR gene for adoptive immunotherapy in hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol* 2016; 37:799-806.

- ⁶⁷ Ebben JD, Lubet RA, Gad E, Disis ML, You M. Epidermal growth factor receptor derived peptide vaccination to prevent lung adenocarcinoma formation: An in vivo study in a murine model of EGFR mutant lung cancer. *Mol Carcinog* 2015.
- ⁶⁸ Keilholz U, Letsch A, Busse A, Asemissen AM, Bauer S, Blau IW, Hofmann WK, Uharek L, Thiel E, Scheibenbogen C. A clinical and immunologic phase 2 trial of Wilms tumor gene product 1 (WT1) peptide vaccination in patients with AML and MDS. *Blood* 2009; 113:6541-8.
- ⁶⁹ Gubin MM, Zhang X, Schuster H, Caron E, Ward JP, Noguchi T, Ivanova Y, Hundal J, Arthur CD, Krebber WJ, et al. Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature* 2014; 515:577-81.
- ⁷⁰ Walter S, Weinschenk T, Stenzl A, Zdrojowy R, Pluzanska A, Szczylik C, Staehler M, Brugger W, Dietrich PY, Mendrzyk R, et al. Multi-peptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival. *Nat Med* 2012; 18:1254-61.
- ⁷¹ Noguchi M, Matsumoto K, Uemura H, Arai G, Eto M, Naito S, Ohyama C, Nasu Y, Tanaka M, Moriya F, et al. An Open-Label, Randomized Phase II Trial of Personalized Peptide Vaccination in Patients with Bladder Cancer that Progressed after Platinum-Based Chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2016; 22:54-60.
- ⁷² Loffler MW, Anoop Chandran P, Laske K, Schroeder C, Bonzheim I, Walzer M, Hilke FJ, Trautwein N, Kowalewski DJ, Schuster H, et al. Personalized peptide vaccine induced immune response associated with long-term survival of a metastatic cholangiocarcinoma patient. *J Hepatol* 2016.
- ⁷³ Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 2011; 480:480-9.
- ⁷⁴ Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, Postow MA, Rizvi NA, Lesokhin AM, Segal NH, Ariyan CE, Gordon RA, Reed K, et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* 2013; 369:122-33.
- ⁷⁵ Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leighl N, Balmanoukian AS, Eder JP, Patnaik A, Aggarwal C, Gubens M, Horn L, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015; 372:2018-28.
- ⁷⁶ McDermott DF, Drake CG, Sznol M, Choueiri TK, Powderly JD, Smith DC, Brahmer JR, Carvajal RD, Hammers HJ, Puzanov I, et al. Survival, Durable Response, and Long-Term Safety in Patients With Previously Treated Advanced Renal Cell Carcinoma Receiving Nivolumab. *J Clin Oncol* 2015; 33:2013-20.
- ⁷⁷ Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, Brett SJ, Castello-Cortes A, Brunner MD, Panoskaltsis N. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med* 2006; 355:1018-28.

- ⁷⁸ Manlove LS, Schenkel JM, Manlove KR, Pauken KE, Williams RT, Vezys V, Farrar MA. Heterologous Vaccination and Checkpoint Blockade Synergize To Induce Antileukemia Immunity. *J Immunol* 2016; 196:4793-804.
- ⁷⁹ Chang AY, Gejman RS, Brea EJ, Oh CY, Mathias MD, Pankov D, Casey E, Dao T, Scheinberg DA. Opportunities and challenges for TCR mimic antibodies in cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2016:1-9.
- ⁸⁰ Dao T, Yan S, Veomett N, Pankov D, Zhou L, Korontsvit T, Scott A, Whitten J, Maslak P, Casey E, et al. Targeting the intracellular WT1 oncogene product with a therapeutic human antibody. *Sci Transl Med* 2013; 5:176ra33.
- ⁸¹ Dubrovsky L, Pankov D, Brea EJ, Dao T, Scott A, Yan S, O'Reilly RJ, Liu C, Scheinberg DA. A TCR-mimic antibody to WT1 bypasses tyrosine kinase inhibitor resistance in human BCR-ABL+ leukemias. *Blood* 2014; 123:3296-304.
- ⁸² Verma B, Neethling FA, Caseltine S, Fabrizio G, Largo S, Duty JA, Tabaczewski P, Weidanz JA. TCR mimic monoclonal antibody targets a specific peptide/HLA class I complex and significantly impedes tumor growth in vivo using breast cancer models. *J Immunol* 2010; 184:2156-65.
- ⁸³ Sergeeva A, Alatrash G, He H, Ruisaard K, Lu S, Wygant J, McIntyre BW, Ma Q, Li D, St John L, et al. An anti-PR1/HLA-A2 T-cell receptor-like antibody mediates complement-dependent cytotoxicity against acute myeloid leukemia progenitor cells. *Blood* 2011; 117:4262-72.
- ⁸⁴ Khanna R. Tumour surveillance: missing peptides and MHC molecules. *Immunol Cell Biol* 1998; 76:20-6.
- ⁸⁵ Angell TE, Lechner MG, Jang JK, LoPresti JS, Epstein AL. MHC class I loss is a frequent mechanism of immune escape in papillary thyroid cancer that is reversed by interferon and selumetinib treatment in vitro. *Clin Cancer Res* 2014; 20:6034-44.
- ⁸⁶ Barnstable CJ, Bodmer WF, Brown G, Galfre G, Milstein C, Williams AF, Ziegler A. Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis. *Cell* 1978; 14:9-20.
- ⁸⁷ Fong S, Tsoukas CD, Pasquali JL, Fox RI, Rose JE, Raiklen D, Carson DA, Vaughan JH. Fractionation of human lymphocyte subpopulations on immunoglobulin coated Petri dishes. *J Immunol Methods* 1981; 44:171-82.
- ⁸⁸ Taylor, G. Disintegration of Water Drops in an Electric Field. *Proc.R. Soc. Lond.* 1964; A280: 383-397.
- ⁸⁹ Rayleigh, L. On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity. *Philos. Mag.* 1882; 14:184-186.
- ⁹⁰ Kebarle P. A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2000; 35:804-17.
- ⁹¹ Dole M, Mack LL, Hines RL. Molecular Beams of Macroions. *J. Chem. Phys.* 1968; 49:2240-2249.

- ⁹² Mack LL, Kralik P, Rheude A, Dole M. Molecular Beams of Macroions. II. J. Chem. Phys. 1970; 52:4977-4986.
- ⁹³ Iribarne JV, Thomson BA. On the evaporation of small ions from charged droplets. J. Chem. Phys. 1975; 64:2287-2294.
- ⁹⁴ Mora JF, Van Berkel GJ, Enke CG, Cole RB, Martinez-Sanchez M, Fenn JB. Electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry. J Mass Spectrom 2000; 35:939-52.
- ⁹⁵ Whitehouse CM, Dreyer RN, Yamashita M, Fenn JB. Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. Anal Chem 1985; 57:675-9.
- ⁹⁶ Nguyen S, Fenn JB. Gas-phase ions of solute species from charged droplets of solutions. Proc Natl Acad Sci U S A 2007; 104:1111-7.
- ⁹⁷ Korner R, Wilm M, Morand K, Schubert M, Mann M. Nano electrospray combined with a quadrupole ion trap for the analysis of peptides and protein digests. J Am Soc Mass Spectrom 1996; 7:150-6.
- ⁹⁸ Makarov A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. Anal Chem 2000; 72:1156-62.
- ⁹⁹ Kingdon KH. A method for the neutralization of electron space charge by positive ionization at very low gas pressures. Phys. Rev. 1923; 21: 408-418.
- ¹⁰⁰ Drews, O. Optimierung massenspektrometrischer Methoden zur Identifizierung von HLA-Liganden und ihre Anwendung in der klinischen Forschung. Dissertation Universität Tübingen 2011.
- ¹⁰¹ Hu Q, Noll RJ, Li H, Makarov A, Hardman M, Graham Cooks R. The Orbitrap: a new mass spectrometer. J Mass Spectrom 2005; 40:430-43.
- ¹⁰² Scigelova M, Makarov A. Orbitrap mass analyzer--overview and applications in proteomics. Proteomics 2006; 6 Suppl 2:16-21.
- ¹⁰³ Perry RH, Cooks RG, Noll RJ. Orbitrap mass spectrometry: instrumentation, ion motion and applications. Mass Spectrom Rev 2008; 27:661-99.
- ¹⁰⁴ Senko MW, Canterbury JD, Guan S, Marshall AG. A high-performance modular data system for Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 1996; 10:1839-44.
- ¹⁰⁵ Olsen JV, de Godoy LM, Li G, Macek B, Mortensen P, Pesch R, Makarov A, Lange O, Horning S, Mann M. Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. Mol Cell Proteomics 2005; 4:2010-21.
- ¹⁰⁶ Choudhary C, Mann M. Decoding signalling networks by mass spectrometry-based proteomics. Nat Rev Mol Cell Biol 2010; 11:427-39.
- ¹⁰⁷ Makarov A, Denisov E, Kholomeev A, Balschun W, Lange O, Strupat K, Horning S. Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. Anal Chem 2006; 78:2113-20.

- ¹⁰⁸ Günder, M. Charakterisierung des HLA-Ligandoms und des Exoms von Hepato- und Cholangiozellul ren Karzinomen im Hinblick auf eine patientenindividualisierte Peptidvakzinierung. Dissertation Universität Tübingen 2012.
- ¹⁰⁹ Hillen, N. Nachweis einer ausgeprägten Individualität von HLA-Ligandomen durch massenspektrometrische Analysen. Dissertation Universität Tübingen 2008.
- ¹¹⁰ Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 1999; 20:3551-67.
- ¹¹¹ Elias JE, Gygi SP. Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nat Methods* 2007; 4:207-14.
- ¹¹² Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E, Aebersold R. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal Chem* 2002; 74:5383-92.
- ¹¹³ Hassan C, Kester MG, de Ru AH, Hombrink P, Drijfhout JW, Nijveen H, Leunissen JA, Heemskerk MH, Falkenburg JH, van Veelen PA. The human leukocyte antigen-presented ligandome of B lymphocytes. *Mol Cell Proteomics* 2013; 12:1829-43.
- ¹¹⁴ Wysocki VH, Tsaprailis G, Smith LL, Brexi LA. Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation. *J Mass Spectrom* 2000; 35:1399-406.
- ¹¹⁵ Hunt DF, Yates JR, 3rd, Shabanowitz J, Winston S, Hauer CR. Protein sequencing by tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83:6233-7.
- ¹¹⁶ Papayannopoulos IA. The Interpretation of Collision-Induced Dissociation Tandem Mass-Spectra of Peptides. 1995; *Mass Spectrom. Rev.*14:49-73.
- ¹¹⁷ Roepstorff P, Fohlman J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom* 1984; 11:601.
- ¹¹⁸ Maux D, Enjalbal C, Martinez J, Aubagnac JL. New example of proline-induced fragmentation in electrospray ionization mass spectrometry of peptides. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2002; 16:1470-5.
- ¹¹⁹ Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 1999; 50:213-9.
- ¹²⁰ Attig S, Hennenlotter J, Pawelec G, Klein G, Koch SD, Pircher H, Feyerabend S, Wernet D, Stenzl A, Rammensee HG, et al. Simultaneous infiltration of polyfunctional effector and suppressor T cells into renal cell carcinomas. *Cancer Res* 2009; 69:8412-9.

- ¹²¹ Barrett T, Troup DB, Wilhite SE, Ledoux P, Rudnev D, Evangelista C, Kim IF, Soboleva A, Tomashevsky M, Marshall KA, et al. NCBI GEO: archive for high-throughput functional genomic data. *Nucleic Acids Res* 2009; 37:D885-90.
- ¹²² Breitkreutz BJ, Stark C, Reguly T, Boucher L, Breitkreutz A, Livstone M, Oughtred R, Lackner DH, Bahler J, Wood V, et al. The BioGRID Interaction Database: 2008 update. *Nucleic Acids Res* 2008; 36:D637-40.
- ¹²³ Brown KR, Jurisica I. Online predicted human interaction database. *Bioinformatics* 2005; 21:2076-82.
- ¹²⁴ Keshava Prasad TS, Goel R, Kandasamy K, Keerthikumar S, Kumar S, Mathivanan S, Telikicherla D, Raju R, Shafreen B, Venugopal A, et al. Human Protein Reference Database--2009 update. *Nucleic Acids Res* 2009; 37:D767-72.
- ¹²⁵ Romero P, Wagg J, Green ML, Kaiser D, Krummenacker M, Karp PD. Computational prediction of human metabolic pathways from the complete human genome. *Genome Biol* 2005; 6:R2.
- ¹²⁶ Aranda B, Achuthan P, Alam-Faruque Y, Armean I, Bridge A, Derow C, Feuermann M, Ghanbarian AT, Kerrien S, Khadake J, et al. The IntAct molecular interaction database in 2010. *Nucleic Acids Res* 2010; 38:D525-31.
- ¹²⁷ Ceol A, Chatr Aryamontri A, Licata L, Peluso D, Briganti L, Perfetto L, Castagnoli L, Cesareni G. MINT, the molecular interaction database: 2009 update. *Nucleic Acids Res* 2010; 38:D532-9.
- ¹²⁸ Schaefer CF, Anthony K, Krupa S, Buchhoff J, Day M, Hannay T, Buetow KH. PID: the Pathway Interaction Database. *Nucleic Acids Res* 2009; 37:D674-9.
- ¹²⁹ Vastrik I, D'Eustachio P, Schmidt E, Gopinath G, Croft D, de Bono B, Gillespie M, Jassal B, Lewis S, Matthews L, et al. Reactome: a knowledge base of biologic pathways and processes. *Genome Biol* 2007; 8:R39.
- ¹³⁰ Warde-Farley D, Donaldson SL, Comes O, Zuberi K, Badrawi R, Chao P, Franz M, Grouios C, Kazi F, Lopes CT, et al. The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic Acids Res* 2010; 38:W214-20.
- ¹³¹ Mostafavi S, Ray D, Warde-Farley D, Grouios C, Morris Q. GeneMANIA: a real-time multiple association network integration algorithm for predicting gene function. *Genome Biol* 2008; 9 Suppl 1:S4.
- ¹³² Calis JJ, Maybeno M, Greenbaum JA, Weiskopf D, De Silva AD, Sette A, Kesmir C, Peters B. Properties of MHC class I presented peptides that enhance immunogenicity. *PLoS Comput Biol* 2013; 9:e1003266.
- ¹³³ Doytchinova IA, Flower DR. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinformatics* 2007; 8:4.

- ¹³⁴ Peper JK, Bösmüller HC, Schuster H, Gückel B, Hörzer H, Roehle K, Schäfer R, Wagner P, Rammensee HG, Stevanovic S, Fend F, Staebler A. HLA ligandomics identifies Histone Deacetylase 1 as target for Ovarian Cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* 2016; 0:e1065369.
- ¹³⁵ Walz S, Stickel JS, Kowalewski DJ, Schuster H, Weisel K, Backert L, Kahn S, Nelde A, Stroh T, Handel M, et al. The antigenic landscape of multiple myeloma: mass spectrometry (re)defines targets for T-cell-based immunotherapy. *Blood* 2015; 126:1203-13.
- ¹³⁶ Kowalewski DJ, Schuster H, Backert L, Berlin C, Kahn S, Kanz L, Salih HR, Rammensee HG, Stevanovic S, Stickel JS. HLA ligandome analysis identifies the underlying specificities of spontaneous antileukemia immune responses in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112:E166-75.
- ¹³⁷ Berlin C, Kowalewski DJ, Schuster H, Mirza N, Walz S, Handel M, Schmid-Horch B, Salih HR, Kanz L, Rammensee HG, et al. Mapping the HLA ligandome landscape of acute myeloid leukemia: a targeted approach toward peptide-based immunotherapy. *Leukemia* 2015; 29:647-59.
- ¹³⁸ Klatt MG, Kowalewski DJ, Schuster H, Di Marco M, Hennenlotter H, Stenzl A, Rammensee HG, Stevanović S. Carcinogenesis of renal cell carcinoma reflected in HLA ligands: A novel approach for synergistic peptide vaccination design. *Oncoimmunology* 2016; 5: 8: DOI:10.1080/2162402X.2016.1204504.
- ¹³⁹ Smith K, Gunaratnam L, Morley M, Franovic A, Mekhail K, Lee S. Silencing of epidermal growth factor receptor suppresses hypoxia-inducible factor-2-driven VHL-/- renal cancer. *Cancer Research* 2005; 65:5221-30.
- ¹⁴⁰ Verheul HM, Hammers H, van Erp K, Wei Y, Sanni T, Salumbides B, Qian DZ, Yancopoulos GD, Pili R. Vascular endothelial growth factor trap blocks tumor growth, metastasis formation, and vascular leakage in an orthotopic murine renal cell cancer model. *Clin Cancer Res* 2007; 13:4201-8.
- ¹⁴¹ Hintz RL, Bock S, Thorsson AV, Bovens J, Powell DR, Jakse G, Petrides PE. Expression of the Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-3 (Igfbp-3) Gene Is Increased in Human Renal Carcinomas. *J Urology* 1991; 146:1160-3.
- ¹⁴² Takahashi M, Papavero V, Yuhas J, Kort E, Kanayama HO, Kagawa S, Baxter RC, Yang XJ, Gray SG, Teh BT. Altered expression of members of the IGF-axis in clear cell renal cell carcinoma. *Int J Oncol* 2005; 26:923-31.
- ¹⁴³ Hogel H, Miikkulainen P, Bino L, Jaakkola PM. Hypoxia inducible prolyl hydroxylase PHD3 maintains carcinoma cell growth by decreasing the stability of p27. *Mol Cancer* 2015; 14.
- ¹⁴⁴ Dormoy V, Danilin S, Lindner V, Thomas L, Rothhut S, Coquard C, Helwig JJ, Jacqmin D, Lang H, Massfelder T. The sonic hedgehog signaling pathway is reactivated in human renal cell carcinoma and plays orchestral role in tumor growth. *Mol Cancer* 2009; 8:123.

- ¹⁴⁵ Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, Dornhofer N, Kong C, Le QT, Chi JT, Jeffrey SS, Giaccia AJ. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature* 2006; 440:1222-6.
- ¹⁴⁶ Eisinger-Mathason TS, Zhang M, Qiu Q, Skuli N, Nakazawa MS, Karakasheva T, Mucaj V, Shay JE, Stangenberg L, Sadri N, et al. Hypoxia-dependent modification of collagen networks promotes sarcoma metastasis. *Cancer Discov* 2013; 3:1190-205.
- ¹⁴⁷ Oda K, Matsuoka Y, Funahashi A, Kitano H. A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Syst Biol* 2005; 1:2005 0010.
- ¹⁴⁸ Weis SM, Cheresh DA. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med* 2011; 17:1359-70.
- ¹⁴⁹ Pohla H, Buchner A, Stadlbauer B, Frankenberger B, Stevanovic S, Walter S, Frank R, Schwachula T, Olek S, Kopp J, et al. High immune response rates and decreased frequencies of regulatory T cells in metastatic renal cell carcinoma patients after tumor cell vaccination. *Mol Med* 2012; 18:1499-508.
- ¹⁵⁰ Asemissen AM, Haase D, Stevanovic S, Bauer S, Busse A, Thiel E, Rammensee HG, Keilholz U, Scheibenbogen C. Identification of an immunogenic HLA-A*0201-binding T-cell epitope of the transcription factor PAX2. *J Immunother* 2009; 32:370-5.
- ¹⁵¹ Sato E, Torigoe T, Hirohashi Y, Kitamura H, Tanaka T, Honma I, Asanuma H, Harada K, Takasu H, Masumori N, et al. Identification of an immunogenic CTL epitope of HIFPH3 for immunotherapy of renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008; 14:6916-23.
- ¹⁵² Andrade Filho PA, Lopez-Albaitero A, Gooding W, Ferris RL. Novel immunogenic HLA-A*0201-restricted epidermal growth factor receptor-specific T-cell epitope in head and neck cancer patients. *J Immunother* 2010; 33:83-91.
- ¹⁵³ Amedei A, Niccolai E, Benaglio M, Della Bella C, Cianchi F, Bechi P, Taddei A, Bencini L, Farsi M, Cappello P, et al. Ex vivo analysis of pancreatic cancer-infiltrating T lymphocytes reveals that ENO-specific Tregs accumulate in tumor tissue and inhibit Th1/Th17 effector cell functions. *Cancer Immunol Immunother* 2013; 62:1249-60.
- ¹⁵⁴ Eberle U. Quantitative Analyse von MHC-Klasse-I-Molekülen in kolorektalen Karzinomen und Identifizierung tumorassoziierter MHC-gebundener Peptide. Dissertation Universität Tübingen 2005.
- ¹⁵⁵ Reichle C. Patientenspezifische Analyse von Tumorantigenen. Dissertation Universität Tübingen 2006.
- ¹⁵⁶ Stickel JS. Qualitative und quantitative Analyse und Vergleich von Tumorantigenen und HLA Klasse I-Liganden in Primärtumoren und Metastasen des Nierenzellkarzinoms. Dissertation Universität Tübingen 2011.

- ¹⁵⁷ Stickel JS, Weinzierl AO, Hillen N, Drews O, Schuler MM, Hennenlotter J, Wernet D, Muller CA, Stenzl A, Rammensee HG, et al. HLA ligand profiles of primary renal cell carcinoma maintained in metastases. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 58:1407-17.
- ¹⁵⁸ Aggarwal S, Yadav AK. False Discovery Rate Estimation in Proteomics. *Methods Mol Biol* 2016; 1362:119-28.
- ¹⁵⁹ Curran TG, Bryson BD, Reigelhaupt M, Johnson H, White FM. Computer aided manual validation of mass spectrometry-based proteomic data. *Methods* 2013; 61:219-26.
- ¹⁶⁰ Saio M, Teicher M, Campbell G, Feiner H, Delgado Y, Frey AB. Immunocytochemical demonstration of down regulation of HLA class-I molecule expression in human metastatic breast carcinoma. *Clin Exp Metastasis* 2004; 21:243-9.
- ¹⁶¹ Aptsiauri N, Carretero R, Garcia-Lora A, Real LM, Cabrera T, Garrido F. Regressing and progressing metastatic lesions: resistance to immunotherapy is predetermined by irreversible HLA class I antigen alterations. *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57:1727-33.
- ¹⁶² Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420:860-7.
- ¹⁶³ Murali R, Scolyer RA. Tumor-infiltrating lymphocytes and mitotic index in metastatic melanoma as predictors of patient survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107:E46; author reply E7.
- ¹⁶⁴ Sharma P, Shen Y, Wen S, Yamada S, Jungbluth AA, Gnjatic S, Bajorin DF, Reuter VE, Herr H, Old LJ, et al. CD8 tumor-infiltrating lymphocytes are predictive of survival in muscle-invasive urothelial carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:3967-72.
- ¹⁶⁵ Virchow, R. An address on the value of pathological experiments. *Br. Med.* 1881; J. 2:198–203.
- ¹⁶⁶ Elinav E, Nowarski R, Thaiss CA, Hu B, Jin C, Flavell RA. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat Rev Cancer* 2013; 13:759-71.
- ¹⁶⁷ Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144:646-74.
- ¹⁶⁸ Motz GT, Coukos G. Deciphering and reversing tumor immune suppression. *Immunity* 2013; 39:61-73.
- ¹⁶⁹ Sethi MK, Thaysen-Andersen M, Kim H, Park CK, Baker MS, Packer NH, Paik YK, Hancock WS, Fanayan S. Quantitative proteomic analysis of paired colorectal cancer and non-tumorigenic tissues reveals signature proteins and perturbed pathways involved in CRC progression and metastasis. *J Proteomics* 2015; 126:54-67.

- ¹⁷⁰ Yang G, Xu Z, Lu W, Li X, Sun C, Guo J, Xue P, Guan F. Quantitative Analysis of Differential Proteome Expression in Bladder Cancer vs. Normal Bladder Cells Using SILAC Method. *PLoS One* 2015; 10:e0134727.
- ¹⁷¹ Dwek MV, Alaiya AA. Proteome analysis enables separate clustering of normal breast, benign breast and breast cancer tissues. *Br J Cancer* 2003; 89:305-7.
- ¹⁷² Wisniewski JR, Ostasiewicz P, Dus K, Zielinska DF, Gnad F, Mann M. Extensive quantitative remodeling of the proteome between normal colon tissue and adenocarcinoma. *Mol Syst Biol* 2012; 8:611.
- ¹⁷³ Wang L, Zhu JS, Song MQ, Chen GQ, Chen JL. Comparison of gene expression profiles between primary tumor and metastatic lesions in gastric cancer patients using laser microdissection and cDNA microarray. *World J Gastroenterol* 2006; 12:6949-54.
- ¹⁷⁴ Weigelt B, Glas AM, Wessels LF, Witteveen AT, Peterse JL, van't Veer LJ. Gene expression profiles of primary breast tumors maintained in distant metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:15901-5.
- ¹⁷⁵ Hoof I, van Baarle D, Hildebrand WH, Kesmir C. Proteome sampling by the HLA class I antigen processing pathway. *PLoS Comput Biol* 2012; 8:e1002517.
- ¹⁷⁶ Bassani-Sternberg M, Pletscher-Frankild S, Jensen LJ, Mann M. Mass spectrometry of human leukocyte antigen class I peptidomes reveals strong effects of protein abundance and turnover on antigen presentation. *Mol Cell Proteomics* 2015; 14:658-73.
- ¹⁷⁷ Wu X, Hasan MA, Chen JY. Pathway and network analysis in proteomics. *J Theor Biol* 2014; 362:44-52.
- ¹⁷⁸ Goh WW, Lee YH, Chung M, Wong L. How advancement in biological network analysis methods empowers proteomics. *Proteomics* 2012; 12:550-63.
- ¹⁷⁹ Roessler S, Lin G, Forgues M, Budhu A, Hoover S, Simpson RM, Wu X, He P, Qin LX, Tang ZY, et al. Integrative genomic and transcriptomic characterization of matched primary and metastatic liver and colorectal carcinoma. *Int J Biol Sci* 2015; 11:88-98.
- ¹⁸⁰ Vignot S, Lefebvre C, Frampton GM, Meurice G, Yelensky R, Palmer G, Capron F, Lazar V, Hannoun L, Miller VA, et al. Comparative analysis of primary tumour and matched metastases in colorectal cancer patients: evaluation of concordance between genomic and transcriptional profiles. *Eur J Cancer* 2015; 51:791-9.
- ¹⁸¹ Gerlinger M, Horswell S, Larkin J, Rowan AJ, Salm MP, Varela I, Fisher R, McGranahan N, Matthews N, Santos CR, et al. Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing. *Nat Genet* 2014; 46:225-33.

- ¹⁸² Lopez JI, Mosteiro L, Guarch R, Larrinaga G, Pulido R, Angulo JC. Low-grade metastases in high-grade clear cell renal cell carcinomas: A clinicopathologic study of 4 cases with an insight into the role of mesenchymal-to-epithelial transition process. *Ann Diagn Pathol* 2016; 20:13-8.
- ¹⁸³ Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 1994; 370:61-5.
- ¹⁸⁴ Zhu J, Liang L, Jiao Y, Liu L, Alliance US-CPS-O. Enhanced invasion of metastatic cancer cells via extracellular matrix interface. *PLoS One* 2015; 10:e0118058.
- ¹⁸⁵ Werfel J, Krause S, Bischof AG, Mannix RJ, Tobin H, Bar-Yam Y, Bellin RM, Ingber DE. How changes in extracellular matrix mechanics and gene expression variability might combine to drive cancer progression. *PLoS One* 2013; 8:e76122.
- ¹⁸⁶ Sharma SG, Aggarwal N, Gupta SD, Singh MK, Gupta R, Dinda AK. Angiogenesis in renal cell carcinoma: correlation of microvessel density and microvessel area with other prognostic factors. *Int Urol Nephrol* 2011; 43:125-9.
- ¹⁸⁷ Facciabene A, Peng X, Hagemann IS, Balint K, Barchetti A, Wang LP, Gimotty PA, Gilks CB, Lal P, Zhang L, et al. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. *Nature* 2011; 475:226-30.
- ¹⁸⁸ Morgan H, Hill PA. Human breast cancer cell-mediated bone collagen degradation requires plasminogen activation and matrix metalloproteinase activity. *Cancer Cell Int* 2005; 5:1.
- ¹⁸⁹ Egan K, Crowley D, Smyth P, O'Toole S, Spillane C, Martin C, Gallagher M, Canney A, Norris L, Conlon N, et al. Platelet adhesion and degranulation induce pro-survival and pro-angiogenic signalling in ovarian cancer cells. *PLoS One* 2011; 6:e26125.
- ¹⁹⁰ Ahmad I, Iwata T, Leung HY. Mechanisms of FGFR-mediated carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1823:850-60.
- ¹⁹¹ Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 1999; 79:1283-316.
- ¹⁹² Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004; 304:1497-500.
- ¹⁹³ Zhuang S, Dang Y, Schnellmann RG. Requirement of the epidermal growth factor receptor in renal epithelial cell proliferation and migration. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 287:F365-72.
- ¹⁹⁴ Levine MD, Liotta LA, Stracke ML. Stimulation and regulation of tumor cell motility in invasion and metastasis. *EXS* 1995; 74:157-79.

- ¹⁹⁵ Xue C, Wyckoff J, Liang F, Sidani M, Violini S, Tsai KL, Zhang ZY, Sahai E, Condeelis J, Segall JE. Epidermal growth factor receptor overexpression results in increased tumor cell motility in vivo coordinately with enhanced intravasation and metastasis. *Cancer Res* 2006; 66:192-7.
- ¹⁹⁶ Yamakawa M, Liu LX, Belanger AJ, Date T, Kuriyama T, Goldberg MA, Cheng SH, Gregory RJ, Jiang C. Expression of angiopoietins in renal epithelial and clear cell carcinoma cells: regulation by hypoxia and participation in angiogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 287:F649-57.
- ¹⁹⁷ Li C, Liu B, Dai Z, Tao Y. Knockdown of VEGF receptor-1 (VEGFR-1) impairs macrophage infiltration, angiogenesis and growth of clear cell renal cell carcinoma (CRCC). *Cancer Biol Ther* 2011; 12:872-80.
- ¹⁹⁸ Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956; 123:309-14.
- ¹⁹⁹ Li B, Qiu B, Lee DS, Walton ZE, Ochocki JD, Mathew LK, Mancuso A, Gade TP, Keith B, Nissim I, et al. Fructose-1,6-bisphosphatase opposes renal carcinoma progression. *Nature* 2014; 513:251-5.
- ²⁰⁰ Dong XF, Berthois Y, Martin PM. Effect of epidermal growth factor on the proliferation of human epithelial cancer cell lines: correlation with the level of occupied EGF receptor. *Anticancer Res* 1991; 11:737-43.
- ²⁰¹ Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; 119:1420-8.
- ²⁰² Mizumoto A, Yamamoto K, Nakayama Y, Takara K, Nakagawa T, Hirano T, Hirai M. Induction of epithelial-mesenchymal transition via activation of epidermal growth factor receptor contributes to sunitinib resistance in human renal cell carcinoma cell lines. *J Pharmacol Exp Ther* 2015; 355:152-8.
- ²⁰³ Zhang L, Lei W, Wang X, Tang Y, Song J. Glucocorticoid induces mesenchymal-to-epithelial transition and inhibits TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and cell migration. *FEBS Lett* 2010; 584:4646-54.
- ²⁰⁴ Nakagawa T, Kosugi T, Haneda M, Rivard CJ, Long DA. Abnormal angiogenesis in diabetic nephropathy. *Diabetes* 2009; 58:1471-8.
- ²⁰⁵ Chang AS, Hathaway CK, Smithies O, Kakoki M. Transforming growth factor beta1 and diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2015:ajprenal 00502 2015.
- ²⁰⁶ Koya D. Epidermal growth factor receptor signaling and the progression of diabetic nephropathy. *J Diabetes Investig* 2015; 6:519-21.
- ²⁰⁷ Girnun GD, Smith WM, Drori S, Sarraf P, Mueller E, Eng C, Nambiar P, Rosenberg DW, Bronson RT, Edelman W, et al. APC-dependent suppression of colon carcinogenesis by PPARgamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:13771-6.
- ²⁰⁸ Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992; 359:235-7.

- ²⁰⁹ Bohm M, Wieland I, Stinhofer C, Otto T, Rubben H. Detection of loss of heterozygosity in the APC tumor suppressor gene in nonpapillary renal cell carcinoma by microdissection and polymerase chain reaction. *Urol Res* 1997; 25:161-5.
- ²¹⁰ Pecina SN, Gall-TroSelj K, M SL, Radic K, NikuSeva-Martic T, Pavelic K. Genetic changes of the E-cadherin and APC tumour suppressor genes in clear cell renal cell carcinoma. *Pathology* 2004; 36:145-51.
- ²¹¹ Sansom OJ, Reed KR, Hayes AJ, Ireland H, Brinkmann H, Newton IP, Battle E, Simon-Assmann P, Clevers H, Nathke IS, et al. Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes Dev* 2004; 18:1385-90.
- ²¹² Sierra J, Yoshida T, Joazeiro CA, Jones KA. The APC tumor suppressor counteracts beta-catenin activation and H3K4 methylation at Wnt target genes. *Genes Dev* 2006; 20:586-600.
- ²¹³ Huang W, Deng B, Wang RW, Tan QY, He Y, Jiang YG, Zhou JH. BCAR1 protein plays important roles in carcinogenesis and predicts poor prognosis in non-small-cell lung cancer. *PLoS One* 2012; 7:e36124.
- ²¹⁴ Konstantinovskiy S, Davidson B, Reich R. Ezrin and BCAR1/p130Cas mediate breast cancer growth as 3-D spheroids. *Clin Exp Metastasis* 2012; 29:527-40.
- ²¹⁵ Modzelewska K, Newman LP, Desai R, Keely PJ. Ack1 mediates Cdc42-dependent cell migration and signaling to p130Cas. *J Biol Chem* 2006; 281:37527-35.
- ²¹⁶ Wolpin BM, Rizzato C, Kraft P, Kooperberg C, Petersen GM, Wang Z, Arslan AA, Beane-Freeman L, Bracci PM, Buring J, et al. Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for pancreatic cancer. *Nat Genet* 2014; 46:994-1000.
- ²¹⁷ Gimenez-Bachs JM, Salinas-Sanchez AS, Serrano-Oviedo L, Nam-Cha SH, Rubio-Del Campo A, Sanchez-Prieto R. Carbonic anhydrase IX as a specific biomarker for clear cell renal cell carcinoma: comparative study of Western blot and immunohistochemistry and implications for diagnosis. *Scand J Urol Nephrol* 2012; 46:358-64.
- ²¹⁸ Bui MH, Seligson D, Han KR, Pantuck AJ, Dorey FJ, Huang Y, Horvath S, Leibovich BC, Chopra S, Liao SY, et al. Carbonic anhydrase IX is an independent predictor of survival in advanced renal clear cell carcinoma: implications for prognosis and therapy. *Clin Cancer Res* 2003; 9:802-11.
- ²¹⁹ Chamie K, Klopfer P, Bevan P, Storkel S, Said J, Fall B, Belldgrun AS, Pantuck AJ. Carbonic anhydrase-IX score is a novel biomarker that predicts recurrence and survival for high-risk, nonmetastatic renal cell carcinoma: Data from the phase III ARISER clinical trial. *Urol Oncol* 2015; 33:204 e25-33.

- ²²⁰ Muselaers CH, Boers-Sonderen MJ, van Oostenbrugge TJ, Boerman OC, Desar IM, Stillebroer AB, Mulder SF, van Herpen CM, Langenhuijsen JF, Oosterwijk E, et al. Phase 2 Study of Lutetium 177-Labeled Anti-Carbonic Anhydrase IX Monoclonal Antibody Girentuximab in Patients with Advanced Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol* 2015.
- ²²¹ Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, Pastorek J, Wykoff CC, Gatter KC, Harris AL. Expression of hypoxia-inducible carbonic anhydrase-9 relates to angiogenic pathways and independently to poor outcome in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2001; 61:7992-8.
- ²²² Sheng W, Chen C, Dong M, Zhou J, Liu Q, Dong Q, Li F. Overexpression of calreticulin contributes to the development and progression of pancreatic cancer. *J Cell Physiol* 2014; 229:887-97.
- ²²³ Shi F, Shang L, Pan BQ, Wang XM, Jiang YY, Hao JJ, Zhang Y, Cai Y, Xu X, Zhan QM, et al. Calreticulin promotes migration and invasion of esophageal cancer cells by upregulating neuropilin-1 expression via STAT5A. *Clin Cancer Res* 2014; 20:6153-62.
- ²²⁴ Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini JL, Castedo M, Mignot G, Panaretakis T, Casares N, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 2007; 13:54-61.
- ²²⁵ Koch M, Hussein F, Woeste A, Grundker C, Frontzek K, Emons G, Hawighorst T. CD36-mediated activation of endothelial cell apoptosis by an N-terminal recombinant fragment of thrombospondin-2 inhibits breast cancer growth and metastasis in vivo. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 128:337-46.
- ²²⁶ Hale JS, Otvos B, Sinyuk M, Alvarado AG, Hitomi M, Stoltz K, Wu Q, Flavahan W, Levison B, Johansen ML, et al. Cancer stem cell-specific scavenger receptor CD36 drives glioblastoma progression. *Stem Cells* 2014; 32:1746-58.
- ²²⁷ Sun H. Identification of key genes associated with gastric cancer based on DNA microarray data. *Oncol Lett* 2016; 11:525-30.
- ²²⁸ Zou X, Feng B, Dong T, Yan G, Tan B, Shen H, Huang A, Zhang X, Zhang M, Yang P, et al. Up-regulation of type I collagen during tumorigenesis of colorectal cancer revealed by quantitative proteomic analysis. *J Proteomics* 2013; 94:473-85.
- ²²⁹ Ibanez de Caceres I, Dulaimi E, Hoffman AM, Al-Saleem T, Uzzo RG, Cairns P. Identification of novel target genes by an epigenetic reactivation screen of renal cancer. *Cancer Res* 2006; 66:5021-8.
- ²³⁰ Boguslawska J, Kedzierska H, Poplawski P, Rybicka B, Tanski Z, Piekliko-Witkowska A. Expression of Genes Involved in Cellular Adhesion and Extracellular Matrix Remodeling Correlates with Poor Survival of Patients with Renal Cancer. *J Urol* 2015.

- ²³¹ Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figier A, Hecht JR, Gallinger S, Au HJ, Murawa P, Walde D, Wolff RA, et al. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 2007; 25:1960-6.
- ²³² Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, Campos D, Maoleekoonpiroj S, Smylie M, Martins R, et al. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2005; 353:123-32.
- ²³³ Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 351:337-45.
- ²³⁴ Gunaratnam L, Morley M, Franovic A, de Paulsen N, Mekhail K, Parolin DA, Nakamura E, Lorimer IA, Lee S. Hypoxia inducible factor activates the transforming growth factor-alpha/epidermal growth factor receptor growth stimulatory pathway in VHL(-/-) renal cell carcinoma cells. *J Biol Chem* 2003; 278:44966-74.
- ²³⁵ Kedar D, Baker CH, Killion JJ, Dinney CP, Fidler IJ. Blockade of the epidermal growth factor receptor signaling inhibits angiogenesis leading to regression of human renal cell carcinoma growing orthotopically in nude mice. *Clin Cancer Res* 2002; 8:3592-600.
- ²³⁶ Heimberger AB, Crotty LE, Archer GE, Hess KR, Wikstrand CJ, Friedman AH, Friedman HS, Bigner DD, Sampson JH. Epidermal growth factor receptor VIII peptide vaccination is efficacious against established intracerebral tumors. *Clin Cancer Res* 2003; 9:4247-54.
- ²³⁷ Henze AT, Garvalov BK, Seidel S, Cuesta AM, Ritter M, Filatova A, Foss F, Dopeso H, Essmann CL, Maxwell PH, et al. Loss of PHD3 allows tumours to overcome hypoxic growth inhibition and sustain proliferation through EGFR. *Nat Commun* 2014; 5:5582.
- ²³⁸ Zhang T, Niu X, Liao L, Cho EA, Yang H. The contributions of HIF-target genes to tumor growth in RCC. *PLoS One* 2013; 8:e80544.
- ²³⁹ He P, Naka T, Serada S, Fujimoto M, Tanaka T, Hashimoto S, Shima Y, Yamadori T, Suzuki H, Hirashima T, et al. Proteomics-based identification of alpha-enolase as a tumor antigen in non-small lung cancer. *Cancer Sci* 2007; 98:1234-40.
- ²⁴⁰ Fu QF, Liu Y, Fan Y, Hua SN, Qu HY, Dong SW, Li RL, Zhao MY, Zhen Y, Yu XL, et al. Alpha-enolase promotes cell glycolysis, growth, migration, and invasion in non-small cell lung cancer through FAK-mediated PI3K/AKT pathway. *J Hematol Oncol* 2015; 8:22.

- ²⁴¹ Marchio S, Lahdenranta J, Schlingemann RO, Valdembri D, Wesseling P, Arap MA, Hajitou A, Ozawa MG, Trepel M, Giordano RJ, et al. Aminopeptidase A is a functional target in angiogenic blood vessels. *Cancer Cell* 2004; 5:151-62.
- ²⁴² Cao Y, Liu X, Lu W, Chen Y, Wu X, Li M, Wang XA, Zhang F, Jiang L, Zhang Y, et al. Fibronectin promotes cell proliferation and invasion through mTOR signaling pathway activation in gallbladder cancer. *Cancer Lett* 2015; 360:141-50.
- ²⁴³ Balanis N, Wendt MK, Schiemann BJ, Wang Z, Schiemann WP, Carlin CR. Epithelial to mesenchymal transition promotes breast cancer progression via a fibronectin-dependent STAT3 signaling pathway. *J Biol Chem* 2013; 288:17954-67.
- ²⁴⁴ Ramos Gde O, Bernardi L, Lauxen I, Sant'Ana Filho M, Horwitz AR, Lamers ML. Fibronectin Modulates Cell Adhesion and Signaling to Promote Single Cell Migration of Highly Invasive Oral Squamous Cell Carcinoma. *PLoS One* 2016; 11:e0151338.
- ²⁴⁵ Steffens S, Schrader AJ, Vetter G, Eggers H, Blasig H, Becker J, Kuczyk MA, Serth J. Fibronectin 1 protein expression in clear cell renal cell carcinoma. *Oncol Lett* 2012; 3:787-90.
- ²⁴⁶ Waalkes S, Atschekzei F, Kramer MW, Hennenlotter J, Vetter G, Becker JU, Stenzl A, Merseburger AS, Schrader AJ, Kuczyk MA, et al. Fibronectin 1 mRNA expression correlates with advanced disease in renal cancer. *BMC Cancer* 2010; 10:503.
- ²⁴⁷ Daly RJ, Binder MD, Sutherland RL. Overexpression of the Grb2 gene in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 1994; 9:2723-7.
- ²⁴⁸ Tari AM, Hung MC, Li K, Lopez-Berestein G. Growth inhibition of breast cancer cells by Grb2 downregulation is correlated with inactivation of mitogen-activated protein kinase in EGFR, but not in ErbB2, cells. *Oncogene* 1999; 18:1325-32.
- ²⁴⁹ Hintz RL, Bock S, Thorsson AV, Bovens J, Powell DR, Jakse G, Petrides PE. Expression of the insulin like growth factor-binding protein 3 (IGFBP-3) gene is increased in human renal carcinomas. *J Urol* 1991; 146:1160-3.
- ²⁵⁰ Shibao K, Fiedler MJ, Nagata J, Minagawa N, Hirata K, Nakayama Y, Iwakiri Y, Nathanson MH, Yamaguchi K. The type III inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is associated with aggressiveness of colorectal carcinoma. *Cell Calcium* 2010; 48:315-23.
- ²⁵¹ Rusinek D, Swierniak M, Chmielik E, Kowal M, Kowalska M, Cyplinska R, Czarniecka A, Piglowski W, Korfanty J, Chekan M, et al. BRAFV600E-Associated Gene Expression Profile: Early Changes in the Transcriptome, Based on a Transgenic Mouse Model of Papillary Thyroid Carcinoma. *PLoS One* 2015; 10:e0143688.

- ²⁵² Sumantran VN, Mishra P, Sudhakar N. Microarray analysis of differentially expressed genes regulating lipid metabolism during melanoma progression. *Indian J Biochem Biophys* 2015; 52:125-31.
- ²⁵³ Mound A, Rodat-Despoix L, Bougarn S, Ouadid-Ahidouch H, Matifat F. Molecular interaction and functional coupling between type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and BKCa channel stimulate breast cancer cell proliferation. *Eur J Cancer* 2013; 49:3738-51.
- ²⁵⁴ Hedberg ML, Goh G, Chiosea SI, Bauman JE, Freilino ML, Zeng Y, Wang L, Diergaarde BB, Gooding WE, Lui VW, et al. Genetic landscape of metastatic and recurrent head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Invest* 2016; 126:169-80.
- ²⁵⁵ Kirschmann DA, Seftor EA, Fong SF, Nieva DR, Sullivan CM, Edwards EM, Sommer P, Csiszar K, Hendrix MJ. A molecular role for lysyl oxidase in breast cancer invasion. *Cancer Res* 2002; 62:4478-83.
- ²⁵⁶ Payne SL, Fogelgren B, Hess AR, Seftor EA, Wiley EL, Fong SF, Csiszar K, Hendrix MJ, Kirschmann DA. Lysyl oxidase regulates breast cancer cell migration and adhesion through a hydrogen peroxide-mediated mechanism. *Cancer Res* 2005; 65:11429-36.
- ²⁵⁷ Gao Y, Xiao Q, Ma H, Li L, Liu J, Feng Y, Fang Z, Wu J, Han X, Zhang J, et al. LKB1 inhibits lung cancer progression through lysyl oxidase and extracellular matrix remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107:18892-7.
- ²⁵⁸ Baker AM, Cox TR, Bird D, Lang G, Murray GI, Sun XF, Southall SM, Wilson JR, Erler JT. The role of lysyl oxidase in SRC-dependent proliferation and metastasis of colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103:407-24.
- ²⁵⁹ Cox TR, Rumney RM, Schoof EM, Perryman L, Hoye AM, Agrawal A, Bird D, Latif NA, Forrest H, Evans HR, et al. The hypoxic cancer secretome induces pre-metastatic bone lesions through lysyl oxidase. *Nature* 2015; 522:106-10.
- ²⁶⁰ Ramankulov A, Lein M, Johannsen M, Schrader M, Miller K, Jung K. Plasma matrix metalloproteinase-7 as a metastatic marker and survival predictor in patients with renal cell carcinomas. *Cancer Sci* 2008; 99:1188-94.
- ²⁶¹ Yokoyama Y, Grunebach F, Schmidt SM, Heine A, Hantschel M, Stevanovic S, Rammensee HG, Brossart P. Matrilysin (MMP-7) is a novel broadly expressed tumor antigen recognized by antigen-specific T cells. *Clin Cancer Res* 2008; 14:5503-11.
- ²⁶² Muller S, Nowak K. Exploring the miRNA-mRNA regulatory network in clear cell renal cell carcinomas by next-generation sequencing expression profiles. *Biomed Res Int* 2014; 2014:948408.
- ²⁶³ Moriarty WF, Kim E, Gerber SA, Hammers H, Alani RM. Neuropilin-2 promotes melanoma growth and progression in vivo. *Melanoma Res* 2016.

- ²⁶⁴ Ji T, Guo Y, Kim K, McQueen P, Ghaffar S, Christ A, Lin C, Eskander R, Zi X, Hoang BH. Neuropilin-2 expression is inhibited by secreted Wnt antagonists and its down-regulation is associated with reduced tumor growth and metastasis in osteosarcoma. *Mol Cancer* 2015; 14:86.
- ²⁶⁵ Wittmann P, Grubinger M, Groger C, Huber H, Sieghart W, Peck-Radosavljevic M, Mikulits W. Neuropilin-2 induced by transforming growth factor-beta augments migration of hepatocellular carcinoma cells. *BMC Cancer* 2015; 15:909.
- ²⁶⁶ Ozcan A, Zhai Q, Javed R, Shen SS, Coffey D, Krishnan B, Truong LD. PAX-2 is a helpful marker for diagnosing metastatic renal cell carcinoma: comparison with the renal cell carcinoma marker antigen and kidney-specific cadherin. *Arch Pathol Lab Med* 2010; 134:1121-9.
- ²⁶⁷ Luu VD, Boysen G, Struckmann K, Casagrande S, von Teichman A, Wild PJ, Sulser T, Schraml P, Moch H. Loss of VHL and hypoxia provokes PAX2 up-regulation in clear cell renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2009; 15:3297-304.
- ²⁶⁸ Li L, Wu Y, Yang Y. Paired box 2 induces epithelial-mesenchymal transition in normal renal tubular epithelial cells of rats. *Mol Med Rep* 2013; 7:1549-54.
- ²⁶⁹ Li CM, Guo M, Borczuk A, Powell CA, Wei M, Thaker HM, Friedman R, Klein U, Tycko B. Gene expression in Wilms' tumor mimics the earliest committed stage in the metanephric mesenchymal-epithelial transition. *Am J Pathol* 2002; 160:2181-90.
- ²⁷⁰ Janke J, Schluter K, Jandrig B, Theile M, Kolble K, Arnold W, Grinstein E, Schwartz A, Estevez-Schwarz L, Schlag PM, et al. Suppression of tumorigenicity in breast cancer cells by the microfilament protein profilin 1. *J Exp Med* 2000; 191:1675-86.
- ²⁷¹ Yao W, Ji S, Qin Y, Yang J, Xu J, Zhang B, Xu W, Liu J, Shi S, Liu L, et al. Profilin-1 suppresses tumorigenicity in pancreatic cancer through regulation of the SIRT3-HIF1alpha axis. *Mol Cancer* 2014; 13:187.
- ²⁷² Cheng YJ, Zhu ZX, Zhou JS, Hu ZQ, Zhang JP, Cai QP, Wang LH. Silencing profilin-1 inhibits gastric cancer progression via integrin beta1/focal adhesion kinase pathway modulation. *World J Gastroenterol* 2015; 21:2323-35.
- ²⁷³ Masui O, White NM, DeSouza LV, Krakovska O, Matta A, Metias S, Khalil B, Romaschin AD, Honey RJ, Stewart R, et al. Quantitative proteomic analysis in metastatic renal cell carcinoma reveals a unique set of proteins with potential prognostic significance. *Mol Cell Proteomics* 2013; 12:132-44.
- ²⁷⁴ Minamida S, Iwamura M, Kodera Y, Kawashima Y, Ikeda M, Okusa H, Fujita T, Maeda T, Baba S. Profilin 1 overexpression in renal cell carcinoma. *Int J Urol* 2011; 18:63-71.

- ²⁷⁵ Karamchandani JR, Gabril MY, Ibrahim R, Scorilas A, Filter E, Finelli A, Lee JY, Ordon M, Pasic M, Romaschin AD, et al. Profilin-1 expression is associated with high grade and stage and decreased disease-free survival in renal cell carcinoma. *Hum Pathol* 2015; 46:673-80.
- ²⁷⁶ Chen Y, Terajima M, Yang Y, Sun L, Ahn YH, Pankova D, Puperi DS, Watanabe T, Kim MP, Blackmon SH, et al. Lysyl hydroxylase 2 induces a collagen cross-link switch in tumor stroma. *J Clin Invest* 2015; 125:1147-62.
- ²⁷⁷ Kurozumi A, Kato M, Goto Y, Matsushita R, Nishikawa R, Okato A, Fukumoto I, Ichikawa T, Seki N. Regulation of the collagen cross-linking enzymes LOXL2 and PLOD2 by tumor-suppressive microRNA-26a/b in renal cell carcinoma. *Int J Oncol* 2016.
- ²⁷⁸ Lind M, Overgaard S, Ongpipattanakul B, Nguyen T, Bunger C, Soballe K. Transforming growth factor-beta 1 stimulates bone ongrowth to weight-loaded tricalcium phosphate coated implants: an experimental study in dogs. *J Bone Joint Surg Br* 1996; 78:377-82.
- ²⁷⁹ Hadaschik EN, Enk AH. TGF-beta1-induced regulatory T cells. *Hum Immunol* 2015; 76:561-4.
- ²⁸⁰ Xiong J, Sun Q, Ji K, Wang Y, Liu H. Epidermal growth factor promotes transforming growth factor-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition in HK-2 cells through a synergistic effect on Snail. *Mol Biol Rep* 2014; 41:241-50.
- ²⁸¹ Sjolund J, Bostrom AK, Lindgren D, Manna S, Moustakas A, Ljungberg B, Johansson M, Fredlund E, Axelson H. The notch and TGF-beta signaling pathways contribute to the aggressiveness of clear cell renal cell carcinoma. *PLoS One* 2011; 6:e23057.
- ²⁸² Kominsky SL, Doucet M, Brady K, Weber KL. TGF-beta promotes the establishment of renal cell carcinoma bone metastasis. *J Bone Miner Res* 2007; 22:37-44.
- ²⁸³ Ivanov SV, Ivanova AV, Salnikow K, Timofeeva O, Subramaniam M, Lerman MI. Two novel VHL targets, TGFBI (BIGH3) and its transactivator KLF10, are up-regulated in renal clear cell carcinoma and other tumors. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 370:536-40.
- ²⁸⁴ Shang D, Liu Y, Yang P, Chen Y, Tian Y. TGFBI-promoted adhesion, migration and invasion of human renal cell carcinoma depends on inactivation of von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Urology* 2012; 79:966 e1-7.
- ²⁸⁵ Lebdai S, Verhoest G, Parikh H, Jacquet SF, Bensalah K, Chautard D, Rioux Leclercq N, Azzouzi AR, Bigot P. Identification and validation of TGFBI as a promising prognosis marker of clear cell renal cell carcinoma. *Urol Oncol* 2015; 33:69 e11-8.
- ²⁸⁶ Miyata Y, Sakai H. Thrombospondin-1 in urological cancer: pathological role, clinical significance, and therapeutic prospects. *Int J Mol Sci* 2013; 14:12249-72.

- ²⁸⁷ Zubac DP, Bostad L, Kihl B, Seidal T, Wentzel-Larsen T, Haukaas SA. The expression of thrombospondin-1 and p53 in clear cell renal cell carcinoma: its relationship to angiogenesis, cell proliferation and cancer specific survival. *J Urol* 2009; 182:2144-9.
- ²⁸⁸ Miyata Y, Koga S, Takehara K, Kanetake H, Kanda S. Expression of thrombospondin-derived 4N1K peptide-containing proteins in renal cell carcinoma tissues is associated with a decrease in tumor growth and angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2003; 9:1734-40.
- ²⁸⁹ Oshika Y, Masuda K, Tokunaga T, Hatanaka H, Kamiya T, Abe Y, Ozeki Y, Kijima H, Yamazaki H, Tamaoki N, et al. Thrombospondin 2 gene expression is correlated with decreased vascularity in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4:1785-8.
- ²⁹⁰ Tokunaga T, Nakamura M, Oshika Y, Abe Y, Ozeki Y, Fukushima Y, Hatanaka H, Sadahiro S, Kijima H, Tsuchida T, et al. Thrombospondin 2 expression is correlated with inhibition of angiogenesis and metastasis of colon cancer. *Br J Cancer* 1999; 79:354-9.
- ²⁹¹ Gerritsen ME, Peale FV, Jr., Wu T. Gene expression profiling in silico: relative expression of candidate angiogenesis associated genes in renal cell carcinomas. *Exp Nephrol* 2002; 10:114-9.
- ²⁹² Nakamura M, Oida Y, Abe Y, Yamazaki H, Mukai M, Matsuyama M, Chijiwa T, Matsumoto H, Ueyama Y. Thrombospondin-2 inhibits tumor cell invasion through the modulation of MMP-9 and uPA in pancreatic cancer cells. *Mol Med Rep* 2008; 1:423-7.
- ²⁹³ Farrow B, Berger DH, Rowley D. Tumor-derived pancreatic stellate cells promote pancreatic cancer cell invasion through release of thrombospondin-2. *J Surg Res* 2009; 156:155-60.
- ²⁹⁴ Nicol D, Hii SI, Walsh M, Teh B, Thompson L, Kennett C, Gotley D. Vascular endothelial growth factor expression is increased in renal cell carcinoma. *J Urol* 1997; 157:1482-6.
- ²⁹⁵ Jacobsen J, Rasmuson T, Grankvist K, Ljungberg B. Vascular endothelial growth factor as prognostic factor in renal cell carcinoma. *J Urol* 2000; 163:343-7.
- ²⁹⁶ Rini BI, Small EJ. Biology and clinical development of vascular endothelial growth factor-targeted therapy in renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2005; 23:1028-43.
- ²⁹⁷ Motzer RJ, Michaelson MD, Redman BG, Hudes GR, Wilding G, Figlin RA, Ginsberg MS, Kim ST, Baum CM, DePrimo SE, et al. Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 24:16-24.

²⁹⁸ Reuter CW, Morgan MA, Grunwald V, Herrmann TR, Burchardt M, Ganser A. Targeting vascular endothelial growth factor (VEGF)-receptor-signaling in renal cell carcinoma. *World J Urol* 2007; 25:59-72.

²⁹⁹ McKiernan JM, Buttyan R, Bander NH, Stifelman MD, Katz AE, Chen MW, Olsson CA, Sawczuk IS. Expression of the tumor-associated gene MN: a potential biomarker for human renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1997; 57:2362-5.

³⁰⁰ Kowalewski DJ, Stevanovic S, Rammensee HG, Stickel JS. Antileukemia T-cell responses in CLL - We don't need no aberration. *Oncoimmunology* 2015; 4:e1011527.

³⁰¹ Malandro N, Budhu S, Kuhn NF, Liu C, Murphy JT, Cortez C, Zhong H, Yang X, Rizzuto G, Altan-Bonnet G, et al. Clonal Abundance of Tumor-Specific CD4(+) T Cells Potentiates Efficacy and Alters Susceptibility to Exhaustion. *Immunity* 2016; 44:179-93.

Anhang

Der folgende Anhang beinhaltet eine Liste aller in dieser Arbeit identifizierter HLA-Liganden in alphabetischer Reihenfolge mit ihrem zugehörigen Quellprotein, der Probe oder den Proben, in welchen es identifiziert wurde, ob der Ligand auch auf PBMCs isoliert wurde und der ermittelten HLA-Annotation.

HLA-Klasse I

<i>Peptidsequenz</i>	<i>PBMC-Peptid</i>	<i>Annotation</i>	<i>Quellprotein</i>	<i>Interne Probennummer (IPN)</i>
APYGRITL	x	B*07	CYFIP1	RCC377M, RCC70N
AAADPKVAF	-	A*03	NUP50	RCC297M2
AAAKPVATK	x	A*03	COL6A3	RCC297M1, RCC297M2
AAAVPRAAF	x	A*03	ERP29	RCC297M2
AAPRPPKPM	-	B*07	RPS26	RCC70M
AAPRTVALTA	-	B*07	HLA-DPB1	RCC377T
AAPRTVALTAL	-	B*07	HLA-DPB1	RCC377T
AAQEAVKLY	x	A*03, A*29	SYNCRIP	RCC297M2
AARAVTGVL	x	B*07	ABCF2	RCC70T
AARPATSTL	x	B*07	EIF4G1	RCC377N, RCC377M, RCC377T
AASKERSGVSL	x	B*07	HIST1H1C	RCC377N, RCC377M, RCC377T
AATPAVRTV	x	A*29	PABPC1	RCC297M2
AAVAIKAMAK	-	A*03	EIF5A	RCC297M2
AAYLRALSL	x	A*02	OGT	RCC329N
AEAKFFTES	x	B*50	SND1	RCC399T
AEALPKQSV	x	B*4403	BTF3	RCC297M2
AEAKLKGKP	x	B*50	TP53BP1	RCC399N, RCC399T
AEFKEAFQL	x	B*4403	MYL6	RCC297M1, RCC297M2
AEFKEAFQLF	x	B*4403	MYL6	RCC297M2
AEFQVKITA	x	B*50	ATF7IP	RCC399T
AEGDLVRL	x	B*4403	NCF4	RCC297M2
AEIKIIREA	x	B*50	SPG20	RCC399T
AEIRHVLVT	x	B*50	MYL6	RCC399T
AEKALGKAA	x	B*50	C20orf43	RCC399T
AELEKHMAA	-	B*50	RRBP1	RCC399N, RCC399T
AENPGKYNI	x	B*4403	HNRNPU	RCC297M2
AENPKLISA	x	B*50	DHX57	RCC399T
AENQTVVKY	x	B*4403	NUP160	RCC297M2
AERDFIHTA	x	B*50	SH3GLB2	RCC399T
AESIVVHTY	x	B*4403	CSE1L	RCC297M2
AESLIAKKI	x	B*4403	CCT2	RCC297M2
AESQILKHL	-	B*4403	NNMT	RCC297M2
AEVDKVTGRF	x	B*4403	RPS21	RCC297M2
AEVFPLKVF	x	B*4403	ZMYM6NB	RCC297M2
AEVKGVSVA	-	B*50	RECQL5	RCC399N

AEYVGH LRA	x	B*50	HDAC6	RCC399T
AFFAERLYY	x	A*29	ANXA7	RCC297M2
AFQERLNSY	x	A*29	NUP155	RCC297M2
AIARNLTQQL	-	B*07	PLIN2	RCC377T
AIDQLHLEY	x	A*01	ACTN4	RCC210A, RCC210N, RCC210T, RCC377M, RCC377T, RCC399T, RCC399N, RCC70N
AIHSQ LLEK	-	A*03	PFDN1	RCC297M2
AINPKLLQL	x	B*08	DDX5	RCC210T
AINSKQLTY	-	A*03	PTP4A3	RCC297M2
AIRNAMGSL	x	B*07	PSMD4	RCC377M
AIRTVTSAL	-	B*07	EHD2	RCC377M, RCC377T, RCC70N
AIVDKVPSV	x	A*02	COPG	RCC329M, RCC329N, RCC399N, RCC399T, RCC70M, RCC70T, RCC70N
ALADGVQKV	x	A*02	APOL1	RCC329M, RCC329N, RCC399M, RCC399N, RCC399T, RCC70M, RCC70N, RCC70T
ALAEIAK AEL	x	A*02	SFPQ	RCC329N
ALANHLIKV	x	A*02	EHD1	RCC399T, RCC70N
ALAPGLPTA	-	A*02	NENF	RCC70N
ALAPGVRAV	x	A*02	RNF114	RCC329N, RCC70N
ALASHLIEA	x	A*02	EHD2	RCC329N, RCC399N, RCC70M, RCC70N
ALASLIRSV	x	A*02	PGCP	RCC329N, RCC399T, RCC70N
ALASVVIHK	-	A*03	FIGNL1	RCC297M2
ALATLIHQV	x	A*02	COPS7A	RCC329N, RCC399T, RCC70M, RCC70N
ALDKATVLL	x	A*02	PDCD4	RCC399T
ALDKDAPLRY	-	A*01	CLSTN3	RCC399T, RCC70T
ALDSQVPKV	x	A*02	FGD3	RCC329N, RCC70N
ALFDGDPHL	-	A*02	PRUNE2	RCC399T
ALFDIESKV	-	A*02	FOLH1	RCC377T, RCC70T
ALFEGKVQL	x	A*02	WDR19	RCC399T, RCC70N
ALFLTLTKK	x	A*03	COX2	RCC297M2, RCC377M, RCC377T
ALFQHITAL	x	A*02	JKAMP	RCC399T
ALGDLVQSV	-	A*02	ZNT4	RCC329T
ALGKIPQTV	-	A*02	UGT1A1	RCC70N
ALGPTGRGV	x	A*02	SPTLC2	RCC399N
ALHNHYTQK	-	A*03	IGHG4	RCC377M, RCC377T
ALIFAVKLAK	-	A*03	PROM1	RCC377N
ALISNSHQL	x	A*02	MAF	RCC329N, RCC399T, RCC70M, RCC70N
ALKNPPINTK	x	A*03	ARPC5	RCC297M1, RCC297M2, RCC377T
ALKTGIVAK	x	A*03	C19orf43	RCC297M2, RCC377N
ALLDKLYAL	x	A*02	IMP3	RCC329M, RCC399T, RCC70M, RCC70N
ALLDSA HLL	x	A*02	AP3D1	RCC399T
ALLDSQFSY	x	A*03	EIF3H	RCC297M2

ALLEVLSQK	x	A*03	FLNA	RCC297M2
ALLGRLAEL	x	A*02	KDM5C	RCC399T
ALLSRLEQI	x	A*02	RALY	RCC399T
ALMPVLNQV	x	A*02	EXOSC6	RCC70N
ALNDHHVYL	-	A*02	ALDOB	RCC329N, RCC70N
ALNELLQHV	x	A*02	TLN1	RCC329M, RCC329N, RCC399T, RCC70N
ALNPLRAVW	-	A*32	SRD5A3	RCC329M, RCC329N
ALPDMVVSH	-	A*03	NDRG1	RCC377M
ALPKGTIVL	-	B*08	PTGR1	RCC210T, RCC399T
ALPPVLTTV	x	A*02	LARP1	RCC329N
ALPSRILLWK	-	A*03	MXRA8	RCC377T
ALQEMVHQV	x	A*02	NEDD9	RCC329N, RCC399N
ALRDVRQQY	-	A*32	VIM	RCC329M, RCC329N, RCC329T
ALSDHHIYL	x	A*02	ALDOA	RCC329N, RCC399N, RCC399T, RCC70M, RCC70N, RCC70T
ALSDSIHTV	-	A*02	PRDM4	RCC329N
ALSNLEVKL	x	A*02	FERMT3	RCC399T
ALSSQIWAA	-	A*02	HAMP	RCC329N
ALSVGIYQV	-	A*02	RBP3	RCC70T
ALVGDRPAV	-	A*02	SEC16A	RCC329N
ALYASRLYL	x	A*02	GMPPA	RCC399T
ALYGVVNVK	x	A*03	FBXO21	RCC297M2
ALYPHVLVK	x	A*03	HNRNPUL1	RCC297M2
ALYSVYRQK	-	A*03	MUL1	RCC297M2
ANVVRNISY	x	A*03	PSMB9	RCC297M2
APAARAPQAL	-	B*07	VEGFA	RCC377T
APAKNIATSL	x	B*07	APBB1	RCC70N
APALRPLVI	x	B*07	CEBPA	RCC377M
APAPIHNQF	-	B*35, B*07	HERPUD1	RCC297M2, RCC70M, RCC70T
APAPRPSLL	x	B*07	DHX38	RCC70M
APAPSTVHF	x	B*35	KLF10	RCC329N, RCC70N
APAPTPTSL	-	B*07	PDZK1	RCC70N
APAQRAQSL	-	B*07	KANK2	RCC377N, RCC377M, RCC377T
APARASVIL	-	B*07	ABCF3	RCC70N
APARGLLLF	x	B*07	SPAST	RCC377M, RCC70N
APARLFALL	x	B*07	SDC4	RCC377M, RCC377T, RCC70N, RCC70T
APATFRQLL	-	B*07	NAT8	RCC377T, RCC70N
APFHQLRISY	-	B*35	SMARCA5	RCC329N
APFLRNVEL	x	B*35, B*07	CNOT1	RCC329M, RCC329N, RCC377M, RCC377T, RCC70T
APFSKVITF	x	B*35	HSPA4L	RCC329N, RCC377M
APFSKVLTF	-	B*35	HSPH1	RCC297M2
APGVGKSAL	-	B*07	RRAD	RCC70M, RCC70T
APGVRAVEL	x	B*07	RNF114	RCC377M, RCC70M, RCC70N, RCC70T
APHRVALTL	-	B*07	POTEE	RCC70N
APKDIASGL	-	B*07	CP	RCC70T, RCC70N

APKPGGLSL	-	B*07	CHST14	RCC70M, RCC70T, RCC70N
APLKLQMEF	-	B*35	POMP	RCC329N
APLLRHLGL	-	B*07	FAM167B	RCC70N
APNLKSQL	x	B*08	TLN1	RCC70N
APNLRGSGV	-	B*07	PPFIBP1	RCC70N
APPPPAHAL	x	B*07	CITED4	RCC70N
APPPRDYTY	x	B*35	RBMX	RCC329N
APRAASIVL	-	B*07	RAPGEF4	RCC70N
APREALAQTVL	x	B*07	CPNE1	RCC70T, RCC70N
APRGLEPIAI	x	B*07	AQP9	RCC377M, RCC377T
APRGPGAEL	x	B*08	SIPA1	RCC399M
APRGTWSTGL	-	B*07	PQBP1	RCC377M
APRHGSLGF	-	B*07	RPL3	RCC70T
APRIITGPAPVL	x	B*07	QKI	RCC377M
APRLETKSL	x	B*07	ALKBH5	RCC70T
APRLPITGL	-	B*07	ZNF526	RCC377M, RCC70N
APRLQSEVAEL	x	B*07	KIAA0174	RCC377M, RCC377T, RCC70N, RCC70T
APRPGLLSL	x	B*07	WIZ	RCC70N
APRPGVLLL	x	B*07	ELN	RCC377T, RCC70N
APRPPPKPM	x	B*07	RPS26	RCC70M, RCC70N
APRPVAVAV	x	B*07	CDKN1C	RCC70N
APRQPGLMA	x	B*07	CHCHD2	RCC377T, RCC70M, RCC70N
APRQPGLMAQM	x	B*07	CHCHD2	RCC377T
APRTFGLTL	-	B*07	EHHADH	RCC377T, RCC70T
APRTL LLLL	-	B*07	HLA-B	RCC377T
APRTLVL LLL	x	B*07	HLA-A	RCC70M, RCC70N
APRTVALTA	x	B*07	HLA-DPB1	RCC377N, RCC377T, RCC70M, RCC70T, RCC70N
APRTVALTAL	x	B*07	HLA-DPB1	RCC377M, RCC377T, RCC70M, RCC70T, RCC70N
APRTVALTALL	x	B*07	HLA-DPB1	RCC377M, RCC377T, RCC70N
APRTLVL LLL	x	B*07	HLA-B	RCC377T, RCC70M, RCC70T
APRTLVL LLLSA	x	B*07	HLA-B	RCC377T
APRPVQAL	x	B*07	ANKRD17	RCC377T, RCC70M, RCC70T, RCC70N
APSGTRVVQVL	-	B*07	PCDHGC3	RCC70T
APSLFHLNNTL	x	B*07	DLC1	RCC70N
APSLHALLL	x	B*07	GIMAP8	RCC70N
APSPRPLSL	x	B*07	C19orf28	RCC377T, RCC70T, RCC70N
APSVVKISY	x	B*35	SMARCA2	RCC329N
APTPPGLRNSL	-	B*07	DOCK6	RCC70N
APVGGHILSY	-	B*35	MYO1C	RCC329N
APVKPGPAL	-	B*07	DKK3	RCC70N
APVLPVGTTEL	-	B*07	WNK1	RCC377M
APWKPTWPA	x	B*07	PRSS23	RCC377T
APYKGEVATL	-	B*07	DPYS	RCC377T
AQH GKVV TW	-	A*32	VWF	RCC329N
AQNAVRLHY	x	A*32	CTNNB1	RCC329M, RCC329N, RCC329T

ASDRNIVLY	-	A*01	DCAF13	RCC210T, RCC70N
ASEFPGAQHY	x	A*01	ADPGK	RCC377T
ASEFQILKY	-	A*01	MIA2	RCC377T
ASYGVSKGK	x	A*03	HNRNPU	RCC377N, RCC377T
ATAHIFATY	-	A*03	AQP9	RCC297M2
ATANQILK	-	A*03	MBNL2	RCC297M1, RCC297M2
ATAPDVRISW	x	A*32	PILRA	RCC329M, RCC329N
ATDFKFAMY	x	A*01	CCND2	RCC377T
ATDKSFVEK	x	A*03	MYH9	RCC377T
ATDNLISDTSY	-	A*01	SACS	RCC70T
ATDSYKVTHY	-	A*01	NAMPT	RCC377T
ATDYHVRVY	-	A*01	FNDC3B	RCC210N, RCC377T, RCC399T, RCC70M, RCC70T
ATEDPWKTNY	-	A*01	ESD	RCC377T, RCC70N
ATEKHLQKY	x	A*01	DCPS	RCC377M, RCC377T, RCC399T
ATEQPLTAK	x	A*03	SIL1	RCC377T
ATEVHPAKY	-	A*01	ALPK2	RCC210T, RCC377T
ATGDMSGLLK	x	A*03	AAMP	RCC377T
ATGSVFTGK	x	A*03	C14orf149	RCC297M2
ATHTAFVAK	x	A*03	TMPO	RCC297M2
ATLPRNFHY	-	A*29	CTNND1	RCC297M2
ATNASVFKY	-	A*29	SRGAP1	RCC297M2
ATNLQRVSY	x	A*32	DDX42	RCC329N
ATNRITVTW	x	A*32	PIAS4	RCC329M, RCC329N
ATNVNNWHW	x	A*32	AHSA1	RCC329N
ATQIKTYSW	x	A*32	RAB3B	RCC329M, RCC329N, RCC329T
ATSKVALVY	-	A*29	ATP5B	RCC297M2
ATTTVMNPK	-	A*03	ITGB2	RCC377M, RCC377T
ATVAVPLVGK	x	A*03	DERL1	RCC377T
ATVTPSPVK	x	A*03	NUCKS1	RCC377N
ATYAPVISA EK	x	A*03	TUBA1C	RCC297M2
ATYHGSFSTK	x	A*03	COL6A3	RCC297M2
AVAAFVLYK	x	A*03	CCDC107	RCC297M2
AVAIKAMAK	x	A*03	EIF5A	RCC377T
AVALPLQTK	x	A*03	PLRG1	RCC297M2
AVDPRFLAY	-	A*01	CHD8	RCC399T
AVFPNEDGSLQK	-	A*03	HEBP1	RCC297M2
AVGPHLTAK	x	A*03	TNFAIP8L1	RCC297M2, RCC377M, RCC377T, RCC377N
AVKARLAAL	x	B*08	SPTAN1	RCC210N
AVKDAVGTLK	x	A*03	KDM3B	RCC297M2
AVKDVAKAL	x	B*08	TLN1	RCC70N
AVKGIGSGK	x	A*03	LG MN	RCC377N
AVKQRGISEL	-	B*08	CDR2	RCC210T
AVLIIAHKL	-	A*02	SEC31B	RCC329N
AVLTKQLLH	x	A*03	CCNI	RCC297M2
AVMGNPVKV	-	A*03	HBB	RCC377T
AVNAHSNILK	x	A*03	IMMT	RCC297M1, RCC297M2, RCC377N, RCC377M, RCC377T

AVQQNPHSW	-	A*32	TTC33	RCC329N
AVRKPASL	x	B*07	FAM40A	RCC70N
AVSAVVHEY	x	A*03	SOAT1	RCC297M2
AVTKYTSAK	x	A*03	H2BFS	RCC297M2, RCC377T
AVTKYTSSK	x	A*03	HIST1H2BL	RCC377M
AVYDRPGASPK	x	A*03	NUP160	RCC297M2
AVYKTHVEK	x	A*03	CASP4	RCC377M
AVYPVRSAY	x	A*32	FAM168B	RCC329N
AVYSHVIQK	-	A*03	SDS	RCC297M2
AVYSHVIQKL	-	A*03	SDS	RCC297M2, RCC377T
AYATHPFKF	-	A*24	NCOA7	RCC210A
AYLHTTTTF	x	A*24	ABCC3	RCC210T
AYLKGTVLF	-	A*24	NR0B1	RCC210A
AYPDKNFTL	-	A*24	WDR63	RCC210A
AYPHNLMTF	x	A*24	TRAM1	RCC210A, RCC210T
AYVHMVTHF	x	A*24	TMBIM6	RCC210A, RCC210N, RCC210T
AYVPGFAHI	-	A*24	CUEDC2	RCC210A
DAAAKALRI	x	B*51	STAU1	RCC210N, RCC210T
DAAEFRVV	-	B*51	MYO1D	RCC210T
DAAEIRLV	x	B*51	NCL	RCC210T
DAANFRTV	-	B*51	MYO1B	RCC210N, RCC210T
DAARFPII	x	B*51	HM13	RCC210A, RCC210N, RCC210T
DAENAMRYI	x	B*51	NCBP2	RCC210A, RCC210T
DAFKSGIVQY	x	B*35	ERAP1	RCC297M2, RCC329M, RCC329N
DAFRVNV	x	B*51	AP2M1	RCC210A, RCC210N, RCC210T
DAGPPTHAF	x	B*35	PEL1	RCC329N
DAHIYLNHI	x	B*51	TYMS	RCC210N, RCC210T
DAHLRPTSL	-	B*08, B*14	TNKS1BP1	RCC210T, RCC210N, RCC329M, RCC329N, RCC329T, RCC399T, RCC70M, RCC70N
DAHMNAKI	-	B*51	PRKAA1	RCC210T
DAHSNLASI	x	B*51	OGT	RCC210T
DAHSTLAKI	-	B*51	TNFRSF4	RCC210T
DAITKASI	x	B*51	USP22	RCC210T
DAILARTV	x	B*51	LAMB2	RCC210A, RCC210N, RCC210T
DAIRLFAAY	x	B*35	PICALM	RCC297M2, RCC329M, RCC329N
DAIRVTKTV	x	B*51	WDR11	RCC210N, RCC210T
DAISKTYSY	x	B*35	RPS2	RCC297M2, RCC329N
DAKLDKAQI	x	B*51	HSPA1A	RCC210T
DAKLDKSQI	x	B*51	HSPA8	RCC210T
DAKQLTTTI	x	B*51	NEDD9	RCC210A, RCC210N, RCC210T
DAKSTIVSI	x	B*51	TMX3	RCC210N, RCC210T
DALDHYKTV	x	B*51	INF2	RCC210T
DALDKIRLI	x	B*51	HSP90B1	RCC210A
DALGKLISI	x	B*51	GCN1L1	RCC210A
DALKEKVI	x	B*51	MAT2A	RCC210T
DALKVTFL	x	B*51	FAM127A	RCC210A, RCC210T

DALLKFSHI	x	B*51	TMBIM6	RCC210A, RCC210T
DALQRSVQL	-	B*14	MVP	RCC329N
DALRQTASV	x	B*51	IMMT	RCC210N
DALRSGLTV	x	B*51	PDCD4	RCC210T
DALRSILTI	x	B*51	MARS	RCC210A
DAMKYTIVV	x	B*51	ATP5A1	RCC210N
DANNAKAVV	-	B*51	CD81	RCC210T
DAPAHHLF	x	B*51	NAT10	RCC210T, RCC399T, RCC70M
DAPDLLKI	-	B*51	SLC34A1	RCC210N
DAPGVPRI	x	B*51	CREB1	RCC210T
DAPHPLSKI	-	B*51	OAZ2	RCC210N
DAPHPLKI	x	B*51	OAZ1	RCC210A, RCC210N, RCC210T
DAPIGPHL	x	B*51	EIF3A	RCC210T
DAPILSKF	-	B*51	CUBN	RCC210N, RCC210T
DAPIVAHL	x	B*51	CPT1A	RCC210A, RCC210N, RCC210T
DAPPSRVSV	-	B*51	SCRIB	RCC210N
DAPTSVKI	x	B*51	EBAG9	RCC210N, RCC210T
DARPSVNAV	x	B*51	MTMR2	RCC210T
DASGRLRVL	-	B*08	FAM84A	RCC399N
DASKVTVF	x	B*35	WDR1	RCC329N
DASLQPRNV	x	B*51	RNF114	RCC210N, RCC210T
DASPPVKI	-	B*51	HSPG2	RCC210T
DASRPELly	-	B*35	MGAT1	RCC329N
DAVKMTII	-	B*51	PKP4	RCC210T
DAVNLEKI	-	B*51	SIK2	RCC210T
DAVNQKI	x	B*51	POLR2B	RCC210N, RCC210T
DAVQFANRV	x	B*51	AGPAT6	RCC210T
DAVVKHVL	x	B*08	COPA	RCC210N, RCC210T, RCC399T, RCC70M, RCC70T, RCC70N
DAWLHHSV	-	B*51	NFE2L3	RCC210T
DAYKQISV	-	B*51	SPAG9	RCC210T
DAYPKNPHL	x	B*51	SNAP29	RCC210T
DAYRALQKL	x	B*51	SCAF4	RCC210N, RCC210T
DAYRPVGL	x	B*51	PER1	RCC210A, RCC210N, RCC210T
DAYTKKELI	x	B*51	TLN1	RCC210T
DAYVILKTV	x	B*51	GSN	RCC210A
DDKKVPGRMY	-	B*4403	SH3BP4	RCC297M2
DEFLRISTA	x	B*14	GNAS	RCC329N
DEFSEAIKAF	x	B*4403	EHD4	RCC297M2
DEIDAIGTKRY	x	B*4403	PSMC1	RCC297M2
DELDSKLNy	x	B*4403	ARHGDIB	RCC297M2
DELEHQRF	-	B*4403	ZMYND11	RCC297M2
DENSVIKSF	x	B*4403	NOL11	RCC297M2
DGFKANLV	-	B*51	SCP2	RCC210T
DGGFVLKV	x	B*51	OBSL1	RCC210T
DGIARVHGL	-	B*14	ATP5A1	RCC329N
DGLKTLNTV	-	B*51	KLHL1	RCC210A, RCC210N, RCC210T
DGSLRVTAL	-	B*14	NBEAL2	RCC329N

DGVAVLKV	x	B*51	HSPD1	RCC210T
DGVKVPGI	-	B*51	AHNAK	RCC210T
DGYLKTSAL	-	B*14	PRKDC	RCC329N
DGYTIVVRI	x	B*51	ABCA1	RCC210A
DGYVVKETI	x	B*51	RPS6KA1	RCC210A
DHSIRALAL	-	B*14	CLASP1	RCC329N
DHYEKPEL	-	B*14	SEC24D	RCC329N
DIAARNVL	x	B*08	PTK2	RCC210T, RCC70N, RCC70T
DIDTHTAKY	-	A*01	CA2	RCC399T
DIHHKVLSL	x	B*08	G3BP2	RCC210N, RCC210T, RCC399N, RCC70T, RCC70N
DIKAANVL	x	B*08	MST4	RCC70N
DILIRTEL	-	B*08	ITPR3	RCC399T
DILLRPEL	x	B*08	CYB5R3	RCC399T
DISVHLVEV	x	A*02	C2orf56	RCC329N
DLDSRVLYY	x	A*01	DNMT1	RCC377T, RCC70M
DLERKVESL	x	B*08	VIM	RCC399T
DLIEKVVI	x	B*08	SEC31A	RCC399T
DLIGKLTSL	x	B*08	CDK5RAP3	RCC399T, RCC70N
DLIIKGISV	x	B*08	TARDBP	RCC399T, RC70N
DLKEHASSL	-	B*08	ERC1	RCC210T
DLKHTGAVL	-	B*08	RPN1	RCC70N
DLLEKSFSL	x	B*08	COBRA1	RCC399T
DLLQKHTL	x	B*08	SPTBN1	RCC210N, RCC210T, RCC399N, RCC399T, RCC70N
DLPEHAVL	-	B*08	HNRNPU	RCC210T, RCC70M, RCC70T
DLRTKGFSL	x	B*08	CAPN1	RCC210T, RCC70T
DLRVTRLL	-	B*08	FAM43A	RCC70N
DMDKVLLKY	-	A*01	MEF2A	RCC70N
DPFAFIHKI	x	B*51	KDM5B	RCC210A
DPFKDILY	x	B*35	BZW1	RCC297M2
DPFSGKTV	-	B*51	DSP	RCC210N
DPGPILRI	x	B*51	TRANK1	RCC210T
DPIGGHIHSY	x	B*35	MYO1G	RCC329N
DPPYSRVI	x	B*51	PJA2	RCC210N, RCC210T
DPQHVVVLY	-	B*35	TENC1	RCC297M2
DPWIGKLLY	x	B*35	SAT1	RCC329N
DPYEVSYRI	x	B*51	BTG1	RCC210A, RCC210N
DPYRALDI	x	B*51	AP3D1	RCC210N, RCC210T
DPYTQRIEV	-	B*51	PAH	RCC210N
DQARHYLL	-	B*14	TTC9C	RCC329N
DQAVRTMEI	-	B*14	BIN2	RCC329N
DQDVRHLAL	-	B*14	DOCK10	RCC329N
DQFERIKTL	-	B*14	PRKACA	RCC329N
DQFQKVLSL	-	B*14	ELP2	RCC329N
DQILKKPL	-	B*08	BTK	RCC70N
DQIVRHDL	-	B*14	UGGT2	RCC329N
DQQVRYNAL	-	B*14	ATP6V1H	RCC329N
DQTIRIHGL	-	B*14	SMU1	RCC329M, RCC329N

DQTSHLAL	-	B*14	ITGB8	RCC329N
DQVSRLVTI	-	B*14	UGDH	RCC329N
DQVTHIRI	-	B*14	PTPN6	RCC329N
DQVYRGAL	-	B*14	MX1	RCC329N
DQYKFLAV	-	B*51	NDUFA4L2	RCC210T
DRAHIAQL	-	B*14	CLTC	RCC329M, RCC329N
DRFANQIL	-	B*14	PAH	RCC329N
DRFLRQLDF	-	B*14	COPA	RCC329N
DRFNHFSL	-	B*14	GPI	RCC329N
DRFQPNMTL	-	B*14	PSMB10	RCC329N
DRGYSSLL	-	B*14	DDX5	RCC329N
DRHIWITAA	x	B*14	PRPF6	RCC329N
DRILRPEL	-	B*14	SNX14	RCC329N
DRLAQILEL	-	B*14	EFR3A	RCC329M, RCC329N
DRLDLARKEL	-	B*14	COPE	RCC329N
DRLQWVTI	-	B*14	SNX17	RCC329M, RCC329N
DRLSASSL	-	B*14	HNRNPU	RCC329N
DRLVASTL	-	B*14	SIGLEC1	RCC329M, RCC329N
DRMVGQVL	x	B*14	EIF2S3	RCC329M, RCC329N
DRRIHLEEI	-	B*14	CCDC77	RCC329N
DRSVPVRL	-	B*14	SPCS3	RCC329N
DRTAQLTSL	-	B*14	SBF2	RCC329N
DRTLIIYITL	x	B*14	ARPC3	RCC329M, RCC329N
DRTSMSVTL	-	B*14	INPP4B	RCC329N
DRTTISRAL	x	B*14	GOLGA2	RCC329N
DRVAHILL	-	B*14	VPS16	RCC329N
DRVAHMEF	-	B*14	SPTBN1	RCC329M, RCC329N
DRVAIHEAM	-	B*14	MCM5	RCC329N
DRVLRAML	-	B*14	CCND1	RCC329M, RCC329N
DRVVATSL	-	B*14	SIGLEC1	RCC329N
DRYDGMVGF	x	B*14	CREG1	RCC329N
DRYEFSSHI	-	B*14	IKZF3	RCC329N
DRYGGQPLF	-	B*14	HNRNPUL2	RCC329N
DRYLLGTSL	-	B*14	ASS1	RCC329N
DRYQYPFVL	-	B*14	SGPP2	RCC329N
DSYPRNPTV	x	B*51	SOAT1	RCC210A, RCC210T
DTAVRHVL	x	B*08	RPS3	RCC399T
DTDHYFLRY	x	A*01	PIGT	RCC210A, RCC377T, RCC399T, RCC70M, RCC70T, RCC70N
DTVKALRV	x	B*51	CD14	RCC210T
DVIIKGNGL	-	B*08	LAMA1	RCC399T
DVKIFVNTI	x	B*51	PKHD1L1	RCC210A
DVQLRLNSI	-	B*14	PPP2R1A	RCC329N
DVTLHQAL	-	B*14	RANGRF	RCC329N
DYMKTTSNF	x	A*24	NEMF	RCC210N, RCC210T
EAAKGTLTY	-	B*35	SGK1	RCC297M2, RCC329M
EAAPHDIGY	-	B*35	NAGK	RCC329N
EAAQKNMAL	x	B*08	MYH9	RCC210N, RCC210T, RCC70M

EAFKAIGTAY	-	B*35	DNAJB12	RCC329N
EAFVRHIL	x	B*08	MYL6	RCC210A, RCC210T, RCC399N, RCC399T, RCC70N
EAIRISPTF	x	B*35	OGT	RCC329N
EAKTAFLL	-	B*51	HMOX1	RCC210T
EALARNLL	-	B*08	NFE2L1	RCC399T
EALVRTVL	x	B*08	CTNNB1	RCC399N
EAQPIVTKY	x	B*35	HNRNPUL2	RCC329M, RCC329N
EAVIKHSL	x	B*08	KIAA0020	RCC210T
EAVKQYSSY	x	B*35	PFKFB3	RCC297M2, RCC329N
EAVKVLSI	-	B*51	SHANK3	RCC210T
EAYLGKKV	x	B*51	HSPA5	RCC210A, RCC210T
EAYLGKTV	x	B*51	HSPA8	RCC210A, RCC210N, RCC210T
EAYNAVVRV	-	B*35	FMNL3	RCC297M2
EAYPDHTQF	x	B*35	THYN1	RCC329N
EEADKLVQRV	x	B*4403	HNRNPUL1	RCC297M2
EEAEIIRKY	x	B*4403	PARP1	RCC297M2
EEAHLNTSF	x	B*4403	MOBKL1A	RCC297M2
EEAQPIVTKY	x	B*4403	HNRNPUL2	RCC297M2
EEFELLGKAY	x	B*4403	EIF3C	RCC297M2
EEFGQAQFSF	x	B*4403	HLA-DPA1	RCC297M2
EEFLRQEHF	-	B*4403	OASL	RCC297M2
EEHLESHKKY	-	B*4403	AKAP2	RCC297M2
EEIAFLKKL	x	B*4403	VIM	RCC297M2
EEIHKFSGTY	-	B*4403	DHRS3	RCC297M2
EEIKEILRF	-	B*4403	SLC3A1	RCC297M1, RCC297M2
EEILKVEQKY	x	B*4403	SET	RCC297M2
EEIREAFRVF	x	B*4403	CALM1	RCC297M2
EEKTISAKY	x	B*4403	MYH9	RCC297M2
EELEQKYTY	x	B*4403	STAT1	RCC297M2
EELNDLIQRF	x	B*4403	PCM1	RCC297M2
EELPHIHAF	x	B*4403	BOLA2	RCC297M2
EELQQKVSY	x	B*4403	STAT3	RCC297M2
EELSPTAKF	-	B*4403	KLF6	RCC297M2
EENRQKLSL	x	B*4403	MYH9	RCC297M2
EEPTVIKKY	x	B*4403	SNX5	RCC297M2
EERTFHIFY	-	B*4403	MYH9	RCC297M2
EESAIRVGF	x	B*4403	SEC24C	RCC297M2
EESLNIVKY	x	B*4403	CCZ1	RCC297M2
EETPVVLQL	-	B*4403	ATP6AP2	RCC297M2
EEVHDLERKY	x	B*4403	NAP1L1	RCC297M2
EEVLIPDQKY	x	B*4403	FBXL3	RCC297M2
EGLIKHIL	-	B*08	OCRL	RCC70N
EIDKNDHLY	-	A*01	MAGED2	RCC210T, RCC377T
EIKEKTVL	-	B*08	PBX1	RCC399N, RCC70N
ELERLTSLY	-	A*01	DNAJB14	RCC399T
ELIGKHAI	-	B*08	CTNND1	RCC210T
ELKIAYQL	-	B*08	COPB2	RCC399T

ELLIRKLPF	x	B*08	HIST1H3A	RCC399T
ELNPKILAL	x	B*08	HIF1A	RCC399T, RCC70N
ELQRKRL	-	B*08	ADPGK	RCC210N
ELRRQVDQL	-	B*08	VIM	RCC210T, RCC399T
EMATRAAL	x	B*08	RHOA	RCC210N, RCC210T, RCC399N
EPFHLIVSY	-	B*35	FCRLA	RCC329N
EPNAVGI	-	B*07	SORT1	RCC70N
EPPPVKQV	-	B*51	PRPF31	RCC210T
EPRHGGLTL	-	B*07	WDR18	RCC377T, RCC70N
EPRLGALAL	-	B*07	CDH16	RCC70N
EPRYPHSL	-	B*07	NCOR2	RCC70N
EPYLSSREI	x	B*51	SPTBN1	RCC210A
EPYTKQQL	-	B*08	STAT3	RCC210T, RCC399T
ERAIGLKL	x	B*14	EDF1	RCC329N
ERAIHQAL	-	B*14	CYP1B1	RCC329M, RCC329N
ERAYPLTL	-	B*14	SLC34A1	RCC329N
ERFGIVQRL	-	B*14	DFNA5	RCC329N
ERIMKAQAL	x	B*08, B*14	HSP90AA1	RCC329N, RCC70N
ERLAIRAQL	-	B*14	NDUFB4	RCC329N
ERLIHPQL	-	B*14	HPS1	RCC329N
ERVVHYEI	-	B*14	NDUFB8	RCC329M, RCC329N, RCC329T
ESDGKSRWFY	-	A*01	C6orf211	RCC70N
ESDINSVRY	x	A*01	GNB5	RCC210T, RCC399T, RCC399N
ESTLHLVL	-	B*08, B*14	UBA52	RCC210T, RCC329M, RCC399T
ETDLLDIRSEY	-	A*01	ANXA11	RCC377M, RCCT, RCC70M
ETDSFKLAY	x	A*01	SYNRG	RCC377T, RCC399T
ETEGPHVLLY	-	A*01	C4B	RCC210T, RCC377M, RCC377T, RCC399M
ETEKMIEKY	x	A*01	SPTBN1	RCC210N, RCC210T, RCC377N, RCC399T, RCC70M, RCC70N
ETELDGLRY	-	A*01	HAAO	RCC210T, RCC377T, RCC399T
ETERIVTTY	-	A*01	DNM2	RCC377T
ETHLKQQL	-	B*08	TXLNA	RCC210N, RCC399N, RCC399T
EVHSRFQSL	x	B*08	SERPINB1	RCC210T, RCC399T, RCC70N, RCC70T
EVIPTPAM	-	A*32	HMOX1	RCC329M, RCC329N
EVLNKHSL	-	B*08	HNRNPM	RCC210T, RCC210N, RCC399T, RCC70M, RCC70N
EVNKFQMAY	x	A*32	SRP14	RCC329M, RCC329N
EVSIVQTY	x	B*35	ACTN1	RCC297M2, RCC329N
EYAGSHQY	x	A*03	ACBD3	RCC297M2
EYMKHTRLF	x	A*24	FLII	RCC210A
EYQKVGQSF	x	A*24	SNX18	RCC210N, RCC210T
FAKRQQQL	-	B*08	MYH9	RCC210T
FATPFLVVR	x	A*03	COX7C	RCC297M1, RCC297M2
FAVDLEHHSY	x	B*35	EXOSC10	RCC329N
FAYDGKDIAL	x	B*35	HLA-C	RCC329M
FEAPIKLVF	x	B*4403	HM13	RCC297M2
FEFDTK TSA	x	B*50	UCHL5	RCC399N, RCC399T

FEIPTGREA	x	B*50	ABI3	RCC399T
FFGETSHNY	x	A*29	MATR3	RCC297M2
FFPDKPITQY	x	A*29	DDOST	RCC297M2
FFPSIYDVKY	-	A*29	CNOT8	RCC297M1, RCC297M2
FGLARAFSL	x	B*08	CDK9	RCC70N
FGLARAKSV	-	B*08	CDK14	RCC210T, RCC70M
FIDASRLVY	x	A*01, A*03, B*35	CTNNA1	RCC210A, RCC297M1, RCC297M2, RCC329N, RCC377T, RCC399T, RCC70M, RCC70N, RCC70T
FIDLVIQAV	-	A*02	AIG1	RCC399M
FLDASGAKLDY	x	A*01	BZW1	RCC70N
FLDESRSTQY	-	A*01	RUVBL2	RCC377T
FLDESVVKV	-	A*02	FMO1	RCC399T, RCC70N
FLDKGEFYI	-	A*02	CP	RCC399T
FLDPDRHFL	-	A*02	FAM83H	RCC399T
FLDPRPLTV	x	A*02	CYP1B1	RCC329M, RCC329N, RCC399T, RCC70M, RCC70N, RCC70T
FLDQNLQKY	-	A*01	DSP	RCC70N
FLEQVHQLY	x	A*01	STAT1	RCC377M
FLFEPVVKKA	x	A*02	SMEK1	RCC70N
FLFNKVVNL	x	A*02	YPEL5	RCC329M, RCC329N, RCC70N
FLIETGPRGV	x	A*02	TNS1	RCC399T
FLIRESETL	x	A*02	LYN	RCC329N, RCC399T
FLLEGIRSL	x	A*02	NCKAP1L	RCC329N
FLLGKEVSL	x	A*02	TBC1D9B	RCC399T
FLLGPRVLVA	-	A*02	TMED10	RCC329N, RCC70N
FLLHIQQQV	x	A*02	SEC24A	RCC399T
FLNDSYLKY	x	B*35	STAG1	RCC297M2
FLNNQEYVL	-	A*02	SPTBN1	RCC70N
FLQEHNNTL	x	A*02	CCDC88C	RCC329N
FLQPELVKL	x	A*02	PSME4	RCC399T
FLSHNFLT	-	A*02	TNS3	RCC399T
FLTDTSHLL	x	A*02	SYNE2	RCC399T, RCC70N
FNSHVHVEY	x	B*35	ASAP2	RCC297M2
FPANNIVKF	x	B*35	SSR1	RCC297M2, RCC329N
FPANVMDVI	-	B*51	DDX5	RCC210A
FPASFPNRQY	-	B*35	HM13	RCC329N
FPDKPITQY	x	B*35	DDOST	RCC329M, RCC329N, RCC329T
FPDKVAIQL	x	B*35	PYGM	RCC297M2
FPEGSRPVL	-	B*07	UGT3A1	RCC70N
FPEHIFPAL	x	B*35	ACTR2	RCC297M2, RCC329M, RCC329N
FPFEKGSVQY	x	B*35	DEK	RCC329N
FPMTHGNTGF	x	B*35	PCBP2	RCC329M, RCC329N
FPNIPGKSL	x	B*07	DEGS1	RCC377M, RCC70N
FPNIVIKGSEL	x	B*35	PRPF8	RCC297M2
FPNLARVL	-	B*08	IER2	RCC70N
FPNRVVFQEF	x	B*35	MYH9	RCC329M

FPSIYDVKY	x	B*35	CNOT8	RCC297M2, RCC329M, RCC329N
FPVEIKSFY	x	B*35	NARS	RCC297M2
FPVGDVNNF	x	B*35	DYNC1I2	RCC297M2
FRFPAAVVV	-	B*14	MGAT1	RCC329N
FRMPELVDF	-	C	ACSL1	RCC399T
FRVHIRSEL	x	B*14	DIAPH1	RCC329N
FRVLHTAL	-	B*14	UBL7	RCC329N
FSDKLHISKY	-	A*01	RSBN1L	RCC70N
FTDKELLY	x	A*01	ABCB1	RCC70N
FTDPRTMGY	x	A*01	PMM2	RCC399T
FTDQQKLIY	-	A*01	MYO1B	RCC70N
FTDVNSILRY	x	A*01	EPRS	RCC377T, RCC70M, RCC70T, RCC70N
FTKVKPLL	x	B*08	MYH9	RCC210T, RCC399T, RCC70T, RCC70N
FVIKKHEL	-	B*08	GTF2I	RCC70N
FVYEPKEQK	-	A*03	IF16	RCC297M2
FYDDKVSAL	x	C	TNS3	RCC329N
FYNESIAFFY	-	A*29	LPAR1	RCC297M2
FYPELKLAY	x	A*29	DDX19A	RCC297M2
FYPPDPAQL	-	C	EPB41	RCC297M2
FYSEVHPHY	x	A*29	ADPGK	RCC297M2
FYSKLGQLY	x	A*29	SETDB1	RCC297M2
GAAGVHFIY	x	B*35	HNRNPF	RCC329N
GASLGARFY	-	B*35	NDUFA4L2	RCC297M2
GEASRLAHY	x	B*4403	HIST1H2BM	RCC297M2
GEFQSFSSA	x	B*50	C7	RCC399N
GEIASFDKA	x	B*50	TMSB10	RCC399N, RCC399T
GEIESKFNQA	x	B*50	POLR2A	RCC399N
GEIPKVLVA	x	B*50	AP2A2	RCC399N
GENHLVQLIY	-	B*4403	VWA5A	RCC297M2
GENSAVLHY	x	B*4403	PEPD	RCC297M2
GESSFTYRAY	x	B*4403	SCAF11	RCC297M2
GESVLKLTf	x	B*4403	HBP1	RCC297M2
GETSYIRVY	x	B*4403	SRSF9	RCC297M2
GEYEWVHKP	-	B*50	RPF1	RCC399T
GIFGGHIRSV	x	A*02	USP10	RCC329N, RCC70N
GLADKVYFL	x	A*02	CAD	RCC399T, RCC70N
GLAPKPVQV	x	A*02	NBEAL2	RCC329N
GLASFKSFL	-	A*02	RGS5	RCC399T
GLASFKSFLK	-	A*03	RGS5	RCC377T
GLDDIKDLKV	-	A*02	MOV10	RCC70N
GLDFGIVRV	-	A*02	HYDIN	RCC329T, RCC70T
GLDVDGIYRV	x	A*02	ARHGAP9	RCC329N
GLGPPGRSV	x	A*02	SPTY2D1	RCC329N, RCC399T, RCC70M
GLIDHQTYL	x	A*02	PLEC	RCC399T, RCC70N
GLIDKVNEL	x	A*02	SRP54	RCC399T
GLIDRQVTV	x	A*02	MACF1	RCC70M, RCC70T

GLLEKIATPK	x	A*03	GSTK1	RCC297M2
GLNDETYGY	-	A*29	ATP1B1	RCC297M2
GLNDFIQKI	x	A*02	SGK1	RCC399T
GLSTEGIYRV	-	A*02	ARHGAP35	RCC70N
GLWGHALLL	x	A*02	SEC16A	RCC70N
GPAKWQNVSL	-	B*07	KIAA1462	RCC70N
GPALGRSFL	-	B*07	CD70	RCC70M
GPDSSRLTSRL	-	B*07	SLC3A1	RCC377T, RCC70N, RCC70T
GPGLSRTGVEL	x	B*07	FLNA	RCC377M
GPLFRNSQL	-	B*07	PTOV1	RCC377T
GPLPRTVEL	-	B*07	GSTK1	RCC70N
GPRAVFNLL	-	B*07	TFE3	RCC377M, RCC377T
GPREAFRQL	x	B*07	SCAND1	RCC70M
GPREAVSGL	x	B*07	TMEM39B	RCC70N
GPRLPWTRL	-	B*07	TMEM214	RCC70N
GPRSSLRVL	x	B*07	SF3B3	RCC377T
GPRTAALGLL	-	B*07	RCN2	RCC377M, RCC70N
GPRTPTQPLL	x	B*07	TNS1	RCC70N
GPSREFFLL	-	B*07	HECW1	RCC70M
GQYGNPLNK	x	A*03	ADAM10	RCC297M2
GRFGGVITI	x	C	AQP9	RCC399T
GRHIVAVL	-	B*14	NAGK	RCC329T
GSAKPGLQK	-	A*03	CA2	RCC377N
GSDPREELLY	-	A*01	CDH5	RCC377T
GSFHIRASY	-	B*35	VPS16	RCC329M, RCC329N
GSKSTQTVAK	-	A*03	MAP4	RCC377M
GSYNKVFLAK	-	A*03	PSMD8	RCC297M2, RCC377T
GSYSSHISSK	x	A*03	ZEB1	RCC377N
GTAAKSITK	x	A*03	GIMAP4	RCC377M
GTDELRLLY	x	A*01	LAS1L	RCC210A, RCC377T, RCC399T
GTDGHVHLY	-	A*01	WDR34	RCC210A, RCC210T, RCC399N
GTDGQGGTFRY	-	A*01	DNAJB4	RCC210N, RCC210T
GTFGGLGSK	x	A*03	AHNAK	RCC297M1, RCC297M2
GTGASGSFK	x	A*03	HIST1H1A	RCC297M2, RCC377M
GTIAKSGTK	x	A*03	HSP90AA1	RCC377M
GTMTGMLYK	x	A*03	TIMM23	RCC297M2, RCC377M, RCC377T
GTNKVASQK	-	A*03	CNN3	RCC297M2, RCC377M, RCC377N, RCC377T
GTQPGPLLKK	-	A*03	ITIH5	RCC297M2
GTYDQKVQGGK	-	A*03	TPPP	RCC377T
GTYGVRAAW	x	A*32	ICAM2	RCC329M, RCC329N
GTYRDANIK	x	A*03	QKI	RCC297M2, RCC377T
GVADKILKK	x	A*03	NMI	RCC297M2
GVAPFTIAR	x	A*03	COL6A3	RCC297M2
GVHGGILNK	x	A*03	PFN3	RCC297M1, RCC297M2, RCC377N, RCC377M, RCC377T
GVMDRGYSY	x	A*03	PSMB5	RCC297M2
GVYGDVQRVK	-	A*03	PTBP1	RCC377T

GVYSFQFNK	-	A*03	RBMS2	RCC377T
GYIERPQLI	x	A*24	PAPD4	RCC210A
HAAGFAYTY	-	B*35	FAM111A	RCC329N
HAAVPTPGY	x	B*35	GBP4	RCC329N
HADVSNQLY	-	A*01	ATP6V1B2	RCC399T
HASDRIAL	x	B*35	TKT	RCC297M1, RCC297M2, RCC329N
HAVVNLINY	-	B*35	CTNNB1	RCC329N
HEAAPGKASY	-	B*4403	SLAMF8	RCC297M2
HEAEVLKQL	x	B*4403	STMN1	RCC297M2
HEYPWILSA	x	B*50	COPA	RCC399T
HFDDFVTNL	x	C	SOAT1	RCC297M2, RCC329N
HFDMAVYL	-	C	LAMB1	RCC329N
HGYENPTYK	x	A*03	APLP2	RCC297M2
HGYVKQSL	-	B*08	LANCL1	RCC210T, RCC210N, RCC210T, RCC399N, RCC399T
HIHSLIGK	x	A*03	H2AFV	RCC297M1, RCC377M
HIENIVAV	x	A*02	RSL1D1	RCC329N, RCC399T, RCC70N
HIKVTQEQY	x	B*35	CBL	RCC297M2
HILGAAYKY	x	A*29	SMARCC1	RCC297M2
HIYDTKLGTDK	-	A*03	CNN2	RCC377T
HLANIVERV	x	A*02	TRIM22	RCC329N, RCC399T, RCC70N
HLDEAQRLLY	-	A*29	ZNF547	RCC297M2
HLDFISIMTY	-	A*01	CHI3L1	RCC377T
HLDLILYY	-	A*01	DPAGT1	RCC399T, RCC70N
HLDTLTHEY	x	A*01	FAM32A	RCC377T, RCC399T, RCC70M
HLGYLPNQL	-	A*02	DDX1	RCC70N
HLKALTSEL	x	B*08	MSN	RCC70N
HLPAGGAVK	-	A*03	MAP4	RCC377T
HLSIINEYL	x	A*02	IQGAP1	RCC399T
HLTDITLKV	x	A*02	KARS	RCC399T
HMTPGMKIY	-	B*35	EPHB2	RCC297M2
HPIALREY	x	B*35	TROVE2	RCC297M2
HPDAPMSQVY	x	B*35	MORF4L1	RCC297M2, RCC329M, RCC329N
HPDEKSIITY	x	B*35	SPTBN1	RCC329N
HPDSHQLFI	x	B*51	G3BP1	RCC210A, RCC210N, RCC210T
HPFLYDRETY	-	B*35	SMCHD1	RCC297M2, RCC329N
HPHQNLIATY	-	B*35	SMU1	RCC329N
HPIRIADGY	-	B*35	CCT5	RCC329N
HPKLFQVVF	-	B*35	GPR84	RCC329N
HPLPETAVRGY	x	B*35	XAB2	RCC297M2, RCC329N
HPLYPFNDPY	-	B*35	AKR1A1	RCC329N
HPNLVVGTTY	x	B*35	DYNC111	RCC329N
HPNYPYSDEY	-	B*35	AKR1C3	RCC297M2, RCC329M
HPPSHWPLI	x	B*51	CTNNB1	RCC210A, RCC210T
HPRDPNLLL	x	B*07	EED	RCC70N
HPRIITEGF	-	B*35	CCT6A	RCC297M2
HPTAFVVSY	x	B*35	TAP1	RCC297M2
HPTDPLTSF	x	B*35	THEMIS2	RCC297M2

HPTVVISAY	-	B*35	CCT3	RCC297M2
HPVPQPLQSF	-	B*35	MAFB	RCC297M2, RCC329M, RCC329N
HPWFGMEQEY	-	B*35	GLUL	RCC329M
HPYQDPDKM	x	B*35	CBX4	RCC329N
HQVDYILETW	-	A*32	SEC14L1	RCC329M, RCC329N
HRFPFSSAL	x	B*14	ATP13A2	RCC329N
HRYEFLETL	x	B*14	NUAK2	RCC329N
HSAGHAVNVY	-	B*35	DUOX2	RCC297M2
HSDPSILGY	-	A*01	GIGYF1	RCC70N
HSDTIQWLY	-	A*01	FHOD1	RCC70N
HSEAHTLLY	x	A*01	HDAC4	RCC399T
HSERHVLLY	x	A*01	HDAC7	RCC210T, RCC399N
HSEYHTLLY	x	A*01	HDAC5	RCC377T, RCC399T, RCC399N, RCC70M
HSMDMKFTY	-	A*32	EPAS1	RCC329N
HSNTQTLGK	-	A*03	LARP1	RCC377M
HTAKISDFSW	x	A*32	RBBP4	RCC329N
HTDDPLTWDY	x	A*01	UTP6	RCC377T
HTDILKEKY	x	A*01	DTWD1	RCC70N
HTDVGLELY	x	A*01	NCOR2	RCC377T, RCC377N, RCC70T
HTETKTITY	x	A*01	EPB41	RCC210N, RCC210T, RCC377M, RCC377N, RCC377T, RCC399T, RCC399M, RCC399N
HTQGPVDSGLY	-	A*01	TNS3	RCC210T, RCC399T
HVHSEFESF	-	A*32	SPI1	RCC329N
HVIDVKFLY	x	B*35	DDB1	RCC329N
HVKVLNTSL	x	B*08	IFI16	RCC70N
HVYVGNISK	-	A*03	KIAA0947	RCC297M2
HYPLNTVTF	-	A*24	TNS1	RCC210T
IADMGLKLY	x	A*01	PCNA	RCC210T, RCC377M, RCC377T, RCC399T, RCC70M, RCC70N
IAFSARTI	-	B*51	C1QB	RCC210A
IANHQVLII	-	B*51	DHX16	RCC210T
IANQVQLFY	x	B*35	ATPAF1	RCC297M2
IARAAEHLRY	-	A*29	MAGEF1	RCC297M2
IARNLTQQL	x	B*07, B*08, B*35	PLIN2	RCC210N, RCC329T, RCC377M, RCC377T, RCC399M, RCC70M, RCC70T, RCC70N
IDRLFDTSA	x	B*50	EXOC7	RCC399N, RCC399T
IEFPYKNLP	-	B*50	ITGAV	RCC399T
IFDQSGTYL	x	C	PRPF19	RCC329N
IGLIRNLAL	x	B*08	JUP	RCC70N
IIDGFMTHY	x	A*01	TM6SF1	RCC399T
IIMPHNIYL	x	A*02	SLC11A1	RCC329N, RCC70M
IINSSITTK	x	A*03	CCT3	RCC377T
ILADVQQL	-	A*02	AOX1	RCC70N
ILDEHVQRV	x	A*02	AXIN1	RCC399T
ILDPHVLL	x	A*02, A*29	NUP88	RCC297M2, RCC399T
ILDPRPTII	x	B*08	GPHN	RCC210T

ILDQKINEV	x	A*02	ODC1	RCC329N, RCC399T, RCC70N
ILDTGTIQL	-	A*02	NAT8	RCC329N, RCC399N, RCC70N
ILFGHENRV	x	A*02	GNB5	RCC70N, RCC70T
ILHDDEVTV	x	A*02	RPLP1	RCC329N
ILKEMTHSW	-	A*32	AFF4	RCC329N
ILLSHLHYL	-	A*02	ERG	RCC70N
ILMEHIIKL	x	A*02	RPL19	RCC329N, RCC399N, RCC70N
ILMGVLKEV	x	A*02	DHX15	RCC399T, RCC70N
ILQEREYRL	x	A*02	SMARCA4	RCC329N
ILQNKIDLV	x	A*02	EIF2S3	RCC399T
ILTDITKGV	x	A*02	EEF2	RCC329N, RCC399N, RCC70N, RCC399T
ILTERGYSF	x	A*29	ACTA1	RCC297M2
ILVKHLTNV	x	A*02	ARHGAP10	RCC399T
ILYGEVEKL	x	A*02	MAT2B	RCC399T
ILYGKIIHL	x	A*02	CHTF8	RCC70N
IMKFINDQY	x	B*35	SEPT9	RCC297M2
IMLEALERV	x	A*02	SNRPG	RCC70M
IPAKLHNSL	x	B*07	HDLBP	RCC70N
IPARFAGVL	x	B*07	VWF	RCC377T
IPARIVTNY	x	B*35	F13A1	RCC329N
IPDGGVHII	x	B*51	RBM12B	RCC210T
IPDKFVVGY	x	B*35	HPRT1	RCC297M2, RCC329N
IPGMVGPIL	-	B*35	DOCK2	RCC329M
IPIGIDKAL	x	B*35	FKBP5	RCC329N
IPMGKSMLV	-	B*51	IGF2	RCC210N
IPNEIIHAL	x	B*35	HNRNPM	RCC297M2, RCC329M, RCC329N, RCC399T, RCC70N
IPNERTMQL	-	B*07	VPS52	RCC70N
IPPDQQRLLI	x	B*51	UBC	RCC210T
IPPHRLSKI	-	B*51	BRPF1	RCC210T
IPPIQVTKV	x	B*51	NCOR2	RCC210N, RCC210T
IPPLATHTI	x	B*51	CD46	RCC210T
IPPLIKSV	-	B*51	DSCAM	RCC210N, RCC210T
IPPLPSKL	-	B*51	DPPA4	RCC210A
IPQGGRGAIQF	x	B*07	SEC23A	RCC377M, RCC377T, RCC70N
IPRAALLPL	-	B*07	HTRA1	RCC70N
IPRAALLPLL	-	B*07	HTRA1	RCC377M, RCC70M, RCC70T, RCC70N
IPSNRIAITL	-	B*07	SDK1	RCC70M
IPTRVVTNY	-	B*35	TGM2	RCC297M2
IPTSARSML	x	B*07	GATAD2B	RCC70N
IPYALRVEL	-	B*07	FGG	RCC70M
IPYHIVNIV	x	B*51	SARS	RCC210A
IPYHSEVPVSL	x	B*07	SPTBN1	RCC377T, RCC70N
IPYPRPIHL	-	B*07	LYRM1	RCC377M, RCC70M
IQNDRQLQY	x	B*35	TFIP11	RCC297M2
IQVTKVTQV	x	B*14	ARCN1	RCC329N
IRAAWTRAL	-	B*14	NID1	RCC329M, RCC329N

IRNIGKTL	-	B*14	RPS3A	RCC329N
IRPGTAFEL	x	C	PLEC	RCC70N
IRVGHAVL	-	B*14	TRAPPC4	RCC329N
ISDLIRDSY	-	A*01	TBC1D8	RCC210A, RCC399T
ISESHPLY	x	A*01	VSIG2	RCC377M, RCC377T, RCC70T, RCC70N
ISNPTRHVV	x	B*35	TLE1	RCC329N
ITAPPSRVL	-	B*07	SCD	RCC377T
ITDHGSLIY	x	A*01	TRIM21	RCC70N
ITDKNSLAY	x	A*01	CWC22	RCC210A, RCC201N, RCC210T, RCC377T, RCC399N, RCC70N
ITDPHSPSRFR	x	A*03	ECE1	RCC377T
ITDSAGHILY	x	A*01	TMED10	RCC210N, RCC210T, RCC377M, RCC377T, RCC399T, RCC399N, RCC70M, RCC70T, RCC70N
ITQGTPLKY	x	A*01	NCOR2	RCC210N, RCC210T, RCC399T, RCC70N
IVAGSLITK	x	A*03	PRPF40A	RCC297M2
IVAKHTSAL	x	A*03	TLN1	RCC377N, RCC377T
IVDGNHRLTL	-	A*02	SPTBN1	RCC70N
IVSSLRLAY	x	A*03	ARFGAP3	RCC297M2
IVYKPVDSLK	-	A*03	MAPT	RCC377T
IYADLSLKY	x	A*29	TMX2	RCC297M2
IYDLATQTL	x	C	AAMP	RCC329N
IYIAGHPAF	x	A*24	HNRNPL	RCC210T
IYIKHPHLF	x	A*24	DNTTIP1	RCC210A
IYTSSVNRL	x	A*24	COPB2	RCC210A, RCC210N, RCC210T
KAFNLRISF	x	B*35	UBE2L6	RCC329N
KAFQATQQK	x	A*03	SETD7	RCC297M2, RCC377M, RCC377N, RCC377T
KAGEVFIHK	x	A*03	NONO	RCC297M2
KAIEKNVL	x	B*08	PRKAR1A	RCC210T, RCC399N
KASGTLREY	x	B*35	RPL18A	RCC297M2
KAYHEQLSV	x	B*51	TUBB1	RCC210T
KAYHEQLTV	-	B*51	TUBA1C	RCC210T
KEAPPEKPK	x	B*50	RPS15	RCC399N, RCC399T
KEFPGFLEN	x	B*50	S100A10	RCC399N, RCC399T
KELEKTYSA	x	B*50	LMNA	RCC399N, RCC399T
KELESIKETY	-	B*4403	FMNL3	RCC297M2
KELFGHSA	-	B*50	WDR72	RCC399N
KEMPTVAQA	-	B*50	RASL12	RCC399T
KENAFSLGA	x	B*50	SUPT6H	RCC399T
KESTLHLVL	x	B*4403	UBA52	RCC297M2
KETADFKVY	x	B*4403	FLNA	RCC297M2
KEVEQFTQV	x	B*50	NDUFB10	RCC399N, RCC399T
KFIDTTSKF	x	A*24	RPL3	RCC210N, RCC210T
KGSSAVRVY	x	A*03	IRF1	RCC297M1, RCC297M2
KIADFGLAR	x	A*03	FGFR3	RCC377T
KIADRFLLY	x	A*03	LMO4	RCC377M, RCC377T
KIAPNTPQL	-	A*02	NOMO1	RCC399T

KIAQKALDL	-	A*02	HMOX1	RCC399T
KIFEGMPVTF	-	A*32	PALLD	RCC329M, RCC329N
KIFEMGPVFTL	x	A*32	COX2	RCC329M, RCC329N
KIFYDRAEY	x	A*32	MOV10	RCC329N
KIFYKTVSF	-	A*32	TTI1	RCC329N
KIGDFGLTK	x	A*03	JAK1	RCC297M2
KIGSIIFQV	x	A*02	PARP14	RCC399T
KIIAFVLEBK	x	A*03	TGOLN2	RCC377T
KIISTLPSW	-	A*32	DAPK1	RCC329N
KIKSFEVVF	x	A*32	TXNIP	RCC329N
KILDIGLAY	x	A*03	VPS41	RCC297M2
KILDYEVTL	x	A*02	IL6ST	RCC399T
KILEDVVG	x	A*02	TPX2	RCC399T
KILPTLEAV	x	A*02	ILF2	RCC399T, RCC70N
KIRDVLQK	-	A*03	IMPACT	RCC297M2
KISGKDFSW	-	A*32	EIF3B	RCC329N
KITDVIIF	x	A*32	MYH9	RCC329M
KIYEGQVEV	x	A*02	RPL5	RCC399N
KIYNSRVQR	x	A*03	IER5	RCC377M
KLAQIRHIY	x	A*32	PBX2	RCC329N
KLAVERYEW	x	A*32	KDM6A	RCC329N
KLAVIKNAW	x	A*32	PANK4	RCC329N
KLDPTKTTL	x	A*02	NDRG1	RCC329M, RCC399T, RCC70M, RCC70N, RCC70T
KLDQVIIHV	x	A*02	NPL	RCC329N, RCC399T
KLEEQARAK	x	A*03	CTTN	RCC377M, RCC377N, RCC377T
KLFAGLVHV	x	A*02	CRYL1	RCC399T
KLFDAPLSI	x	A*02	WASH1	RCC399T
KLFDHAVSKF	x	A*03	ACSL4	RCC297M2, RCC377T
KLFDIRPIW	x	A*32	GTF3C5	RCC329N
KLFDKLEAY	x	A*03	API5	RCC297M2
KLFDRPQEL	x	A*02	DENND4C	RCC329N
KLFGAAEVQRF	x	A*32	SPTAN1	RCC329N
KLFGMIITI	x	A*02	SEC61A1	RCC399T
KLFGPFTRNYY	-	A*32	CYBA	RCC329N
KLFIGGLSF	x	A*32	HNRNPA1	RCC329M, RCC329N
KLFPYALAF	x	A*32	NAA15	RCC329N
KLFQGQLVL	x	A*32	USP1	RCC329N, RCC399T
KLFVGGLSF	x	A*32	CIRBP	RCC329M, RCC329N
KLGEFAKVLEL	-	A*02	PPP2R1A	RCC329N
KLGEIVTTI	x	A*02	ARF1	RCC329M, RCC329N
KLGSVPVTV	x	A*02	FAM115A	RCC329N, RCC399N, RCC399T, RCC70M, RCC70N
KLHDETLTY	-	A*03	TFCP2	RCC297M2
KLHDINAQL	x	A*02	AP1B1	RCC329N, RCC399T
KLHELNQKW	-	A*32	SPTAN1	RCC329N
KLHGVNINV	x	A*02	RBM4	RCC329N, RCC399T, RCC70M, RCC70T, RCC70N
KLHQRVEQL	-	B*08	CEBPD	RCC210N, RCC210T

KLIDDVHRL	x	A*02	SRPR	RCC70T
KLIDRTESL	x	A*02	LSP1	RCC399T
KLIGQVHEV	x	A*02	FRY	RCC70N
KLIPQLPTL	x	A*02	RRAGC	RCC399T
KLKEAETRAEF	-	A*32	TPM1	RCC329N
KLLDEVTYL	-	A*02	CYP2J2	RCC399T
KLLEGEESRISL	-	A*02	VIM	RCC329M
KLLEPVLLL	x	A*02	RPS16	RCC70M, RCC70N
KLLEQRAQY	x	A*32	CTR9	RCC329N
KLLNYAPLEK	x	A*03	POLR2L	RCC377M
KLMDHIYAV	x	A*02	COG5	RCC329N
KLMDQLEAL	x	A*02	VTA1	RCC399T
KLNEMSYEL	-	A*02	PDE4DIP	RCC329N
KLNLQTFQW	x	A*32	KLHDC10	RCC329N
KLNNRQLNY	-	A*03	TWF1	RCC297M2
KLPNFGFVVF	-	A*32	G3BP2	RCC329N
KLPNSVLGK	-	A*03	EHD4	RCC297M2
KLPNSVLGR	-	A*03	EHD2	RCC297M2
KLQELNYNL	x	A*02	STAT1	RCC329N, RC399T
KLREPNTLTK	x	A*03	TMEM131	RCC297M2
KLSDLQTQL	x	A*02	POLR2C	RCC399T, RCC70T
KLSEIDVAL	-	A*02	EFHD1	RCC399N, RCC399T
KLSELEAAL	-	A*02	KRT8	RCC399T
KLSLVAAML	-	A*02	HSPA5	RCC399T
KLSQIRQIY	x	A*32	PBX1	RCC329N
KLSQKGYSW	x	A*32	BCL2L1	RCC329N
KLSSLIILM	-	A*02	SERPINH1	RCC329M, RCC399T
KLSTFRESF	x	A*32	SP100	RCC329N
KLTENLVAL	-	A*02	CDK17	RCC399T
KLTFEVVNL	-	A*02	ITPR1	RCC329M
KLVELPYTV	x	A*02	OSGEP	RCC399T
KLWGQSIQL	x	A*02	SWT1	RCC399T
KLYEFVHSF	-	A*32	DNAJC22	RCC329N
KLYPWIHQF	x	A*32	C9orf41	RCC329N
KMFIGGLSW	x	A*32	HNRNP	RCC329M
KMMDVTVTI	x	A*02	NOMO1	RCC399T
KMWEEAISL	x	A*02	DOCK2	RCC399T
KMYDAAKLLY	-	A*03	CLTC	RCC377M
KPAEYGYVSL	-	B*07	CEBPB	RCC377M, RCC377T
KPAGPPGIL	x	B*07	MYH9	RCC377T, RCC70M, RCC70T, RCC70N
KPAGPPGILAL	x	B*07	MYH9	RCC377T, RCC70T
KPANVFITA	-	B*07	NEK6	RCC377T
KPASFMSTI	-	B*07	ACLY	RCC377M
KPEEQRQAL	x	B*07	PLEC	RCC377M, RCC377T
KPFDPARTPLVL	-	B*07	BCAR1	RCC377M
KPFDQTTISL	-	B*07	CNN3	RCC377M, RCC377T, RCC70N
KPGLFSLTL	-	B*07	ASA1	RCC70N

KPHSGFHVAF	x	B*07	EFHA1	RCC377M, RCC70T
KPITGGVITY	-	B*35	FHL2	RCC297M2, RCC329N
KPKEADESL	x	B*07	TLN1	RCC377M, RCC377T
KPLGPTAAF	-	B*07	PIP5K1C	RCC377M, RCC70N
KPMEKISL	-	B*08	ZNF326	RCC70N
KPNANRIAL	x	B*07	LGALS3	RCC377T
KPNSNQVNL	x	B*07	GCLM	RCC377T, RCC70M
KPRDVSSVEL	x	B*07	SPTBN1	RCC377T, RCC70N
KPRSPVVEL	x	B*07	ADRBK1	RCC70N
KPSGVSAAL	-	B*07	RRP7A	RCC70N
KPTLPLRL	-	B*07	CMIP	RCC377T
KPVDPIVGY	-	B*35	COL12A1	RCC297M2, RCC329N
KPVIPAAVL	-	B*07	ETS2	RCC377M, RCC70N
KPVKPHSSF	x	B*07	PRRC2C	RCC377M
KPVYPGQTL	x	B*07	HSD17B4	RCC377T, RCC70N
KQMEQVAQF	-	A*32	TAGLN	RCC329M, RCC329N
KQSPSAGVHTF	-	A*32	WDTC1	RCC329N
KQTDVGITHF	-	A*32	PRPF8	RCC329N
KQVDSIVWTF	-	A*32	SLAMF7	RCC329N
KQYQIKGLEW	-	A*32	SMARCA4	RCC329N
KRGDVIIYL	x	C	SKAP2	RCC399T, RCC70T
KRQEAI FEL	x	C	ARHGEF3	RCC70N, RCC70T
KSDLFFHDY	-	A*01	RFC1	RCC377T
KSDSGKPYYY	x	A*01	PRPF40A	RCC377T
KSDVHLNFY	-	A*01	HLTF	RCC210A, RCC377T, RCC70M, RCC70T
KSDVNKEYY	x	A*01	RBM22	RCC377M
KSEMNVMKY	-	A*01	MET	RCC70T
KSFEAPIKLVF	-	A*32	HM13	RCC329N
KSFEGNVFMY	-	A*32	TMEM30A	RCC329N
KSFGSAQFAW	x	A*32	COPB2	RCC329N
KS LERATQL	-	B*08	COMMD3	RCC210T
KSL LW TETF	x	A*32	ITGAV	RCC329M, RCC329N
KSTDVAKTF	x	B*35	LCP1	RCC297M2
KSVYWENTL	x	A*32	NUP107	RCC329N
KTDASFHAY	-	A*01	SLC12A1	RCC210N, RCC399N
KTDGSGFIGY	-	A*01	AKT3	RCC210A, RCC399T, RCC70N
KTDHFIFTY	-	A*01	LRRC42	RCC377T
KTDLDLQQY	x	A*01	LRRC8C	RCC210A, RCC377T, RCC399T
KTDLHNEGY	-	A*01	RFTN1	RCC399N
KTDSTGTHSLY	x	A*01	SIPA1L1	RCC210N, RCC377N, RCC377T
KTEVNSGFFY	x	A*01	CCT6A	RCC377T
KTFEGNLTK	x	A*03	PRPF8	RCC297M2
KTFSEHLTSY	x	A*32	KLRAQ1	RCC329N
KTFSGQTHGF	-	A*32	CMBL	RCC329N
KTFTGHREW	x	A*32	PAFAH1B1	RCC329N
KTIDASVSKK	x	A*03	ATF7IP	RCC377M
KTIGLREVV	x	A*32	MSN	RCC329N

KTKQDEVNAAW	-	A*32	SPTAN1	RCC329N
KT LAVVHSF	-	A*32	WDR72	RCC329N
KTL DHVLTH	x	A*03	TBCD	RCC297M2
KTLGTDGLFLF	x	A*32	SEPN1	RCC329M, RCC329N
KTRDDWLVSWS	-	A*32	PRKDC	RCC329N
KTTDRYIQQK	x	A*03	MTA2	RCC377M
KTWTALRHQY	-	A*32	BCAR3	RCC329N
KTYETTLEK	-	A*03	ALB	RCC377T
KTYGEIFEK	x	A*03	NDUFC2	RCC297M1, RCC297M2, RCC377T
KTYSL LHQW	-	A*32	PIK3C2A	RCC329N
KVADMALHY	x	A*03	CCT8	RCC297M2
KVAGAAPK	x	A*03	HIST1H1D	RCC297M2, RCC377M, RCC377T
KVANIILSY	x	A*03	SPG11	RCC297M2, RCC377M, RCC377T
KVAVATPAK	x	A*03	NCL	RCC377T
KVDHHTDKY	x	A*01	F13A1	RCC377M
KVFAGYYTK	-	A*03	PLOD2	RCC297M2
KVFESWMHHW	x	A*32	CD74	RCC329N
KVFEYHNVL	x	A*32	APPBP2	RCC329N
KVFFRAGVL	x	A*03	MYH9	RCC377T
KVFLGRDTY	x	A*32	ASNS	RCC329N
KVFQEPLFY	-	A*03	CTSL1	RCC297M2
KVHAYIISY	-	A*32	EHD4	RCC329N
KVIDEIYRV	x	A*02	FBXO28	RCC399T, RC70N, RCC70T
KVLERVNAV	x	A*02	PSME2	RCC329N, RCC399T, RCC70M, RCC70T
KVLGDVIEV	-	A*02	CRYAB	RCC399T
KVLGIVGV	x	A*02	CNOT1	RCC399T
KVMNWKETL	x	A*32	STK38	RCC329N
KVNA MFTF	x	A*32	NOMO1	RCC329N
KVNIVPIAK	x	A*03	SEPT2	RCC297M2
KVSDYILQH	-	A*03	ASTN2	RCC297M2
KVTEGSFVYK	x	A*03	GDI2	RCC297M2, RCC377T
KVYENYPTY	x	A*03	DEK	RCC297M2, RCC377T
KVYGPVAK	x	A*03	FLNA	RCC297M1, RCC297M2
KVYNIQIRY	x	A*03	LCP2	RCC377T
KYEELFPAF	x	A*24	NAPA	RCC210A
KYFDEHYEY	x	C	CKS2	RCC210A, RCC297M1, RCC297M2, RCC329M, RCC329N, RCC329T, RCC70M, RCC70N, RCC70T
KYIH SANVL	x	A*24	MAPK1	RCC210A, RCC210N, RCC210T
KYKDAANLL	-	A*24	KLC1	RCC210T
KYPDRVPVI	x	A*24	GABARAP	RCC210A, RCC210T
KYPSDLPYM	-	A*24	ERG	RCC210A, RCC210N, RCC210T
KYPSPFVVF	x	A*24	DHX9	RCC210A
KYQEV TNNL	x	A*24	CAPRIN1	RCC210A
LAKLRQEL	-	B*08	RRBP1	RCC70N

LAPLAKVI	x	B*51	GAPDH	RCC210T
LAPVVKKEI	x	B*51	IQGAP1	RCC210T
LEAAKSIAA	x	B*50	TLN1	RCC399N
LFDHAVSKF	x	C	ACSL4	RCC297M2, RCC329N
LLAERDLYL	-	A*02	TGM2	RCC399T
LLAPRPVAV	x	A*02	CDKN1C	RCC329N, RCC70N
LLDEHHISY	x	A*01	SPECC1L	RCC210A, RCC70M, RCC70N
LLDIRSEY	x	A*01	ANXA11	RCC210N, RCC210T, RCC377M, RCC399T, RCC70N
LLDPSQKNLY	x	A*01	ZNF124	RCC70N
LLDPSVFHV	-	A*02	NOC4L	RCC70N
LLDQGQLNKY	x	A*01	CLTC	RCC377M, RCC70M, RCC70T, RCC70N
LLDRFLATV	x	A*02	CCNI	RCC70N
LLDRVFTTY	-	A*01	MIOX	RCC70N
LLDVPTAAV	-	A*02	IFI30	RCC329N
LLFDRPMHV	x	A*02	HNRNPM	RCC329N
LLGPPVGV	x	A*02	CIZ1	RCC70N
LLGPRLVLA	x	A*02	TMED10	RCC329M, RCC329N, RCC399T, RCC70N
LLGPRVIGK	-	A*03	ODF3B	RCC297M2
LLHDRSFSY	x	A*29	TUBGCP2	RCC297M2
LLHETDSAV	-	A*02	FOLH1	RCC70M
LLIENVASL	x	A*02	GPX1	RCC329M, RCC70N
LLSPILARY	-	B*35	VCPIP1	RCC297M2
LLYDAEIHIL	-	A*02	ITGA2	RCC399T
LLYESPERY	x	A*01	TAP1	RCC377M, RCC377T
LMISRTPEV	x	A*02	IGHG1	RCC329M
LMQTEVHHV	-	A*02	ARHGEF18	RCC329N
LPAATRATL	-	B*07	TMEM213	RCC377N, RCC70N
LPAATRATLIL	-	B*07	TMEM213	RCC70N
LPAKILVEF	x	B*35	ZWINT	RCC329N
LPALRSIGL	x	B*07	RXRA	RCC377T, RCC70N
LPAREATQF	-	B*35	GAS6	RCC329N
LPAWPHRGL	-	B*07	NSUN5	RCC377M
LPDATSSHRTV	x	B*51	HCFC1	RCC210T
LPDTLKVTY	x	B*35	ITGB2	RCC297M2, RCC329N
LFPDKETGF	-	B*35	SLIRP	RCC297M2
LFPGKVTNI	x	B*35	PTBP2	RCC297M2
LPGPKEGDL	-	B*51	DACH1	RCC210T
LPHAPGVQM	x	B*07	HDAC1	RCC70N
LPHHRVIEV	x	B*51	NOMO1	RCC210T
LPHLADLVSY	x	B*35	VDR	RCC297M2
LPHNRLVSL	-	B*35	LRRRC58	RCC329N
LPHPGQLQV	x	B*51	ATL3	RCC210T
LPIGDVATQY	x	B*35	CCT7	RCC297M2
LPKEHAASL	-	B*07	COMMD4	RCC70M, RCC70N, RCC70T
LPKQPPLAL	x	B*07	RANBP9	RCC70N
LPKTTALEL	x	B*08	SON	RCC399T

LPLEEHYRF	x	B*35	EHD1	RCC329M, RCC329N
LPLVKPYL	-	B*08	CLTC	RCC399T
LPNAVITRI	x	B*51	POLE3	RCC210A, RCC210T
LPNGRSVSL	-	B*07	RASAL2	RCC70M
LPPGTKVTI	-	B*51	ZNF280D	RCC210N
LPPPAAKTV	x	B*51	RNF181	RCC210T
LPPPPQQKI	x	B*51	CRNKL1	RCC210N
LPQGIVREL	x	B*07	SUPT4H1	RCC377M, RCC377T, RCC70N
LPQHQPAY	x	B*35	JUND	RCC329N
LPRAGGAFL	-	B*07	LAMB3	RCC377M
LPRAVGTQTL	x	B*07	SNX1	RCC377M, RCC70N
LPRAVNTQAL	x	B*07	SNX2	RCC377M, RCC70T
LPRGFGSLPAL	x	B*07	RSU1	RCC377M
LPRGGLTSI	x	B*51	DENND3	RCC210T
LPRGGSGSVL	x	B*07	UBAP1	RCC377T, RCC70T, RCC70N
LPRGMQPTF	-	B*07	PSMB8	RCC377M
LPRGSIPRSL	-	B*07	MCM6	RCC70N
LPRGSSPSVL	-	B*07	TGIF2	RCC70M, RCC70N
LPRLTPPVL	x	B*07	CCT8	RCC377M
LPRPHASIMF	x	B*07	DHX9	RCC70N
LPRPQGIV	x	B*51	PROSER2	RCC210T
LPRPTQASF	-	B*07	DAB2	RCC70N
LPRQPPMSL	x	B*07	FLII	RCC377M
LPRQSQITV	-	B*51	FILIP1L	RCC210N, RCC210T
LPSAYQPGIL	-	B*51	CD248	RCC210T
LPSKPSSTL	x	B*07	PACSIN2	RCC70N
LPSPVTAQKY	x	B*35	EEF2	RCC297M2, RCC329M, RCC329N
LPSSGRSSL	x	B*07	BAG3	RCC70T, RCC70N
LPVRLANI	x	B*51	PDK1	RCC210A
LPWANKVTI	x	B*51	PKHD1L1	RCC210A
LPWPARPAL	x	B*07	HPS6	RCC70N
LPYKGGNTL	-	B*51	COL12A1	RCC210N, RCC210T, RCC377T
LPYNHQHEY	-	B*35	FADS2	RCC297M2
LPYRATENDIY	-	B*35	CUX1	RCC329N
LQTRQEL	-	B*14	PRPF19	RCC329N
LQYSRQEGL	-	B*14	KIAA1967	RCC329N
LRFDGALNV	-	B*14	TUBA8	RCC329N
LRFPGQLNA	x	B*14	TUBB1	RCC329N
LRFQSSAVM	x	B*14	HIST1H3A	RCC329N
LRLLIHQSL	-	B*14	HNRNPK	RCC329N
LSDKNIEQY	x	A*01	FYTTD1	RCC210A, RC210N, RCC210T, RCC399T, RCC399N
LSDLGKLSY	x	A*01	MYST1	RCC399T, RCC70N
LSDSGVTQRY	x	A*01	OSGEP	RCC210T, RCC399T
LSERYAELY	-	A*01	IER5L	RCC210T, RCC377M, RCC399T, RCC70N
LTDITKGVQY	x	A*01	EEF2	RCC377M, RCC377T, RCC399T, RCC70N

LTDPEAAKY	x	A*01	GBA	RCC70M
LTDRGVMSY	x	A*01	IRF3	RCC210T, RCC377M, RCC399T, RCC70M, RCC70N
LTDRLASLY	x	A*01	FAM160B1	RCC399T
LTDSSLKY	-	A*01	TRIOBP	RCC210T, RCC70N
LTEKANHY	-	A*01	CPSF3L	RCC210T, RCC70 M, RCC70N
LTEQQKALY	-	A*01	POGK	RCC210T
LTEQRALLY	-	A*01	TECPR2	RCC210T
LTEVNKTGTQY	x	A*01	SERPINB6	RCC70N
LTRPGSSSL	x	B*07	PLEKHA2	RCC377T
LVILGHYFK	-	A*03	SLC16A10	RCC377N
LVMAPRTVL	x	B*07	HLA-B	RCC377M, RCC377T, RCC70N
LVRPPGTMA	-	B*07	CDHR5	RCC377T
LYANMFERL	-	A*24	FKBP4	RCC210A
LYDPVISKL	x	C	MCRS1	RCC297M2, RCC329N
LYKLVNFFL	-	A*24	CCDC164	RCC210N
LYRATMIL	x	B*08	COX7A2	RCC70N
MAPARLFAL	x	B*08	SDC4	RCC399T
MAPRALLL	x	B*51	HLA-C	RCC210A, RC210N, RCC210T
MAPRLLLL	x	B*51	HLA-F	RCC210T
MAPRTLIL	x	B*51	HLA-C	RCC210A, RCC210T
MAPRVIVI	x	B*51	TMEM204	RCC210T
MAQKRIHAL	-	B*08	RGS5	RCC210T
MIEPRTLQY	x	A*01	RPS16	RCC70N
MLDGILSKY	x	A*01	MET	RCC210A
MMSEAPGPINF	x	A*01	MYL9	RCC70N
MPADTNKAF	x	B*35	TMEM111	RCC329N
MPFRGDTV	x	B*51	TBCD	RCC210N
MPFSPYEPLNF	-	B*35	CLU	RCC329M
MPGFKGLIL	-	B*07	NRXN3	RCC70T
MPILISKI	x	B*51	SNTA1	RCC210A
MPKFSPMPGF	x	B*35	AHNAK	RCC297M2, RCC329M, RCC329N
MPKVHIEF	x	B*08	HDLBP	RCC70N
MPNVKVAVF	x	B*08	DDX39B	RCC399T
MPRGVVVTL	x	B*07	HECTD1	RCC377M, RCC399T, RCC70N
MPSASMTRL	-	B*07	NDRG1	RCC377T
MPSHPDRAY	-	B*35	TNFSF13	RCC329N
MPVGPDAILRY	x	B*35	BAG6	RCC297M2, RCC329M, RCC329N
MPVLKVVL	x	B*08	SEC31A	RCC70N
MPYKGMTTV	-	B*51	DPYSL3	RCC210T
MQRARPTL	-	B*08	IGFBP3	RCC210T
MRFDGRLGF	-	B*14	NUDT16	RCC329M
MRLGGRLVL	-	B*14	CECR1	RCC329N
MRLGLHQVL	x	B*14	DIAPH1	RCC329N
MRMATPLLM	-	B*14	CD74	RCC329M, RCC329N
MSEAPGPINF	-	A*01	MYL9	RCC70N
MTERQALSY	x	A*01	SIK3	RCC399T
MTNIICLLY	-	A*01	GALNTL4	RCC399T

MTNPHNHLY	-	A*29	TTC35	RCC297M2
MVTEIRLKY	-	A*29	SF3B3	RCC297M2
NAAERRGPL	x	B*07	HLA-DRA	RCC377M, RCC377T
NAAKIFNLY	-	B*35	DPYS	RCC297M2, RCC329N
NAFEVAEKY	x	B*35	ACTN4	RCC297M2, RCC329N
NATDLLKVL	-	B*35	SHANK3	RCC297M2
NAYKTPLL	-	B*51	DHX37	RCC210N
NEASVLHNL	x	B*4403	MYH9	RCC297M2
NELNIIHKF	-	B*4403	PRPF31	RCC297M2
NEPYIFKVF	x	B*4403	PIK3AP1	RCC297M2
NEVSKIVQTY	x	B*4403	ACTN1	RCC297M2
NEVTTEIRF	-	B*4403	COL6A3	RCC297M2
NFTEVHPDY	-	A*29	CAT	RCC297M2
NIIELVHQV	x	A*02	SYK	RCC329M, RCC329N
NKTIHAEL	-	B*14	FKBP8	RCC329N
NLAEDIMRL	x	A*02	VIM	RCC329M
NLAEKLIGV	x	A*02	RALGAPB	RCC70N
NLAENISRV	x	A*02	PYGM	RCC70M, RCC70T, RCC70N
NLASKIEEA	-	A*02	CCNL1	RCC329T
NLDKNTVGY	-	A*01	DNAJC11	RCC210T, RCC399T, RCC70N
NLGVTEDKV	-	A*02	RHOXF1	RCC399M
NLKEKVAQL	-	B*08	FGG	RCC210T
NLKVKVLF	x	B*08	STAT1	RCC70N
NLLPKLHIV	x	A*02	CLIC1	RCC329N, RCC399T, RCC70N
NLLPYSRLY	x	B*35	VPS13C	RCC297M2
NLMEQPIKV	-	A*02	JUP	RCC70N
NLSPSASQY	-	B*35	GUCA1A	RCC297M1
NMYGKVVTV	x	A*02	SUPT5H	RCC329N
NPASKVIAL	x	B*07	CLTC	RCC377M, RCC70N, RCC70T
NPHEVQPSY	-	B*35	EGLN3	RCC297M1, RCC329M
NPHNDIQAF	-	B*35	CHD5	RCC297M2
NPIDHVSFY	x	B*35	SAMHD1	RCC329N
NPISGLLEY	-	B*35	ADAR	RCC329N
NPKAFFSVL	-	B*07	IDO1	RCC377M
NPKESSSSL	x	B*07	GTF3C1	RCC377M
NPMKAGTQL	-	B*07	ITGAV	RCC377T
NPQERTLTL	x	B*35	HSP90AB1	RCC329N, RCC399T, RCC70N
NPRDLFGSL	-	B*07	CIDEB	RCC377T, RCC70N
NPRSVTLI	x	B*07	CCT6A	RCC377M, RCC377T
NPRTQTHATL	-	B*07	DPYD	RCC377M, RCC377T
NPVGGALLEY	-	B*35	ADAR	RCC297M2
NPWDNKAVY	x	B*35	SYVN1	RCC329M
NPYRDLQIY	-	B*35	MYO1C	RCC329M
NQFPGFKEV	x	A*02	SNRPA	RCC329N, RCC399T, RCC70N
NQHVKASAL	x	B*08	PPP2R1A	RCC399T
NQQSRDLSSL	-	B*14	UBR5	RCC329N
NQVIHRDI	-	B*14	PAK1	RCC329N
NQYLRVSL	-	B*14	CCPG1	RCC329N

NRFAGFGIGL	x	B*14	SLC25A46	RCC329M, RCC329N
NRFIRDDQL	-	B*14	C10orf11	RCC329N
NRFPAVNSL	x	B*14	GOSR1	RCC329N
NRFQIATV	x	B*14	PSMB4	RCC329N
NRFSDHVAL	x	B*14	DHX9	RCC329M, RCC329N
NRFTVAEL	-	B*14	SF3B2	RCC329N
NRFYHEEL	-	B*14	C9orf78	RCC329N
NRGDFFML	-	B*14	VPS16	RCC329N
NRLAMATAL	-	B*14	LRRC32	RCC329N
NRLTFASTL	x	B*14	POLR2B	RCC329N
NRVLHQEL	-	B*14	AMOTL1	RCC329N
NRVPLKHEL	x	B*14	PTPRC	RCC329N
NRVQSLVL	-	B*14	ITGAM	RCC329N
NRYDGIYKV	-	B*14	UHRF1	RCC329N
NRYDQGVAV	-	B*14	UBA1	RCC329N
NRYPVQVVV	-	B*14	RPN2	RCC329N
NRYPVQVVV	-	B*14	RPN2	RCC329N
NRYIPTAAA	-	B*14	SEC61A1	RCC329N
NSEILPTLKY	-	A*01	GPX3	RCC70N
NSELLNDRY	-	A*01	MYH14	RCC399N
NTDPWAGYRY	x	A*01	METAP1	RCC70N
NTDRNIDKY	x	A*01	C3orf63	RCC377T
NTDSPLRY	x	A*01	RPSA	RCC210A, RCC210N, RCC210T, RCC377T, RCC399T, RCC399N, RCC70M, RCC70N, RCC70T
NTERTVWQY	-	A*01	PTPN11	RCC70N
NVADLHEKY	x	B*35	PSMB5	RCC297M2, RCC329M, RCC329N
NVADVVIKF	x	B*35	RPN2	RCC297M2, RCC329M, RCC329N
NVDPVQHTY	-	A*01	AGRN	RCC210N, RCC210T, RCC399T, RCC399N, RCC70M
NVGGLIGTPK	-	A*03	EYA2	RCC297M2
NVHDIMVSF	x	B*35	SHQ1	RCC329N
NVIRDAVTY	x	A*03, B*35	HIST1H4A	RCC297M2, RCC329M, RCC329N
NVKEKIYAV	-	B*08	SPATS2L	RCC399T, RCC70M
NVRIATTAL	x	A*02, B*07	LAPTM5	RCC377M, RCC70M, RCC70T, RCC70N
NVTQVRAFY	-	B*35	CAT	RCC297M2
NYARGHYTI	x	A*24	TUBA1A	RCC210T
NYLALSGVL	-	A*24	AMACR	RCC210N
PSDSHRLSY	-	A*01	NPY1R	RCC210N, RCC377N, RCC399T, RCC399N
PTDPKVVVY	x	A*01	AIM1	RCC210N, RCC210T, RCC377T, RCC399T, RCC70M, RCC70N
PTDTNVIRY	-	A*01	TTC9	RCC210T
PVSSTRLSK	-	A*03	MYST3	RCC297M1, RCC297M2
QALQKQAL	-	B*08	G0S2	RCC399T
QAPPPPQVQ	x	B*51	FOXJ3	RCC210T
QARIEIESF	x	B*35	HSPA5	RCC329M, RCC329N
QASDVSVKY	x	B*35	TPR	RCC297M2, RCC329N, RCC329T

QEAGIKTAF	-	B*4403	PAICS	RCC297M2
QEDRPGLHAY	x	B*4403	LSP1	RCC297M2
QEHIDLGIKY	-	B*4403	RPL11	RCC297M2
QEIEEIRQKY	-	B*4403	STK4	RCC297M2
QEISHLIEP	x	B*50	TLN1	RCC399N
QEKDKLLAA	-	B*50	KTN1	RCC399N
QELNDRFANY	x	B*4403	DES	RCC297M2
QELQEINRVY	-	B*4403	ANXA2	RCC297M2
QETHLKQQL	-	B*4403	TXLNA	RCC297M2
QETREILHF	-	B*4403	PTPN1	RCC297M2
QETSFTKEAY	x	B*4403	TPT1	RCC297M2
QEVIKAYGF	-	B*4403	C12orf57	RCC297M2
QEVNELLQKF	-	B*4403	RAI14	RCC297M2
QFHEKTSAL	-	B*08	SYNE2	RCC210N, RCC399T
QIASFILLR	x	A*03	GIMAP4	RCC377T
QIFVKTLTGK	x	A*03	UBB	RCC377M, RCC377T
QIYNPPSGK	-	A*03	API5	RCC377T
QLDDLKVEL	x	A*02	RPL35	RCC329N
QLDSHVHAV	-	A*02	SNAPIN	RCC399T
QLDSPGSLK	-	A*03	ITPRIP	RCC297M2
QLDTHMELY	-	A*01	MACF1	RCC399T
QLEDGRTLSDY	x	A*01	UBA52	RCC377T, RCC70M
QLIDKVVQL	x	A*02	SEC14L1	RCC329M, RCC329N, RCC399T, RCC70M, RCC70N, RCC70T
QLREKAGQL	-	B*08	LZTS2	RCC210T
QLTNVILHL	-	A*02	SMCR7L	RCC399T
QLVDIIEKV	x	A*02	PSME3	RCC329M, RCC329N, RCC399T, RCC70M
QLYKEQLAK	x	A*03	MYH9	RCC297M2
QLYWSHPRK	x	A*03	RPS29	RCC297M2, RCC377T
QNWYKAEL	-	B*08	GRB2	RCC399T
QPAGHRPAL	-	B*07	PCSK7	RCC377M
QPDQTRIVAL	x	B*07	FBL	RCC377T, RCC70M, RCC70N
QPHSPTSSL	-	B*07	AMOT	RCC377T
QPINLIFRY	x	B*35	SNRPE	RCC297M2, RCC329M, RCC329N
QPLLREVL	-	B*08	PSMB4	RCC399T, RCC70N
QPNPLPLRL	-	B*07	PCM1	RCC377T
QPNTTGKQL	x	B*07	MSN	RCC377T
QPQHAFNAL	-	B*07	CITED2	RCC70T
QPQHPLHVTY	-	B*35	PEBP1	RCC297M2, RCC329M, RCC329N
QPREPQVYTL	-	B*07	IGHG1	RCC377T, RCC70T
QPRNLLLAL	-	B*07	DCTPP1	RCC377T
QPRTPILLI	-	B*07	LOX	RCC377M, RCC377T
QPRTPLVL	-	B*08	CDH13	RCC70M
QPRVTGVVL	-	B*07	SOD3	RCC377M
QPRYPVNSV	-	B*07	TCP1	RCC70M
QPSPARAPAE	-	B*07	PMAIP1	RCC70M

QPTVRITEL	-	B*07	POLR2C	RCC377M, RCC377T, RCC70N
QPVPRSVL	-	B*08	IFI35	RCC70N
QPYTKEVL	-	B*08	STAT2	RCC399T
QQIEKDIL	-	B*08	APC	RCC70T
QQVARAVL	-	B*14	HSPG2	RCC329N
QRLPRPSSL	-	B*14	FERMT3	RCC329N
QRVADRLGL	-	B*14	PRPS2	RCC329N
QSDKVYEVY	-	A*01	DPY19L4	RCC210N, RCC399N
QSEIASMLY	-	A*01	KANK2	RCC377T
QSFDKWEVAK	-	A*03	COX411	RCC377T
QSRIRIDSL	-	B*08	LMNA	RCC210T
QTALPGNDRY	-	A*01	USP25	RCC210T
QTDHLFFKY	-	A*01	ADAM10	RCC399T
QTEKQSTGVY	-	A*01	LMOD1	RCC377N, RCC399N
QTESQQIRY	-	A*01	ATP13A3	RCC210N
QTETKTITY	-	A*01	EPB41L2	RCC210A, RCC210N, RCC210T, RCC377T, RCC399T, RCC399M, RCC399N, RCC70M, RCC70T, RCC70N
QTKTRHLAL	-	B*08	SMC1A	RCC210T
QTYVGITEK	x	A*03	SNRNP200	RCC297M1
QVDPLSALKY	x	A*01	MKLN1	RCC70N
QVFKLGLAK	-	A*03	RPS9	RCC297M2
QYAGKYVLF	-	A*24	GPX3	RCC210A, RCC210N
QYLPHVARL	-	A*24	SURF4	RCC210A
QYPVIIHLI	x	A*24	ELOVL1	RCC210A
RALEAEKRALW	-	A*32	SCRIB	RCC329N
RAMVARLGL	-	B*07	CD24	RCC377T
RARDAILDAL	-	B*07	PYCARD	RCC377T
RAYQQALSR	-	A*03	PLIN2	RCC377T
RDAPIVNKV	-	B*51	FN1	RCC210T
REAFTKSI	x	B*4403	SPCS2	RCC297M2
REAQLISA	-	B*50	SRSF11	RCC399N
REDAARAIA	x	B*50	EIF3G	RCC399N
REFPDRLVGY	x	B*4403	EXT2	RCC297M2
REGDLLFTVA	-	B*50	EIF3I	RCC399T
REHAPFLVA	x	B*50	PNPLA2	RCC399N, RCC399T
RELPFKSA	x	B*50	YTHDC1	RCC399N, RCC399T
REMIPFAVV	-	B*50	SEPT9	RCC399N, RCC399T
REMPVKVEA	x	B*50	IPO7	RCC399T
RESPFSTSA	x	B*50	XPO1	RCC399T
REVSGIKAA	x	B*50	LMNA	RCC399N, RCC399T
REVTTLQA	-	B*50	DCBLD2	RCC399T
REYQVKLQA	-	B*50	TRIM5	RCC399N, RCC399T
RFDHVITNM	-	C	C1QB	RCC329N
RFKTQPVTF	-	A*24	C11orf96	RCC210T
RGDSTFESKSYK	-	A*03	FGA	RCC377M, RCC377T
RIFEPPPPK	x	A*03	DHX15	RCC297M2
RILPQDVILKF	-	A*32	DDX27	RCC329N

RILSGVVTK	x	A*03	RPS11	RCC377T
RIPPVAVRL	-	A*02	CHD4	RCC399T
RIPSFVTEL	-	A*02	GBF1	RCC399T
RIRDLAQLK	-	A*03	STAT6	RCC297M2
RISLPLPNF	x	A*32	VIM	RCC329N
RISSNPVAK	-	A*03	RNF213	RCC297M2
RIYGESADAVK	x	A*03	FXR1	RCC297M2
RLANTAPAW	x	A*32	SMARCB1	RCC329N
RLASTLVHL	-	A*02	CLTC	RCC329N, RCC399T
RLASYLDKV	-	A*02	KRT9	RCC399T
RLASYLDRV	-	A*02	KRT18	RCC329N, RCC399T, RCC70T
RLAVYIDRV	x	A*02	LMNA	RCC399T
RLDELGGVYL	x	A*02	RPN2	RCC329M, RCC399T
RLFDDVPQV	-	A*02	HEATR2	RCC399T
RLFEGNALL	x	A*02	RPS9	RCC399T
RLFGAVVRW	x	A*32	BTBD1	RCC329N
RLFGISLSY	x	A*03	CLCN7	RCC297M2
RLFGTTVTF	x	A*32	ATP6AP1	RCC329M, RCC329N
RLFGTTVTFK	x	A*03	ATP6AP1	RCC377T
RLFPVPGSGLVL	-	A*32	LAMP2	RCC329N
RLFPWGNKL	x	A*32	SUMF1	RCC329N
RLFSSIVTV	x	A*02	DUS2L	RCC399T
RLFVGSIPK	x	A*03	SYNCRIP	RCC297M2, RCC377M, RCC377T
RLGEAEGLMKV	-	A*02	SLC38A10	RCC329N
RLIDLGVGL	x	A*02	KDM5B	RCC399T
RLIPERTVW	-	A*32	NEK6	RCC329N
RLIPTLVSI	x	A*02	IPO9	RCC399T
RLIQESPTL	x	A*02	LPCAT3	RCC399T
RLLDEEISRV	-	A*02	QKI	RCC329N
RLLDGAFKL	x	A*02	CLASP1	RCC399T
RLLDLHQSW	x	A*32	PGGT1B	RCC329N
RLLDYVVNI	x	A*02	KANK2	RCC399T, RCC70T
RLLEQKVEL	x	A*02	PNN	RCC399T
RLLGYVATL	x	A*02	CSDE1	RCC399T
RLLPGNATISK	x	A*03	PARP14	RCC297M2, RCC377T
RLLQEQHQL	x	A*02	RNF213	RCC399T
RLLSPPLRPR	x	A*03	ATRN	RCC297M2
RLPVAPLRK	-	A*03	C1S	RCC297M2
RLQEDPPVGV	x	A*02	UBE2B	RCC329N
RLQGELQAV	-	A*02	ORAI3	RCC399T
RLSPAGAALLW	x	A*32	SPPL2A	RCC329N
RLSPSPTSQR	x	A*03	LMNA	RCC377M, RCC377T
RLSYNTASNK	-	A*03	RPL34	RCC297M2
RLTDYVAFI	-	A*02	COPS8	RCC399T
RLVAIRTEY	-	A*32	PLEC	RCC329N
RLVEIQYEL	x	A*02	GIT2	RCC399T
RLWGEPVNL	x	A*02	USP9X	RCC329N, RCC399T
RLYPTPRVR	x	A*03	DNAJB12	RCC377T

RLYPWGVVEV	x	A*02	SEPT2	RCC329N
RMFAPTKTW	-	A*32	RPL4	RCC329N
RMGTYGVRAAW	x	A*32	ICAM2	RCC329M, RCC329N
RMLPHAPGV	x	A*02	HDAC1	RCC329M, RCC329T, RCC399N, RCC399M, RCC399T, RCC70M, RCC70N
RMNEVISLW	x	A*32	SPTAN1	RCC329N
RMSDLHVLL	-	A*02	HABP2	RCC329M, RCC329N
RNADVFLKY	-	A*29	TRIO	RCC297M2
RPAGLPEKY	-	B*35	SAA1	RCC329N, RCC329T
RPAGLSPTL	-	B*07	VGLL4	RCC70N
RPAGPALLL	-	B*07	FUCA1	RCC377M
RPAGPALLLL	-	B*07	FUCA1	RCC377M, RCC377T
RPANHRQLTF	x	B*07	PSMD13	RCC377T
RPAPAAPLL	x	B*07	ZNF385A	RCC70T, RCC70N
RPAPLSAEL	-	B*07	MVD	RCC377T, RCC70N
RPAPPAQSL	-	B*07	EPN2	RCC70N
RPAPVEVTY	x	B*35	PTP4A1	RCC297M2, RCC329M, RCC329N, RCC329T
RPAQGVVTTL	-	B*07	FN1	RCC70M, RCC70T
RPAQLHIGF	x	B*07	UBA1	RCC377T, RCC70T
RPAQVSQPF	-	B*07	PRRC2C	RCC70M
RPAVGHSGL	-	B*07	ZC3H3	RCC377M
RPDGHQNNL	-	B*07	KPNB1	RCC377M
RPELVRPAL	-	B*07	AKR1C1	RCC377T, RCC70M
RPFERTITM	x	B*07, B*08, B*35	SDCBP	RCC329N, RCC399T, RCC70N
RPGAFSTVL	-	B*07	SORBS3	RCC377M
RPGGLGSSSL	-	B*07	KRT7	RCC70N
RPHHDASTF	-	B*07	PLOD2	RCC377M
RPHQARETL	-	B*07	MED7	RCC377M
RPHTVLTVI	-	B*07	TBL3	RCC70N
RPHYGSVL	x	B*08	IQGAP1	RCC70N
RPILTIITL	x	B*07, B*08, B*35	TP53	RCC297M1, RCC297M2, RCC377T, RCC70N
RPITDSPVL	x	B*07	MAT2B	RCC377M, RC377T, RCC70N, RCC70T
RPKETDHKSL	-	B*07	PHF20	RCC377M
RPLNVRVAL	-	B*07	ADAM15	RCC377T
RPMPGHTTV	-	B*07	NDRG1	RCC377M, RCC377T
RPPLEEKKAL	x	B*07	PLEKHA2	RCC377M
RPQAPATVGL	x	B*07	TCEB2	RCC70M, RCC70N
RPQASHQLL	x	B*07	UROD	RCC377M, RCC377T
RPQDGVAVL	-	B*07	MYO1C	RCC377N, RCC70M, RCC70N, RCC70T
RPRAATVVA	x	B*07	PRKAR1A	RCC377M
RPREAIEVRF	x	B*07	OS9	RCC70T, RCC70N
RPRGLALVL	x	B*07	CASP2	RCC377M, RCC377T, RCC70N, RCC70T
RPRHQGMV	x	B*07	ACTBL2	RCC377M
RPRLTSNEKL	x	B*07	TRAPPC4	RCC377T, RCC399N, RCC70N

RPRNALLL	x	B*07	SGSH	RCC377M, RCC70N
RPRPGNILL	x	B*07	TRPC4AP	RCC70T
RPRPTEATVSL	x	B*07	HMHA1	RCC70N, RCC70T
RPRVTEPISA	-	B*07	APOL1	RCC70M, RCC70N
RPSAAGINL	x	B*07	DHX9	RCC70T, RCC70N
RPSASTQAL	-	B*07	DDB1	RCC377M
RPSGAVVTL	x	B*07	NOSIP	RCC70N
RPSGLHGDVSL	-	B*07	TUT1	RCC70N
RPSGPGPEL	x	B*07	SMARCA2	RCC70M, RCC70N
RPSLRALL	-	B*07	IGFBP7	RCC70N
RPSLRALLL	-	B*07	IGFBP7	RCC377M, RCC70M, RCC70N
RPSQNLQL	-	B*07	MED25	RCC377M, RCC377T, RCC70N
RPSTSRSL	x	B*07	VIM	RCC377M, RCC377T
RPTLWAAAL	-	B*07, B*35	IGFBP3	RCC329T, RCC377M, RCC377T, RCC70M, RCC70T
RPVSSAASVY	-	B*35	KRT18	RCC297M2
RPWLEGRHTL	-	B*07	EIF2B4	RCC70N
RPWSNSRGL	x	B*07	CDC42SE1	RCC70M
RPYEPINSI	x	B*07	GTF3C2	RCC377T
RPYSQVNVL	x	B*07	UTRN	RCC377T, RCC70M, RCC70N
RQIDDILSV	x	A*02	AKR1A1	RCC399T
RQYGSEGRFTF	-	A*32	TMED4	RCC329N
RSDAEKQLLY	-	A*01	FRK	RCC377T
RSDLQSLGY	-	A*01	VRK3	RCC399T
RSDTPLIYK	x	A*03	IARS	RCC297M2
RSLAYIHSF	x	A*32	GSK3B	RCC329N
RSLDHPNVLKF	-	A*32	LIMK2	RCC329N
RSLGSSPVK	x	A*03	C12orf35	RCC297M2
RSYDPPLK	x	A*03	HNRNPF	RCC297M2
RSYVTTSTR	-	A*03	VIM	RCC297M2, RCC377T
RTEEALQLY	x	A*01	SRP72	RCC210A, RCC377T
RTEYNLRK	x	A*03	PLEC	RCC377T
RTGPPMGSRF	x	A*03	EIF4H	RCC377T
RTHLVSEVF	-	A*32	ALOX5	RCC329N
RTLPLVLLLY	x	A*03	BIRC6	RCC297M2
RTLWSSVL	-	A*32	TBC1D10A	RCC329N
RTMNIKSATW	x	A*32	HIF1A	RCC329N
RTNPNSGDFRF	-	A*32	RLIM	RCC329N
RTREDIEGSHW	-	A*32	RNF123	RCC329N
RTVNLKSATW	-	A*32	EPAS1	RCC329N, RCC329T
RTYSSHVSW	-	A*32	KIAA0913	RCC329N
RVAPPRALL	-	B*07	RAB11FIP5	RCC377T
RVASNPYTW	x	A*32	SPTAN1	RCC329N
RVFPDKGYSF	x	A*32	TIA1	RCC329N
RVFPEKGYSF	x	A*32	TIAL1	RCC329N
RVFPEVNW	x	A*32	GTF3C1	RCC329N
RVFTGVVTK	x	A*03	CCAR1	RCC297M2
RVFVVGVMTK	x	A*03	SCP2	RCC297M2, RCC377T

RVGALYLLY	x	A*03	SNAPC1	RCC297M2
RVGVGIRSSY	x	A*32	MCM5	RCC329N
RVHAYIISY	-	A*03, A*32	EHD2	RCC297M2, RCC329M, RCC329N, RCC329T, RCC377T
RVHPETYEW	x	A*32	SUPT6H	RCC329N
RVKLPSPGSKK	x	A*03	RPL8	RCC377M
RVKPLHYISW	x	A*32	NRD1	RCC329N
RVLEKDSVTLK	x	A*03	FCGR3A	RCC297M2
RVLEKPESLLL	x	A*02	TJAP1	RCC329N
RVLNKLGGVK	x	A*03	ATOX1	RCC297M2
RVLPPSHRVTW	x	A*32	VAV1	RCC329N
RVMAPRALL	x	B*07	HLA-C	RCC377T, RCC70N
RVNEYRFAW	x	A*32	ATP6V1H	RCC329N
RVPPPPQSV	x	A*02	SHC1	RCC399T
RVQEAVESMVK	x	A*03	FAM136A	RCC377T
RVRDVFEAK	x	A*03	IMPDH2	RCC297M2
RVREITENL	-	B*07	LCP1	RCC70N
RVSDINFTL	x	A*02	PPP6R3	RCC329N, RCC329T
RVTPIFILKK	x	A*03	TOMM5	RCC297M2
RVTYPAKAK	x	A*03	RPN2	RCC297M1, RCC297M2, RCC377M, RCC377N, RCC377T
RVYGGLTTK	x	A*03	PDCD6IP	RCC377T
RVYIGRLSY	x	A*03, A*32	SRSF4	RCC329M, RCC329N, RCC329T, RCC377T
RVYSPPEWISR	x	A*03	PIM2	RCC377T
RYASINTHL	x	A*24	CSNK1D	RCC210A, RCC210T, RCC210N
RYGLVTNEI	x	A*24	IFIH1	RCC210A, RCC210T, RCC210N
RYIPTAAAF	x	A*24	SEC61A1	RCC210A, RCC210T, RCC210N
RYLPDTLLL	x	A*24	COMT	RCC210A
RYPDSHQLF	x	A*24	G3BP2	RCC210A, RCC210T, RCC210N
RYPTSIASL	x	A*24	BUB3	RCC210A, RCC210T
RYSSMAASF	-	A*24	PDZK1IP1	RCC210T, RCC210N
RYVPRASYF	x	A*24	CCND3	RCC210A
SAKPKVLL	x	B*08	SAMHD1	RCC210A, RCC210T
SALEHSIQY	x	B*35	CAT	RCC329N
SAPSALRV	-	B*51	PPP2R3C	RCC210T
SASSLARAY	x	B*35	UBR5	RCC297M2
SAVDFIRTL	x	B*35	STK17A	RCC297M2
SAYGSKVAY	x	A*03	ANXA2	RCC297M2
SEASKLGAP	x	B*50	HEXIM1	RCC399N, RCC399T
SEGDIQKGY	x	B*4403	DIP2A	RCC297M2
SEIHLQVKY	-	B*4403	SIGLEC1	RCC297M2
SEIYGLMKA	x	B*50	GK	RCC399N
SELITKAVA	x	B*50	HIST1H1C	RCC399T
SELQARETF	x	B*4403	PLEC	RCC297M2
SEMDTSVKF	-	B*4403	ITGAV	RCC297M2
SENKIVGIGY	x	B*4403	DCTD	RCC297M2
SESPIEKVL	-	B*4403	MAP1B	RCC297M2
SEVTFALHSA	-	B*50	AAMP	RCC399N

SEYIHAQVA	x	B*50	FKBP9	RCC399N, RCC399T
SFDSTVRL	x	C	TBL1Y	RCC329N
SFEQFHLFY	x	A*29	PLCG2	RCC297M2
SFSTVHEKF	x	A*24	WDR36	RCC210N, RCC210T
SIDGRVVEPK	x	A*03	HNRNPA2B1	RCC297M2
SIDRTVMYY	-	A*01	SLC3A1	RCC210N, RCC210T, RCC377M, RCC377T, RCC399T, RCC399N, RCC70N
SIFDGRVVAK	x	A*03	TMCO1	RCC297M2
SIFKQPVTK	x	A*03	MBD2	RCC297M1
SIGDIFLKY	x	A*29	ECT2	RCC297M1, RCC297M2
SIIDRVIL	-	A*02	CRYL1	RCC399T
SIIGRLLEV	x	A*02	PPP1CA	RCC329M, RCC329N, RCC399T, RCC70M, RCC70N, RCC70T
SIIVFYNSV	-	A*02	RB1	RCC329T
SINPNNHSW	x	A*32	INTS8	RCC329N
SLAEGLRV	x	A*02	OAS3	RCC329N, RCC70M, RCC70N, RCC70T
SLAELVHAV	-	A*02	SESN1	RCC70N
SLAGGIIGV	-	A*02	HNRNPK	RCC399T, RCC70N
SLAQYLINV	x	A*02	PCBP2	RCC329M
SLDKLLQNNY	-	A*03	RGS5	RCC297M2
SLDVGGPLRY	x	A*01	PXMP2	RCC377T
SLFGGSVKL	x	A*02	PDCD6IP	RCC329N, RCC399T, RCC70M, RCC70N
SLFGSPVAK	x	A*03	MKL2	RCC297M2
SLFPGKLEV	x	A*02	FLII	RCC329N, RCC399T, RCC70N
SLFPGKLEV	x	A*02	FLII	RCC329N
SLGVAALYK	x	A*03	COX6C	RCC297M2, RCC377T
SLIPEALRL	-	A*02	HCFC1R1	RCC399T
SLIPHPFGV	-	A*02	LRP2	RCC70N
SLKQAPLVH	x	A*03	CLTA	RCC377T
SLLDKIIGA	x	A*02	PTRF	RCC329M, RCC329N, RCC399T, RCC70M, RCC70N, RCC70T
SLLKSLGL	x	A*02	EEF1E1	RCC399T
SLLLENLEKI	x	A*02	HNRNPCL1	RCC329N, RCC399T
SLLGGDVVSV	x	A*02	TSC22D3	RCC329N
SLLGHLMIV	-	A*02	HINT1	RCC399T
SLLHLGALY	-	A*29	SCD	RCC297M2
SLLTSSKGLQK	x	A*03	PLIN2	RCC297M2, RCC377T
SLLYNVPAV	x	A*02	APP	RCC329N
SLMDHTIPEV	x	A*02	SDCBP	RCC329N
SLMHSFILK	x	A*03	DYNLRB1	RCC377M, RCC377T
SLPDIKVYL	x	A*02	RGS14	RCC399T
SLSDHIVLL	-	A*02	ITGA3	RCC399T
SLSEKTVLL	x	A*02	CD59	RCC329M, RCC329N, RCC399T, RCC70M, RCC70N, RCC70T
SLWGQPAEA	-	A*02	COL4A5	RCC70N
SLYASSPGGVYATR	-	A*03	VIM	RCC297M2
SLYHIYVAL	-	A*02	HMOX1	RCC70M

SLYHRVLLY	-	A*03	ARFGEF3	RCC297M2
SLYKEGHSK	x	A*03	CHD5	RCC377M
SMTLAIHEI	-	A*02	DEGS1	RCC329N
SPAAEKAQL	x	B*07	CLCC1	RCC377T
SPAARSLSL	-	B*07	PRX	RCC70N
SPAFSTRVL	x	B*07	SND1	RCC377T
SPAGKTNAL	-	B*07	INADL	RCC377N, RCC377T, RCC399M
SPAQQHAHL	-	B*07	WWTR1	RCC377N
SPDLRLTWL	x	B*07	DOCK6	RCC377T
SPEGRLYQVEY	-	B*35	PSMA6	RCC297M2, RCC329N
SPEVGRSL	-	B*07	SYNE1	RCC70N
SPGQKGTVM	x	B*07	MFSD10	RCC377M
SPGQRSISL	-	B*07	ABL1	RCC70N
SPGWVRLAL	x	B*07	VKORC1	RCC377M, RCC377T
SPHGGALVM	-	B*35	INTS1	RCC329N
SPHPAIARL	-	B*07	C4B	RCC377T
SPIKVTLATL	x	B*07	NPM1	RCC70N
SPKLPVSSL	x	B*07	ARID3A	RCC377M, RCC70T
SPLTKSISL	x	B*08	AKAP13	RCC210T, RCC399T
SPNQARAQAAL	x	B*07	PTBP1	RCC377T
SPNSKVNTL	-	B*07	HADHA	RCC377T
SPQGRVMTI	x	B*07	PCBP1	RCC70N
SPQKVTLYL	x	B*07	ITGB2	RCC377M, RCC377T, RCC70T
SPQPRLIYL	x	B*07	ADIPOR1	RCC70N
SPRAAEPVQL	-	B*07	CA9	RCC377T
SPRASMGLV	-	B*07	TP53BP1	RCC70N
SPRDPVLTL	x	B*07	ANKLE2	RCC70M, RCC70N, RCC70T
SPRENILVSL	-	B*07	SCD	RCC377T
SPRGAGWLF	x	B*07	PPP6C	RCC377T, RCC70N
SPRGAGYLF	x	B*07	PPP4C	RCC377M, RCC70N
SPRGFPLGL	x	B*07	SLAIN2	RCC377T, RCC70N
SPRGYFHTF	-	B*07	WASL	RCC70N
SPRLPVGGF	x	B*07	TRIP12	RCC70N
SPRLPVGGFRSL	x	B*07	TRIP12	RCC377M, RCC70T, RCC70N
SPRLSQTFL	x	B*07	DOCK2	RCC377T
SPRPAAMVL	-	B*07	NTN4	RCC70N
SPRPAPLLL	-	B*07	AMACR	RCC377T, RCC70N
SPRPPLISV	x	B*07	MUDENG	RCC377T, RCC70N
SPRSSLNNSL	x	B*07	FOXJ3	RCC70N
SPRVGISAV	-	B*07	PAPPA2	RCC70N
SPRVHSLIL	-	B*07	SPG21	RCC70T, RCC70N
SPRVTVACL	-	B*07	FAM86A	RCC377T
SPRYIFTML	x	B*07	TOP2A	RCC377T
SPSLRILAI	x	B*08	LLGL2	RCC399T
SPSTSRTPLL	-	B*07	EGFR	RCC377M
SPTASRISL	-	B*07	SASH1	RCC70N
SPTPHGLSL	-	B*07	F8	RCC70N
SPVDSVLFY	x	B*35	CTNNB1	RCC297M2, RCC329N

SPVHVAFERL	-	B*35	MLK4	RCC329T
SPVNSSKQPSY	-	B*35	ATP5G1	RCC329N
SPVVRVAV	x	B*07	EEF2	RCC70T
SPYLRPLTL	-	B*35	NUDT14	RCC329N, RCC377M, RCC399T
SPYQNIKIL	x	B*07	SMS	RCC377M, RCC377T
SQILKHLL	-	B*08	NNMT	RCC399T
SQMLRAVSL	x	B*14	BAZ2A	RCC329N
SRADLIKQY	x	C	HSDL1	RCC399T
SRIARALAL	-	B*14	CYR61	RCC329N
SRVIRNAL	-	B*14	NCKAP1L	RCC329N
SRYLNEKAV	-	B*14	PICALM	RCC329N
SRYTGASL	-	B*14	HDAC3	RCC329N
SSAPPLTGK	x	A*03	PATZ1	RCC297M2, RCC377T
SSAPTARVF	x	B*35	PRPF6	RCC297M2
SSDRHLTQY	-	A*01	CHD1	RCC377M, RCC377T
SSDSL RHVY	-	A*01	F13A1	RCC377T
SSDSVGGFRY	x	A*01	CLINT1	RCC399T
STDHIPILY	x	A*01	GFPT1	RCC210N, RCC377T
STDKAEYTFY	x	A*01	RBPJ	RCC377M, RCC377T, RCC70M, RCC70T
STDKFKTDY	x	A*01	COPS6	RCC70M, RCC70N
STDKQMGY	-	A*01	EIF3I	RCC399N
STDPSVLGKY	-	A*01	HES1	RCC210A, RCC210N, RCC210T, RCC377T, RCC399T, RCC399N, RCC70N
STDSETLRY	x	A*01	SYTL2	RCC399N
STDWHVVNY	x	A*01	DOCK11	RCC377T
STEERHLLY	-	A*01	ENPP2	RCC210T, RCC399T, RCC399N
STELNHLGY	x	A*01	RHOT2	RCC210A, RCC210N, RCC210T, RCC377T, RCC399T, RCC70N
STINYKWSF	-	A*32	GPNMB	RCC329M, RCC329N
STTASLSKK	x	A*03	PRUNE	RCC377M
STVSRFFLY	x	A*29	CIRH1A	RCC297M2
STYPRPHEY	-	A*03	CTSZ	RCC297M1, RCC297M2
SVAGKIHTV	x	A*02	STON1	RCC329N, RCC399N, RCC399T, RCC70N
SVAQLLSK	x	A*03	KDM5A	RCC297M2
SVAQVLSR	x	A*03	AQP3	RCC297M2, RCC377T
SVASAAVLSH	x	A*03	RPN2	RCC297M2, RCC377M
SVASPFTSK	-	A*03	ATP13A3	RCC297M2
SVDPHGFISY	x	A*01	TIMM50	RCC377M, RCC377T, RCC399T, RCC70M, RCC70N
SVFPGARLL	x	A*02	CARM1	RCC399T
SVFPGARLLTI	-	A*32	CARM1	RCC329M
SVFYGAPSK	-	A*03	C4A	RCC297M2
SVNGKVL SK	x	A*03	NOMO1	RCC297M1, RCC297M2, RCC377N, RCC377M, RCC377T
SVPLPISHK	x	A*03	USP11	RCC297M2
SVSNVVITK	x	A*03	EPS15	RCC297M1, RCC297M2
SVYVYKVLK	x	A*03	HIST1H2BL	RCC297M2, RCC377T

SYFPEITHI	-	A*24	JAK1	RCC210T, RCC297M2, RCC399T
SYILRPVAF	-	A*24	SLC28A1	RCC210T
SYINFELRY	x	A*29	CRNKL1	RCC297M2
SYMGHFDLL	x	A*24	SF3B5	RCC210A
SYSGTFHSL	-	A*24	NBPF1	RCC210A
SYTSVKENF	-	A*24	FAM120B	RCC210N, RCC210T
TAADIFKQY	x	B*35	STAG2	RCC329N
TAAKPAASI	x	B*51	ZNF207	RCC210T, RCC210N
TAAPGRFSF	-	B*35	DCTPP1	RCC329M
TADHNLPLY	-	A*01	TBL3	RCC210T, RCC377T
TAFDVAEKY	x	B*35	ACTN1	RCC297M2
TAGAKLLF	-	B*51	STAT2	RCC210N
TAHNKVAL	x	B*08	TRIM25	RCC399N
TAIRHHVL	x	B*51	NOMO1	RCC210T
TAKLPAPSI	x	B*51	LCP2	RCC210A, RCC210N, RCC210T
TAPPGVLKI	-	B*51	RASIP1	RCC210N, RCC210T
TATATNHVL	x	B*35	RECQL	RCC329N
TAVIDHHNY	-	B*35	DDOST	RCC329M, RCC329N
TAVVKHVL	x	B*08	NSD1	RCC210T, RCC70N
TEAKPAVVA	-	B*50	ILF3	RCC399N
TEAPLNPKA	x	B*50	ACTA1	RCC399T
TEAPVLNIQF	-	B*4403	AP2A2	RCC297M2
TEAQVEKQL	-	B*4403	CTTNBP2NL	RCC297M2
TEIPGTVKF	-	B*4403	TPMT	RCC297M2
TELDLHKRL	-	B*4403	RBM27	RCC297M2
TENTEENRRFY	x	B*4403	ALDOA	RCC297M2
TEVDARLSF	x	B*4403	TALDO1	RCC297M2
TEVSKTPEA	x	B*50	MAGED2	RCC399N
TEYPVQRNY	-	B*4403	MPRIP	RCC297M2
TFDASRTTF	x	C	NUMB	RCC329N
TFPGIKLIY	-	A*29	SLC43A2	RCC297M2
TGKIRVQSL	-	B*08	UTRN	RCC210T, RCC70N
TGLQKVQSL	-	B*08	PRKCDBP	RCC210N, RCC210T, RCC399T, RCC70N
TGYLKGYTL	x	B*08	RBM8A	RCC399T, RCC70N
TGYLNTVTV	x	B*51	GNB2L1	RCC210A, RCC210T
TIAPALVSK	-	A*03	ENO1	RCC297M2, RCC377T
TIFTARLYY	x	A*03	APOBEC3F	RCC297M1, RCC297M2
TIKEGSQLK	x	A*03	NHP2L1	RCC297M2, RCC377M
TLADLVHHV	x	A*02	TRRAP	RCC329N, RCC399T, RCC70N
TLADVLYHV	x	A*02	ASH2L	RCC399T
TLDGSLHAV	x	A*02	ERN1	RCC399T, RCC70T
TLIEDILGV	-	A*02	TRPC4AP	RCC329N
TLKNREASL	-	B*08	SPTBN1	RCC210N
TLLNVIKSV	x	A*02	ITPR1	RCC329N, RCC399T, RCC70N
TLNEKLTAL	x	B*08	BRK1	RCC70N
TLSDLRVYL	x	A*02	SRXN1	RCC399T, RCC70M, RCC70N, RCC70T
TLSEIKALL	x	A*02	ACTN1	RCC70N

TLVYHVVG	x	A*02	SF3B3	RCC399T
TLYEAVREV	x	A*02	RPL10A	RCC399T
TMDPKPLAY	x	A*01	GPR155	RCC210N, RCC210T, RCC399T, RCC399N
TMLARLASA	-	A*02	CSPG4	RCC399T
TNTRLRAL	x	B*08	SF3B3	RCC70N
TPALRFVAV	-	B*07	ACP5	RCC377T, RCC399T
TPAPRPLLL	-	B*07	SH3D19	RCC70N
TPDTGRILSKL	x	B*07	PSMD4	RCC377T
TPFGGRLLVL	x	B*07	FLYWCH1	RCC377T
TPHDFIEHF	-	B*35	CCND1	RCC329M
TPHLRNLA	-	B*07	PSMG4	RCC70N
TPHQTFVRL	-	B*07	RPN2	RCC377T, RCC70M, RCCN, RCC70T
TPIKDGIY	x	B*35	DOK3	RCC329N
TPISRLVAL	x	B*08	ASB8	RCC399T
TPKNTSVSL	-	B*07	YME1L1	RCC377T, RCC70N
TPLERAQHL	-	B*08	TGFB1	RCC210T
TPMGPGRTV	x	B*07, B*51	LGALS8	RCC210T, RCC377T
TPQSNRPVM	x	B*07	POLR2A	RCC377T
TPRDLVLRSL	-	B*07	MYO1G	RCC377M, RCC377T
TPRGKPL	-	B*08	HMOX1	RCC210A, RCC210T
TPRPTAAEL	x	B*07	ESYT1	RCC70M, RCC70T
TPRSTVGVVAL	x	B*07	KLHL4	RCC377T, RCC70N
TPRVHISSV	-	B*07, B*08	NEFL	RCC377T, RCC399T
TPRVPDNL	-	B*07	TNFAIP1	RCC70T, RCC70N
TPSLVKSTSQL	x	B*07	ATP5G2	RCC377M, RCC377T, RCC70M, RCC70T
TPVRLPSI	x	B*51	IRF1	RCC210N, RCC210T
TQTVRVVAL	-	B*14	PMVK	RCC329N
TSALPIIQK	x	A*03	PLIN2	RCC377M, RCC377T
TSDKPGSPY	-	A*01	ACSL4	RCC210T
TSDQQRQLY	-	A*01	OCLN	RCC210N
TSERTVLR	-	A*01	DHX16	RCC210A, RCC210T, RCC70N
TSSKGQLQK	-	A*03	PLIN2	RCC377M
TTDPNIRVGY	-	A*01	HGF	RCC70N
TTDPSVRWEY	-	A*01	LPA	RCC70N
TTEQHGARY	x	A*01	TAPBP	RCC377M, RCC377N, RCC377T
TTEVHPELY	x	A*01	ERGIC3	RCC210A, RCC210T, RCC377T, RCC399T, RCC70M, RCC70T
TVADKIHSV	x	A*02	DUSP14	RCC329N, RCC399T, RCC70M, RCC70T, RCC70N
TVAEKSFVAV	-	A*02	IPO4	RCC329N
TVAVPLVGK	x	A*03	DERL1	RCC377M, RCC377T
TVDGVVFHY	x	A*01	VCAN	RCC399T
TVDNVHLEY	-	A*01	PREX2	RCC210A, RCC210N, RCC210T, RCC399T, RCC399N
TVDQVKDLY	-	A*01	CP	RCC210T, RCC377M, RCC377T, RCC399T, RCC399M, RCC70M, RCC70N, RCC70T

TVGLIRNL	x	A*02	CTNNB1	RCC399N, RCC399T
TVGSAISRK	-	A*03	TPD52L2	RCC377M
TVKQKYLSE	-	B*08	PAK2	RCC70N
TVNSKALEI	-	B*08	GBP4	RCC210N, RCC210T
TVNSPAIYK	-	A*03	UTP11L	RCC297M2
TVRPPVAVK	-	A*03	COL6A3	RCC297M1, RCC297M2
TVTEVLLKY	x	A*29	RRN3	RCC297M1, RCC297M2
TVYRNPESEFK	-	A*03	HIGD2A	RCC297M2
TYGEIFEKF	x	A*24	NDUFC2	RCC210A
TYLEKAIKI	x	A*24	USP7	RCC210T
TYTDRVFFL	x	A*24	PLXNB2	RCC210A
VADKVHLMY	-	A*01	TRIM25	RCC210A, RCC210N, RCC210T, RCC377M, RCC399T, RCC399N, RCC70N
VAHQQLIQI	x	B*51	DDB1	RCC210A
VAKAVTQAL	x	B*07	TLN1	RCC377M, RCC377T, RCC70N
VEINIDHKF	-	B*4403	HDLBP	RCC297M2
VEKPVGVAA	x	B*50	GSE1	RCC399N, RCC399T
VEVPETPKA	x	B*50	MAGED2	RCC399N
VFDEAIRAVL	x	C	RAC1	RCC297M2, RCC329N
VFDIHVIDF	-	C	FKBP9	RCC329N
VFDKTLAEL	x	C	ATF7IP	RCC329N
VFIDKQTNL	x	A*24	CELF1	RCC210T
VFLPIHITY	x	A*29	CMKLR1	RCC297M2
VFPDKGYSF	x	A*24	TIA1	RCC210A
VFPEKGYSF	x	A*24	TIAL1	RCC210A, RCC210N, RCC210T
VFPKEPVEL	-	C	HLA-DPA1	RCC329M
VGARIYHTI	-	B*51	MGST1	RCC210T
VGHVKPQAL	x	B*08	GP1BA	RCC210T, RCC70M
VGKGRDISL	-	B*08	DCP1B	RCC70N
VGLIRNLAL	x	B*08	CTNNB1	RCC399T, RCC70T, RCC70N
VIFDEVHYI	x	A*02	SKIV2L	RCC399T
VIFTGGVGK	x	A*03	CEPT1	RCC297M2, RCC377T
VIKEKALTL	x	B*08	USP9X	RCC210T
VIKETQERY	x	A*29	BRD8	RCC297M2
VILPGKTPV	-	A*02	EIF2C1	RCC329N
VISPPTVPK	-	A*03	POLR1B	RCC297M2
VLAPRVLRA	-	A*02	RCN1	RCC329M
VLDDKLVFV	x	A*02	ANO6	RCC399T, RCC70T, RCC70N
VLDERSALY	-	A*01	SASH1	RCC210T, RCC399T
VLDPYLLKY	x	A*01	MRPS17	RCC377M, RCC399T, RCC70M, RCC70N, RCC70T
VLFEHAVGY	x	A*03	NOP56	RCC297M2
VLFRGGPRGLLAVA	-	A*02	SSR1	RCC329N
VLGQFLVLK	-	A*03	BANF1	RCC297M2
VLGSKHLDL	-	B*08	ADH6	RCC399T
VLGTVVHGK	-	A*03	MTCH2	RCC297M2
VLHVKTESL	x	B*08	ATF6B	RCC210T, RCC70N

VLIDYQRNV	x	A*02	XPO1	RCC329M, RCC399T, RCC70M, RCC70N
VLIEKSHEM	-	A*02	UACA	RCC399T, RCC70N
VLIPKLPQL	x	A*02	ORMDL3	RCC329M, RCC329N, RCC399T, RCC70N
VLLGKVYVV	x	A*02	KLHL24	RCC329N, RCC399T, RCC70N
VLLPLRVTL	x	A*02	AGPAT9	RCC329N, RCC70N
VLMDRLPSL	x	A*02	URB1	RCC399T
VLMTEDIKL	x	A*02	EIF4G1	RCC399T
VLPRSSRGLL	-	A*02	LAMA5	RCC399T
VLQGKLAEV	x	A*02	MACF1	RCC70N
VLRVTHEL	-	B*08	PSMC3	RCC399T, RCC70N
VLSSRLAFA	x	A*02	HLA-DRB3	RCC329M, RCC329N, RCC399N, RCC399T, RCC70M, RCC70T, RCC70N
VLVDRTIYI	-	A*02	HRSP12	RCC70N
VLWDRTFSL	x	A*02	STAT1	RCC329M, RCC329N, RCC399T, RCC70M, RCC70N, RCC70T
VLWGETVHL	x	A*02	MAP3K8	RCC329N, RCC329T, RCC70N
VMAPRALLL	x	E	HLA-C	RCC210T
VMAPRTLIL	x	E	HLA-C	RCC210T, RCC297M2, RCC329M, RCC399T
VMAPRTLLL	-	E	HLA-A	RCC210N
VMAPRTLVL	x	E	HLA-A	RCC210N, RCC210T, RCC329M, RCC399T
VMAPRTVLL	x	E	HLA-B	RCC329N
VMDSKIVQV	x	A*02	KPNA1	RCC329N, RCC70M, RCC70N
VMEKSFLEY	x	A*01	UBE2Z	RCC399T, RCC70N
VPAHFVAL	-	B*07	C2	RCC377T
VPATDRNAL	x	B*07	EIF3E	RCC70M, RCC70T
VPDSSGPERIL	x	B*35	HNRNPK	RCC297M2, RCC329M, RCC329N, RCC377T, RCC70N
VPDTSRIYV	x	B*51	UXT	RCC210A
VPFHRVDTI	x	B*51	LGALS9	RCC210A, RCC210N, RCC210T
VPFRHLLL	x	B*08, B*14	CD4	RCC329N, RCC399T
VPHGHITSL	x	B*07	NAA10	RCC70N
VPHSIINGY	x	B*35	RPLP06	RCC297M2
VPKTHLEL	x	B*08	AIF1	RCC399T, RCC70N, RCC70T
VPLDERIVF	x	B*35	FAM129B	RCC297M2
VPLDKQITI	x	B*51	GNL3	RCC210A, RCC210T
VPLRRDQTI	-	B*51	C1QB	RCC210T
VPNNKITVV	x	B*51	LDHB	RCC210N
VPNRHIEI	x	B*51	MNDA	RCC210T
VPPKSLEI	-	B*51	COBLL1	RCC210N
VPPLATNTV	x	B*51	SAP130	RCC210T
VPRAAFSPLLLPL	-	B*07	ERP29	RCC70M
VPRAILVDL	-	B*07	TUBB	RCC70N
VPRPPQTSL	x	B*07	WIZ	RCC70T
VPRPPSLLATL	x	B*07	DIP2A	RCC70N
VPRQPTVTSV	x	B*07	PDLIM5	RCC70N

VPRSSMVL	-	B*07	MARCH7	RCC377M, RCC377T, RCC70N
VPRVGLGL	x	B*08	TMEM140	RCC70N
VPSKPPMSL	x	B*07	ANKRD40	RCC377M, RCC70N
VPSTERMVL	x	B*07	UBTF	RCC377M
VPVAKTAEI	-	B*07	NUP153	RCC377M
VPVGHVVL	-	B*07	WFS1	RCC70N
VPVGRQPII	x	B*51	LATS1	RCC210T
VPVPPLPEY	x	B*35	ATP5F1	RCC329M, RCC329N
VPYLRDLGL	x	B*14	ABCG1	RCC329N
VPYPVTTTT	x	B*51	CD36	RCC210T
VQHPRQLAL	-	B*14	JUN	RCC329N
VQLIRSWSL	-	B*14	PLEC	RCC329N
VQPSKYHFL	-	B*08	MAGEF1	RCC210T
VQSLHSKL	-	B*14	KTN1	RCC329N
VQVARNAL	-	B*14	SIGLEC1	RCC329N
VRFLGNLVL	-	B*14	RRAGA	RCC329M, RCC329N
VRVDRDYVL	-	B*14	HTATIP2	RCC329N
VRYESYAL	x	B*14	SDPR	RCC329N
VSDFGGRSL	-	C	RPA1	RCC329N
VSDHSGFHY	-	A*01	PTAR1	RCC210T, RCC70N
VSDKGNLMY	-	A*01	GRIN2A	RCC210T, RCC377T
VSDKTLSEY	x	A*01	ABCF2	RCC70N
VSDRVTVLY	-	A*01	COQ6	RCC399T, RCC70N
VSSHVERVF	-	B*35	C1orf109	RCC297M2
VSYSHIQSK	x	A*03	MAP4	RCC297M1, RCC377T
VTASVRLSY	-	A*32	VWF	RCC329M
VTDGPGNYKY	-	A*01	ATRN	RCC70N
VTDKSMVDKY	-	A*01	ECM29	RCC210T, RCC70N
VTDNRAFGY	x	A*01	DAB2	RCC210N, RCC377T, RCC399T, RCC399N, RCC70M, RCC70T, RCC70N
VTDRSDARLQY	-	A*01	APH1A	RCC70N
VTDSPRILK	-	A*03	DOPEY2	RCC297M2
VTEFQPLYI	-	A*01	PAH	RCC377T
VTEIDQDKY	x	A*01	FLNA	RCC377T
VTEKDLLLY	x	A*01	SNTB2	RCC377T, RCC329N, RCC70N, RCC70T
VTELHVISY	x	A*01	RNF213	RCC210A, RCC210N, RCC210T, RCC377M, RCC399T, RCC399N
VTFPEFLRY	x	A*29	CHST14	RCC297M2
VTNPHTDAW	x	A*32	GADD45B	RCC329N
VTSGKIEY	x	A*03	HCFC1	RCC297M2
VTSPIRASY	x	B*35	MFAP3	RCC297M2, RCC329M, RCC329N, RCC329T
VTYKNVPNW	x	A*32	RAN	RCC329N
VVKEDAFYSW	x	A*32	EIF4G1	RCC329N
VVKPPGSSL	x	A*02	BAP1	RCC70N
VVLPQIHTV	-	A*02	F8	RCC70N
VVMRDPASK	x	A*03	HNRNPA2B1	RCC297M2

VVNVKPLTGK	x	A*03	C12orf23	RCC297M2, RCC377T
VVSKHQSPK	-	A*03	SNX1	RCC377M
VYAQKHQQL	x	A*24	TRIM33	RCC210T, RCC210N
VYGFVREAL	x	A*24	UBXN6	RCC210A
VYIKHPVSL	x	A*24	PSMD8	RCC210A, RCC210T, RCC210N
VYISEHEHF	x	A*24	CLPTM1	RCC210A, RCC210N, RCC210T
VYLPHTSL	x	A*24	MYLIP	RCC210T
VYPDGIHRI	x	A*24	SF3B3	RCC210T
VYQHLFTRI	x	A*24	AP5Z1	RCC210A
VYQNHVQHL	-	A*24	ARHGAP5	RCC210T, RCC210N
VYSHVIQKL	-	A*24	SDS	RCC210A, RCC210T
VYSPHVLNL	x	A*24	DNM1	RCC210A
VYTSGVYHI	-	A*24	TENC1	RCC210A, RCC210N, RCC210T
VYVVGTAHF	x	A*24	TRABD	RCC210A, RCC210N
WSDGHLIYY	-	A*01	PLEKHB2	RCC70N
YADPVNAHY	x	A*01	ROD1	RCC399T, RCC70N
YAFNMKATV	x	B*51	HSPA8	RCC210A
YAYDGKDYI	x	B*51	HLA-C	RCC210A
YEAPGVREA	x	B*50	BCAS2	RCC399N
YEHDDKLTP	-	B*50	RDX	RCC399N
YEKILFTEA	x	B*50	PSMD8	RCC399T
YFELVQHEY	x	A*29	TNFAIP3	RCC297M2
YFEYIEENKY	-	A*29	HNRNPU	RCC297M2
YFHHQDGYRY	x	A*29	N4BP2L2	RCC297M2
YFSDPFLKY	-	A*29	PON2	RCC297M2
YGMPRQIL	x	B*08	TAGLN2	RCC210T, RCC399T, RCC70N
YIDEQFERY	x	A*01	SEPT2	RCC70M
YIHGRLQSL	-	B*08	ERCC1	RCC399T, RCC70N
YIKHPVSL	-	B*08	PSMD8	RCC210N
YIYPKHLKY	x	A*29	DOCK10	RCC297M2
YLAPHVRTL	-	A*02	GPS1	RCC70N
YLDIGQVYY	-	A*01	TTC22	RCC377T
YLDYHMEKY	-	A*01	AS3MT	RCC210A
YLEQLHQLY	x	A*01	STAT3	RCC70N
YLLPAIVHI	x	A*02	DDX5	RCC70M, RCC70N, RCC70T
YLLPHILVY	x	A*03	ATR	RCC297M2
YLNLIHVS	x	A*02	AKAP10	RCC70N
YPAFPGRAI	-	B*51	NR5A1	RCC210A
YDPYSRASL	-	B*07	EPPK1	RCC377T
YPRIMNTF	x	B*51	TUBB1	RCC210N
YPDFGPGNTL	-	B*35	MMP7	RCC297M2
YPPFRGVTI	x	B*51	CDC123	RCC210A
YPKGAGEML	x	B*07	ANAPC16	RCC70N
YPKRPLLGL	x	B*07	DDX24	RCC70N
YPLKTGETI	-	B*51	PPAP2B	RCC210N, RCC210T
YPNVNIHNF	x	B*35	SPTBN1	RCC329N
YPPGVKEI	x	B*51	PDS5A	RCC210T
YPPHVQKV	x	B*51	SENP6	RCC210A, RCC210T, RCC210N

YPPPEVRNI	x	B*51	SF3A1	RCC210A, RCC210T, RCC210N
YPVEHPDKF	x	B*35	VCP	RCC297M2
YSEGYPGQRY	-	A*01	SHMT1	RCC70M, RCC70N
YTDATSKY	-	A*01	DNAJC3	RCC210N, RCC210T, RCC399T, RCC70M
YTDHQNSSYY	-	A*01	SOX9	RCC70M
YTDKIDRY	x	A*01	TSPAN4	RCC210A, RCC210T, RCC399T, RCC70M, RCC70N, RCC70T
YTDPEVFKY	-	A*01	PTGIS	RCC70N, RCC70T
YTDVSTRY	x	A*01	TMX2	RCC377T, RCC399N, RCC70M, RCC70T, RCC70N
YTDYGGLIFNSY	-	A*01	COX2	RCC377T
YTPPPHHI	-	B*51	NDUFS5	RCC210N
YTRPTPVQK	x	A*03	DDX3X	RCC297M1, RCC297M2, RCC377M, RCC377T
YVDPQFLTY	x	A*01	PJA1	RCC210A, RCC377M, RCC70M, RCC70N
YVHDDGRVSY	x	B*35	GMFG	RCC297M2, RCC329M, RCC329N
YVKDIPATL	-	A*02	HNMT	RCC329T
YVYEYPSRY	x	A*29	NEDD9	RCC297M2
YVYPLQLKY	x	A*29	DOCK11	RCC297M2
YWGEIISQQY	x	A*29	IDE	RCC297M1
YYIFIPSKF	x	A*29	DDX47	RCC297M2
YYPEYKLLF	x	A*29	ATP6V0D1	RCC297M2
YYRYPTGESY	-	A*29	PFKFB3	RCC297M2
YYSNKAYQY	x	A*29	GIMAP6	RCC297M2
YYYDPTTGLYY	-	A*29	RBM5	RCC297M2

HLA-Klasse II

<i>Peptidsequenz</i>	<i>PBMC-Peptid</i>	<i>Annotation</i>	<i>Quellprotein</i>	<i>Interne Probennummer (IPN)</i>
AAAFAGLSREEALR	-	DR	IL411	RCC377M
AAAFAGLSREEALR	-	DR	IL411	RCC377M
AAHLPAEFTPAVH	-	DR	HBA1	RCC329T, RCC399M
AAHLPAEFTPAVHA	-	DR	HBA1	RCC329T
AAHLPAEFTPAVHASL	-	DR	HBA1	RCC329T
AAHLPAEFTPAVHASLDKF	-	DR	HBA1	RCC399M
AAKILADATAKMVEA	-	DR	TLN1	RCC399N
AAKILADATAKMVEAA	-	DR	TLN1	RCC399N
AAKYQLDPTASISA	-	DR	VDAC2	RCC210N
AAPAHVPPAPQASGWAF	-	DR	MYO15A	RCC377M
ADNLRRLKSKQSEPPV	-	DR	LYST	RCC70N
ADRDLLLIHKLSLKD	-	DR	PTPRB	RCC329T
ADSGEGDFLAEGGGVR	-	DR	FGA	RCC329M, RCC329T
AEHVRVTKAFSVN	-	DR	LAMP1	RCC210N
AEHVRVTKAFSVNIF	-	DR	LAMP1	RCC210N
AERDALNIETAIKTKG	-	DR	ANXA2	RCC297M2
AFGLPRLPEE	-	DR	HSPB1	RCC399M
AFKVHQYFNVELIQ	-	DR	C3	RCC70N
AFSDGLAHLNDNL	-	DR	HBB	RCC399M
AFSDGLAHLNDNLK	-	DR	HBB	RCC377M
AFSDGLAHLNDNLKGTG	-	DR	HBB	RCC399M
AGKYVPAIAHLIH	-	DR	CPVL	RCC210N, RCC297M2, RCC329M, RCC329T
AGKYVPAIAHLIHS	-	DR	CPVL	RCC210N, RCC297M2, RCC329M, RCC329T
AGPPGFPQAVGAKGEAGPQ	-	DR	COL1A1	RCC329T
AGSWAFSTAASVSDR	-	DR	TINAGL1	RCC210N
AGTAFIQTQQLHAAM	-	DR	PKM2	RCC377M
AGTAFIQTQQLHAAMA	-	DR	PKM2	RCC377M
AGTVRRQAVDV SPL	-	DR	RPS5	RCC329M, RCC329N
AGTVRRQAVDV SPLR	-	DR	RPS5	RCC329M
AGVANALAHKYH	x	DR	HBB	RCC210N
AGWDVIQMTPQEIAVN	-	DR	ITGB5	RCC297M2
AGYALAQMGRLKGP	-	DR	C3	RCC329T
AGYALAQMGRLKGPL	-	DR	C3	RCC329M, RCC329N, RCC329T, RCC377N
AGYALAQMGRLKGPLL	-	DR	C3	RCC329N, RCC329T
AGYRLLSRGHTPT	-	DR	HSPG2	RCC70N
AHLLILRDTKTYMLA	-	DR	ORM1	RCC399N
AISDYVFNTASLVYH	-	DR	LBP	RCC329M, RCC329N, RCC329T, RCC377N, RCC399N
AISDYVFNTASLVYHE	-	DR	LBP	RCC329T
AISDYVFNTASLVYHEE	-	DR	LBP	RCC399N
ALADLDELLIRA	-	DR	HSPG2	RCC70N
ALAQMGRLKGPL	-	DR	C3	RCC70N
ALEEQLQIRAE	-	DR	KRT10	RCC377T
ALKDIVINANPASPP	-	DR	AIMP2	RCC377M
APAALYQTIENIK	-	DR	ITM2B	RCC210T, RCC329N
APAHVPPAPQASGWAF	-	DR	MYO15A	RCC377M
APASTRLFQVRANSAGAT	-	DR	GSN	RCC210T

APGHTIVPSTASPPVSSA	-	DR	PAX2	RCC297M1, RCC329M, RCC377N, RCC70M,
APHYYEQTRGGQVS	-	DR	ITGAD	RCC210N, RCC297M2, RCC329M
APITGYRIVYSPSV	-	DR	FN1	RCC210N, RCC297M2
APITGYRIVYSPSVE	-	DR	FN1	RCC210N, RCC297M2
APITGYRIVYSPSVEG	-	DR	FN1	RCC210N, RCC297M2, RCC329M, RCC329N
APITGYRIVYSPSVEGS	-	DR	FN1	RCC210A, RCC210N, RCC297M2, RCC329M, RCC329N
APITGYRIVYSPSVEGSS	-	DR	FN1	RCC210N
APSAILPLPGQSVR	-	DR	ITIH4	RCC297M2
APSNLRFLLATTPNSL	-	DR	FN1	RCC210A, RCC210N, RCC297M2, RCC329M, RCC329N, RCC329T
APSNLRFLLATTPNSLL	-	DR	FN1	RCC297M2, RCC329N, RCC329T
APSNLRFLLATTPNSLLV	-	DR	FN1	RCC210N, RCC297M2, RCC329M, RCC329N, RCC329T
APSNLVISERTHRS	-	DR	COL12A1	RCC210T
AQELLRVLRAQPQVQV	-	DR	GSN	RCC297M2
AQELLRVLRAQPQVQVA	-	DR	GSN	RCC297M2
AQHALTSVSRGSSSLK	-	DR	CXCR4	RCC329M, RCC329T
AQMGRLLKGPL	-	DR	C3	RCC329N
AQTAFSANPANPAI	-	DR	SDCBP	RCC377M
AQTAFSANPANPAIL	-	DR	SDCBP	RCC377M
ASAPGYLAITKKVAVPY	-	DR	CPE	RCC377M
ASGRITGIVMDSGDGVTHTVPIYEG	-	DR	ACTB	RCC399M
ASLGKNPTDAY	-	DR	MYL12B	RCC399M
ASLGKNPTDAYLDA	-	DR	MYL12B	RCC399M
ASNDMYHSRALQVVR	-	DR	CST3	RCC210N, RCC210T, RCC329N
ASNDMYHSRALQVVRA	-	DR	CST3	RCC210N, RCC210T, RCC329N
ASSGASGGKIDNSVLVL	-	DR	AIFM1	RCC70N
ASSPGGVYATRSSA	-	DR	VIM	RCC399M
ASSPGGVYATRSSAVR	-	DR	VIM	RCC329M
ASVSTVLTSKY	-	DR	HBA1	RCC70N
ASVSTVLTSKYR	-	DR	HBA1	RCC210T, RCC70N
ASVYAGAGGSGSRISVSRS	-	DR	KRT18	RCC399M
ATAASSSSLEKS	x	DR	POTEE	RCC297M2
ATAYGSTVSKRVAWH	-	DR	APOB	RCC210T
ATPFLVVRHQLLKT	-	DR	COX7C	RCC210N, RCC70N
AVASFPKKQE	x	DR	COX7A2	RCC210N
AVHKAVLTIDEKGTEA	-	DR	SERPINA1	RCC210T
AVHKAVLTIDEKGTEAA	-	DR	SERPINA1	RCC210T, RCC210N, RCC377M, RCC70N, RCC70T
AVHKAVLTIDEKGTEAAG	-	DR	SERPINA1	RCC210T, RCC210N, RCC399N, RCC70N
AVHQFDSVKRISNSG	-	DR	ENPEP	RCC377M, RCC70T
AVRDMRQTVAVGVVIK	-	DR	EEF1A2	RCC210A, RCC210T, RCC210N, RCC329M, RCC329N, RCC329T
AVRDMRQTVAVGVVIKA	-	DR	EEF1A2	RCC210N
AWGKVGAHAGEY	-	DR	HBA1	RCC210N
AYIPTNVISITDG	-	DR	ATP5A1	RCC329N
DAFNLASAHKVPVT	-	DR	ANPEP	RCC329N
DAPAALYQTIENIK	-	DR	ITM2B	RCC210T
DASTLQSQAEGTGDAAK	-	DR	HMG4	RCC210T, RCC329T
DDVPHIALDGKLGGLVQPH	-	DR	ITGB5	RCC399N
DENQFVAVTSTNAAK	-	DR	CRMP1	RCC210N, RCC297M2

DENTVHMSWAKPVDPI	-	DR	COL12A1	RCC210T
DEVGGEALGRL	x	DR	HBB	RCC70N
DEYLKTTGKPIE	-	DR	ANXA6	RCC210A, RCC210N, RCC210T, RCC329M, RCC329N, RCC329T
DEYLKTTGKPIEA	-	DR	ANXA6	RCC210N
DEYLKTTGKPIEAS	-	DR	ANXA6	RCC210N, RCC210T, RCC329N
DFFGNGPPVNYK	-	DR	IFI30	RCC377M
DFFGNGPPVNYKTG	-	DR	IFI30	RCC377M
DGGDFVGTAAHLVQPR	-	DR	ILVBL	RCC210N, RCC329N
DGKRIQYQLVDISQD	-	DR	SH3BGRL3	RCC329M, RCC329N, RCC329T
DGPVVTDPKAPNVV	-	DR	ARHGDIB	RCC210T
DGPVVTDPKAPNVVV	-	DR	ARHGDIB	RCC210T
DGPVVTDPKAPNVVVT	-	DR	ARHGDIB	RCC210T, RCC399N
DGQSYRGTSSTTTTG	-	DR	PLG	RCC297M2
DGRAYTAISHIPQPA	-	DR	NID2	RCC70N
DHPTFNKITPNLAE	-	DR	SERPINA1	RCC297M2
DHPTFNKITPNLAEF	-	DR	SERPINA1	RCC297M2
DIRPEIHENY	-	DR	ATP6V1G1	RCC70N
DIRPEIHENYR	-	DR	ATP6V1G1	RCC70N
DIRPEIHENYRING	-	DR	ATP6V1G1	RCC70N
DISASRPNILL	-	DR	ARSE	RCC70N
DIVADHVASYG	-	DR	HLA-DQA1	RCC210T, RCC70N
DIVADHVASYGVN	-	DR	HLA-DQA1	RCC377M, RCC70N
DKLHVDPENFRLLG	-	DR	HBB	RCC210N
DKPVYTPDQSVKV	-	DR	C5	RCC210T, RCC210T, RCC70N, RCC70T
DKPVYTPDQSVKVR	-	DR	C5	RCC210T
DKPVYTPDQSVKVRV	-	DR	C5	RCC210T
DKTYSYLNKLPVKS	-	DR	NPC2	RCC70N
DLAGRDLTDYL	-	DR	ACTB	RCC399M
DLDKKETVWH	-	DR	HLA-DPA1	RCC210T
DLGTYVINKQTPNKQ	-	DR	FXN	RCC329N, RCC329T, RCC70N
DLHSYVVMNHGRSY	-	DR	NID1	RCC70N, RCC70T
DLHSYVVMNHGRSYT	-	DR	NID1	RCC70N, RCC70T
DLRLPYSVVR	-	DR	C3	RCC210T, RCC210N, RCC70N
DLSFNQIARLPSG	-	DR	LUM	RCC70N
DLSFNQIARLPSGLPV	-	DR	LUM	RCC377N
DMRQTVAVGVK	-	DR	EEF1A2	RCC210T, RCC210N, RCC329T
DNHGATYAFSGTHYWR	-	DR	HPX	RCC329N
DNKGIDSDASYPYK	-	DR	CTSS	RCC210T
DNKGIDSDASYPYKA	-	DR	CTSS	RCC210T
DNSRNLDLDSIIA	-	DR	KRT2	RCC377T
DPIIEDRHGGYKP	-	DR	CKB	RCC70N
DPIIEDRHGGYKPS	-	DR	CKB	RCC210A, RCC210N, RCC210T, RCC70N, RCC70T
DPIIEDRHGGYKPSDE	-	DR	CKB	RCC210N
DPIISDRHGGYKP	-	DR	CKM	RCC210T
DPIISDRHGGYKPT	-	DR	CKM	RCC210N, RCC210T, RCC399N, RCC70N
DPSGTYHAWKANAIGR	-	DR	PSMA7	RCC210N
DPSGTYHAWKANAIGRG	-	DR	PSMA7	RCC210T, RCC210N, RCC329N, RCC329T
DQINTDLNLSHAQ	-	DR	MYH9	RCC210N
DRIFVSVTNEHL	-	DR	TNFSF10	RCC210N
DRYFYNQEEYVR	-	DR	HLA-DRB1	RCC329N

DSGDGVTHNVPIYEG	-	DR	ACTA1	RCC399M, RCC70N
DSGYRPNLSPEEA	-	DR	PSMB8	RCC70N
DSGYRPNLSPEEAY	-	DR	PSMB8	RCC377M, RCC399N
DSGYRPNLSPEEAYD	-	DR	PSMB8	RCC329T, RCC377M, RCC399N, RCC70N
DSKDSTYLSSTLT	-	DR	IGKC	RCC210N
DSNIKFVSHVEKLGNNP	-	DR	APOB	RCC210T
DSSATAYGSTVSKRVAWH	-	DR	APOB	RCC210T, RCC210N
DTYRHTFTLSLPR	-	DR	CSF1R	RCC210T
DVHWTRAGEVQ	-	DR	AZGP1	RCC210N
DVPHIALDGKLG	-	DR	ITGB5	RCC210T, RCC210N
DVPHIALDGKLGGLV	-	DR	ITGB5	RCC399N
DVPHIALDGKLGGLVQPH	-	DR	ITGB5	RCC399N
DVSAYIPTNVISITDG	-	DR	ATP5A1	RCC329N, RCC329T
DYGNIRTVARVPGPA	-	DR	PLXND1	RCC329N, RCC329T
DYGSYSGNTQGGTSTQ	-	DR	HNRNPUL1	RCC377M, RCC70N
EAKAFLHVPKVIIG	-	DR	NID1	RCC210T, RCC210N, RCC297M2
EDHRFENTPEIAIR	-	DR	PLXND1	RCC210N
EDIVADHVASYG	-	DR	HLA-DQA1	RCC399N, RCC70N
EDIVADHVASYGVN	-	DR	HLA-DQA1	RCC210N, RCC70N, RCC70T
EDMKGHFSISIPVK	-	DR	A2M	RCC210T
EDPKFEVIEKPAQ	-	DR	ATP5J	RCC70N
EEHWVHESGRPVQR	-	DR	HSPG2	RCC297M2
EETQYVMDDTGLVPGR	-	DR	PTPRB	RCC399N
EETQYVMDDTGLVPGRQ	-	DR	PTPRB	RCC399N
EETVITVDTKAAGKG	-	DR	FLNA	RCC210T, RCC210N, RCC399N, RCC70N
EETVITVDTKAAGKGK	-	DR	FLNA	RCC210N, RCC399N, RCC70N
EFVNTSNAGAG	-	DR	FLNA	RCC70N
EGPEYWDEETGKVK	-	DR	HLA-A	RCC210T
EGQFSINKVPGNFH	-	DR	ERGIC1	RCC329N, RCC329T, RCC377M, RCC377N, RCC399N, , RCC70N, RCC70T
EGQYARLISPPVH	-	DR	NRP2	RCC297M2
EHPAYTQIAKEHALA	-	DR	SCAMP1	RCC70N
EHPAYTQIAKEHALAQ	-	DR	SCAMP1	RCC70N
EHPEFLKAGKEPG	-	DR	GSN	RCC377M
EHPEFLKAGKEPGLQ	-	DR	GSN	RCC70N
EHRSPPPGLSKFFE	-	DR	PRIC285	RCC70T, RCC70N
EKSAVTALWG	-	DR	HBB	RCC70N
ELAVASFPKKQE	-	DR	COX7A2	RCC70N
ELDEKAVRPGYPK	-	DR	VTN	RCC210T
ELPDGQVITIG	-	DR	POTEE	RCC399M
ELPDGQVITIGNER	-	DR	POTEE	RCC399M
ENDRIFVSVTNEHL	-	DR	TNFSF10	RCC210N
ENNKLTYSHGNYL	-	DR	VAMP7	RCC210A, RCC210N, RCC210T, RCC329N
EPKGIFRINENTGSVS	-	DR	CDH13	RCC329N, RCC70N
EQLGEYKFQNA	-	DR	ALB	RCC297M2
EQWLLTTAKNL	-	DR	HP	RCC329T
ERDALNIETAIKTKG	-	DR	ANXA2	RCC297M2
EREAILAIHKEAQR	-	DR	ACTN4	RCC329T
ERPTYTNLNRLLISQ	-	DR	TUBA8	RCC377M, RCC70N
ESRAQLGGPEAAKSDETAAK	-	DR	HSPB1	RCC399M
ESTGVFTTMEKAGAHLQ	-	DR	GAPDH	RCC377M

ETTQLTADSHPSYHTDG	-	DR	DNAJC5	RCC210A, RCC210T, RCC210N, RCC377M, RCC399N, RCC399T, RCC70N
ETVITVDTKAAGKG	-	DR	FLNA	RCC210T, RCC210N, RCC399N, RCC70N, RCC70T
ETVITVDTKAAGK GK	-	DR	FLNA	RCC210A, RCC210N, RCC210T, RCC377M, RCC377N, RCC399N, RCC399M, RCC399T
EVGGEALGRL	x	DR	HBB	RCC210N, RCC329M, RCC70N
EVKEYAQVFREHAN	-	DR	CTNNA1	RCC70N
EYAQVFREHANK	-	DR	CTNNA1	RCC70N
EYDESGPSIVHRK	-	DR	POTEE	RCC70N
FAGDDAPRAVFPISVG	-	DR	POTEE	RCC70N
FAIDNSGR II	-	DR	CDH5	RCC210N, RCC70N
FAIDNSGR IIT	-	DR	CDH5	RCC210N, RCC70N
FDPIIEDRHGGYKPS	-	DR	CKB	RCC70N
FDPIISDRHGGYKPT	-	DR	CKM	RCC210T
FDRTGDGKIL	-	DR	MYL6	RCC70N
FDRTGDGKILYS	-	DR	MYL6	RCC70N
FEGQFSINKVPGNFH	-	DR	ERGIC1	RCC329N, RCC329T, RCC377N, RCC399N, RCC70N
FESFGDLSTPDAVMGNPKVKA	-	DR	HBB	RCC399M
FFIDLRLPYSVVR	-	DR	C3	RCC210T
FFLPDSSKLLSG	-	DR	MAN1A1	RCC210T
FGGPGTASRP	x	DR	VIM	RCC210T
FGGPGTASRPSSS	-	DR	VIM	RCC210T, RCC297M2, RCC329M, RCC329T
FGGPGTASRPSSRSYVTTSTRT	-	DR	VIM	RCC329T
FIDLRLPYS	-	DR	C3	RCC210T
FIDLRLPYSV	-	DR	C3	RCC210T
FIDLRLPYSVVR	-	DR	C3	RCC399N, RCC70N
FLKAGKEPGLQ	-	DR	GSN	RCC70N
FLPDSSKLLSG	-	DR	MAN1A1	RCC70N
FLSFPTTKTY	-	DR	HBA1	RCC399M
FRVPTANVSVVD	-	DR	GAPDH	RCC377M
FRVPTANVSVVDL	-	DR	GAPDH	RCC377M
FSAYIKNSNPALNDN	-	DR	CLIC1	RCC377M
FSHDYKGSTSHHL	-	DR	APOB	RCC210N
FSHDYKGSTSHHLVS	-	DR	APOB	RCC210N
FSINKVPGNFH	-	DR	ERGIC1	RCC70N
FSNALEPDFKATSIT	-	DR	DAG1	RCC399N
FSNKITPIQSKE	-	DR	AK4	RCC70N
FSNKITPIQSKEAY	-	DR	AK4	RCC210N, RCC70N
FSSKFQVDNNRNL	-	DR	A2M	RCC210T, RCC70N
FSVTKKQLGAG	-	DR	PLG	RCC70N
FTVDDKEHSIK	-	DR	CFB	RCC210N, RCC210T, RCC70N
FTVDDKEHSIKVS	-	DR	CFB	RCC210T
FVELGTQPAT	-	DR	APOA2	RCC70N
FVELGTQPATQ	x	DR	APOA2	RCC70N
FVIDKSGSMSG	-	DR	ITIH4	RCC70N
FVQTHRPTGEF	-	DR	HLA-DPA1	RCC70N
FVRFSDAASPR	x	DR	HLA-C	RCC210N
FWINGTPLVK	-	DR	APCS	RCC399N, RCC70N
FYVDLKKKETVWH	-	DR	HLA-DPA1	RCC210N
GARNIVAAMKAHGV D	-	DR	BLVRB	RCC329M, RCC329T

GASQAGMTGYGRPRQIIS	-	DR	TAGLN	RCC329T
GAVYSFDPVGSYQR	-	DR	PSMB1	RCC399N
GDFRYTTTGMVNT	-	DR	C1R	RCC210T, RCC329N
GDFRYTTTGMVNTY	-	DR	C1R	RCC297M2
GDGQSYRGTSSTTTTG	-	DR	PLG	RCC297M2
GDGQSYRGTSSTTTTGK	-	DR	PLG	RCC297M2
GDGTFQKWAAVVVPS	-	DR	HLA-C	RCC329N
GDGTFQKWASVVVPSG	-	DR	HLA-A	RCC329N
GDLGTYVINKQTPNKQ	-	DR	FXN	RCC70N
GEETVITVDTKAAGK GK	-	DR	FLNA	RCC70N
GEGFLAEGGGVR	-	DR	FGA	RCC329T
GEITTGRVSA	-	DR	SLC25A12	RCC210A, RCC377M
GENYRGNVAVTVSG	-	DR	PLG	RCC399N
GENYRGNVAVTVSGHT	-	DR	PLG	RCC399N
GERGVPGGPAGVGPAG	-	DR	COL1A1	RCC399T
GGGYVKLFPNSLDQ	-	DR	CALR	RCC297M2
GGGYVKLFPNSLDQT	-	DR	CALR	RCC297M2
GGIGALVRLKSLQG	-	DR	TGFBI	RCC329M
GGKYAATSQVLLPS	-	DR	IGHM	RCC329N
GGNKIEVNKNQFALIE	-	DR	KDR	RCC399N
GGNKIEVNKNQFALIEG	-	DR	KDR	RCC399N
GGPGFLSIERPDSRPP	-	DR	C4A	RCC70N, RCC70T
GGPGGFGPGGYPGGIHEVS	-	DR	KRT2	RCC377T
GGPSLTSDLQAQSKG	-	DR	VTN	RCC399T
GGPSLTSDLQAQSKGNPE	-	DR	VTN	RCC210T, RCC210N, RCC399N, RCC399T
GGWIKANPVPDGHS	-	DR	ECE1	RCC70N
GGWIKANPVPDGHSR	-	DR	ECE1	RCC70N
GHPNIVINNAAGNFIS	-	DR	DECR1	RCC399N, RCC70N
GHPNIVINNAAGNFISP	-	DR	DECR1	RCC329N, RCC329T, RCC377M, RCC399N, RCC70N
GHPNIVINNAAGNFISPT	-	DR	DECR1	RCC377M, RCC399N, RCC70N
GHPQYLLDSNSWIE	-	DR	C4A	RCC399N
GHPQYLLDSNSWIEE	-	DR	C4A	RCC399N
GIAEFWINGTPLVK	-	DR	APCS	RCC329N, RCC377N
GIAEFWINGTPLVKKG	-	DR	APCS	RCC377N, RCC399N
GIFRINENTGSVS	-	DR	CDH13	RCC70N
GINISPDDKYIYVADI	-	DR	PON2	RCC399N
GINISPDGKYVYIAEL	-	DR	PON2	RCC399N
GKEYFAIDNSGRI	-	DR	CDH5	RCC210N, RCC399N, RCC70N
GKEYFAIDNSGRII	-	DR	CDH5	RCC210A, RCC210N, RCC399N, RCC70N
GKEYFAIDNSGRIIT	-	DR	CDH5	RCC210N, RCC210T, RCC399N, RCC70N
GKIDVHWTRAGEVQ	-	DR	AZGP1	RCC210N
GKKEYLIAGKAEGDG	-	DR	TIMP2	RCC70N
GKNPTDAYLDA	-	DR	MYL12B	RCC399M
GKVVNDEVGGALGR	-	DR	HBB	RCC210N
GKVVNDEVGGALGRL	-	DR	HBB	RCC210N, RCC70N
GLTAFEATDNQAIK	-	DR	MTPN	RCC210N
GNALVVDPKKPFRR	-	DR	EHD3	RCC210N
GNNIRTVARVPGPA	-	DR	PLXND1	RCC329N
GNPKSDEMNVKVL	-	DR	MYL6	RCC399M
GPDGLTAFEATDNQAIK	-	DR	MTPN	RCC210N

GDPSPSPAFRIEDA	-	DR	THBS1	RCC297M2
GPPPQGGRPQ	-	DR	PRH1	RCC297M1
GPPVSELITK	x	DR	HIST1H1C	RCC329T
GPPYVSWLIDANHNM	-	DR	ENG	RCC210T, RCC399N
GPPYVSWLIDANHNMQ	-	DR	ENG	RCC210T, RCC399N
GPQGGPPGPKGNSGEPG	-	DR	COL1A1	RCC329M
GPSLTSDLQAQSKGNPE	-	DR	VTN	RCC399N
GPTTYKVTSTLTIK	-	DR	IGHM	RCC210N, RCC210T, RCC329N
GPTTYKVTSTLTIKE	-	DR	IGHM	RCC210N, RCC210T, RCC297M2, RCC329M
GRPQGGPPQGGHQQ	-	DR	PRH1	RCC297M1
GSDSFLAEHKLLGNIK	-	DR	FKBP3	RCC70N
GSFHASSSLTVK	-	DR	FCGRT	RCC210T
GSFHASSSLTVKS	-	DR	FCGRT	RCC210N, RCC210T
GSFHASSSLTVKSG	-	DR	FCGRT	RCC210N, RCC210T, RCC329N
GSLQFGYNTGVINAPQ	-	DR	SLC2A1	RCC377M, RCC399N
GTFQKWAAVVVPS	-	DR	HLA-C	RCC329N
GTFQKWASVVVPSG	-	DR	HLA-A	RCC329N
GTGENYRGNVAVTVSG	-	DR	PLG	RCC399N
GTGENYRGNVAVTVSGHT	-	DR	PLG	RCC329M, RCC329N, RCC329T, RCC377M, RCC399N, RCC70N, RCC70T
GTLIIRDVKESDQG	-	DR	HSPG2	RCC210T, RCC399N
GVANALAHKYH	-	DR	HBB	RCC329T
GVDISATKAVHISNPK	-	DR	FARSB	RCC210N, RCC210T
GVFTTMEKAGAH	-	DR	GAPDH	RCC377M
GVFTTMEKAG AHL	-	DR	GAPDH	RCC377M
GVLRIQNLDQS	-	DR	HSPG2	RCC329T
GVTHTVPIYEG	-	DR	POTEE	RCC399M
GYALAQMGRLKGPL	-	DR	C3	RCC329N, RCC329T
HAFILQDTKALHQV	-	DR	C2	RCC399N
HATPTPVTAIGPPTTA	-	DR	DAG1	RCC297M2
HKAULTIDEKGTEA	-	DR	SERPINA1	RCC210A, RCC210N, RCC210T, RCC377M, RCC399T, RCC70N, RCC70T
HKAULTIDEKGTEAA	-	DR	SERPINA1	RCC210N, RCC210T, RCC377M, RCC399M, RCC399N, RCC70N, RCC70T
HKAULTIDEKGTEAAG	-	DR	SERPINA1	RCC210A, RCC210N, RCC210T, RCC377M, RCC399N, RCC70T, RCC70N
HLLILRDTKYMLA	-	DR	ORM1	RCC399N
HLPAEFTPAVH	-	DR	HBA1	RCC210N
HLPAEFTPAVHASL	-	DR	HBA1	RCC210N
HLPAEFTPAVHASL DK	-	DR	HBA1	RCC210N
HLTPEEKSAVTA	-	DR	HBB	RCC210N, RCC329T, RCC70N
HLTPEEKSAVTAL	-	DR	HBB	RCC210N
HPNIVINNAAGNFIS	-	DR	DECR1	RCC399N
HPNIVINNAAGNFISP	-	DR	DECR1	RCC399N
HPQYLLDSNSWIE	-	DR	C4A	RCC399N
HVIGPEGVLAGKTRV	-	DR	ABCC3	RCC297M2, RCC329T
IAAKYQLDPTASISA	-	DR	VDAC2	RCC210N, RCC399N, RCC70N
IAAKYQLDPTASISAK	-	DR	VDAC2	RCC210A, RCC210N, RCC210T, RCC70N, RCC70T
IAEFWINGTPLVK	-	DR	APCS	RCC377N, RCC399N

IAEFWINGTPLVKK	-	DR	APCS	RCC377N, RCC399N
IAEFWINGTPLVKKG	-	DR	APCS	RCC399N
IAGYALAQMGRLKGPL	-	DR	C3	RCC329T
IAGYALAQMGRLKGPLL	-	DR	C3	RCC329T
IDKVISTITNNIQ	-	DR	TGFBI	RCC210T
IDLRLPYSVVR	-	DR	C3	RCC210N, RCC70N
IDQINTDLNLSHAQ	-	DR	MYH9	RCC210T, RCC210N, RCC399N
IEDTFETLRAAVAASG	-	DR	TGFBI	RCC297M2
IEGNLIFDPNNYLPK	-	DR	APOB	RCC210T, RCC399N
IEGNLIFDPNNYLPKE	-	DR	APOB	RCC399N
IEGSNKVPVDPA	-	DR	GSN	RCC210N
IEKPAGPPGILAL	-	DR	MYH9	RCC70N
IEVDGKQVELA	-	DR	RHOA	RCC210N
IGEETVITVDTKAAGK GK	-	DR	FLNA	RCC210T
IGTVLAMPDPAARHS	-	DR	CDH5	RCC399N
IGTVLAMPDPAARHSIG	-	DR	CDH5	RCC210T, RCC399N
IGVEFATRSIQVDGK	-	DR	RAB11A	RCC210N
IIPLLTDPKNHGLSD	-	DR	EPHX1	RCC210A, RCC399N
IIPLLTDPKNHGLSDE	-	DR	EPHX1	RCC399N
IKEEHVIIQAE	-	DR	HLA-DRA	RCC297M2, RCC70N
IKEEHVIIQAEF	-	DR	HLA-DRA	RCC297M2
IKIIAPPERKY	-	DR	ACTA1	RCC399M
ILQDTKALHQ	-	DR	C2	RCC210T, RCC210N, RCC70N
ILQDTKALHQV	-	DR	C2	RCC210N, RCC210T, RCC70N
ILRDTKTYMLA	-	DR	ORM1	RCC70N
INDAFNLASAHKVPVT	-	DR	ANPEP	RCC329N
INEQWLLTTAKNL	-	DR	HP	RCC210T, RCC329M, RCC329T
INISPDGKYVYIAEL	-	DR	PON2	RCC210T
INNQLTLDSENTKYFHK	-	DR	APOB	RCC399N
INNQLTLDSENTKYFHKLN	-	DR	APOB	RCC399N
INTDLNLSHAQ	-	DR	MYH9	RCC210N, RCC210T, RCC70N
IPAPTDLKFTQVPTSL	-	DR	FN1	RCC297M2
IPGNALVDPKPKPFR	-	DR	EHD3	RCC210N
IPGPPALTLVPAELVR	-	DR	CSF1R	RCC210T
IPQKIAVQPGTVGPQ	-	DR	COL4A2	RCC297M2, RCC329N, RCC329T
IRPEIHENYRING	-	DR	ATP6V1G1	RCC70N
IRTIELDGTKIKLQ	-	DR	RAB1A	RCC399N
ISDYVFNTASLVYH	-	DR	LBP	RCC399M, RCC399N
ISDYVFNTASLVYHE	-	DR	LBP	RCC329T, RCC377N
ISDYVFNTASLVYHEE	-	DR	LBP	RCC329M, RCC329N, RCC329T, RCC377N, RCC399N
ISKYELDKAFSDR	-	DR	C3	RCC210T
ISPMVMDAKAVAGNI	-	DR	VCL	RCC210T, RCC399N
ISPMVMDAKAVAGNIS	-	DR	VCL	RCC399N
ISTPEELGLDKV	-	DR	COX5A	RCC70N
ISVLYGDEEVPRSPF	-	DR	FLNA	RCC399N
ITSIVKDSSAARNG	-	DR	SDCBP	RCC210N, RCC399T, RCC70N
ITSIVKDSSAARNGL	-	DR	SDCBP	RCC210N, RCC399N
ITSIVKDSSAARNGLL	-	DR	SDCBP	RCC210N, RCC399N
IVINNAAGNFIS	-	DR	DECR1	RCC70N
IVINNAAGNFISPT	-	DR	DECR1	RCC70N
IVSAADKVDAG	-	DR	VPS8	RCC377T, RCC399T
IVVIGHVDSGKS	-	DR	EEF1A1	RCC399M

KAVLTIDEKGTE	-	DR	SERPINA1	RCC210T, RCC210N, RCC399N, RCC70N, RCC70T
KAVLTIDEKGTEA	-	DR	SERPINA1	RCC210A, RCC210T, RCC210N, RCC377M, RCC377N, RCC399T, RCC399M, RCC399N, RCC399T, RCC70M, RCC70T, RCC70N
KAVLTIDEKGTEAA	-	DR	SERPINA1	RCC210A, RCC210T, RCC210N, RCC377M, RCC377N, RCC377T, RCC399T, RCC399M, RCC399N, RCC399T, RCC70T, RCC70N
KAVLTIDEKGTEAAG	-	DR	SERPINA1	RCC210T, RCC210N, RCC377M, RCC377N, RCC399M, RCC399N, RCC399T, RCC70N, RCC70T
KAVLTIDEKGTEAAGA	-	DR	SERPINA1	RCC399N
KDILEDRRGQVDT	-	DR	HLA-DRB1	RCC210T
KDIVINANPASPP	-	DR	AIMP2	RCC377M
KDKTYSYLNKLPVK	-	DR	NPC2	RCC70N
KDSTYLSSTLTLSK	-	DR	IGKC	RCC210N, RCC210T, RCC297M2, RCC329M, RCC329N
KDSTYLSSTLTLSKA	-	DR	IGKC	RCC210N, RCC210T, RCC329M, RCC329N
KEETQYVMDDTGLVPG	-	DR	PTPRB	RCC399N
KEETQYVMDDTGLVPGR	-	DR	PTPRB	RCC399N
KEETQYVMDDTGLVPGRQ	-	DR	PTPRB	RCC399N
KEQLTPLIKKAGTE	-	DR	APOA2	RCC70N
KEYFAIDNSGRII	-	DR	CDH5	RCC210N, RCC399N
KEYFAIDNSGRIIT	-	DR	CDH5	RCC210N, RCC399N
KFDHTNSLNIAG	-	DR	APOB	RCC210A, RCC210T, RCC210N
KGKEYFAIDNSGRII	-	DR	CDH5	RCC210N, RCC70N
KIAFSATRTINVP	-	DR	C1QB	RCC297M2
KIAFSATRTINVPL	-	DR	C1QB	RCC297M2, RCC329M
KIAFSATRTINVPLR	-	DR	C1QB	RCC210N, RCC210T, RCC329N
KIRTIELDGKTIKLQ	-	DR	RAB1A	RCC399N
KIVLDPSGSMN	-	DR	CFB	RCC210T
KNPKFMETVAEKA	-	DR	CLU	RCC210N
KNPKFMETVAEKALQ	-	DR	CLU	RCC210N, RCC210T
KNTLYLQMNSLRAED	-	DR	-	RCC377M
KNYRIDTINLFPA	-	DR	CP	RCC70N, RCC70T
KPNKFTVETRAGTGG	-	DR	FLNA	RCC377M
KPPSYNVATTLPSYDE	-	DR	NDFIP1	RCC70N
KQEYDESGPSIVHRK	-	DR	POTEE	RCC70N
KQGYQLIEGNQVLH	-	DR	C1R	RCC297M2
KQIWRIEGSNKVPVD	-	DR	GSN	RCC297M2
KRAEFTVETRSAGQG	-	DR	FLNA	RCC377M
KRKIVLDPSGSMN	-	DR	CFB	RCC70N
KSTLITDGSTPIN	-	DR	MVP	RCC210T, RCC399T
KTVETRDGQVINETSQ	-	DR	VIM	RCC329M
KVDIVAINDPFID	-	DR	GAPDH	RCC70M
KVDLSFSPSQSLPA	-	DR	A2M	RCC210N
KVLGNPKSDEMNVKVL	-	DR	MYL6	RCC399M
KVNVDEVGGEALGRL	-	DR	HBB	RCC210N
KVVPEMTEILKKK	-	DR	ETFA	RCC70N
KYVPAIAHLIH	-	DR	CPVL	RCC210N, RCC210T, RCC329M, RCC329N, RCC329T

KYVPAIAHLIHS	x	DR	CPVL	RCC210T, RCC210N, RCC297M2, RCC329M, RCC329N, RCC329T
LANIAVDKANLEI	-	DR	HLA-DRA	RCC399N
LANIAVDKANLEIM	-	DR	HLA-DRA	RCC399N
LANIAVDKANLEIMT	-	DR	HLA-DRA	RCC399N
LASVSTVLTSKYR	-	DR	HBA1	RCC210N, RCC329M
LATISTLEAVRGRPF	-	DR	CREG1	RCC297M2
LAVASFPKKQE	-	DR	COX7A2	RCC70N
LAVFQDEGAEPLKQ	-	DR	C4A	RCC297M2
LDELRDEGKASSAK	-	DR	ALB	RCC329M
LDLSFNQIARLPSG	-	DR	LUM	RCC377N
LDRYFYNQEEYVR	-	DR	HLA-DRB1	RCC329N
LEKDIISDTSGDFRK	-	DR	ANXA2	RCC210T
LILRDTKTYMLA	-	DR	ORM1	RCC70N
LILRDTKTYMLAF	-	DR	ORM1	RCC210T
LLILRDTKTYMLAFD	-	DR	ORM1	RCC329T
LLSPYSYSTTAVVTNPK	-	DR	TTR	RCC210N
LNTILPDARDPAF	-	DR	LAMP1	RCC399N
LNTILPDARDPAFK	-	DR	LAMP1	RCC210N, RCC399N
LNTILPDARDPAFKA	-	DR	LAMP1	RCC399N
LPIIDVAPLDVGAPD	-	DR	COL1A1	RCC329N
LPSPFQQSPSVPLNH	-	DR	NOTCH1	RCC210N
LPSPFQQSPSVPLNHLP	-	DR	NOTCH1	RCC210N
LRDTKTYMLA	-	DR	ORM1	RCC70N
LRFLATTPNSL	-	DR	FN1	RCC210A, RCC297M2, RCC329N, RCC329T
LRFLATTPNSLL	-	DR	FN1	RCC210T
LRFLATTPNSLLV	-	DR	FN1	RCC210T
LRLPYSVVRN	-	DR	C3	RCC70N
LSDRYVSHFETEGPH	-	DR	C4A	RCC210T
LSFPTTKTYFPHF	-	DR	HBA1	RCC329T
LSPYSYSTTAVVTNPK	-	DR	TTR	RCC210A, RCC210N, RCC297M2, RCC329N
LSTLEMDDRSHYT	-	DR	VSIG4	RCC377M
LTAFEATDNQAIK	-	DR	MTPN	RCC210N
LTEAPLNPKA	-	DR	ACTA1	RCC399M
LVEVSRNLGKVG	-	DR	ALB	RCC70N
LVQDTRIHLVPS	-	DR	AEBP1	RCC210N, RCC70N
LVVRHQLLKT	x	DR	COX7C	RCC210N, RCC210T, RCC70N
LVVYPWTQRF	-	DR	HBB	RCC297M2, RCC329M, RCC329N, RCC329T, RCC377N, RCC399M, RCC70M, RCC70N, RCC70T
LWVVP SDKSGFEPAS	-	DR	MYH9	RCC399M
LWVVP SDKSGFEPASLKEEVGEEA	-	DR	MYH9	RCC399M
MATAASSSSLEKS	-	DR	POTEE	RCC399M, RCC70N
MDSGYRPNLSPEEAYD	-	DR	PSMB8	RCC399N
MFYVDLKKETVWH	-	DR	HLA-DPA1	RCC399N
MLEPVQRPDVVLVGAGYR	-	DR	HSPG2	RCC399N
MPFSPKASVAAMEA	-	DR	TP53BP1	RCC70T
MPIRKDDEVQVVRG	-	DR	RPL26	RCC210T
NDRIFVSVTNEHL	-	DR	TNFSF10	RCC210N, RCC329N, RCC329T
NKNNFIQTKSIPKSE	-	DR	PTPRB	RCC210N
NKVDLSFSPS QSLPA	-	DR	A2M	RCC297M2
NLRFLATTPNSLLV	-	DR	FN1	RCC210T
NLSKEDDVRQY	-	DR	RPS6	RCC329M

NNKLTYSHGNYL	-	DR	VAMP7	RCC210N, RCC210T
NPANPAILSEASAPIPH	-	DR	SDCBP	RCC297M2
NPGGYVAYSKAATVTG	-	DR	TFRC	RCC210T, RCC329N
NPGGYVAYSKAATVTGK	-	DR	TFRC	RCC210T, RCC329N
NPHVNPLPTGYEDE	-	DR	COX6A1	RCC70N
NQIARLPSGLPV	-	DR	LUM	RCC70N
NQKGHSLQPRGFLS	-	DR	HLA-DRB1	RCC70N
NQLTLDSENTKYFHK	-	DR	APOB	RCC210A, RCC210N, RCC210T
NTILPDARDPAFK	-	DR	LAMP1	RCC210N, RCC210T, RCC377M, RC399N, RCC70M, RCC70N
NTILPDARDPAFKA	-	DR	LAMP1	RCC210N, RCC210T, RCC399N, RCC70N
NTILPDARDPAFKAA	-	DR	LAMP1	RCC210T, RCC399N, RCC70N
NTVISVNPSTKLQEGG	-	DR	VCAM1	RCC329N, RCC399N, RCC70N
NVLRINEPTAAAIAYG	-	DR	HSPA1A	RCC70M
PAVHASLDFK	-	DR	HBA1	RCC329T
PLTKAADISLDNLVE	-	DR	TP53BP1	RCC70N
PTTKTYFPHF	-	DR	HBA1	RCC329T
QAVLHMEQRKQQQQ	-	DR	NUCB1	RCC329N, RCC329T, RCC377M, RCC70T
QAVLHMEQRKQQQQQQ	-	DR	NUCB1	RCC329N
QEYDESGPSIVHRK	-	DR	ACTB	RCC210N, RCC70N
QGYQLIEGNQVLH	-	DR	C1R	RCC297M2
QIWRIEGSNKVPVD	-	DR	GSN	RCC210T
QKIAFSATRINVPLR	-	DR	C1QB	RCC210T, RCC297M2, RCC329M, RCC329T
QLGEYKFQNAL	-	DR	ALB	RCC297M2
QLNTILPDARDPAFK	-	DR	LAMP1	RCC377M, RCC399N
QPRPAFSAIRRNP	-	DR	C1QA	RCC377M
QPTMALMHKVPSEG	-	DR	GPRC5C	RCC329N, RCC377M
QRSHSTIASLGLAFP	-	DR	LYST	RCC329T
RAIAVDPIRGNLYWT	-	DR	NID2	RCC297M1
RAVTELGRPDAEY	-	DR	HLA-DRB1	RCC399M
RDMRQTVAVGVK	-	DR	EEF1A1	RCC210T, RCC210N, RCC297M2, RCC329T
RETNLDSLPLVDTHSK	-	DR	VIM	RCC329M
RETNLLYDPKESASSN	-	DR	ENPEP	RCC210T
RIFVGSSQVPIVFEN	-	DR	NID1	RCC70N
RIQLVEEELDRAQER	-	DR	TPM1	RCC329M, RCC329T
RLPIIDVAPLDVGAPD	-	DR	COL1A1	RCC297M2, RCC329M, RCC329N
RPRAPIIAVTRNPQ	-	DR	PKM2	RCC70N
RPRAPIIAVTRNPQT	-	DR	PKM2	RCC377M
RPRAPIIAVTRNPQTA	-	DR	PKM2	RCC329T, RCC377M, RCC70N, RCC70T
RPSLVPASAENVNK	-	DR	ITIH4	RCC210T
RSIQVDGKTIKAQ	-	DR	RAB11A	RCC210T, RCC70N
RVAPEEHPTL	-	DR	ACTB	RCC399M
RVAPEEHPVL	x	DR	ACTB	RCC210A, RCC210N, RCC210T, RCC399M
RVAPEEHPVLLT	-	DR	ACTA1	RCC399M
RVDPVNFKLLSH	-	DR	HBA1	RCC210N
SAAIAAMQKFYGLQ	-	DR	MMP14	RCC329M, RCC329N, RCC329T
SAKILADATAMVEA	-	DR	TLN1	RCC399N
SAKILADATAMVEAA	-	DR	TLN1	RCC210T, RCC399N
SALEEYTKKLNQ	-	DR	APOA1	RCC210T

SAPGYLAITKKVAVPY	-	DR	CPE	RCC377M, RCC399M, RCC70T
SASMISNEAVVNILS	-	DR	ENG	RCC399N
SATAYGSTVSKRVAWH	-	DR	APOB	RCC210T, RCC210N, RCC329N, RCC329T
SATRTINVPLR	-	DR	C1QB	RCC210T
SDGLAHLNLIKGT	-	DR	HBB	RCC329T
SDGSFHASSSLTVK	-	DR	FCGRT	RCC210T, RCC210N, RCC329M, RCC329N, RCC329T
SDGSFHASSSLTVKS	-	DR	FCGRT	RCC210N, RCC210T
SDGSFHASSSLTVKSG	-	DR	FCGRT	RCC210A, RCC210T, RCC210N, RCC297M2, RCC329M, RCC329N, RCC329T
SDGSFHASSSLTVKSGD	-	DR	FCGRT	RCC210T, RCC329N
SDGSFHASSSLTVKSGDE	-	DR	FCGRT	RCC210N, RCC329N
SDHINFDPVYKVKPNP	-	DR	IL6ST	RCC399N
SDHINFDPVYKVKPNPP	-	DR	IL6ST	RCC399N
SEEHVWHESGRPVQR	-	DR	HSPG2	RCC297M2
SFNQIARLPSG	-	DR	LUM	RCC70N
SFNQIARLPSGLPV	-	DR	LUM	RCC70N
SGEGDFLAEGGGVR	-	DR	FGA	RCC329M, RCC329T
SGKDYNVTANSKL	-	DR	LDHA	RCC210T, RCC329N, RCC329T
SGPLSLQEVDQHP	-	DR	PEBP1	RCC329N
SGPPVSELITK	-	DR	HIST1H1C	RCC329T
SGPTTYKVTSTLTIK	-	DR	IGHM	RCC210T, RCC329N
SGPTTYKVTSTLTIKE	-	DR	IGHM	RCC210N, RCC210T, RCC329N
SGTDFTLTISRLEP	-	DR	-	RCC329N
SGTDFTLTISRLEPE	-	DR	-	RCC210N, RCC297M2, RCC329M, RCC329N, RCC329T
SGTDFTLTISRLEPED	-	DR	-	RCC210N
SGTYHAWKANAIGRG	-	DR	PSMA7	RCC210N
SHDLVQEAIIDHAQD	-	DR	LAMA4	RCC297M2, RCC329T
SINKVPGNFH	-	DR	ERGIC1	RCC70N
SLGSALRPST	-	DR	VIM	RCC329T
SLGSALRPSTS	-	DR	VIM	RCC329T
SLGSALRPSTSR	-	DR	VIM	RCC329T
SLGSALRPSTSRSS	-	DR	VIM	RCC329M, RCC329N, RCC329T
SLGSALRPSTSRSL	-	DR	VIM	RCC329T
SLGSALRPSTSRSLY	-	DR	VIM	RCC329M
SLPIKESEIIDF	-	DR	RPS2	RCC297M2
SLQFGYNTGVINAPQ	-	DR	SLC2A1	RCC399N
SLSDRYVSHFETEGPH	-	DR	C4A	RCC210T
SLVQDTRIHLVPS	-	DR	AEBP1	RCC70N
SLVSKGTLVQTK	x	DR	HIST1H1A	RCC329M, RCC329N, RCC329T
SLVSKGTLVQTKGTGASGS	-	DR	HIST1H1A	RCC329T
SMPIRKDDEVQVVR	-	DR	RPL26	RCC210T
SMPIRKDDEVQVVRG	-	DR	RPL26	RCC377M
SNDMYHSRALQVVRA	-	DR	CST3	RCC210N
SNKITPIQSKEAY	-	DR	AK4	RCC70N
SNLRFLATTPNSL	-	DR	FN1	RCC210N
SPAFRIEDANLIPP	-	DR	THBS1	RCC297M2
SPELEETLHTITK	-	DR	KNG1	RCC329N
SPHWGSTYSVSVVE	-	DR	PTGDS	RCC210T, RCC329N
SPHWGSTYSVSVVET	-	DR	PTGDS	RCC210N
SPMYSIITPNILR	-	DR	C3	RCC297M2, RCC329N, RCC329T

SPYSYSTTAVVTNPK	-	DR	TTR	RCC210A, RCC210T, RCC210N, RCC297M2, RCC329N
SRAQLGGPEAAKSDETAAK	-	DR	HSPB1	RCC399M
SRGTLLEGLPGLSQ	-	DR	THBS2	RCC297M2
SRGTLLEGLPGLSQR	-	DR	THBS2	RCC297M2
SRLPIIDVAPLDVGAPD	-	DR	COL1A1	RCC297M2, RCC329T
SRSVALAVLA	-	DR	B2M	RCC399T
SSALTTVIATV	-	DR	PTCHD2	RCC399N, RCC399M
SSKFQVDNNRNL	-	DR	A2M	RCC210T, RCC210N, RCC399T, RCC70T
SSKFQVDNNRLL	-	DR	A2M	RCC210N, RCC210T, RCC399N, RCC70T
SSVYEQHESTPLR	-	DR	FN1	RCC210T, RCC210N
SSVYEQHESTPLRGR	-	DR	FN1	RCC210N, RCC210T, RCC329N
SSVYEQHESTPLRGRQ	-	DR	FN1	RCC210N
STGVFTTMEKAGAH	-	DR	GAPDH	RCC377M, RCC70N, RCC70T
STGVFTTMEKAG AHL	-	DR	GAPDH	RCC377M, RCC70N
STPTLVEVSRNLGK	-	DR	ALB	RCC329N, RCC329T, RCC70N
STPTLVEVSRNLGKVG	-	DR	ALB	RCC329M, RCC329N, RCC329T, RCC377M, RCC377N, RCC399M, RCC70M, RCC70N, RCC70T
STPTLVEVSRNLGKVGS	-	DR	ALB	RCC329N, RCC329T, RCC377N, RCC70N, RCC70T
STQLQIDPSLHE	-	DR	HSPG2	RCC210T
STQTLVNVAPRDTT	-	DR	VCAM1	RCC329N
STQTLVNVAPRDTTV	-	DR	VCAM1	RCC329N, RCC329T, RCC399N
SVNKYRGTAGNALMD	-	DR	FGB	RCC210T
SVNKYRGTAGNALMDG	-	DR	FGB	RCC210T, RCC210N, RCC329N, RCC329T
SVPGVRLQLQDSVDF	-	DR	VIM	RCC329T
SVPKEISPDTHLLDLQNN	-	DR	BGN	RCC399N
SVQAPSYGARPVSSA	-	DR	KRT18	RCC399M
SVSSSSYRRMFGGPGTASRPSSS	-	DR	VIM	RCC329T
SVSSVYEQHESTPLR	-	DR	FN1	RCC210T
SVSSVYEQHESTPLRGRQ	-	DR	FN1	RCC210T
SVSTVLTSKY	-	DR	HBA1	RCC70N
SVSTVLTSKYR	-	DR	HBA1	RCC210N, RCC210T
SVWDYAHQHGPDP	-	DR	CTSZ	RCC297M2
SVWDYAHQHGPDE	-	DR	CTSZ	RCC210T, RCC297M2
SVYEQHESTPLR	-	DR	FN1	RCC210A, RCC210T, RCC210N, RCC297M2, RCC329M
SVYEQHESTPLRGR	-	DR	FN1	RCC210N, RCC210T
SVYEQHESTPLRGRGR	-	DR	FN1	RCC210T, RCC210N
SVYEQHESTPLRGRGRQ	-	DR	FN1	RCC210T
SYPARVPPPPPIAR	-	DR	HNRNPC	RCC329M
SYSTTAVVTNPK	-	DR	TTR	RCC210T, RCC210N
SYVGDEAQSQR	-	DR	ACTA1	RCC399M
SYVGDEAQSQRG	-	DR	ACTA1	RCC399M
SYVTTSTRYSLG	-	DR	VIM	RCC329T
TDKPVYTPDQSVKV	-	DR	C5	RCC210T
TERGYSFTTTAERE	-	DR	ACTB	RCC399M
TGENYRGNVAVTVSG	-	DR	PLG	RCC329M, RCC329N, RCC329T, RCC377M, RCC399N
TGENYRGNVAVTVSGHT	-	DR	PLG	RCC329M, RCC329N, RCC377M, RCC399N, RCC70N

TGVFTTMEKAGAH	-	DR	GAPDH	RCC377M, RCC377N, RCC399M, RCC70N, RCC70T
TGVFTTMEKAG AHL	-	DR	GAPDH	RCC377N, RCC377M
THLPKGSAAELMSVV	-	DR	C5	RCC329N
TIEKFEKEAAEMGKG	-	DR	EEF1A1P5	RCC297M2
TILPDARDPAFK	-	DR	LAMP1	RCC70N
TKDTYRHTFTLSLPR	-	DR	CSF1R	RCC210T
TLDSNTKYFHK	-	DR	APOB	RCC210N, RC210T
TLIIYLDKVSHSEDD	-	DR	C3	RCC399N
TLPTKETIEQEKRSE	-	DR	TMSB10	RCC329M
TLVEVSRNLGKVG	-	DR	ALB	RCC70N
TLVEVSRNLGKVG S	-	DR	ALB	RCC70N
TLVEVSRNLGKVGSK	-	DR	ALB	RCC70N
TPDFIVPLTDLRIPS	-	DR	APOB	RCC70M
TPESRYLAQIGDSVSL	-	DR	VCAM1	RCC297M2
TPGKPYILTVPGHLDE	-	DR	C4A	RCC210N, RCC297M2, RCC329N
TPGNALVVDPKKPFRR	-	DR	EHD4	RCC210T, RCC210T
TPHGIILDSVDAAFI	-	DR	HPX	RCC329N, RCC329T
TPILVDGKDVMP EVN	-	DR	GPI	RCC377M
TPKIQVYSRHPA	-	DR	B2M	RCC70T
TPKIQVYSRHPAE	-	DR	B2M	RCC329T
TPKIQVYSRHPAEN	-	DR	B2M	RCC210A, RCC329T, RCC70M
TPPLSSTQLQIDPSLHE	-	DR	HSPG2	RCC210N, RCC399N, RCC70N
TPPLSSTQLQIDPSLHEFQ	-	DR	HSPG2	RCC399N
TPSYVAFTDTERL	-	DR	HSPA1A	RCC329T
TPSYVAFTDTERLIG	-	DR	HSPA1A	RCC297M2, RCC329N
TPTLVEVSRNLGK	-	DR	ALB	RCC329N, RCC329T, RCC70N
TPTLVEVSRNLGKV	-	DR	ALB	RCC377M
TPTLVEVSRNLGKVG	-	DR	ALB	RCC329M, RCC329N, RCC329T, RCC377M, RCC377N, RCC399M, RCC70N, RCC70T
TPTLVEVSRNLGKVG S	-	DR	ALB	RCC329T, RCC377N, RCC70N
TSDHINFDVPYKVKPNPP	-	DR	IL6ST	RCC399N
TSPSPKAGAATGRIVA	-	DR	ATP5B	RCC210N
TTQLTADSHPSYHTDG	-	DR	DNAJC5	RCC210T, RCC210N, RCC399N
TTSTRYSLSGSA	-	DR	VIM	RCC210T
TVETRDGQVINETSQ	-	DR	VIM	RCC329M
TVGGTAYAIYEL	-	DR	COX7A2	RCC70N
TVITVDTKAAGK GK	-	DR	FLNA	RCC399T
TVYLAAVNRLYQLSG	-	DR	PLXND1	RCC329N
TVYLQMNSLRAEDT	-	DR	-	RCC377M
TYGETGGNSPVQEFTVPG	-	DR	FN1	RCC210N
VADIEVDGKQVELA	-	DR	RHOA	RCC399N
VAGDIFKDNAILS NPV	-	DR	SLC34A1	RCC399N
VAGDIFKDNAILS NPVA	-	DR	SLC34A1	RCC399N
VANALAHKYH	-	DR	HBB	RCC210T, RCC70T
VAPEEHPTLLT	-	DR	ACTA1	RCC399M
VAPEEHPVLLT	-	DR	ACTB	RCC399M
VAPEEHPVLLTEAPLNPKA	-	DR	ACTB	RCC399M
VASFVNLNLP SGV	-	DR	C5	RCC70T
VAVISYDGSNKYYADS	-	DR	-	RCC377M
VAVVPSGQEQR	-	DR	HLA-A	RCC329N
VDEVGGEALGRL	-	DR	HBB	RCC210N, RCC70N
VDKVIAQATAFSANPA	-	DR	SDCBP	RCC297M2

VDPENFRLGNVL	-	DR	HBB	RCC297M2
VDPVNFKLLSH	-	DR	HBA1	RCC210N
VDTGIGMTKADLINN	-	DR	HSP90AA1	RCC297M2, RCC329N
VDTGIGMTKADLINNL	-	DR	HSP90AA1	RCC297M2, RCC329N
VEHPEFLKAGKEPG	-	DR	GSN	RCC70N
VEHPEFLKAGKEPGLQ	-	DR	GSN	RCC70N
VELGTQPATQ	-	DR	APOA2	RCC70N
VFDEYLKTTGKPIE	-	DR	ANXA6	RCC210N
VGAGYRLLSRGHTPT	-	DR	HSPG2	RCC70N
VHKAVLTIDEKGTEA	-	DR	SERPINA1	RCC210T, RCC377M, RCC399N, RCC70N
VHKAVLTIDEKGTEAA	-	DR	SERPINA1	RCC210T, RCC210N, RCC210T, RCC377M, RCC399M, RCC399N, RCC70N, RCC70T
VHKAVLTIDEKGTEAAG	-	DR	SERPINA1	RCC210N, RCC210T, RCC377M, RCC399N, RCC70N, RCC70T
VHLTPEEKSA	-	DR	HBB	RCC329T
VHLTPEEKSAVT	-	DR	HBB	RCC210N, RCC210T, RCC329T, RCC70N
VHLTPEEKSAVTA	-	DR	HBB	RCC210N, RCC210T, RCC329T
VHLTPEEKSAVTAL	-	DR	HBB	RCC210T, RCC210N, RCC297M2, RCC329M, RCC329T, RCC377N, RCC399M, RCC70N
VHPDYRQDESYNF	-	DR	C1R	RCC210T
VHPDYRQDESYNFE	-	DR	C1R	RCC210T, RCC210N, RCC70N, RCC70T
VHPDYRQDESYNFEG	-	DR	C1R	RCC210T, RCC210N, RCC399M, RCC399N, RCC70M, RCC70N, RCC70T
VHPDYRQDESYNFEGD	-	DR	C1R	RCC210T
VHPISTQSPDLEPI	-	DR	KNG1	RCC329N, RCC329T
VHPKVTVYPSKT	-	DR	HLA-DRB1	RCC399M
VIALKNNQKSEPL	-	DR	FN1	RCC70N
VIGEPIDERGPIK	-	DR	ATP5B	RCC399M
VITVDTKAAGKG	-	DR	FLNA	RCC210T
VIVPLKTGLQE	-	DR	C3	RCC329N, RCC329T
VIVPLKTGLQEVE	-	DR	C3	RCC329N, RCC329T
VKEYAQVFREHANK	-	DR	CTNNA1	RCC70N
VLSAAAGGKNLKSP	-	DR	IFNAR1	RCC210T, RCC70T
VLSPADKTNVK	x	DR	HBA1	RCC210T, RCC329M, RCC329T, RCC70N
VLSPADKTNVKA	x	DR	HBA1	RCC210T, RCC210N, RCC329T, RCC399M, RCC70N
VLSPADKTNVKAAWG	-	DR	HBA1	RCC210T
VTIDEKGTEAAG	-	DR	SERPINA1	RCC70N
VMDDTGLVPGR	-	DR	PTPRB	RCC70N
VNGFGRIGRLVTR	-	DR	GAPDH	RCC377M, RCC70N
VNGFGRIGRLVTRA	-	DR	GAPDH	RCC377M, RCC70N
VNSLAEVHRLY	-	DR	POLG	RCC210T, RCC399T
VNVAPRDTTV	-	DR	VCAM1	RCC70N
VNVDEVGGGALGRL	-	DR	HBB	RCC399M
VPKTFVNITPAEVG	-	DR	PFN1	RCC297M2
VPKTFVNITPAEVGL	-	DR	PFN1	RCC297M2
VPKEISPD TTL	-	DR	BGN	RCC70N
VPKEISPD TTLDLQN	-	DR	BGN	RCC399N

VPKEISPDTTLLDLQNN	-	DR	BGN	RCC399N
VPYVIVPLKTGLQE	-	DR	C3	RCC329M, RCC329N, RCC329T
VPYVIVPLKTGLQEVE	-	DR	C3	RCC329M, RCC329N, RCC329T
VQDTRIHVPS	-	DR	AEBP1	RCC70N
VRDMRQTVAVGVK	-	DR	EEF1A2	RCC210N, RCC210T, RCC329N, RCC329T
VRQQYESVAAKNLQE	-	DR	VIM	RCC329N
VRSLVQDTRIHVPS	-	DR	AEBP1	RCC377M, RCC399N, RCC70T
VSASMISNEAVVNILS	-	DR	ENG	RCC399N
VSASMISNEAVVNILSS	-	DR	ENG	RCC399N
VSETESRGSESGIFTN	-	DR	FGA	RCC70N
VSGGIGALVRLKSLQGD	-	DR	TGFBI	RCC329M
VSGVALDPKNNLVIF	-	DR	PAM	RCC399N
VSGVALDPKNNLVIFH	-	DR	PAM	RCC210N, RCC399N
VSHEFAINFNPTNPF	-	DR	CPNE2	RCC329T, RCC399N
VSSVYEQHESTPL	-	DR	FN1	RCC210N
VSSVYEQHESTPLR	-	DR	FN1	RCC210A, RCC210T, RCC210N, RCC297M2, RCC329M, RCC329N, RCC329T
VSSVYEQHESTPLRG	-	DR	FN1	RCC210A, RCC210T, RCC210N, RCC297M2, RCC329N
VSSVYEQHESTPLRGR	-	DR	FN1	RCC210A, RCC210T, RCC210N, RCC297M2, RCC329N, RCC329T
VSSVYEQHESTPLRGRQ	-	DR	FN1	RCC210T, RCC210N
VSTPTLVEVSRNLGKVG	-	DR	ALB	RCC329N, RCC329T, RCC377M, RCC70N
VSTPTLVEVSRNLGKVGS	-	DR	ALB	RCC329T, RCC377N, RCC70N
VSTVLTSKYR	x	DR	HBA1	RCC210N
VSVSSVYEQHESTPLR	-	DR	FN1	RCC210T
VSWLIDANHNM	-	DR	ENG	RCC399N
VSWLIDANHNMQ	-	DR	ENG	RCC399N
VSWQPPRARITGY	-	DR	FN1	RCC399T
VTAPGHTIVPSTASPPVSSA	-	DR	PAX2	RCC377N
VTTSTRYSLG	-	DR	VIM	RCC399M
VVAGVANALAHKYH	-	DR	HBB	RCC210N, RCC210T, RCC329T, RCC70T
VVEHPEFLKAGKEPG	-	DR	GSN	RCC70N
VVINPYKNLPIYSEE	-	DR	MYH9	RCC399M
VVSLGSPSGEVSHPRKT	-	DR	AHSG	RCC329T
VWVPSDKSGFEPASL	-	DR	MYH9	RCC399M
VWVPSDKSGFEPASLKEEVGEEA	-	DR	MYH9	RCC399M
WRPSLVPASAENVNK	-	DR	ITIH4	RCC210T
WVAVVPSGQEQR	-	DR	HLA-A	RCC329N
YAGKYVPAIAHLIH	-	DR	CPVL	RCC297M2, RCC329M, RCC329T
YAGKYVPAIAHLIHS	-	DR	CPVL	RCC297M2
YALAQMGRLKGPL	-	DR	C3	RCC329T
YALPHAILRL	-	DR	ACTB	RCC399M
YASGRTTGIVM	x	DR	ACTB	RCC399M
YASGRTTGIVMDSGD	-	DR	ACTB	RCC399M
YASGRTTGIVMDSGDGVTHTVPIYEG	-	DR	ACTB	RCC399M
YDESGPSIVHRK	x	DR	ACTB	RCC210N, RC399M, RCC70N
YDMNAANVGWNNSTFA	-	DR	MIF	RCC297M2
YEEIAQRSKEEAAL	-	DR	KRT2	RCC377T
YELDEKAVRPG	-	DR	VTN	RCC210T
YELPDGQVITIGNER	-	DR	ACTA1	RCC399M

YELPDGQVITIGNERF	-	DR	ACTA1	RCC399M
YGNNIRTVARVPGPA	-	DR	PLXND1	RCC329N
YKFQNALLVRYT	-	DR	ALB	RCC297M2
YLQMNSLRAEDT	-	DR	-	RCC377M
YNELRVAPEEHPVL	-	DR	ACTB	RCC399M
YPGKIDVHWTRA	-	DR	AZGP1	RCC210N
YPGKIDVHWTRAGEVQ	-	DR	AZGP1	RCC210T
YSIITPNILR	-	DR	C3	RCC297M2
YSIITPNILRL	-	DR	C3	RCC210T, RCC329N
YSIITPNILRLE	-	DR	C3	RCC297M2
YSKQFTSSTSYNRGDS	-	DR	FGA	RCC210T
YSTTAVVTNPK	-	DR	TTR	RCC210N
YTELSSTRGYSIFS	-	DR	CRP	RCC329T
YVDLDDKKEVWH	-	DR	HLA-DPA1	RCC210T, RCC70N, RCC70T
YVDLDDKKEVWHLE	-	DR	HLA-DPA1	RCC210N
YVFNTASLVYH	-	DR	LBP	RCC329N, RCC329T, RCC70N
YVFNTASLVYHEE	-	DR	LBP	RCC329N, RCC329T, RCC377M, RCC399N, RCC70N
YVTTSTRTYS	-	DR	VIM	RCC210T
YVTTSTRTYSLG	-	DR	VIM	RCC210T, RCC329T
YVTTSTRTYSLGSA	-	DR	VIM	RCC210T, RCC329T
YYIQDQTKGDYQK	-	DR	ANXA2	RCC210A, RCC210N, RCC210T, RCC377M, RCC399M, RCC399N, RCC70T
YYIQDQTKGDYQKA	-	DR	ANXA2	RCC210T, RCC377M, RCC399N
YYYIQDQTKGDYQK	-	DR	ANXA2	RCC399N

Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die vorliegende Arbeit wurde am Interfakultären Institut für Zellbiologie in der Abteilung für Immunologie unter der Betreuung von Professor Dr. Stefan Stevanović durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Direktor des Instituts Professor Dr. Hans-Georg Rammensee und dem Gruppenleiter und Betreuer Professor Dr. Stefan Stevanović.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Marc Günder, Christian Hotz und Ursula Kohlhofer von mir eigenständig durchgeführt. Die laborinterne Datenbank zum Abgleich von HLA-Liganden, insbesondere von Liganden aus mononukleären Zellen, wurde von den Diplomanden und Doktoranden der letzten Jahre (u.a. Heiko Schuster, Daniel Kowalewski und Nico Trautwein) aus dem Interfakultären Institut für Zellbiologie zur Verfügung gestellt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Aus dieser Arbeit ging die später aufgeführte Publikation mit dem Namen „Carcinogenesis of renal cell carcinoma reflected in HLA ligands: A novel approach for synergistic peptide vaccination design“ hervor.

Hierbei stellte Moreno Di Marco HLA-Liganden aus Nierenzellkarzinomen und gesunden Nierengewebe zur Validierung der identifizierten Peptide zur Verfügung. Die für den Abgleich von HLA-Liganden notwendigen Peptide aus PBMCs und BMDCs isolierten vor allem Daniel Kowalewski und Heiko Schuster. Jörg Hennenlotter aus der Abteilung für Urologie am Uniklinikum Tübingen akquirierte sämtliche Gewebeproben, wobei die Bereitstellung der notwendigen Infrastruktur für die Operationen durch den Leiter der Abteilung Professor Dr. Arnulf Stenzl gewährleistet wurde. Professor Dr. Hans-Georg Rammensee und Professor Dr. Stefan Stevanović waren an der Konzeption des Projektes

beteiligt, stellten sämtliche Laborressourcen zur Verfügung und betreuten mit großer Sorgfalt diese Publikation.

Mein Anteil bei der eben genannten Publikation bestand in der Durchführung aller Experimente zur Generierung der Primärdaten, in der Konzeption einer neuen Auswertungsmethodik für HLA-Liganden durch Netzwerkanalysen, in der Durchführung sämtlicher notwendiger Analysen und Statistiken sowie in der Verfassung der Publikation und der Antworten im Review-Prozess.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

A handwritten signature in black ink, reading "Martin Klatt". The signature is written in a cursive, flowing style.

Stuttgart, den 11.09.2016

Publikation

Klatt MG, Kowalewski DJ, Schuster H, DiMarco M, Hennenlotter J, Stenzl A, Rammensee HG, Stevanović S. Carcinogenesis of renal cell carcinoma reflected in HLA ligands: a novel approach for synergistic peptide vaccination design. *Oncoimmunology* 2016; 5:8. DOI:10.1080/2162402X.2016.1204504.

Danksagung

Mein Dank geht an so viele Menschen, dass es nicht möglich wäre, sie alle im Rahmen dieser Danksagung aufzuzählen. Dennoch möchte ich es immerhin versuchen, wenigstens einem besonders wichtigen Teil von ihnen hier meinen herzlichen Dank auszusprechen.

Zuerst danke ich Professor Dr. Hans-Georg Rammensee dafür, dass er so nett und freundlich auf meine Anfrage nach einer Doktorarbeit in seinem Institut geantwortet hat und mir die Möglichkeit gab, meine Dissertation in seinem Institut durchführen zu können. Seine fachliche Kompetenz sowie seine offene wie liebenswerte Art bestimmen das Klima in diesem wunderbaren Institut.

An zweiter Stelle danke ich Professor Dr. Stefan Stevanović dafür, dass er es anschließend zum wiederholten Male auf sich genommen hat, einen Medizinstudenten zu seiner Dissertation zu verhelfen. Ich hoffe sehr, dass noch viele weitere Studenten sich in Zukunft glücklich schätzen dürfen, einen so kompetenten, freundlichen, fröhlichen, immer Zeit habenden (auch wenn er eigentlich keine hat) und engagierten Betreuer zu haben.

Ohne die Hilfe vieler lieber Kolleginnen und Kollegen wäre diese Arbeit schließlich niemals entstanden. Ich habe mich von Anfang an wohl in diesem Institut gefühlt und dass verdanke ich all den lieben und begeisterten Elchen, welche dort gearbeitet haben, immer noch oder jetzt auch wieder dort arbeiten. Euch allen danke ich ganz herzlich für sämtliche Hilfe, Unterstützung und für eine schlicht und ergreifend wunderschöne Zeit! Ich bin sehr glücklich, auch ein Elch zu sein!

Ein besonderer Dank geht nach Boston an Professor W. Nicholas Haining. Während meiner aufregenden Zeit in seinem Labor am DFCI brachte er mir die Netzwerkanalysen näher, welche der Schlüssel zum Erfolg dieser Arbeit wurden - ein wirklich sehr unverhofftes Glück.

Außerdem danke ich von ganzem Herzen meiner gesamten Familie für all die Freude, Kraft und den Rückhalt. Danke für all die lieben motivierenden Worte, das Verständnis und die vielen schönen Stunden mit euch.

Keiner dieser Schritte wäre jedoch möglich gewesen ohne die unermessliche Unterstützung meiner Eltern. Ich danke euch für alles, was ihr mir ermöglicht, eure unendliche Liebe, Geduld und alles Glück, das ich mit und durch euch erlebt habe.

Die letzten Worte dieser Arbeit widme ich Nika:

Danke für Deine Geduld. Danke für Dein Verständnis. Danke für Deine Liebe. Danke, dass es Dich gibt!

Lebenslauf

Martin Gunther Klatt
geboren am 04.03.1986 in Kitzingen

Ausbildung

2007 - 2014 Studium der Humanmedizin
Eberhard Karls Universität Tübingen

23.05.2014 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

04/2009 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

1996 - 2005 Armin-Knab-Gymnasium, Kitzingen

Arbeitserfahrung

seit 07/2014 Assistenzarzt am Uniklinikum Tübingen
Abteilung für Hämatologie und Onkologie

Wissenschaftliche Tätigkeit

03/2010 - 09/2016 Promotion am Interfakultären Institut für Zellbiologie
Abteilung Immunologie, Universität Tübingen
Thema: „Netzwerkanalysen von Quellproteinen aus
HLA-Liganden von Primärtumoren und Metastasen des
Nierenzellkarzinoms: Ein neuer Ansatz zur Identifikation
von tumorassoziierten Antigenen und Peptiden.“

02 - 08/2012 Forschungsaufenthalt bei Prof. W. Nicholas Haining
Dana-Farber Cancer Institute, Boston, USA

Stipendien

2010 - 2011 Graduiertenkolleg 794: „Zelluläre Mechanismen
immunassoziierter Prozesse.“

2007 - 2014 Studienstiftung des Deutschen Volkes

Publikationen

Klatt MG, Kowalewski DJ, Schuster H, DiMarco M, Hennenlotter J, Stenzl A, Rammensee HG, Stevanović S. Carcinogenesis of renal cell carcinoma reflected in HLA ligands: a novel approach for synergistic peptide vaccination design. *Oncoimmunology* 2016; 5:8. DOI:10.1080/2162402X.2016.1204504.

Kurachi M, Barnitz RA, Yosef N, Odorizzi PM, Dilorio MA, Lemieux ME, Yates K, Godec J, Klatt MG, Regev A, Wherry EJ, Haining WN. The transcription factor BATF operates as an essential differentiation checkpoint in early effector CD8+ T cells. *Nat Immunol* 2014; 15:373-83.