

**Bestimmung von Sequenzmotiven  
natürlicher Peptidisolate aus  
MHC-Klasse I und II-Molekülen**

**DISSERTATION**

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

**zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften**

**2001**

**vorgelegt von**

**VOLKER GNAU**

Tag der mündlichen Prüfung: 12. April 2001

Dekan: Prof. Dr. Hansgeorg Probst

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Günther Jung

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Jörg Metzger

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von

**Herrn Professor Dr. Günther Jung**

in der Zeit von Januar 1993 bis Dezember 1995

am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Professor Dr. Günther Jung danke ich sehr herzlich für die interessante Themenstellung, die hervorragenden Arbeitsbedingungen in seinem Arbeitskreis, seine uneingeschränkte Unterstützung sowie sein mir entgegengebrachtes Vertrauen.

## **Danksagung**

*Mein Dank gilt darüber hinaus all jenen, die meine Arbeit mit Rat und Tat unterstützten:*

Herrn Dr. Stefan Stevanovic (meinem Jefe) für seine allzeitige Ansprechbarkeit und seine Unterstützung während der gesamten Zeit dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Jörg W. Metzger und Herrn Dr. Christoph Kempter für die Einweisung in die Massenspektrometrie und für die Aufnahme von unzähligen Massenspektren.

Herrn Dr. Dieter Stoll für viele fruchtbare Diskussionen und für seinem festen Glauben an die Vollendung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Dietmar Kaiser für seine ständige Hilfsbereitschaft und seine „Modelling-Qualitäten“.

Herrn Dr. Wolfgang Kraas für die zahlreichen Peptidsynthesen und für die Verbesserung meiner „Rückhand“.

Frau Maria Munari für die Einweisung in die automatisierte Aminosäurenanalytik.

Frau Ursula Becker für die Erledigung organisatorischer Aufgaben und nicht nur dieser.

Meiner zahlreichen „Kundschaft“

Meinen ehemaligen Laborkolleginnen und Laborkollegen, insbesondere Frau Dr. Susanne Feiertag. Darüber hinaus: Frau Dr. Insa Flechsler, Frau Dr. Heike Otto, Herrn Dr. Jörg Früchtel, Herrn Dr. Hans Georg Ihlenfeldt, Herrn Dr. Stefan Kienle, Herrn Dr. Andrej Surovoy, Herrn Dr. Karl-Heinz Wiesmüller und Herrn Dr. Norbert Zimmermann.

Den Mitarbeitern des AK Rammensee insbesondere Frau Dr. Kirsten Falk und Herrn Dr. Olaf Röttschke, die immer dafür Sorge trugen, dass die Proben zum Sequenzieren niemals ausgingen.

Herrn Prof. Dr. Artur Melms und Herrn Dr. Georg Malcherek für die extrem gute Zusammenarbeit und für viele gemeinsam verbrachte Stunden.

Den Mitarbeitern im AK Götz, insbesondere Frau Dr. Birgitt Ottenwälder und Herrn Dr. Thomas Kupke für die gute interdisziplinäre Zusammenarbeit.

Meiner Familie, insbesondere meiner Frau, danke ich für ihre Geduld, Anteilnahme und liebevolle Unterstützung und dafür, dass sie die vielen Arbeitsstunden am Abend und an den Wochenenden, die für diese Arbeit genutzt wurden, so klaglos akzeptierte.

*Meiner Familie*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Das Immunsystem	1
1.1.1	Der Histokompatibilitäts Komplex	2
1.1.2	Die MHC-Klasse-I und Klasse-II Gene und Proteine	3
1.1.3	Die Struktur von MHC-Klasse-I Proteinen und die Selektivität der Peptidbindung	4
1.1.4	Die Struktur von MHC-Klasse-II Proteinen und die Selektivität der Peptidbindung	6
1.1.5	Die Charakteristik der MHC-Molekül-Peptidbindung	7
1.1.6	Synthese, Transport und Beladung von MHC-Molekülen	8
1.1.7	Die MHC-Klasse-I abhängige Antigenprozessierung	8
1.1.8	Das Proteasom	9
1.1.9	Der TAP Heterodimer	10
1.1.10	Die Peptidbindung an MHC-Klasse-I	10
1.1.11	Die Antwort der T-Zelle (CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen)	12
1.1.12	Die MHC-Klasse-II Prozessierung	13
1.1.13	Die Antwort der T-Zellen (CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen)	16
1.1.14	Der Crosstalk	18
1.2	Lantibiotika	19
1.2.1	Biosynthese der Lantibiotika	20
1.2.2	Klassifizierung und Eigenschaften von Lantibiotika	22
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>23</b>
2.1	Chemikalien und Lösungsmittel	23
2.2	Analytik	23
2.2.1	Hochdruckflüssigkeitschromatographie	23
2.2.2	Massenspektrometrie	24
2.2.3	UV/VIS-Spektroskopie	25
2.2.4	Aminosäurenanalyse	25
2.2.5	Automatische Protein- und Peptidsequenzierung	26
2.2.6	Peptidmodifikationen für die Sequenzanalyse	28
2.2.6.1	Detektion von Cysteinresten	28
2.2.6.2	Sequenzierung von Lanthionin und 3-Methylanthionin und der $\alpha$ , $\beta$ -ungesättigten Aminosäuren 2,3-Didehydroalanin und (Z)-2,3 Didehydrobutyrin	28
2.3	Synthesen	29
2.3.1	Automatische Festphasensynthese von Einzelpeptiden	29
2.3.2	Multiple Peptidsynthese am Syro, Version 1.0	30
2.3.3	Synthese von Peptidmischungen nach der Premix-Methode	32
2.3.4	Biotinylierungen	33
2.3.4.1	N-terminale Biotinylierungen	33

2.3.4.2	C-terminale Biotinylierung	34
2.3.5	Reduktionsverfahren für S-oxidiertes Methionin	35
2.3.6	Abspaltungen	35
2.3.6.1	Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe	35
2.3.6.2	Abspaltung vom polymeren Träger	36
2.3.7	Visualisierung der Rezeptor Ligand Wechselwirkung	36

### **3 ERGEBNISSE 37**

3.1	Poolsequenzierung von MHC-Klasse-I-Liganden	37
3.1.1	Das HLA-B7-Ligandenmotiv	37
3.1.2	Das HLA-A1-Ligandenmotiv	42
3.1.3	Das HLA-A3-Ligandenmotiv	45
3.1.4	Das HLA-A*1101 (HLA-A11)-Ligandenmotiv	47
3.1.5	Das HLA-A24-Ligandenmotiv	50
3.1.6	Das HLA-A31-Ligandenmotiv	50
3.1.7	Das HLA-A*3303-Ligandenmotiv	54
3.1.8	Das HLA-B*2702-Ligandenmotiv	57
3.1.9	Das HLA-B*2705-Ligandenmotiv	60
3.1.10	Das HLA-B*3801-Ligandenmotiv	63
3.1.11	Peptid Motive von HLA-B39 Subtypen	65
3.1.12	Ligandenmotive von HLA-B51 Subtypen	69
3.1.13	Das HLA-B*5201-Ligandenmotiv	74
3.1.14	Teilinformation über das HLA-B*7801-Ligandenmotiv	77
3.1.15	Das HLA-B58-Ligandenmotiv	79
3.1.16	Das HLA-B60-Ligandenmotiv	81
3.1.17	Das HLA-B61-Ligandenmotiv	83
3.1.18	Das HLA-B62-Ligandenmotiv	86
3.2	Poolsequenzierung von MHC-Klasse-II-Liganden	88
3.2.1	Das HLA-DR17-Ligandenmotiv	89
3.2.2	Ligandenmotive von HLA-DR4 Subtypen	94
3.2.2.1	Das HLA-DR4Dw4 (DRB1*0401)-Ligandenmotiv	95
3.2.2.2	Das HLA-DR4Dw10 (DRB1*0402)-Ligandenmotiv	99
3.2.2.3	Das HLA-DR4Dw14 (DRB1*0404)-Ligandenmotiv	102
3.2.2.4	Das HLA-DR4Dw15 (DRB1*0405)-Ligandenmotiv	103
3.3	Interaktion natürlicher Liganden mit DR17-Molekülen: Das HLA-DR17-Ligandenmotiv	109
3.3.1	Affinität natürlicher Peptide zu HLA-DR17	109
3.3.2	Sequenzabhängige, spezifische und sequenzunabhängige, unspezifische Kontaktstellen	111
3.3.3	Spezifische Interaktion der Peptidseitenketten	112
3.3.4	Doppelsubstitutionen und negative Effekte	112
3.3.5	Modulation allelspezifischer Bindungseigenschaften	115
3.3.6	Charakterisierung der Interaktion von Klasse-II-assoziierten Peptiden der invarianten Kette (CLIPs) mit HLA-DR-Molekülen	116
3.3.7	Affinität der CLIP-Peptide zum HLA-DR17-Rezeptor	117

3.3.8	Minimalepitop der CLIPs für die Bindung an das HLA-DR17-Molekül	117
3.3.9	Detaillierte Beschreibung der Ankerpositionen	118
3.3.10	„Molecular Modelling“ der Bindung von CLIP Ii(106-117) in der Bindungstasche des HLA-DR1-Rezeptors	118
3.4	Edman-Abbau von Lantibiotika	129
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>133</b>
4.1	Das HLA-DR17-Ligandenmotiv	134
4.2	Die Supermotive der Klasse-II-assoziierten Peptide der Invarianten Kette (CLIPs)	137
4.2.1	Ankerpositionen	138
4.2.2	Sequenzunabhängige Interaktionen	139
4.2.3	Bindungsepitop und Bindungsaffinität der CLIPs	140
4.2.4	Supermotive der CLIPs für die Interaktion mit MHC-Klasse-II-Molekülen	140
4.3	Molecular Modelling	142
4.4	Die HLA-DR4-Ligandenmotive	142
4.4.1	Belegung der P1-Tasche	142
4.4.2	Belegung der P4-Tasche	143
4.4.3	Belegung der P6-Tasche	144
4.4.4	Belegung der P7-Tasche	145
4.4.5	Belegung der P9-Tasche	145
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>147</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>149</b>

## Abkürzungen

AA	<i>Amino Acid</i> / Aminosäure
Abb.	<i>Abbildung</i>
$\alpha$ 1AT	<i>alpha</i> 1- <i>Antitrypsin</i>
APCs	<i>Antigen Presenting Cell</i> / Antigen präsentierende Zelle
API	<i>Atmospheric Pressure Ionisation</i>
ApoB	<i>Apolipoprotein B</i> 100
ATP	<i>Adenosintriphosphat</i>
ATZ	<i>Anilinothiazolidinon</i>
Boc	tert.- <i>Butyloxycarbonyl</i>
CD4/8	<i>Cluster of differentiation</i> ; internationalstandardisierte Nomenclatur für Antigene auf Zelloberflächen, die mit spezifischen monoklonalen Antikörpern nachweisbar sind → Differenzierung von Zelltypen/ Zellaktivität. (Vorhandensein oder Fehlen dieser Marker wird durch <sup>+/-</sup> angegeben)
CLIP	<i>class-II-associated invariant chain peptide</i> / Klasse II-assoziertes Peptid der invarianten Kette
C-terminal	carboxyterminal
CTL	<i>cytotoxische T-Lymphozyten</i>
DCM	<i>Dichlormethan</i>
Dha	<i>Dehydroalanin</i>
Dhb	<i>Dehydrobutyrin</i>
DIC	<i>Diisopropylcarbodiimid</i>
DIEA	<i>Diisopropylethylamin</i>
DMF	<i>Dimethylformamid</i>
Dmtr	<i>Dimethoxytrityl</i>
EBV	<i>Epstein-Barr-Virus</i>
EDT	<i>Ethandithiol</i>
eq.	<i>equivalent</i> / Äquivalent(e)
ER	<i>endoplasmatisches Retikulum</i>
Fmoc	9- <i>Fluorenyl-methoxycarbonyl</i>
gp	<i>Glykoprotein</i>
HA	<i>Hämagglutinin-Protein</i>
HLA	<i>human leucocyte antigen</i> / humanes Leukozyten Antigen
HOBt	1- <i>Hydroxybenzotriazol</i>

HPLC	<b>H</b> igh <b>P</b> erformance <b>L</b> iquid <b>C</b> hromatography (Hochdruckflüssigkeitschromatographie)
HSP	<b>H</b> itze- <b>S</b> hock- <b>P</b> rotein
Ii	<b>I</b> nvariant chain / invariante Kette
IL-1/-2	<b>I</b> nterleukin 1 / <b>I</b> nterleukin 2 ...
kD	<b>k</b> ilo- <b>D</b> alton
Lan	<b>L</b> anthionin
MeLan	3- <b>M</b> ethyl <b>l</b> anthionin
MeOH	Methanol
MHC	<b>m</b> ajor <b>h</b> istocompatibility <b>c</b> omplex / Haupt-Histokompatibilitätskomplex
Mtr	4- <b>M</b> ethoxy-2,3,6- <b>t</b> rimethylbenzyl-sulfonyl
NMP	<b>N</b> - <b>M</b> ethylpyrrolidon
NMR	<b>N</b> uclear <b>M</b> agnetic <b>R</b> esonance / Magnetische Kernresonanz (Spektroskopie)
N-terminal	aminoterminal
P1 / P2	<b>P</b> osition <b>1</b> / <b>P</b> osition <b>2</b> ...
PEG	<b>P</b> olyethylenglycol
PITC	<b>P</b> henyl <b>i</b> sothiocyant (Edman Reagenz)
Pmc	2,2,5,7,8- <b>P</b> entamethylchroman-6-sulfonyl
PTC	<b>P</b> henylthiocarbamoyl (Aminosäure)
PTH	<b>P</b> henylthiohydantoin (Aminosäure)
RP	<b>R</b> eversed <b>P</b> hase, Umkehrphase (RP-HPLC)
rpm	<b>r</b> evolutions <b>p</b> er <b>m</b> inute / Umdrehungen pro Minute
RT	<b>R</b> aum <b>t</b> emperatur
Tab.	<b>T</b> abelle
TAP	<b>T</b> ransporter associated with <b>A</b> ntigen <b>P</b> rocessing
TBTU	<b>B</b> enzotriazol-1-yl-oxy- <b>t</b> etramethyl <b>u</b> ronium tetrafluoroborat
tBu	<b>t</b> ert.- <b>B</b> utyl
Th <sub>1</sub> / Th <sub>2</sub>	<b>T</b> - <b>H</b> elfer-1 Zellen / <b>T</b> - <b>H</b> elfer-2 Zellen
TCR	<b>T</b> cell <b>r</b> eceptor / T-Zellrezeptor (Typ 1 oder 2)
TFA	<b>T</b> ri <b>f</b> luoroacetic <b>A</b> cid / Trifluoressigsäure
TF-R	<b>T</b> ransferrin <b>r</b> ezeptor
UV	nahes <b>U</b> ltraviolett (200-400 nm)
VIS	<b>V</b> isible. Sichtbarer Wellenlängenbereich (400-800 nm)

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1.1</b>	Schematische Darstellung der Genorganisation des humanen HLA-Komplexes	3
<b>Abb. 1.2</b>	Vergleich der Röntgenstrukturen von HLA-Klasse-I (HLA-Aw68) und Klasse-II (HLA-DR1).	5
<b>Abb. 1.3</b>	MHC-Klasse-I-abhängige Antigenprozessierung	11
<b>Abb. 1.4</b>	Struktur der humanen Invarianten Kette mit den verschiedenen Längen und Modifikationen	14
<b>Abb. 1.5</b>	Modell des Ii-Trimers und des MHC Klasse II-Ii-Komplexes	15
<b>Abb. 1.6</b>	Intrazellulärer Transport und Manipulation des MHC-Klasse-II-Invariante Kette Komplexes	17
<b>Abb. 1.7</b>	Strukturformeln von ungewöhnlichen Aminosäuren in Lantibiotika.	19/20
<b>Abb. 1.8</b>	Modell der Epiderminbiosynthese	21
<b>Abb. 2.1</b>	Aufbau des Biotin-Amid-Harzes	34
<b>Abb. 3.1</b>	Poolsequenzierung von HLA-B*0701 gebundenen Selbstpeptiden	39/40
<b>Abb. 3.2</b>	Repräsentative RP-HPLC-Auftrennung von HLA-DR 17-eluierten Peptiden	88
<b>Abb. 3.3</b>	Poolsequenzierung von HLA-DR17 gebundenen Selbstpeptiden	90/91
<b>Abb. 3.4</b>	HPLC-Chromatogramm der HLA-DR4Dw4-eluierten Peptide	96
<b>Abb. 3.5</b>	HPLC-Chromatogramm der HLA-DR4Dw10-eluierten Peptide	99
<b>Abb. 3.6</b>	HPLC-Chromatogramm der HLA-DR4Dw14-eluierten Peptide	103
<b>Abb. 3.7</b>	HPLC-Chromatogramm der HLA-DR4Dw15-eluierten Peptide	106
<b>Abb. 3.8</b>	Bindung verschiedener natürlicher DR17-Liganden an HLA-DR17-Moleküle	110
<b>Abb. 3.9</b>	Bindung eingekürzter Alanin-Derivate des Selbstpeptids ApoB(2877-92) an HLA-DR17-Moleküle	111
<b>Abb. 3.10</b>	Die Bindungskapazität des natürlichen DR17-Liganden $\alpha$ 1AT(149-64) verglichen mit einfachen Alanin Substitutionsvarianten	112
<b>Abb. 3.11</b>	Die Bindungskapazität des natürlichen DR17-Liganden $\alpha$ 1AT(149-64) verglichen mit Doppelsubstitutionsanaloga	113
<b>Abb. 3.12</b>	Konvertierung natürlicher HLA-DR1 und -DR12-Liganden zu HLA-DR17 bindenden Peptiden	116
<b>Abb. 3.13</b>	Die Bindungskapazität von CLIP(97-120) im Vergleich zu konventionellen HLA-DR17 Selbstpeptiden	117
<b>Abb. 3.14</b>	Kartierung der Bindungsstelle von CLIPs	118
<b>Abb. 3.15</b>	Analyse der sequenzabhängigen Kontaktstellen der CLIPs	119
<b>Abb. 3.16</b>	Modulation allelspezifischer Kontaktstellen an DR17	120
<b>Abb. 3.17</b>	Charakterisierung der CLIP Bindungsstelle an DR17	121
<b>Abb. 3.18</b>	Kartierung der Bindungsstellen von CLIPs an DR1	122
<b>Abb. 3.19</b>	Bestimmung des Beitrags der einzelnen Kontaktstelln zur Bindung an DR1	123
<b>Abb. 3.20</b>	Die Kristallstruktur des cokrystallisierten HLA-DR3-CLIP Komplexes	126
<b>Abb. 3.21</b>	Die Ribbon Darstellung der Kristallstruktur von HLA-DR1	127
<b>Abb. 3.22</b>	Aufsicht auf die Connolly Oberfläche der HLA-DR1 Bindungsstelle	128
<b>Abb. 3.23</b>	Primärstruktur des Lantibiotika Gallidermin	129
<b>Abb. 3.24</b>	Reaktionsschema ungewöhnlicher Aminosäuren aus Lantibiotika mit alkalischer Propanthiol-Lösung	131
<b>Abb. 3.25</b>	Sequenzanalyse des modifizierten Gallidermins	132
<b>Abb. 4.1</b>	Schematische Darstellung der MHC-Klasse-II Peptid-Interaktion	136
<b>Abb. 4.2</b>	Vergleich der Röntgenstrukturdaten der HA 306-318 Bindung an HLA-DR1 und der CLIP-Bindung an HLA-DR3	139

## Verzeichnis der Tabellen

<b>Tab. 2.1</b>	Ablauf des Edman-Abbaus im Protein Sequencer 477A.	27
<b>Tab. 2.2</b>	Seitenschutzgruppen der Aminosäuren für die Standardpeptidsynthese	29
<b>Tab. 2.3</b>	DIC-Synthesezyklus am multiplen Peptidsynthesizer	30
<b>Tab. 2.4</b>	TBTU/DIC-Synthesezyklus am multiplen Peptidsynthesizer	31
<b>Tab. 2.5</b>	Synthesezyklus der Kupplung der X-Position am Syro. Vers.1.0.	32
<b>Tab. 3.1</b>	Poolsequenzierung von HLA-B*0701-eluierten Peptiden.	38
<b>Tab. 3.2</b>	Das HLA-B*0701-Motiv	41
<b>Tab. 3.3</b>	Poolsequenzierung von HLA-A1-eluierten Peptiden	43
<b>Tab. 3.4</b>	Das HLA-A1-Motiv	44
<b>Tab. 3.5</b>	Poolsequenzierung von HLA-A3-eluierten Peptiden	46
<b>Tab. 3.6</b>	Das HLA-A3-Motiv	47
<b>Tab. 3.7</b>	Poolsequenzierung von HLA-A*1101-eluierten Peptiden	48
<b>Tab. 3.8</b>	Das HLA-A*1101-Motiv	49
<b>Tab. 3.9</b>	Poolsequenzierung von HLA-A24-eluierten Peptiden	51
<b>Tab. 3.10</b>	Das HLA-A24-Motiv	52
<b>Tab. 3.11</b>	Poolsequenzierung von HLA-A*31012-eluierten Peptiden	53
<b>Tab. 3.12</b>	Das HLA-A*31012-Motiv	54
<b>Tab. 3.13</b>	Poolsequenzierung von HLA-A3303-eluierten Peptiden.	55
<b>Tab. 3.14</b>	Das HLA-A3303-Motiv	56
<b>Tab. 3.15</b>	Poolsequenzierung von HLA-B*2702 eluierten Peptiden	58
<b>Tab. 3.16</b>	Das HLA-B*2702-Motiv	59
<b>Tab. 3.17</b>	Das HLA-B*2705-Motiv	61/62
<b>Tab. 3.18</b>	Poolsequenzierung von HLA-B*3801-eluierten Peptiden	64
<b>Tab. 3.19</b>	Das HLA-B*3801-Motiv	65
<b>Tab. 3.20</b>	Poolsequenzierung von HLA-B*3901-eluierten Peptiden	66
<b>Tab. 3.21</b>	Poolsequenzierung von HLA-B*3902-eluierten Peptiden	67
<b>Tab. 3.22</b>	Das HLA-B*3901 und das HLA-B*3902-Motiv	68
<b>Tab. 3.23</b>	Poolsequenzierung von HLA-B*5101-eluierten Peptiden	70
<b>Tab. 3.24</b>	Poolsequenzierung von HLA-B*5102-eluierten Peptiden	71
<b>Tab. 3.25</b>	Das HLA-B*5101 und HLA-B*5103-Motiv	72
<b>Tab. 3.26</b>	Poolsequenzierung von HLA-B*5103-eluierten Peptiden	73
<b>Tab. 3.27</b>	Das HLA-B*5102-Motiv	74
<b>Tab. 3.28</b>	Poolsequenzierung von HLA-B*5201-eluierten Peptiden	75
<b>Tab. 3.29</b>	Das HLA-B*5201-Motiv	76
<b>Tab. 3.30</b>	Das partielle HLA-B*7801-Motiv	77
<b>Tab. 3.31</b>	Poolsequenzierung von HLA- B*7801-eluierten Peptiden	78
<b>Tab. 3.32</b>	Das HLA-B*58-Motiv	79
<b>Tab. 3.33</b>	Poolsequenzierung von HLA-B58-eluierten Peptiden	80
<b>Tab. 3.34</b>	Das HLA-B60-Motiv	81
<b>Tab. 3.35</b>	Poolsequenzierung von HLA-B60-eluierten Peptiden	82
<b>Tab. 3.36</b>	Poolsequenzierung von HLA-B61-eluierten Peptiden	84
<b>Tab. 3.37</b>	Das HLA-B61-Motiv	85
<b>Tab. 3.38</b>	Das HLA-B62-Motiv	86
<b>Tab. 3.39</b>	Poolsequenzierung von HLA-B62-eluierten Peptiden	87

<b>Tab. 3.40</b>	Poolsequenzierung von HLA-DR17-eluierten Peptiden	92
<b>Tab. 3.41</b>	Das HLA-DR17-Ligandenmotiv	94
<b>Tab. 3.42</b>	Poolsequenzierung von HLA-DR4Dw4-eluierten Peptiden	97
<b>Tab. 3.43</b>	Das HLA-DR4Dw4-Ligandenmotiv	98
<b>Tab. 3.44</b>	Poolsequenzierung von HLA-DR4Dw10-eluierten Peptiden	100
<b>Tab. 3.45</b>	Das HLA-DR4Dw10-Ligandenmotiv	101
<b>Tab. 3.46</b>	Poolsequenzierung von HLA-DR4Dw14-eluierten Peptiden	104
<b>Tab. 3.47</b>	Das HLA-DR4Dw14-Ligandenmotiv	105
<b>Tab. 3.48</b>	Poolsequenzierung von HLA-DR4Dw15-eluierten Peptiden	107
<b>Tab. 3.49</b>	Das HLA-DR4Dw15-Ligandenmotiv	108
<b>Tab. 3.50</b>	Inhibition der Bindung von ApoB(2877-2894) an HLA-DR17 durch Peptidliganden	114
<b>Tab. 3.51</b>	Die Ankerpositionen der HLA-Klasse II Ligandenmotive lassen ein von CLIPs verwendetes Supermotiv vermuten	124
<b>Tab. 4.1</b>	Supermotive der CLIPs für die Bindung an verschiedenen HLA-DR Allelen	141
<b>Tab. 4.2</b>	Gegenüberstellung der vier beschriebenen HLA-DR4 Subtypen	145

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Die immunologische Überwachungsfunktion in Vertebraten beruht auf der Suche nach Antigenen, welche die Anwesenheit eines Eindringlings anzeigt. Per Definition ist ein Antigen eine molekulare Struktur, die als fremd erkannt wird und eine adaptive Immunantwort (Prinzip der klonalen Selektion) hervorruft. Die humorale und die zellvermittelte Immunantwort bilden die beiden Hauptäste der spezifischen Immunabwehr. Sie ermöglichen es dem Organismus, gegen extrazelluläres Antigen mittels der humoralen und gegen intrazelluläres Antigen durch die zellvermittelte Immunantwort vorzugehen. Die Hauptwaffe der humoralen Immunabwehr sind die Antikörper: Lösliches Antigen und Viren werden präzipitiert, Mikroorganismen opsoniert und mit Hilfe des Komplement-Systems abgetötet. Da bei Virusinfektionen und Tumorerkrankungen die Zellen des Organismus direkt befallen sind, können Antikörper, die ansonsten so effektiven Waffen der Körperabwehr, nichts ausrichten. Diese Aufgabe übernehmen spezialisierte weiße Blutzellen, die zytotoxischen T-Zellen ( $CD8^+$ -Zellen), auch Killerzellen genannt. Durch Cytolyse vernichten sie die Wirtszelle des Antigens. Hierbei fungieren nicht nur Teile eines Krankheitserregers als Antigen, sondern besondere Molekülkomplexe aus Fragmenten des Antigens (Peptide), die im Zusammenhang mit körpereigenen MHC-Molekülen (*major histocompatibility complex*) erkannt werden. Zytotoxische T-Lymphozyten erkennen eine Zelle mit viralem Antigen nur, wenn diese wie sie selbst die gleichen MHC-Moleküle trägt. Diese duale Spezifität der zytotoxischen T-Zellen, die simultane Erkennung von „eigen“ und „fremd“ wird als *MHC-Restriktion* bezeichnet. Die MHC-Moleküle bilden Taschen, in denen sie jene Peptide beherbergen und wie einen Ausweis vorzeigen. Diese Peptide fallen beim ständigen Abbau von Proteinen in den Zellen an. Gesunde Zellen tragen nur körpereigene Peptide zur Schau, virusbefallene Zellen hingegen zeigen auch Peptide aus Virusproteinen und verraten dadurch den inneren Feind. Auch manche Tumorzellen können sich durch typische Peptide selbst anzeigen und so ihre eigene Zerstörung durch Killerzellen hervorrufen. MHC-Moleküle sammeln also Peptide im Zellinneren auf. Dieser Komplex aus MHC und Peptid wird von den Zellen dann auf ihre Oberfläche transportiert und so den Zellen

des Immunsystems zur Inspektion präsentiert. Die Aufarbeitung von antigenem Material, die sogenannte *Prozessierung*, ist auf das engste mit den Mechanismen für die Synthese und Wiederverwertung aller zelleigenen Proteine und ihrem Transport zwischen den verschiedenen Zellkompartimenten verknüpft. Ein umfassendes Verständnis der Antigenprozessierung gibt somit Aufschluß darüber, was auf molekularer Ebene sowohl in erkrankten, als auch in gesunden Zellen geschieht.

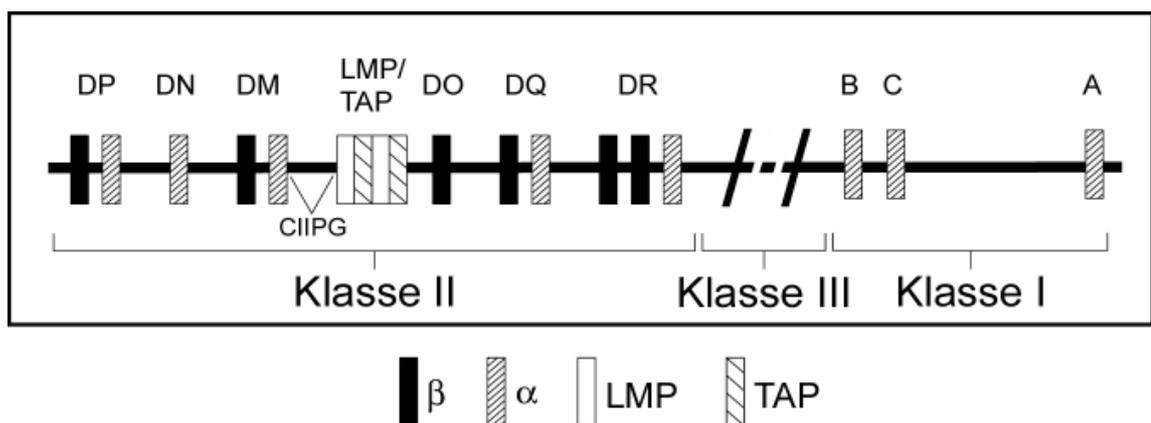
### 1.1.1 Der Histokompatibilitäts Komplex

Immunologen entdeckten die MHC-Moleküle bei ihren Experimenten zur Gewebeverträglichkeit bei Transplantationen. In den 30er Jahren wurde erstmals während solcher Experimente auf dem Mäusechromosom 17 ein Gen-Locus identifiziert, der die Gewebeverträglichkeit (Histokompatibilität) kontrolliert und H-2 genannt wurde. Einige dieser Gene waren hochpolymorph und beeinflussten in der Hauptsache den Abstoßungsprozeß. Ein ähnlicher Bereich wurde in den 50er Jahren beim Menschen eingegrenzt und als HLA (*human leucocyte antigen*) bezeichnet. Weitere Forschungen ergaben, daß die genetischen Elemente (Transplantationsantigene), die sowohl die Immunantwort steuern als auch die Spezifität der T-Lymphozyten bestimmen, in der gleichen Region wie der Haupt-Histokompatibilitäts-Locus liegen [Benacerraf et al., 1972; Schwartz et al., 1985]. Der Name MHC stellt die Bedeutung dieser eng gekoppelten Gruppe von Genen für die Gewebeverträglichkeit heraus und ist ein Oberbegriff, der die entsprechenden Gene beziehungsweise Moleküle in allen Spezies bezeichnet.

Es gibt zwei Arten von MHC-Molekülen, die sich in Struktur und Funktion unterscheiden und später getrennt behandelt werden: MHC-Klasse-I-Moleküle werden auf nahezu allen Arten von Körperzellen gefunden, jedoch in stark unterschiedlicher Expression, während Klasse-II-Moleküle nur auf Immunzellen wie B-Zellen, Makrophagen, Monozyten, dendritischen Zellen und Endothelzellen vorkommen. Unter dem Einfluß von Gamma-Interferon kann die Klasse-II-Expression allerdings auch auf verschiedenen anderen Zellarten induziert werden. Zu diesen fakultativen APCs (Antigen Processing Cells) zählen neben Fibroblasten verschiedene epitheliale Zellen.

### 1.1.2 Die MHC-Klasse-I und Klasse-II Gene und Proteine

**Abb. 1.1** zeigt ein vereinfachtes Schema der humanen und murinen MHCs, das sowohl die polygene Natur der Klasse-I und Klasse-II Gen-Loci hervorhebt, als auch die Organisation der Klasse-I und Klasse-II Proteindomänen zeigt. Beide Molekülklassen bilden heterodimere Transmembran-Glykoproteine: Ein MHC-Molekül der Klasse-I entsteht durch nicht-kovalente Assoziation einer schweren, ca. 45 kD großen, aus drei Domänen bestehenden Integralmembran-Proteinkette, mit einem leichten, 12 kD großen, nicht-MHC kodierten und nicht polymorphen löslichen Protein, dem Beta-2-Mikroglobulin ( $\beta_2m$ ). Beim Menschen sind die Gene für die schweren Ketten in der MHC-Region. Mit über 3500 Kilobasen umfassen sie ca. 0.1% des menschlichen Genoms und sind auf dem kurzen Arm des Chromosom 6 lokalisiert. Das Gen für die leichte Kette liegt auf Chromosom 15. Neben den in ihrer Funktion bereits charakterisierten, „klassischen“ MHC-I-Genen HLA-B, C, und A besitzt der Mensch noch eine Reihe weiterer, wie HLA-E, F und G, deren Funktion jedoch noch nicht genau bekannt sind [Trowsdale et al., 1995]. Klasse-II-Moleküle hingegen werden aus zwei etwa gleich großen Ketten,  $\alpha$  (33 kD) und  $\beta$  (29 kD), jeweils mit zwei immunglobulinartigen Domänen und einer Transmembranregion gebildet. Sämtliche MHC-H-Gene sitzen innerhalb der MHC-Region auf der zentromerischen Seite des kurzen Arms von Chromosom 6; DRA, DQA und DPA kodieren für die  $\alpha$ -Ketten, DRB, DQB und DPB für die jeweils zugehörigen  $\beta$ -Ketten.



**Abb. 1.1** Schematische Darstellung der Genorganisation des humanen HLA-Komplexes. Es sind jeweils nur die funktionellen Ketten eingezeichnet. CIIPG = Klasse-II prozessierende Gene, LMP = Gene für zwei Proteasomenuntereinheiten, TAP = Transporter Antigener Peptide (A, B, C-Transporter für Klasse-I assoziierte Peptide [Germain et al., 1994].

Neben den MHC-Genen sitzen in der MHC-Region noch einige weitere Gene, deren Produkte für die MHC-Funktion, sprich für deren Beladung mit Informationen in Form von Peptiden, eine Rolle spielen: Der Antigen-Peptid-Transporter TAP [Monaco et al., 1992], die Proteasomenuntereinheiten LMP2 und LMP7 [Goldberg et al., 1992] und die Chaperone DMA und DMB. Die beiden *tap*-Gene sind dabei nicht nur räumlich mit HLA-DM assoziiert, sondern sie fördern ähnlich wie DM die Beladung von MHC-Molekülen mit Peptiden.

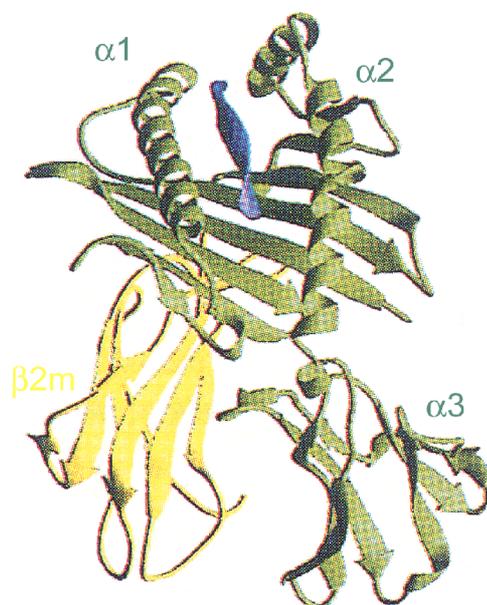
Ein herausragendes Merkmal der MHC-Gene ist ihr ungeheurer Polymorphismus. Mensch und Maus verfügen über mehr als hundert verschiedene etablierte Formen dieser Moleküle und damit über ebenso viele Genvarianten (Allele), jedes Individuum trägt aber nur drei bis sechs unterschiedliche Klasse-I-Moleküle. Die Zahl von drei bis zu sechs verschiedenen MHC-Allelen scheint die optimale Anzahl für einen Organismus zu sein. Vergrößert man ihre Anzahl, so steht dem Vorteil, mehr Peptide präsentieren zu können, der Nachteil einer erhöhten Anzahl autoreaktiver T-Zellen gegenüber. Je größer also die Zahl der MHC-Moleküle ist, desto mehr potentielle Selbst-Antigene gibt es; dementsprechend müssen zur Vermeidung von Autoimmunreaktionen mehr T-Zellen vernichtet werden. Andererseits schränkt eine geringere Zahl an MHC-Typen die Flexibilität der Immunantwort auf eindringende Organismen stark ein. Die Wahrscheinlichkeit, daß ein persönliches MHC-Muster auf der Welt doppelt vorkommt, strebt daher gegen Null. Somit erklärt sich die Gewebeunverträglichkeit zwischen Spendeorgan und Empfängerorganismus, was Transplantationen so äußerst schwierig macht.

### **1.1.3 Die Struktur von MHC-Klasse-I Proteinen und die Selektivität der Peptidbindung**

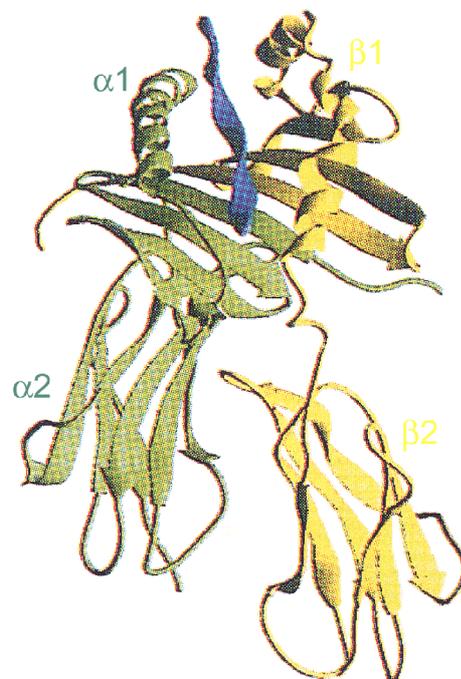
Die räumliche Struktur beider Molekülklassen wurde röntgenkristallographisch untersucht. **Abb. 1.2** zeigt das „Ribbon-Diagramm“ des humanen Klasse-I-Moleküls [Bjorkman et al., 1987; Saper et al., 1991; Madden et al., 1992]. Die  $\alpha$ -Kette setzt sich aus drei globulären  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  und  $\alpha_3$  genannten Domänen, einer Transmembran- und einer kurzen zytoplasmatischen C-terminalen Domäne zusammen. Die  $\alpha_3$ -Domäne, die den Kontakt

mit dem akzessorischen T-Zell-Protein CD8 vermittelt, zählt ebenso wie das Beta-2-Mikroglobulin vom Faltungsmuster her zur sog. Immunglobulin-Superfamilie, einer Gruppe von Proteinen oder Proteindomänen, die an Zell-Zell-Wechselwirkungen betei­digt sind. Die beiden anderen Domänen des Klasse-I-Moleküls,  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  formen innerhalb des intramolekularen Dimers der schweren Kette eine tiefe Grube, deren Rand von zwei  $\alpha$ -Helices (eine von jeder Domäne), und deren Boden von acht antiparallelen  $\beta$ -Faltblattstrukturen aus beiden Domänen gemeinsam (vier von jeder Domäne) gebildet wird. In dieser Peptidbindungsgrube werden Peptide mit einer Länge von typischerweise neun (seltener 8-11) Aminosäuren [Falk, et al. 1991] in einheitlicher Orientierung über nicht kovalente Bindungskräfte festgehalten. Dabei sind die Amino- und Carboxy-termini der Peptide in den sogenannten Bindungstaschen A und F in den gegenüberliegenden Ecken der Grube fixiert. Die Seitenketten der Ankeraminosäuren füllen komplementäre Taschen in der Bindungsgrube aus (B Position 2, C Position 5 und wiederum F Position 8 oder 9 im Peptid) [Engelhard, 1994], während die dazwischen

a) HLA-Aw68 (Klasse I)



b) HLA-DR1 (Klasse II)



**Abb. 1.2** Vergleich der Röntgenstrukturen von a) HLA-Klasse-I (HLA-Aw68) [Bjorkman et al., 1987] und b) Klasse-II (HLA-DR1) [Stern et al., 1994].

liegende Region zum Kontakt mit dem T-Zell-Rezeptor nach „oben“ exponiert liegt. Die Anordnung und Spezifität dieser Taschen ist in den verschiedenen Allelprodukten unterschiedlich; das heißt: Unterschiede in Form und Eigenschaft dieser Taschen bedingen die selektive Affinität der verschiedenen Formen von MHC-Molekülen zu bestimmten Peptiden. Von den 70 HLA-A-, 160 HLA-B- und 45 HLA-C-Allelprodukten hat ein jedes seine eigene, individuelle Peptidspezifität, definiert primär durch die Lage und Spezifität der Taschen, welche die Seitenketten der Ankeraminosäuren beherbergen und sekundär durch Interaktionen mit Nicht-Ankeraminosäureresten der Peptide. Da sowohl die Taschen als auch die übrigen mit dem Peptid in Kontakt kommenden Grubenelemente stark vom Polymorphismus betroffen sind, ist die Allelabhängigkeit der MHC-Peptidspezifitäten (Peptidmotive) leicht verständlich. Durch die Kenntnis der allelspezifischen Motive – zu denen auch Präferenzen und Abhorrenzen außerhalb der Anker gehören – lassen sich MHC-Liganden, also T-Zellepitope, vorhersagen.

#### **1.1.4 Die Struktur von MHC-Klasse-II-Proteinen und die Selektivität der Peptidbindung**

Die in *Abb. 1.2b* gezeigte Ansicht der Klasse-II HLA-DR1 Struktur [Brown et al., 1993] stellt die große Ähnlichkeit der beiden Peptid-Bindungsproteine heraus. Klasse-II unterscheidet sich von Klasse-I hauptsächlich dadurch, daß die Peptidbindungsgrube je zur Hälfte aus den beiden nicht kovalent miteinander verbundenen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten gebildet wird (Klasse-I:  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Domäne), wobei in Analogie zu Klasse-I die Antigenbindungsstelle von acht antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern am Boden, und zwei  $\alpha$ -Helices an der Seite aufgespannt wird. Ihr fehlen allerdings die spezifischen Taschen, welche die Enden eines Peptids umgreifen können. N- und C-Termini der Peptide sind folglich nicht in der Grube fixiert. Statt dessen wirken hauptsächlich Bindungskräfte zwischen dem Peptid-Rückgrat und der Grube, und zwar entlang eines 9-Aminosäurenabschnitts eines Peptids variabler Länge und die Seitenketten an bestimmten Positionen des in der Grube befindlichen 9-Aminosäurenabschnitts interagieren wie bei MHC I mit komplementären Taschen. Die PeptidAuswahl, die ein MHC-Molekül der Klasse-II präsentiert,

enthält eine gemeinsame zentrale Grundsequenz, allerdings mit unterschiedlich langen, quasi überhängenden Enden („ragged ends“). Die Länge der gebundenen antigenen Liganden auf Klasse-II-Proteinen ist nicht limitiert und variiert zwischen 12 und 25 Aminosäuren [Chicz et al., 1993]. Der ausgeprägte Polymorphismus, den sowohl Klasse-I als auch Klasse-II-Moleküle zeigen, ist weitgehend auf die Peptidbindungsregion beschränkt, d.h. Spezifität und Abstand der Bindungstaschen werden primär durch die Peptidspezifität eines jeden Allelproduktes bestimmt. Die Taschenspezifität reicht von sehr hoch – wenn nur die sauren Aminosäuren Asp und Glu vorhanden sind – bis zu sehr degeneriert – falls alle Aminosäuren außer den basischen vorhanden sind. Da sich einige eng verwandte MHC-II-Allele, die unterschiedlich mit Autoimmunerkrankheiten assoziiert sind, in ihrer Peptidspezifität unterscheiden, liegt die Annahme nahe, daß die unterschiedlich präsentierten Peptide mit den Krankheiten in Verbindung stehen [Friede et al., 1996].

Überraschend zeigten die Klasse-II Strukturdaten, daß das HLA-DR1 Heterodimer als  $(\alpha\beta)_2$  Komplex kristallisiert und somit eine simultane Interaktion mit zwei TCR erlauben würde [Brown et al., 1993]. Derzeit wird heftig diskutiert, ob es sich dabei um einen Kristallisationsartefakt handelt und warum die Dimerbildung nur für MHC-Klasse-II reserviert sein sollte. Die Beobachtung, daß 120 kD I-E<sup>k</sup> Komplexe an der Zelloberfläche exprimiert werden und auch die T-Zellantwort modulieren können, stützen die Dimer-Formationstheorie [Schäfer et al., 1994].

### 1.1.5 Die Charakteristik der MHC-Molekül-Peptidbindung

Da in der Prozessierung pathogen abgeleitete Strukturen nicht von körpereigenen Strukturen unterschieden werden können, muß das Immunsystem ein möglichst vollständiges Peptid-Muster aller pathogenen Sequenzen präsentieren, um zu gewährleisten, daß wenigstens eine eindeutige Sequenz enthalten ist, die einen potentiellen inneren Feind identifizieren kann. Für einen Organismus scheint die Länge von neun Aminosäureresten die optimale Länge zur Unterscheidung zwischen selbst und nicht-selbst zu sein. Durch die Verringerung der Aminosäurereste sinkt die Spezifität und damit steigt die Wahrscheinlichkeit, daß der präsentierte Selbstpeptidpool die gleichen Sequenzen wie der pathogen-abgeleitete Peptidpool enthält, wodurch der Einfluß der Selbsttoleranz

auf das rekrutierbare T-Zellrepertoire wiederum anwächst. Berechnungen auf der Grundlage der kodierten Aminosäuren aus dem Genom höherer Vertebraten ( $3 \times 10^7$  bis  $10 \times 10^7$ ) zeigen, daß Peptide mit einer Länge von mehr als 8 oder 9 Aminosäuren benötigt werden, um nach der Elimination der autoreaktiven T-Zellen ein verbleibendes adäquates T-Zellrepertoire zu gewährleisten.

### **1.1.6 Synthese, Transport und Beladung von MHC-Molekülen**

Der Zusammenbau von MHC-Klasse-I- und Klasse-II-Molekülen und deren Assoziation mit antigenen Peptiden gleicht einer Fließbandmontage. Jedes Molekül, jede Station hat eine spezielle Aufgabe zu verrichten, bevor das partiell bearbeitete Produkt zur nächsten Station der zellulären Maschinerie weitergereicht wird (*Abb. 1.3*). MHC-Klasse-I- und Klasse-II-Moleküle verwenden unterschiedliche intrazelluläre Prozessierungswege und präsentieren dementsprechend fast ausnahmslos ein unterschiedliches Repertoire von Peptiden.

### **1.1.7 Die MHC-Klasse-I-abhängige Antigenprozessierung**

Die beiden Untereinheiten der Klasse-I-Moleküle, die schwere  $\alpha$ -Kette und die leichte  $\beta_2$ -Kette, fädeln sich noch während ihrer ribosomalen Synthese in das Endoplasmatische Retikulum (ER) ein. Fehlt die leichte Kette, kann sich die schwere weder richtig falten, noch durch den Golgi-Apparat geschleust und zur Zelloberfläche gelangen, ihrem endgültigen Bestimmungsort. Der dimere Komplex aus beiden Ketten kann diese Reise zur Zelloberfläche nur dann antreten, wenn er im ER auch ein Peptid gebunden hat. Hinweise hierfür lieferte die Entdeckung von mutierten Zellen, die nur ein Zwanzigstel der normalen Menge an MHC-Molekülen der Klasse-I auf ihrer Oberfläche trugen. Obwohl sie beide Ketten im üblichen Maße herstellten, saßen die Ketten ungefaltete im ER fest [Townsend et al., 1989]. Nach künstlicher Zufuhr antigener Peptide aber falteten sich die Ketten korrekt, was in einer erhöhten Expression von MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche resultierte. Ein passendes Peptid stabilisiert also die Wechselwirkung zwischen beiden Ketten, die nur in der richtigen Konformation den

Qualitätskontroll-Mechanismus der Zelle passieren und somit zum Export zur Zelloberfläche freigegeben werden. Passende Peptide können damit als dritte Untereinheit der Klasse-I-Moleküle angesehen werden.

Der nur grob bekannte Hauptweg der MHC-I-Liganden-Entstehung (Antigenprozessierung) beginnt am Proteasom.

### 1.1.8 Das Proteasom

Der wichtigste zytosolische, nicht lysosomale proteolytische Komplex ist das Proteasom [Goldberg und Rock, 1990 und 1992; Monaco, et al. 1992]. Ein im Zytosol befindliches Protein wird vom Proteasom in Peptide zerlegt. Dabei ist sowohl das 20S Proteasom, das ubiquitinylierte Proteine spaltet, als auch das Proteasom beteiligt. Das unmittelbare Substrat ist nicht genau bekannt. – Es könnte sich um denaturiertes Protein handeln oder um von anderen Proteasen produzierte Proteinfragmente. Die röntgenkristallographische Strukturaufklärung eines bakteriellen 20S-Proteasoms (von *Thermoplasma acidophilum*) ergab einen faßartigen Komplex aus 28 Untereinheiten, die in vier Siebener-Ringen übereinander angeordnet sind, wobei die beiden inneren Ringe von  $\beta$ -, die beiden äußeren von  $\alpha$ -Untereinheiten gebildet werden [Löwe, J., Stock, D., et al. 1995]. Beim Thermoplasma-Proteasom beträgt der Abstand der sieben im  $\beta$ -Ring befindlichen aktiven Zentren jeweils 28 Å, was einer Peptidlänge von etwa neun Aminosäuren im gestreckten Zustand entspricht, so daß man sich die von diesem Proteasom produzierten Octa- bis Dodecamere als Doppelschnittprodukte vorstellen kann. Unter dem Einfluß von  $\gamma$ -Interferon [Monaco, et al. 1992], etwa in Zusammenhang mit einer viralen Infektion der Zelle, werden drei der konstitutiven  $\beta$ -Untereinheiten gegen andere – LMP2, LMP7 und MECL1 – ausgetauscht. Außerdem induziert Interferon- $\gamma$  den PA28-Regulator, einen Ringkomplex aus drei  $\alpha$ - und drei  $\beta$ -Untereinheiten, der an die aus  $\alpha$ -Untereinheiten bestehenden Ringe des 20 S-Proteasoms bindet. Der Komplex aus 20 S-Proteasom und PA28 schneidet aus längeren Peptiden solche mit 9 bis 11 Aminosäuren mittels Doppelschnitt heraus, was exakt der für die MHC-I-Beladung erforderlichen Länge entspricht [Driscoll et al., 1993; Gaczynska et al., 1993; Dick, T.P., Ruppert, T., et al. 1996]. Vermutlich werden die

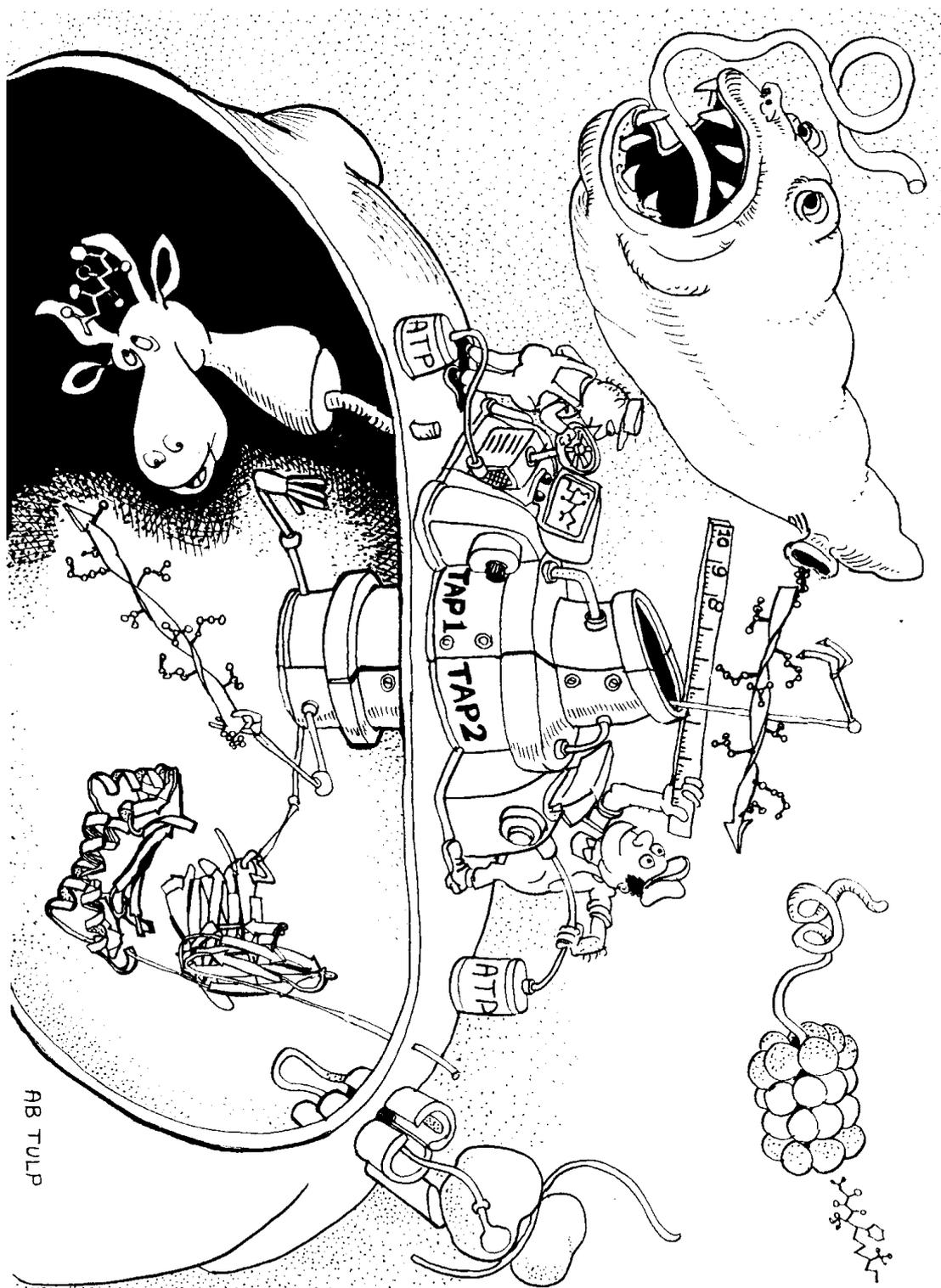
dominanten MHC-I-Liganden – also solche mit hoher Kopienzahl pro Zelle – auf diese Weise direkt hergestellt, während andere Liganden nach Verlassen des Proteasoms noch durch Exopeptidasen im endoplasmatischen Retikulum (ER) gekürzt werden müssen.

### 1.1.9 Der TAP Heterodimer

Die vom Proteasom kommenden Peptide werden in ATP-abhängiger Weise durch den Antigen-Peptid-Transporter TAP (Transporter associated with Antigen Processing), einem Heterodimer aus den in der MHC-Region kodierten Untereinheiten TAP1 und TAP2, aus dem Zytosol in das Lumen des ER transportiert. Wie die Peptide vom Proteasom zu TAP gelangen ist noch nicht bekannt. Möglicherweise sind Chaperone wie HSc70 dabei beteiligt. TAP zeigt sowohl Größen- als auch Sequenzspezifität: Peptide mit einer Länge von 8-13 Aminosäuren, der durchschnittlichen Länge von MHC-Klasse-I bindenden Peptiden, werden von TAP bevorzugt transportiert. Mit Hilfe von TAP können auch längere oder kürzere Peptide transportiert werden, jedoch mit bedeutend geringerer Effizienz [Momburg et al., 1992]. Während die terminalen Aminosäurereste die Spezifität des Transportes bei Maus und Ratte beeinflussen, spielt der TAP-Polymorphismus eine entscheidende Rolle bei der Auswahl des Satzes an Peptiden, welcher von ansonsten identischen MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert wird [Powis et al., 1992]. Diese TAP-Charakteristika legen den Vergleich mit einem molekularen Lineal nahe, das den Abstand zwischen den N- und den C-Termini von Peptiden mißt, um bevorzugt potentielle, zur Klasse-I-Bindungsspalte passende Liganden zu importieren (*Abb. 1.3*).

### 1.1.10 Die Peptidbindung an MHC-Klasse-I

Ist ein Peptid am luminalen TAP-Ende angelangt, wird sein weiterer Weg von mehreren Umständen bestimmt. Viele MHC-I-Moleküle, wie zum Beispiel HLA-A2, binden über das Adaptermolekül Tapasin, an TAP [Sadasivan et al., 1996]. Paßt das eingeschleuste Peptid in die Grube eines solchen MHC-Moleküls, bindet es daran. Das nunmehr fertig beladene MHC-Molekül dissoziiert von seinen Hilfsmolekülen und wird über den



**Abb. 1.3** MHC-Klasse-I-abhängige Antigenprozessierung. Die vom Proteasom kommenden, degradierten Peptide werden in ATP-abhängiger Weise durch TAP aus dem Zytosol in das Lumen des ER transportiert. Im ER binden die frisch synthetisierten MHC-Klasse-I Heterodimere ankommende Peptide von korrekter Sequenz und Länge, und bringen diese über den Standardweg der Membranproteine an die Zelloberfläche [nach Benham et al., 1995].

exozytotischen Standardweg der Membranproteine an die Zelloberfläche gesteuert. Bis ein neu synthetisiertes MHC-I-Molekül ein Peptid binden kann, muß es mehrere Stationen passieren: Der neu synthetisierten schweren Kette ist zunächst das Chaperon Calnexin bei der Faltung behilflich. Nachdem  $\beta_2$ -Mikroglobulin an diese neue schwere Kette gebunden hat, assoziiert das Heterodimer mit Calreticulin. Der dabei entstehende trimere Komplex bindet mittels Tapsin an TAP. Paßt das von TAP transportierte Peptid nicht oder nicht gleich an das TAP-gebundene MHC-Molekül oder kann das MHC-Molekül nicht an TAP binden (wie etwa eine Reihe von HLA-B-Molekülen), ist sein weiteres Schicksal unbekannt. Vermutlich wird es trotz des langsamen Abbaus durch Proteasen im ER von Exopeptidasen auf die richtige Länge getrimmt. Vermutlich passen 95% der durch TAP in das Lumen des ERs eingeschleusten Peptide nicht zur Peptidspezifität der vorhandenen MHC-Moleküle, weshalb sie entsorgt werden müssen. Wahrscheinlich werden sie schnell in ATP-abhängiger Weise aus dem ER in das Zytosol transportiert und dort wie mißgefaltete Proteine weiter abgebaut, oder aber sie werden gleich im ER degradiert. Die kurze Halbwertszeit von Peptiden im ER könnte gewährleisten, daß nur hochaffine Peptide an Klasse-I-Moleküle binden. Letztlich kann so mindestens ein Teil der beim Proteinturnover anfallenden Peptide abgezweigt, auf MHC-I-Moleküle montiert und an die Zelloberfläche gebracht werden, wobei die Selektion der abgezweigten Peptide weitgehend von der Peptidspezifität der MHC-Moleküle abhängig ist.

### **1.1.11 Die Antwort der T-Zelle (CD8<sup>+</sup>-T-Zellen)**

Eine menschliche Zelle besitzt zwischen einer halben und einer Million Exemplare jeder ihrer Klasse-I-Moleküle. Diese wiederum können mehr als zehntausend verschiedene Peptide mit individuellen Kopienzahlen zwischen einer und mehr als zehntausend präsentieren, wodurch eine normale Zelle einen außergewöhnlich vielfältigen Satz von Peptiden besitzt. All diese Peptide leiten sich von normalen, zellulären Proteinen ab und das Immunsystem – genauer gesagt die für MHC-I zuständige T-Zellsubpopulation der CD8<sup>+</sup>-Zellen (CD8<sup>+</sup>-Zellen tragen neben dem TCR das Oberflächenmarker-Molekül CD8 zur Vermittlung des MHC-I Kontakts) – verhält

sich normalerweise gegenüber diesen Peptiden tolerant. Zytotoxische T-Zellen werden im Thymus ausgebildet, wobei autoreaktive T-Zellen eliminiert werden.

Kommen zu den zehntausend Selbstpeptiden beispielsweise nach einer Virusinfektion der Zelle weitere neue hinzu, können diese von den CD8<sup>+</sup>-T-Zellen als fremd erkannt werden, was die Apoptose der infizierten Zelle einleitet. Diesem Selbsttod der Zelle schließt sich die Freisetzung von Lymphokinen (Regulator Proteinen) und porenbildender Enzyme durch die CD8<sup>+</sup>-T-Zellen an. Für die Erstaktivierung virusspezifischer T-Zellen sind allerdings neben dem Erscheinen der neuen Peptide noch weitere Voraussetzungen notwendig. Zu diesen gehört die Antigenpräsentation auf dendritischen Zellen in Kombination mit löslichen („Streß“) -Mediatoren. In einem solchen Falle bindet der TCR an den Komplex aus MHC und Peptid. Die Signalübertragung in die T-Zelle erfolgt nun über die zum TCR-Komplex gehörenden CD3-Moleküle. Zusätzlich müssen Kostimulations-Akzeptoren wie CD28 auf der T-Zelle durch Bindung an Kostimulatoren wie B7 auf der antigenpräsentierenden Zelle besetzt werden.

Diese eingeschränkte Erkennung von Peptidantigenen nur in Assoziation mit eigenen MHC-Molekülen wird als *MHC-Restriktion* bezeichnet. Neben der Bekämpfung virusinfizierter und maligner Zellen sind „MHC-I-restringierte T-Zellen“ auch bei der Entfernung von Parasiten und von mit bestimmten Bakterien infizierten Zellen sehr wichtig.

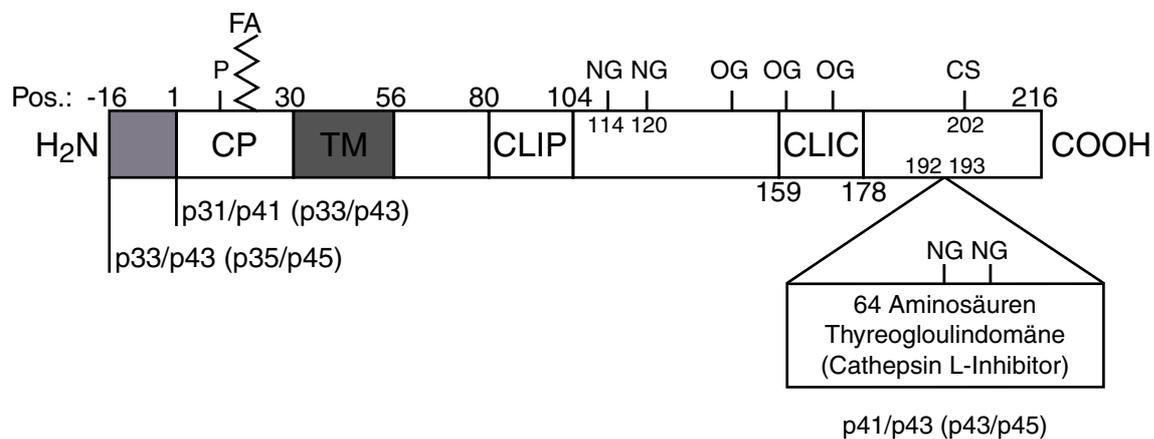
### **1.1.12 Die MHC-Klasse-II-Prozessierung**

MHC-Klasse-II-Moleküle haben sich auf die Präsentation antigener Fragmente spezialisiert, die in der Regel aus vesikelassoziierten Proteinen stammen: Entweder sind es membranständige Proteine oder solche, die durch Pinozytose, Phagozytose oder receptorvermittelte Endozytose in Vesikel (extrazelluläre Pathogene oder Toxine) gelangt sind.

Im Vergleich zu Klasse-I-Molekülen verschiebt sich der Beladungsort von Klasse-II Peptiden durch die Wechselwirkung mit einem spezialisierten und nicht MHC-kodierten Protein vom ER in die Endosomen. Auch die neu synthetisierten MHC-Moleküle der Klasse-II werden im endoplasmatischen Retikulum (ER) zusammgebaut. Hierzu asso-

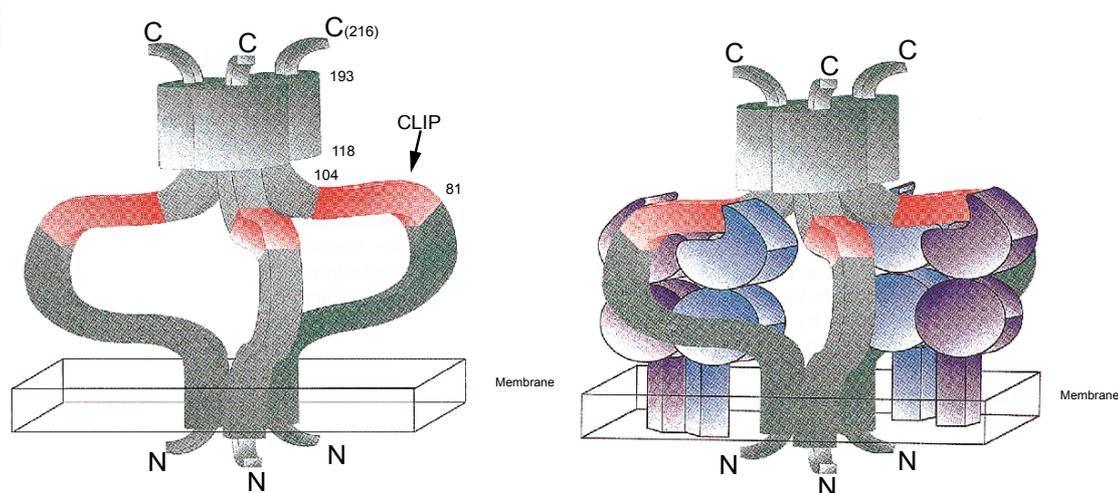
ziieren die MHC-II  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten kurz nach ihrer Synthese in stöchiometrischem Verhältnis mit einem chaperonartigen Mehrzweckmolekül, der sogenannten Invarianten Kette (Ii), zu einem nonameren Komplex (*Abb. 1.5*) [Roche et al., 1990, Teyton et al., 1990]. Die Ii ist ein nicht polymorphes, nicht MHC-kodiertes Transmembran-Glykoprotein, welches zwischen den verschiedenen Spezies bemerkenswert stark konserviert ist. Die humane invariante Kette wird im Widerspruch zu ihrem Namen in vier, sich funktionell nicht unterscheidende Isoformen p31, p33, p43 und p45 exprimiert (*Abb. 1.4*) [Shacher et al., 1995; Takaesu et al., 1995].

Die Hauptform der humanen Ii ist die p31-Form [Strubin et al., 1986], die 216 Aminosäuren lang ist, eine N-terminale cytoplasmatische Domäne von 30 Aminosäuren besitzt und von einer 26 Aminosäuren-Reste langen hydrophoben Transmembranregion [Strubin et al. 1984] gefolgt wird. Sie sorgt für eine effiziente Dimerisierung und Faltung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten der Klasse-II-Moleküle (Chaperone-Funktion). Da die Ii im Gegensatz zu den eher globulären MHC-Molekülen in einer langgestreckten Konformation vorliegt, kann sie über die sogenannte CLIP-Region (Class II associated invariant chain peptide) mit der MHC-Klasse-II-Bindungsgrube in Wechselwirkung treten und diese blockieren [Germain et al., 1994]. Somit können im ER keine Peptide



**Abb. 1.4** Struktur der humanen Invarianten Kette mit den verschiedenen Längen und Modifikationen. Abkürzungen: CP: Cytoplasmatische Domäne; TM: Transmembran Domäne; CLIP: „class II-associated invariant chain peptide, C-terminal“; NG: N-Glykosylierung; OG: Glykosylierung; FA: Acylierung (Palmitoylrest); P: Phosphorylierung; CS: Chondroitinsulfat.

etwa aus dem MHC-I-Beladungsweg, in die Grube gelangen [Cresswell et al., 1990]. Diese intrazelluläre Assoziation ist die Voraussetzung für eine effiziente Freisetzung von Klasse-II-Molekülen aus dem ER und das Weiterleiten dieser über das Trans-Golgi-Netzwerk in das sogenannte MHC-II-Beladungskompartiment, einem speziellen lysosomenartigen Vesikel, in dem die Peptidbeladung stattfindet. Dazu erfolgt zunächst die schrittweise partielle Proteolyse der Ii durch Cathepsin S.



**Abb. 1.5** Modell des Ii-Trimers (links) und des MHC-Klasse-II-Ii-Komplexes. Im rechten Bild sind, aufgrund der Übersichtlichkeit nur zwei der drei MHC-Moleküle eingezeichnet [nach Cresswell., 1996]

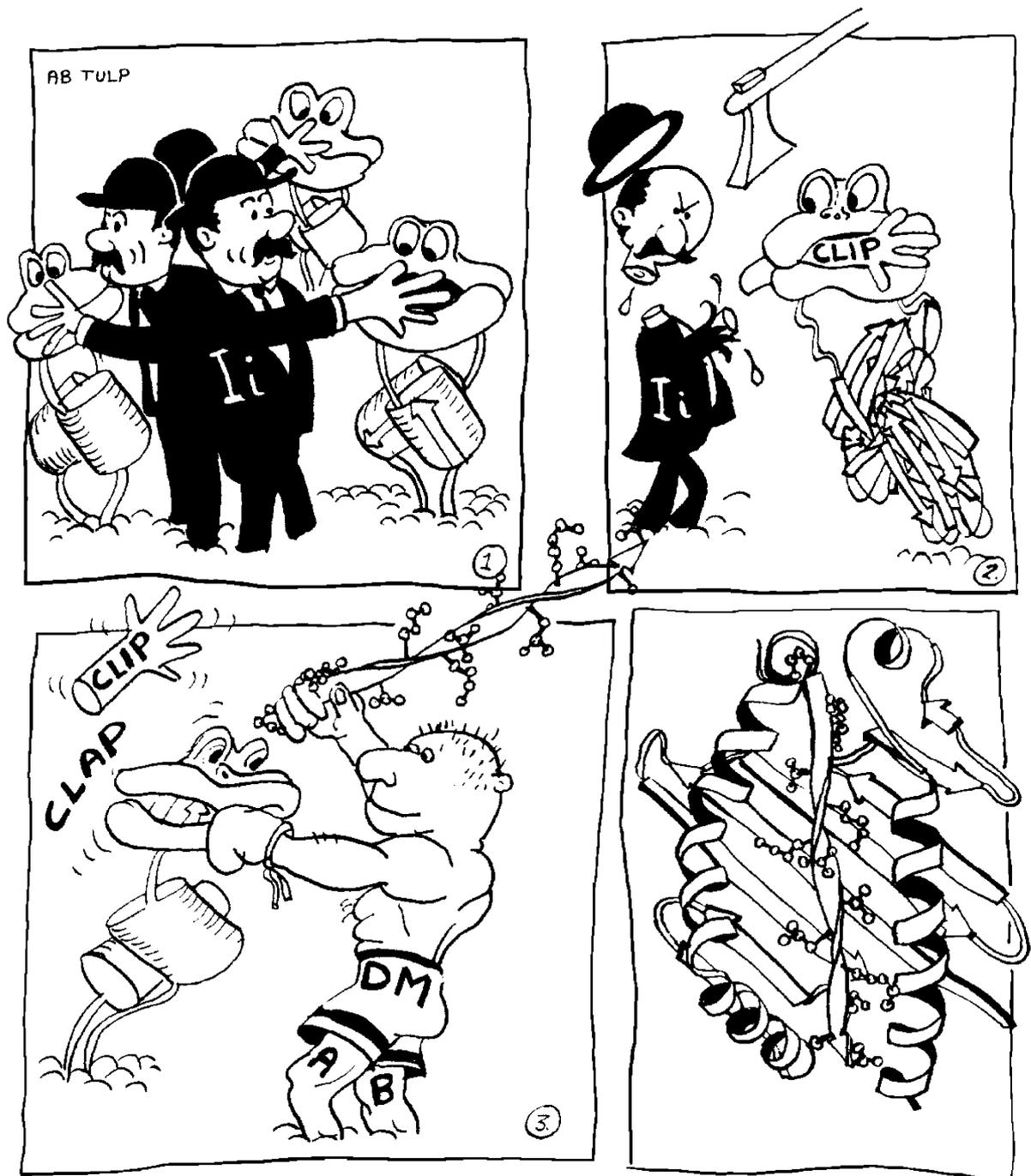
Die Endprodukte dieser definierten Ii-Degradation sind kurze Peptide, genannt CLIP, die zunächst in der MHC-Bindungsgrube festsitzen und diese blockieren. Um CLIPs gegen „richtige“ Peptide – vorprozessierte Antigene, prospektive MHC-II-Liganden – auszutauschen, bedarf es eines weiteren Hilfsmoleküls, dem HLA-DM. Das HLA-DM-Molekül, ein Heterodimer bestehend aus den beiden in der MHC-Region kodierten Untereinheiten DMA und DMB, ist dieses Antigenprozessierungs-Hilfsmolekül, das sowohl in vitro als auch in vivo CLIPs freizusetzen vermag und somit die Beladung mit antigenen Peptiden katalysiert [Sloan et al., 1995; Sherman et al., 1995; Denzin et al., 1995; Morris et al., 1994; Fling et al., 1994]. Die für CLIP ausgetauschten richtigen Peptidliganden durch eine optimal im sauren Milieu (pH 4.5-6) arbeitende lysosomalen Proteasen wie Cathepsin D produziert. Vermutlich sind hier bei auch Exopeptidasen wie die Aminopeptidase N (CD13) beteiligt, was sich aus dem häufigen Vorkommen von

Prolin in Position 2 von MHC-II-Liganden schließen lässt [Rammensee et al.,1995] (vgl. 3.2). Obwohl gezeigt werden konnte, daß HLA-DM in multilaminaren Strukturen ähnlich dem Beladungskompartiment angereichert und mit konventionellen Klasse-II-Molekülen kolokalisiert ist, bleibt fraglich ob Proteolyse und Beladung im gleichen Kompartiment stattfinden.

Die fertig beladenen MHC-II-Moleküle, bestehend aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette und dem Peptid, werden schließlich an die Zelloberfläche gebracht. Wenn beladene MHC-II-Moleküle, etwa im Verlauf eines Phagozytosevorgangs, wieder in ein saures Vesikel gelangen, können die gebundenen Peptide gelöst und gegen andere ausgetauscht werden, da die MHC-II-Peptidassoziation im sauren Milieu labiler wird.

### **1.1.13 Die Antwort der T-Zellen ( $CD4^+$ -T-Zellen)**

Die mit MHC-II befaßten T-Zellen gehören zur Subpopulation der  $CD4^+$ -T-Zellen. Erkennt eine solche T-Zelle ein MHC-II-präsentiertes fremdes Peptid auf einer professionellen antigenpräsentierenden Zelle – Makrophage oder dendritische Zelle – und kommt ein „Streß“-Signal hinzu, wird die T-Zelle aktiviert und produziert Zytokine wie IL-2, IL-4 und  $IFN\gamma$ . Das Spektrum der produzierten Zytokine ist von der Vorgeschichte der T-Zelle sowie vom örtlichen Spiegel der bereits vorhandenen Zytokine abhängig. Die  $CD4^+$ -T-Zellen lassen sich auf Grund der von ihnen produzierten Zytokinspektren in zwei Subgruppen unterteilen: Die T-Helfer-1 ( $Th_1$ )-Zellen mit dem Leitzytokin  $IFN\gamma$  und die  $Th_2$ -Zellen mit dem Leitzytokin IL-4, wobei es jedoch Überlappungen und Abweichungen gibt.  $Th_1$ -Zellen sind inflammatorisch und können durch Aktivierung antigen-unspezifischer Effektoren die Zerstörung extrazellulärer Parasiten, wie Leishmanien, bewirken. Außerdem sind  $Th_1$ -Zellen bei der Zellregulation beteiligt.  $Th_2$ -Zellen werden hauptsächlich als Regulatoren der humoralen Immunität betrachtet, da sie vor allem B-Zellen aktivieren. Nachdem eine B-Zelle ihr Antigen mittels ihres membranständigen Antigenrezeptors – des Immunglobulins mit den zugehörigen Signaltransduktionsmolekülen – gebunden hat, bringt sie es durch rezeptorvermittelte Endozytose zum Degradationsvesikel. Aus dem Antigen entstandene Peptide werden



**Abb. 1.6** Intrazellulärer Transport und Manipulation des MHC-Klasse-II-Invariante-Kette-Komplexes. Im ER assoziieren drei MHC-II- $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten in stöchiometrischen Verhältnis mit der Invarianten Kette (Ii) zu einem nonameren Komplex (1). Dieser Komplex wird durch den Golgi Apparat in den endoplasmatischen Prozessierungsweg eingeschleust, auf dem die Ii degradiert wird (2) Ein Fragment der Ii (CLIP) bleibt zunächst mit dem Klasse-II Molekül assoziiert und verhindert so die Bindung von Peptiden. Um CLIPs freizusetzen bedarf es eines weiteren Hilfsmoleküls, dem HLA-DM (3). Dieses Antigenprozessierungs-Hilfsmolekül katalysiert die Beladung von Klasse-II-Molekülen mit Peptiden (4) [nach Benham et al., 1995].

auf MHC-II geladen und können auf der Zelloberfläche von  $CD4^+$ -T-Zellen erkannt werden. Auf diese Weise erkennen B-Zellen und die sie regulierenden T-Zellen verschiedene Teile desselben Antigens. Beispielsweise kann das Immunglobulin den Glykosylrest eines Glykoproteins erkennen, während das MHC-II-Molekül und damit die T-Zelle ein Peptid aus dem Proteinanteil bindet beziehungsweise erkennt. Hat eine (in der Regel durch Makrophagen oder dendritische Zellen voraktivierte)  $CD4^+$ -T-Zelle den MHC-Peptidkomplex einer antigenpräsentierenden B-Zelle gebunden, erfolgt die Aktivierung der B-Zelle über Zell-Zell-Kontakt und vor allem über Zytokine: IL-4 dirigiert zum Beispiel B-Zellen zur IgG1- und IgE-Produktion. Somit sind  $Th_2$ -Zellen auch für IgE-vermittelte Allergien verantwortlich.

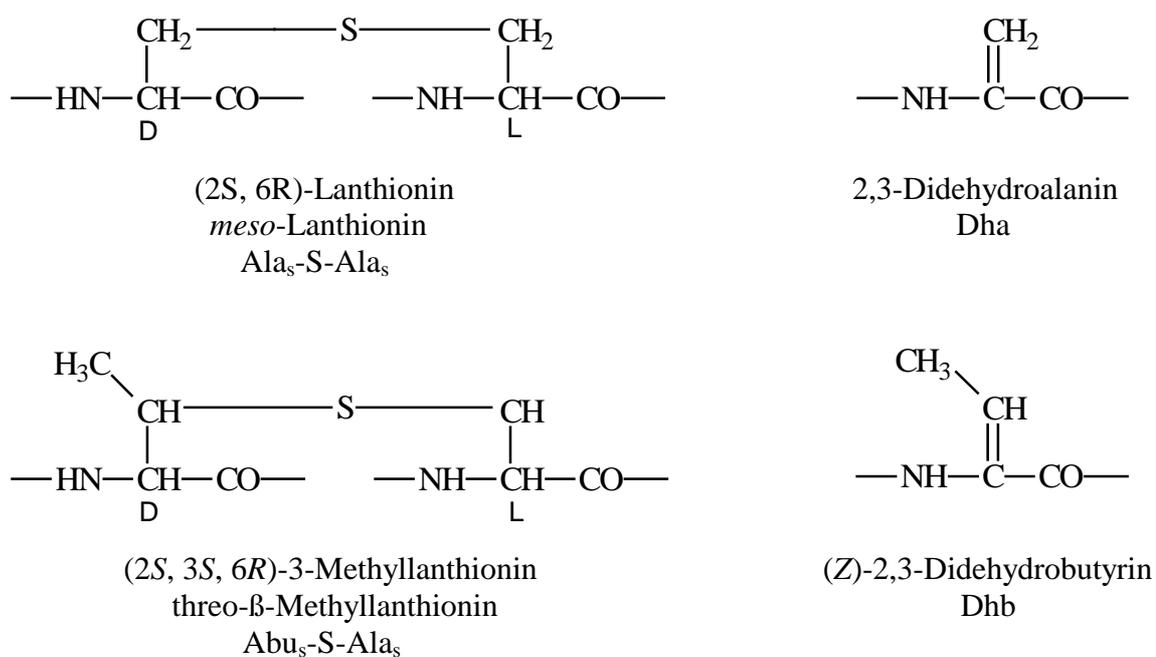
#### 1.1.14 Der Crosstalk

Die Hauptwege der Peptidbeladung für MHC-I und MHC-II-Moleküle unterscheiden sich deutlich voneinander. Jedoch gibt es zwischen den beiden Überlappungen, die möglicherweise bedeutende Konsequenzen haben: Auch Peptide aus exogenen Antigenen können nach Phagozytose durch Makrophagen oder nach Aufnahme in dendritische Zellen an MHC-I-Moleküle gebunden werden. Dieses kann sowohl durch das Einschleusen des exogenen Antigens in den normalen MHC-I-Weg geschehen, als auch durch eine alternative Beladung in eine endozytischen Vesikel [Harding et al., 1996]. Besonders effektiv ist die MHC-I-Beladung durch exogenes Antigen, wenn dieses aggregiert ist, etwa durch Hitze oder durch Kopplung an Partikel.

Andererseits können MHC-II-Moleküle mit Peptiden aus zytosolischen Proteinen beladen werden, wobei die Beladung aber TAP-unabhängig erfolgt. Somit muß das Protein oder davon herrührendes Peptid auf einem anderen Weg in eines der Vesikel gelangen .

## 1.2 Lantibiotika

Lantibiotika sind peptidische Bacteriocine, die neben anderen modifizierten Aminosäuren auch die Thioether-Aminosäure Lanthionin enthalten. Sie kombinieren antibiotische Wirkung mit ungewöhnlichen Strukturelementen. Neben dem namensgebenden Lanthionin (Lan) und 3-Methylanthionin (MeLan) sind die  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Aminosäuren 2,3-Didehydroalanin (Dehydroalanin, Dha) und (Z)-2,3 Didehydrobutyrin (Dehydrobutyrin, Dhb), die allerdings nicht nur in dieser Peptidgruppe vorkommen, bei den Lantibiotika weit verbreitet. In der Lantibiotika-Subklasse der Duramicine findet man zusätzlich die nicht proteinogenen und weiter modifizierten Aminosäuren  $\beta$ -Hydroxyasparaginsäure sowie Lysinalanin. Auch andere Modifikationen wie die Einführung des D-Alaninrestes aus L-Serin [Skaugen, M., et al.], die Bildung von Lysinalanin Brücken, die Bildung von neuen N-terminalen Blockaden und die oxidative Decarboxylierung von C-terminalem Cystein sind beschrieben. So wird beispielsweise das Lantibiotikum Pep5 N-terminal durch eine 2-Oxobutyrylgruppierung blockiert, Epilancin K7 wiederum durch eine Hydroxypyruvat-Modifikation. Epidermin, Gallidermin und Mercacidin tragen eine C-terminale Aminovinylfunktion. Die in den Lantibiotika auftretenden ungewöhnlichen Aminosäuren sind in *Abb. 1.7a* und *Abb. 1.7b* zusammengefasst.



*Abb. 1.7a* Strukturformeln von ungewöhnlichen Aminosäuren in Lantibiotika

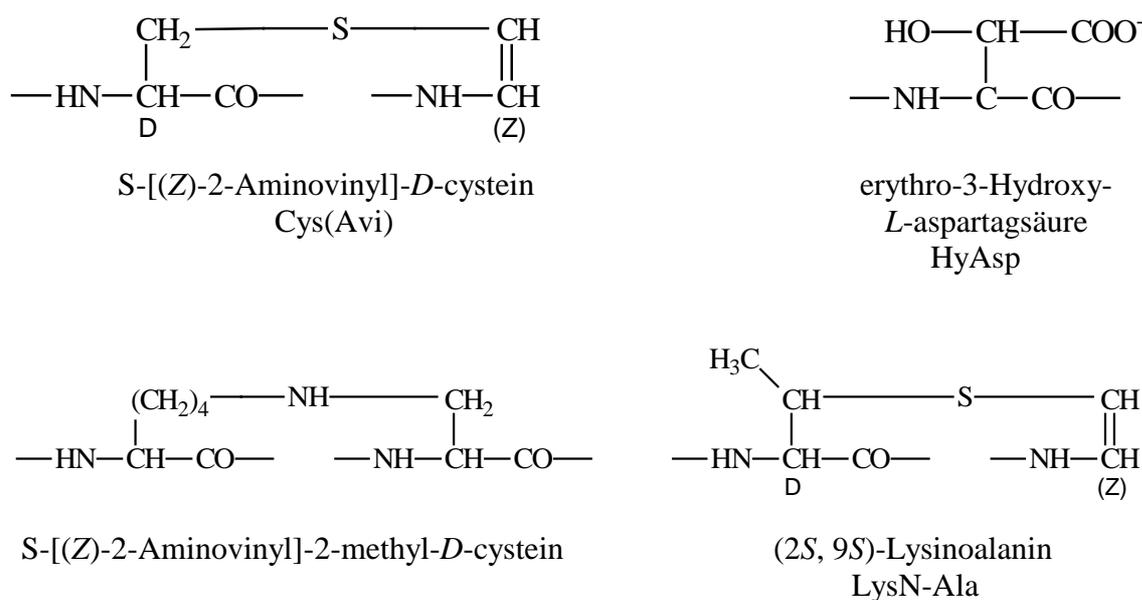
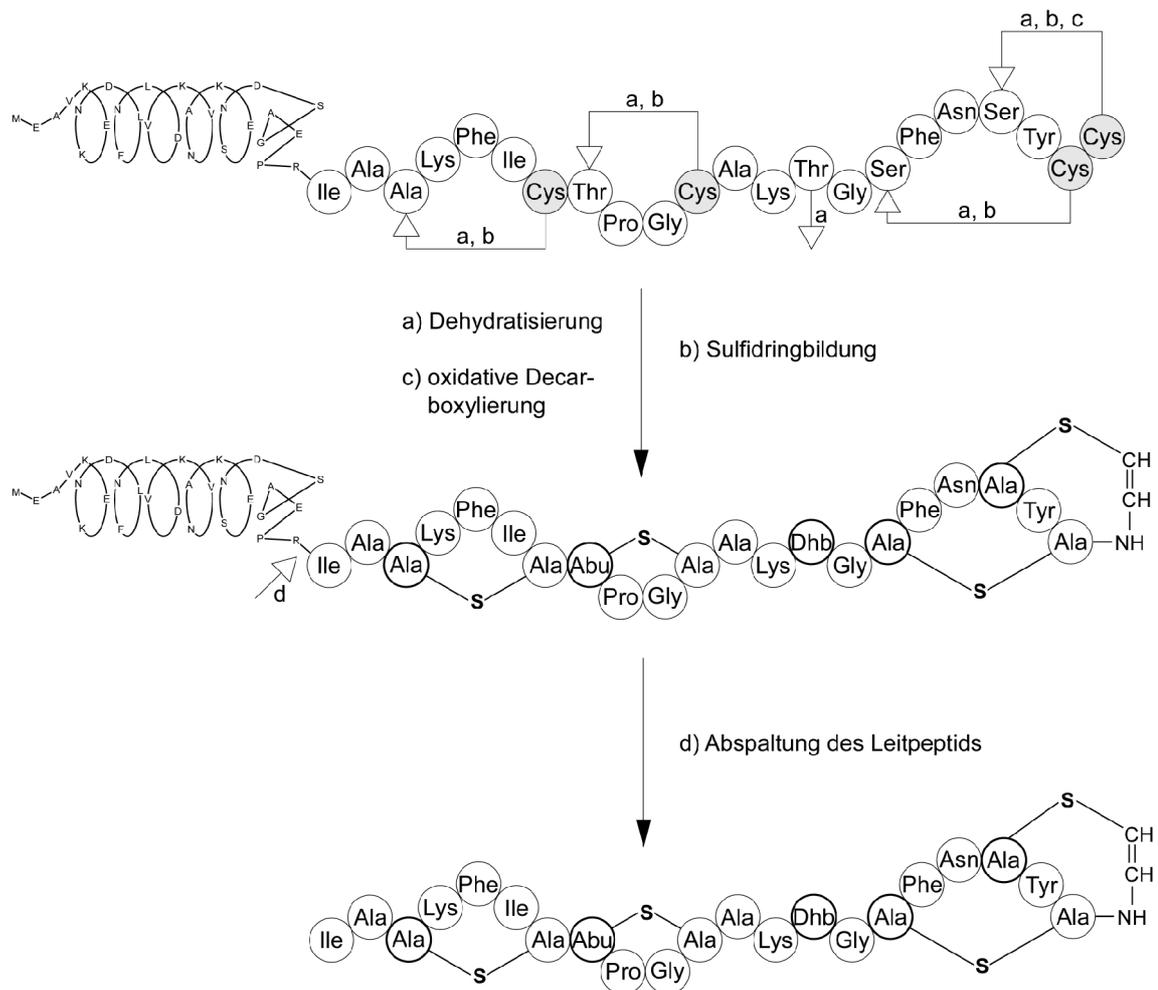


Abb. 1.7b Strukturformeln von ungewöhnlichen Aminosäuren in Lantibiotika.

## 1.2.1 Biosynthese der Lantibiotika

Lantibiotika werden von Gram-positiven Bakterien nicht über den für andere Peptidantibiotika-Biosynthesen typischen Multienzym-Thiotemplat-Mechanismus [F. Lipman et al. 1971], sondern ribosomal als inaktive Vorläuferproteine (Prelantibiotikum) synthetisiert. Diese Prelantibiotika, die sich aus der N-terminalen Leadersequenz und dem unmodifizierten Propeptid zusammensetzen, werden posttranslational durch enzymatische Modifikationen in die aktiven Peptidantibiotika umgesetzt. Als Modifizierungsreaktion wurde für Lantibiotika ein zweistufiger Prozeß vorgeschlagen [Sahl et al. 1991]: Zuerst werden die spezifischen Hydroxyaminosäuren Serin und Threonin des Propeptides enzymatisch zu 2,3-Didehydroalanin bzw. Didehydrobutyrin dehydratisiert. Im nächsten Schritt erfolgt die stereospezifische Addition der Thiolgruppen der Cysteinreste an die entstandenen  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Doppelbindungen unter Konfigurationsumkehr am  $\alpha$ -Kohlenstoffatom. Die Ausbildung der intramolekularen Thioetherbrücken erfolgt dabei so, daß das die Thiolgruppe besteuernde Cystein C-terminal zur Dehydroaminosäure liegt.



**Abb. 1.8** Modell der Epiderminbiosynthese. Zunächst werden die Serin- bzw. Threoninreste in den Positionen +3, +8, +14, +16, +19 dehydratisiert. Es entstehen Dehydroalanin- und Dehydrobutyrinreste. An die Doppelbindungen von Dehydroalanin +3, +16, +19 und Dehydrobutyrin +8, nicht aber von Dehydrobutyrin +14 addieren sich die Thiolgruppen der vier Cysteinreste (in der Zeichnung grau unterlegt) des Precursorpeptids. Die Ausbildung der intramolekularen Thioetherbrücken erfolgt dabei so, daß das die Thiolgruppe besteuernde Cystein C-terminal zu der Dehydroaminosäure liegt. Serinreste im Bereich des Leitpeptids werden nicht dehydratisiert. Der C-terminale Lanthioninring wird unter Ausbildung von S-(2-Aminovinyl)-D-Cystein oxidativ decarboxyliert. Nach dem 1988 aufgestellten Modell erfolgt dabei zunächst eine Decarboxylierung und erst anschließend die Ausbildung der Doppelbindung. Im letzten Schritt wird das Leitpeptid durch Proteolyse entfernt und das reife Epidermin in das Kulturmedium sekretiert [Abbildung verändert nach Schnell et al., 1989].

Die *S*-(2-Aminovinyl)-*D*-Cystein-Funktion von Epidermin wird mittels eines identifizierten Flavoenzyms [Kupke et al. 1994] durch oxidative Decarboxylierung des C-terminalen Cysteinrestes gebildet. Bei der anschließenden proteolytischen Abspaltung des Leaderpeptids entsteht das biologisch aktive Lantibiotikum (**Abb. 1.8**).

### 1.2.2 Klassifizierung und Eigenschaften von Lantibiotika

Lantibiotika lassen sich bezüglich ihrer Struktur in zwei Gruppen unterteilen [Jung, G. 1991]. Erstens die Typ-A Lantibiotika (z.B. Nisin, Gallidermin, Epidermin), die kationische Eigenschaften und eine längliche, helixartige Molekülgestalt mit einer variablen Größe zwischen 21 und 43 Aminosäure-Reste aufweisen. Ihr Wirkungsmechanismus beruht u.a. auf der Bildung spannungsabhängigen Poren und Biosynthesehemmung der Bakterienzellwand. Zweitens die Typ-B Lantibiotika (z.B. Duramycin, Cinnamycin) mit neutralen bis schwach basischen Eigenschaften, und einer eher globulären Gestalt. Alle Typ-B Lantibiotika sind aus 19 Aminosäureresten aufgebaut, die sich wiederum durch den Austausch einzelner Aminosäurereste ineinander überführen lassen [Fredenhagen, A. et al. 1990] und als Enzyminhibitoren agieren.

Das Typ-A Lantibiotikum Epidermin wird von *Staphylococcus epidermis* produziert und ist gegen eine Reihe Gram-positiver Mikroorganismen aktiv, darunter *Propionibacterium acnes* [Allgaier, H. Diss. 1985], weshalb es als potentiell Aknetherapeutikum untersucht wird. Es besteht aus 22 Aminosäuren und enthält die Bausteine *meso*-Lanthionin, Methyllanthionin, Dehydrobutyrin sowie *S*-(2-Aminovinyl)-*D*-Cystein. Da das *S*-(2-Aminovinyl)-*D*-Cystein aus dem C-terminalen-Cystein des Epidermin-Präpeptids gebildet wird, besitzt das Molekül keinen Carboxy-Terminus (**Abb. 1.8**). Lanthionine und  $\alpha,\beta$ -Dehydroaminosäuren sind in allen Typ-A Lantibiotika enthalten, während *S*-(2-Aminovinyl)-*D*-Cystein nur in Epidermin, Gallidermin und Mersacidin vorkommt. Gallidermin weist gegenüber Epidermin die kleinstmögliche Aminosäurenvariation auf: Leucin ist durch Isoleucin in Position 6 ersetzt [Kellner, R. et al. 1988]. Gallidermin wird dadurch allerdings in seiner Wirkung gegenüber Epidermin verdoppelt, weshalb dieses Peptid sogar bereits in den klinischen Test kam. Die entsprechenden Precursorpeptide unterscheiden sich zusätzlich in zwei weiteren Aminosäurepositionen im Leaderpeptid [Schnell, N. et al. 1989].

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Die verwendeten Lösungsmittel der Qualität p. a. wurden bei den Firmen Merck (Darmstadt), Baker (Groß-Gerau), Fluka (Neu-Ulm) und Riedel de Häen (Seelze) erworben. Für die HPLC-Trennungen wurden Acetonitril der Reinheit LiChrosolv (Baker, Groß-Gerau), Trifluoressigsäure zur UV-Spektroskopie (Merck, Darmstadt) und entionisiertes Wasser aus einer Millipore-Filtrationsanlage (MilliRo, Millipore, Eschborn) verwendet. Die  $N_{\alpha}$ -Fmoc-L-Aminosäurederivate mit orthogonalen Seitenkettenschutzgruppen wurden von den Firmen NovaBiochem (Läufelingen, Scheiz) und Bachem (Bubendorf, Schweiz) bezogen. Funktionalisierte Polystyrolharze stammen von den Firmen NovaBiochem (Läufelingen, Scheiz), Bachem (Bubendorf, Schweiz), Alexis (Grünberg) und Rapp Polymere (Tübingen). Diisopropylcarbodiimid (DIC), Diisopropylethylamin (purum) (DIEA), 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT), p-Thiokresol (purum), Thioanisol (purum), Phenol, Ethandithiol (EDT), 2-Mercaptoethanol, Triisopropylsilan, Trifluoressigsäure (TFA) (purum und reinst), und Eisessig (purum) wurden von Fluka (Neu-Ulm) bezogen. Piperidin (zur Synthese) und Acetanhydrid (zur Analyse) stammen von Merck (Darmstadt). O-(1-H-Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (TBTU) wurde von NovaBiochem (Läufelingen, Schweiz) erworben und Dmtr-Biotin stammte von Boehringer Mannheim. Sonstige nicht näher aufgeführte Chemikalien wurden von Aldrich (Steinheim), Fluka (Neu-Ulm) und Merck (Darmstadt) bezogen.

### 2.2 Analytik

#### 2.2.1 Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Für die hochdruckflüssigkeitschromatographischen Trennungen im analytischen und semipräparativen Maßstab standen folgende Geräte zur Verfügung: HPLC-System mit Niederdruckgradientenpumpe 600 (Waters/Millipore, Eschborn), Autoinjektor WISP

712 (Waters/Millipore, Eschborn), Photodiodenarray Detektor 590 (Waters/Millipore, Eschborn) HPLC-System mit Niederdruckgradientenpumpe 600 (Waters/Millipore, Eschborn), U6K-Injektorblock (Waters/Millipore, Eschborn), UV-Detektor Lambda max 481 (Waters/Millipore, Eschborn) und Autosampler M22 (Abimed, Düsseldorf).

Die analytischen Trennungen wurden an Nucleosil C-18, 3µm, 120 Å, 2 x 250 mm (Grom, Ammerbuch) durchgeführt. Zur präparativen Trennung wurde mit einer Säule C-18, 10 µm, 120 Å, 20 x 250 mm (Grom, Ammerbuch) gearbeitet.

Die Detektion erfolgte bei der Probenreinigung mittels Photodiodenarray Detektor über einen Bereich von 200 bis 310 nm.

Die Elution erfolgte mit verschiedenen Gradienten der Laufmittel A: 0.1 % Trifluoressigsäure in Wasser und B: 0.08 % Trifluoressigsäure in Acetonitril. Die Flußraten betragen 0.3 mL/min für analytische, 28 mL/min für präparative Trennungen. Das Wasser wurde durch einen 0.45 µm Filter filtriert (Millipore, Eschborn) und anschließend am Vakuum entgast. Während der Chromatographie wurden die Lösungsmittel durch Helium sauerstofffrei gehalten.

Folgende Gradienten wurden verwendet:

- I 20 % B auf 75 % B in 20 min
- II 30 % B auf 70 % B in 30 min
- III 10 % B auf 60 % B in 30 min
- IV 15 % B auf 60 % B in 30 min
- V 20 % B auf 70 % B in 30 min

### 2.2.2 Massenspektrometrie

Druckluftunterstützte Elektrospray-Massenspektrometrie wurde an einem API III TAGA 6000E Triple-Quadrupol-Massenspektrometer mit Ionspray-Ionisationsquelle (Sciex, Thornhill, Ontario, Canada) durchgeführt. Peptide wurden in Mischungen aus Acetonitril/Wasser (1:1), Methanol/1% Ameisensäure (1:1) oder *tert.*-Butylalkohol/Wasser (4:1) gelöst. Für Einzelmessungen erfolgte die Probenzufuhr (Konzentration 0.1 mg/ml) über eine Infusionspumpe (Harvard Apparatus, Southnatic, Massachusetts,

USA) bei einem Fluß von 5 µl/min. Für größere Probenzahlen wurde eine HPLC-Spritzenpumpe (140 A, Applied Biosystems, Weiterstadt) angeschlossen und ein kontinuierlicher Fluß (100 µl/min) eines isokratischen Wasser/Acetonitril (1:1)-Gemisches (mit 0.1% (v/v) Ameisensäure) eingestellt. In Abständen von 1.5 min wurden über einen automatischen Probeninjektor (Model 231, Dilutor 401, Gilson, Villiers le Bel) jeweils 5 µl der Probe (Konzentration ca. 1 mg/ml) in den Laufmittelstrom injiziert.

Weitere Einzelmessungen wurden an einem VG Quattro II Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (Fisons, Manchester, UK) mit Ionspray-Ionenquelle durchgeführt. Die Probenzufuhr erfolgte direkt mit einem Fluß von 5 µl/min durch eine Spritzenpumpe Infusion Pump 22 (Harvard Apparatus, Southnatick, USA). Die Probenkonzentration betrug 0.1 mg/ml in Wasser oder Acetonitril unter Zusatz von 0.1% Ameisensäure.

Zur Untersuchung der PEG-Derivate wurde das Massenspektrometer online mit einer Microbore-HPLC-Anlage (SMART-System, Pharmacia, Upsala Schweden) gekoppelt. Die Messungen wurden isokratisch (30% Acetonitril) bei einer Flußrate von 100 µl/min durchgeführt, und das maximal auftragbare Probenvolumen betrug 15µl.

### 2.2.3 UV/VIS-Spektroskopie

UV/VIS-Spektren wurden an einem Lambda 5 UV/VIS-Spektrometer (Perkin-Elmer, Überlingen) aufgenommen.

### 2.2.4 Aminosäurenanalyse

Aminosäureanalysen wurden mit einem Aminosäureanalytiker 420 A (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt. 400-1000 pmol der zu analysierenden Probe wurden in 30 µl Lösung auf den Probenträger aufgetragen und anschließend vollautomatisch in der Gasphase bei 160°C mit 6 N Salzsäure 90 min hydrolysiert, mit Phenylisothiocyanat derivatisiert und die erhaltenen PTC- (Phenylthiocarbamoyl-) Aminosäuren online über eine Microbore-HPLC analysiert.

### 2.2.5 Automatische Protein- und Peptidsequenzierung

Die Sequenzierungen erfolgten durch automatisierten Edman-Abbau in zwei "pulsed-liquid" Protein Sequencern 477 A und 476 A mit direkt angeschlossenem HPLC-System PTH-Analyzer 120 A (Applied Biosystems, Weiterstadt). Alle Reagenzien und Lösungsmittel sowie die Glasfaserfilter stammten von Applied Biosystems. Flüssige Proben wurden in 30 bzw. 15 µl-Portionen auf Glasfaserfiltern (Durchmesser 12 bzw. 6 mm) im Argonstrom getrocknet und in die Reaktionskammer eingesetzt. Als Adhäsionsmittel wurde BioBrene Plus (1,5 bzw. 0.75 mg), ein Polybrennderivat, verwandt. Die Abfolge der Reaktionsschritte ist in **Tab. 2.1** dargestellt. Zur Auftrennung der PTH-(Phenylthiohydantoin-) Aminosäuren wurde ein linearer Gradient (Anfangswert 9 % B, in 20 min auf 38 %B, Gesamtdauer 29 min) verwendet. Laufmittel B war Acetonitril, Laufmittel A 3.5 % Tetrahydrofuran in Wasser mit ca. 15 ml Premixed-Buffer (NaOAc-Puffer), pH ca. 4,0. Die Detektion bei einer Wellenlänge von 269 nm erfolgte in einer Flußzelle mit 8 mm Strahlengang.

Als unmittelbares Ergebnis jedes Zyklus erhält man ein HPLC-Chromatogramm mit den UV-Signalen der einzelnen PTH-Aminosäuren. Die UV-Signale werden automatisch nach einer vorgegebenen Kalibrierung in pmol jeder PTH-Aminosäure ausgedrückt. Zur Entscheidung, welche Sequenz vorliegt, müssen mehrere Faktoren berücksichtigt werden:

- Absolute Signalhöhe in jedem Zyklus
- Signalzuwachs gegenüber dem Vorzyklus
- Signalarückgang gegenüber dem Vorzyklus

Die endgültige Festlegung der Sequenz kann durch ein Computerprogramm bestätigt werden.

Eine ausführliche Diskussion der beim automatisierten Edman-Abbau auftretenden Probleme und der Auswertung der Ergebnisse findet sich S. Stevanovic [Dissertation, 1992; Stevanovic et al. 1993]

**Tab. 2.1** Ablauf des Edman-Abbaus im Protein Sequencer 477A (FastNormal 1)

<b>Reaktionskammer</b> (48°C) Reaktionsschritt	Dauer [sec]	<b>Konversionsgefäß</b>	Dauer [sec]	Operation
Trimethylamin	26			
PITC	8			<i>Kupplung</i>
Argon	40			
Trimethylamin	400			
PITC	8			<i>Kupplung</i>
Argon	40			
Trimethylamin	400			
PITC	8			<i>Kupplung</i>
Argon	40			
Trimethylamin	400			
Argon	120			
n-Heptan	60			<i>Waschschritt</i>
Essigester	200			<i>Waschschritt</i>
Argon	120			
Trifluoressigsäure	3			<i>Abspaltung</i>
Pause	300			
Argon	120			
n-Heptan	6			
Transfer: Essigester	50	25 % Trifluoressigsäure	6	
Pause	20	Transfer-Empfang	50	<i>Extraktion</i>
Transfer: Argon	40	Transfer-Empfang	20	
Essigester	30	Transfer-Empfang	40	
Argon	120	Argon	150	
		25 % Trifluoressigsäure	6	
		Pause	1200	
		Argon-Trocknen	400	<i>Konversion</i>
		20 % Acetonitril	20	
		Pause	400	<i>Lösen Rückstand</i>
		Transfer zur HPLC	15	
		20 % Acetonitril	20	<i>Waschschritt</i>
		Leeren	30	

## **2.2.6 Peptidmodifikationen für die Sequenzanalyse**

### **2.2.6.1 Detektion von Cysteinresten**

Vor Beginn der Sequenzierung kann eine Pyridylethylschutzgruppe eingeführt werden [Ruegg, V. T. et al., 1977]. Zu 500  $\mu\text{l}$  Acetonitril werden 25  $\mu\text{l}$  Tributylphosphin und 10  $\mu\text{l}$  4-Vinylpyridin gegeben und von dieser Lösung sofort 20  $\mu\text{l}$  auf den Glasfaserfilter mit der getrockneten Probe pipettiert. Der Filter wird ohne weiteres Trocknen in der Reaktionskammer plziert und das Programm PYRCYS-1 gestartet, gefolgt von den normalen Sequenzierzyklen.

### **2.2.6.2 Sequenzierung von Lanthionin und 3-Methylanthionin und der $\alpha$ , $\beta$ -ungesättigten Aminosäuren 2,3-Didehydroalanin und (Z)-2,3 Didehydrobutyrin.**

Das Peptid (ca. 1 nmol) wird mit alkalischer Propanthiol-Lösung versetzt. Nach einer Stunde bei 50 °C wird die Probe direkt auf einem mit Polybrene behandelten Glasfilter pipettiert, getrocknet, in der Reaktionskammer plziert und die Sequenzierung gestartet. Die automatische Peptidsequenzierung mittels Edman-Abbau wurde mit einem "pulsed liquid phase" Proteinsequencer Model 477A (Applied Biosystems, Weiterstadt) unter Verknüpfung mit dem PTH-Analyser Model 120A durchgeführt. Die Bestimmung der abgebauten Phenylthiohydantoin-Aminosäuren erfolgte über RP-HPLC (PTH-C18, 220 x 2,1 mm).

## 2.3 Synthesen

### 2.3.1 Automatische Festphasensynthese von Einzelpeptiden

Die automatische Festphasensynthese von Einzelpeptiden wurde am Peptidsynthesizer 433 A (Applied Biosystems, Weiterstadt) nach der Fmoc/tBu-Strategie [Fields et al., 1990] an Styrol-1%-Divinylbenzol-Copolymeren durchgeführt. Zur Synthese von Peptiden mit C-terminaler Carboxygruppe (Peptidsäuren) wurden Harze mit p-Benzyloxybenzylalkohol-Anker [Wang, 1973] eingesetzt, die mit der ersten Fmoc-geschützten Aminosäure beladen waren (Beladung: 0.4-0.6 mmol/g). Für die Synthese von vollgeschützten Peptidfragmenten bzw. von Peptiden mit C-terminalem Prolin, Glycin, Cystein und Histidin wurde das mit der ersten Fmoc-geschützten Aminosäure vorgeladene 2-Chlortritylchlorid-Harz [Barlos et al., 1991] verwendet. Die Aktivierung der Fmoc-Aminosäuren erfolgte am ABI-Peptidsynthesizer ausschließlich mit TBTU/HOBt. Für die trifunktionellen Aminosäuren wurden folgende Seitenkettenschutzgruppen verwendet:

**Tab. 2.2** Seitenschutzgruppen der Aminosäuren für die Standardpeptidsynthese.

Aminosäure	Schutzgruppe
Asp, Glu, Ser, Thr und Tyr	<i>tert.</i> -Butyl
Cys, Asn, Gln und His	Trityl
Lys, Trp	Boc
Arg	Mtr, Pmc, Pbf

Je 1 mmol Fmoc-Aminosäure wurde in Kartuschen eingewogen und während der Synthese mit TBTU/HOBt in DMF (0.45 mol/l) und DIEA in NMP (2 mol/l) so aufgelöst, daß Fmoc-Aminosäure, TBTU, HOBt und DIEA in nahezu äquimolarem Verhältnis vorlagen. Die eingesetzte Harzmenge betrug ca. 200 mg, wodurch sich bei einer Beladung von 0.4-0.6 mmol/g ein 10facher Überschuß an Fmoc-Aminosäure ergibt. Während des ersten Synthesesyklus wurde das Polymer in DMF gequollen. Am Ende der programmierten Synthesesyklen wurde das Fmoc-geschützte Peptidpolymer mit Methanol gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet.

## 2.3.2 Multiple Peptidsynthese am Syro, Version 1.0

### Der L-Alanin-Scan

Ein systematischer Ansatz zur Evaluierung des Betrages, den jede einzelne Aminosäure eines natürlichen Liganden zur Bindung an einen Rezeptor leistet, ist der „Scan“. Hierbei wird jeweils eine Aminosäure der natürlichen Sequenz – unter Berücksichtigung jeder Position – durch eine andere ersetzt. Somit werden so viele Analoga, wie der Ligand Aminosäuren hat, benötigt. Am häufigsten wird der L-Alanin-Austausch durchgeführt. Mit Hilfe von L-Alanin läßt sich insbesondere die Relevanz jeder Seitenkette beurteilen. Im Vergleich zu Glycin ist der Konformationsraum eingeschränkt, die Sekundärstruktur, insbesondere die Helix wird nicht gestört, die Hydrophobizität wird nicht entscheidend verändert, sodaß vor allem die Bedeutung der funktionellen Seitenketten untersucht werden kann. Da meist eine große Anzahl von Analoga benötigt wird, stellen multiple parallele Peptidsynthesemethoden den Schlüssel zur Realisierung dar.

Weitere Aminosäuren, die für Scans eingesetzt werden, sind Glycin, Phenylalanin und das jeweilige D-Enantiomer der nativen Aminosäure. Während beim D-Enantiomer die Seitenkette prinzipiell noch vorhanden ist, also die Hydrophobizität und das Gesamtdipolmoment nicht verändert werden, kann die Bedeutung der Sekundärstruktur und die Seitenkettenorientierung untersucht werden. Phenylalanin steigert die Hydrophobizität, Glycin reduziert die Stabilität der Konformation.

Die multiple Peptidsynthese wurde an dem vollautomatisierten System Syro, Version 1.0 (SYRO, MultiSynTech, Bochum) durchgeführt. Für die Synthese wurden je 40 mg

*Tab. 2.3 DIC-Synthesesyklus am multiplen Peptidsynthesizer.*

Operation	Reagenz	Volumen [ $\mu$ l]	Dauer
Quellen des Harzes	DMF	500	10 min
2 x Deblockierung	50% Piperidin in DMF	je 400	15 + 10 min
Waschen	DMF	600	6 x 1 min
Kupplung	AA/HOBt in DMF (0.5 mol/l) + DIC in DMF (1 mol/l)	350 250 (100+100+50)	60 min
Kupplungszusatz	DCM in DMF [75% (v/v)]	100	30 min
Waschen	DMF	600	4 x 1 min

der mit der ersten Aminosäure beladenen Harze verwendet, wobei die Beladung des für die Synthese vollgeschützter Peptide verwendete 2-Chlortritylchlorid-Harzes in den einzelnen Reaktionsgefäßen durchgeführt wurde. Bei einer durchschnittlichen Beladung von 0.5 mmol/g besitzen 40 mg Harz 0.02 mmol freie Kupplungsstellen. Als Syntheseflächen wurden Pipettenspitzen mit Filterfritten verwendet (Eppendorf, Hamburg), die in zwei Syntheseblöcken mit Vakuum- und Absaugvorrichtungen angeordnet werden, so daß parallel  $2 \times 48 = 96$  verschiedene Peptide synthetisiert werden können. Die benötigten N<sup>α</sup>-Fmoc-geschützten Aminosäuren wurden in den vom Synthesizer errechneten Mengen in separate Gefäße eingewogen und dort mit einer 0.6 M Lösung von HOBt in DMF vorgelöst. Die Synthesesyklen sind **Tab. 2.3** zu entnehmen. Die Kupplung der Fmoc-Aminosäuren an das Harz erfolgte in 5fachem Überschuß, nach in situ Aktivierung mit DIC, welches als 1.5 M Lösung in DMF ebenfalls im 5fachen Überschuß zugegeben wurde. Die Kupplungszeiten betragen 50 min. Zur Fmoc-Abspaltung wurden 400 µl 50% Piperidin in DMF zum gequollenen Harz pipettiert. Das Waschen der Peptidpolymere erfolgte durch wiederholte Zugabe von 500 µl DMF mittels eines 4fach-Arms und Absaugen der überstehenden Lösung. Zwischen DMF-Zugabe und Absaugen war eine einminütige Absetzzeit einprogrammiert. Nach beendeter Synthese wurden die Peptidpolymere durch wiederholtes Zupipettieren und Absaugen von MeOH und Diethylether gewaschen und getrocknet.

**Tab. 2.4** TBTU/DIC-Synthesesyklus am multiplen Peptidsynthesizer.

Operation	Reagenz	Volumen [µl]	Dauer
Quellen des Harzes	DMF	500	10 min
2 x Deblockierung	50% Piperidin in DMF	je 400	15 + 10 min
Waschen	DMF	600	6 x 1 min
Kupplung	AS/HOBt in DMF (0.5 mol/l)	350	75 min
	+ DIEA in NMP (3 mol/l)	80	
	+ TBTU in DMF (0.45 mol/l)	350 (200+150)	
	+ DIC in DMF (1 mol/l)	150	
Waschen	DMF	600	4 x 1 min

Für die Synthese schwieriger Sequenzen wurde ein TBTU/DIC-Syntheszyklus etabliert, der die gleichzeitige Verwendung der beiden Aktivierungsreagenzien TBTU und DIC vorsieht. Nach der Zugabe der AA/HOBt in DMF-Lösung (350  $\mu$ l, 0.5 mol/l) werden nacheinander DIEA in NMP (80  $\mu$ l, 3 mol/l) und TBTU in DMF (350  $\mu$ l portioniert über 2 Schritte, 0.45 mol/l) zupipettiert. Nach einer Kupplungsdauer von 45 min wird DIC in DMF (150  $\mu$ l, 1 mol/l) zugegeben und weitere 30 min gekuppelt.

### 2.3.3 Synthese von Peptidmischungen nach der Premix-Methode

Zur Synthese der synthetischen Peptidmischungen [Houghten, 1993; Jung et al. 1992] wurden die beschriebenen Reaktionsgefäße verwendet, in welche die entsprechenden Fmoc-Wang-Harze eingewogen wurden. Für die Kupplung der definierten Positionen wurden 0.7 M Lösungen der benötigten Fmoc-L-Aminosäuren in HOBt/DMF (0.7 M) angesetzt. Die Kupplung erfolgte mit 3.5fachem Überschuß an Fmoc-Aminosäuren nach in situ Aktivierung mit DIC, welches unverdünnt in 3.5fachen Überschuß zugegeben wurde. Die Kupplungszeit betrug 50 min. Das Protokoll des Syntheszyklus der definierten Positionen entspricht weitgehend dem Protokoll der multiplen Peptidsynthese am Syro, Version 1.0.

*Tab. 2.5 Syntheszyklus der Kupplung der X-Position am Syro. Vers.1.0.*

<b>Operation</b>	<b>Reagenz</b>	<b>Volumen [<math>\mu</math>l]</b>	<b>Dauer</b>
Quellen des Harzes	DMF	500	10 min
Deblockierung	50% Piperidin in DMF	je 400	15 min
Waschen	DMF	600	6 x 2 min
Kupplung	AA-Mix/HOBt /TBTU (0.23 M) + 2 eq. DIEA	350	180 min
Waschen	DMF	600	4 x 2 min

Zur Herstellung der Fmoc-Aminosäure-Mischung wurden die 18 Fmoc-L-Aminosäuren (ohne C und W) der X-Positionen, bzw. die für die jeweiligen Positionen im Peptid vorgesehenen Aminosäuren, in äquimolarem Verhältnis zueinander eingewogen und eine 0.7 M Lösung in HOBt/TBTU/DMF (0.7 M) unter Zugabe von 2eq DIEA hergestellt.

Diese Stammlösung wurde mit DCM verdünnt (1:2), um eine Konzentration von 0.23 M zu erhalten. Die Kupplung der X-Position erfolgte durch Zugabe einer äquimolaren Menge der Fmoc-Aminosäure-Mischung, bezogen auf die freien Aminofunktionen des Harzes. Die Kupplungszeit betrug 3 h, wobei in dieser Zeit ca. 50 % des DCM aus dem offenen Gefäß entwich und die abnehmende Kupplungskonzentration durch erneute Konzentrierung ausgeglichen wurde. Nach der Kupplung wurde einmal mit DMF gewaschen und noch einmal 3 h nach der oben beschriebenen Methode nachgekuppelt. Auf diese Weise wurden durch Kaisertest 84-94 % Umsatz nach der ersten und 100 % Umsatz nach der 2. Kupplung ermittelt.

## 2.3.4 Biotinylierungen

### 2.3.4.1 N-terminale Biotinylierungen

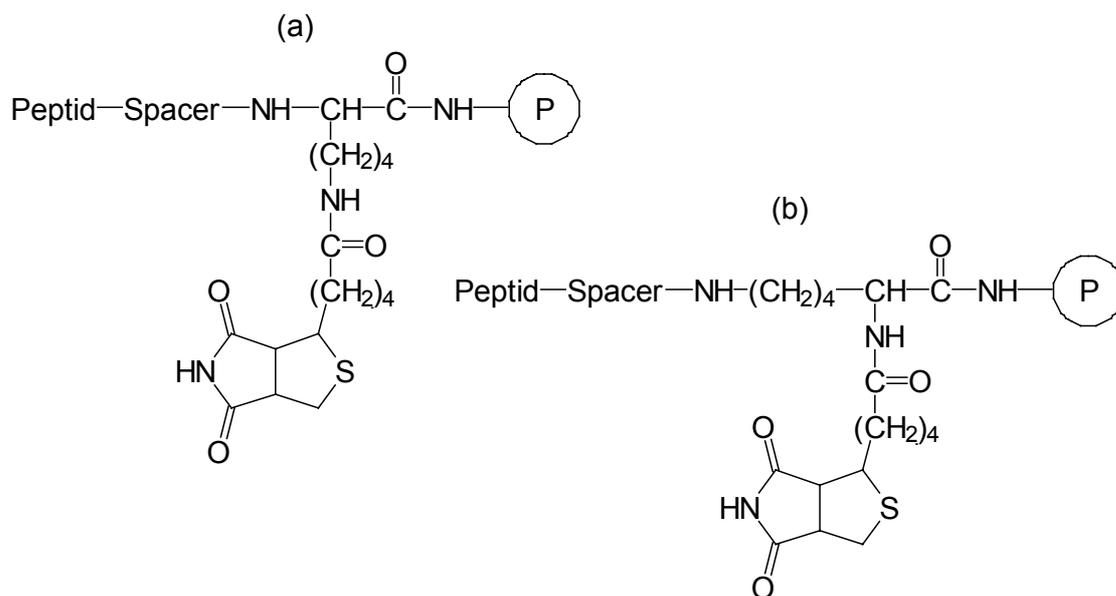
Die N-terminale Biotinylierung der betreffenden Peptide wurde am multiplen Synthesizer durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde die Peptidsequenz vor der Biotinylierung zunächst durch einen Spacer der Sequenz  $\epsilon$ -Lysin- $\beta$ -Alanin- $\epsilon$ -Aminohexansäure- $\beta$ -Alanin verlängert, wobei das Lysin als Boc-Lys(Fmoc)-Derivat eingesetzt wurde. Anschließend wurde das Biotin an den N-Terminus des Spacers, d.h. an die  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins gekuppelt. Als Biotinylierungsreagenz wurde Biotin(Dmtr) eingesetzt, das analog einer „normalen Aminosäure“ in 0.25 molarem HOBt/DMF gelöst und mit 3 bis 5fachen Überschuss gekuppelt wurde. Alternativ wurde unmodifiziertes D-Biotin, das 0.15 molar in 0.15 molarem TBTU/HOBt unter Zusatz von 3 Äquivalenten DIEA in NMP gelöst wurde, verwendet. Die aktivierte Lösung wurde vom multiplen Synthesizer auf die Reaktionsgefäße verteilt und 6 h gekuppelt. Um eine vollständige Reaktion zu gewährleisten, wurde nach der Hälfte der Reaktionszeit zusätzlich 150  $\mu$ l DIC [2 molare Lösung in DMF] zupipettiert. Nach der

Kupplung wurde mehrmals mit DMF gewaschen, und die Abspaltung der biotinylierten Peptide erfolgte analog der Vorschrift für nicht biotinylierte Peptide.

### 2.3.4.2 C-terminale Biotinylierung<sup>1</sup>

Die Biotinylierung erfolgt über ein C-terminal an das Harz gekoppelte Lysin-Derivat [Fmoc-Lys(Dde) bzw. Dde-Lys(Fmoc)], wobei die Biotinyl-Gruppe über die  $\alpha$ - bzw.  $\epsilon$ -Aminofunktion gebunden war.

Rink-Amid-Harz (0.55 mmol/g Beladung) wurde mit Fmoc-Lys(Dde) beladen (2eq. Aminosäure, 2 eq. TBTU, 2 eq. HOBt, 3 eq. DIEA, 2 h, Raumtemperatur). Nach fünfmaligem Waschen mit DMF wurden noch vorhandene freie Aminogruppen mit Acetanhydrid gecapped (5% Acetanhydrid, 0.5% DIEA in DMF, 30 min). Nach erneutem Waschen wurde die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten (20% Piperidin in DMF,



**Abb. 2.1** Aufbau des Biotin-Amid-Harzes:

a) Biotinylierung über die  $\alpha$ -Aminofunktion des C-terminalen Lysins.

b) Biotinylierung über die  $\epsilon$ -Aminofunktion des C-terminalen Lysins.

<sup>1</sup>Das für die Synthese verwendete Harz wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Wolfgang Kraas zur Verfügung gestellt.

20 min) und wiederum gewaschen. Die Kupplung von Biotin erfolgte wie oben beschrieben. Nach erneutem Waschen wurde die Dde-Gruppe entfernt (5% Hydrazin in DMF 2 x 10 min) und wiederum gewaschen. Das Harz wurde dann direkt in die Peptidsynthese eingesetzt. Vor der Kupplung der Fmoc-Aminosäuren des Peptidteils wurde ein Spacer aus  $\beta$ -Alanin,  $\epsilon$ -Aminohexansäure und einem weiteren  $\beta$ -Alanin auf den Harz aufgebaut.

### 2.3.5 Reduktionsverfahren für S-oxidiertes Methionin

Die Peptide (ca. 20 mg) wurden in gut verschließbaren Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen in TFA (1 ml/Peptid) gelöst. Nach Zugabe von Ethandithiol (15.7  $\mu$ l/ml Lösungsmittel = 0.2 mol/l) wurde Trimethylsilylbromid (13  $\mu$ l/ml Lösungsmittel = 0.1 mol/l) zugesetzt und das Zentrifugenröhrchen dicht verschlossen. Es bildete sich nach kurzer Zeit ein Niederschlag. Nach 15 min bei Raumtemperatur wurde vorgekühlter Diethylether (4 ml/Peptid) zugegeben. Die präzipitierten Peptide wurden abzentrifugiert, dreimal mit Diethylether gewaschen und aus *tert.*-Butylalkohol/Wasser (4:1) lyophilisiert [Beck, 1993].

## 2.3.6 Abspaltungen

### 2.3.6.1 Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Das eingewogene Fmoc-Peptidpolymer wurde zweimal für 10 min mit 50% Piperidin in DMF (400  $\mu$ l/100 mg Harz) versetzt, anschließend mit DMF, DCM, Isopropanol, DMF und Diethylether (jeweils 2 ml) gewaschen und im Vakuum getrocknet.

### 2.3.6.2 Abspaltung vom polymeren Träger

Die Peptid-Polymere aus der multiplen Synthese wurden nach dem Trocknen in den 2 ml-Einwegspritzen belassen, die unten mit einem Stopfen verschlossen wurden. Harze aus den Synthesen am ABI-Synthesizer wurden in solche Gefäße eingewogen. Anschließend wurde die vorgemischte Abspaltungslösung 90% TFA, 5% Thioanisol, 5% Thiokresol oder (Reagenz K [King et al.,1990]): 82.5% TFA, 5% Thioanisol, 2.5% Ethandithiol, 5% Phenol, 5% Wasser; 1 ml/40 mg Peptidharz) zugegeben. Nach 3 h unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur wurden die Abspaltungslösungen vom Polymer getrennt, indem die Lösung durch Druck des Spritzenkolbens in verschließbare Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen überführt wurde. Das Polymer wurde durch die Fritte in der Spritze zurückgehalten. Durch Zugabe von eisgekühltem Diethylether (3-4 ml pro Zentrifugenröhrchen) wurden die Peptide gefällt. Nach Zentrifugation der verschlossenen Gefäße (10 min, 2500 rpm, RT) wurden die Überstände abdekantiert, die Peptidrückstände erneut mit Diethylether versetzt, das Gefäß erneut verschlossen und mittels Vortexer dispergiert. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Die ausgefällten Peptide wurden in *tert.*-Butylalkohol/Wasser (4:1, v/v) aufgenommen und lyophilisiert.

### 2.3.7 Visualisierung der Rezeptor Ligand Wechselwirkung („Molecular Modelling“)

Die HLA-DR1 Kristallstruktur wurde von der Brookhaven-Datenbank bezogen. Zur Visualisierung kam das Programmpaket Insight II auf einer Silicon Graphics IRIS Indigo R4000 Workstation zum Einsatz. Moleküldynamiksimulationen und Kraftfeldminimierungen wurden mit dem Programm Discover (Biosym) und dem Kraftfeld CVFF durchgeführt. Das CLIP-Peptid (Ii(106-117)) wurde aus den Aminosäurebausteinen der Bibliothek des Insight II-Programmpakets aufgebaut.

## 3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war:

1. Die Aufklärung verschiedener MHC-Klasse-I-Ligandenmotive.
2. Für das eindeutig definierbare Ligandenmotiv von MHC-Klasse-I-assoziierten Peptiden eine Analogie bei MHC-Klasse-II-assoziierten Peptiden zu finden.
3. Die Definition des allelspezifischen Motives natürlicher HLA-DR17-Liganden und vier verschiedener HLA-DR4-Subtypen.

Die hier dargestellten Ergebnisse betreffen ausschließlich die Sequenzierung von Selbstpeptiden aus Tumorzelllinien, d.h. die entsprechenden Zellen waren nicht mit Fremdorganismen in Kontakt und präsentierten ausschließlich endogenes Material auf ihren MHC-Molekülen. Tumorzellenaufzucht, Lyse, Detergenzienbehandlung sowie Immunpräzipitation, Säureextraktion und HPLC-Auftrennung der natürlichen Peptidliganden wurden in Kooperation mit Frau Dr. Kirsten Falk, Herrn Dr. Olaf Röttschke, Herrn Dr. Thomas Friede, Herrn Dr. Stefan Stevanovic und Herrn Dr. Georg Malcherek in den Labors von Prof. H.-G. Rammensee und Prof. A. Melms durchgeführt.

### 3.1 Pool-Sequenzierung von MHC-Klasse-I-Liganden

#### 3.1.1 Das HLA-B7-Ligandenmotiv

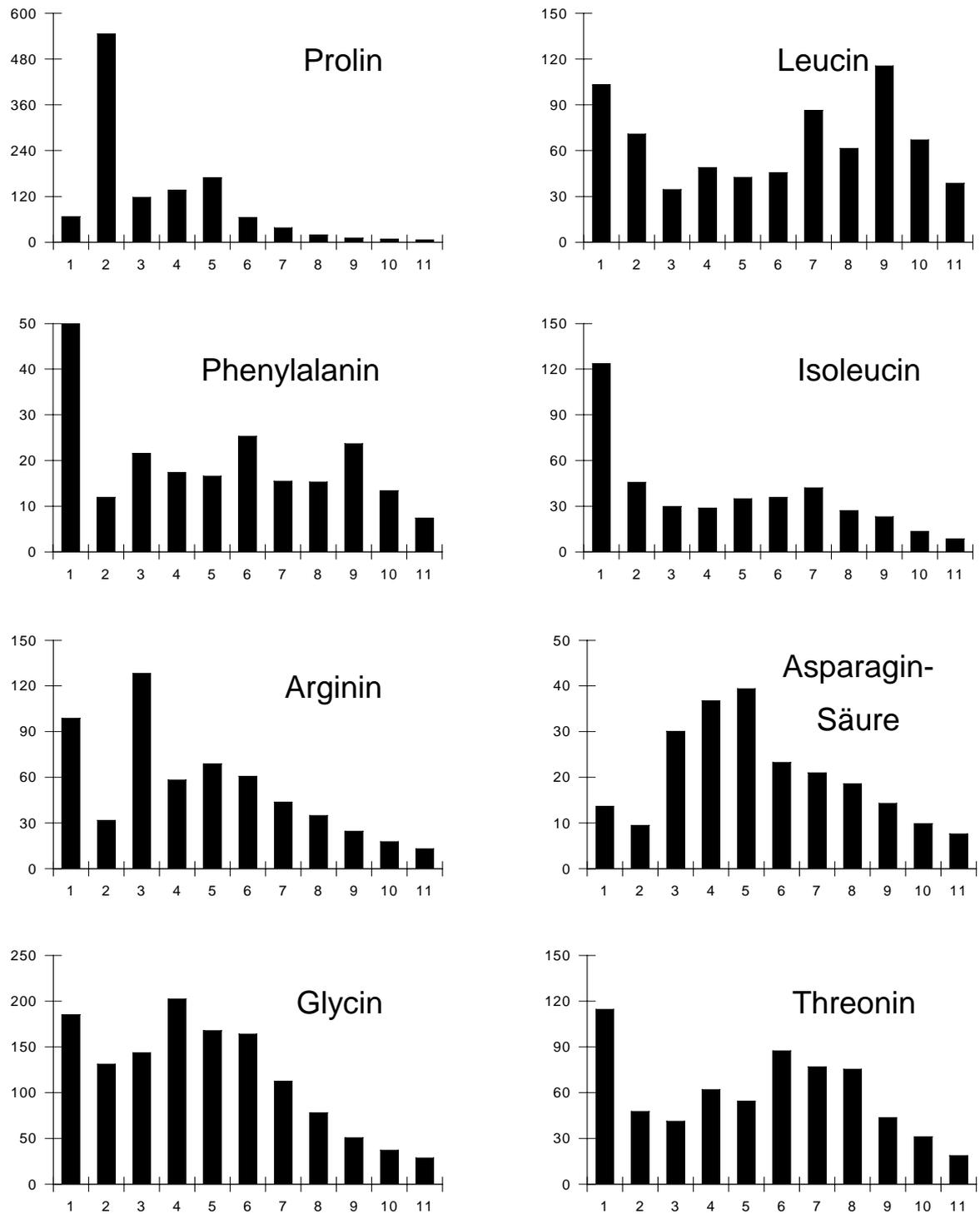
Bei der Sequenzierung eines Peptidpools aus MHC-Klasse-I-Liganden wird jede Ankerposition nur durch ein paar wenige Signale eng verwandter PTH-Aminosäuren charakterisiert. In *Tabelle 3.1* ist ein repräsentatives Sequenzierexperiment eines HLA-B\*0701 Peptidpools zu sehen. Dargestellt ist der Verlauf der 18 detektierbaren PTH-Aminosäuren (nach steigender Hydrophatie geordnet) über die einzelnen Abbauschritte. Zur Veranschaulichung wurde in *Abb. 3.1A* und *Abb.3.1B* das HLA-B\*0701-Ligandenmotiv – exemplarisch für MHC-Klasse-I-Moleküle – graphisch dargestellt.

Die Signale lassen sich in zwei Kategorien aufteilen: In einen dreifachen (fett gedruckt und unterstrichen) und in einen 1.5fachen Anstieg (unterstrichen) der gefundenen PTH-

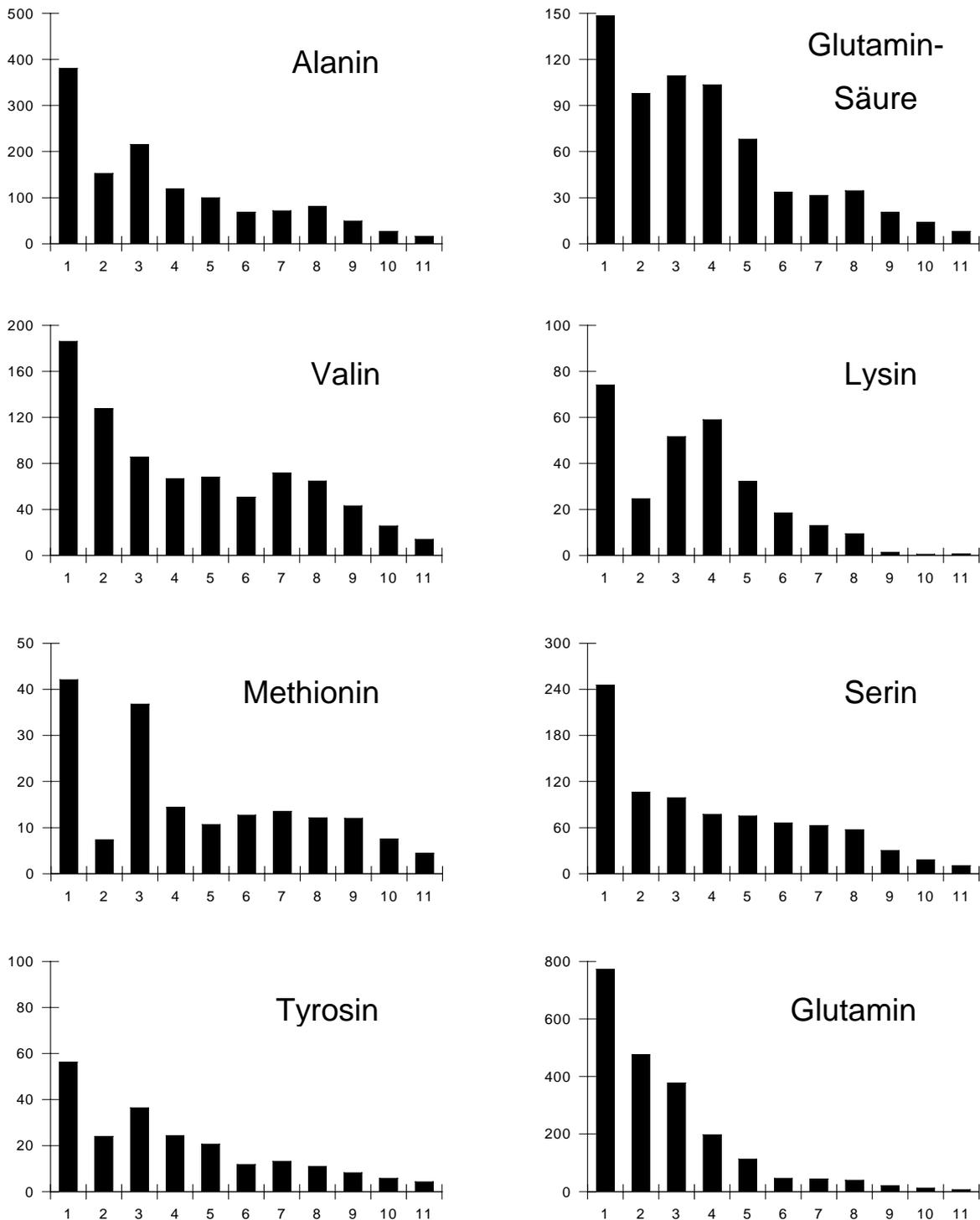
## Pos. Aminosäurekonzentration [pmol]

	I	V	L	F	M	A	G	T	S	Y	P	H	Q	N	E	D	K	R
	Ile	Val	Leu	Phe	Met	Ala	Gly	Thr	Ser	Tyr	Pro	His	Gln	Asn	Glu	Asp	Lys	Arg
1	123,6	186,0	103,1	50,0	42,1	381,2	185,1	114,6	245,5	56,3	66,4	12,9	772,7	20,1	148,4	13,7	74,1	98,8
2	45,8	127,3	70,9	11,9	7,3	152,6	131,1	47,6	106,1	24,0	<b>546,0</b>	9,9	476,3	11,6	97,8	9,5	24,6	31,7
3	29,8	85,5	34,4	<u>21,5</u>	<b>36,8</b>	215,4	143,8	41,3	98,8	36,4	117,2	<u>16,7</u>	378,2	<u>28,4</u>	109,4	<b>30,1</b>	<u>51,6</u>	<b>128,3</b>
4	28,8	66,7	49,0	17,4	14,4	119,2	202,5	<u>62,0</u>	77,1	24,3	135,7	14,3	197,6	28,6	103,4	36,8	58,9	58,3
5	<u>35,0</u>	68,0	42,4	16,6	10,7	99,4	167,9	54,4	75,3	20,6	168,4	17,6	112,7	30,4	68,0	39,4	32,1	69,0
6	35,8	50,6	45,5	<u>25,3</u>	12,7	68,3	164,0	<u>87,4</u>	66,2	11,8	64,5	11,0	46,2	20,6	33,6	23,3	18,5	60,8
7	42,1	71,7	<u>86,4</u>	15,5	13,5	71,4	112,7	76,9	62,5	13,2	37,4	11,8	44,3	23,0	31,3	21,0	12,9	43,9
8	27,0	64,7	61,4	15,3	12,1	80,4	77,9	75,5	57,1	11,0	18,8	11,8	39,8	16,1	34,5	18,6	9,4	34,9
9	23,0	43,1	<u>115,5</u>	<u>23,7</u>	12,0	49,0	50,7	43,7	30,2	8,2	10,9	11,0	21,1	8,7	20,4	14,3	1,3	24,6
10	13,3	25,5	67,0	13,4	7,5	26,6	37,0	31,1	17,9	5,8	7,6	11,7	12,5	5,4	13,8	9,9	0,5	17,9
11	8,6	13,8	38,6	7,4	4,4	16,3	28,8	18,7	10,4	4,2	5,7	9,2	7,3	3,0	7,9	7,6	0,7	13,1

**Tab. 3.1** Poolsequenzierung von HLA-B\*0701-eluierten Peptiden. Abgebildet sind die Mengen der 18 detektierbaren PTH-Aminosäuren (Cys und Trp fehlen) [pmol], geordnet nach steigender Hydrophatie von I1 Abbauschritten.



**Abb. 3.1A** Poolsequenzierung von *HLA-B\*0701*-gebundenen Selbstpeptiden. Abgebildet sind die Mengen der PTH-Aminosäuren [pmol] von 11 Abbauschritten, wobei die unterschiedliche Skalierung zu beachten ist.



**Abb. 3.1B** Poolsequenzierung von *HLA-B\*0701*-gebundenen Selbstpeptiden. Abgebildet sind die Mengen der PTH-Aminosäuren [pmol] von 11 Abbauschritten, wobei die unterschiedliche Skalierung zu beachten ist.

2 bestimmen, da es einen achtfachen Anstieg im Verhältnis zu Pro in Position 1 aufweist. In Zyklus 3 zeigen viele PTH-Aminosäuren einen Mengenanstieg im Vergleich zum Vorzyklus. Dies erklärt sich durch das dominante Signal von Pro in Zyklus 2, da keine anderen Aminosäuren in dieser Position bei HLA-B\*0701-Liganden zugelassen sind, was zu einer allgemeinen Verminderung aller anderen Aminosäuren in dieser Position führt. Somit ist es sinnvoll, Zyklus 3 mit Zyklus 1 zu vergleichen, da hier nur ein paar wenige deutliche Signale von Asn, Asp und Arg zu erkennen sind.

In den Zyklen 4 bis 8 lassen sich diverse Veränderungen der Aminosäurenmuster beobachten, die zumeist unterhalb des definierten Signalgrenzwertes liegen. Manche dieser Signale – wie z.B. Phe und Thr in Zyklus 6 – sind wahrscheinlich für das Bindungsmotiv nicht relevant, da diese beiden Aminosäuren unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. Jedoch wird in Position 7 eine Bevorzugung von hydrophoben Aminosäuren deutlich erkennbar, was sich an den Val und Ile Signalen manifestieren läßt. Die außergewöhnlich hohe Menge an Gln in allen Zyklen ist durch den Zusatz von Gln zum Kulturmedium erklärbar und kann somit als Artefakt betrachtet werden.

*Tab. 3.2 Das HLA-B\*0701-Motiv. Fette Symbole kennzeichnen Ankerpositionen oder Aminosäuren. Die Bewertung der Poolsequenzierungsdaten erfolgte wie beschrieben.*

HLA-B*0701	Position									Herkunft, [Literatur]	
	1	<b>2</b>	3	4	5	6	7	8	<b>9</b>		
<b>Anker</b>		<b>P</b>								<b>L</b> <b>F</b>	
<b>Starke Signale</b>	I		R	D	D	F	L				
				G	P	T					
<b>Andere bevorzugte Aminosäuren</b>	A		D	E	I	R	V				
	H		E	H	V	L					
	S		Q	L							
			K	K							
			Y	S							
			F	T							
			M	P							
			N								
			A								
	T	<b>P</b>	G	P	G	V	R	Y	P	<b>L</b>	HIV-1 nef [Cullmann et al. 1991]

Die außergewöhnlich hohe Menge an Gln in allen Zyklen ist durch den Zusatz von Gln zum Kulturmedium erklärbar und kann somit als Artefakt betrachtet werden.

Zyklus 9 weist zwei Signale mit 1.5- und 1.9fachem Anstieg auf: Phe und Leu, die beide dem Bindungsmotiv zugeordnet werden können, da sie sehr ähnliche Eigenschaften besitzen und in diesem späten Zyklus noch starke Signale zeigen. Da in den Zyklen 10 und 11 wiederum ein starker Rückgang aller detektierten PTH-Aminosäuren zu verzeichnen ist, kann davon ausgegangen werden, daß diese beiden Signale in Zyklus 9 den C-Terminus der HLA-B\*0701-Liganden repräsentieren.

Das Ergebnis dieses Experiments erlaubt die Bestimmung des Bindungsmotivs der Selbstpeptide auf dem HLA-B\*0701-Rezeptor (**Tab. 3.2**): Pro in Position 2 und Leu/Phe am C-terminalen Ende, das sich in diesem Fall in Position 9 befindet.

Zur Interpretation von Sequenzierdaten aus MHC-Klasse-I-Peptidpools lassen sich zwei Regeln aufstellen:

- (i) In den Zyklen mit Ankeraminosäuren ist der Hintergrund der meisten anderen PTH-Aminosäuren sehr gering und führt somit im darauffolgenden Zyklus nur zu schwachen Signalanstiegen.
- (ii) Durch den ständigen, analysebedingten Probenverlust sinkt die Qualität der Signale mit der Anzahl der aufgezeichneten Zyklen. Folglich erreichen die C-terminalen Aminosäuren oft nicht einmal den für ein Signal definierten Grenzwert. Verglichen mit dem drastischen Rückgang der anderen Aminosäuren können diese C-terminalen Ankeraminosäuren dennoch problemlos erkannt werden.

### 3.1.2 Das HLA-A1-Ligandenmotiv

Alle vier Epitope tragen einen aliphatischen Rest (Leu oder Val) in Position 2, einen basischen Rest am C-Terminus und zeigen eine Länge von 8, 9 oder 10 Aminosäuren. Drei der vier Peptide bedienen sich wenigstens eines Hilfsankers in Position 6 oder 7.

Das Consensus-Motiv der HLA-A1 gebundenen Peptide (**Tab. 3.4**) wurde in drei voneinander unabhängigen Isolations- und Sequenzierungsexperimenten bestimmt. Bei der Poolsequenzierung (**Tab. 3.3**) lassen sich zwei Ankerpositionen, P3 beziehungsweise P9, aus der Menge der Peptide leicht identifizieren. Position 3 wird von den beiden

Pos.	Aminosäurekonzentration [pmol]																	
	I Ile	V Val	L Leu	F Phe	M Met	A Ala	G Gly	T Thr	S Ser	Y Tyr	P Pro	H His	Q Gln	N Asn	E Glu	D Asp	K Lys	R Arg
1	137,3	169,8	221,5	178,8	95,3	135,1	49,5	35,4	42,6	108,4	9,6	1,1	34,0	19,0	51,9	18,3	2,8	13,9
2	204,7	216,9	288,4	141,0	53,9	140,6	26,1	232,8	118,7	73,8	20,3	0,9	12,8	14,7	23,6	10,9	2,5	32,6
3	71,6	67,9	89,9	46,1	28,1	118,2	42,2	34,4	32,1	36,9	15,3	0,2	26,8	18,3	159,7	304,8	9,5	7,9
4	182,9	128,9	230,7	78,3	47,6	100,1	99,9	37,8	31,2	34,8	105,1	0,0	28,7	23,9	71,0	110,5	29,4	12,7
5	154,3	145,1	186,5	99,7	43,1	125,0	131,0	49,2	37,5	77,7	67,3	0,4	41,4	33,8	45,5	84,4	21,3	16,8
6	198,2	170,5	181,6	139,7	52,8	98,6	133,1	55,7	35,8	52,9	52,8	0,1	38,3	26,9	37,3	70,8	26,3	15,8
7	189,7	169,4	424,0	95,7	45,8	113,4	99,7	37,1	19,3	56,7	39,5	0,0	36,2	20,0	48,2	60,2	11,2	10,5
8	87,1	143,6	321,3	67,5	54,8	71,1	79,1	29,6	22,7	55,8	17,3	1,4	38,9	16,8	26,5	35,8	16,4	2,8
9	66,7	53,5	175,0	54,8	23,9	46,0	53,1	13,3	14,0	218,1	9,4	0,2	27,7	10,7	16,1	29,5	9,5	4,0
10	29,1	28,2	87,2	21,0	11,9	23,8	37,6	7,5	8,0	122,3	4,4	0,3	11,0	4,3	6,8	17,2	3,7	6,3
11	29,0	29,8	39,3	11,0	7,6	18,1	15,9	6,2	4,7	70,2	3,0	0,1	6,2	2,8	4,0	12,9	2,5	4,2

**Tab. 3.3** Poolsequenzierung von **HLA-A1**-eluierten Peptiden. Abgebildet sind die Mengen der 18 detektierbaren PTH-Aminosäuren (Cys und Trp fehlen) [pmol], geordnet nach steigender Hydrophatit von 11 Abbauschritten.

P9, aus der Menge der Peptide leicht identifizieren. Position 3 wird von den beiden sauren Aminosäuren Asp und Glu dominiert, die einen 7- bzw. 28fachen Anstieg im Vergleich zum Vorzyklus aufweisen. Position 9 hingegen ist ausschließlich für Tyr reserviert und zeigt in diesem späten Zyklus ein hohes Signal mit vierfachem Anstieg. Da Tyr9 in den darauffolgenden Positionen ein auffälliges „Tailing“ zeigt, liegt die Vermutung nahe, daß eine Minderheit der Peptide länger als die A1-typischen Nonamere ist. Neben den Ankerpositionen sind zusätzlich starke Signale von Ser2, Thr2, Pro4, Gly5, Gly6 und Leu7 zu beobachten.

**Tab. 3.4** Das *HLA-A1*-Motiv. Fette Symbole kennzeichnen Ankerpositionen oder Aminosäuren. Die Bewertung der Poolsequenzierungsdaten erfolgte wie beschrieben.

HLA-A1	Position									Herkunft, [Literatur]				
	1	<u>2</u>	<b>3</b>	4	5	6	<u>7</u>	8	<b>9</b>					
<b>Anker</b> oder <b>Hilfsanker</b>		<u>T</u>	<b>D</b>				<u>L</u>		<b>Y</b>	[Falk et al. 1994] [Di Brino et al.1993] [Di Brino et al.1994]				
<b>Andere bevorzugte Aminosäuren</b>		L		P	G	G				[Kubo et al.1994] [Sette et al.1994]				
				G	N	V								
				I	Y	I								
<b>Beispiele für Liganden</b>	A	<u>T</u>	<b>D</b>	F	K	F	A	M	<b>Y</b>	Cyclin D2 189-197				
	I	A	<b>D</b>	M	G	H	<u>L</u>	K	<b>Y</b>	Proliferating cell nuclear antigen				
	M	I	<b>E</b>	P	R	T	<u>L</u>	Q	<b>Y</b>	Ribosomal protein S16				
	Y	<u>T</u>	<b>D</b>	S	D	Y	F	I	<b>S</b>	Ets-1 154-162				
	L	<u>T</u>	<b>D</b>	P	G	V	<u>L</u>	D	<b>Y</b>	No gene bank match				
	V	<u>S</u>	<b>D</b>	I	V	G	P	D	G	L	V	<b>Y</b>	Fibrillarin 177-188	
	Y	<u>T</u>	<b>D</b>	Y	G	G	<u>L</u>	I	F	N	S	<b>Y</b>	Cytochrome C oxidase II	
	Q	<u>S</u>	<b>E</b>	D	G	S	H	T	I	Q	I	M	<b>Y</b>	HLA-class I $\alpha$ -chain
<b>T-Zell Epitope</b>	E	A	<b>D</b>	P	T	G	H	S	<b>Y</b>	MAGE1 [Traversari et al. 1992, van der Bruggen et al. 1991]				
	V	<u>S</u>	<b>D</b>	G	G	P	N	L	<b>Y</b>	Influenza A RNA polymerase 1 [Di Brino et al., 1993]				
	C	<u>T</u>	<b>E</b>	L	K	L	S	D	<b>Y</b>	Influenza A NP 44-52 [Di Brino et al., 1994]				
	E	V	<b>D</b>	P	I	G	H	L	<b>Y</b>	MAGE-3 168-176 [Gaugler et al 1994]				

Das Motiv wurde ferner durch die Analyse von acht A1-eluierten Selbstpeptiden bestätigt (**Tab. 3.4**). Fünf von ihnen waren Nonamere, zwei Dodecamere und eines zeigte eine Länge von 13 Aminosäuren. Alle acht C-Termini dieser analysierten Peptide wurden von Tyr besetzt. Sieben von ihnen zeigten ihre sauren Ankeraminosäuren in Position 3, ein Selbstpeptid in Position 4, wobei sich insgesamt ein Asp/Glu Verhältnis von 6:2 ergab. Die negativ geladenen Carboxylfunktionen von Asp und Glu haben wahrscheinlich in dem positiv geladenen Arg156 auf dem Boden der Bindungsgrube von A1-Molekülen ihren Counterpart [Di Brino et al., 1994]. Die analysierten Selbstpeptide spiegelten auch die im Poolsequenzierungsexperiment gefundene Häufigkeit der anderen starken Signale wider: besonders Ser und Thr in Position 2 wie auch Leu oder das verwandte Ile in Position 7 wurden bei der Mehrzahl der Peptide beobachtet. Damit bestätigen die analysierten Selbstpeptide eindrucksvoll das durch die Poolsequenzierungsexperimente gewonnene Ligandenmotiv für HLA-A1 Rezeptoren. Sieben dieser Peptide stammen von normalen zellulären Proteinen und eines von einem mitochondrialen Protein, der Cytochrome-C-Oxidase II ab. Ein optimales T-Zellepitop repräsentiert ein melanom-assoziiertes Antigen, MAGE1 [Van der Bruggen et al. 1991], und ein weiteres Epitop aus dem Influenza-Virus [Di Brino et al. 1993] paßt genau zu diesem Ligandenmotiv.

### 3.1.3 Das HLA-A3-Ligandenmotiv

Wenige und schwach ausgebildete Signale deuten auf eine große Heterogenität in den HLA-A3-restringierten Peptiden hin. Während hauptsächlich die aliphatischen Aminosäuren Leu und Val sowie in geringen Maße auch Met die erste Ankerposition (P2) besetzen, wird die zweite Ankerposition (P9) sowohl von den beiden aromatischen Resten Phe und Tyr, als auch von der polaren Aminosäure Lys dominiert (**Tab. 3.5**).

In den dazwischen liegenden Positionen 6 und 7 zeigen sich bevorzugt hydrophobe Aminosäuren. Die Länge der A3-Liganden wird durch das abschließende Auftreten eines deutlichen Signals in Zyklus 9 mit neun Aminosäuren bestimmt.

Das so ermittelte Motiv findet sich in vier A3-restringierten CTL-Epitopen eines HIV-Proteins wieder [Di Brino et al., 1993] (**Tab. 3.6**).

Pos. Aminosäurekonzentration [pmol]																		
	I	V	L	F	M	A	G	T	S	Y	P	H	Q	N	E	D	K	R
	Ile	Val	Leu	Phe	Met	Ala	Gly	Thr	Ser	Tyr	Pro	His	Gln	Asn	Glu	Asp	Lys	Arg
1	36.6	22.7	14.5	8.5	6.1	39.8	27.7	15.7	30.0	10.0	7.7	0.0	20.4	3.4	(0.0)	0.0	29.9	0.0
2	28.0	38.4	32.7	2.7	7.9	10.7	13.7	10.6	9.2	3.9	5.9	0.0	7.4	1.3	2.8	0.0	2.7	0.5
3	10.5	8.3	15.0	17.9	4.2	13.9	13.8	4.0	4.3	17.0	7.1	0.8	4.7	2.8	3.7	1.5	6.3	0.0
4	6.0	9.0	12.0	3.8	1.4	8.4	19.1	5.6	5.1	4.2	13.6	0.2	4.8	4.0	9.2	8.3	6.2	0.4
5	9.2	10.3	8.5	3.5	1.9	7.7	20.1	3.5	3.5	4.1	17.4	0.6	4.6	2.8	5.2	5.6	9.0	1.1
6	10.7	11.2	11.1	6.4	2.7	8.4	16.4	5.9	4.4	3.8	12.4	1.0	4.8	2.2	4.8	4.3	4.7	1.4
7	11.8	9.8	27.3	6.3	3.0	7.2	14.8	4.8	2.8	2.8	8.7	1.0	3.7	2.1	3.2	4.6	3.9	1.4
8	7.3	7.4	14.4	5.5	2.4	7.1	12.7	8.1	4.8	3.6	6.1	0.5	5.6	2.7	(0.0)	5.3	6.3	2.5
9	3.8	4.8	6.0	5.9	2.4	5.1	10.4	3.9	2.4	7.5	4.6	1.0	4.0	1.7	3.6	4.0	11.6	2.1
10	2.5	3.0	3.7	3.2	1.2	3.8	7.7	3.4	1.5	3.7	4.4	0.6	2.8	1.3	2.3	2.9	8.2	1.2
11	1.8	2.4	2.2	2.1	0.7	2.7	6.6	2.4	1.2	2.0	4.2	0.7	2.0	0.9	1.8	2.2	5.4	0.8
12	2.3	3.2	2.5	1.6	0.7	3.0	7.0	1.9	1.3	1.7	4.9	0.9	2.0	0.9	1.7	2.8	3.6	0.1

**Tab. 3.5** Poolsequenzierung von **HLA-A3**-eluierten Peptiden. Abgebildet sind die Mengen der 18 detektierbaren PTH-Aminosäuren (Cys und Trp fehlen) [pmol], geordnet nach steigender Hydrophobie von 12 Abbanschriften.

**Tab. 3.6** Das *HLA-A3*-Motiv. Fette Symbole kennzeichnen Ankerpositionen oder Aminosäuren. Die Bewertung der Poolsequenzierungsdaten erfolgte wie beschrieben.

HLA-A3	Position									Herkunft, [Literatur]		
	1	<b>2</b>	3	4	5	<u>6</u>	<u>7</u>	8	<b>9</b>			
<b>Anker</b> oder <u>Hilfsanker</u>		<b>L</b>	<u>F</u>			<u>I</u>	<u>I</u>		<b>K</b>	[Falk et al. 1994]		
		<b>V</b>	<u>Y</u>			<u>M</u>	<u>L</u>		<b>Y</b>	[DiBrino et al. 1993]		
		<b>M</b>				<u>F</u>	<u>M</u>		<b>F</b>	[Maier et al. 1994]		
						<u>V</u>	<u>F</u>			[Kubo et al. 1994]		
						<u>L</u>						
<b>Andere bevorzugte Aminosäuren</b>	I				I T			Q				
					P			S				
					V			T				
					K			K				
<b>T-Zell Epitope</b>	R	<b>L</b>	R	D	L	<u>L</u>	<u>L</u>	I	L	T	R	HIV-1 gag gp41 259-269 [Takahashi et al. 1991; Safrit et al. 1994]
	Q	<b>V</b>	P	L	R	P	<u>M</u>	T	<b>Y</b>	K		HIV-1 nef 73-82 [Koenig et al. 1990]
	T	<b>V</b>	<u>Y</u>	Y	G	<u>V</u>	P	V	W	<b>K</b>		HIV-1 gp120 7-16 [Venet and Walker 1992]
	R	<b>L</b>	R	P	G	G	K	K	<b>K</b>			HIV-1 gag p17 19-27 [Venet and Walker 1992]
	I	<b>L</b>	<u>R</u>	G	S	<u>V</u>	<u>A</u>	H	<b>K</b>			Influenza A NP 265-274 [DiBrino et al. 1993]
	R	<b>L</b>	<u>R</u>	A	E	<u>A</u>	Q	V	<b>K</b>			EBV EBNA-3 471-479 [Hill et al. 1995]
	V	<b>Y</b>	<u>Y</u>	G	V	<u>P</u>	<u>V</u>	W	<b>K</b>			HIV-1 gp120 7-16 [Johnson et al. 1994]
	R	<b>V</b>	<u>C</u>	E	K	<u>M</u>	<u>A</u>	L	<b>Y</b>			HCV-1 NS5 575-583 [Koziel et al. 1995]

### 3.1.4 Das HLA-A\*1101 (HLA-A11)-Ligandenmotiv

Signifikant für die Poolsequenzierdaten von HLA-A11-Liganden waren starke Signale der positiv geladenen Reste Arg und Lys in Position 9 (**Tab. 3.7**). Eine Vielzahl weiterer deutlicher Signale läßt neben der Ankerposition P9 eine starke Präferenz für hydrophobe Aminosäuren in den Positionen 2, 3 und 7 erkennen. Da Lys9 und Arg9 in den darauffolgenden Positionen ein auffälliges „Tailing“ zeigen, ist – wie im Falle des

## Pos. Aminosäurekonzentration [pmol]

	I	V	L	F	M	A	G	T	S	Y	P	H	Q	N	E	D	K	R
	Ile	Val	Leu	Phe	Met	Ala	Gly	Thr	Ser	Tyr	Pro	His	Gln	Asn	Glu	Asp	Lys	Arg
1	248,6	285,4	139,5	149,2	122,2	611,2	247,7	67,3	164,4	49,2	6,5	2,8	73,3	22,9	18,0	0,0	143,1	0,2
2	367,0	997,1	244,9	348,1	44,7	196,8	60,9	302,6	84,7	106,3	61,5	1,5	63,9	14,1	6,4	0,0	6,1	1,3
3	314,9	177,1	512,3	470,1	736,7	240,0	97,4	36,7	41,7	118,5	88,2	3,2	87,9	11,0	58,2	166,2	7,4	2,4
4	129,4	148,4	314,1	139,0	54,7	194,4	239,1	59,4	61,4	61,9	226,9	5,1	78,0	54,0	207,7	180,8	112,5	7,7
5	207,9	300,6	265,3	273,6	77,6	252,7	227,9	51,8	55,5	87,1	227,1	5,2	55,5	46,9	110,1	86,3	74,7	5,8
6	340,0	328,0	299,2	259,7	74,1	165,6	211,5	70,1	57,6	68,4	197,5	4,8	66,3	34,0	93,6	66,7	91,8	8,8
7	299,1	306,0	479,9	236,4	73,2	194,3	113,9	86,7	40,7	95,7	145,5	7,4	69,4	64,2	93,9	35,1	74,6	11,2
8	195,1	237,9	394,4	153,8	67,5	175,6	101,7	69,8	49,5	98,4	123,5	5,3	103,0	62,7	125,6	20,8	112,5	16,7
9	108,6	116,0	201,1	124,7	47,7	86,0	55,3	37,7	29,5	92,3	91,1	4,1	40,0	31,6	65,1	30,8	321,6	22,3
10	43,2	51,2	116,6	75,2	26,2	52,4	39,1	17,8	14,5	48,8	53,8	3,8	34,5	17,0	36,5	20,6	240,1	16,0
11	23,3	27,1	50,0	33,6	17,8	29,0	26,4	11,6	9,9	23,0	33,1	2,7	14,6	14,4	22,6	16,0	198,0	17,2

Tab. 3.7 Poolsequenzierung von **HLA-A\*1101**-eluierten Peptiden. Abgebildet sind die Mengen der 18 detektierbaren PTH-Aminosäuren (Cys und Trp fehlen) [pmol], geordnet nach steigender Hydrophatite von 11 Abbauschritten.

**Tab. 3.8** Das *HLA-A\*1101*-Motiv. Fette Symbole kennzeichnen Ankerpositionen oder Aminosäuren. Die Bewertung der Poolsequenzierungsdaten erfolgte wie beschrieben.

HLA-A*1101	Position									Herkunft, [Literatur]		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9			
<b>Anker</b> oder <b>Hilfsanker</b>		<u>V</u>	<u>M</u>				<u>L</u>		<b>K</b>	[Falk et al. 1994] [Zhang et al. 1993] [Kubo et al. 1994]		
		<u>I</u>	<u>L</u>				<u>I</u>					
		<u>F</u>	<u>F</u>				<u>Y</u>					
		<u>Y</u>	<u>Y</u>				<u>V</u>					
			<u>I</u>				<u>F</u>					
			<u>A</u>									
<b>Andere bevorzugte Aminosäuren</b>	A	T	N	P	P	I		R	R	R	R	
			D	G	I	V		K	D			
			E	D	F	M		N				
			Q	E	V			E				
				K	M			Q				
<b>Beispiele für Liganden</b>	A	<u>V</u>	<u>M</u>	K	P	E	A	E	K	R	<b>K</b>	
	A	<u>V</u>	<u>I</u>	L	P	P	<u>L</u>	S	P	Y	F	<b>K</b>
	A	S	<u>F</u>	D	K	A	K	L	K	<b>K</b>		
	G	Q	<u>Y</u>	G	N	P	<u>L</u>	N	<b>K</b>			
	G	<u>V</u>	<u>M</u>	P	S	H	<u>F</u>	S	R			
	Y	<u>F</u>	D	P	A	N	G	K	F	S	<b>K</b>	
	A	<u>T</u>	<u>A</u>	G	D	G	<u>L</u>	I	E	L	R	<b>K</b>
	S	<u>T</u>	<u>Y</u>	Y	G	S	<u>F</u>	V	T	R		
												No gene bank match
												HSB 66 EST
												Thymosin $\beta$ -10 9-18
												Metalloproteinase bov.
												Ribosomal protein S19
												Elongation factor 2
												Prohibitin (rat)
												No gene bank match
<b>T-Zell Epitope</b>	I	<u>V</u>	T	D	F	S	<u>V</u>	I	<b>K</b>			
	E	L	N	E	A	L	E	L	<b>K</b>			
	V	P	<u>L</u>	R	P	M	<u>T</u>	Y	<b>K</b>			
	A	<u>I</u>	<u>F</u>	Q	S	S	M	T	<b>K</b>			
	Q	<u>V</u>	P	L	R	P	M	T	Y	<b>K</b>		
	S	T	<u>A</u>	P	P	A	H	G	V			
	T	<u>I</u>	N	Y	T	I	<u>F</u>	<b>K</b>				
	A	A	<u>V</u>	D	L	S	H	<u>F</u>	L	K	E	<b>K</b>
												EBNA 4 [Zhang et al. 1993; Gavioli et al. 1993]
												p53 343-351 [Zhang et al. 1993]
												HIV-1 nef 74-82 [Zhang et al. 1993]
												HIV-1 RT 325-333 [Zhang et al. 1993]
												HIV-1 nef 73-82 [Couillin et al. 1993]
												Epithelial cell mucin, MUC-1 107-115 [Domenech et al. 1995]
												HCV-1 NS1 238-245 [Koziel et al. 1995]
												HIV-1 nef 83-94 [Cullmann et al. 1993]

HLA-A1-Ligandenmotivs – zu vermuten, daß eine Minderheit der Peptide länger als die Klasse-I-typischen Nonamere ist. Das für HLA-A11 aufgestellte Ligandenmotiv wurde durch die erfolgreiche Sequenzierung von acht Einzelpeptiden mit einer Länge zwischen 9 und 12 Aminosäuren bestätigt (**Tab. 3.8**). Die Peptide trugen entweder Lys oder Arg mit einem Lys/Arg Verhältnis von 6:2 an ihrem C-terminalen Ende. Diese Erwartung wurde ferner durch die Sequenziererergebnisse mehrerer HPLC-Fraktionen bestätigt. Die Fraktionen enthielten wenig komplexe Peptidmischungen von coeluierenden Peptiden, die deutliche Arg- und weniger stark ausgeprägte Lys-Signale in den Positionen 9 bis 12 zeigten.

Ein bekanntes A11-restringiertes CTL-Epitop aus dem Epstein-Barr-Virus [C. Traversari et al., 1992] entspricht exakt diesem Ligandenmotiv.

### **3.1.5 Das HLA-A24-Ligandenmotiv**

Obwohl die Sequenzanalyse der A24-Peptidpools eine Signalvielfalt ergab (**Tab. 3.9**), läßt sich das Postulat für ein gemeinsames Bindungsmotiv aller A24-restringierter Peptide auf zwei Positionen reduzieren: Während Position 2 exklusiv für Tyr reserviert ist, treten als zweite Anker mit Phe, Leu und Ile in Position 9 wiederum hydrophobe Reste am C-Terminus auf. Neben diesen Ankerpositionen dienen P5 und P6 als hydrophobe Hilfsanker (**Tab. 3.10**). Die Länge der A24-Peptide wurde wieder anhand des letzten Signals mit neun Aminosäuren bestimmt.

Ein T-Zell Epitop aus dem HIV gp41 von neun Aminosäuren Länge paßt gut zu dem beschriebenen Motiv.

### **3.1.6 Das HLA-A31-Ligandenmotiv**

Die Interpretation der Sequenzanalyse der A31-Peptidmischungen (**Tab. 3.11**) führte wie im Falle der A11-Peptidmischungen zu einem Ligandenmotiv mit basischem, carboxy-terminalem Anker. Im Gegensatz zu A11- binden A31-Moleküle bevorzugt Peptide mit einem C-terminalen Arg (**Tab. 3.12**). Neben dieser Ankerposition sind weitere zusätzliche konservierte Positionen – P2, P3 und P6 – mit einer starken

Pos.	Aminosäurekonzentration [pmol]																	
	Ile	V	L	F	M	A	G	T	S	Y	P	H	Q	N	E	D	R	
	Val	Leu	Phe	Met	Ala	Gly	Thr	Ser	Tyr	Pro	His	Gln	Asn	Glu	Asp	Lys	Arg	
<b>1</b>	14.3	24.0	14.2	12.0	6.1	34.6	39.5	13.4	22.0	8.9	14.0	4.2	46.8	1.7	11.5	82.0	10.1	6.5
<b>2</b>	8.1	22.9	8.4	13.5	4.6	23.5	33.5	6.3	12.1	18.4	23.8	3.6	29.4	1.6	8.9	63.7	5.4	1.7
<b>3</b>	9.4	13.8	12.0	14.9	5.2	19.0	30.0	4.4	7.3	6.2	16.5	1.8	22.2	2.1	8.9	43.9	5.0	1.7
<b>4</b>	4.5	9.1	7.2	13.0	0.0	12.9	26.1	3.7	4.9	3.4	16.0	1.2	14.5	2.5	8.2	28.4	6.3	1.7
<b>5</b>	6.1	10.4	5.4	10.6	3.0	10.7	22.6	3.1	3.7	2.9	15.8	1.5	10.9	2.8	6.8	18.8	5.2	2.9
<b>6</b>	5.4	9.0	6.2	9.4	3.2	8.9	19.3	3.2	2.5	2.8	11.4	1.7	7.3	2.3	6.1	12.6	4.0	2.7
<b>7</b>	3.4	8.8	4.4	5.8	4.6	(3.8)	(5.2)	(0.0)	(0.0)	2.9	8.8	(0.9)	(2.2)	(0.3)	(1.1)	(2.9)	3.3	(0.0)
<b>8</b>	3.1	6.6	4.6	5.2	0.0	6.8	12.4	2.6	2.4	2.8	5.6	2.4	6.0	2.8	5.7	7.6	5.7	3.2
<b>9</b>	3.6	4.9	6.6	8.8	0.0	5.2	9.2	1.9	1.8	1.9	4.4	1.9	3.6	1.9	3.9	6.4	3.7	2.2
<b>10</b>	2.0	2.8	3.6	4.8	0.0	3.8	8.0	1.2	1.7	1.6	3.0	1.2	2.8	1.4	3.6	5.5	1.9	1.9
<b>11</b>	1.9	2.7	2.9	2.9	0.0	3.1	6.8	0.8	1.4	1.3	3.5	1.1	2.1	1.1	2.7	4.2	1.9	1.7
<b>12</b>	1.5	3.2	2.1	2.0	0.0	2.9	6.3	0.6	1.2	1.2	4.3	1.0	1.7	1.3	2.4	4.6	1.7	1.9

**Tab. 3.9** Poolsequenzierung von **HLA-A24**-ehierten Peptiden. Abgebildet sind die Mengen der 18 detektierbaren PTH-Aminosäuren (Cys und Trp fehlen) [pmol], geordnet nach steigender Hydrophatit von 12 Abbauschritten.

**Tab. 3.10** Das *HLA-A24*-Motiv. Fette Symbole kennzeichnen Ankerpositionen oder Aminosäuren. Die Bewertung der Poolsequenzierungsdaten erfolgte wie beschrieben.

HLA-A24	Position									Herkunft, [Literatur]	
	1	<b>2</b>	3	4	<u>5</u>	<u>6</u>	7	8	<b>9</b>		
<b>Anker</b> oder <u>Hilfsanker</u>		<b>Y</b>			<u>I</u> <u>V</u>	<u>F</u>				<b>I</b> <b>L</b> <b>F</b>	[Maier et al. 1994]
<b>Bevorzugte Aminosäuren</b>		F	N E L M P G	D P E K			Q N	E K			
<b>T-Zell Epitope</b>	R	<b>Y</b>	L	K	D	Q	Q	L	<b>L</b>		HIV-1 gp41 67-75 [Dai et al., 1992]
	A	<b>Y</b>	G	L	D	<u>F</u>	Y	I	<b>L</b>		p15 melanoma antigen 10-18 [Robbins et al. 1995]
	A	F	L	P	W	H	R	L	F	<b>L</b>	Tyrosinase 188-197 [Kang et al. 1995]
	A	F	L	P	W	H	R	L	<b>F</b>		Tyrosinase 188-196 [Kang et al. 1995]
	R	<b>Y</b>	S	I	F	<u>F</u>	D	Y			EBV EBNA-3 114-121 [Burrows et al. 1994]

Präferenz für hydrophobe Reste zu erkennen. A31-Moleküle erfordern folglich Liganden mit einem positiv geladenen C-Terminus ohne zusätzlichen „Clearcut Anker“, aber mit den Positionen P2, P3 und P6 als Hilfsanker.

Sechs erfolgreich sequenzierte Einzelpeptide bestätigten neben der Länge von 9 Aminosäuren (4 Nonamere, ein Decamer, ein Undecamer) sowohl den C-terminalen Anker P9 als auch den hydrophoben Hilfsanker in P3. Die beiden Hilfsanker P2 und P6 hingegen wurden von den identifizierten Selbstpeptiden selten verwendet.

Ein T-Zell Epitop des Hepatitis B Virus [Missale et al. 1993] paßt gut zu diesem aufgestellten HLA-A31-Ligandenmotiv.

Pos.	Aminosäurekonzentration [pmol]																	
	I Ile	V Val	L Leu	F Phe	M Met	A Ala	G Gly	T Thr	S Ser	Y Tyr	P Pro	H His	Q Gln	N Asn	E Glu	D Asp	K Lys	R Arg
1	208.8	333.0	91.0	71.1	133.1	311.7	137.1	84.6	74.6	38.5	9.0	4.6	59.0	7.4	0.0	0.0	218.3	43,8
2	157.9	454.7	288.8	153.1	129.4	130.7	87.0	117.4	51.8	194.2	19.3	3.9	110.8	12.6	18.5	0.0	24.1	13,2
3	158.0	127.0	255.4	186.2	143.6	127.2	102.9	29.9	28.9	165.1	22.8	5.9	100.4	91.0	37.5	23.7	238.1	22.1
4	109.8	185.5	142.5	78.1	47.2	178.2	192.5	85.9	59.5	91.5	248.5	11.8	72.8	62.8	142.0	119.3	109.6	37.4
5	271.3	243.5	202.9	175.4	76.8	207.8	167.2	47.4	50.8	117.4	274.8	14.0	52.3	32.9	76.1	78.0	118.2	52.2
6	230.6	225.1	277.4	189.0	56.1	199.1	180.6	110.9	53.7	86.1	153.2	29.6	71.7	40.8	124.5	107.4	91.0	89.1
7	203.4	364.4	218.0	190.5	63.7	169.4	130.3	84.5	42.4	102.1	119.9	30.0	63.3	65.4	108.7	74.4	102.8	79.4
8	168.3	203.7	243.5	107.1	68.7	134.0	139.6	89.2	48.2	102.2	104.1	22.7	77.3	64.3	117.5	46.6	72.3	115.5
9	74.2	100.4	131.1	67.6	64.7	68.2	78.5	34.7	21.1	41.4	48.5	15.4	34.2	24.4	59.1	25.8	45.9	222.2
10	43.3	61.2	89.8	32.0	23.4	50.1	55.0	25.8	15.7	28.0	33.3	12.6	31.3	20.8	40.6	25.7	24.7	138.3
11	21.9	29.4	49.6	16.2	10.6	29.4	31.7	13.8	11.5	13.9	17.6	6.1	16.4	10.9	21.6	12.7	17.5	129.0
12	13.8	25.2	27.7	10.3	6.1	16.2	23.1	8.4	7.5	9.9	10.7	5.1	9.5	5.6	10.8	10.2	9.3	103.5
13	8.8	15.7	14.6	6.8	3.9	10.5	19.5	5.3	5.6	6.7	6.5	2.6	5.0	5.6	7.5	6.2	4.6	54.0
14	6.8	11.6	10.6	5.3	3.3	8.9	15.7	4.3	4.8	7.7	5.6	0.3	4.1	4.0	0.0	6.5	2.2	47.4

**Tab. 3.11** Poolsequenzierung von **HLA-A\*31012**-ehierten Peptiden. Abgebildet sind die Mengen der 18 detektierbaren PTH-Aminosäuren (Cys und Trp fehlen) [pmol], geordnet nach steigender Hydrophatit von 14 Abbauschritten.

**Tab. 3.12** Das HLA-A\*31012-Motiv. Fette Symbole kennzeichnen Ankerpositionen oder Aminosäuren. Die Bewertung der Poolsequenzierungsdaten erfolgte wie beschrieben.

HLA-A*31012	Position									Herkunft, [Literatur]		
	1	<u>2</u>	<u>3</u>	4	5	<u>6</u>	7	8	<b>9</b>			
<b>Anker</b> oder <b>Hilfsanker</b>		<u>L</u>	<u>F</u>			<u>L</u>				<b>R</b>	[Falk et al. 1994]	
		<u>V</u>	<u>L</u>			<u>F</u>						
		<u>Y</u>	<u>Y</u>			<u>V</u>						
		<u>F</u>	<u>W</u>			<u>I</u>						
<b>Andere bevorzugte Aminosäuren</b>	K	T	K	P	P	T	N	L				
	R	Q	N	D	I	N	V	N				
				E	V	D	R	Q				
				G	F	E	F					
				S	L	R	T					
				V	Y		H					
				T	W		L					
							Y					
<b>Beispiele für Liganden</b>	L	Q	<u>F</u>	P	V	G	R	V	H	<b>R</b>	Histon H2a 23-32 [Falk et al. 1994]	
	Q	Q	<u>L</u>	Y	W	S	H	P		<b>R</b>	40S ribosomal protein S29 3-11 [Falk et al. 1994]	
	R	G	<u>Y</u>	R	P	R	F	R		<b>R</b>	Y-box transcription factor 239-247 [Falk et al. 1994]	
	K	<u>V</u>	<u>F</u>	G	P	<u>I</u>	H	E		<b>R</b>	GlcNac-P-transferase 371-379 [Falk et al. 1991]	
	K	I	M	K	W	N	Y	E		<b>R</b>	No gene bank match	
	R	<u>Y</u>	M	D	A	W	N	T	Y	S	<b>R</b>	Lamin B2/ppv1 gene [Falk et al. 1994]
<b>T-Zell Epitope</b>	S	T	<u>L</u>	P	E	T	T	V	V	R	<b>R</b>	HBV cAg 141-151 [Missale et al. 1993]
	R	L	R	D	<u>L</u>	L	L	<u>I</u>	V	T	<b>R</b>	HIV-1 gag gp41 775-785 [Safrit et al. 19994]

### 3.1.7 Das HLA-A\*3303-Ligandenmotiv

Bei der Sequenzanalyse von A\*3303-Liganden trat nur in einer Position ein singuläres Signal auf: Arg<sub>9</sub> zeigt in diesem späten Zyklus einen beinahe dreifachen Anstieg im Vergleich zum Vorzyklus (**Tab. 3.13**). Der C-Terminus des HLA-A\*3303-Liganden-

Pos.	Aminosäurekonzentration [pmol]																		
	I	V	W	L	F	M	A	G	T	S	Y	P	H	Q	N	E	D	K	R
	Ile	Val	Trp	Leu	Phe	Met	Ala	Gly	Thr	Ser	Tyr	Pro	His	Gln	Asn	Glu	Asp	Lys	Arg
1	174.2	167.3	15.5	177.2	211.1	388.2	154.0	76.7	93.6	104.5	139.2	21.6	0.0	151.9	74.8	763.3	0.0	27.6	2.6
2	320.5	704.2	20.8	366.2	497.0	123.9	410.4	80.5	218.5	94.4	578.5	91.7	1.5	61.4	82.3	65.0	5.6	13.4	8.1
3	357.0	308.9	31.7	693.3	288.7	178.0	355.0	149.0	59.4	45.6	222.0	86.3	4.7	154.5	155.3	138.9	22.9	415.7	26.6
4	196.8	170.1	16.9	235.2	100.4	64.8	271.8	304.2	66.9	93.0	87.4	402.0	7.9	104.0	108.7	303.6	205.6	311.8	33.1
5	309.4	295.7	22.9	329.6	239.3	86.0	208.7	206.5	54.7	51.1	118.2	449.6	14.2	81.4	82.0	155.7	73.4	345.7	52.9
6	426.9	271.4	18.8	393.1	275.8	86.6	187.1	238.3	88.8	66.1	130.3	320.6	16.7	81.5	80.4	208.9	142.9	203.4	70.3
7	294.6	369.6	17.7	263.4	189.4	56.4	203.8	154.5	82.8	50.5	154.9	168.0	16.8	82.4	73.3	146.8	42.6	198.9	55.9
8	226.1	269.1	11.6	333.0	171.5	91.5	216.5	208.6	82.9	63.2	123.8	166.4	16.2	139.2	118.7	221.8	20.3	209.5	80.7
9	108.5	119.7	6.5	174.4	90.6	48.3	93.5	111.4	41.0	33.0	64.7	89.1	9.7	65.2	44.8	94.6	34.5	184.0	218.0
10	55.0	91.0	0.0	146.4	44.7	25.9	51.4	69.9	21.3	16.8	35.7	51.1	12.0	39.4	35.8	62.7	15.8	74.1	155.0
11	28.6	32.9	0.0	44.7	22.5	10.6	31.9	36.9	9.7	9.9	12.8	28.9	2.8	15.6	19.2	20.2	6.8	63.2	93.1
12	14.0	22.3	0.0	24.5	12.3	5.6	17.3	30.9	6.2	5.8	8.0	17.0	1.5	7.8	9.5	10.8	6.7	27.1	51.8
13	8.9	10.3	0.0	19.2	8.2	3.1	12.7	22.0	4.2	5.3	6.0	10.6	2.7	5.4	6.8	7.3	5.6	11.9	26.4
14	7.5	8.6	0.0	13.3	7.9	2.6	9.6	19.0	3.2	3.1	5.4	9.3	2.6	4.2	4.7	0.0	5.3	7.5	18.0

**Tab. 3.13** Poolsequenzierung von **HLA-A3303**-eluierten Peptiden. Abgebildet sind die Mengen der 18 detektierbaren PTH-Aminosäuren (Cys fehlt) [pmol], geordnet nach steigender Hydrophatie von 14 Abbauschritten.

**Tab. 3.14** Das *HLA-A\*3303*-Motiv. Fette Symbole kennzeichnen Ankerpositionen oder Aminosäuren. Die Bewertung der Poolsequenzierungsdaten erfolgte wie beschrieben.

HLA-A*3303	Position									Herkunft, [Literatur]		
	1	<u>2</u>	3	4	5	6	7	8	<b>9</b>			
<b>Anker</b> oder <b>Hilfsanker</b>		<u>A</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>Y</u> <u>V</u>								<b>R</b>	[Falk et al. 1994]	
<b>Bevorzugte Aminosäuren</b>	D E	T	L K	P	P	I				L F		
<b>Andere Geduldete Aminosäuren</b>	M		Q W E N	R D E G	R I F W	R D H Y	H Y V T	Q N E M				
<b>Beispiele für Liganden</b>	D E T	M S <u>Y</u>	A G Y	A P G	Q S S	I I S	T V F	Q H V	<b>R</b> <b>R</b> <b>R</b>			HLA A*3302 137-145 beta actin 363-371 Initiation factor eIF3 p40 124-132
	D	<u>Y</u>	I	H	I	R	I	Q	Q	<b>R</b>		Translation factor sui I homolog 29-38
	E	<u>I</u>	M	K	W	N	R	E		<b>R</b>		No gene bank match
	T	<u>I</u>	M	P	K	D	I	Q	L	A	<b>R</b>	Histon 3.1/3.3 118-129
<b>T-Zell Epitope</b>	I	<u>V</u>	G	L	N	K	I	V		<b>R</b>		HIV-1 gag p24 135-143 [Buseyne et al. 1993]

motivs wurde, wie im Falle der HLA-A11 und A31-Motive, von einer basischen Aminosäure besetzt.

Neben diesem dominanten Singulettsignal am C-Terminus traten als weitere deutliche Signale die hydrophoben Aminosäuren Ala2, Ile2, Leu2, und Val2 neben den aromatischen Aminosäuren Tyr und Phe in Position 2 auf. Die Länge der gebundenen Peptide wurde hauptsächlich mit neun Aminosäuren bestimmt ( **Tab. 3.14**).

Die Charakteristika des A\*3303-Motivs zeigen sich auch bei den sechs Einzelliganden. Vier dieser Einzelliganden sind Nonamere und alle tragen einen C-terminalen Arg-Rest. Fünf der sechs sequenzierten Peptide haben einen hydrophoben oder aromatischen Rest an Position 2 der Poolsequenz und bestätigen somit P2 als Hilfsanker des Ligandenmotivs.

### 3.1.8 Das HLA-B\*2702-Ligandenmotiv

Das Ligandenmotiv der HLA-B\*2702 und der -B\*2705 gebundenen Peptide wurde in drei bzw. acht voneinander unabhängigen Isolations- und Sequenzierexperimenten bestimmt. Die kleinen Unterschiede - drei Aminosäuresubstitutionen an Positionen 77 (Asp in B\*2705, Asn in B\*2702), 80 (Thr→Ile) und 81 (Leu→Ala; [Bjorkman und Parham 1990]) - zwischen den beiden HLA-Molekülen lassen vermuten, daß sich die B\*2702- und B\*2705-Ligandenmotive nur geringfügig voneinander unterscheiden. Alle drei Aminosäureaustausche befinden sich in der "F-Tasche" des B27-Moleküls [Matsamura et al., 1992]. Durch diese Substitution von Asp gegen Asn in Position 77 enthält die F-Bindungstasche von B\*2702 weniger negative Ladungen als die von B\*2705. Das B\*2702-Motiv bevorzugt Liganden mit einer Länge von neun Aminosäuren. Der carboxy-terminale Anker wird hauptsächlich durch die aromatischen Resten Phe und Tyr (neben Spuren von Trp) gebildet, läßt aber auch die aliphatischen Reste von Leu und Ile (**Tab. 3.16**) zu. Position 2 ist exklusiv für Arg reserviert und stellt somit neben Position 9 den zweiten Anker des B\*2702-Motivs dar. In den Zyklen 3 bis 6 lassen sich sehr unterschiedliche Aminosäuremuster beobachten. Dennoch wird in Position 3 eine Bevorzugung von Phe und Leu, in den Positionen 6 und 7 eine Präferenz für Tyr oder aliphatische Reste, in Position 8 eine Vorliebe für polare Tyr oder aliphatische Reste sowie in Position 8 eine Vorliebe für polare Aminosäuren erkennbar (**Tab. 3.15**).

Pos.	Aminosäurekonzentration [pmol]																		
	Ile	Val	L	F	M	A	G	T	S	Y	P	H	Q	N	E	D	K	R	
1	380,8	332,3	120,6	247,9	118,5	302,5	577,4	0,0	69,3	91,1	39,5	36,3	57,4	6,7	36,6	35,3	394,0	78,2	
2	101,5	100,8	112,6	248,7	26,8	133,1	135,6	0,0	18,6	95,3	122,8	16,0	96,6	8,8	49,8	30,6	111,8	476,5	
3	406,5	346,9	758,8	679,8	151,5	273,4	89,3	2,25	27,5	134,5	78,3	31,2	56,6	28,9	18,2	56,7	43,4	159,2	
4	178,3	220,3	442,1	193,0	63,2	215,6	306,6	0,0	21,2	53,3	303,4	23,1	136,3	31,8	101,3	87,3	228,8	88,7	
5	396,8	427,4	414,2	186,7	100,1	131,5	202,9	0,0	27,2	58,3	303,4	24,3	90,5	40,0	84,4	58,1	92,9	61,4	
6	420,9	486,6	319,5	150,9	62,7	267,7	120,7	0,0	17,0	72,9	208,9	25,4	84,1	40,7	77,1	65,7	178,3	56,4	
7	327,8	457,1	514,8	182,9	103,5	191,3	135,9	0,0	14,6	109,2	163,7	24,5	63,9	36,4	82,4	58,5	25,3	46,7	
8	130,0	345,6	345,8	116,0	70,7	147,9	118,7	0,0	15,8	80,2	87,2	26,1	80,5	64,9	107,8	64,0	177,7	60,9	
9	110,7	156,9	322,2	299,0	50,2	64,1	44,2	0,0	10,3	124,3	36,6	11,9	32,4	21,7	40,3	29,2	18,2	41,8	
10	62,1	76,1	151,5	188,0	22,5	31,8	32,4	0,0	6,2	98,4	16,7	3,9	17,2	9,4	15,8	18,7	3,9	30,7	
11	22,9	36,6	72,5	96,4	10,1	16,1	19,7	0,0	1,7	54,6	9,1	2,2	4,8	7,6	7,3	14,4	0,0	23,7	
12	10,0	22,3	33,9	43,1	5,1	10,2	15,4	0,0	1,4	24,3	6,4	0,8	3,5	4,0	3,9	8,6	0,0	19,8	
13	7,3	13,4	22,9	20,1	2,6	6,9	11,5	0,0	2,2	12,3	5,5	0,0	2,3	2,2	1,4	5,5	0,0	18,6	

**Tab. 3.15** Poolsequenzierung von **HLA-B\*2702** eluierten Peptiden. Abgebildet sind die Mengen der 18 detektierbaren PTH-Aminosäuren (Cys und Trp fehlen) [pmol], geordnet nach steigender Hydrophatie von 13 Abbauschritten

**Tab. 3.16** Das *HLA-B\*2702*-Motiv. Fette Symbole kennzeichnen Ankerpositionen oder Aminosäuren. Kursiv gedruckte Symbole kennzeichnen schwache Signale. Die Bewertung der Poolsequenzierungsdaten erfolgte wie beschrieben.

HLA-B*2702	Position									Herkunft. [Literatur]	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
<b>Anker</b>		<b>R</b>								<b>F</b> <b>Y</b> <b>I</b> <b>L</b> <b>W</b>	[Röttschke et al. 1994]
<b>Bevorzugte Aminosäuren</b>			F			Y	Y	K			
			L			I	L	N			
						V	V	D			
								E			
								R			
<b>Andere Geduldete Aminosäuren</b>	K		F	G	I	I	Y	K			
			L	P	K	V	L	V			
				K	E	Y	V	D			
				D	V	R	T	E			
				E	M	D	F	R			
				Q	T	H					
				T		E					
				S		Q					
<b>Beispiele für Liganden</b>	S	<b>R</b>	D	K	T	I	I	M	<b>W</b>		HGNBP beta-subunit C5 35-43
	G	<b>R</b>	L	T	K	H	T	K	<b>F</b>		60S ribosomal protein L36 (rat) 29-38
	R	<b>R</b>	F	V	N	V	V	P	T	<b>F</b>	40S ribosomal protein S30 40-49
	K	<b>R</b>	Y	K	S	I	V	K	<b>Y</b>		HFPS 191-199
	K	<b>R</b>	K	K	A	Y	A	D	<b>F</b>		Cytochrome C oxidase 42-50
	K	<b>R</b>	G	I	L	T	L	K	<b>Y</b>		Actin 63-71
	G	<b>R</b>	F	G	V	G	N	K	<b>Y</b>		No gene bank match
	G	<b>R</b>	F	K	L	I	V	L	<b>Y</b>		No gene bank match
<b>T-Zell Epitope</b>	K	<b>R</b>	W	I	I	L	G	L	N		HIV-1 gag p24 131-139 [Nietfield et al. 1995]
	L	<b>R</b>	S	R	Y	W	A	I			Influenza A NP 381-388 [Tussey et al. 1995]
	R	<b>R</b>	I	Y	D	L	I	E	<b>L</b>		EBV EBNA-6 258-266 [Brooks et al. 1993]

Durch weitere Experimente konnten acht Selbstpeptide identifiziert werden, von denen wiederum sechs – mit Hilfe einer Datenbanksuche – bereits bekannten Proteinen zugeordnet werden konnten. Alle acht analysierten Selbstpeptide entsprechen sehr gut dem aufgestellten Motiv, wobei eines eine abweichende Länge von zehn statt neun Aminosäuren besitzt (**Tab. 3.16**). Weder in der Primärstruktur der Einzelliganden, noch in den Poolsequenzierdaten konnten positiv geladene Reste am C-Terminus gefunden werden, was in diesem Fall einen erheblichen Unterschied zum B\*2705-Ligandenmotiv bedeutet.

### 3.1.9 Das HLA-B\*2705-Ligandenmotiv

Obwohl das B\*2705-Motiv jenem von B\*2702 ähnlich ist, gibt es marginale Unterschiede (**Tab. 3.18**). Den Motiven gemeinsam ist der Arg-Anker an Position 2, jedoch zeigt der C-terminale Anker an Position 9 leichte Unterschiede, die sich in der Hierarchie der Reste beschreiben lassen. Leu und Phe dominieren bei beiden Motiven, hingegen wird Met nur bei B\*2705 detektiert. Schwache, aber eindeutige Arg-Signale konnten in den meisten Experimenten ebenfalls an dieser Position gefunden werden. In den Zyklen 3 bis 8 ließen sich starke Signale mit jedoch unterschiedlicher Hierarchie im Vergleich zum B\*2702-Motiv erkennen.

Das Motiv konnte ferner durch die erfolgreiche Analyse von vierzehn B\*2705-eluierten Selbstpeptiden bestätigt werden. Zwei der identifizierten Peptide sind mit früher beschriebenen identisch [Jardetzky et al., 1991] und bei elf von ihnen ließen sich die Herkunft mit Hilfe einer Proteindatenbanksuche feststellen (**Tab. 3.17**). Neun der Peptide waren Nonamere, jeweils eines ein Octamer, ein Decamer, ein Dodecamer und eines zeigte eine Länge von 12 Aminosäuren. Mindestens fünf der analysierten B\*2705-Liganden trugen eine positiv geladene Aminosäureseitenkette (Arg, Lys oder His) an ihrem C-Terminus. Da die erfolgreich sequenzierten Peptide in vielen Kopien auftraten, ist zu vermuten, daß ihre positiv geladenen C-Termini das Poolsequenzierergebnis retuschieren. Anhand der Röntgenstruktur des B\*2705-Moleküls [Madden et al. 1991] lassen sich zwei alternative Bindungsmodelle beschreiben: Während das erste Modell eine ionische Wechselwirkung der positiv geladenen Seitenkette an Position 9 des

**Tab. 3.17** Das *HLA-B\*2705*-Motiv. Fette Symbole kennzeichnen Ankerpositionen oder Aminosäuren. Kursiv gedruckte Symbole kennzeichnen schwache Signale. Die Bewertung der Poolsequenzierungsdaten erfolgte wie beschrieben. Fortsetzung Seite 63.

HLA-B*2705	Position									Herkunft, [Literatur]		
	1	<b>2</b>	3	4	5	6	7	8	<b>9</b>			
<b>Anker</b>		<b>R</b>								<b>L</b> <b>F</b> <b>Y</b> <b>R</b> <b>H</b> <b>K</b>	[Röttschke et al. 1994] [Jardetzky et al. 1991]	
<b>Bevorzugte Aminosäuren</b>	A		L	K	I	I	I	K	M			
	G		I	Q	V	A	T	N	I			
	K		F	E	L	N	Y	R				
	R			G	P	Q	M	E				
					G	D	L	Q				
						V	W					
						K	N					
						V						
						P						
<b>Beispiele für Liganden</b>	A	<b>R</b>	L	F	G	I	R	A	<b>K</b>		60S ribosomal protein L13 188-196 [Jardetzky et al. 1991]	
	G	<b>R</b>	L	T	K	H	T	K	<b>F</b>		60S ribosomal protein L36 29-38	
	R	<b>R</b>	L	G	X	Q	Y	R	<b>R</b>		No gene bank match	
	R	<b>R</b>	F	G	D	K	L	N	<b>F</b>		Immediate early-response gene 30-38	
	G	<b>R</b>	V	F	I	I	K	E			No gene bank match	
	T	<b>R</b>	Y	P	I	L	A	G	<b>H</b>		Cytochrom P450 20-28	
	K	<b>R</b>	F	S	F	K	K	S	<b>F</b>		MARCKS (cattle) 155-163	
	A	<b>R</b>	L	Q	T	A	L	<b>L</b>			Rat core histone	
	R	<b>R</b>	L	P	I	F	S	R	<b>L</b>		TISB protein 325-333	
	R	<b>R</b>	F	M	Q	Y	Y	V	<b>Y</b>		No gene bank match	
	R	<b>R</b>	I	K	E	I	V	K	<b>K</b>	<b>H</b>	HSP 86 200-209	
	R	<b>R</b>	I	K	E	I	V	K	<b>K</b>		HSP 86 200-208 [Jardetzky et al. 1991]	
	R	<b>R</b>	M	G	P	P	V	G	G	<b>H</b>	<b>R</b>	Ribonucleoprotein L 312-322
	G	<b>R</b>	I	D	K	P	I	L	<b>K</b>			60S ribosomal protein L8 173-181 [Jardetzky et al. 1991]
	R	<b>R</b>	S	K	E	I	T	V	<b>R</b>			ATP-dependent RNA Helicase 77-85 [Jardetzky et al. 1991]
	K	<b>R</b>	F	E	G	L	T	Q	<b>R</b>			No gene bank match [Jardetzky et al. 1991]

<b>HLA-B*2705</b>	<b>Position</b>	
<i>Fortsetzung</i>	1 <b>2</b> 3 4 5 6 7 8 <b>9</b>	<b>Herkunft, [Literatur]</b>
<b>Beispiele für Liganden</b>	R <b>R</b> V K E V V K <b>K</b>	HSP90 beta 195-203 [Jardetzky et al. 1991]
	F <b>R</b> Y N G L I H <b>R</b>	60S ribosomal protein L28 37-45 [Jardetzky et al. 1991]
	R <b>R</b> Y Q K S T E <b>L</b>	Histone H3.3 52-60 [Jardetzky et al. 1991]
	R <b>R</b> W L P A G D A	Elongation factor2 341-349 [Jardetzky et al. 1991]
	R <b>R</b> I S G V D R <b>Y</b>	EST [Jardetzky et al. 1991]
	R <b>R</b> F T R P E <b>H</b>	No gene bank match [Jardetzky et al. 1991]
	K K Y Q K S T E <b>L</b>	No gene bank match [Jardetzky et al. 1991]
<b>T-Zell Epitope</b>	S R Y W A I R T <b>R</b>	Influenza A NP 383-391 [Huet et al 1990, Jardetzky et al. 1991]
	G R A F V T I G <b>K</b>	HIV-1 gp 120 314-322 [Huet et al. 1990, Buseyne et al. 1993]
	R R Y P D A V Y <b>L</b>	Measles virus F protein 323-331 [van Binnendijk et al. 1993]
	R R I Y D L I E <b>L</b>	EBV EBNA-6 258-266 [Brooks et al. 1993]
	K R W I I L G L N <b>K</b>	HIV-1 gag p24 265-274 [Huet et al. 1990, Buseyne et al. 1993]
	R R K A M F E D I	HSP60 283-291 [Cerrone et al. 1991]
	L R G K W Q R R Y <b>R</b>	EBV EBNA-6 343-351 [Brooks et al. 1993]

Liganden mit der negativ geladenen F-Tasche (des Rezeptors) beschreibt (Arg oder Lys an Position 9 und Asp 116 oder Asp 77 der B\*2705-Sequenz), wird im zweiten Modell eine nicht-ionische Interaktion von hydrophoben Seitenketten an Position 9 des Liganden mit den gleichen oder anderen B\*2705-Resten diskutiert. Die erhaltenen Daten zeigen, daß zumindest bei den Einzelpeptiden mit einer durchschnittlichen Zahl an Kopien das zweite Modell bevorzugt wird. Tatsächlich zeigen die Poolsequenzierdaten von den B\*2705-Sequenzierproben, bei denen dominante Einzelpeptide ausgespart wurden, keine Arginin-Signale an Position 9. Die entsprechende Bindungstasche des B\*2702-Moleküls sollte, wie die unterschiedliche Hierarchie der Ankerreste vermuten läßt, zwar ähnlich, jedoch nicht identisch sein. Signale von positiv geladenen

Resten an Position 9 waren weder bei der Analyse der B\*2702-Poolsequenzierdaten, noch in den Primärstrukturdaten der Einzelliganden zu finden. Da eine positiv geladene Seitenkette an Position 9 des Liganden in Asn<sub>77</sub> auf der Seite des Rezeptors keinen Gegenspieler für eine ionische Wechselwirkung hat, ist letztlich der prinzipielle Unterschied zwischen dem B\*2702- und dem B\*2705-Motiv auf das Fehlen von positiv geladenen Resten am Carboxy-Terminus von B\*2702-Liganden zurückzuführen.

Ein weiterer interessanter Aspekt unserer Daten ergibt sich aus der Tatsache, daß man prinzipiell das identische Peptid-Motiv bei der Analyse von B\*2705-Liganden, die von humanen oder transfizierten Mauszellen eluiert wurden, erhält. Lediglich kleine Unterschiede zeigen sich in der Hierarchie der gefundenen Aminosäuren in sog. Nicht-Ankerpositionen. Dies legt die Vermutung nahe, daß die „Ligandenproduktionsmaschinerie“ – das proteolytische System – sich prinzipiell beim Menschen und bei der Maus nicht unterscheidet. Obige Ergebnisse bestätigen die bereits zu einem früheren Zeitpunkt publizierte Vorstellung [Falk et al., (1992); Falk et al., (1993)], welche sich auf die Analyse von Einzelpeptide, die aus Human- bzw. Mauszellen prozessiert wurden, stützte.

### 3.1.10 Das HLA-B\*3801-Ligandenmotiv

Das HLA-B\*3801 Motiv fordert Peptide mit einer Länge von neun Aminosäuren und einem hydrophoben Anker am C-Terminus, welcher hauptsächlich von Phe oder Leu besetzt wird (**Tab. 3.18**). Während in Position 2 häufig der positiv geladene Rest His gefunden wird, zeigt Position 3 eine Vorliebe für die negativ geladenen Aminosäuren Asp und Glu.

Sieben erfolgreich sequenzierte Einzelpeptide bestätigten ferner das aufgestellte Ligandenmotiv, wobei fünf dieser Selbstpeptide von normalen zellulären Proteinen abstammen (**Tab. 3.19**).

Pos.	Aminosäurekonzentration [pmol]																	
	Ile	Val	Leu	Phe	Met	Ala	Gly	Thr	Ser	Tyr	Pro	His	Gln	Asn	Glu	D Asp	K Lys	R Arg
1	132.8	60.1	53.6	98.1	38.5	60.3	21.9	37.4	16.3	53.9	5.7	1.8	17.5	17.9	0.0	(0.0)	1.2	1.5
2	32.8	19.9	32.0	169.1	15.8	44.0	30.7	14.3	9.2	64.9	33.5	0.1	27.6	7.6	0.0	(0.0)	6.3	4.3
3	66.3	40.0	32.7	41.6	27.6	61.2	39.7	12.9	24.3	28.6	16.2	1.0	19.0	123.2	35.5	(0.0)	1.1	2.0
4	57.0	56.1	74.3	27.2	16.3	66.2	92.7	21.0	15.1	15.6	71.2	0.5	23.5	81.3	74.1	(0.0)	18.8	2.5
5	71.2	97.3	75.2	30.4	27.8	115.2	114.1	39.4	24.1	20.5	59.0	0.0	24.9	74.7	76.4	(0.0)	23.0	4.6
6	105.1	140.9	58.7	32.1	21.9	67.7	94.5	39.2	16.9	22.0	38.9	0.0	30.6	14.7	67.3	(0.0)	24.8	3.0
7	79.9	143.3	73.8	27.1	16.8	67.6	55.4	36.9	13.5	45.9	27.7	0.2	34.8	23.5	65.1	(0.0)	15.0	5.2
8	38.9	76.8	49.1	19.7	17.8	40.7	32.0	41.3	15.2	52.1	13.4	0.0	30.0	24.8	56.9	(0.0)	34.5	3.3
9	32.8	34.7	69.4	42.5	15.4	22.7	19.5	17.9	6.4	20.5	5.9	0.0	12.2	12.1	25.3	(0.0)	9.2	2.5
10	15.6	14.3	38.8	24.7	10.0	10.9	12.5	8.7	2.8	7.6	3.5	1.1	5.5	4.6	10.4	(0.0)	3.6	1.9
11	8.6	6.7	23.0	12.8	4.6	7.5	11.1	4.3	1.6	3.8	2.3	0.4	2.9	6.7	4.2	(0.0)	1.3	1.2
12	5.1	4.8	13.2	6.2	2.2	6.1	10.0	2.8	1.2	2.0	1.9	1.0	1.7	5.2	0.0	(0.0)	1.0	0.2

**Tab. 3.18** Poolsequenzierung von **HLA-B\*3801**-eluierten Peptiden. Abgebildet sind die Mengen der 18 detektierbaren PTH-Aminosäuren (Cys und Trp fehlen) [pmol], geordnet nach steigender Hydrophobie von 12 Abbauschritten.

**Tab. 3.19** Das **HLA-B\*3801**-Motiv. Fette Symbole kennzeichnen Ankerpositionen oder Aminosäuren. Die Bewertung der Poolsequenzierungsdaten erfolgte wie beschrieben.

HLA-B*3801	Position									Herkunft, [Literatur]	
	1	<u>2</u>	<u>3</u>	4	5	6	7	8	<b>9</b>		
<b>Anker</b> oder <b>Hilfsanker</b>		<u>H</u>	<u>D</u>							<b>F</b> <b>L</b>	[Falk et al. 1995]
<b>Bevorzugte Aminosäuren</b>	I	F	I	G	M	V	Y	K	I		
		P	A	E	T	I	V	Y			
		W	S	P	V	T	N	N			
		Y	N	L	A	K		R			
			M	V	E	R					
			V		G	N					
					L	H					
					K						
					S						
<b>Beispiele für Liganden</b>	E	<u>H</u>	A	G	V	I	S	V	<b>L</b>		HBV X interacting protein 40-48
	T	<u>H</u>	<u>D</u>	E	L	E	d	K	<b>L</b>		No gene bank match
	Q	Y	<u>D</u>	E	A	V	A	Q	<b>F</b>		Histone binding protein 599-607
	Y	F	<u>D</u>	P	A	N	G	K	<b>F</b>		Elongation factor2 265-273
	S	<u>H</u>	<u>I</u>	G	D	A	V	V			Cyclin 152-159
	Y	<u>H</u>	<u>E</u>	D	I	H	T	Y	<b>L</b>		Cyclin A 178-186
	T	F	<u>D</u>	V	A	P	S	R	<b>L</b>		Pm5 protein 270-278

### 3.1.11 Peptid-Motive von HLA-B39-Subtypen

Der HLA-B\*3901- und der -B\*3902 Rezeptor unterscheiden sich in ihrer Primärstruktur lediglich in den Aminosäurepositionen 63 und 67 [Kato et al. 1993]. Wie erwartet, ist das B\*3901- Motiv jenem von B\*3902 sehr ähnlich. Beide Motive binden bevorzugt Nonamere mit Leu oder einer anderen hydrophoben Aminosäure am C-Terminus und einem hydrophilen Rest in Position 2 (**Tab. 3.22A & 3.22B**). Da jedoch die Reste 63 (Asn in B\*3901, Glu in B\*3902) und 67 (Cys in B\*3901, Ser in B\*3902) [Guo et al., 1993] zu der P2 Bindungstasche gehören, unterscheiden sich auch die P2 Anker in beiden Motiven voneinander: B\*3901 verlangt nach His oder Arg, beide

Pos. Aminosäurekonzentration [pmol]																		
	I	V	L	F	M	A	G	T	S	Y	P	H	Q	N	E	D	K	R
	Ile	Val	Leu	Phe	Met	Ala	Gly	Thr	Ser	Tyr	Pro	His	Gln	Asn	Glu	Asp	Lys	Arg
1	76,3	43,3	48,9	68,7	117,0	111,3	46,8	118,3	62,0	55,8	6,2	0,0	182,1	54,7	89,3	0,0	11,3	3,3
2	27,9	19,5	20,1	26,7	13,9	46,8	28,1	16,1	14,4	14,7	15,7	27,6	119,3	9,2	29,9	1,9	13,2	26,0
3	95,5	59,9	70,4	91,8	54,9	181,2	48,7	28,4	38,2	42,2	10,2	24,2	61,9	5,9	30,3	82,3	2,5	13,0
4	82,3	66,5	80,0	56,6	42,0	160,5	145,3	26,9	31,5	30,2	114,9	24,1	72,0	6,7	90,1	90,6	41,7	13,8
5	116,6	191,4	114,4	52,7	32,6	117,0	119,6	64,6	29,5	64,7	86,8	19,6	54,9	7,4	71,9	82,2	26,7	15,7
6	175,0	172,4	90,8	38,5	28,9	77,9	60,4	29,2	16,8	29,2	56,4	13,9	38,9	11,8	49,2	59,0	18,8	19,6
7	112,5	132,0	86,4	37,5	23,7	53,4	38,5	25,4	14,2	42,4	32,2	11,3	29,3	17,1	40,3	32,3	9,6	13,9
8	56,1	104,7	49,2	15,7	20,3	45,6	21,8	24,1	12,6	30,6	17,7	8,3	24,9	8,0	44,1	26,9	15,1	16,3
9	25,6	38,3	57,2	7,3	7,5	18,5	11,3	9,5	5,8	11,4	6,9	1,3	9,0	2,8	17,7	14,3	2,7	4,4
10	13,9	19,2	35,6	4,0	4,5	10,7	7,8	6,6	3,0	10,3	4,2	0,0	3,8	1,3	8,4	8,6	0,7	2,2
11	12,4	9,8	19,7	2,1	2,6	6,2	6,0	2,7	1,9	5,7	2,6	1,4	1,9	1,0	5,2	5,5	0,2	2,0
12	6,3	6,6	9,6	0,9	1,5	4,7	4,1	1,0	1,4	3,2	1,3	0,9	1,0	0,6	0,0	2,9	0,2	0,9

**Tab. 3.20** Poolsequenzierung von **HLA-B\*3901**-eluierten Peptiden. Abgebildet sind die Mengen der 18 detektierbaren PTH-Aminosäuren (Cys und Trp fehlen) [pmol], geordnet nach steigender Hydrophobie von 12 Abbauschritten.

**Tab. 3.21** Das **HLA-B\*3901** (A) und das **HLA-B\*3902** (B) Motiv. Fette Symbole kennzeichnen Ankerpositionen oder Aminosäuren. Die Bewertung der Poolsequenzierungsdaten erfolgte wie beschrieben.

A)										
HLA-B*3901	Position									Herkunft [Literatur]
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
<b>Anker</b> oder <b>Hilfsanker</b>		<b>R</b> <b>H</b>				<u>I</u> <u>V</u> <u>L</u>			<b>L</b>	
<b>Bevorzugte Aminosäuren</b>			A D I L F V M S T Y	D E G P K	V Y I L F T G K N P	N	N Y F	S K R	V I M	
<b>Beispiele für Liganden</b>	S I S	<b>H</b> <b>H</b> <b>R</b>	I E D	G P K	D E T	A P I	V H I	V I M		Cyclin 152-159 CKShs1 59-66 GBLP 35-42
B)										
HLA-B*3902	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
<b>Anker</b> oder <b>Hilfsanker</b>		<b>K</b> <b>Q</b>			<u>I</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>V</u>	<u>I</u> <u>V</u> <u>L</u>			<b>L</b>	
<b>Andere bevorzugte Aminosäuren</b>	K A		A I F V N L T Y E H S	G P	N E G P Q S T	V Y T H F I M P R	V L T N D H	T S R	F M	

Pos. Aminosäurekonzentration [pmol]																		
I	V	L	F	M	A	G	T	S	Y	P	H	Q	N	E	D	K	R	
Ile	Val	Leu	Phe	Met	Ala	Gly	Thr	Ser	Tyr	Pro	His	Gln	Asn	Glu	Asp	Lys	Arg	
1	250.8	265.3	284.3	329.6	153.6	942.7	488.0	162.5	227.6	241.6	49.3	34.9	180.9	20.2	63.5	0.0	592.7	159.8
2	46.1	51.46	0.0	118.5	175.4	119.6	94.6	0.0	34.2	59.4	48.1	22.0	1330.9	7.5	207.0	0.0	1872.6	72.7
3	394.4	318.8	271.1	369.6	154.3	449.4	81.5	131.7	121.3	123.2	43.6	72.3	214.2	54.6	236.7	123.9	297.9	69.6
4	144.3	110.3	169.4	98.0	54.6	172.9	234.3	92.6	55.6	47.5	170.9	47.9	97.8	52.7	243.3	87.3	158.6	50.9
5	629.5	491.3	378.5	268.8	72.8	462.4	437.9	174.9	109.9	112.9	223.5	41.9	220.6	149.4	251.2	67.2	156.1	68.2
6	645.6	635.8	331.2	330.2	130.0	355.4	299.3	199.9	99.2	169.0	230.1	41.0	292.7	108.0	181.5	37.8	132.4	89.5
7	507.4	599.4	439.5	237.1	103.7	277.7	144.5	216.0	69.6	146.0	130.8	51.0	206.1	107.5	174.0	87.3	110.3	65.9
8	195.9	441.3	236.2	78.1	52.4	333.9	75.5	291.1	101.6	81.7	58.1	25.2	188.4	49.7	180.5	64.5	78.5	86.7
9	119.2	179.6	608.9	79.4	58.0	95.6	34.4	56.7	30.2	27.2	20.8	10.6	69.5	17.9	54.7	53.7	34.5	42.0
10	34.5	50.55	158.3	24.3	18.9	44.6	21.2	28.7	14.0	10.8	8.9	3.5	22.9	8.2	18.4	50.7	14.4	25.8
11	17.9	23.5	60.6	13.1	6.5	20.8	15.8	9.8	6.5	6.6	5.9	2.2	10.0	4.9	10.3	33.6	10.6	22.9
12	9.4	13.6	24.5	6.4	2.9	11.4	12.4	5.8	3.8	3.8	3.4	1.0	5.6	2.8	5.2	21.0	6.8	16.5

**Tab. 3.** 22Poolsequenzierung von **HLA-B\*3902**-eluierten Peptiden. Abgebildet sind die Mengen der 18 detektierbaren PTH-Aminosäuren (Cys und Trp fehlen) [pmol], geordnet nach steigender Hydrophobie von 12 Abbauschritten.

positiv geladen, während B\*3902 die positive Aminosäure Lys und das neutrale, polare Gln bevorzugt. Beiden Motiven ist eine Vorliebe für hydrophobe Reste in den Positionen 5 und 6 gemeinsam wobei dieses Merkmal in P6 bei B\*3901 und in P5 bei B\*3902 stärker ausgeprägt ist (*Tab. 3.20 und Tab. 3.21*). Die Aspekte des B\*3901-Ligandenmotivs spiegeln sich in den drei erfolgreich sequenzierten Einzelliganden mit Ausnahme jener der gefundenen Länge von 8 Aminosäuren wider. Folglich bindet B\*3901 sowohl Nonamere als auch Octamere. Weitere Aussagen über das B\*3902-Motiv sind nicht möglich, da keine Einzelliganden erfolgreich sequenziert werden konnten.

### 3.1.12 Ligandenmotive von HLA-B51 Subtypen

HLA-B\*5101- und -B\*5102-Moleküle bevorzugen Peptide mit einer Länge von neun Aminosäuren und einem hydrophoben Rest am carboxy-terminalen Ende (*Tab. 3.25A & Tab. 3.27*). Die Poolsequenzierdaten konnten zwar nur bis Position 7 interpretiert werden, doch die Primärstruktur von drei analysierten Liganden legt die Vermutung nahe, daß das HLA-B\*5103 Motiv große Übereinstimmung mit den beiden obigen Ligandenmotiven hat (*Tab. 3.25B*). Position 2 ist bei allen drei Motiven sehr ähnlich und stellt einen Anker für kleine Reste wie Ala, Pro und Gly dar, was wiederum eine kleine P2-Tasche vermuten läßt. Dennoch treten - zumindest bei B\*5101 und B\*5103 - an ein paar wenigen Liganden an Position 2 die voluminösen, hydrophoben Reste Phe und Trp auf und zeigen so eine alternative Interaktion der P2-Seitenkette mit der Bindungsgrube an. Alle drei Motive bevorzugen Tyr oder eine andere aromatische Aminosäure in Position 3, was bei B\*5102 und B\*5103 ausgeprägter ist als bei B\*5101. In den anderen Positionen zeigten sich keine spezifischen Signale. Die große Übereinstimmung dieser drei Motive wird durch wiederholt detektierte Einzelliganden unterstrichen: Das aus dem Guanidin-Nucleotid-bindende Protein D stammende Peptid (GBLP) (192-200) ist der dominante Ligand der drei MHC-Moleküle B\*5101, B\*5102 und B\*5103. Das Ubiquitin-konjugierte Enzym E2-16 KD (UBC5) 6148 ist ein Ligand von B\*5101 und B\*5102, während die Thymidilat-Synthase (TYSY) (253-261) außer

Pos. Aminosäurekonzentration [pmol]																			
	I	V	L	F	M	A	G	T	S	Y	P	H	Q	N	E	D	K	R	
	Ile	Val	Leu	Phe	Met	Ala	Gly	Thr	Ser	Tyr	Pro	His	Gln	Asn	Glu	Asp	Lys	Arg	
1	106.9	196.0	106.3	172.4	127.0	197.4	230.7	238.6	96.3	118.9	44.6	8.7	95.7	28.4	63.9	157.6	6.9	11.5	
2	41.0	108.6	47.0	148.3	35.4	287.1	305.7	59.2	55.7	88.7	153.5	4.6	62.8	9.2	31.8	81.0	17.0	0.0	
3	36.6	79.2	41.5	126.9	25.2	179.3	173.3	33.0	42.8	153.0	100.1	3.4	78.5	10.9	27.0	56.5	13.6	0.6	
4	35.4	62.0	97.5	44.5	12.8	138.9	176.5	49.9	43.4	62.5	61.4	3.7	59.1	16.0	40.2	46.7	21.1	4.5	
5	35.0	97.4	53.2	36.0	25.6	128.0	147.8	43.8	31.8	37.6	56.1	4.9	43.9	44.2	33.1	44.7	15.6	10.5	
6	32.0	65.1	50.0	16.0	11.6	93.9	97.7	63.0	24.4	20.0	35.0	4.8	35.6	23.2	24.7	29.8	12.3	1.0	
7	35.5	119.1	41.6	21.6	21.6	81.2	95.3	43.6	21.0	17.6	38.4	4.5	34.6	17.4	28.1	30.9	23.0	8.3	
8	36.0	72.2	31.0	19.0	18.6	53.7	61.2	53.0	18.5	15.6	25.0	4.3	21.4	11.0	21.6	24.5	17.1	5.4	
9	30.9	56.2	24.5	17.3	14.7	35.8	44.2	26.3	12.5	13.6	20.6	4.5	16.4	8.9	18.8	21.3	13.3	6.5	
10	22.8	34.4	18.3	14.9	12.0	21.8	30.3	9.5	7.9	9.4	16.1	3.2	9.0	5.8	11.1	10.9	9.7	4.7	
11	17.4	24.6	15.3	13.7	11.3	17.6	24.3	5.4	5.6	7.6	14.9	2.7	6.1	4.1	7.9	9.2	8.9	3.3	
12	14.6	19.9	13.2	12.7	10.7	14.2	21.0	4.1	4.4	6.2	14.8	2.0	4.7	3.6	6.3	7.5	8.0	3.5	

**Tab. 3.23** Poolsequenzierung von **HLA-B\*5101**-elutierten Peptiden. Abgebildet sind die Mengen der 18 detektierbaren PTH-Aminosäuren (Cys und Trp fehlen) [pmol], geordnet nach steigender Hydrophatite von 11 Abbauschritten.

Pos.	Aminosäurekonzentration [pmol]																	
	I Ile	V Val	L Leu	F Phe	M Met	A Ala	G Gly	T Thr	S Ser	Y Tyr	P Pro	H His	Q Gln	N Asn	E Glu	D Asp	K Lys	R Arg
1	236.7	153.9	523.8	389.2	324.5	94.0	80.7	298.0	89.5	321.3	7.5	25.8	108.2	56.0	69.7	61.1	0.0	0.0
2	26.0	62.5	32.7	112.8	0.0	585.2	249.5	27.1	30.3	71.1	715.2	8.4	35.2	10.2	14.8	22.3	7.5	3.2
3	82.5	88.8	149.1	228.4	49.5	244.7	97.65	35.0	44.1	352.0	209.2	9.1	33.1	55.9	22.8	63.5	23.1	11.9
4	71.5	92.9	222.9	47.9	24.1	132.9	214.6	67.5	36.1	67.5	132.8	12.2	48.6	44.6	97.3	63.8	81.9	15.2
5	63.1	214.6	81.8	50.2	26.9	199.0	211.7	88.9	44.1	42.0	107.5	17.7	49.8	90.5	51.9	59.0	55.2	21.0
6	141.9	164.0	98.3	47.1	31.9	105.5	134.1	128.9	35.5	26.9	83.5	12.7	56.0	66.2	35.0	53.7	70.3	19.8
7	82.3	164.9	75.8	22.8	36.0	78.1	74.1	66.1	25.1	18.5	51.7	11.8	66.7	34.2	57.7	43.1	78.2	43.9
8	56.6	73.7	37.7	15.1	24.8	37.1	44.0	99.0	20.9	26.7	21.6	8.9	37.4	22.5	44.3	25.6	42.9	28.7
9	53.6	69.0	18.4	7.3	5.9	14.6	22.6	27.0	7.8	12.1	9.1	5.2	13.6	9.5	19.4	17.3	13.8	12.3
10	28.5	37.9	10.6	7.7	9.2	8.5	15.1	12.4	4.4	7.9	10.4	3.1	5.9	4.7	9.2	10.3	6.8	6.7
11	12.7	18.4	6.7	6.5	7.43	7.1	12.2	5.5	3.6	6.3	10.2	2.3	3.4	3.3	5.4	7.4	4.6	5.2
12	7.75	11.9	5.5	6.6	6.6	6.7	12.0	4.2	3.3	5.4	10.8	1.6	2.7	2.8	3.9	6.1	0.0	3.7

**Tab. 3.24** Poolsequenzierung von HLA-B\*5102-eluierten Peptiden. Abgebildet sind die Mengen der 18 detektierbaren PTH-Aminosäuren (Cys und Trp fehlen) [pmol], geordnet nach steigender Hydrophatit von 12 Abbauschritten.

Tab. 3.25 Das *HLA-B\*5101* (A) und *HLA-B\*5103* (B) Motiv. Fette Symbole kennzeichnen Ankerpositionen oder Aminosäuren. Die Bewertung der Poolsequenzierungsdaten erfolgte wie beschrieben.

A)	Position									
<b>HLA-B*5101</b>	1	<b>2</b>	3	4	5	6	7	8	<b>9</b>	<b>Herkunft, [Literatur]</b>
<b>Anker</b>		<b>A</b>							<b>F</b>	[Falk et al. 1995]
		<b>P</b>							<b>I</b>	
		<b>G</b>								
<b>Andere bevorzugte Aminosäuren</b>	I	W	I	G	V	N	K	T	W	
	L	F	L	V	T	I	Q		M	
	V		M	I	G	L	R		V	
	Y		F	K	A	K	E		L	
	D		W	E	I	Q				
			Y	D	S					
			V							
			E							
			H							
			D							
			R							
			N							
<b>Beispiele für Liganden</b>	Y	<b>P</b>	F	K	P	P	K	V		UBC enzyme E2 61-68
	D	<b>A</b>	H	I	Y	L	N	H	<b>I</b>	Thymidylate synthase 253-261
	T	<b>G</b>	Y	L	N	T	V	T	V	GBLP 192-200
	D	<b>A</b>	Y	A	L	N	H	T	L	Octamer binding factor 243-251
	I	<b>P</b>	P	E	V	N	H	T	L	No gene bank match
<b>B)</b>										
<b>HLA-B*5103</b>		<b>A</b>	<u>Y</u>						<b>V</b>	[Falk et al. 1995]
		<b>P</b>							<b>I</b>	
		<b>G</b>							<b>F</b>	
<b>Andere bevorzugte Aminosäuren</b>	T	F	F	E	G	I	V			
	V	W	D	L	A	K	M			
	D		L	N	V	T				
				R	N					
				G	Q					
				Q	M					
				T	R					
				V						
<b>Beispiele für Liganden</b>	T	<b>G</b>	<u>Y</u>	L	N	T	V	T	<b>V</b>	GBLP 192-200
	D	<b>A</b>	H	I	Y	L	N	H	<b>I</b>	Thymidylate synthase
	Y	F	D	D	T	L	E	D	<b>F</b>	No gene bank match

Pos. Aminosäurekonzentration [pmol]		V	L	F	M	A	G	T	S	Y	P	H	Q	N	E	D	K	R
Ile		Val	Leu	Phe	Met	Ala	Gly	Thr	Ser	Tyr	Pro	His	Gln	Asn	Glu	Asp	Lys	Arg
1	106.9	196.0	106.3	172.4	127.0	197.4	230.7	238.6	96.3	118.9	44.6	8.7	95.7	28.4	63.9	157.6	6.9	11.5
2	41.0	108.6	47.0	148.3	35.4	287.1	305.7	59.2	55.7	88.7	153.5	4.6	62.8	9.2	31.8	81.0	17.0	0.0
3	36.6	79.2	41.5	126.9	25.2	179.3	173.3	33.0	42.8	153.0	100.1	3.4	78.5	10.9	27.0	56.5	13.6	0.6
4	35.4	62.0	97.5	44.5	12.8	138.9	176.5	49.9	43.4	62.5	61.4	3.7	59.1	16.0	40.2	46.7	21.1	4.5
5	35.0	97.4	53.2	36.0	25.6	128.0	147.8	43.8	31.8	37.6	56.1	4.9	43.9	44.2	33.1	44.7	15.6	10.5
6	32.0	65.1	50.0	16.0	11.6	93.9	97.7	63.0	24.4	20.0	35.0	4.8	35.6	23.2	24.7	29.8	12.3	1.0
7	35.5	119.1	41.6	21.6	21.6	81.2	95.3	43.6	21.0	17.6	38.4	4.5	34.6	17.4	28.1	30.9	23.0	8.3
8	36.0	72.2	31.0	19.0	18.6	53.7	61.2	53.0	18.5	15.6	25.0	4.3	21.4	11.0	21.6	24.5	17.1	5.4
9	30.9	56.2	24.5	17.3	14.7	35.8	44.2	26.3	12.5	13.6	20.6	4.5	16.4	8.9	18.8	21.3	13.3	6.5
10	22.8	34.4	18.3	14.9	12.0	21.8	30.3	9.5	7.9	9.4	16.1	3.2	9.0	5.8	11.1	10.9	9.7	4.7
11	17.4	24.6	15.3	13.7	11.3	17.6	24.3	5.4	5.6	7.6	14.9	2.7	6.1	4.1	7.9	9.2	8.9	3.3
12	14.6	19.9	13.2	12.7	10.7	14.2	21.0	4.1	4.4	6.2	14.8	2.0	4.7	3.6	6.3	7.5	8.0	3.5

**Tab. 3.26** Poolsequenzierung von HLA-B\*5102-eluierten Peptiden. Abgebildet sind die Mengen der 18 detektierbaren PTH-Aminosäuren (Cys und Trp fehlen) [pmol], geordnet nach steigender Hydrophatit von 12 Abbauschritten.

**Tab. 3.27** Das *HLA-B\*5102*-Motiv. Fette Symbole kennzeichnen Ankerpositionen oder Aminosäuren. Die Bewertung der Poolsequenzierungsdaten erfolgte wie beschrieben.

HLA-B*5102	Position									Herkunft, [Literatur]	
	1	<b>2</b>	<u>3</u>	4	5	6	7	8	<b>9</b>		
<b>Anker</b> oder <b>Hilfsanker</b>		<b>P</b> <b>A</b> <b>G</b>	<u>Y</u>							<b>I</b>	[Falk et al. 1995]
<b>andere</b> <b>bevorzugte</b> <b>Aminosäuren</b>			F	G	V	I	R	T			
			V	E	Q	N	E	R			
			L	K	N	Q	Q	Y			
			I	L	G	T	K				
					T	T					
					Q						
					R						
					N						
					H						
<b>Beispiele</b> <b>für Liganden</b>	Y	<b>A</b>	<u>Y</u>	D	G	K	D	Y	<b>I</b>		HLA-B*5102 116-124
	Y	<b>P</b>	F	K	P	P	K	V			UBC enzyme E2 60-67
	L	<b>P</b>	P	G	R	I	I	K	X		No gene bank match
	L	<b>P</b>	F	T	V	I	L	V			Guanine nucleotide related protein 562-569
	T	<b>G</b>	<u>Y</u>	L	N	T	V	T	<b>V</b>		GBLP 192-200
	F	<b>A</b>	<u>Y</u>	D	G	K	D	Y	<b>I</b>		HLA class I 140-148
	M	<b>P</b>	W	F	K	G	w	K	<b>V</b>		Elongation factor 1 208-216
	F	<b>P</b>	S	E	I	V	G	K	R	<b>I</b>	Ribosomal protein S7/S8 135-144

außer auf B\*5101- auch auf B\*5103-Molekülen gefunden wird. Andererseits zeigen sich leichte Unterschiede zwischen den drei B51-Motiven, da deren Anker- und Nicht-Ankerpositionen verschiedene Vorlieben aufweisen.

### 3.1.13 Das HLA-B\*5201-Ligandenmotiv

Das HLA-B\*5201 Motiv bindet bevorzugt Peptide mit einer Länge von acht oder neun Aminosäuren und einem hydrophoben C-terminalen Anker. Die Daten lassen keine weiteren eindeutigen Ankerpositionen erkennen (**Tab. 3.28**). Stattdessen verwendet das B\*5201-Ligandenmotiv drei Hilfsanker: Position 2 für Gln, Position 3 für aromatische

Pos.	Aminosäurekonzentration [pmol]																	
	I Ile	V Val	L Leu	F Phe	M Met	A Ala	G Gly	T Thr	S Ser	Y Tyr	P Pro	H His	Q Gln	N Asn	E Glu	D Asp	K Lys	R Arg
1	306,5	470,8	335,0	221,5	104,1	263,5	122,4	116,3	129,3	158,5	21,0	15,6	202,1	55,9	121,6	0,0	667,6	0,0
2	89,4	44,4	94,9	357,7	414,7	119,9	145,8	9,0	105,3	74,9	86,2	3,8	977,9	16,5	326,9	0,0	19,2	0,7
3	296,9	192,3	302,3	415,0	94,2	96,7	51,0	73,4	28,9	393,0	180,7	8,3	112,0	43,3	60,4	108,4	139,0	0,0
4	316,9	212,0	402,4	83,2	69,7	155,1	102,1	85,4	41,6	106,3	341,1	4,7	120,9	49,9	197,2	74,1	219,2	0,0
5	410,3	520,2	391,5	189,0	127,9	261,4	115,5	108,2	36,8	41,0	193,6	7,4	109,2	37,9	80,4	24,1	65,1	0,0
6	226,0	217,9	356,1	54,5	44,4	126,9	77,1	82,7	54,5	22,6	246,0	9,5	78,5	74,4	84,5	19,1	129,0	0,0
7	113,1	237,4	151,3	31,5	55,3	99,0	61,5	99,5	37,8	56,7	84,8	10,4	115,2	70,6	152,4	5,7	284,6	0,0
8	323,5	339,9	84,7	21,9	20,5	35,3	19,6	64,1	18,9	25,3	26,1	0,4	29,5	33,9	73,4	0,0	80,6	17,1
9	155,7	170,2	56,3	27,5	13,9	12,8	15,4	13,5	5,5	10,8	12,4	1,1	12,9	7,9	22,9	4,2	13,1	4,6
10	50,7	60,4	26,3	11,7	6,1	9,1	10,8	8,7	3,0	6,4	6,6	2,8	7,8	4,5	11,5	6,5	5,0	3,0
11	17,1	21,2	13,4	5,3	2,9	6,2	8,1	4,1	2,7	3,1	5,0	1,2	5,5	6,4	8,	3,6	2,7	2,6
12	7,1	11,0	7,3	3,4	2,6	3,7	9,2	2,6	1,7	2,4	3,5	1,0	3,3	4,3	3,8	2,7	1,5	2,1

**Tab. 3.28** Poolsequenzierung von **HLA-B\*5201**-eluierten Peptiden. Abgebildet sind die Mengen der 18 detektierbaren PTH-Aminosäuren (Cys und Trp fehlen) [pmol], geordnet nach steigender Hydrophatit von 12 Abbauschritten.

**Tab. 3.29** Das **HLA-B\*5201**-Motiv. Fette Symbole kennzeichnen Ankerpositionen oder Aminosäuren. Die Bewertung der Poolsequenzierungsdaten erfolgte wie beschrieben. Klassifikation auf P8 und P9 als Anker bedeutet, daß der C-terminale Anker entweder an Position P8 oder an Position P9 ist.

HLA-B*5201	Position									Herkunft, [Literatur]
	1	<u>2</u>	<u>3</u>	4	<u>5</u>	6	7	<b>8</b>	<b>9</b>	
<b>Anker</b> oder <u>Hilfsanker</u>		Q	<u>F</u>		<u>L</u>			<b>I</b>	<b>I</b>	[Falk et al. 1995]
			<u>Y</u>		<u>I</u>			<b>V</b>	<b>V</b>	
			<u>W</u>		<u>V</u>					
<b>Andere bevorzugte Aminosäuren</b>	V	M	I	L	M	K	K	M	M	
	L	F	L	I	F	N	E	F	F	
	I	P	P	V	A	L	Q			
			D	P	T	T	Y			
			K	K	G	S				
			E							
			A							
<b>Beispiele für Liganden</b>	T	G	<u>Y</u>	L	N	T	V	T	<b>V</b>	GBLP 192-200
	G	<u>Q</u>	<u>F</u>	K	T	Y	A	<b>I</b>		Ribosomal Protein S21 48-55
	H	S	T	I	M	P	R	L		PI-CDC21 695-7702
	G	F	<u>Y</u>	P	G	S	I	E	<b>V</b>	MHC II beta chain 121-129
	V	<u>Q</u>	I	F	G	N	K	M		RBAP-2 432-439
	Y	F	D	P	A	N	G	K	F	Elongation factor 2 265-273
	L	<u>Q</u>	<u>F</u>	P	<u>V</u>	G	R	<b>I</b>		Histone H2a Z 25-32
	H	M	<u>Y</u>	I	F	L	H	T	<b>V</b>	No gene bank match
<b>T-Zell Epitope</b>	A	F	H	H	<u>V</u>	A	R	E	L	HIV-1 nef 190-198 [Hidda et al. 1995]

und Position 5 für aliphatische Reste. Die wesentlichen Aspekte des HLA-B\*5201-Ligandenmotivs sind auch bei den acht Einzelliganden anzutreffen. Vier dieser Einzelliganden sind Octamere, die anderen vier haben eine Länge von neun Resten. Das Peptid GBLP (192-200), das sowohl auf den HLA-B\*5101, -B\*5102 und -B\*5103-Molekülen angetroffen wurde (vgl. **Tab. 3.25A**, **B** und **Tab. 3.27**), findet man also auch unter den B\*5201-Liganden (**Tab. 3.29**).

### 3.1.14 Teilinformation über das HLA-B\*7801-Ligandenmotiv

Für B\*7801-Liganden konnte durch zwei voneinander unabhängige Poolsequenzierungen ein Anker für die kleinen Aminosäuren Pro, Ala oder Gly in Position 2 – analog dem B51-Motiv (vgl. 3.1.12) – wahrscheinlich gemacht werden (**Tab. 3.30**). Position 6 ist ein Anker oder Hilfsanker in Form von hydrophoben Resten. Die Poolsequenzierdaten in den Zyklen >8 waren nicht interpretierbar (**Tab. 3.31**) und ebenso konnten keine Einzelliganden sequenziert werden. Deshalb konnte das B\*7801-Motiv nicht vollständig aufgeklärt werden. Die Übereinstimmung von Position 2 im B\*7801- und dem B51-Motiv kann jedoch als eindeutig angesehen werden (vgl. **Tab. 3.25A, B und Tab. 3.27**).

**Tab. 3.30** Das HLA-B\*7801-Motiv. Dieses Motiv ist nur partiell, da der C-terminale Anker nicht bestimmt werden konnte. Fette Symbole kennzeichnen Ankerpositionen oder Aminosäuren. Die Bewertung der Poolsequenzierungsdaten erfolgte wie beschrieben.

HLA-B*7801	Position									Literatur
	1	<b>2</b>	3	4	5	<u>6</u>	7	<b>8</b>	9	
<b>Anker</b> oder <u>Hilfsanker</u>		<b>P</b> <b>A</b> <b>G</b>				<u>I</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>V</u>		<b>A</b>		[Falk et al 1995]
<b>Andere bevorzugte Aminosäuren</b>			Y D W	F D G L V S Q R N	D G V N R T		A V N K Q E	K S		

## Pos. Aminosäurekonzentration [pmol]

	I	V	L	F	M	A	G	T	S	Y	P	H	Q	N	E	D	K	R
	Ile	Val	Leu	Phe	Met	Ala	Gly	Thr	Ser	Tyr	Pro	His	Gln	Asn	Glu	Asp	Lys	Arg
1	202,2	292,0	280,4	104,6	71,6	475,8	233,7	106,9	295,5	94,2	95,2	10,9	134,5	21,0	48,0	(0,0)	77,6	0,8
2	73,1	133,9	72,9	61,5	19,6	465,3	250,9	58,1	187,7	46,8	204,5	9,1	73,0	21,2	29,4	10,3	53,1	2,0
3	66,6	53,3	67,6	63,5	18,5	205,3	222,0	40,6	95,6	73,7	90,3	5,1	48,0	27,9	29,0	34,8	43,3	2,9
4	42,4	48,5	58,5	15,6	11,1	125,3	213,2	26,3	50,7	22,6	77,5	6,9	39,9	25,2	45,5	37,6	34,1	4,6
5	31,9	42,0	59,4	18,6	12,6	89,8	173,0	31,9	41,2	18,5	55,1	6,1	29,9	19,2	24,5	41,5	26,8	5,0
6	86,3	48,0	121,9	41,4	10,2	53,8	98,0	20,6	15,3	9,2	51,3	4,9	14,7	10,6	13,4	33,7	10,1	2,9
7	47,9	61,0	73,7	17,3	5,5	79,6	65,6	21,1	17,6	9,0	17,6	4,4	16,5	17,7	18,3	41,8	17,7	4,2
8	16,5	52,0	22,1	8,6	7,7	85,0	42,9	13,5	17,9	5,9	17,9	3,0	13,9	8,8	10,6	25,2	10,6	3,9
9	7,1	20,1	11,7	7,2	4,4	63,2	26,6	6,3	7,2	3,1	7,2	0,8	4,6	2,7	3,8	14,8	5,9	0,0
10	5,7	9,5	7,0	5,1	2,7	31,8	38,7	5,0	5,1	3,4	5,1	1,7	4,2	2,3	0,0	16,9	3,7	1,3

**Tab. 3.31** Poolsequenzierung von **HLA-B\*7801**-eluierten Peptiden. Abgebildet sind die Mengen der 18 detektierbaren PTH-Aminosäuren (Cys und Trp fehlen) [pmol], geordnet nach steigender Hydrophobie von 10 Abbauschritten.

### 3.1.15 Das HLA-B\*58-Ligandenmotiv

Betrachtet man die Poolsequenzierdaten von HLA-B\*58-Liganden, fällt der aromatische C-terminale Anker in Position 9 (**Tab. 3.33**) durch sein starkes Signal besonders auf. Acht der neun sequenzierten B\*58-Einzelantigenen trugen entweder Phe oder Trp an ihrem C-terminalen Ende (**Tab. 3.32**). Position 2 bildet den Anker bestehend aus kleinen Resten wie Ala, Ser, Thr oder Gly, was mit der Primärstruktur der analysierten Selbstpeptide übereinstimmt. Während P4 eine Präferenz sowohl für

**Tab. 3.32** Das **HLA-B\*58-Motiv**. Fette Symbole kennzeichnen Ankerpositionen oder Aminosäuren. Die Bewertung der Poolsequenzierungsdaten erfolgte wie beschrieben. Kleine Symbole in den Peptidsequenzen zeigen Reste mit geringerer Wahrscheinlichkeit an.

HLA-B*5801	Position									Herkunft, [Literatur]	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
<b>Anker</b> oder <b>Hilfsanker</b>		<b>A</b> <b>S</b> <b>T</b>		<b>P</b> <b>E</b> <b>K</b>	<b>V</b> <b>I</b> <b>L</b> <b>M</b> <b>F</b>				<b>F</b> <b>W</b>		
<b>Andere bevorzugte Aminosäuren</b>	K	G	G	D	A	I	L	N	Y		
	R		T	Q	D	V	Y	R			
	I		I	R	N	L	M	K			
			L		T	F	N	T			
			V			Y					
			F			W					
			V			Q					
			N								
			Q								
<b>Beispiele für Liganden</b>	K	<b>A</b>	G	<b>Q</b>	<b>V</b>	V	T	I	<b>W</b>	Lamin C 490-498	
	A	<b>G</b>	D	R	<b>T</b>	F	Q	K	<b>W</b>	MHC class I 260-268	
	I	<b>t</b>	T	<b>K</b>	<b>A</b>	I	S	R	<b>F</b>	No gene bank match	
	R	<b>T</b>	D	G	K	V	F	Q	<b>F</b>	Ribosomal protein L30 23-31	
	I	<b>T</b>	S	<b>Q</b>	<b>D</b>	V	L	H	<b>S</b>	Cytochrome C oxidase 154-163	
	I	<b>S</b>	D	S	<b>N</b>	P	F	L	T	Q	No gene bank match
	K	<b>t</b>	D	<b>e</b>	<b>V</b>	V	T	L	<b>F</b>	No gene bank match	
	V	<b>T</b>	S	<b>P</b>	<b>L</b>	T	V	E	<b>W</b>	MHC class II β 209-217	
	g	<b>A</b>	V	N	<b>V</b>	V	M	T	<b>f</b>	Glucose transporter 5 322-330	

## Pos. Aminosäurekonzentration [pmol]

	I	V	L	F	M	A	G	T	S	Y	P	H	Q	N	E	D	K	R
	Ile	Val	Leu	Phe	Met	Ala	Gly	Thr	Ser	Tyr	Pro	His	Gln	Asn	Glu	Asp	Lys	Arg
1	316,6	246,5	161,8	69,1	89,0	235,9	99,5	72,5	67,7	63,8	10,3	0,0	52,3	14,3	0,0	0,0	396,6	16,1
2	176,5	289,1	85,3	81,8	76,3	475,5	127,7	328,1	342,8	34,9	28,1	0,0	15,7	9,8	4,7	0,0	53,3	3,9
3	228,1	345,0	225,0	136,0	85,2	276,0	226,9	126,5	122,7	90,8	21,6	0,1	39,5	89,3	0,0	18,5	19,8	0,0
4	100,9	133,0	83,0	48,6	25,7	149,2	161,8	95,2	79,8	31,2	243,7	0,8	69,2	84,6	0,0	75,8	131,4	0,0
5	190,1	280,5	44,5	63,8	45,9	200,8	161,9	136,7	80,8	45,5	163,8	1,3	60,4	54,3	0,0	97,3	67,3	7,6
6	189,8	295,7	161,8	130,4	51,7	149,7	158,3	127,1	67,4	108,9	127,6	6,7	133,1	92,7	0,0	99,9	47,6	9,1
7	160,8	251,3	215,4	97,3	65,2	168,1	126,8	121,5	64,1	122,5	111,9	14,7	124,3	96,2	0,0	85,3	49,5	11,7
8	110,5	199,3	159,5	85,2	46,1	128,6	100,6	149,8	58,0	88,6	59,7	9,3	112,4	84,6	0,0	63,0	79,5	19,4
9	70,5	110,0	114,7	132,0	29,3	74,7	69,3	89,9	37,0	91,5	38,5	18,8	66,5	48,4	0,0	62,7	34,5	15,2
10	39,2	62,8	62,8	60,7	17,0	53,3	43,4	44,1	20,7	52,3	21,8	9,4	36,8	26,3	0,0	30,7	16,5	12,6
11	22,2	35,6	33,7	29,8	8,5	29,9	28,4	25,7	12,9	25,2	14,8	6,0	18,3	14,1	0,0	16,7	7,8	6,9
12	14,4	24,6	22,7	17,7	6,6	20,3	25,1	19,4	11,2	15,5	10,7	8,4	12,8	11,3	0,0	0,0	4,7	1,8

**Tab. 3.33** Poolsequenzierung von **HLA-B\*58**-eluierten Peptiden. Abgebildet sind die Mengen der 18 detektierbaren PTH-Aminosäuren (Cys und Trp fehlen) [pmol], geordnet nach steigender Hydrophobie von 12 Abbauschritten.

Pro, als auch für geladene oder polare Aminosäurereste zeigt, bevorzugt P5 hydrophobe Reste, obschon auch polare Reste geduldet werden. Wie die Primärstruktur der detektierten Einzelpeptide vermuten lässt, zeigen auch die Poolsequenzierdaten neben einer Vorliebe für die positiv geladenen Aminosäuren Lys und Arg eine Präferenz für die aliphatische Aminosäure Ile in Position 1.

### 3.1.16 Das HLA-B\*60-Ligandenmotiv

Entsprechend den Poolsequenziererergebnissen binden B\*60-Moleküle bevorzugt Liganden mit einer Länge von neun Aminosäuren, wobei das C-terminale Ende von Leu besetzt wird (**Tab. 3.35**).

**Tab. 3.34** Das **HLA-B\*60**-Motiv. Fette Symbole kennzeichnen Ankerpositionen oder Aminosäuren. Die Bewertung der Poolsequenzierungsdaten erfolgte wie beschrieben. Kleine Symbole in den Peptidsequenzen zeigen Reste mit geringerer Wahrscheinlichkeit an.

HLA-B*60	Position									Herkunft	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
<b>Anker</b> oder <b>Hilfsanker</b>		<b>E</b>					<b>I</b> <b>V</b>			<b>L</b>	
<b>Andere</b> <b>bevorzugte</b> <b>Aminosäuren</b>			A	P	L	K	L	K			
			V	K	I	N	Y	R			
			I	D	V	P	M	Q			
			L	G	D	V					
			M	N	T	I					
			F	Q	N	D					
			S	T	P	R					
			D		G	Q					
			N		K						
					Q						
<b>Beispiele</b> <b>für Liganden</b>	K	<b>E</b>	S	T	L	H	L	V	<b>L</b>		Ubiquitin 63-71
	H	<b>E</b>	A	T	L	R	c	w	A	<b>L</b>	MHC class I 221-230
	Y	<b>E</b>	I	H	D	G	M	N	<b>L</b>		HSBM02C05 (expressed sequence tag)
	I	<b>E</b>	V	D	P	D	T	K	E	m	Ribosomal protein S17 95-105
	S	<b>E</b>	S	P	<b>I</b>	V	<b>V</b>	<b>V</b>	<b>L</b>		Signal peptidase 45-54

## Pos. Aminosäurekonzentration [pmol]

	I	V	L	F	M	A	G	T	S	Y	P	H	Q	N	E	D	K	R
	Ile	Val	Leu	Phe	Met	Ala	Gly	Thr	Ser	Tyr	Pro	His	Gln	Asn	Glu	Asp	Lys	Arg
1	91,8	69,9	66,9	49,0	20,0	114,9	142,2	15,3	39,8	45,4	23,3	0,0	46,7	10,7	32,6	23,4	46,8	9,9
2	42,1	42,5	55,1	24,7	17,9	80,8	85,8	46,9	18,9	33,4	22,6	0,0	47,5	13,0	1000,9	27,0	47,8	16,3
3	162,7	177,6	108,2	87,6	49,1	152,6	95,4	33,2	38,0	37,5	41,4	19,0	45,8	33,5	371,5	100,2	42,9	20,4
4	85,3	95,5	103,0	42,1	25,6	96,0	162,6	49,3	31,0	38,4	59,7	25,5	67,9	66,8	220,6	133,0	84,9	35,9
5	123,8	149,5	141,0	43,7	22,5	120,9	165,6	38,9	29,5	36,1	66,2	22,3	83,3	70,8	274,3	157,2	93,5	30,4
6	144,2	161,4	123,6	55,0	27,4	129,6	160,4	43,8	19,2	40,9	70,0	35,8	84,3	101,0	200,7	166,4	141,8	76,8
7	148,7	162,8	87,5	44,5	14,8	74,4	69,2	39,8	20,9	43,7	34,5	22,6	56,6	54,4	105,9	92,5	51,3	43,7
8	90,7	131,6	54,7	18,2	12,7	73,3	54,6	36,4	8,3	40,9	20,6	19,6	74,6	45,9	112,9	87,8	57,2	40,6
9	45,1	60,4	91,3	12,6	8,7	39,1	19,4	2,7	6,7	17,1	11,2	0,0	20,9	13,6	46,1	52,3	34,5	21,4
10	16,2	30,3	57,2	7,2	5,2	21,9	20,8	7,3	4,3	10,0	6,4	3,6	13,6	11,9	28,4	48,8	18,1	15,0
11	8,4	13,3	24,3	4,6	2,7	12,8	14,0	5,8	2,6	5,7	4,6	1,8	7,8	7,8	13,5	35,8	10,8	11,3
12	4,9	8,2	9,8	2,6	2,0	8,9	11,9	4,6	2,2	3,8	3,2	0,0	5,2	5,1	7,5	28,2	7,4	8,7

**Tab. 3.35** Poolsequenzierung von **HLA-B60**-eluierten Peptiden. Abgebildet sind die Mengen der 18 detektierbaren PTH-Aminosäuren (Cys und Trp fehlen) [pmol], geordnet nach steigender Hydrophobie von 12 Abbauschritten.

Bei den fünf analysierten Selbstpeptiden hatten drei eine Länge von neun, eines war zehn und ein weiteres elf Aminosäuren lang, wobei aber alle ein carboxy-terminales Leu trugen. Während in Position 2 eine deutliche Bevorzugung für die saure Aminosäure Glu sowohl bei der Poolsequenzierung, als auch in den Daten der Einzelsequenzierungen erkennbar ist, zeigt sich auf Position 9 eine Vorliebe für hydrophobe Aminosäurereste (*Tab. 3.34*).

### 3.1.17 Das HLA-B61-Ligandenmotiv

Zur Interpretation der HLA-B61 Poolsequenzierungsergebnisse wurden zusätzlich die Primärstrukturdaten von acht HLA-B61 Einzelpeptiden herangezogen. B61-Moleküle binden Octamere oder Nonamere mit einer aliphatischen Aminosäure am C-Terminus, vorzugsweise Val (*Tab. 3.36*). Wie im Falle des HLA-B60 Motivs, wird Position 2 von der sauren Aminosäure Glu besetzt, aber auch Pro wird auf P2 toleriert. Dieses Ergebnis stammt jedoch nur aus den Poolsequenzierdaten und spiegelt sich nicht in den Sequenzen der Einzelliganden wider, da diese ausschließlich Glu in Position 2 tragen. Während die Positionen 3 und 6 mit ihrer Präferenz für hydrophobe Aminosäuren ein ähnliches Ladungsprofil zeigen, bevorzugt Position 1 mit Gly und Arg Reste mit unterschiedlichen chemischen Eigenschaften.

Drei der acht Einzelpeptide stammen von ribosomalen Proteinen ab (*Tab. 3.37*).

**Pos. Aminosäurekonzentration [pmol]**

	I	V	L	F	M	A	G	T	S	Y	P	H	Q	N	E	D	K	R
	Ile	Val	Leu	Phe	Met	Ala	Gly	Thr	Ser	Tyr	Pro	His	Gln	Asn	Glu	Asp	Lys	Arg
1	88,7	101,0	55,3	85,2	47,7	111,2	89,6	2,9	11,7	35,0	9,4	0,0	53,6	2,8	7,3	(0,0)	97,9	0,0
2	31,6	49,8	25,5	57,4	10,9	39,7	54,0	12,8	14,3	25,7	23,9	0,0	57,1	4,9	508,8	5,8	21,2	0,4
3	186,4	125,7	150,1	227,9	41,4	103,2	81,4	43,2	20,1	61,9	25,8	0,0	59,1	24,0	90,0	19,9	51,3	0,0
4	98,2	71,7	119,1	61,0	19,8	85,5	184,2	35,9	30,8	39,6	116,1	0,0	68,4	37,4	141,8	42,6	60,9	0,0
5	127,3	121,2	118,7	61,4	43,7	110,3	199,1	37,9	30,6	29,3	83,4	0,5	64,3	31,1	88,7	71,9	67,4	0,4
6	152,4	133,2	146,6	137,4	39,8	97,0	89,3	49,2	25,2	27,2	77,8	0,0	50,7	77,0	59,5	43,3	53,7	0,0
7	135,9	145,9	137,8	63,6	28,4	100,5	97,0	49,4	18,1	97,2	53,4	0,0	39,9	29,4	55,0	24,0	30,8	0,4
8	55,5	136,4	45,1	19,6	12,5	103,0	48,4	38,0	37,6	28,8	36,8	0,3	40,4	22,6	60,2	15,0	54,4	0,0
9	29,4	90,9	29,8	14,1	8,5	107,2	25,6	17,7	12,0	10,4	36,6	0,0	15,0	10,3	24,6	9,4	15,7	0,0
10	12,4	38,4	14,8	8,5	5,7	68,7	26,2	10,8	6,5	5,5	18,7	3,9	7,3	6,7	10,6	6,4	7,3	0,0
11	7,9	18,9	8,7	5,2	3,4	41,9	16,5	5,8	3,4	4,0	9,9	2,5	4,6	3,9	0,0	3,5	8,6	0,0

**Tab. 3.36** Poolsequenzierung von **HLA-B61**-eluierten Peptiden. Abgebildet sind die Mengen der 18 detektierbaren PTH-Aminosäuren (Cys und Trp fehlen) [pmol], geordnet nach steigender Hydrophobie von 11 Abbauschritten.

**Tab. 3.37** Das **HLA-B61**-Motiv. Fette Symbole kennzeichnen Ankerpositionen oder Aminosäuren. Die Bewertung der Poolsequenzierungsdaten erfolgte wie beschrieben. Kleine Symbole in den Peptidsequenzen zeigen Reste mit geringerer Wahrscheinlichkeit an.

HLA-B61	Position									Herkunft, [Literatur]	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
<b>Anker</b> oder <b>Hilfsanker</b>		<b>E</b>	<u>F</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>W</u>			<u>I</u>				<b>V</b>	
<b>Andere bevorzugte Aminosäuren</b>	G R	P	M T	E G P L S M N D D G K F A N R S N K Q	V I L L M D G F N S K Q	N	Y V L W I T R D G	K S P	A		
<b>Beispiele für Liganden</b>	G E	<b>E</b> <b>E</b>	<u>F</u> <u>F</u>	G Q	G F	F <u>I</u>	G K	S K	<b>V</b> A	IEF 9306 (human mRNA) 127-135 Associated-microfibril protein 72-80 Ribosomal protein S21 6-13 Ribosomal protein S17 77-84 Ribonucl.reductase 290-297 Ribosomal protein S15 116-123 No gene bank match No gene bank match	

### 3.1.18 Das HLA-B62-Ligandenmotiv

HLA-B62-Moleküle binden meist Liganden mit einer Länge von neun Aminosäuren, wobei die C-terminale Position von den aromatischen Resten Phe und Tyr belegt ist (**Tab. 3.38**). Während in Position 2 besonders Gln und aliphatische Aminosäuren entdeckt wurden, finden sich auf Position 5 neben Gly auch hydrophobe Reste (**Tab. 3.39**). Obwohl P3 eine Vielzahl verschiedener Aminosäuren toleriert, ist eine Vorliebe für die positiv geladenen Reste von Lys, Arg und His erkennbar.

**Tab. 3.38** Das **HLA-B62**-Motiv. Fette Symbole kennzeichnen Ankerpositionen oder Aminosäuren. Die Bewertung der Poolsequenzierungsdaten erfolgte wie beschrieben. Kleine Symbole in den Peptidsequenzen zeigen Reste mit geringerer Wahrscheinlichkeit an.

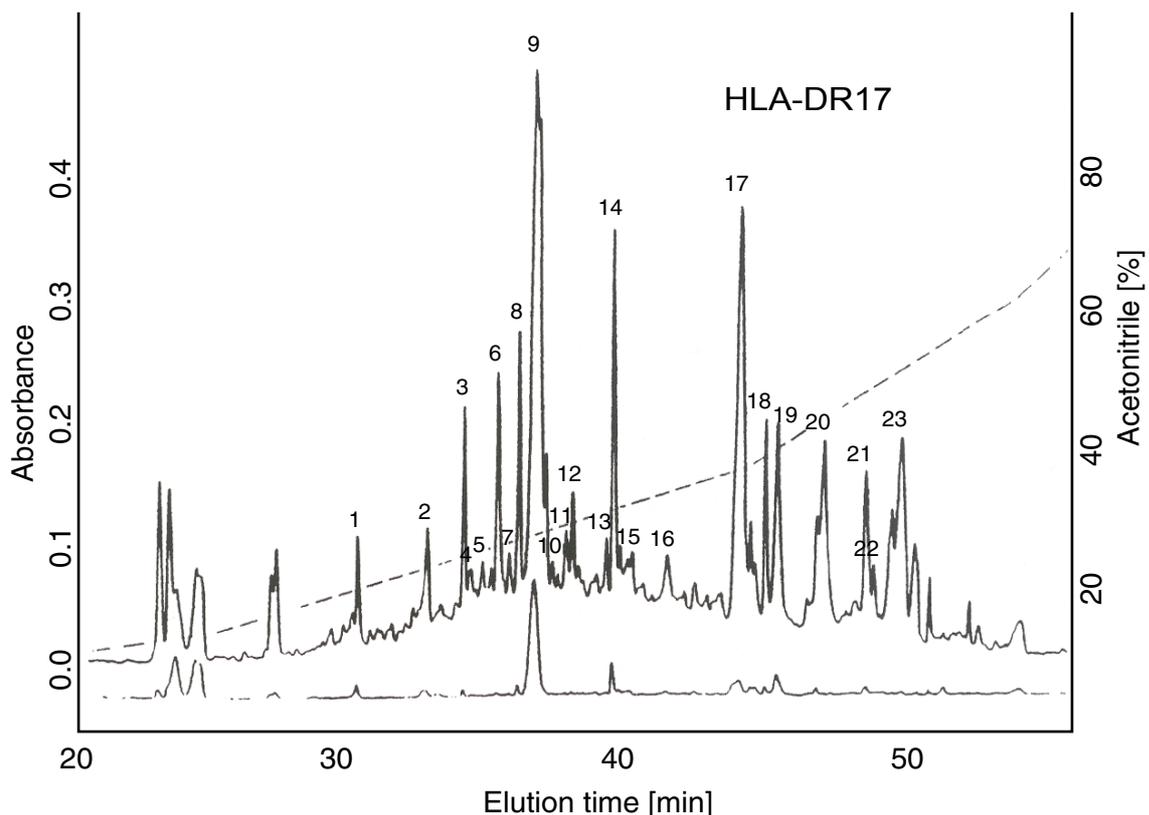
HLA-B*62	Position									Herkunft, [Literatur]	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
<b>Anker</b> oder <b>Hilfsanker</b>		<b>Q</b> <b>L</b>				<b>I</b> <b>V</b>			<b>F</b> <b>Y</b>		
<b>Andere bevorzugte Aminosäuren</b>		I	M	K	P	G	V	V	V		
			V	A	E	L	T	T	T		
				N	G	F	G	L			
				F	D	T	I	I			
				P							
				Y							
				H							
<b>Beispiele für Liganden</b>	V	<b>L</b>	K	P	G	M	V	V	T	<b>F</b>	Elongation factor 1 $\alpha$ 271-280
	Y	<b>L</b>	G	E	F	S	I	T	<b>Y</b>		Ribosomal protein S15 114-122
	G	<b>Q</b>	R	K	G	A	G	S	<b>V</b>		Ribosomal protein L8 (rat) 7-15
	K	<b>I</b>	K	S	F	V	K	V	<b>Y</b>		Ribosomal protein L27 66-74
	I	<b>Q</b>	P	G	R	G	F	V	L	<b>Y</b>	No gene bank match
	S	<b>Q</b>	F	G	G	G	S	Q	<b>Y</b>		No gene bank match
	G	<b>Q</b>	R	K	P	A	T	S	<b>Y</b>		Ribosomal protein L28 (rat) 68-76
	V	<b>Q</b>	G	P	V	G	L				Collagen $\alpha$ 1 1106-1112
<b>T-Zell Epitope</b>	I	<b>L</b>	G	N	K	I	V	R	M	<b>Y</b>	HIV gag 267-276 [Buseyne et al. 1993]

Pos.	Aminosäurekonzentration [pmol]																	
	I Ile	V Val	L Leu	F Phe	M Met	A Ala	G Gly	T Thr	S Ser	Y Tyr	P Pro	H His	Q Gln	N Asn	E Glu	D Asp	K Lys	R Arg
1	492,5	417,8	302,8	254,3	90,5	389,3	338,4	80,9	101,1	175,5	13,6	3,6	95,0	23,7	0,0	0,0	206,8	11,0
2	417,7	456,7	863,8	59,2	283,9	150,6	127,9	45,6	71,1	25,7	40,9	1,8	912,6	12,2	264,5	1,2	5,7	5,3
3	448,4	175,0	60,8	284,6	110,1	322,2	126,3	51,8	55,7	120,7	112,5	9,9	101,8	171,4	53,1	6,4	622,5	27,0
4	195,6	178,7	187,6	88,5	58,3	211,3	318,6	55,6	52,6	45,8	418,3	5,2	81,0	50,0	236,2	163,1	248,2	21,3
5	329,3	301,1	255,5	122,2	61,9	192,8	319,2	81,3	63,3	53,9	275,4	8,4	100,6	71,6	154,9	96,6	123,9	12,2
6	271,9	350,8	246,4	135,1	87,5	166,4	294,6	107,4	73,0	71,0	147,6	10,9	88,6	89,5	145,1	71,0	104,0	18,9
7	237,0	397,6	242,4	79,2	80,9	195,8	113,7	127,5	50,5	66,6	70,3	10,2	100,2	64,7	152,2	35,5	78,2	16,8
8	114,3	354,2	134,8	69,1	44,3	196,3	123,2	127,6	60,1	114,5	44,6	9,3	96,6	61,4	128,7	28,6	99,2	17,1
9	34,5	114,5	102,9	187,9	25,9	75,0	51,2	53,5	23,9	479,2	21,1	2,6	33,0	17,7	39,8	14,4	26,9	7,7
10	20,3	38,5	35,4	80,8	9,1	28,3	27,9	17,3	9,0	225,2	11,8	2,5	15,9	7,9	17,4	10,0	10,7	4,2
11	11,5	18,7	17,2	27,5	4,8	15,4	19,5	10,1	6,0	98,6	8,4	1,2	12,1	8,6	20,2	13,3	6,0	0,2

**Tab. 3.39** Poolsequenzierung von **HLA-B62**-eluieren Peptiden. Abgebildet sind die Mengen der 18 detektierbaren PTH-Aminosäuren (Cys und Trp fehlen) [pmol], geordnet nach steigender Hydrophatit von 11 Abbauschritten.

### 3.2 Pool-Sequenzierung von MHC-Klasse-II-Liganden

Die multiple Sequenzanalyse von MHC-Klasse-II-Pools ist im Vergleich zur Analyse von MHC-Klasse-I-Pools durch die unterschiedliche Länge der Liganden („ragged ends“) weitaus schwieriger. Glücklicherweise unterscheidet sich jedoch bei den meisten Liganden der Abstand vom N-Terminus zur ersten Ankeraminosäure nur geringfügig, weshalb in den Sequenzierdaten die Ankeraminosäuren dann als Signalcluster erscheinen, welche sich wiederum auf zwei oder drei benachbarte Positionen erstrecken. Somit relativiert sich die komplexe Interpretation der Daten an Positionen mit konservierter Aminosäurenbesetzung durch die additive Kumulation der entsprechenden Aminosäuren. Diese Tatsache erlaubt die genaue Bestimmung der Ankeraminosäuren und hilft bei der Identifikation von Selbstpeptiden aus dem Peptidpool, die als einzelne Signale im Chromatogramm zu erkennen sind (vgl. **Abb. 3.2**).



**Abb. 3.2** HPLC-Chromatogramm. Repräsentative RP-HPLC-Auftrennung von HLA-DR17-eluierten Peptiden. Die Peptide wurden mit Ausnahme der gekennzeichneten, dominanten „Peaks“ der Poolsequenzierung unterworfen. Aus den markierten Fraktionen wurden Einzelsequenzen bestimmt.

### 3.2.1 Das HLA-DR17-Ligandenmotiv

**Tabelle 3.40** zeigt ein repräsentatives Sequenzierexperiment eines Peptidpools von MHC-Klasse-II (DR17/52b)-Selbstpeptiden. Dargestellt ist der Verlauf der 18 detektierbaren PTH-Aminosäuren (nach steigender Hydrophathie geordnet, Cys und Trp fehlen) über die einzelnen Abbauschritte. Zur Veranschaulichung wurde in **Abb. 3.3A** und **Abb. 3.3B** das DR 17-Ligandenmotiv exemplarisch für MHC-Klasse-II-Moleküle graphisch dargestellt.

Zur Bestimmung des Ligandenmotivs von HLA-DR17-Molekülen wurden fünf voneinander unabhängige Poolsequenzierungen durchgeführt. Das stärkste Signal stammt von Prolin und erscheint reproduzierbar immer exakt in Position 2. Da dieses starke Prolin-Signal in Position 2 bei vielen MHC-Klasse-II-Peptidpools unabhängig von ihrer Länge am N-Terminus beobachtet wurde [K. Falk et al., 1994], gehört es wahrscheinlich nicht zum Ligandenmotiv von HLA-DR17-Selbstpeptiden. Einige, nicht konservierte Aminosäuren zeigen gar keine Signale, wobei jedoch deren Mengen stetig abnehmen, was sich besonders gut an Alanin, als auch bei Histidin und Glycin sehen läßt. Schwache Konturanstiege der Signale können von dominanten Selbstpeptiden oder durch nicht stabilen Hintergrund verursacht werden. Deshalb dürfen sie nicht zum Ligandenmotiv gezählt werden. Andere konservierte Aminosäuren zeigen hingegen über zwei bis drei Zyklen hinweg die erwarteten Signalcluster und erlauben so das Erstellen eines „Consensus-Motivs“.

Der erste Anker in Position 4/5, als relative Position 1 des Ligandenmotivs definiert, wird von Leu/Ile dominiert, aber auch Phe, Met und Val zeigen deutliche Signale. Der auffälligste Signalcluster zeigt sich in Zyklus 7/8: Er ist ausschließlich für Asp reserviert und repräsentiert die zweite Ankerposition in relativer Position 4 des Peptidmotivs. Ein dritter Anker läßt sich in den Zyklen 9/10 (relative Position 6) bestimmen und wird von positiv geladenen Aminosäuren bzw. Säureamiden wie Lys, Arg, Asp und Gln besetzt. Die vierte Ankerposition findet sich schließlich in den Zyklen 11-14 (relative Position 9) und wird überwiegend von hydrophoben Aminosäuren und Arg besetzt.

Das HLA-DR17-Ligandenmotiv wird in **Tabelle 3.41** komprimiert dargestellt. Die Anordnung und Besetzung der konservierten Aminosäuren in den relativen Positionen 1, 4, 6 und 8-10 ist symmetrisch: Geladene Aminosäuren liegen eingerahmt von

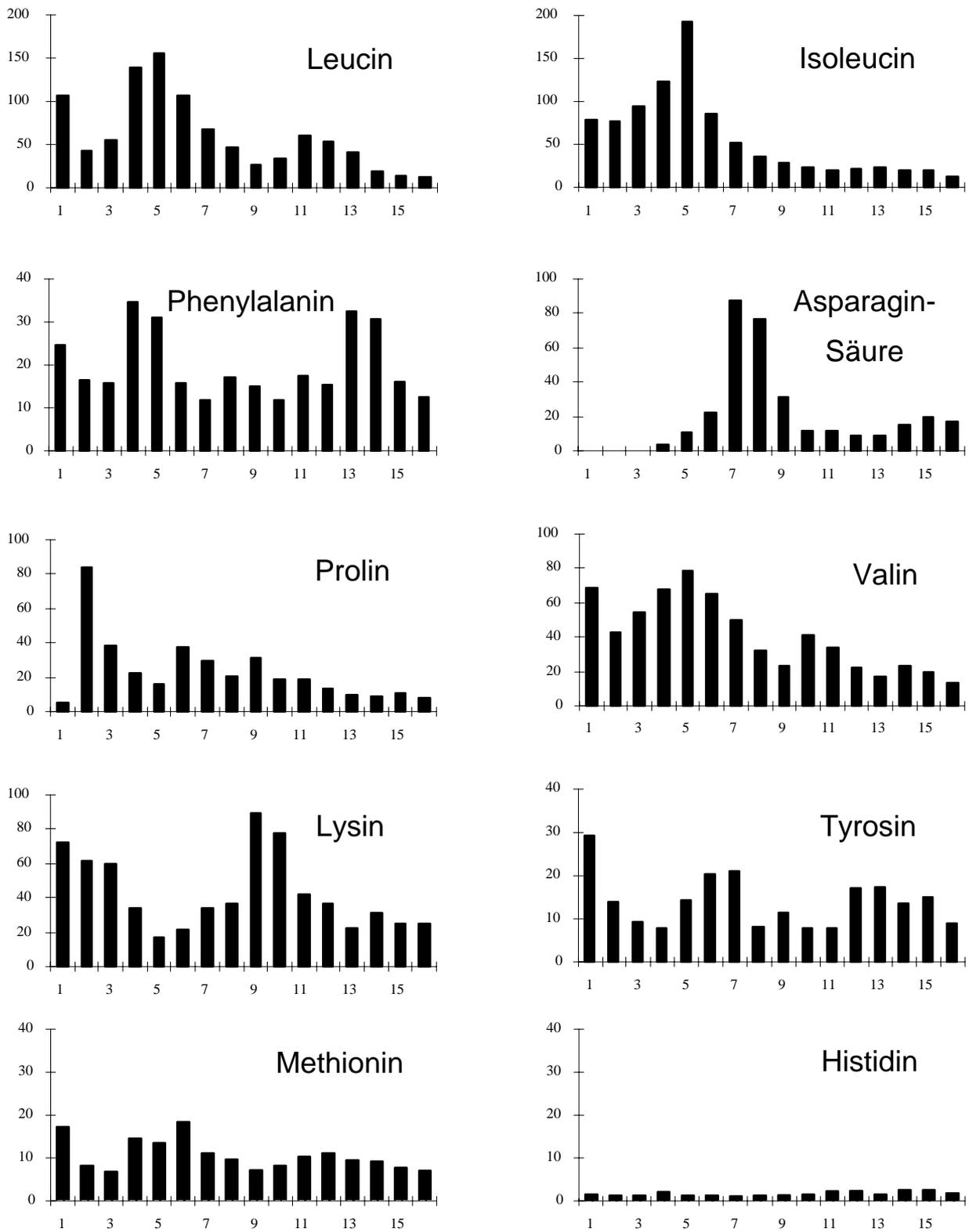
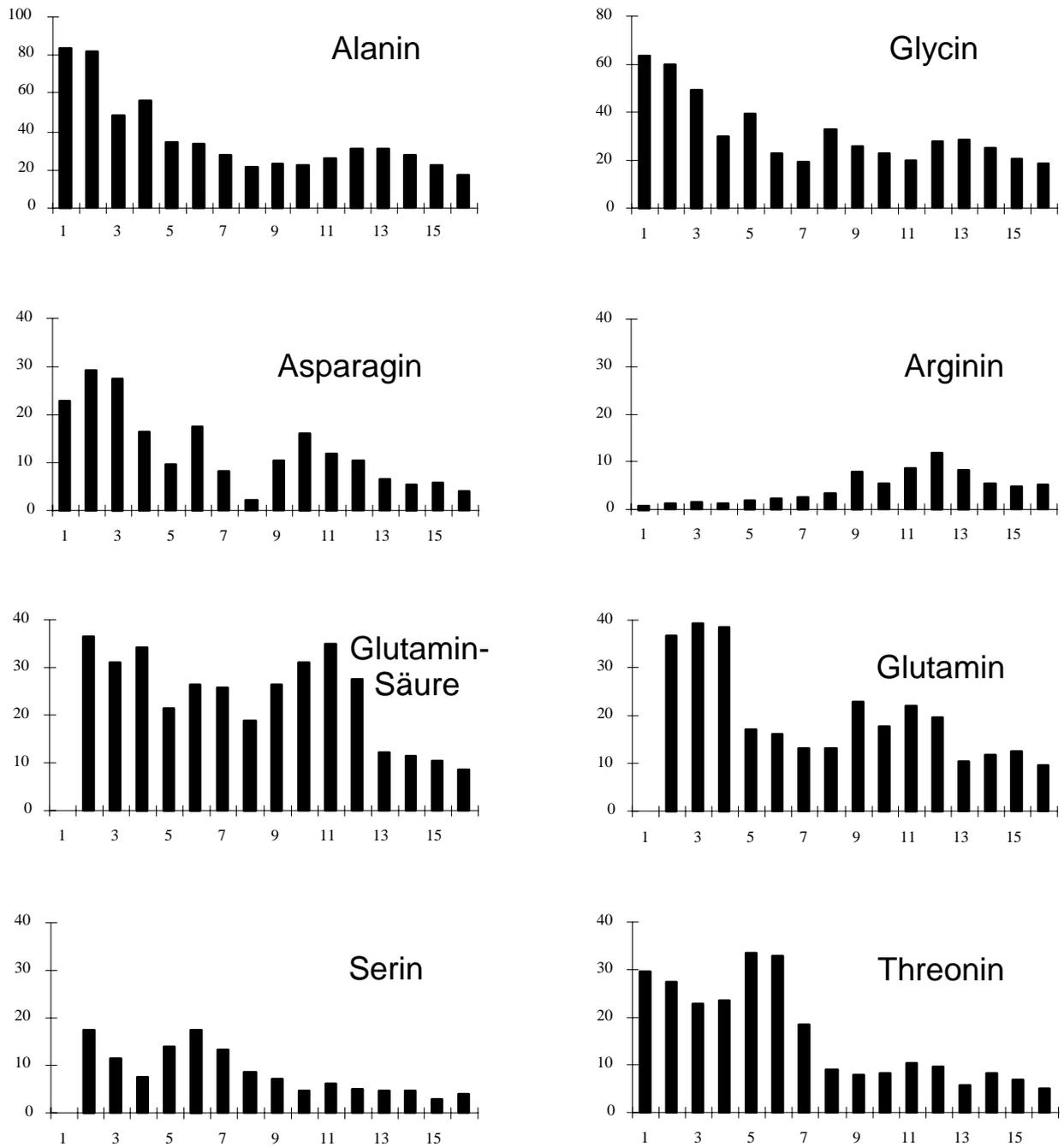


Abb. 3.3A Poolsequenzierung von *HLA-DR17*-gebundenen Selbstpeptiden.



**Abb. 3.3B** Poolsequenzierung von *HLA-DR17*-gebundenen Selbstpeptiden. Abgebildet sind die Mengen der PTH-Aminosäuren [pmol] von 16 Abbauschritten, wobei die unterschiedliche Skalierung zu beachten ist

Pos.	Aminosäurekonzentration [pmol]																		
	Ile	Val	Leu	Phe	Met	Ala	Gly	Thr	Ser	Tyr	Pro	His	Gln	Asn	Glu	D	K	R	
1	77.7	68.5	107.8	24.8	16.9	83.6	63.3	29.8	0.0	29.4	5.4	1.6	0.0	22.9	0.0	0.0	72.6	0.8	
2	77.3	43.1	43.3	16.6	8.0	81.7	59.7	27.6	17.4	13.8	83.5	1.4	36.7	29.4	36.5	0.0	61.8	1.1	
3	95.4	54.4	55.4	15.8	6.5	48.5	49.4	23.0	11.3	9.3	38.8	1.4	39.2	27.6	30.9	0.0	59.9	1.5	
4	<u>123.1</u>	<u>67.6</u>	<u>139.1</u>	34.6	<u>14.3</u>	55.8	30.2	23.5	7.6	7.7	22.5	2.3	38.6	16.5	34.4	3.3	34.0	1.2	
5	<u>193.4</u>	<u>78.7</u>	<u>154.7</u>	31.0	<u>13.3</u>	34.1	39.5	33.6	13.9	<u>14.2</u>	16.0	1.4	17.3	9.5	21.6	10.4	17.3	1.8	
6	86.4	65.0	107.5	15.6	<u>18.1</u>	33.2	23.0	32.8	17.6	<u>20.5</u>	37.2	1.4	16.0	17.6	26.5	21.9	21.8	2.0	
7	51.5	50.3	67.5	11.7	10.9	27.9	19.2	18.5	13.3	<u>21.1</u>	29.2	1.2	13.3	8.3	25.8	<u>87.2</u>	34.0	2.4	
8	35.8	32.2	46.9	17.0	9.4	21.3	32.9	8.8	8.6	8.3	20.2	1.4	13.1	2.2	18.8	<u>76.4</u>	36.5	3.3	
9	29.1	23.4	25.9	14.9	6.9	<u>23.0</u>	25.4	7.7	7.3	11.5	31.6	1.5	<u>23.0</u>	<u>10.4</u>	<u>26.4</u>	31.5	<u>89.4</u>	<u>7.8</u>	
10	22.5	41.4	34.0	11.8	8.0	<u>22.2</u>	22.7	8.2	4.6	8.0	18.7	1.7	<u>17.7</u>	<u>15.9</u>	<u>31.0</u>	11.7	<u>77.3</u>	<u>5.5</u>	
11	19.9	33.9	<u>61.5</u>	17.6	10.1	<u>26.1</u>	19.9	10.5	6.1	7.9	18.6	2.5	<u>22.1</u>	11.8	<u>35.0</u>	11.2	41.8	<u>8.6</u>	
12	20.6	22.3	<u>53.5</u>	15.4	10.9	<u>31.4</u>	27.6	9.5	5.0	<u>17.0</u>	13.8	2.6	<u>19.5</u>	10.5	<u>27.4</u>	9.0	36.7	<u>11.8</u>	
13	23.5	17.4	41.5	<u>32.4</u>	9.2	<u>31.4</u>	28.3	5.8	4.7	<u>17.5</u>	9.5	1.6	10.4	6.4	12.1	9.2	22.6	<u>8.2</u>	
14	20.0	23.0	20.3	<u>30.6</u>	9.0	27.4	24.9	8.3	4.7	13.4	8.8	2.8	11.9	5.3	11.6	<u>15.2</u>	31.0	5.2	
15	19.8	19.3	15.0	15.9	7.5	22.1	20.9	6.7	2.9	15.1	10.7	2.8	12.6	5.7	10.4	<u>19.4</u>	25.3	4.8	
16	12.7	13.8	12.1	12.4	6.8	17.3	18.6	5.1	3.9	8.8	8.2	1.9	9.7	4.0	8.7	16.9	25.1	4.9	

**Tab. 3.40** Poolsequenzierung von **HLA-DRI7**-eluierten Peptiden. Eines von fünf voneinander unabhängigen, hoch reproduzierbaren Ergebnissen ist dargestellt. Cluster mit einem Anstieg von 40-50% im Vergleich zum Vorzyklus, die sich auf zwei oder drei Position erstrecken, wurden als signifikant betrachtet und unterstrichen.

HLA-DR17	Relative Position									Herkunft, [Literatur]	Fraktion
	-1/-2	1	4	6	9						
<b>Anker</b>	P	L	D	K	Y					[Malcherek et al.1993] [Geluk et al.1994] [Geluk et al.1992]	
		I		R	L						
		F		E	F						
		M		Q							
		V		N							
<b>Beispiele für Liganden</b>	I S N Q	L	T L	S N	T K	Y F	H K	L N		Apolipoprotein B-100 2877-2894	12
	I S N Q	L	T L	S N	T K	Y F	H K	L		Apolipoprotein B-100 2877-2893	8
	I S N Q	L	T L	S N	T K	Y F	H K			Apolipoprotein B-100 2877-2892	3
	V D T	F L	E V	K N	L L	Y H	S E	A		alpha1-Antitrypsin (bovine) 149-164	18
	K P R A	I V	V D	P V	H G	F M	Y			LDL receptor 518-532	19
	K Q T	I S	P D	Y R	N M	I				IgG2a 384-395	11
	Y P N	F I	M D	P K	E L	D K	V			No gene bank match	-
	N I Q	L I	N D	Q E	V A	R F	D			No gene bank match	-
	A V N E	I I	S D	Y H	Q Q	F T				Apolipoprotein B-100 4483-4496	-
	I P D N L F	L K	S D	G R	V K	Y T	L N			Apolipoprotein B-100 1273-1290	-
	L L S	F V	R D	L N	Q Y	R A	D I			Transferrin receptor 618-632	-
<b>Invariant Chain Peptide</b>	LPKPPKPVSK	M R	M A	T P	L					Invariant chain 97-113, [Chicz et al. 1993]	-
	LPKPPKPVSK	M R	M A	T P	L L	M Q	A L	P		Invariant chain 97-119, [Sette et al. 1992]	-
	LPKPPKPVSK	M R	M A	T P	L L	M Q	A L	P M		Invariant chain 97-120, [Riberdy et al. 1992]	-
	PKPPKPVSK	M R	M A	T P	L					Invariant chain 98-113	-
	PKPPKPVSK	M R	M A	T P	L L	M Q	A			Invariant chain 98-117	-
	KPPKPVSK	M R	M A	T P	L L	M Q				Invariant chain 99-116	-
	KPPKPVSK	M R	M A	T P	L L	M Q	A L	P M		Invariant chain 99-119	-
	ATKYGN	M T	E D	H V	M H	L L	Q N	A		Invariant chain 131-149, [Chicz et al. 1993]	-

**Tab. 3.41** Das **HLA-DR17** Ligandenmotiv. Erstellt aus den Ergebnissen von fünf unabhängigen Poolsequenzierungen. Die Sequenzen von zehn natürlichen DR17 Liganden sind neben publizierten Peptiden der Invarianten Kette sinnvoll zum Ligandenmotiv gruppiert und aufgelistet.

hydrophoben Aminosäuren im Zentrum des Ligandenmotivs. In Position 1 wurden hauptsächlich aliphatische Aminosäuren und Phe gefunden, nicht aber die voluminösen, aromatischen Aminosäuren Tyr und Trp. Die markanteste Position ist P4, weil sie von einer einzigen Aminosäure dominiert wird und diese mit Asp negativ geladen ist.

Nach der Bestimmung des Ligandenmotivs von HLA-DR17-Molekülen können alle isolierten und analysierten Selbstpeptide sinnvoll gruppiert werden. Ihre Länge variiert zwischen 12 und 19 Aminosäuren. Von den 12 bestimmten Liganden tragen 5 die erste Ankeraminosäure relativ zu ihrem N-Terminus in Position 4, und fünf weitere Liganden in Position 5, während zwei Liganden ihren ersten Anker in Position 7 tragen. Insgesamt zeigt sich damit, daß die Mehrzahl der Selbstpeptide den Signalcluster in Position 4/5 generieren. Alle Liganden tragen in relativer Position 1 entweder Leu, Ile oder Phe. Position 4 wird ausschließlich von Asp besetzt, während – von einer Ausnahme abgesehen – basische Aminosäuren in Position 6 dominieren. Position 9 schließlich wird von hydrophoben Aminosäuren und Arg besetzt. So bestätigen die gefundenen Einzelsequenzen eindrucksvoll die Ergebnisse der Poolsequenzierung und das daraus abgeleitete Consensus-Motiv von HLA-DR17-Molekülen, einschließlich der Aminosäure Prolin in absoluter Position 2 (**Tab. 3.41**).

Der Ursprung zehn dieser zwölf erfolgreich sequenzierten Selbstpeptide läßt sich mit Hilfe einer Datenbanksuche feststellen. Sie stammen in der Regel von Proteinliganden oder Membranrezeptoren, deren Herkunft typisch ist für Klasse-II assoziierte Selbstpeptide auf nicht-phagozytierenden Zellen [Chicz et al., 1993].

### **3.2.2 Ligandenmotive von HLA-DR4 Subtypen**

Zur Definition der HLA-DR4-Ligandenmotive wurden drei verschiedene Informationsquellen herangezogen: Neben den Ergebnissen der Poolsequenzierung und der Primärstruktur von 60 Selbstpeptiden konnte anhand der dreidimensionalen Struktur des HLA-DR1/Peptid-Komplexes [Stern, L.J. et al., 1994] eine Verfeinerung der aufgestellten Motive durch die genaue Analyse der entsprechenden Bindungstaschen erfolgen. Wahrscheinlich besitzen die nahe verwandten DR4-Moleküle eine ähnliche Anordnung der Bindungstaschen, weisen jedoch individuelle allelspezifische Unterschiede auf.

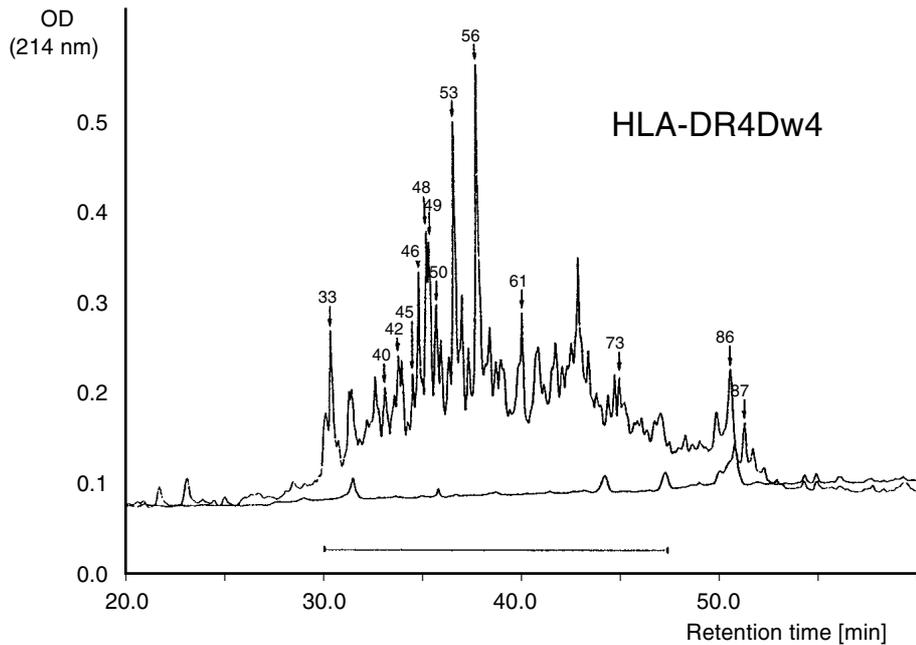
Signifikant für die Poolsequenzierdaten von HLA-DR4-Liganden ist das starke, singuläre Prolin-Signal in Position 2. Da dieses Prolin außerhalb der Bindungsgrube liegt [J.H. Brown et al., 1993], trägt es nicht zur Peptidbindung bei, sondern ist wahrscheinlich durch eine Aminopeptidase N-artige Aktivität während der Prozessierung zu erklären (vgl. „Das *HLA-DR17-Ligandenmotiv*“).

### 3.2.2.1 Das HLA-DR4Dw4 (DRB1\*0401)-Ligandenmotiv

HLA-DR4-Moleküle wurden aus der EBV-transformierten B-Zelllinie LRM immunpräzipitiert, die DR4 assoziierten Peptide säureextrahiert und mittels HPLC aufgetrennt. Die Peptide wurden mit Ausnahme der gekennzeichneten, dominanten „Peaks“ der Poolsequenzierung unterworfen, wobei aus den markierten Fraktionen Einzelsequenzen bestimmt wurden (**Abb. 3.4**).

Die erste konservierte Position des HLA-DR4Dw4-Ligandenmotivs läßt sich in den Zyklen 3, 4 und 5 durch das Auftreten der überwiegend aromatischen, aber auch aliphatischen Aminosäuren Tyr, Phe, Trp und Met festmachen. Das Zentrum dieses ersten Signalclusters liegt in Position 4, welche als relative Position 1 des Ligandenmotivs definiert wird (**Tab. 3.42**). Ein weiterer Signalcluster läßt sich in den Zyklen 6, 7 und 8, erkennen, der von den Aminosäuren Val, Ala und Leu dominiert wird. Ebenso sind Anstiege der negativ geladenen Aminosäuren Asp und Glu in den Zyklen 7 und 8 zu beobachten, wohingegen die positiv geladenen Aminosäuren nur in geringen Mengen bzw. nur als Einzelsignal (Arg in Zyklus 8) vorkommen. Das signifikante singuläre Arg-Signal (kein Cluster) in Zyklus 8 kann als Signal eines dominanten HLA-A2 Einzelliganden betrachtet werden, das aber nicht die Ankersituation reflektiert. Tatsächlich tragen von den 24 identifizierten DR4Dw4-Peptiden fünf Asp oder Glu, aber keines eine positiv geladene Aminosäure an Position 4 des Liganden. Zentrum dieses zweiten Clusters in absoluter Position 7 ist der zweite Anker in relativer Position 4.

Ein dritter Anker läßt sich in den Zyklen 9/10 (relative Position 6) festmachen. Er trägt neben polaren Resten wie Asn, Gln, Ser und Thr auch geladene Aminosäuren [Hammer, J., P. et al., 1993; Sette, A., J. et al., 1993].



**Abb. 3.4** HPLC-Chromatogramm der HLA-DR4Dw4-eluierten Peptide. Die Pfeile geben Peaks an, die getrennt und einzeln sequenziert wurden. Der horizontale Balken zeigt die Fraktionen an, die vereinigt und als Gemisch sequenziert wurden (Fraktionen zwischen 30 und 47 min). Die untere Kurve zeigt die Extinktion der Glycin-Kontrolle bei 214 nm.

Die Zyklen 10/11 der Poolsequenzierung tendieren zu positiv geladenen Aminosäuren und repräsentieren den vierten, wenig spezifischen Anker.

Die fünfte, stark degenerierte Ankerposition findet sich in den Zyklen 12-14 (relative Position 9) und läßt sich eher durch die Abwesenheit negativ geladener und aromatischer Reste, als durch die Dominanz bestimmter Ankeraminosäuren beschreiben.

Dadurch ergibt sich ein einfaches DR4Dw4-Motiv. Der erste Anker an der relativen Position 1 (reflektiert absolute Position 5) ist hydrophob. Ebenfalls der zweite Anker an relativer Position 4 (reflektiert absolute Position 8) ist hydrophob (aliphatisch) und toleriert negativ geladene Aminosäuren, wohingegen positive geladene Reste benachteiligt sind.

Einige der markantesten DR4Dw4-Liganden lassen sich von coexprimierten MHC-Klasse-I-Molekülen ableiten, insbesondere ein HLA-A2-Fragment, das in zahlreichen

Pos.	Aminosäurekonzentration [pmol]																		
	I	V	L	F	M	W	A	G	T	S	Y	P	H	Q	N	E	D	R	
	Ile	Val	Leu	Phe	Met	Trp	Ala	Gly	Thr	Ser	Tyr	Pro	His	Gln	Asn	Glu	Asp	Arg	
<b>1</b>	139.4	290.4	217.6	162.6	39.7	17.3	166.3	-	-	120.0	114.7	29.7	31.3	27.5	27.4	125.4	173.3	96.3	35.6
<b>2</b>	64.2	160.5	133.9	29.5	18.7	7.6	69.9	-	-	-	32.8	<b>155.8</b>	-	-	7.2	44.4	-	94.2	-
<b>3</b>	63.7	111.7	<u>136.9</u>	<b>68.2</b>	<b>28.4</b>	<u>8.4</u>	<b>121.1</b>	-	-	70.6	<b>80.6</b>	121.7	35.6	98.7	<b>44.8</b>	<b>122.7</b>	221.7	<b>151.3</b>	69.0
<b>4</b>	58.7	96.1	107.0	<b>205.0</b>	<b>30.8</b>	<b>14.9</b>	103.8	-	-	55.6	<b>143.2</b>	96.7	30.8	70.8	<b>56.1</b>	111.6	191.3	129.2	<u>88.2</u>
<b>5</b>	<u>75.1</u>	<b>140.4</b>	97.5	160.6	<b>33.8</b>	<b>18.6</b>	102.5	-	-	37.7	<b>151.3</b>	66.6	23.7	<b>144.3</b>	49.2	111.2	169.6	72.4	<b>101.1</b>
<b>6</b>	98.4	120.8	94.1	<u>187.1</u>	30.5	<b>19.7</b>	<u>118.1</u>	-	-	<u>44.9</u>	101.0	59.8	21.7	65.0	46.4	83.7	127.8	<b>110.3</b>	<b>117.4</b>
<b>7</b>	87.0	<b>168.7</b>	<u>101.9</u>	107.4	20.7	14.4	<b>147.7</b>	-	-	33.3	55.7	49.1	15.1	52.8	45.6	<u>96.2</u>	<u>179.2</u>	<b>123.9</b>	100.6
<b>8</b>	51.7	92.9	85.7	62.6	20.1	10.3	<b>162.3</b>	-	-	33.1	35.0	50.1	11.9	<b>75.2</b>	41.0	<u>96.2</u>	<b>191.3</b>	80.6	<b>154.2</b>
<b>9</b>	<u>52.9</u>	<u>96.1</u>	72.1	<b>117.2</b>	<u>25.9</u>	8.2	139.5	396.6	61.3	<u>43.8</u>	26.0	<u>51.0</u>	<u>13.8</u>	50.5	<b>61.2</b>	58.5	166.9	56.7	98.7
<b>10</b>	37.3	78.0	<u>76.5</u>	41.0	19.7	6.3	116.7	220.3	<u>60.1</u>	<u>46.7</u>	23.1	<u>50.7</u>	<b>17.7</b>	38.3	<b>75.8</b>	51.8	<u>231.3</u>	42.5	66.7
<b>11</b>	34.6	55.2	<u>69.0</u>	23.6	<u>23.7</u>	3.7	<u>170.3</u>	121.4	40.2	<u>54.6</u>	<u>24.4</u>	<u>57.5</u>	<b>21.0</b>	<u>51.3</u>	46.6	46.7	126.9	42.3	58.5
<b>12</b>	<u>42.7</u>	41.4	<u>70.1</u>	17.4	16.9	2.7	160.7	90.4	28.8	38.3	20.3	40.6	14.8	<b>63.5</b>	27.8	43.9	<u>134.2</u>	37.7	<u>72.3</u>
<b>13</b>	33.5	33.5	53.8	13.7	21.9	1.9	<u>172.8</u>	78.0	22.0	33.3	17.4	29.6	11.1	<b>76.2</b>	27.1	35.8	67.6	<u>50.0</u>	59.6
<b>14</b>	30.8	29.5	42.8	<u>18.6</u>	12.4	2.2	139.6	57.0	25.1	25.9	16.5	27.3	9.9	58.4	25.5	35.5	49.7	<b>52.1</b>	51.7
<b>15</b>	21.7	23.1	29.8	<u>18.2</u>	8.6	1.6	65.0	44.7	23.9	35.1	16.3	<u>29.1</u>	9.0	43.0	18.3	28.0	43.3	36.8	51.1
<b>16</b>	13.9	16.7	20.7	12.6	<b>13.3</b>	1.9	37.6	34.6	16.8	19.1	12.0	26.6	7.4	<u>59.3</u>	14.2	27.3	34.6	26.4	41.4
<b>17</b>	9.3	14.6	15.8	7.8	9.8	12	27.6	27.8	11.8	11.1	7.3	21.4	6.0	32.1	10.1	22.6	23.6	17.4	<b>63.8</b>
<b>18</b>	6.6	11.2	12.1	5.7	<b>27.1</b>	1.0	20.7	25.4	9.2	9.4	7.1	16.9	5.5	18.5	7.9	15.9	20.3	13.2	42.6

**Tab. 3.42** Poolsequenzierung von **HLA-DR4Dw4**-eluierten Peptiden. Abgebildet sind die Mengen der 18 detekrierbaren PTH-Aminosäuren (Cys und Trp fehlen) [pmol], geordnet nach steigender Hydrophatite von 18 Abbauschritten. Fette Symbole kennzeichnen einen Anstieg von mehr als 50% im Vergleich zum Vorzyklus. Unterstrichene Symbole kennzeichnen einen Anstieg oder Rückgang, der kleiner als der erwartete „Tailing Effekt“ ausfällt.

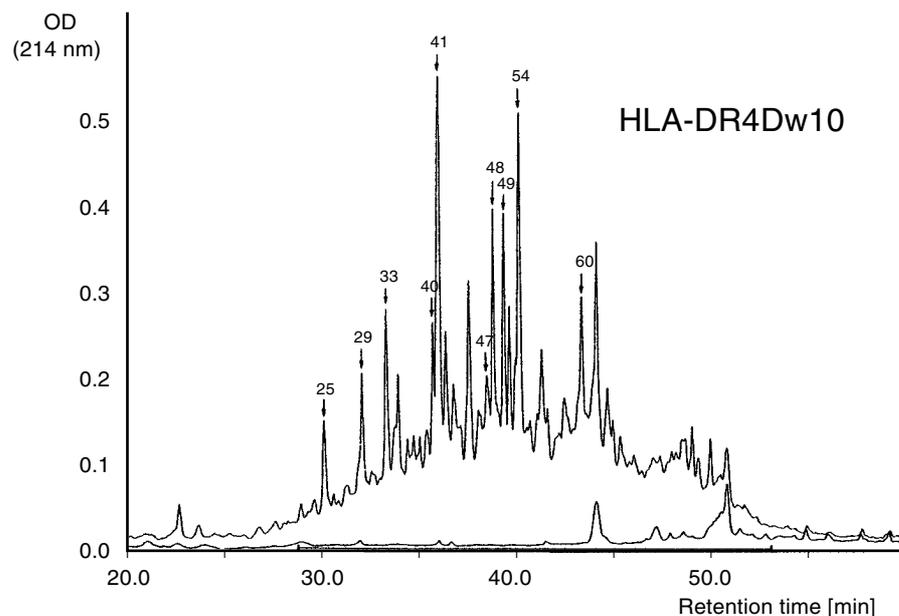
HLA-DR4Dw4	Relative Position									Herkunft, [Literatur]	Fraktion		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9				
<b>Anker oder andere bevorzugte Aminosäuren</b>	F, Y, W I, L V, M			F, W, I L, V, A D, E no R, K		N, S T, Q H, R	polar, charged, aliphatic		polar, aliphatic	K	[Friede et al. 1996] [Sette et al. 1993] [Hammer et al. 1993/1995] [Hill et al. 1994]		
<b>Beispiele für Liganden</b>	VDDTQ DTQ	F F	V V	R R	F F	D D	S S	D D	A A	A A	SQRMEP... SQR	HLA-A2 28-? HLA-A2 30-44	53, 56 40
	VDDTQ	F	V	R	F	D	S	D	A	A	SQR	HLA-A2 33-44	33
	VDDTQ	F	V	R	F	D	S	D	A	A	SQRMEP	HLA-A2 33-47	42, 49
	VDDTQ	F	V	R	F	D	S	D	A	A	SQRM	HLA-A2 28-45	46, 55
	DGKD	F	V	R	F	D	S	D	A	A	SQRM	HLA-A2 33-45	45
	LSS	F	V	R	F	D	S	D	A	A	SPRGEF...	HLA-45 28-?	50, 54
	LSS	Y	I	A	L	N	E	D	L	S	S	HLA-B44 143-156	
	LSS	W	T	A	A	D	T	A	A	Q	ITQ	HLA-B44 154-168	48
	LSS	W	T	A	A	D	T	A	A	Q	IT	HLA-B44 154-167	49
	LY	F	R	N	Q	K	G	S	H	S	GLQPTGFL	HLA-DR4β 252-270	61
	DVA	F	V	K	D	Q	T	V	I	Q	NTD	Transferrin cattle 68-82	40
	YDHN	F	V	K	A	I	N	A	I	Q	KSW	Catepsin C 170-185	73, 55
	KHKV	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	...	Igk chain C region 80-?	
	HKV	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L...	Igk chain C region 81-?	
	DGP	F	R	I	I	T	V	P	A	A	LDY	No gen bank match	86, 87
	TGN	Y	R	I	E	S	V	I	S	S		Sphin. activator protein 3 165-176	
	GERA	M	T	K	D	N	N	L	L	G	...	HSC70 445-?	
	XXX	Y	E	X	A	L	S	L	P	S	K...	No gen bank match	

**Tab. 3.43** Das **HLA-DR4Dw4** Ligandemotiv. Abgeleitet von Poolsequenzierungsergebnissen, natürlichen Liganden, und Röntgenstruktur-Daten. *HSC 70, Heat-Shock verwandtes Protein 70; PAI-Plasminogen Aktivator Inhibitor1; VLA-4, ein Zelloberflächen Heterodimer aus der Superfamilie der Adhäsions Rezeptoren.*

N- und C-terminalen Längenvarianten gefunden wurde (**Tab. 3.44**). Ihre korrespondierenden Sequenzen können selbst in den Poolsequenzierdaten verfolgt werden: So läßt sich beispielsweise die Partialsequenz QFVRFSDA leicht in den Zyklen 5 bis 13 verfolgen. In **Tabelle 3.43** sind alle erfolgreich sequenzierten DR4Dw4-Liganden neben bereits früher publizierten Selbstpeptiden [Chicz et al., 1993] im Verhältnis zum DR4Dw4-Ligandenmotiv sinnvoll gruppiert und aufgelistet.

### 3.2.2.2 Das HLA-DR4Dw10 (DRB1\*0402)-Ligandenmotiv

Die Fraktionen im Bereich zwischen 28.0 min und 58.5 min wurden vereinigt und als Gemisch sequenziert (**Abb. 3.5** und **Tab. 3.44**). Obwohl das DR4Dw10-Motiv dem DR4Dw4-Motiv sehr gleicht, gibt es dennoch marginale Unterschiede (**Tab 3.45**).



**Abb. 3.5** HPLC-Chromatogramm der HLA-DR4Dw10-eluierten Peptide. Die Pfeile geben Peaks an, die getrennt und einzeln sequenziert wurden. Der horizontale Balken zeigt die Fraktionen an, die vereinigt und als Gemisch sequenziert wurden (Fraktionen zwischen 28 und 58.5 min). Die untere Kurve zeigt die Extinktion der Glycin-Kontrolle bei 214 nm.

Pos.	Aminosäurekonzentration [pmol]																		
	I Ile	V Val	L Leu	F Phe	M Met	A Ala	G Gly	T Thr	S Ser	Y Tyr	P Pro	H His	Q Gln	N Asn	E Glu	D Asp	K Lys	R Arg	
1	143.2	102.8	148.2	111.9	22.0	83.0	160.5	23.0	28.5	52.1	17.1	6.3	14.9	10.7	36.8	39.7	22.0	11.2	
2	76.8	<u>106.1</u>	74.5	54.0	14.0	<b>143.1</b>	91.8	<u>29.2</u>	<u>33.2</u>	45.0	<b>136.7</b>	<u>9.0</u>	<b>33.0</b>	<b>26.8</b>	<u>47.2</u>	<b>57.2</b>	<b>53.6</b>	<b>25.0</b>	
3	<u>96.8</u>	70.8	<u>85.4</u>	<u>59.9</u>	<u>15.8</u>	65.1	<b>134.6</b>	22.0	31.3	43.6	75.0	<b>15.8</b>	<b>62.4</b>	<b>39.3</b>	<b>69.6</b>	<b>99.0</b>	<b>89.9</b>	<b>60.1</b>	
4	<b>148.1</b>	67.2	<b>164.0</b>	41.4	15.5	55.4	84.2	16.2	22.5	26.3	62.7	14.8	48.3	<b>47.3</b>	54.1	83.7	79.9	<b>71.4</b>	
5	123.1	<u>75.0</u>	114.2	<u>42.3</u>	14.9	<u>67.6</u>	66.6	<b>24.7</b>	22.2	23.8	41.8	12.4	<u>50.7</u>	39.1	44.0	70.0	74.1	<b>99.4</b>	
6	89.7	73.0	106.4	26.4	14.7	58.7	62.7	18.5	20.1	21.1	35.2	19.7	46.3	34.7	37.5	53.6	<b>114.0</b>	93.3	
7	75.4	52.2	<u>113.2</u>	<u>29.6</u>	<b>25.9</b>	53.0	53.5	17.7	<u>22.8</u>	<u>21.6</u>	35.7	<b>30.2</b>	44.2	27.5	36.6	43.7	87.0	93.1	
8	43.9	52.8	88.8	<u>30.4</u>	19.9	51.1	53.3	13.4	17.0	16.0	<u>43.2</u>	33.2	33.3	<u>28.9</u>	35.1	39.5	68.5	<u>114.1</u>	
9	28.4	38.8	70.1	16.8	12.5	44.8	<u>59.2</u>	<b>24.6</b>	<b>33.2</b>	12.3	34.7	24.0	28.7	<b>45.4</b>	32.4	<u>51.3</u>	44.2	92.7	
10	26.1	31.1	46.2	<u>22.5</u>	8.3	43.0	52.4	21.5	27.0	<u>17.0</u>	21.2	<b>45.0</b>	<b>48.1</b>	38.4	26.3	40.9	42.1	86.0	
11	19.2	29.1	<u>51.0</u>	16.7	<u>8.7</u>	<u>52.5</u>	44.5	19.6	19.9	16.4	<u>24.2</u>	35.6	33.7	<u>45.2</u>	24.5	32.5	<u>48.0</u>	<u>87.0</u>	
12	18.4	26.7	41.5	10.4	6.6	51.6	<u>47.8</u>	13.8	18.3	15.6	19.0	24.3	<b>74.1</b>	37.8	<u>25.4</u>	24.1	38.4	59.3	
13	14.2	24.4	25.7	<b>25.1</b>	6.4	42.8	35.7	9.9	15.6	<u>19.4</u>	20.2	16.4	54.3	29.2	22.0	20.5	32.5	40.7	
14	11.0	21.9	20.1	23.9	3.7	<u>50.3</u>	26.3	<u>12.6</u>	15.4	15.7	<u>20.3</u>	10.6	39.0	21.6	19.0	19.0	30.2	<u>44.7</u>	
15	8.7	15.5	14.4	17.4	3.5	38.6	25.0	11.0	10.8	<b>30.3</b>	16.9	7.3	25.4	16.0	14.7	16.9	22.6	37.4	
16	6.7	11.6	10.9	16.5	2.8	27.8	20.3	5.9	7.8	24.0	11.6	5.8	16.6	11.9	11.2	<u>25.1</u>	19.5	27.6	
17	4.6	8.2	10.0	10.6	2.4	18.2	<u>23.6</u>	4.2	5.2	18.1	11.1	4.4	11.9	7.5	8.8	22.6	13.1	20.0	
18	3.9	6.3	8.3	6.0	2.3	11.6	19.2	4.0	4.7	11.0	9.0	3.7	8.5	6.1	6.8	18.8	<u>16.2</u>	14.7	
19	2.8	5.2	6.4	3.6	1.7	8.1	15.5	2.5	3.8	6.3	6.7	2.8	6.8	4.5	5.5	13.8	14.0	10.6	
20	2.4	4.2	4.9	2.5	1.4	6.5	10.8	1.6	3.2	4.3	5.6	2.0	5.3	3.3	4.2	12.1	12.2	8.5	

**Tab. 3.44** Poolsequenzierung von **HLA-DRβDw10**-eluierten Peptiden. Abgebildet sind die Mengen der 18 detektierbaren PTH-Aminosäuren (Cys und Trp fehlen) [pmol], geordnet nach steigender Hydrophobie von 20 Abbauschritten. Fette Symbole kennzeichnen einen Anstieg von mehr als 50% im Vergleich zum Vorzyklus. Unterstrichene Symbole kennzeichnen einen Anstieg oder Rückgang, der kleiner als der erwartete „Tailing Effekt“ ausfällt.



Bei beiden Motiven finden sich die Ankerpositionen P6 (mit einer Vorliebe für polare Reste, vor allem Asn, Glu, Ser, Thr, sowie auch positiv geladene Aminosäuren) und P9, an welcher wiederum weder negativ geladene, noch aromatische Aminosäuren toleriert werden.

Die Poolsequenzierung zeigt eine Clusterbildung der hydrophoben Aminosäuren Leucin und Isoleucin in den Zyklen 3, 4 und 5. Besonders auffällig sind Cluster der polaren Aminosäuren His, Gln, Asn, Glu, Asp, Lys und Arg in den Zyklen 2 und 3. Weniger deutlich sind Anstiege der hydrophoben Aminosäuren Leu, Met und Phe in den Zyklen 7 bzw. 8. Hieraus ergibt sich ein einfaches DR4Dw10-Motiv, das aus einem ersten hydrophoben Anker (an der absoluten Position 5) und einen zweiten ebenfalls hydrophoben Anker (an der absoluten Position 8) besteht, der aber schwächer ausgeprägt ist.

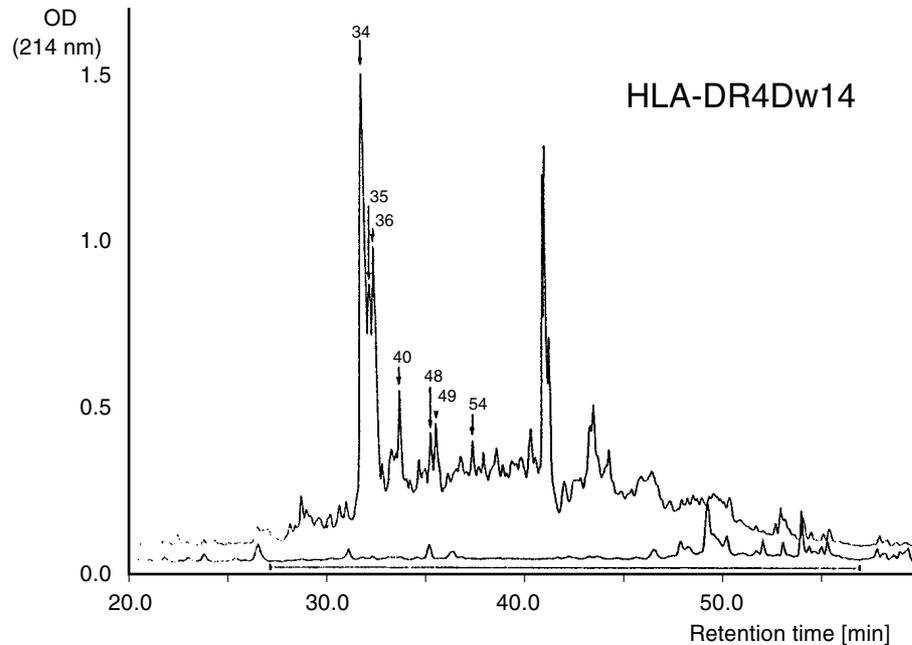
Insgesamt konnten 21 Liganden identifiziert werden (**Tab. 3.45**), die von 10 verschiedenen Proteinen stammen. Die am häufigsten gefundenen Liganden leiten sich von dem HLA-B38 Molekül ab. Bemerkenswert ist, daß nur im Falle von HLA-DR4Dw10 und nicht bei den anderen HLA-DR4 Subtypen ein Fragment der Invarianten Kette (CLIP) als Ligand gefunden wurde. Weiterhin wurden Fragmente von MHC-Klasse-II-Molekülen, einem B-Zellaktivierungsmarker (BLAST-1) und zytosolischen Proteinen gefunden.

### 3.2.2.3 Das HLA-DR4Dw14 (DRB1\*0404)-Ligandenmotiv

Der HLA-DR4Dw14- und der DR4Dw4-Rezeptor unterscheiden sich in ihrer Primärstruktur lediglich in einer Aminosäureposition. Wie im Falle des DR4Dw10-Moleküls ist das  $\beta$ Gly<sub>86</sub> aus der P1-Bindungstasche durch  $\beta$ Val<sub>86</sub> substituiert. Wie erwartet zeigt das DR4Dw14-Ligandenmotiv somit in Position 1 die gleiche Vorliebe für hydrophobe Reste mit einer Bevorzugung von aliphatischen Aminosäuren wie das DR4Dw10-Motiv.

**Tab. 3.46** zeigt das Ergebnis der Poolsequenzierung, das durch den Edman-Abbau der Fraktionen von 27.0 min bis 58.0 min erhalten wurde (**Abb. 3.6**). Der Pool weist sehr starke Signale auf, die von zwei dominanten Einzelsequenzen herrühren. Dies sind der N-Terminus von HLA-B60 (GSHSMRYF...) und die N-terminal um eine Aminosäure verkürzte Variante (SHSMRYF ...). Die so im Pool entstandenen Doppelsignale sind in **Tabelle 3.47** durch ein beta ( $\beta$ ) markiert.

Neben diesen Einzelsequenzen werden mehrere, von diesen unabhängige Cluster erkennbar. Der erste hydrophobe Anker an absoluter Position 5 wird von Val, Leu und Ile über die Zyklen 4 und 5 gebildet. Der zweite hydrophobe Anker (an relativer Position 4, bzw. an absoluter Position 8) ist von Met, Ile und Ala besetzt.



**Abb. 3.6** HPLC-Chromatogramm der HLA-DR4Dw14-eluierten Peptide. Die Pfeile geben Peaks an, die getrennt und einzeln sequenziert wurden. Der horizontale Balken zeigt die Fraktionen an, die vereint und als Gemisch sequenziert wurden (Fraktionen zwischen 27 und 58.0 min). Die untere Kurve zeigt die Extinktion der Glycin-Kontrolle bei 214 nm.

#### 3.2.2.4 Das HLA-DR4Dw15 (DRB1\*0405)-Ligandenmotiv

Die erhaltenen Fraktionen wurden im Retentionsbereich von 31.0 min bis 57.0 min zusammengeführt (**Abb. 3.7**) und als Pool sequenziert (**Tab. 3.46**). Abermals ist in Zyklus 2 ein singuläres Prolinsignal zu erkennen. Der erste Anker in den Positionen 3-5 (relative Position 1) wird von Tyr/Phe dominiert, aber auch andere hydrophobe

Pos.	Aminosäurekonz. [pmol]																	
	I Ile	V Val	L Leu	F Phe	M Met	A Ala	G Gly	T Thr	S Ser	Y Tyr	P Pro	H His	Q Gln	N Asn	E Glu	D Asp	K Lys	R Arg
1	673.2	487.2	644.3	238.4	127.6	401.4	626.4 <sup>ß</sup>	77.2	91.8 <sup>ß</sup>	216.5	37.8	14.0	41.1	42.0	123.4	87.8	92.2	25.4
2	350.9	413.8	319.4	77.6	73.5	485.6	323.2	61.7	104.9 <sup>ß</sup>	125.7	457.0	26.1 <sup>ß</sup>	111.7	71.5	182.7	184.3	193.7	40.7
3	442.8	371.0	297.8	85.7	48.8	290.5	412.7	42.5	75.7 <sup>ß</sup>	88.5	203.2	48.3 <sup>ß</sup>	111.5	120.9	144.1	184.9	185.5	45.7
4	780.6	344.1	395.4	73.2	102.9 <sup>ß</sup>	258.9	251.2	27.2	75.6 <sup>ß</sup>	73.0	129.8	0.7	180.8	80.6	151.7	143.3	122.4	27.1
5	858.8	500.8	637.6	93.1	242.4 <sup>ß</sup>	245.5	162.2	30.5	39.1	69.8	101.5	0.8	109.8	84.2	103.8	125.6	145.0	62.7 <sup>ß</sup>
6	650.2	368.5	415.6	168.3	117.8	330.1	184.4	41.5	46.4	118.5 <sup>ß</sup>	76.8	-	90.4	98.6	83.6	109.1	241.5	80.9 <sup>ß</sup>
7	676.7	288.2	354.3	186.9 <sup>ß</sup>	138.5	331.9	128.8	26.3	42.5	157.5 <sup>ß</sup>	134.0	-	81.7	198.5	77.6	94.5	98.7	58.7
8	563.9	244.5	334.2	332.6 <sup>ß</sup>	143.3	268.2	135.3	39.3	43.3	67.7	113.9	1.2	61.1	98.0	68.2	101.6	54.6	52.1
9	253.7	241.2	231.0	147.4	105.5	254.6	142.2	84.4 <sup>ß</sup>	64.8	43.4	95.6	-	73.2	157.4	94.3	130.9	49.3	42.9
10	225.1	188.4	178.0	63.3	63.3	295.8 <sup>ß</sup>	117.6	101.6 <sup>ß</sup>	46.9	58.5	65.4	-	67.5	206.0	65.1	127.6	35.8	16.2
11	183.6	178.8	306.9	61.9	103.1 <sup>ß</sup>	435.8 <sup>ß</sup>	144.5	43.6	39.9	37.4	65.9	0.2	68.8	128.4	72.4	108.5	42.1	34.9
12	155.8	167.5	285.8	49.5	108.4 <sup>ß</sup>	343.0	171.6	23.6	49.8 <sup>ß</sup>	51.7	51.3	1.2	80.4	80.2	62.9	84.7	39.7	39.8
13	122.1	160.6	150.2	50.1	44.8	273.3	147.9	24.3	55.5 <sup>ß</sup>	42.8	36.9	0.8	75.7	49.5	51.7	75.6	44.4	43.1 <sup>ß</sup>
14	106.5	146.9	108.4	52.3	32.6	225.8	169.7	29.7	34.8	39.4	41.6 <sup>ß</sup>	-	91.5	47.8	51.9	73.7	51.8	67.4 <sup>ß</sup>
15	75.0	117.9	65.3	33.5	20.1	140.7	111.8	30.7	23.0	31.8	41.4 <sup>ß</sup>	-	40.9	49.9	26.6	57.1	32.1	33.9
16	59.1	91.4	52.0	27.9	14.6	93.8	130.5 <sup>ß</sup>	26.0	17.9	24.4	25.7	0.9	38.7	36.8	32.2	46.2	20.9	18.5
17	40.9	60.0	44.1	21.1	10.3	65.1	103.7	20.3	13.3	16.8	17.3	-	24.9	20.4	20.0	34.3	14.4	23.1 <sup>ß</sup>
18	31.1	42.6	33.7	15.4	8.0	50.2	97.0	15.8	11.0	10.8	12.0	0.5	11.4	10.0	16.4	21.9	10.2	13.4
19	27.1	35.8	26.7	12.5	7.0	41.1	69.4	15.4	10.0	8.3	10.9	-	8.1	8.1	18.6 <sup>ß</sup>	20.3	9.5	11.1
20	22.7	31.3	20.9	10.1	5.3	30.1	48.9	11.8	7.2	7.2	9.7	-	6.4	5.7	13.2	15.6	7.6	10.8
21	4.1	3.0	2.3	1.0	0.5	2.8	6.0	1.3	0.7	0.5	0.9	0.5	0.1	0.5	14.3	1.5	1.2	3.2

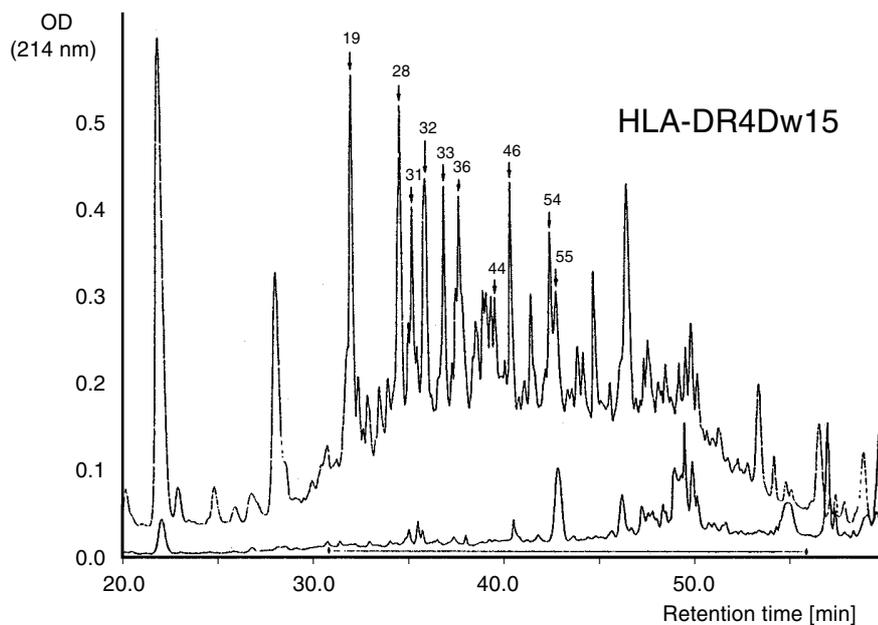
**Tub. 3.46** Poolsequenzierung von **HLA-DRDw14**-eluierten Peptiden. Abgebildet sind die Mengen der 18 detektierbaren PTH-Aminosäuren (Cys und Trp fehlen) [pmol], geordnet nach steigender Hydrophobie von 21 Abbauschritten. Fette Symbole kennzeichnen einen Anstieg von mehr als 50% im Vergleich zum Vorzyklus. Unterstrichene Symbole kennzeichnen einen Anstieg oder Rückgang, der kleiner als der erwartete „Tailing Effekt“ ausfällt. Signale können von den dominanten Peptiden GSHSMRYF... oder SHSMRYF... abgeleitet werden.

HLA-DR4Dw14	Relative Position									Herkunft, [Literatur]	Fraktion		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9				
<b>Anker oder</b>	<b>V, I</b>			<b>Y, F, W</b>	<b>N, T</b>		<b>polar</b>		<b>polar</b>		[Friede et al. 1996]		
<b>andere bevorzugte</b>	<b>L, M</b>			<b>I, L</b>	<b>S, Q</b>		<b>charged</b>		<b>aliphatic</b>		[Hammer et al. 1995]		
<b>Aminosäuren</b>				<b>V, M, A</b>	<b>R</b>		<b>aliphatic</b>		<b>K</b>				
				<b>D, E</b>									
				<b>no R, K</b>									
<b>Beispiele</b>	<b>GSHS</b>	<b>M</b>	<b>R</b>	<b>Y</b>	<b>F</b>	<b>H</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>M</b>	<b>S</b>	<b>RPGRGE</b>	<b>HLA-B*4010 1-19</b>	<b>34, 35, 36, 48</b>
<b>für Liganden</b>	<b>SHS</b>	<b>M</b>	<b>R</b>	<b>Y</b>	<b>F</b>	<b>H</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>M</b>	<b>S</b>	<b>RPGRGE</b>	<b>HLA-B*4010 2-19</b>	<b>34, 35, 36, 48</b>
	<b>YDNS</b>	<b>L</b>	<b>K</b>	<b>I</b>	<b>I</b>	<b>S</b>	<b>N</b>	<b>A</b>	<b>S</b>	<b>C</b>	<b>TTN</b>	<b>GAPDH 139-154</b>	

**Tab. 3.47** Das **HLA-DR4Dw14** Ligandenmotiv. Abgeleitet von Poolsequenzierungsergebnissen, natürlichen Liganden, und Röntgenstruktur-Daten. GAPDH, Glycerin Aldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase.

Aminosäuren zeigen deutliche Signale. Der zweite Signalcluster tritt in den Zyklen 7/8 auf und wird überwiegend von den aliphatischen Resten Val, Ile, Leu, Met und Ala besetzt, während allerdings Tyr und Phe fehlen. In den Zyklen 9/10 bzw. 12/13 lassen sich weitere von hydrophilen Aminosäuren gebildete Cluster erkennen, wobei letzteres von Asp/Glu dominiert wird.

Das DR4Dw15-Molekül besitzt im Gegensatz zu den anderen untersuchten DR4-Molekülen an DR<sub>57</sub> keine Asparaginsäure, sondern ein Serin, und stellt somit für DR-Moleküle eine Ausnahme dar. Die P9-Bindungstasche von DR4Dw15 besitzt somit eine negative Ladung weniger als die entsprechende Tasche der anderen DR4-Moleküle. Die gefundenen Aminosäurecluster der negativ geladenen Reste von Asp und Glu in den Zyklen 12 und 13 zeigen diesen Unterschied sehr klar.



**Abb. 3.7** HPLC-Chromatogramm der HLA-DR4Dw15-eluierten Peptide. Die Pfeile geben Peaks an, die getrennt und einzeln sequenziert wurden. Der horizontale Balken zeigt die Fraktionen an, die vereinigt und als Gemisch sequenziert wurden (Fraktionen zwischen 31,0 und 57,0 min). Die untere Kurve zeigt die Extinktion der Glycin-Kontrolle bei 214 nm.

Pos.	Aminosäurekonzentration. [pmol]																			
	I Ile	V Val	L Leu	F Phe	W Trp	M Met	A Ala	G Gly	T Thr	S Ser	Y Tyr	P Pro	H His	Q Gln	N Asn	E Glu	D Asp	K Lys	R Arg	
<b>1</b>	85.5	106.1	106.5	66.1	4.3	13.4	110.6	91.0	35.0	34.0	104.5	13.1	1.9	12.4	12.5	55.8	46.0	40.1	12.1	
<b>2</b>	41.2	85.3	<u>114.7</u>	35.4	<u>5.1</u>	11.6	<u>141.9</u>	73.0	29.4	<u>36.9</u>	57.3	<b>275.4</b>	<b>14.4</b>	<b>33.8</b>	<b>31.5</b>	<b>97.5</b>	<b>81.3</b>	<b>48.8</b>	<b>30.8</b>	
<b>3</b>	<u>46.4</u>	73.2	109.7	<b>66.8</b>	4.5	<b>30.6</b>	104.1	72.8	<u>31.7</u>	29.3	<b>103.5</b>	184.7	<b>17.8</b>	<b>47.5</b>	<b>38.3</b>	<b>96.6</b>	<b>100.4</b>	<u>52.5</u>	<u>39.5</u>	
<b>4</b>	<u>54.8</u>	71.5	98.9	<b>105.7</b>	<u>6.2</u>	23.8	63.6	62.9	<u>39.2</u>	28.2	<b>173.0</b>	99.2	<b>18.6</b>	<b>68.0</b>	28.6	85.4	79.8	50.8	<u>42.7</u>	
<b>5</b>	90.1	<u>83.0</u>	<u>106.3</u>	<b>106.1</b>	5.1	21.5	61.5	43.1	<u>43.0</u>	19.0	<b>187.5</b>	70.1	<b>20.0</b>	<b>78.3</b>	29.6	66.3	68.9	<u>58.0</u>	<u>45.6</u>	
<b>6</b>	<b>97.4</b>	<u>117.4</u>	<u>106.8</u>	93.8	<u>5.8</u>	<b>38.5</b>	<u>86.2</u>	32.0	36.0	<u>27.7</u>	120.0	56.7	18.4	69.3	29.9	<u>71.3</u>	59.7	55.2	<u>53.6</u>	
<b>7</b>	<b>95.0</b>	<u>159.7</u>	<u>114.5</u>	89.5	5.0	<b>40.8</b>	<b>119.2</b>	29.0	30.2	23.8	88.7	53.5	15.5	44.4	33.8	46.3	50.8	42.0	<u>57.4</u>	
<b>8</b>	77.4	<b>199.0</b>	84.4	61.8	2.5	26.9	81.7	<u>30.2</u>	29.0	23.5	77.1	<u>61.7</u>	10.3	30.2	32.6	28.0	49.6	36.7	<u>58.8</u>	
<b>9</b>	57.2	164.6	64.9	43.8	4.5	29.3	71.0	<u>35.6</u>	<u>37.7</u>	28.1	53.9	<u>64.8</u>	<b>19.4</b>	<u>39.9</u>	<b>57.3</b>	28.6	<u>83.9</u>	28.3	<u>63.4</u>	
<b>10</b>	38.5	133.6	60.0	33.4	4.2	17.3	76.4	<u>39.7</u>	35.4	29.5	35.8	<u>62.6</u>	12.2	32.8	<b>72.5</b>	22.5	67.3	26.0	49.3	
<b>11</b>	32.7	133.9	51.9	21.6	3.8	<u>22.0</u>	<u>86.5</u>	37.5	29.5	22.5	27.2	<u>64.4</u>	9.5	<u>40.0</u>	51.4	<b>32.9</b>	<u>73.3</u>	<u>27.9</u>	48.3	
<b>12</b>	28.0	91.0	41.1	14.7	2.4	13.6	58.3	27.8	19.8	16.8	18.7	59.9	8.3	<u>39.8</u>	36.9	<b>48.6</b>	<b>95.3</b>	25.1	<u>49.2</u>	
<b>13</b>	23.0	64.9	30.6	12.5	2.7	10.5	42.5	<u>29.4</u>	17.7	<u>17.7</u>	18.8	49.8	9.1	36.8	24.5	45.8	<b>120.5</b>	<u>26.7</u>	<u>56.3</u>	
<b>14</b>	16.8	40.7	20.7	8.6	1.0	6.3	34.9	23.1	14.8	15.9	16.9	33.2	7.2	34.1	<u>28.6</u>	34.3	92.7	24.3	38.6	
<b>15</b>	14.5	30.2	16.9	<b>13.6</b>	<b>3.5</b>	4.7	23.4	-	-	3.6	13.2	23.5	3.2	13.0	12.8	16.9	40.9	17.9	-	
<b>16</b>	9.1	20.3	10.2	6.9	1.8	3.4	20.9	21.6	11.1	<b>10.1</b>	13.1	16.9	3.4	<u>14.2</u>	<u>23.1</u>	<u>19.8</u>	<u>50.7</u>	<u>18.2</u>	18.7	
<b>17</b>	7.3	14.4	7.8	5.2	0.7	2.7	14.8	19.5	-	9.7	9.5	13.2	1.8	9.7	16.4	13.7	40.9	13.2	16.1	
<b>18</b>	6.2	11.2	5.8	5.2	1.5	2.3	10.0	16.0	7.3	8.1	6.9	9.7	1.3	6.4	13.7	8.3	29.2	9.6	12.0	
<b>19</b>	4.2	8.9	4.4	3.9	0.7	1.3	7.3	13.5	4.9	6.4	4.7	6.7	0.9	4.5	10.6	5.9	21.2	6.6	7.5	
<b>20</b>	2.9	7.0	3.3	2.8	0.6	1.0	6.9	9.9	3.7	5.5	3.4	5.1	0.8	3.8	8.5	4.4	15.1	5.0	7.0	

**Tab. 3.48** Poolsequenzierung von **HLA-DR4Dw15**-eluierten Peptiden. Abgebildet sind die Mengen der 18 detektierten PTH-Aminosäuren (Cys und Trp fehlen) [pmol], geordnet nach steigender Hydrophatie von 20 Abbauschritten. Fette Symbole kennzeichnen einen Anstieg von mehr als 50% im Vergleich zum Vorzyklus. Unterstrichene Symbole kennzeichnen einen Anstieg oder Rückgang, der kleiner als der erwartete „Tailing Effekt“ ausfällt.

HLA-DR4Dw15	Relative Position									Herkunft, [Literatur]	Fraktion		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9				
<b>Anker oder andere bevorzugte Aminosäuren</b>	<b>F, Y, W</b> <b>V, I</b> <b>L, M</b>			<b>V, I, L</b> <b>M, D, E</b>		<b>N, S</b> <b>T, Q</b> <b>K, D</b>	<b>polar</b> <b>charged</b> <b>aliphatic</b>		<b>D, E, Q</b>		[Friede et al. 1996]		
<b>Beispiele für Liganden</b>	YPTORAR	Y	Q	W	V	R	C	N	P	D	SNS	PGSG 1-19	19
	QRAR	Y	Q	W	V	R	C	N	P	D	SNS	PGSG 4-19	19
	RAR	Y	Q	W	V	R	C	N	P	D	SNS	PGSG 5-19	19
	KPPQ	Y	I	A	V	H	V	V	P	D	Q	MIF 32-45	28, 44
	FRE	F	K	L	S	K	V	W	R	D	QH	Transferrin receptor 173-186	
	FRE	F	K	L	S	K	V	W	R	D	Q	Transferrin receptor 173-185	
	FRE	F	K	L	S	K	V	W	R	D	QH	Transferrin receptor 174-186	28
	RE	F	K	L	S	K	V	W	R	D	Q	Transferrin receptor 174-185	31
	RE	F	K	L	S	K	V	W	R	D	Q	Transferrin receptor 397-411	33
	VEPDH	Y	V	V	V	G	A	O	R	D	A	Transferrin receptor 398-411	32
	EPDH	Y	V	V	V	G	A	Q	R	D	A	Transferrin 92-107	
	THY	Y	A	V	A	V	V	K	K	D	TDFK	HSP90-beta 68-81	33
	KELK	I	D	I	I	P	N	P	Q	E	R	beta-2 microglobulin 83-96	54
	YLL	Y	Y	T	E	F	T	P	T	E	KDEY	beta-2 microglobulin 83-98	
	LL	Y	Y	T	E	F	T	P	T	E	KDEY	beta-2 microglobulin 83-98	
	CAIHAKR	V	T	I	M	P	K	D	I	Q	LA...	Histone H3 110-?	36
	APNT	F	K	T	L	D	S	W	R	D		ras-related protein RAB-7 (rat)	36
	VADK	I	Q	L	I	N	N	M	L	D		Phosphoglycerate kinase 216-228	

**Tab. 3.49**

Das **HLA-DR4Dw15** Ligandemotiv. Abgeleitet von Poolsequenzierungsergebnissen, natürlichen Liganden, und Röntgenstruktur-Daten. Drei Peptidsequenzen, (KVHGS<sup>L</sup>ARAGK<sup>V</sup>RGQ<sup>T</sup>PK<sup>V</sup>A..., SSHK<sup>T</sup>FR<sup>K</sup>RFLAK<sup>K</sup>Q<sup>K</sup>Q<sup>N</sup>R..., GK<sup>F</sup>MK<sup>P</sup>GK<sup>V</sup>VL<sup>L</sup>AG<sup>R</sup>YS...) aus ribosomalen Proteinen sind nicht gruppiert, da ihre Herkunft aus verschiedenen Gründen fraglich zu sein scheint: i) sie repräsentieren den N-terminalen Teil des jeweiligen Proteins, ii) die C-terminalen Reste konnten auf Grund der ungewöhnlichen Länge von mehr als 20 Aminosäuren nicht charakterisiert werden, iii) sie wurden auch häufig bei der Extraktion von verschiedenen anderen Klasse II Proteinen gefunden.

Tatsächlich trägt auch beinahe jeder der natürlichen Liganden, die in **Tabelle 3.49** gruppiert sind Asp oder Glu an Position 9. Somit ist P9 ein Anker für negativ geladene, oder im geringeren Umfang für polare Reste.

Die Sequenzanalyse einzelner Fraktionen erwies sich als sehr ergiebig (**Tab. 3.49**), da jede der sequenzierten Fraktionen im Durchschnitt zwei klar voneinander abzugrenzende Einzelsequenzen ergab. Es wurden außerdem Fragmente eines Proteoglykankern-Proteins (PGSG), eines Hemmfaktors der Makrophagenwanderung (MIF) und des Transferrinrezeptors gefunden.

### **3.3 Interaktion natürlicher Liganden mit DR17-Molekülen: Das HLA-DR17-Ligandenmotiv**

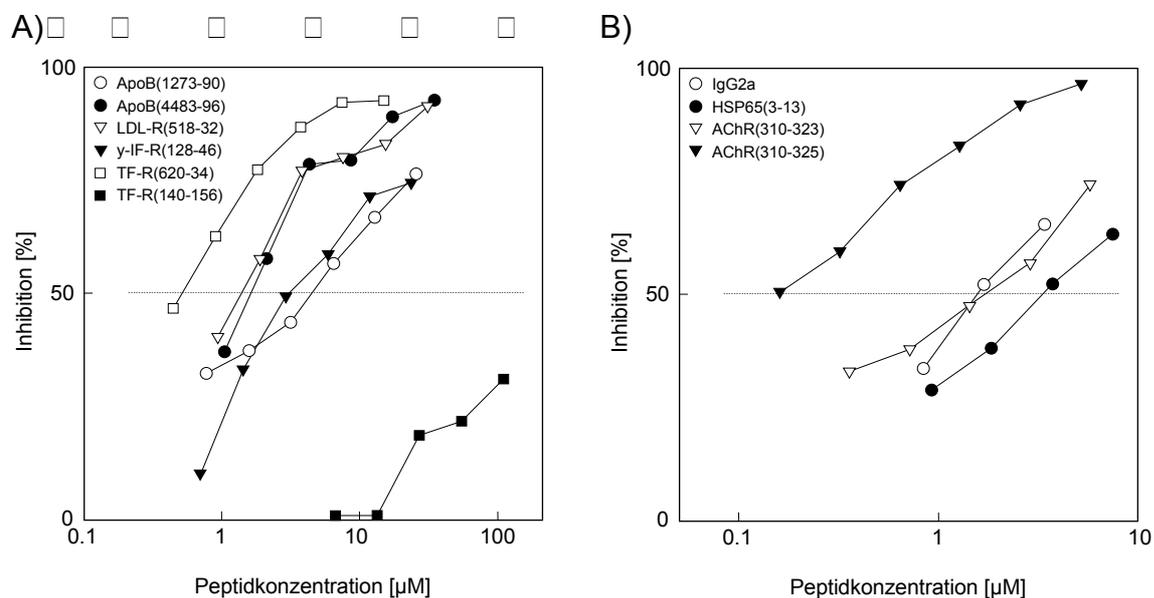
Die Sequenzanalyse natürlich prozessierter HLA-DR17-Liganden ergab ein exakt vorgegebenes Arrangement von Positionen mit konservierter Aminosäurenbesetzung. Um die strukturellen Interaktionen zwischen Rezeptor und Ligand genauer zu untersuchen, wurden die Beiträge der konservierten Aminosäuren für das Bindungsmotiv der DR17-Liganden in einem nicht-radioaktiven Bindungsassay bestimmt. Dieser beruhte auf der Bindung von Peptiden an isolierte MHC-Moleküle, wodurch die Bindungskapazitäten von DR17-Liganden oder deren Varianten an native DR17-Moleküle direkt miteinander vergleichbar wurden. Als biotinylierter Agonist wurde der natürliche Ligand ApoB(2877-2894) in einer Konzentration von 2µM mit steigenden Konzentrationen zu dem Kompetitorpeptid inkubiert und dessen inhibitorisches Potential in einer Titrationskurve bestimmt.

#### **3.3.1 Affinität natürlicher Peptide zu HLA-DR17**

In einem Peptidbindungsassay wurde die Bindungskapazität von acht natürlich prozessierten Peptiden bestimmt, deren Länge von zwölf bis neunzehn Aminosäuren variierte (**Tab. 3.41**). Sämtliche Bindungsansätze wurden bei pH 5 durchgeführt, da die Peptidbindung in saurem Milieu verstärkt wird [Jensen, 1991; Sidney et al., 1992]. Die Inhibi-

tionskurven in **Abb. 3.8A** machen deutlich, daß sich – im Unterschied zu dem natürlichen DR12-Ligand TF-R(140-156) – sieben der acht DR17-Liganden durch exzellente Bindungseigenschaften auszeichnen. Ferner sind die Bindungsexperimente mit solchen Peptiden durchgeführt worden, die in der Literatur bereits als DR17-restringierte T-Zell-Epitope beschrieben sind. Eines der ausgewählten Peptide war das als hochaffin und sehr spezifisch beschriebene Peptid HSP(3-13) [Galuk et al., 1992; Sidney et al., 1992], ein Fragment aus dem mykobakteriellen „Heat-Shock-Protein“ HSP65. Es zeigte eine gute, jedoch eindeutig geringere Bindungskapazität als die Majorität der natürlichen DR17-Liganden. Das aus dem humanen Acetylcholin-Rezeptor abgeleitete Peptid H $\alpha$ AChR(310-325), ein bekanntes Autoantigen der Myasthenia gravis, zeigte hervorragende Bindungseigenschaften. Wurde dieses Peptid im Versuch am C-Terminus um zwei Aminosäuren verkürzt, reduzierte sich die Bindungskapazität auf circa ein Zehntel (**Abb. 3.8B**).

Beim Vergleich dieser Sequenzen mit dem DR17-Ligandenmotiv wird offenbar, daß die suboptimal bindenden Peptide direkt hinter dem C-terminalen Anker in Position 9 abgeschnitten sind (**Tab. 3.41 und Tab. 3.50**).

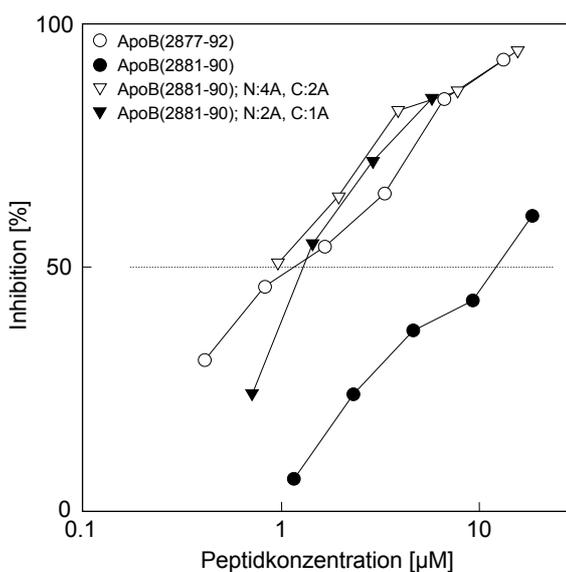


**Abb. 3.8** **A)** Bindung verschiedener natürlicher DR17-Liganden und eines natürlichen DR12-Liganden TF-R(140-156) als Negativ-Kontrolle an aufgereinigte HLA-DR17-Moleküle.

**B)** Bindung von DR17-restringierten T-Zell-Epitopen verglichen mit einem natürlichen DR17-Liganden. Die sequenzabhängigen und sequenzunabhängigen Effekte sind in **Tab. 3.50** genauer illustriert.

### 3.3.2 Sequenzabhängige, spezifische und sequenzunabhängige, unspezifische Kontaktstellen

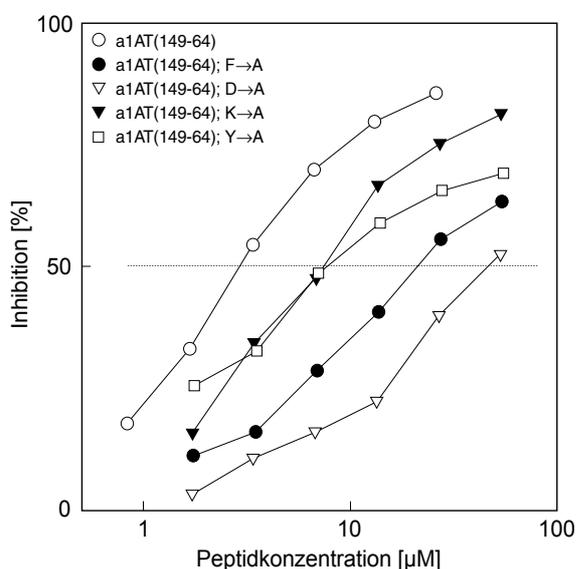
Das Resultat aus *Absatz 3.3.1* erlaubt bereits die Annahme, daß Aminosäuren an nicht-konservierten Positionen die Bindung durchaus beeinflussen können. Um dieses Ergebnis zu präzisieren, wurden Verkürzungs- und Substitutionsvarianten des Peptids ApoB(2877-2892) mit gleicher Kernsequenz (ApoB(2881-2890)) synthetisiert. Dabei zeigte sich, dass allein diese Kernsequenz zwar für die Bindung an DR17 hinreichend ist, jedoch mit einer ca. 10fach verringerten Bindungskapazität (*Abb. 3.9*). Durch Hinzufügen von Alanin an beide Peptidenden konnte die originale Bindungskapazität indessen wieder hergestellt werden. Dieser Effekt konnte bereits schon mit dem Ala-substituierten 13-mer (AALTLDSNIKYFA) erzielt werden (*Abb. 3.9*). Offensichtlich tragen also auch jene Aminosäuren zur Bindung bei, die direkt bei, aber außerhalb der Kernsequenz liegen, unabhängig von ihrer jeweiligen Struktur. Diese und analoge Einkürzungsstudien am DR1- Epitop HA(307-319) konnten manifestieren (Daten nicht gezeigt), dass das Peptidbindungsepitop für die Interaktion mit der MHC-II-Bindungsgrube generell auf die Länge von 13 Aminosäuren festgeschrieben ist. Diese Erkenntnis erklärt somit plausibel, warum die Länge natürlicher Liganden in der Regel zwölf Aminosäuren nicht unterschreitet (*Tab. 3.41*) [Chicz et al., 1993; Rudensky et al., 1992; Hunt et al., 1992].



**Abb. 3.9** Bindung eingekürzter Alanin-Derivate des Selbstpeptids Apo-B(2877-92) an HLA-DR17-Moleküle. Der Einfluß der flankierenden Reste wird durch die Kernsequenz des Selbstpeptids und seine mit Ala verlängerten Varianten gezeigt.

### 3.3.3 Spezifische Interaktion der Peptidseitenketten

Die vorliegenden Analysen sollten die Bindungseigenschaften der konservierten Aminosäuren natürlicher DR17-Liganden in den relativen Positionen 1, 4, 6, und 9 näher bestimmen. Stellvertretend für die natürlichen DR17-Liganden wurde  $\alpha$ 1AT(149-164) ausgewählt. Die vier konservierten Positionen dieses Modell-Liganden wurden sukzessiv gegen Alanin substituiert (**Tab. 3.50**). Die Bindungskapazität der vier Substitutions-Varianten verringerte sich dabei signifikant, wenngleich in abweichendem Ausmaß. Die Substitution von K157 und Y160 resultierte in einer schwach bis geringen, der Austausch von F152 und besonders jener von D155 führte aber zu einer stärker ausgeprägten Reduktion des Bindungsvermögens (**Abb. 3.10**). Anhand dieser Daten zeigten sich erste Hinweise darauf, daß die vier konservierten Positionen natürlicher DR17-Liganden als Anker für die Interaktion in der Peptidbindungsgrube fungieren. Der bei einer Monosubstitution gemessene Effekt war jedoch relativ gering. Folglich wurde die Versuchsstrategie auf Mehrfachsubstitutionen ausgedehnt, um die Funktion und den Beitrag des Ankerkollektivs im Detail beleuchten zu können.



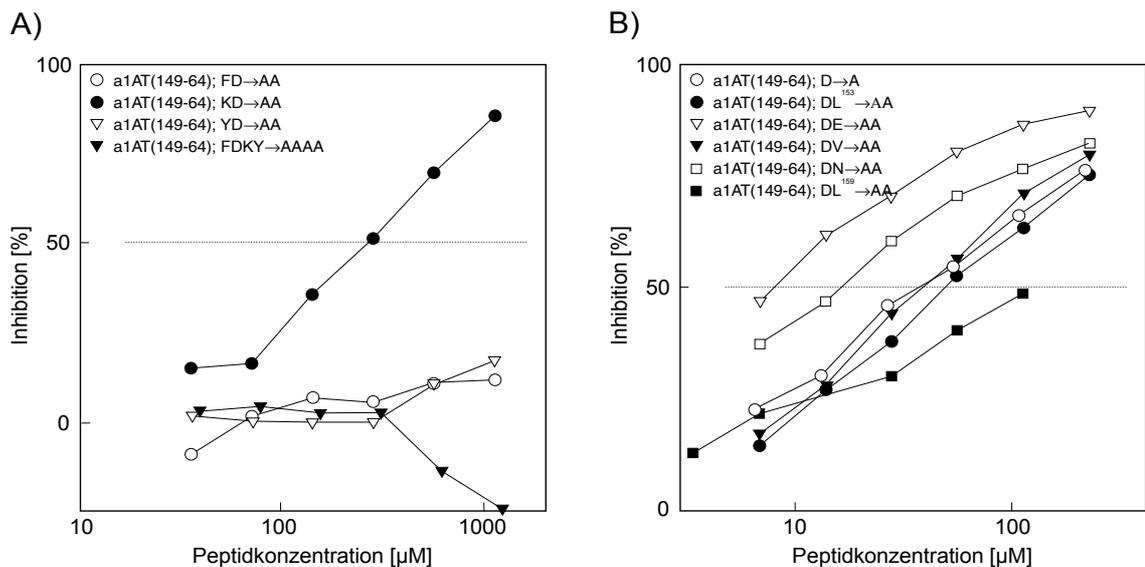
**Abb. 3.10** Die Bindungskapazität des natürlichen DR17-Liganden  $\alpha$ 1AT (149-64) verglichen mit Varianten, deren konservierten Positionen einzeln gegen Alanin substituiert wurden.

### 3.3.4 Doppelsubstitutionen und negative Effekte

Zur Durchführung der Doppelsubstitutionen wurde neben dem Hauptanker Asp155 zusätzlich die gesamte Peptidkernsequenz  $\alpha$ 1AT(152-160) in Folge gegen Alanine sub-

stituiert. Die Ergebnisse (**Abb. 3.11A und Abb. 3.11B**) belegen die enormen Effekte einer Doppelsubstitution konservierter Positionen. Selbst bei hochmolarem Überschuß konnte keine Inhibition nachgewiesen werden.

In den darauffolgenden Kontrollexperimenten wurden sukzessive nicht-konservierte Positionen mit Asp155 substituiert. **Abb. 3.11A** zeigt, wie sich diese Substitutionen nicht oder nur marginal auswirkten und im Gegenteil sogar zu einer Steigerung der Bindungskapazität führten. Als Ergebnis dieser Reihen von Doppelsubstitutionen können die vier postulierten Kontaktstellen eindeutig als Anker identifiziert werden. Auffallend bei der Versuchsreihe ist weiter der negative Einfluß nicht-konservierter, geladener Aminosäuren auf das Bindungsvermögen (**Abb. 3.11B**). All diese Resultate stärken die Annahme, daß die Bindungsaffinität eines Liganden durch die Summe der Einzelbeiträge von positiv und negativ geladenen Aminosäureseitenketten bestimmt wird.



**Abb. 3.11** **A)** Die Bindungskapazität des natürlichen DR17-Liganden  $\alpha\text{1AT}(149-64)$  verglichen mit Analoga, welche an zwei der vier konservierten Positionen verändert wurden. **B)** Die Bindungskapazität der monosubstituierten Variante  $\alpha\text{1AT}[D155\rightarrow A]$  im Vergleich zu Analoga, die durch Doppelsubstitution einer konservierten (D155) und einer nicht-konservierten Position erhalten wurden.

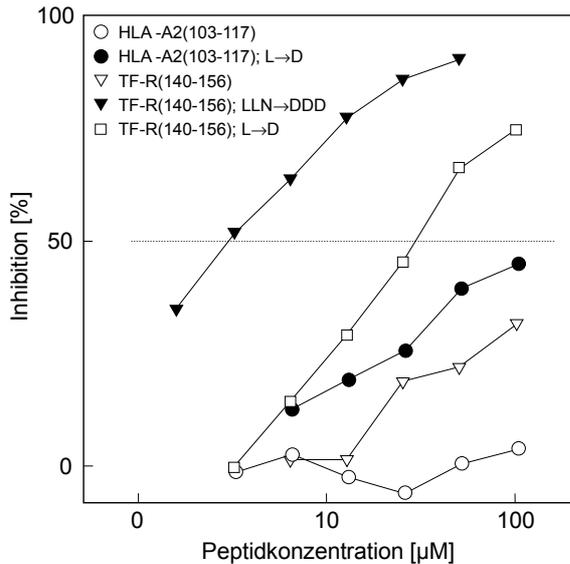
**Tab. 3.50** Inhibition der Bindung von ApoB(2877-2894) an HLA-DR17 durch Peptidliganden. Die Peptide sind entsprechend dem DR17-Ligandenmotiv ausgerichtet. Fette, grau unterlegte Symbole kennzeichnen konservierte oder veränderte Positionen. Informationen über DR17-Liganden [Malcherek et al., 1993] und Informationen über DR1 und DR12-Liganden [Chicz et al., 1993 & Falk et al., 1994] liegen bereits vor.

	Relative Position														Inhibit. [µM]					
	1	*	*	4	*	6	*	*	9											
<b>Natürliche DR17-Liganden</b>																				
ApoB(2877-92)	I	S	N	Q	L	T	L	D	S	N	I	K	Y	F	K	K	1.2			
LDL-R(518-32)		K	P	R	A	I	V	V	D	P	V	H	G	F	M	Y	1.2			
ApoB(4423-96)		A	V	N	E	I	I	S	D	Y	H	Q	Q	F	T		2.5			
ApoB(1273-90)	I	P	D	N	L	F	L	K	S	D	G	R	V	K	Y	T	L	N	3.8	
TF-R(620-34)				L	L	S	F	V	R	D	L	N	Q	Y	R	A	D	I	0.7	
γ-IF-R(128-46)	G	P	P	K	L	Q	I	R	K	E	E	K	Q	I	M	I	D	I	F	3.0
IgG2a				K	D	T	I	S	P	D	Y	R	N	M	I					17
α1AT(149-164)				V	Q	T	F	L	E	Q	V	K	M	L	Y	H	S	E	A	3.4
<b>Varianten von DR17-Liganden</b>																				
ApoB(2881-90)					L	T	L	D	S	N	I	K	Y	F						12.8
α1AT(149-164); F→A		V	D	T	A	L	E	D	V	K	N	L	Y	H	S	E	A			18.7
α1AT(149-164); D→A		V	D	T	F	L	E	A	V	K	N	L	Y	H	S	E	A			41.6
α1AT(149-164); K→A		V	D	T	F	L	E	D	V	A	N	L	Y	H	S	E	A			6.7
α1AT(149-164); Y→A		V	D	T	F	L	E	D	V	K	N	L	A	H	S	E	A			7.1
α1AT(149-164); FD→AA		V	D	T	A	L	E	A	V	K	N	L	Y	H	S	E	A			>>2000
α1AT(149-164); KD→AA		V	D	T	F	L	E	A	V	A	N	L	Y	H	S	E	A			270
α1AT(149-164); YD→AA		V	D	T	F	L	E	A	V	K	N	L	A	H	S	E	A			>>2000
α1AT (149-164); FDKY→AAAA		V	D	T	A	L	E	A	V	A	N	L	A	H	S	E	A			>>2000
<b>DR12-Liganden und Varianten</b>																				
TF-R140-55	D	F	T	G	T	I	K	L	L	N	E	N	S	Y	V	P	R			>>200
TF-R140-55; L→D	D	F	T	G	T	I	K	L	D	N	E	N	S	Y	V	P	R			2.8
TF-R140-55; LLN→DDD	D	F	T	G	T	I	K	D	D	D	E	N	S	Y	V	P	R			19.8
<b>DR17-Motiv Peptide</b>																				
HSP65(3-13)				K	T	I	A	Y	D	E	E	A	R	R						23.8
HACHR(310-323)	N	W	V	R	K	V	F	I	D	T	I	P	N	I						12.9
HACHR(310-325)	N	W	V	R	K	V	F	I	D	T	I	P	N	I	M	F				1.2
TT(1272-84)			N	G	Q	I	G	N	D	P	N	R	D	I	L					190
TT(1272-84); I→A			N	G	Q	A	G	N	D	P	N	R	D	I	L					>800
TT(1272-84); D→A			N	G	Q	I	G	N	A	P	N	R	D	I	L					>800
TT(1272-84); I→D			N	G	Q	D	G	N	D	P	N	R	D	I	L					>>800

Zudem geben diese Substitutionsversuche qualitative Hinweise auf die Hierarchie der Anker in einem definierten Peptid. Verwendet man die Alaninsubstitution als internen Maßstab, so haben die Aminosäuren Phenylalanin und Asparaginsäure in den relativen Positionen 1 und 4 die höchste Priorität für die Bindung von  $\alpha$ 1AT(149-164). Die Einzelsequenzen natürlicher DR17-Liganden bestätigen dies: Die Ankerpositionen 1 und 4 werden absolut konserviert, während die Positionen 6 und 9 eine gewisse Variabilität (*Tab. 3.41*) erlauben.

### 3.3.5 Modulation allelspezifischer Bindungseigenschaften

Der natürliche DR12-Ligand TF-R(140-156) (Falk et al., 1994) wurde in Bindungsstudien zur negativen Kontrolle der Bindung an DR17 eingesetzt (*Abb. 3.8*). Dieses Peptid hat wie alle DR17-Liganden Leucin und Tyrosin in den relativen Positionen 1 und 9, sowie ein weiteres Leucin in Position 4, das allerdings nicht mit dem von den DR17-Liganden erstellten Motiv (*Tab. 3.41*) kompatibel ist. Im Anschluß folgte der inverse Versuch: Statt wie bisher die Anker durch Alanin zu substituieren, wurde nun Asparaginsäure als allelspezifischer Anker an der Position 4 in das TF-R (140-156) eingeführt. Der Austausch dieser einzelnen Aminosäure machte aus dem natürlichen DR12 einen exzellenten DR17-Liganden. Diese allelspezifische Modulation, die ebenfalls mit einem natürlichen DR1-Liganden (HLA-A2(103-117)) reproduziert wurde (*Abb. 3.12*), unterstreicht die bereits aus der Sequenzierung von Selbstpeptiden abgeleitete Hypothese von der entscheidenden Rolle der Asparaginsäure im DR17-Liganden-Motiv. Weitere Substitutionen benachbarter P4-Positionen zeigten, daß dieser Effekt jedoch spezifisch und auf P4 lokalisiert ist (*Abb. 3.12*), da sie ansonsten zu einer Reduktion des Bindungsvermögens führten.



**Abb. 3.12** Konvertierung natürlicher HLA-DR1- und -DR12-Liganden zu HLA-DR17 bindenden Peptiden. HLA-A2(103-117) und TF-R(140-156) wurden durch Substitution von Leucin mit Asparaginsäure in der relativen Position 4 zu exzellenten DR17-Liganden.

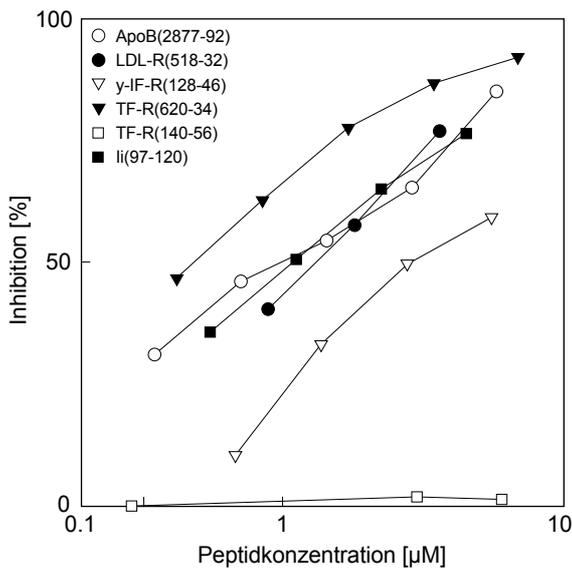
### 3.3.6 Charakterisierung der Interaktion von Klasse-II-assoziierten Peptiden der invarianten Kette (CLIPs) mit HLA-DR-Molekülen

Verschiedene Peptide, die aus einer bestimmten Region der Invarianten Kette Ii(97-120) stammen, werden häufig neben anderen natürlichen Liganden auf diversen Klasse-II-Molekülen gefunden [Chicz et al., 1992; Hunt et al., 1992; Rudensky et al., 1992; Riberdy et al., 1992; Sette et al., 1992]. Solche Klasse-II-assoziierten Peptide der Invarianten Kette, kurz CLIPs genannt, bestimmen die Liganden von Klasse-II „processing-deficient“ Zellen. Es ist unklar, ob CLIPs in der MHC Bindungsgrube oder an eine nicht-polymorphe Region außerhalb der Peptidbindungsgrube von MHC-Klasse-II-Molekülen binden. Zur Klärung der Interaktion zwischen Klasse-II-Moleküle und CLIPs wurde das Bindungsvermögen von CLIP und CLIP-Varianten mit den beiden Klasse-II-Allelen HLA-DR1 und HLA-DR17, die in vivo mit CLIP assoziiert sind (**Tab. 3.51**), untersucht und mit dem Bindungsvermögen antigener Peptide verglichen [Riberdy et al., 1992; Sette et al., 1992; Chicz et al., 1992].

### 3.3.7 Affinität der CLIP-Peptide zum HLA-DR17-Rezeptor

Die Titrationskurven in *Abb. 3.13* zeigen CLIP(97-120) im Vergleich mit anderen natürlichen DR17-Liganden. Hierbei lässt sich die luminale Region der Invarianten Kette eindeutig als potentieller Kompetitor antigener DR17-Peptide identifizieren.

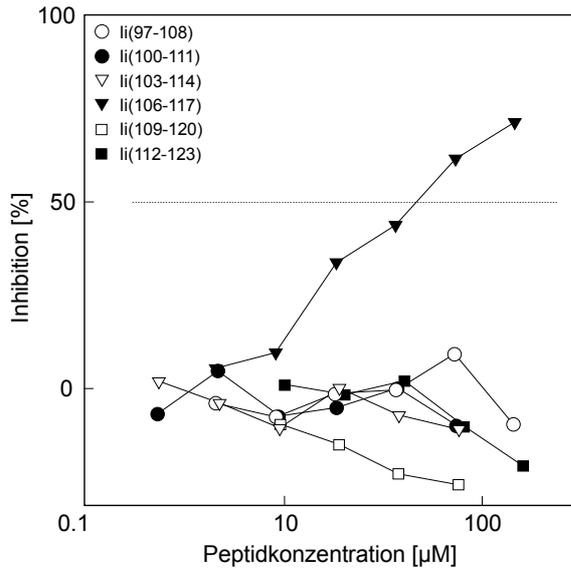
Zur genaueren Untersuchung der Bindungscharakteristika von CLIPs und ihrer Varianten wurde wiederum der natürliche DR17-Ligand ApoB(2877-2894) in biotinylierter Form als Agonist im Wettbewerbsassay eingesetzt.



*Abb. 3.13* Die Bindungskapazität von CLIP(97-120) im Vergleich zu konventionellen HLA-DR17-Selbstpeptiden. Die Bindung wurde in Konkurrenz mit  $2\mu\text{M}$  ApoB (2877-2894) an aufgereinigten DR17-Moleküle gemessen.

### 3.3.8 Minimalepitop der CLIPs für die Bindung an das HLA-DR17-Molekül

Aus der luminalen Region der invarianten Kette (Ii(97-120)) wurden sechs überlappende Peptide mit einer Länge von 12 Aminosäuren synthetisiert. Das Potential dieser Peptide, mit dem natürlichen DR17-Liganden ApoB(2877-2894) um die Bindung an aufgereinigte HLA-DR17-Moleküle zu konkurrieren wurde bei pH 5 gemessen. Allein Ii(106-117) war in der Lage, dosisabhängig die Bindung von ApoB(2877-2894) zu inhibieren (*Abb.3.14*). Somit lässt sich das Bindungsepitop der CLIPs an HLA-DR17 auf die Sequenz Ii(106-117) festschreiben. Dieser Befund war zu erwarten, da diese Sequenz in allen CLIPs enthalten ist, die auf DR-Molekülen gefunden wurden [Malcharek et al., 1995; Chicz et al., 1993; Sette et al., 1992; Riberdy et al., 1992].

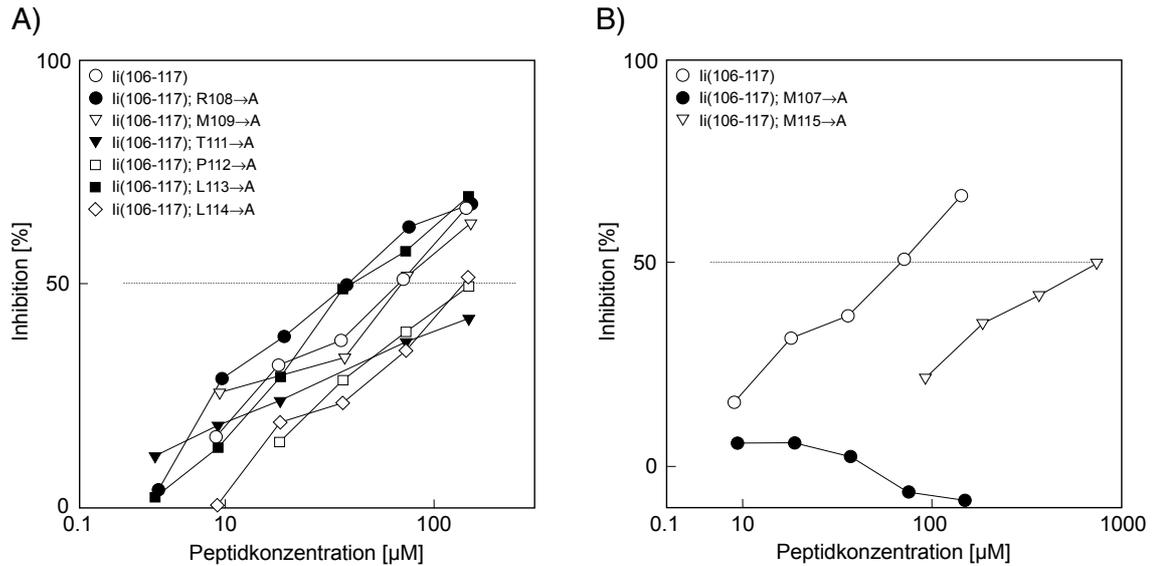


**Abb. 3.14** Kartierung der Bindungsstelle von CLIPs. Die Bindungskapazitäten von sechs überlappenden 12mer Peptiden von Ii(97-120) wurde bestimmt und somit das Minimalepitop für die Bindung an DR17 identifiziert. Lediglich das Peptid Ii(106-117) zeigt dosisabhängige Inhibition.

### 3.3.9 Detaillierte Beschreibung der Ankerpositionen

Der sogenannte „Scan“ ist ein systematischer Ansatz zur Evaluierung des Beitrages, den jede einzelne Aminosäure eines natürlichen Liganden zur Bindung an einen Rezeptor leistet. Hierbei wird jeweils eine Aminosäure der natürlichen Sequenz – unter Berücksichtigung jeder Position – durch eine andere ersetzt.

Um die Bindung von Ii(106-117) detaillierter betrachten zu können, wurden die Ankerpositionen des Dodecapeptids durch einfache Alaninsubstitutionen untersucht. An den meisten Positionen konnten nur leichte Veränderungen des Bindungsvermögens beobachtet werden (**Abb. 3.15A**). Jedoch traten die Alaninsubstitutionen für Met107 und Met115 selbst bei hohen Konzentrationen nur minimal oder überhaupt nicht mit dem natürlichen Liganden Ii(106-117) in Konkurrenz, was sich in einer Einbuße der Bindungskapazität um das 100- bzw. 20fache manifestierte (**Abb. 3.15B**). Diese Beobachtung steht im Einklang mit dem Ergebnis, dass weder Ii(97-113) (Daten nicht gezeigt) noch Ii(103-114) oder Ii(109-120) in der Lage sind, mit ApoB(2877-2894) um die Bindung an DR17-Moleküle zu konkurrieren, da diesen eingekürzten Peptiden entweder Met107 oder Met115 fehlt.

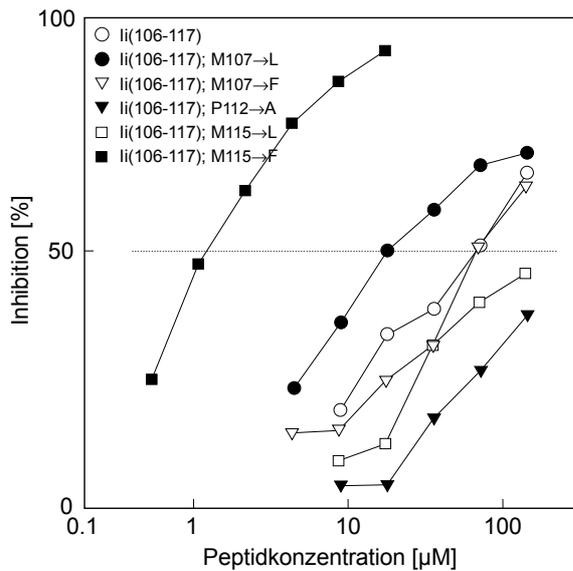


**Abb. 3.15** Analyse der sequenzabhängigen Kontaktstellen der CLIPs. Die Auswirkungen des Ala-Scans auf die Bindung des Minimalepitops Ii(106-117) an HLA-DR17 sind in **A)** für die relativen Positionen 2-8, und in **B)** für die relativen Positionen 1 und 9 dargestellt.

Damit sind Met107 und Met115 als hydrophobe Ankerpositionen für die Bindung der CLIPs an DR17 identifiziert. Wurde Met115 durch Phe oder Leu ersetzt, führte dies im Vergleich zu der Alaninsubstitution nur zu einer geringeren Einbuße der Bindungskapazität, wohingegen die entsprechenden Substitutionen von Met107 eine gleichbleibende oder sogar verbesserte Bindungskapazität erbrachten (**Abb. 3.16**).

Dies bedeutet, daß die beiden Methionine Met107 und Met115 durch homologe Aminosäuren gleichwertig ersetzt werden können, während negativ geladene Aminosäuren wie Asparaginsäure zu einem völligen Verlust des Bindungsvermögens führen (Daten nicht gezeigt).

Die Methionine Met107 und Met115 sind durch sieben andere Aminosäuren voneinander getrennt. Dies deckt sich mit der räumlichen Anordnung hydrophober/aromatischer Ankeramino-säuren an den relativen Positionen P1 und P9, wie sie bei natürlichen DR17-Liganden gefunden wurde (**Tab. 3.41**) [Malcherek et al. 1993; Malcherek et al. 1994]. Trotz dieser partiellen Homologie zwischen Ii(106-117) und natürlichen DR17-Liganden gibt es einen wesentlichen Unterschied: Das natürliche DR17-Ligandenmotiv weist vier spezifische Kontaktstellen an den relativen Positionen

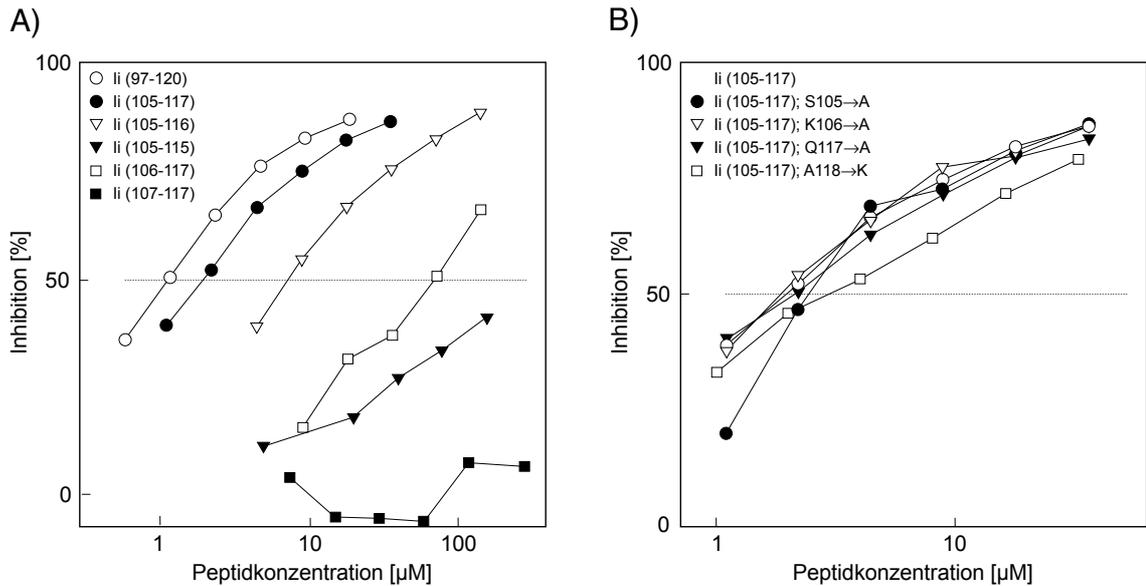


**Abb. 3.16** Modulation allelspezifischer Kontaktstellen an DR17. Substitution von Met107 und Met115 gegen hydrophobe und aromatische Reste zeigen die Allelspezifität der Interaktion von DR17 an den degenerierten Positionen P1 und P9.

P1, P4, P6 und P9 auf, wobei P4 der allelspezifische Anker ist, der exklusiv von dem negativ geladenen Asparaginsäure-Rest besetzt wird.

Substituiert man Ala110 der CLIP Sequenz (in relativer Position 4) mit Asparaginsäure, steigt die Bindungskapazität dieses Asp-Analogen von Ii(106-117) um mehr als das 20fache an (**Abb. 3.16**). Diese allelspezifische Modulation könnte darauf hinweisen, dass CLIPs prinzipiell die strukturellen Voraussetzungen zur Bindung in der Peptidbindungsgrube erfüllen, obwohl die CLIPs nicht optimal mit allelspezifischen Kontaktstellen ausgestattet sind (**Tab. 3.41**).

Die relative Bindungskapazität von Ii(106-117) war ca.  $50\mu\text{M}$ , wohingegen die Bindungskapazität des langen Ii Peptids Ii(97-120)  $1\mu\text{M}$  betrug und damit in der Größenordnung von natürlichen DR17-Liganden lag ( $0,7-3,8\mu\text{M}$ ) (**Abb. 3.13**). Der große Unterschied der Bindungskapazitäten zwischen den Verkürzungsvarianten und den CLIPs mit natürlicher Länge rührt wahrscheinlich von den flankierenden Resten. Wie die Titrationskurven in **Abb. 3.17A** illustrieren, hatte das Entfernen der acht N-terminalen und der drei C-terminalen Reste (Ii(105-117)) nur geringen Einfluß auf die Bindung, das Entfernen weiterer Aminosäuren hingegen resultierte in einem dramatischen Verlust des Bindungsvermögens dieser Varianten. Folglich sind die Reste Ser105, Lys106, Gln116 und Ala117 essentiell für die Bindung an DR17- und an DR1-Moleküle (Daten nicht gezeigt).

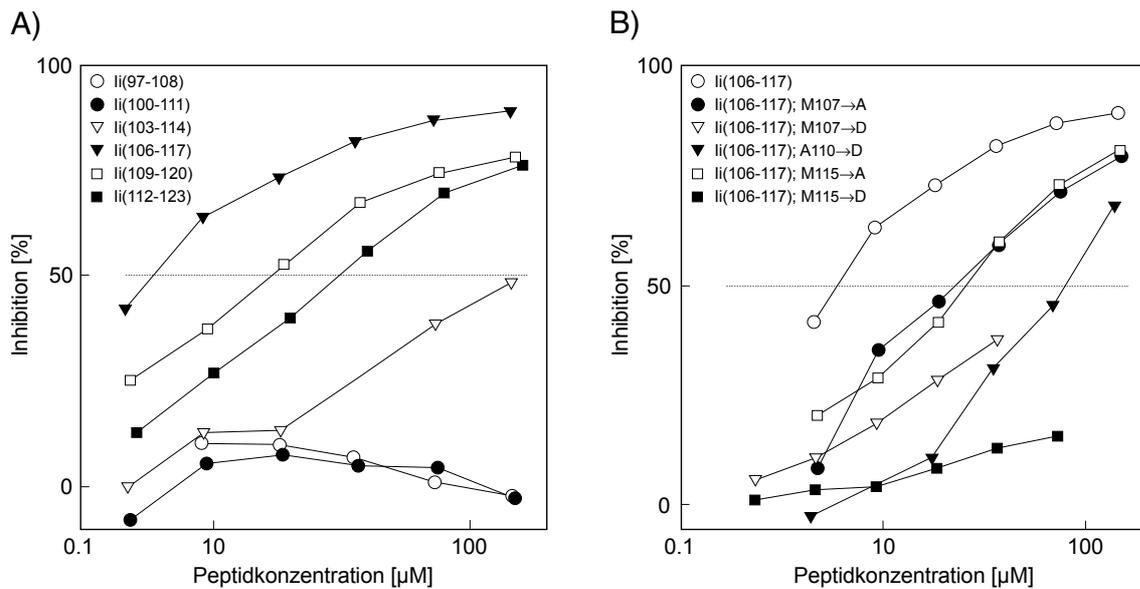


**Abb. 3.17** Charakterisierung der CLIP Bindungsstelle an HLA-DR17.

**A)** Vergleich der Bindungskapazitäten des Ii Peptids Ii(97-120) mit Verkürzungsvarianten von Ii(106-117). **B)** Substitution flankierender Aminosäuren zur Analyse ihres sequenzunabhängigen Beitrags für die Bindung an DR17.

Um den Beitrag der vier flankierenden Aminosäuren zur Bindungskapazität zu evaluieren, wurden diese Reste einzeln gegen verschiedene Aminosäuren substituiert. Die resultierenden Titrationskurven in **Abb. 3.17B** sind beinahe deckungsgleich, was beweist, dass für die Bindung an den Rezeptor alleine die Länge des Peptides maßgebend ist, während die Natur der den Kern flankierenden Aminosäuren keinen Einfluß besitzt.

Dies bestätigt, dass sich die Bindung der CLIPs – wie auch die allelspezifischer Liganden – aus zwei Komponenten zusammensetzt: Einer spezifischen, seitenkettenabhängigen, und einer seitenkettenunabhängigen Interaktion, die via Wasserstoffbrücken vermittelt wird [Stern et al., 1994].



**Abb. 3.18** Kartierung der Bindungsstellen von CLIPs an HLA-DR1.

**A)** Bindungsvermögen der sechs überlappenden Dodecapeptide von Ii(97-120) **B)** Beitrag der beiden Methionine, Met107 und Met115 zum Inhibitionsvermögen von Ii(106-120).

Als konsequente Folge dehnten sich die CLIP-Bindungstudien auf HLA-DR1 aus: Aufgereinigte DR1-Moleküle wurden mit dem biotinylierten natürlichen Liganden HLA-A2(103-117) beladen und deren Konkurrenz gegen Invariant Chain Peptide gemessen. Wie schon bei den DR17 Bindungsstudien, war unter den sechs getesteten Dodecameren wiederum das Peptid Ii(106-117) der beste Inhibitor (**Abb. 3.18A**). Dieses Ergebnis war zu erwarten, da diese Sequenz alle CLIPs enthielt, die auf DR1-Molekülen gefunden wurden (**Tab. 3.51**).

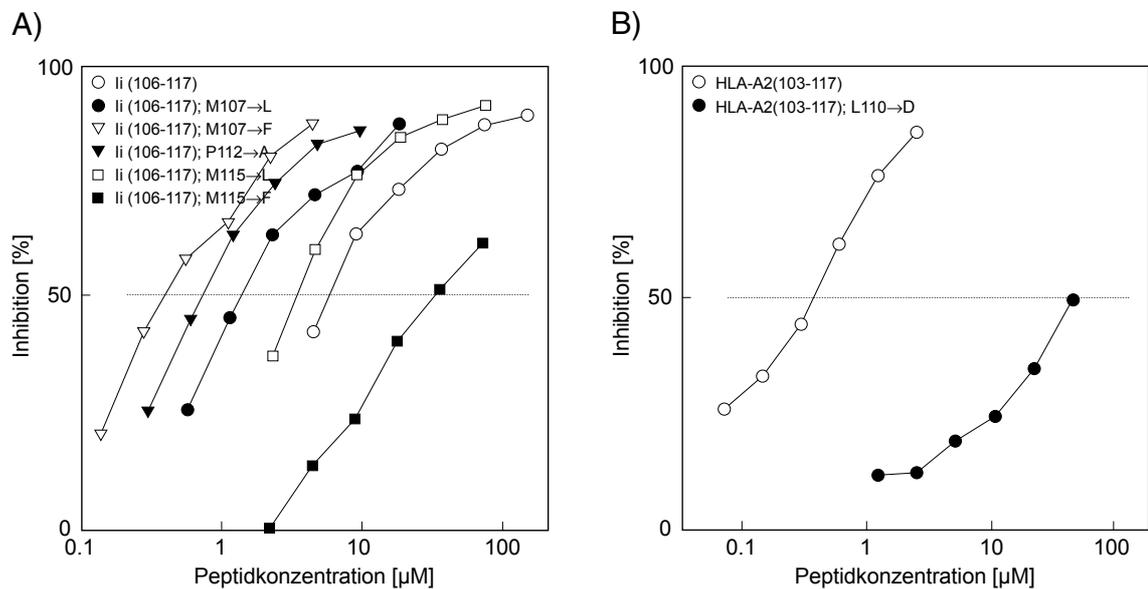
**Abb. 3.18B** belegt, dass die beiden Methionine, Met107 und Met115 abermals eine entscheidende Rolle bei der Bindung des Dodecapeptids Ii(106-117) spielen. Während der messbare Effekt bei den Alaninanaloga nur minimal ausfiel, waren jedoch die Auswirkungen der Substitutionen mit geladenen Resten signifikant (**Abb. 3.15B** und **Abb. 3.18B**).

Ersetzte man aber Met107 durch Phenylalanin, konnte bei DR1 eine signifikante Verbesserung des Bindungsvermögens beobachtet werden, wohingegen die entsprechende Substitution bei DR17 zu keiner Veränderung der Bindungskapazität führte (**Abb. 3.16** und **Abb. 3.19A**). Diese Resultate spiegeln somit exakt die

allelspezifischen Unterschiede zwischen DR1 und DR17 wider: Aromatische Reste dominieren P1 im DR1-Ligandenmotiv und aliphatische Aminosäuren sind die bevorzugten Reste des DR17-Ligandenmotivs.

In diesem Sinne lassen sich ebenso die Ergebnisse der Met115 Substitutionsvarianten interpretieren. Auch hier zeigte das Alaninanalogon eine geringfügigere Reduktion der Bindungskapazität als das Phenylalaninanalogon, wobei die Substitution von Met115 gegen Leucin sogar in einer Verstärkung der Bindung resultierte (**Abb. 3.19A**).

Die Position 4 von natürlichen DR1-Liganden wird hauptsächlich von aliphatischen Resten besetzt [Falk et al., 1994; Hammer et al., 1993]. Tauschte man Ala110 aus Ii(106-117) bzw. Leu110 aus HLA-A2(103-117) mit Asparaginsäure, so verringerte sich die Bindungskapazität dieser beiden Substitutionsvarianten deutlich (**Abb. 3.18B und Abb. 3.19B**). Die Einführung der Asparaginsäure in CLIPs an Position 4 führte im Falle von DR17 zu einer Verstärkung und im Falle von DR1 zu einer Reduktion der Bindungsstärke. Folglich zeigen CLIPs zwar eindeutig ein allelspezifisches Bindungsverhalten, aber dieselbe Substitution führt je nach Allel – DR1 oder DR17 – zu



**Abb. 3.19** Bestimmung des Beitrags der einzelnen Kontaktstellen zur Bindung an HLA-DR1.

**A)** Substitution von Met107 und Met115 gegen hydrophobe Aminosäuren. **B)** Reduktion der Bindungsstärke von HLA-A2(103-117) durch Einführung der DR17 allelspezifischen Ankeramino-säure Asparagin in Position 4.

**Tab. 3.51** Die Ankerpositionen der HLA-Klasse-II-Ligandenmotive lassen ein von CLIPs verwendetes Supermotiv vermuten.

		Relative Position										Literatur				
		1	*	*	4	*	6	*	*	9						
<b>HLA-DR17-Motiv</b>		<b>L</b>			<b>D</b>		<b>K</b>			<b>Y</b>		[a]				
		<b>I</b>					<b>R</b>			<b>L</b>						
		<b>F</b>					<b>E</b>			<b>F</b>						
		<b>M</b>					<b>Q</b>									
		<b>V</b>					<b>N</b>									
CLIP(97-120)	LPKPPKPV	<u>S</u>	<u>K</u>	<b>M</b>	R	M	A	T	P	L	L	<b>M</b>	<u>Q</u>	<u>A</u>	LPM	[b, c]
CLIP(97-119)	LPKPPKPV	<u>S</u>	<u>K</u>	<b>M</b>	R	M	A	T	P	L	L	<b>M</b>	<u>Q</u>	<u>A</u>	LP	[b, c, d]
CLIP(98-119)	PKPPKPV	<u>S</u>	<u>K</u>	<b>M</b>	R	M	A	T	P	L	L	<b>M</b>	<u>Q</u>	<u>A</u>	LP	[c, d]
CLIP(99-120)	KPPKPV	<u>S</u>	<u>K</u>	<b>M</b>	R	M	A	T	P	L	L	<b>M</b>	<u>Q</u>	<u>A</u>	LPM	[b, d]
CLIP(99-119)	KPPKPV	<u>S</u>	<u>K</u>	<b>M</b>	R	M	A	T	P	L	L	<b>M</b>	<u>Q</u>	<u>A</u>	LP	[d]
<b>HLA-DR1-Motiv</b>		<b>Y</b>			<b>M</b>		<b>A</b>			<b>L</b>						[e, f, g]
		<b>F</b>			<b>L</b>		<b>G</b>			<b>A</b>						
		<b>V</b>			<b>A</b>		<b>S</b>			<b>M</b>						
		<b>L</b>														
CLIP(97-121)	LPKPPKPV	<u>S</u>	<u>K</u>	<b>M</b>	R	M	<b>A</b>	T	P	L	L	<b>M</b>	<u>Q</u>	<u>A</u>	LPMG	[d]
CLIP(97-120)	LPKPPKPV	<u>S</u>	<u>K</u>	<b>M</b>	R	M	<b>A</b>	T	P	L	L	<b>M</b>	<u>Q</u>	<u>A</u>	LPM	[d]
CLIP(97-119)	LPKPPKPV	<u>S</u>	<u>K</u>	<b>M</b>	R	M	<b>A</b>	T	P	L	L	<b>M</b>	<u>Q</u>	<u>A</u>	LP	[d]
CLIP(98-121)	PKPPKPV	<u>S</u>	<u>K</u>	<b>M</b>	R	M	<b>A</b>	T	P	L	L	<b>M</b>	<u>Q</u>	<u>A</u>	LPMG	[d]
CLIP(98-120)	PKPPKPV	<u>S</u>	<u>K</u>	<b>M</b>	R	M	<b>A</b>	T	P	L	L	<b>M</b>	<u>Q</u>	<u>A</u>	LPM	[d]
CLIP(96-119)	PKPPKPV	<u>S</u>	<u>K</u>	<b>M</b>	R	M	<b>A</b>	T	P	L	L	<b>M</b>	<u>Q</u>	<u>A</u>	LP	[d]
CLIP(99-120)	KPPKPV	<u>S</u>	<u>K</u>	<b>M</b>	R	M	<b>A</b>	T	P	L	L	<b>M</b>	<u>Q</u>	<u>A</u>	LPM	[d]
CLIP(99-119)	KPPKPV	<u>S</u>	<u>K</u>	<b>M</b>	R	M	<b>A</b>	T	P	L	L	<b>M</b>	<u>Q</u>	<u>A</u>	LP	[d]
CLIP(100-119)	PPKPV	<u>S</u>	<u>K</u>	<b>M</b>	R	M	<b>A</b>	T	P	L	L	<b>M</b>	<u>Q</u>	<u>A</u>	LP	[d]
CLIP(106-120)			<u>K</u>	<b>M</b>	R	M	<b>A</b>	T	P	L	L	<b>M</b>	<u>Q</u>	<u>A</u>	LPM	[d]
CLIP(106-119)			<u>K</u>	<b>M</b>	R	M	<b>A</b>	T	P	L	L	<b>M</b>	<u>Q</u>	<u>A</u>	LP	[d]

völlig unterschiedlichen Effekten. Um auch die Spezifität der vierten Kontaktstelle von DR1 genauer zu charakterisieren, wurde in die Ii(106-117) Sequenz der DR1 spezifische Anker Alanin in relativer Position 6 eingeführt (P112→A). Wie *Abb. 3.19A* zu entnehmen ist, verbesserte diese allelspezifische Modulation die Bindungskapazität des Ii-Peptids enorm.

Diese Ergebnisse zeigen, wie CLIPs allelspezifischen Ansprüchen gerecht werden: Seitenkettenabhängige, spezifische Kontaktstellen passen ebenso perfekt wie seitenkettenunabhängige, unspezifische (Daten für DR1 nicht gezeigt) Kontaktstellen zu den allelspezifischen, natürlichen DR1- und DR17-Liganden. Die Verwendung hydrophober Kontaktstellen (*Tab. 3.51*) ermöglicht es CLIPs, gut an verschiedene Klasse-II-Moleküle zu binden, auch an DR17-Moleküle, die sich durch ein ausgeprägtes allelspezifisches Ligandenmotiv auszeichnen. Das Fehlen spezifischer Anker könnte eine Konzession der CLIPs zur Vermeidung von negativen Einflüssen auf die Bindung sein, um die Allgemeingültigkeit der Bindung an MHC-Klasse-II-Moleküle zu bewahren. Zur Bewahrung der Promiskuität sind die CLIPs wohl mit möglichst geringen Ansprüchen ausgestattet.

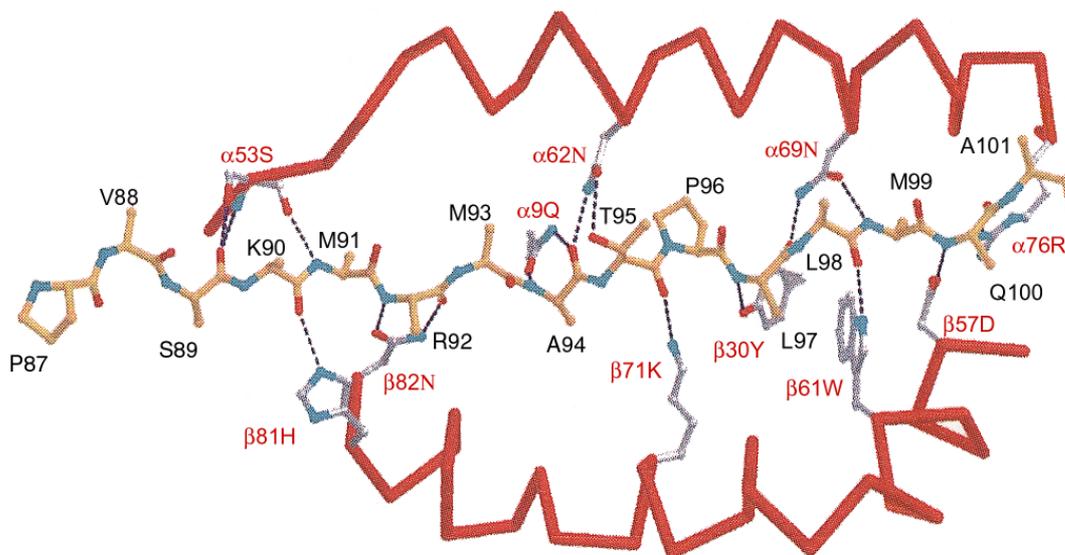
Der Einsatz synthetischer Peptidchemie zeigte, dass CLIPs den gleichen Peptidrahmen zur Bindung in der Peptidbindungsgrube bei den sehr verschiedenen Klasse-II-Molekülen DR1 und DR17 verwenden. CLIPs haben demnach tatsächlich die Charakteristika einer promiskuitiven Bindung in der MHC-Klasse-II-Bindungsgrube.

### **3.3.10 „Molecular Modelling“ der Bindung von CLIP Ii(106-117) in der Bindungsgrube des HLA-DR1-Rezeptors**

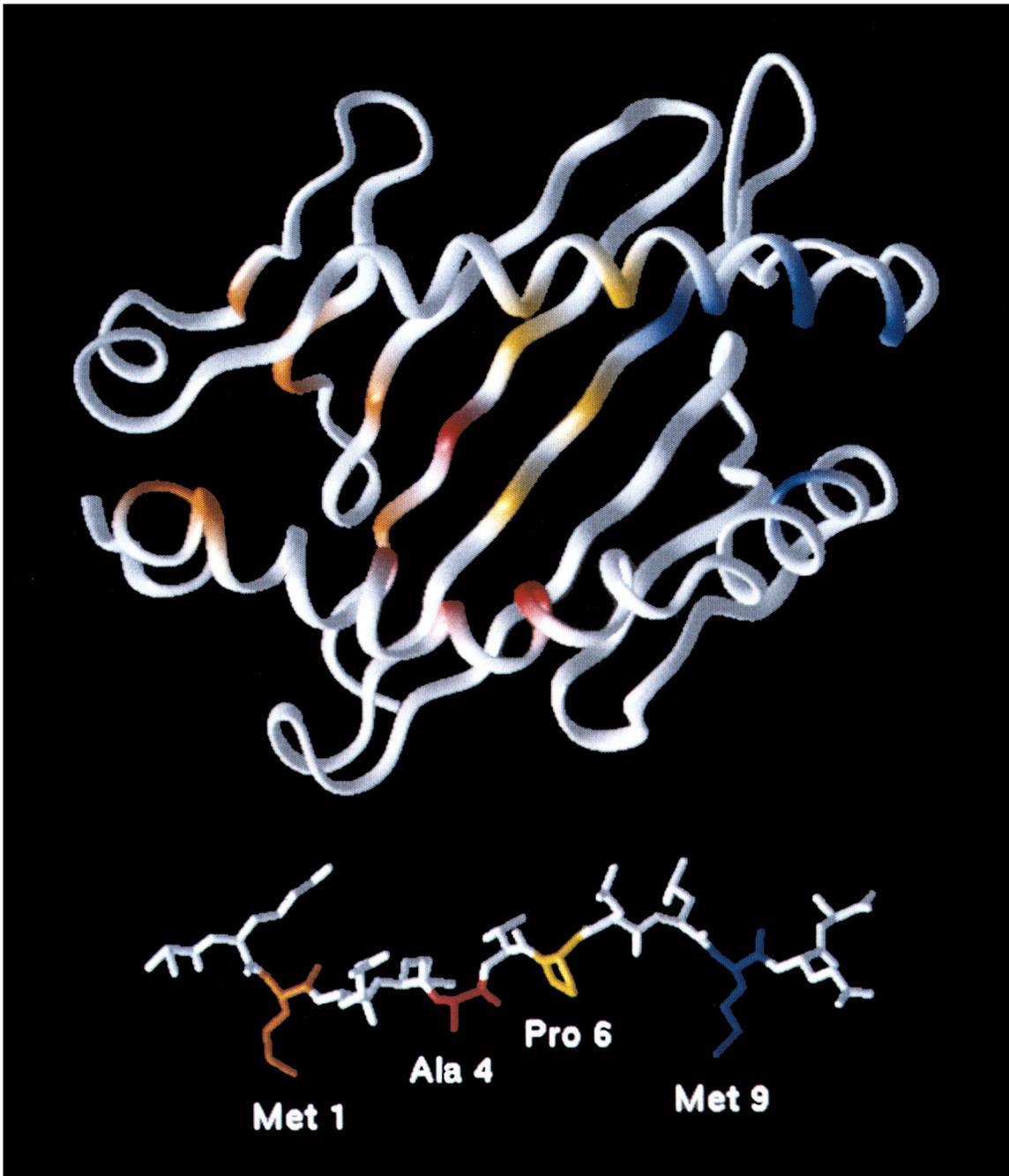
Um die mögliche Bindung von CLIP Ii(106-117) in der Peptidbindungsgrube von HLA-DR1-Molekülen zu illustrieren, wurde versucht, mit den Methoden des „Molecular Modelling“ diese Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung zu modellieren. Die HLA-DR1-Kristallstruktur wurde von der Brookhaven-Datenbank bezogen. Zur Visualisierung kam das Programmpaket Insight II auf einer Silicon Graphics IRIS Indigo R4000 Workstation zum Einsatz. Moleküldynamiksimulationen und Kraftfeldminimierungen wurden mit dem Programm Discover (Biosym) und dem Kraftfeld CVFF durchgeführt.

Das CLIP-Peptid (Ii(106-117)) wurde aus den Aminosäurebausteinen der Bibliothek des Insight II-Programmpakets aufgebaut, energieminiert und die bekannten Ankerpositionen manuell durch schrittweise Veränderung der Torsionswinkel des Peptidrückgrats und der Seitenketten in die bekannten Bindungstaschen des HLA-DR1-Moleküles eingepaßt. Zur Beseitigung möglicher sterischer Überlappungen wurde der Peptid-MHC-Komplex einer anschließenden Energieminimierung unterzogen, wobei die Positionen der MHC-Atome festgehalten wurden (*Abb. 3.21* und *Abb. 3.22*). Die potentiellen Kontaktstellen sind in *Abbildung 3.21* analog ihrer Bindungstaschen koloriert.

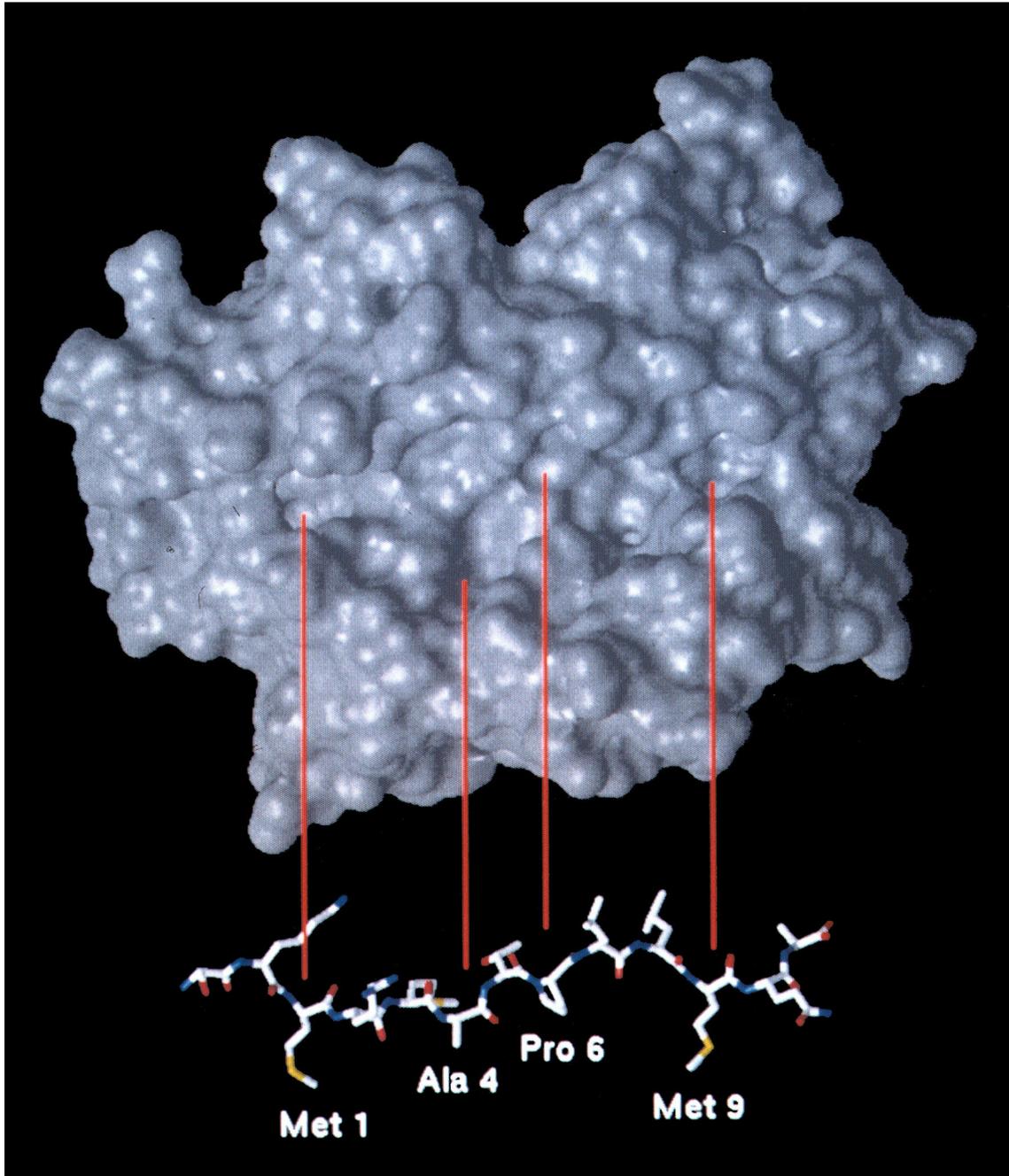
*Abbildung 3.20* zeigt die nach Abschluss der vorliegenden Arbeit veröffentlichte mögliche Wechselwirkung des CLIP-Liganden mit dem HLA-DR3-Rezeptor, die durch Röntgenstrukturanalyse eines kokristallisierten HLA-DR3-CLIP Komplexes entstand.



*Abb. 3.20* Die Aufsicht der Kristallstruktur des kokristallisierten **HLA-DR3-CLIP-Komplexes** zeigt CLIP Ii(87-101) in der Peptidbindungsgrube des **HLA-DR3-Moleküls** gebunden. Die gestrichelte Linien zeigen die möglichen 17 Wasserstoffbrückenbindungen zwischen CLIP und DR3, von denen 11 mit MHC-Klasse-II koservierten Aminosäuren gebildet werden. Von diesen 11 Wasserstoffbrückenbindungen, werden 10 zwischen der CLIP-Hauptkette und DR3, und eine zwischen einer CLIP-Seitenkette und DR3 gebildet. Eingezeichnet sind ausschließlich DR3-Reste(silber) die Wasserstoffbrücken mit CLIP bilden.



**Abb. 3.21** Die Ribbon Darstellung der Kristallstruktur von *HLA-DR1* [Stern et al. 1994]. Gezeigt ist ausschließlich die Bindungsgrube. Die vier Taschen, welche die CLIP Seitenketten beherbergen, sind in verschiedenen Farben dargestellt und entsprechend ihrem Abstand von der prominentesten Tasche nummeriert. Braun: Tasche 1, rot: Tasche 4, Gelb: Tasche 6, blau: Tasche 9. CLIP Ii(106-117) ist als CPK Modell dargestellt. Kontaktstellen sind analog ihrer Bindungstasche koloriert.



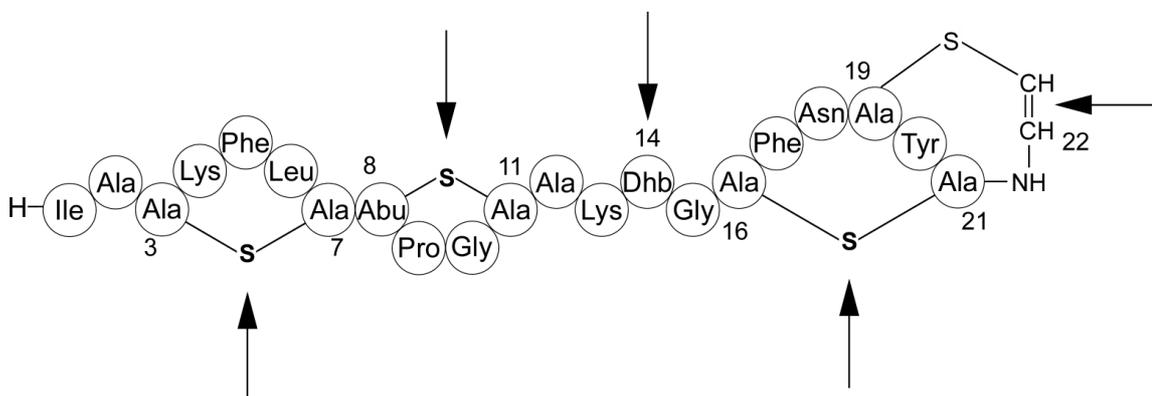
**Abb. 3.22** Aufsicht auf die Connolly Oberfläche der **HLA-DRI**-Bindungsstelle. Die Aminosäuren welche die Bindungstaschen bilden sind rot dargestellt. Darunter ist CLIP Ii(106-117) als gestrecktes "Stick Model" gezeigt. Die roten Linien verbinden die Peptidseitenketten mit ihren korrespondierenden Bindungstaschen.

### 3.4 Edman-Abbau von Lantibiotika

Im Rahmen einer Kooperation mit Frau Dr. Birgitt Ottenwalder, Herrn Dr. Thomas Kupke und Herrn Prof. Dr. Friedrich Götz (Universität Tübingen, Mikrobielle Genetik) sollten die Struktur-Wirkungsbeziehungen einzelner Lantibiotika aufgeklärt werden, um auch durch biotechnologische Herstellung von Analoga ihre Anwendbarkeit zu erhöhen. Mit Hilfe der aus zweidimensionalen NMR-spektroskopischen Techniken gewonnenen Strukturdaten lassen sich potentielle Proteasenschnittstellen identifizieren, die durch Aminosaurenaustausch zu proteasenresistenten Analoga führen. Hierzu werden routinemäßig durchführbare Analysemethoden benötigt, mittels derer eventuelle Leserahmenverschiebungen bei den entstandenen Mutanten oder aber Modifizierungs-Enzym Inaktivität überprüft werden kann.

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung von Methoden zur Routine-Analytik exprimierter, genetisch modifizierter Mutanten.

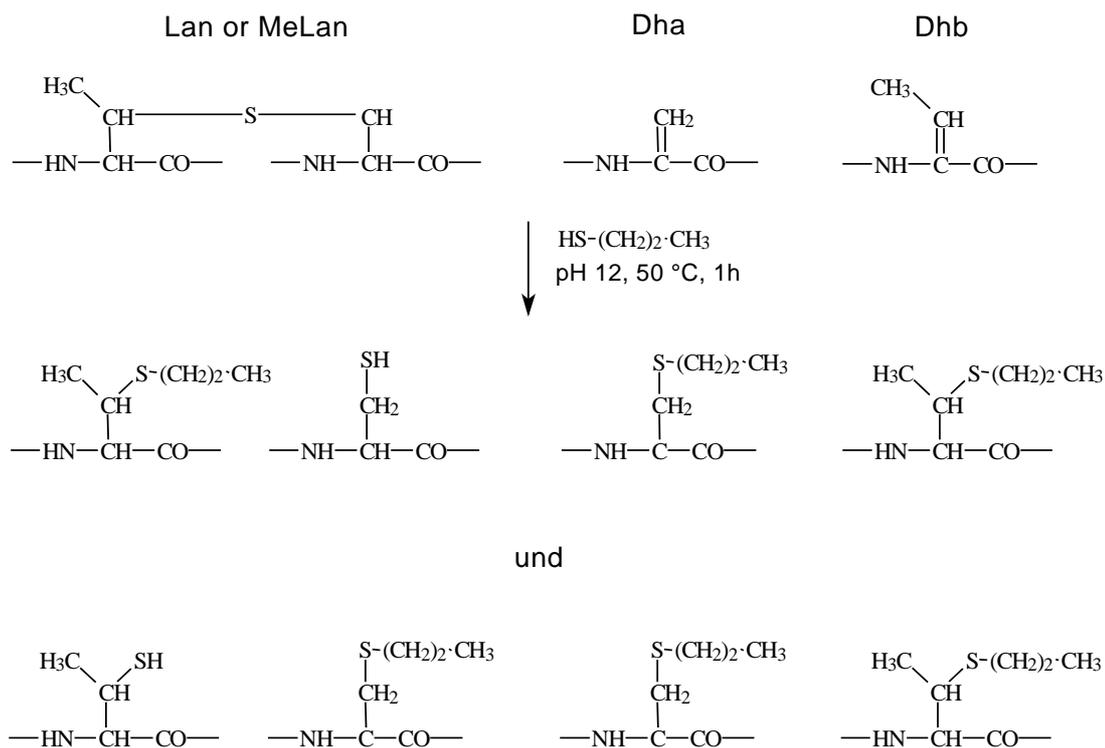
Die oben genannten posttranslationalen Modifikationen führen bei der herkommlichen Sequenzierung mittels Edman-Abbau zu großen Schwierigkeiten: Nicht eine der modifizierten Aminosäuren kann ohne weitere chemische Modifikationen analytisch detektierbar gemacht werden (*Abb.3.23*).



*Abb. 3.23* Primärstruktur des Lantibiotika Gallidermin. Die Pfeile zeigen die verschiedenen Modifikationsstellen an.

Bei der Sequenzierung von unmodifiziertem Gallidermin tritt bei der  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Aminosäure 2,3-Didehydrobutyrin in Position 14 ein Abbruch des Edman-Abbaus auf, da dieser Rest bei freiem N-Terminus durch Tautomerisierung und nachfolgende Hydrolyse des gebildeten Imins zur Ketosäure konvertiert, die wiederum ohne freie Aminogruppe keine PTC-Aminosäure bilden kann. Lanthionin und Methyllanthionin bilden als essentielle Schritte des Edman-Abbaus zwar PTC- und ATZ-Aminosäuren, verursachen aber vermutlich als Folge der tetrazyklischen Peptidstruktur (die zu hoher Molekülspannung und schlechter Zugänglichkeit führt) einen drastischen Einbruch der „repetitive yield“ bei den folgenden Resten. Während die beiden Brückenköpfe der Lanthionin- und Methyllanthioninreste einfach als Lücken bei der Sequenzierung auftauchen, konnten weder PTH-Lanthionin noch PTH-Methyllanthionin – obwohl im Sequenzer prinzipiell detektierbar und trotz intensiver Suche – in keiner Sequenzierung nachgewiesen werden. Grund dafür könnte sowohl die Instabilität der Sulfidbrücken unter den alkalischen Kupplungsbedingungen sein, als auch die Unlöslichkeit der gebildeten PTH-Derivate in den verwendeten Standardlösungsmitteln. Um die Lantibiotika dennoch einer Sequenzierung zugänglich zu machen, hat sich die Modifizierung mit Thiolen als sehr hilfreich erwiesen. Bei der Modifizierung mit alkalischer Ethanthiol-Lösung [Meyer, H.E. et al., 1994] entstehen allerdings PTH-Aminosäuren, die zum Teil mit Standardaminosäuren koeluieren und folglich schlecht zu detektieren sind.

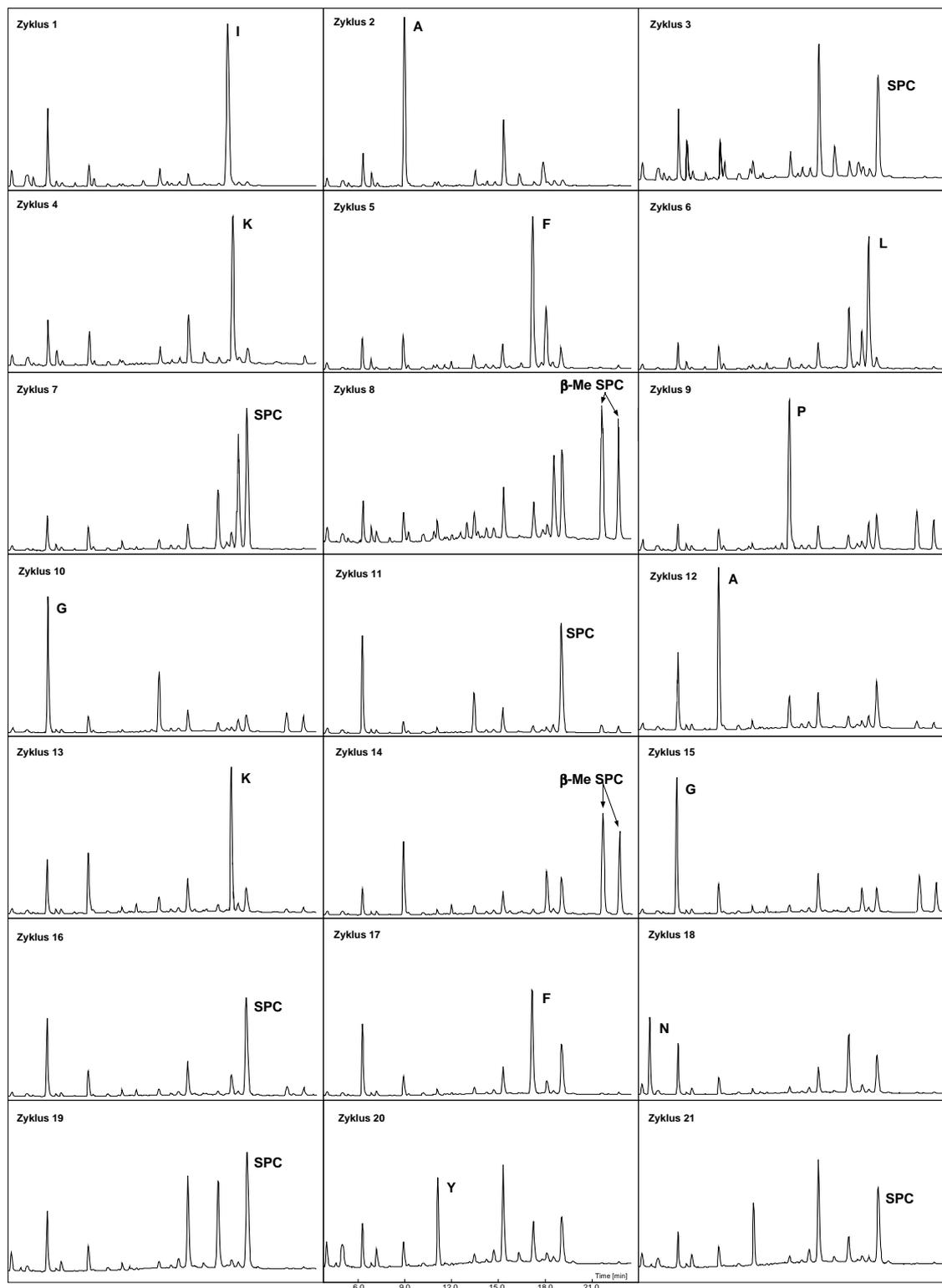
Ersetzt man Ethanthiol durch Propanthiol, ergeben sich eindeutig identifizierbare PTH-Aminosäurederivate. Bei der Reaktion mit alkalischer Thiollösung erfolgt eine Öffnung der Thioetherbrücken bei Lanthionin und Methyllanthionin durch basenkatalysierte Eliminierung unter Bildung von 2,3-Didehydroalanin bzw. 2,3-Didehydrobutyrin und Cystein bzw.  $\beta$ -Methylcystein, je nach Aminosäurerest. Diese reagieren nun mit dem Alkanthiol, im Falle der Dehydroaminosäuren in einer Additions-, im Falle der Cysteine in einer Substitutionsreaktion, wobei die entsprechenden stabilen S-Propylcysteinyl- und  $\beta$ -Methyl-S-propylcysteinyl-derivate entstehen (**Abb. 3.24**).



**Abb. 3.24** Reaktionsschema der ungewöhnlichen Aminosäuren Lanthionin (Lan), 3-Methylanthionin (MeLan), 2,3-Didehydroalanin (Dha) und Didehydrobutyrin (Dhb) mit alkalischer Propanthiol-Lösung.

Beim PTH-Derivat des  $\beta$ -Methyl-S-Propylcysteins beobachtet man im HPLC-Eluationsprofil zwei Signale. Die Addition des Thiols an das C- $\beta$ -Atom des Didehydrobutyrins erfolgt nicht stereospezifisch, sodaß sich zwei Enantiomerenpaare (R,R und S,S; S,R und R,S) bilden, die als Diastereomere unterschiedliche Retentionszeiten aufweisen. PTH- $\beta$ -Methyl-S-propylcystein kann als Peak-Doublet identifiziert werden, das nach PTH-Leucin und PTH-S-Propylcystein im HPLC-Eluationsprofil erscheint (**Abb. 3.25**).

Die beschriebene Methode der Modifikation von Lantibiotika ermöglicht somit eine routinemäßig durchführbare Analyse, mit der sowohl eventuelle Leserahmenverschiebungen bei den entstandenen Mutanten, als auch Modifizierungs-Enzym Inaktivität überprüft werden kann.



**Abb. 3.25** Sequenzanalyse des modifizierten Gallidermins. Die Chromatogramme der on-line PTH-Aminosäureanalyse sind abgebildet. PTH-S-Propylcystein (SPC) tritt in den Zyklen 3, 7, 11, 16 und 19 auf. PTH- $\beta$ -Methyl-S-Propylcystein kann als Peak-Douplet in den Zyklen 8 und 14 identifiziert werden.

## 4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Bindungsmotive 18 verschiedener MHC-Klasse-I und fünf verschiedener MHC-Klasse-II-Moleküle durch multiple Sequenzanalyse MHC-extrahierter Peptidpools aufgeklärt werden. Die vier unterschiedlichen HLA-DR4-Moleküle und das DR17-Molekül ergaben zusammen 70 Peptidsequenzen aus 37 verschiedenen Proteinen. Die meisten dieser Peptide sind endogener Herkunft und membrangebunden. Viele Peptide stammen von MHC-Klasse-I-Molekülen, einige leiten sich von Hitzeschockproteinen ab und spiegeln somit ihre mögliche Rolle bei der Beladung von MHC-Klasse-II-Molekülen wider. Die Bindungsmotive sind allelspezifisch verschieden und bilden die Voraussetzung für die Bindung von Peptiden an MHC-Moleküle.

Als besondere Anwendung des klassischen Edman-Abbaus ist die Poolsquenzierung von MHC-Liganden eine logische Antwort auf die geringen Ausbeuten an Peptiden, indem sie anstelle einzelner Peptidsequenzen den Gesamtpool der Peptide (natürliche Peptidbibliotheken) nach der HPLC-Trennung als komplexes Gemisch analysiert.

Zur Interpretation der Sequenzierdaten aus MHC-Klasse-I-Peptidpools lassen sich zwei Regeln aufstellen:

- (i) In den Zyklen mit Ankeramino-säuren ist der Hintergrund der meisten anderen PTH-Aminosäuren sehr gering und führt somit im darauffolgenden Zyklus nur zu schwachen Signalanstiegen.
- (ii) Durch den ständigen, analysebedingten Probenverlust sinkt die Qualität der Signale mit der Anzahl der aufgezeichneten Zyklen. Folglich erreichen die C-terminalen Aminosäuren oft nicht einmal den für ein Signal definierten Grenzwert. Verglichen mit dem drastischen Rückgang der anderen Aminosäuren können diese C-terminalen Ankeramino-säuren dennoch problemlos erkannt werden.

Diese für die Poolsequenzierung von MHC-Klasse-I-Liganden aufgestellten Regeln sind prinzipiell auch auf Klasse-II anwendbar. Da jedoch die Veränderung der Aminosäuremuster über die einzelnen Abbauschritte geringer als bei den Klasse-I-Pools war, musste der Signalwert herabgesetzt und bei 50% definiert werden. Die höhere Komple-

xität der eluierten MHC-Klasse-II-Liganden lässt sich durch ihre unterschiedliche Länge („ragged ends“) erklären. Da der Abstand vom N-Terminus zur ersten Ankeraminosäure bei den meisten Liganden jedoch nur geringfügig variiert, erscheinen in den Sequenzierdaten die Anker als Signalcluster, die sich wiederum über zwei oder drei benachbarte Positionen erstrecken. Dieses Phänomen ermöglicht die exakte Festschreibung der Ankeraminosäure-Position und hilft bei der Identifikation dominanter Einzelsequenzen aus dem Peptidpool durch ihr Erscheinen als singuläre Signale, wobei den ständig anwachsenden Datenbanken bei der Zuordnung dieser analysierter Einzelpeptide eine immer größere Bedeutung zukommt.

Die multiple Sequenzanalyse hat sich als Methode der Wahl bei der Interpretation von MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II Sequenzierdaten etabliert. Zur Vermeidung von Fehlinterpretationen bei der Beurteilung von MHC-Klasse-II Daten müssen die Ergebnisse durch die Analyse von Selbstpeptiden und deren sinnvolle Gruppierung bestätigt werden, da diese ein Spiegelbild des Ligandenmotivs darstellen. Wenn möglich können die aufgestellten Motive mit Hilfe dreidimensionaler Strukturdaten (Röntgenstrukturanalyse) weiter unterstützt und die aufgestellten Motive verfeinert werden.

Alternativ können die postulierten konservierten Positionen durch Bindungsstudien verifiziert, und darüber hinaus die strukturellen Voraussetzungen der Nicht-Ankerpositionen abgeleitet werden

## **4.1 Das HLA-DR17-Ligandenmotiv**

Die Ergebnisse fünf unabhängiger Poolsequenzierungen eines repräsentativen Querschnitts natürlich prozessierter DR17-Liganden, aus denen dominante Peptidsequenzen ausgeschlossen wurden, ergaben das HLA-DR17-Konsensus-Motiv. Von den isolierten Selbstpeptiden konnten 12 erfolgreich sequenziert, sinnvoll zum erhaltenen Ligandenmotiv gruppiert und dadurch die Herkunft von zehn Liganden festgestellt werden. Somit bestätigen die analysierten Selbstpeptide eindrucksvoll das mit Hilfe der Poolsequenzierung aufgestellte Ligandenmotiv des HLA-DR17-Rezeptors.

Zum besseren Verständnis der strukturellen Interaktionen zwischen Rezeptor und Ligand wurden die Beträge der einzelnen Aminosäuren ausgewählter DR17-Selbst-

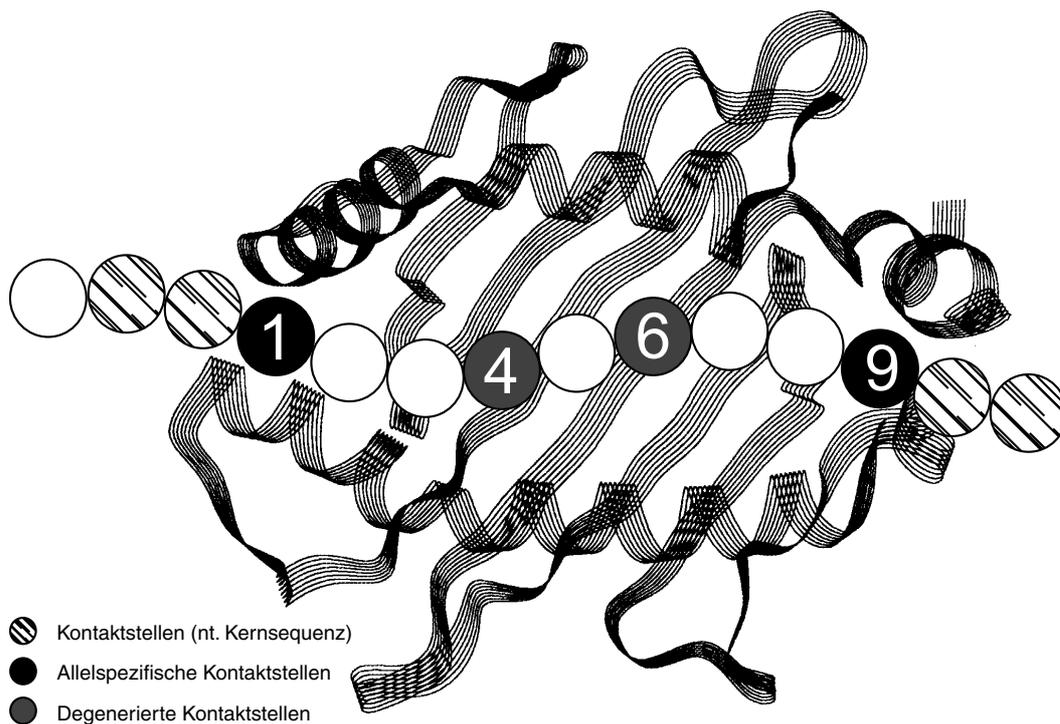
peptide durch Bindungsstudien in einem nicht-radioaktiven Peptidbindungsassay verifiziert, und basierend auf diesen Daten die allgemeinen strukturellen Voraussetzungen für HLA-DR17-Liganden abgeleitet.

Es zeigt sich eine symmetrische Anordnung und Belegung der konservierten Aminosäurereste in den relativen Positionen 1, 4, 6 und 9 (**Tab. 3.41**), geladene Aminosäuren liegen eingerahmt von hydrophoben Resten im Zentrum des Ligandenmotivs. Das Arrangement der Ankeraminosäuren stimmt somit in wesentlichen Teilaspekten (P1 und P4) mit einem anderen postulierten DR17-Ligandenmotiv überein [Geluk et al., 1993]. Jedoch widerspricht das hier aufgestellte HLA-DR17-Ligandenmotiv völlig drei weiteren postulierten DR17-Motiven [Sidney et al. 1992, Chicz et al., 1993; Kropshofer et al., 1993], die nicht einmal den dominanten, allelspezifischen Anker Asparaginsäure in relativer Position 4 identifizieren konnten (**Tab. 3.40, Tab. 3.41; Abb. 3.10, Abb. 3.12**). Wie mehrfach experimentell bestätigt werden konnte, basiert die allelspezifische Bindung von DR17-Liganden auf dem Asparaginsäurerest in Position 4.

Die Mehrzahl natürlicher DR1- und DR12-Liganden bindet nicht an DR17, wie umgekehrt auch natürliche DR17-Liganden nicht an DR1 binden (Daten nicht gezeigt). Substituiert man jedoch den Anker P4 von DR1/DR12-Liganden durch Asparaginsäure, so kann die Bindung an DR17 moduliert werden (**Abb. 3.12**). Diese allelspezifische Modulation erbringt den Hinweis auf konservierte Kontaktstellen innerhalb der Allele.

Ein gemeinsames Merkmal natürlicher HLA-DR-Liganden sind hydrophobe Ankeraminosäuren in Position 1 [Jardetzky et al., 1990; O'Sullivan et al., 1991; Sette et al., 1993; Hammer et al., 1993; Kropshofer et al., 1993; Falk et al., 1994], ebenso ist die Anordnung der Ankerpositionen in den Positionen P1, P4, P6, P7 und P9 ist innerhalb der HLA-DR-Motive, HLA-DR1, DR2, DR3, DR4 und DR5 kompatibel.

Peptidbindungsstudien an Verkürzungs- und Substitutionsvarianten verschiedener MHC-Klasse-II-Liganden zeigen, dass ein Ligand zur optimalen Interaktion mit der Peptidbindungsgrube eine minimale Länge von 13 Aminosäuren, aufweisen muss (**Abb. 3.9**). Diese sogenannte *Peptidbindungssequenz* von mindestens 13 Aminosäureresten ist sowohl für eine gute Bindungsaffinität [**Tab. 3.51**] als auch für eine stabile Assoziation des MHC/Peptidkomplexes (Nelson et al., 1993) von grundlegender Bedeutung.



**Abb. 4.1** Schematische Darstellung der MHC-Klasse-II-Peptid-Interaktion. Die sequenzabhängigen Kontaktstellen befinden sich auf einem Nonamer mit definierten Abständen in den relativen Positionen 1, 4, 6 und 9. Die Anker P1 und P9 sind mehr oder weniger degeneriert, wobei der Anker P1 ausschließlich mit hydrophoben/aromatischen Aminosäuren besetzt wird. Die Anker P4 und P6 bestimmen hingegen bevorzugt die Allelspezifität der Peptidbindung. Eine zweite Komponente für die MHC-Klasse-II-Peptid-Interaktion bilden die Wasserstoffbrückenbindungen entlang des Peptidrückgrats, die auch von flankierenden Aminosäuren unmittelbar N- und C-terminal zum nonameren Peptidkernsequenz geformt werden.

Die Peptidbindungssequenz kann weiter unterteilt werden in ein nonamerer Kernpeptid, das seitenkettenspezifisch mit den Bindungstaschen interagiert (**Abb. 3.8**), sowie in zwei die Kernsequenz flankierende Regionen mit einer Länge von je einer Aminosäure, die wiederum über Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Rezeptor interagieren und somit die Kompaktheit des Komplexes verstärken (**Abb. 4.1**) [Stern et al., 1993; Ghosh et al., 1995]. Durch gezielte Modifikation beider Peptidenden konnte in weiteren Peptidbindungsstudien der sequenzunabhängige Beitrag der flankierenden Aminosäuren bei der Peptid/MHC-Interaktion gezeigt werden (**Abb. 3.9**).

Das hier definierte HLA-DR17-Ligandenmotiv stimmt bis ins Detail mit den strukturellen Bedingungen überein, die durch den Polymorphismus der MHC-Bindungsgrube vorgegeben werden [Brown et al., 1993; Stern et al., 1994; Ghosh et al. 1995].

Neben diesen für HLA-DR-Interaktionen allgemein gültigen Bindungscharakteristika zeigen HLA-DR17-Liganden ein einzigartiges, allelspezifisches Ligandenmotiv. Die allelspezifische Bindung der DR17-Liganden beruht allein auf der Asparaginsäure in relativer Position 4. Diese Dominanz einer einzelnen Aminosäure ist unter den HLA-DR-Motiven einzigartig. Der Asparaginsäurerest in P4 hebt sich somit als der eigentliche, allelspezifische Anker der DR17-Liganden aus dem Gesamt-Arrangement der Anker in den relativen Positionen 1, 4, 6, und 9 hervor. Wie die Röntgenstrukturdaten des HLA-DR17-Kristalls zeigen, stehen den konservierten Taschen (Taschen 1, 3, 7 und 9) variable Taschen (Taschen 4 und 6) mit ausgeprägtem Polymorphismus gegenüber [Ghosh et al., 1995]. In den variablen Taschen kumulieren die polymorphen Aminosäuren, welche diese Spezifität vermitteln.

Die positiv geladenen DR $\beta$ -Aminosäurereste Lysin  $\beta_{71}$  und Arginin  $\beta_{74}$  in der P4 Bindungstasche interagieren mit dem negativ geladenen Anker Aspartat. Möglicherweise interagieren gerade umgekehrt positiv geladene Aminosäuren als Anker in Position 6 mit Aspartat  $\beta_{28}$  in der DR17-Bindungsgrube [Stern et al., 1994; Ghosh et al., 1995]. Neben diesen geladenen Kontaktstellen tragen natürliche DR17-Liganden hydrophobe Anker in den relativen Positionen 1 und 9, welche mit konservierten, nicht-polaren Bindungstaschen in Wechselwirkung treten können. Diese hydrophoben Anker haben DR17-Liganden mit DR1- und DR12-Liganden gemeinsam [Daten nicht gezeigt; Hammer et al., 1993], wobei besonders der hydrophobe Anker in Position 1 von universeller, allel-übergreifender Bedeutung für die Bindung zu sein scheint.

## **4.2 Die Supermotive der Klasse-II-assoziierten Peptide der Invarianten Kette (CLIPs)**

CLIPs sind definierte Abbauprodukte der Invarianten Kette (Ii), die bei der Reifung von MHC-Klasse-II-Molekülen entstehen. Sie werden häufig neben anderen natürlichen

Liganden auf verschiedenen Klasse-II-Molekülen gefunden und konkurrieren folglich mit anderen natürlichen Liganden um die Bindung an MHC-Moleküle.

Diese Konkurrenz kann durch zwei unterschiedliche Modelle beschrieben werden:

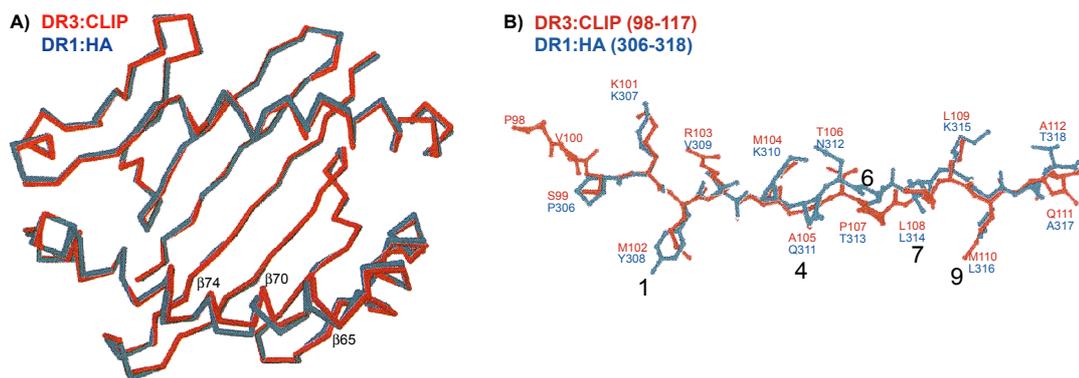
- (i) CLIPs binden in der MHC Bindungsgrube analog wie antigene Peptide und kompetieren somit abhängig von ihrer Affinität mit konventionellen Liganden.
- (ii) CLIPs binden an eine nicht polymorphe Region außerhalb der Peptidbindungsgrube von MHC-Klasse-II-Molekülen und üben dort einen allosterischen Effekt aus.

Das zweite Modell bietet die einfachste Erklärung für die promiskuitive Bindung von CLIPs an eine Vielzahl von Klasse-II-Molekülen, da CLIPs nicht dem Polymorphismus der Peptidbindungsgrube gehorchen müssen.

Zur Klärung dieser Frage wurde die Interaktion zwischen MHC-Klasse-II-Molekülen und CLIPs umfassend charakterisiert, und mit der Wechselwirkung konventioneller Liganden verglichen. Der Vergleich belegt eindeutig, dass CLIPs ein allelspezifisches Bindungsverhalten zeigen und folglich in der Peptidbindungsgrube binden. Die Interaktion lässt sich genau wie der natürlicher Liganden in einen sequenzabhängigen und in einen sequenzunabhängigen Beitrag unterteilen.

### **4.2.1 Ankerpositionen**

Die beiden Methionine M107 und Met115 in den relativen Positionen P1 und P9 wurden als Hauptanker der CLIPs für die Bindung an DR1 und DR17 identifiziert; Met107 übernimmt diese Rolle für die Bindung an DR4. Somit tragen CLIPs genau wie konventionelle HLA-DR-Liganden in P1 einen hydrophoben Anker. In P9 haben DR1 und DR17 – nicht aber DR4 – eine weitere Gemeinsamkeit: Diese Position wird von hydrophoben Aminosäuren besetzt. Somit konnte an drei unterschiedlichen HLA-DR-Allelen gezeigt werden, dass sowohl die Anordnung, als auch die physiko-chemischen Eigenschaften der Ankeramino-säuren den Voraussetzungen natürlicher Liganden entsprechen.



**Abb. 4.2** Vergleich der Röntgenstrukturdaten der HA 306-318 Bindung an HLA-DR1 und der CLIP-Bindung an HLA-DR3. **A)** Vergleich der Peptidbindungstaschen DR1/HA und DR3/CLIP **B)** Vergleich der Peptidstrukturen HA 306-318 und CLIP 87-101 [Ghosh et al., 1995].

#### 4.2.2 Sequenzunabhängige Interaktionen

Durch Bindungsstudien konnten sequenzunabhängige Interaktionen für verschiedene natürliche Liganden und für CLIPs demonstriert werden (Daten nicht gezeigt). Die beiden N- und C-terminalen Aminosäuren, die die nonamere Kernsequenz Ii(107-115) flankieren, erhöhen die Affinität der CLIPs an MHC-Moleküle um circa den Faktor 100, während eine weitere Verlängerung ohne Effekt bleibt. Diese Peptidbindungsstudien belegen eine eindeutige Analogie im Bindungsverhalten der CLIPs zu konventionellen Liganden. Die Spezifität der Bindung an unterschiedliche Allele korreliert bis ins Detail mit dem Polymorphismus der einzelnen Bindungstaschen. Die Röntgenstrukturdaten des CLIP/HLA-DR17-Komplexes illustrieren sehr eindrucksvoll, dass CLIPs in der MHC Peptidbindungsgrube binden [Ghosh et al., 1995]. Sowohl die Wechselwirkung der Methionin-Anker mit ihren komplementären Taschen, als auch die Wasserstoffbrückenbindungen des Peptidrückgrats konnten so dargestellt werden. Die Interaktion von CLIPs mit dem DR17-Rezeptor ist mit der Assoziation von antigenen Peptiden nahezu identisch (**Abb. 4.2**).

### 4.2.3 Bindungsepitop und Bindungsaffinität der CLIPs

Das Bindungsepitop der CLIPs konnte auf eine Sequenz von 13 Aminosäuren Ii(105-117) kartiert werden und weist eine vergleichbare Bindungskapazität wie die längeren CLIPs auf. Inhibitionsstudien zeigen eine annähernd identische Bindungskapazität von CLIPs und konventionellen DR1- und DR17-Liganden, aber eine ca. 20fach schlechtere Bindung an DR4. Auch andere Arbeitsgruppen konnten eine vom Allel abhängige Stabilität der CLIP/HLA-Komplexe zeigen [Avva et al., 1994; Sette et al., 1995], was eine Regulierung der Bindung von CLIPs in allelspezifischer Weise nahelegt.

### 4.2.4 Supermotive der CLIPs für die Interaktion mit MHC-Klasse-II-Molekülen

Die CLIP Sequenz – hierin besonders das Bindungsepitop Ii(107-115) – ist bei Mensch, Maus und Ratte konserviert und so optimiert, dass es die Bindungsmotive aller Allele einschließt. So können CLIPs selbst an DR17-Moleküle binden, obwohl diese ein einzigartiges und sehr spezifisches Bindungsmotiv besitzen. Diese Interaktion erfolgt durch Met107 und Met115 mit hydrophoben Bindungstaschen. Allelspezifische Anker, wie etwa Aspartat in P4, positiv geladene Aminosäuren in P6 oder auch aromatische Aminosäuren in P1, fehlen den CLIPs (**Tab. 4.1**) [Hammer et al., 1993; Newcomb et al., 1993]. Vielmehr sind gerade die Positionen P4 und P6, die mit polymorphen Bindungstaschen wechselwirken, mit den beiden kleinen und chemisch neutralen Aminosäuren Alanin und Prolin besetzt. Ersetzt man diese Aminosäuren durch allelspezifische Anker, wird die Bindungsaffinität dieser CLIP-Substitutionsvarianten an das korrespondierende Allel dramatisch erhöht und gleichzeitig an das andere Allel erniedrigt (**Abb. 3.18**).

So zeigt sich die CLIP-Sequenz als ein im Laufe der Evolution erarbeiteter Kompromiss mit dem Ziel, die Bindung an möglichst viele Klasse-II-Allele zu gewährleisten. Diese Bindung durfte jedoch keine stabile Assoziation sein, wie sie künstlich durch allelspezifische Anker induziert werden kann. Vielmehr repräsentieren CLIP/MHC-Komplexe ein Intermediat, das im Verlaufe der MHC-Reifung dissoziiert, um antigene Peptide oder Selbstpeptide präsentieren zu können (Riberdy et al., 1992; Sette et al.,



1992). So beinhaltet die CLIP-Sequenz Supermotive, welche sowohl die Assoziation mit, als auch die Dissoziation von verschiedensten Klasse-II-Allele gewährleistet. Damit wird der Reifeprozess der MHC-Klasse-II-Moleküle von der de novo-Synthese bis zur definierten Beladung gesteuert.

### 4.3 „Molecular Modelling“

Mit den Mitteln des „Molecular Modelling“ konnte die mögliche Bindung der CLIPs in der Peptidbindungsgrube analog der Bindung endogener Peptide illustriert werden. Sowohl die Wechselwirkung der Methionin-Anker mit ihren komplementären Taschen, als auch die Wasserstoffbrückenbindungen des Peptidrückgrats konnten so dargestellt werden.

Die kurz nach Ende der experimentellen Arbeiten veröffentlichten Röntgenstrukturdaten des CLIP/HLA-DR3-Komplexes [Ghosh et al., 1995] zeigen CLIP in gestreckter Konformation, analog zur Bindung von HA 306-318 an HLA-DR1 [Stern et al., 1994], in der Peptidbindungsgrube des HLA-DR3-Moleküls gebunden (*Abb. 4.2*). Die Interaktion von CLIPs mit dem DR17-Rezeptor ist also mit der Assoziation von antigenen Peptiden nahezu identisch.

### 4.4 Die HLA-DR4-Ligandenmotive

Die Poolsequenzierung der vier untersuchten HLA-DR4 Subtypen ergab bei allen ein einfaches Ligandenmotiv, anhand dessen die gefundenen Einzelliganden sinnvoll gruppiert werden können. Zur Verfeinerung der DR4-Motive wurden die Erkenntnisse aus der Röntgenstrukturanalyse aus der Kokristallisation von HLA-DR1 mit endogenen Peptiden bzw. mit einem Influenza-Peptid miteinbezogen. Dies ergab eine Wechselwirkung des Influenza-Peptids über 5 Taschen mit dem MHC-Klasse-II-Molekül. Die große Homologie zwischen DR1 und DR4 legt nahe, dass beide sehr ähnliche räumliche Struktur und damit ebenso 5 Taschen besitzen, deren Spezifität durch die sie bindenden Aminosäuren bestimmt wird.

#### 4.4.1 Belegung der P1-Tasche

Die erste konservierte Position lässt sich in den Edman-Zyklen 3 bis 5 festmachen, wobei die Aminosäuren zwischen DR1, DR4Dw4 und DR4Dw15 identisch sind (**Tab. 4.2**). Damit zeigt P1 bei den gebundenen Peptiden eine eindeutige Vorliebe für hydrophobe, besonders aromatische Aminosäuren (Phe, Tyr, Trp, Ile, Leu, Val und Met). DR4Dw10 und DR4Dw14 tragen jedoch an Position 86 der DR $\beta$ -Kette Val anstelle von Gly, was zu einer Reduktion des P1-Taschenvolumens führt. Folglich fehlen hier die großen aromatischen Aminosäuren und es können lediglich aliphatische Aminosäuren nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse decken sich mit den Bindungsstudien anderer Arbeitsgruppen [Hammer et al., 1993; Hammer et al., 1994; Sette et al., 1993; Hill et al., 1994; Matsushita et al., 1995].

#### 4.4.2 Belegung der P4-Tasche

Die P4-Spezifität von HLA-DR1 zeigt sich als deutlich degenerierter als jene von P1, da neben aliphatischen auch polare Aminosäuren wie Asn und Gln aufgenommen werden können. Die Spezifität der P4- und der P7-Bindungstaschen wird vor allem durch die DR $\beta$ -Aminosäurereste  $\beta_{70}$ ,  $\beta_{71}$  und  $\beta_{74}$  beeinflusst, die bei den untersuchten DR4-Molekülen polymorph sind. Im Vergleich zur DR1- besitzt die DR4Dw4-Tasche eine positive Ladung mehr ( $\beta_{13}\text{Phe}\rightarrow\text{His}$ ).

Die gefundenen Aminosäurecluster bei DR4Dw4 zeigen eine Bevorzugung negativ geladener Aminosäuren, wohingegen DR4Dw10 positiv geladene Reste favorisiert. HLA-DR4Dw14 und DR4Dw15 haben mit Ausnahme einer konservierten Substitution ( $\beta_{71}\text{Lys}\rightarrow\text{Arg}$ ) die gleiche Struktur der P4-Bindungstasche wie DR4Dw4. Folglich ist das Muster der gefundenen Aminosäuren dem von DR4Dw4 sehr ähnlich (gestört bei DR4Dw15 durch kontaminierende Einzelsequenzen von Peptiden aus PGSG und dem Transferrin Rezeptor). Auch die sinnvolle Gruppierung der identifizierten Einzel-liganden spiegelt die unterschiedlichen Ladungen in der P4-Bindungsgrube klar wider, d.h. für DR4Dw4, DR4Dw14 und DR4Dw15 findet man eine Präferenz negativ geladener Aminosäuren. Hingegen bevorzugt DR4Dw10 – neben der DR4-Allel-unabhängigen Bevorzugung hydrophober Aminosäuren – eindeutig positiv geladene Aminosäure-

reste. Die hier gezeigten Spezifitäten der P4-Tasche von verschiedenen DR4-Subtypen werden durch Peptidbindungstudien, die von verschiedenen anderen Arbeitsgruppen durchgeführt wurden [Sette et al., 1993; Hammer et al., 1994; Hammer et al., 1995; Matsushita et al., 1995] bestätigt.

#### **4.4.3 Belegung der P6-Tasche**

Eine Präferenz für kleine Aminosäuren zeigt die P6-Tasche von HLA-DR1 [Falk et al., 1993; Hammer et al., 1992; Sinigaglia und Hammer, 1994; Stern et al., 1994]. Die vier untersuchten DR4-Moleküle unterscheiden sich in den beiden DR $\beta$ -Aminosäuren ( $\beta_{11}$ Val und  $\beta_{13}$ His) der entsprechenden Reste in DR1. Bevorzugt werden polare, seltener geladene Aminosäuren gebunden, was so bei DR4Dw4 bislang nicht gezeigt werden konnte [Sette et al., 1993; Hammer et al., 1994]. Allerdings zeigten diese Bindungsstudien die negative Auswirkung geladener Aminosäuren auf die Bindung. Ursächlich könnte hierfür die Substitution nur eines synthetischen Peptids sein, da dessen intramolekulare Effekte, die Einfluss auf die Bindung des DR4-Moleküls ausüben, nicht ausgeschlossen werden können.

#### **4.4.4 Belegung der P7-Tasche**

Weder durch Poolsequenzierung, noch durch Bindungsstudien konnte eine Spezifität der P7-Tasche von HLA-DR1 nachgewiesen werden [Falk et al., 1993; Sinigaglia und Hammer, 1994; Hammer et al., 1992; Stern et al., 1994]. Dies gilt ebenso für P7 von DR4Dw4, DR4Dw14 und DR4Dw15. Jedoch DR4Dw10, das anders als DR1 und die anderen DR4-Moleküle eine negative Ladung (Glu) an DR $\beta_{71}$  trägt, bevorzugt positiv geladene und polare Aminosäuren, schließt aber negativ geladene Aminosäuren aus. Mehr als die Hälfte aller auf HLA-DR4Dw10 gefundenen Liganden tragen an P7 eine positive Ladung, keiner jedoch eine negative.

**Tab. 4.2** Gegenüberstellung der vier beschriebenen HLA-DR4 Subtypen, DR4Dw4, DR4Dw10, DR4Dw14 und DR4Dw15.

HLA-DR4 Subtypen	Relative Position								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>HLA-DR4Dw4</b>	F, Y, W I, L V, M			F, W, I L, V, A D, E no R, K		N, S T, Q H, R	polar, charged, aliphatic		polar, aliphatic K
<b>HLA-DR4Dw10</b>	V, I L, M			Y, F, W I, L, M R, N no D, E		N, Q S, T K	R, K H, N Q, P		polar, aliphatic H
<b>HLA-DR4Dw14</b>	V, I L, M			Y, F, W I, L V, M, A D, E no R, K		N, T S, Q R	polar charged aliphatic		polar aliphatic K
<b>HLA-DR4Dw15</b>	F, Y, W V, I L, M			V, I, L M, D, E		N, S T, Q K, D	polar charged aliphatic		D, E, Q

#### 4.4.5 Belegung der P9-Tasche

Die P9-Bindungstasche von HLA-DR1 bevorzugt neben aliphatischen auch polare Reste [Stern et al., 1994; Hammer et al., 1992; Falk et al., 1993]. Die vier untersuchten DR4-Moleküle unterscheiden sich von DR1 durch eine Substitution ( $\text{DR}\beta_9\text{Trp}\rightarrow\text{Glu}$ ). Dieser Aminosäureaustausch führt zu einem sauren Charakter dieser Tasche, die aber trotzdem auch aliphatische Reste aufnehmen kann.

Anders zeigt sich die Situation bei DR4Dw15: Gegenüber den anderen untersuchten DR4-Molekülen besitzt es nicht Asp, sondern Ser an  $\text{DR}\beta_{57}$ , was bei den DR-Molekülen eine Ausnahme darstellt. Die P9-Tasche von DR4Dw15 besitzt dadurch eine negative

Ladung weniger als jene der anderen DR4-Moleküle. In den Zyklen 12 und 13 der Poolsequenzierung werden signifikante Anstiege von Asp und Glu sichtbar. Ebenso besitzen fast alle DR4Dw15-Liganden an P9 eine negativ geladene Aminosäure und nur in einem Fall ein Gln.

Die Präferenz für negativ geladene Aminosäuren an P9 von DR4Dw15 dokumentiert auch eine andere Arbeitsgruppe, die jedoch nicht mit der Poolsequenzierung, sondern durch Gruppierung identifizierter Einzelliganden unter der Annahme eines aromatischen Ankers an P1 arbeitete [Kinouchi et al., 1994].

## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation werden vier zwischen Januar 1992 und Dezember 1995 durchgeführte Forschungsprojekte detailliert mit Ergebnissen beschrieben:

1. Die Bestimmung verschiedener MHC-Klasse-I-Ligandenmotive.
2. Analogien zwischen dem eindeutig definierbaren Ligandenmotiv bei MHC-Klasse-I-assozierten Peptiden und MHC-Klasse-II-assozierten Peptiden anhand allelspezifischer Ligandenmotive von HLA-DR17 und vier HLA-DR4 Subtypen zu finden.
3. Die Aufklärung struktureller Voraussetzungen für die Bindung natürlicher Liganden an HLA-DR17-Moleküle.
4. Das Lokalisieren der Bindungsstelle von CLIPs in möglicher Analogie zu antigenen Peptiden in der MHC-Bindungsgrube oder aber in einer nicht polymorphen Region außerhalb der Peptidbindungsgrube.

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wird die Aufklärung von 18 verschiedenen MHC-Klasse-I-Bindungsmotive durch multiple Sequenzanalyse von MHC-extrahierten Peptidpools beschrieben.

Im Rahmen der zweiten Aufgabenstellung konnte die multiple Sequenzanalyse erfolgreich von MHC-Klasse-I- auf MHC-Klasse-II-Ligandenmotive ausgedehnt werden. Aufgrund der höheren Komplexität MHC-Klasse-II-eluierter Peptide im Vergleich zu Klasse-I-Eluaten treten geringere Veränderungen der Aminosäuremuster über die einzelnen Abbauschritte hinweg auf als bei Klasse-I-Pools, weshalb die Definitionen der multiplen Sequenzanalyse modifiziert und neue Signalgrenzwerte erstellt werden mussten. Um Fehlinterpretationen bei der Beurteilung von MHC-Klasse-II-Daten zu vermeiden, wurden die Ergebnisse durch die Analyse von Selbstpeptiden und deren sinnvolle Gruppierung bestätigt. Durch eine Röntgenstrukturanalyse können aufgestellte Motive weiter verfeinert werden.

Somit konnten die Bindungsmotive von HLA-D17 und vier HLA-DR4-Subtypen durch die Kombination der Ergebnisse multipler Sequenzanalyse MHC-extrahierter Peptid-

pools und der sinnvollen Gruppierung 70 erfolgreich bestimmter Peptidsequenzen identifiziert werden.

Für die dritte Fragestellung wurde ein nicht-radioaktiver Peptidbindungsassay zur genauen Beschreibung der Wechselwirkungsparameter zwischen Rezeptor und Ligand etabliert.

Die Peptidbindungsstudien zeigen, dass ein Ligand zur optimalen Interaktion mit der Peptidbindungsgrube eine minimale Länge von 13 Aminosäuren aufweisen muss. Diese sogenannte Peptidbindungssequenz lässt sich weiter unterteilen: In ein nonameres Kernpeptid und zwei die Kernsequenz flankierende Regionen. Die sequenzabhängigen Kontaktstellen befinden sich auf einem Nonamer mit definierten Abständen in den relativen Positionen 1, 4, 6 und 9. Die Anker P1 und P9 sind verschieden stark degeneriert, wobei der Anker P1 ausschließlich mit hydrophoben/aromatischen Aminosäuren besetzt wird. Die Anker P4 und P6 bestimmen bevorzugt die Allelspezifität der Peptidbindung. Eine weitere Komponente für die MHC-Klasse-II-Peptid-Interaktion bilden die Wasserstoffbrückenbindungen entlang des Peptidrückgrats, die von flankierenden Aminosäuren unmittelbar N- und C-terminal zur nonameren Peptidkernsequenz geformt werden.

Zur Klärung der vierten Frage wurde die Interaktion zwischen MHC-Klasse-II-Molekülen und CLIPs umfassend charakterisiert und mit der Wechselwirkung konventioneller Liganden verglichen. Die Interaktion der CLIPs lässt sich identisch zu der natürlicher Liganden in einen sequenzabhängigen und einen sequenzunabhängigen Beitrag unterteilen. Das Ergebnis erlaubt das eindeutige Lokalisieren der Bindungsstelle von CLIPs in der Peptidbindungsgrube analog zu antigenen Peptiden.

## 6 Literatur

Allgaier, H. (1985) *Dissertation. Eberhard-Karls-Universität Tübingen.*

Avva, R., und Cresswell, P. (1994) In vitro and in vivo formation and dissociation of HLA-DR complexes with invariant chain-derived peptides. *Immunity 1*, 763-774.

Barlos, K., Chatzi, O., Gatos, D., Stavropoulos, G. (1991) 2-Chlorotrityl chloride resin. Studies on anchoring of Fmoc-amino acids and peptide cleavage, *Int. J. Peptide Protein Res.* 37, 513-520.

Beck, W. (1993) *Dissertation. Eberhard-Karls-Universität Tübingen.*

Benacerraf, B., und McDevitt, H.O. (1972) Histocompatibility-linked immune response genes, *Science 175*, 273-279.

Benacerraf, B., Michalek, M.T., Dang, L.H. und Rock, K.L. (1990) The importance of antigen processing in determinant selection and of the cell membrane as a reservoir of processed antigen, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 54, 293-299.

Benham A., Tulp, A., und Neefjes (1995) Synthesis and assembly of MHC-peptide complexes, *Immunology Today 16*, 359-362.

Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L. und Wiley, D.C. (1987) Structure of the human class I histocompatibility antigen HLA-A2, *Nature 329*, 506-512.

Brooks, J.M., Murray, R.J, Thomas, W.A., Kurilla, M.G., Rickinson, A.B. (1993) Different HLA-B27 subtypes present the same immunodominant Epstein-Barr virus peptide, *J. Exp. Med.* 178, 879-887.

Brown, J.H., Jardetzky, T.S., Gorga, J.C., Stern, L.J., Urban, R.G., Strominger, J.L. und Wiley, D.C. (1993) Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1, *Nature* 364, 33-39.

Burrows, S.R, Gardner, J., Khanna, R., Steward, T., Moss, D.J., Rodda, S., Suhrbier, A. (1994) Five new cytotoxic T cell epitopes identified within Epstein-Barr virus nuclear antigen 3. *J. Gen. Virol.* 75, 2489-2493.

Buseyne, F., McChesney, M., Porrot, F., Kovarik, S., Guy, B., Riviere, Y. (1993) Gag-specific cytotoxic T lymphocytes from human immunodeficiency virus type 1-infected individuals: Gag epitopes are clustered in three regions of the p24gag protein, *J. Virol.* 67, 694-702.

Celis, E., Fikes, J., Wentworth, P., Sidney, J., Southwood, S., Maewal, A., Del, Guercio, M.F., Sette, A., Livingston, B. (1994) Identification of potential CTL epitopes of tumor-associated antigen MAGE-1 for five common HLA-A alleles. *Mol. Immunol.* 18, 1423-1430.

Cerrone, M.C., Ma J.J., Stephens R.S. (1991) Cloning and sequence of the gene for heat shock protein 60 from *Chlamydia trachomatis* and immunological reactivity of the protein. *Infect. Immun.* 1, 79-90.

Chicz, R.M., Urban, R.G., Lane, W.S., Gorga, J.C., Stern, L.J., Vignali, D.A.A. und Strominger, J.L. (1992) Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogenous in size. *Nature* 358, 764-768

Chicz, R.M., Urban, R.G., Gorga, J.C., Vignali, D.A.A., Lane, W.S. und Strominger, J.L. (1993) Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J. Exp. Med.*, 178, 27-47.

Couillin, I., Connan, F., Culmann-Penciolelli, B., Gomard, E., Guillet, J.G., Choppin, J. (1995) HLA-dependent variations in human immunodeficiency virus Nef protein alter peptide/HLA binding. *Eur. J. Immunol.* 3, 728-732.

Cresswell, P., Avva, R.R., Davis, J.E., Lamb, C.A., Riberdy, J.M., und Roche, P.A. (1990) Intracellular Transport and peptide binding properties of HLA class II glycoproteins. *Semin. Immunol.* 2, 273-280.

Cresswell, P. (1996) Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* 84, 505-507.

Culmann, B., Gomard, E., Kieny, M.P., Guy, B., Dreyfus, F., Saimot, A.G., Sereni, D., Sicard, D., Levy, J.P. (1991) Six epitopes reacting with human cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells in the central region of the HIV-1 NEF protein. *J. Immunol.* 146, 1560-1565.

Dai, U. C., West, K., Littau, R., Takahashi, K., und Ennis, F. A. (1992) Mutation of human immunodeficiency virus type 1 at amino acid 585 on gp41 results in loss of killing by CD8<sup>+</sup> A24-restricted cytotoxic T lymphocytes, *J. Virol.* 66, 3151-3154.

Denzin, L. K., und Cresswell, P. (1995). HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II  $\alpha\beta$  dimers and facilitates peptide loading, *Cell* 82, 155-165.

Di Brino, M., Parker, K. C., Shiloach, J., Knierman, M., Lukszo, J., Turner, R. V., Biddison, W. E., und Coligan, J. E. (1993 a) Endogenous peptides bound to HLA-A3 possess a specific combination of anchor residues that permit identification of potential antigenic peptides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1508–1512.

Di Brino, M., Tsuchida, T., Turner, R. V., Parker, K. C., Coligan, J. E., und Biddison, W. E. (1993 b) HLA-A1 and HLA-A3 T-cell epitopes derived from Influenza virus proteins predicted from peptide binding motifs, *J. Immunol.* 151, 5930-5935.

DiBrino, M., Parker, K.C., Margulies, D.H, Shiloach, J., Turner, R.V., Biddison, W.E., Coligan, J.E. (1994) The HLA-B14 peptide binding site can accommodate peptides with different combinations of anchor residues. *J. Biol. Chem.* 269, 32426-32434.

Di Brino, M., Parker, K. C., Shiloach, J., Turner, R. V., Tsuchida, T., Garfield, M., Biddison, W. E., und Coligan, J. E. (1994) Endogenous peptides with distinct amino acid anchor residue motifs bind to HLA-A1 and HLA-B8, *J. Immunol.* 152, 620-631.

Dick, T.P., Ruppert, T., Groettrup, M., Kloetzel, P.M., Kuehn, L., Koszinowski, U.H., Stevanovic, S., Schild, H., und Rammensee, H.G. (1996), *Cell* 86,253-262.

Domenech, N., Henderson, R.A., Finn, O.J. (1995) Identification of an HLA-A11-restricted epitope from the tandem repeat domain of the epithelial tumor antigen mucin. *J. Immunol.* 155, 4766-4774.

Engelhard, V.E. (1994) Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules, *Ann. Rev. Immunol.* 12, 181-207.

Falk, K., Rötzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G. und Rammensee, H.G. (1991) Allele-specific motifs revealed by sequencing of self peptides eluted from MHC molecules, *Nature* 351, 290-296.

Falk K, Rötzschke O, Takiguchi M, Grahovac B, Gnau V, Stevanovic S, Jung G, Rammensee HG. (1994) Peptide motifs of HLA-A1, -A11, -A31, and -A33 molecules, *Immunogenetics* 40, 238-241.

Falk K, Rötzschke O, Takiguchi M, Gnau V, Stevanovic S, Jung G, Rammensee HG. (1995) Peptide motifs of HLA-B58, B60, B61, and B62 molecules. *Immunogenetics* 41, 165-168.

Falk K, Rötzschke O, Takiguchi M, Gnau V, Stevanovic S, Jung G, Rammensee HG. (1995) Peptide motifs of HLA-B38 and B39 molecules. *Immunogenetics* 41, 162-164.

Falk K, Rötzschke O, Takiguchi M, Gnau V, Stevanovic S, Jung G, Rammensee HG. (1995) Peptide motifs of HLA-B51, -B52 and -B78 molecules, and implications for Behcet's disease. *Int. Immunol.* 2, 223-228.

Fields, G.B., Noble, R.L. (1990) *Int. J. Peptide Protein Res.* 35, 161-214.

Fredenhagen, F., Fendrich, G., Märki, F., Gruner, W., Raschdorf, F. und Peter, H. H. (1990) *J. Antibiot.* 43, 1403-1412.

Fling, S.P., Arp, B., und Pious, D. (1994) HLA-DMA and -DMB genes are both required for MHC class II/peptide complex formation in antigen-presenting cells, *Nature* 368, 554-558.

Friede, T., Gnau, V., Jung, G., Keilholz, W., Stevanovic, S. und Rammensee, H.G. (1996) Natural ligand motifs of closely related HLA-DR4 molecules and implications for differential disease association, *Biochem. Biophys. Acta* 1316, 85-101.

Gaugler, B., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P., Romero, P., Gaforio, J.J., De Plaen, E., Lethe, B., Brasseur, F., Boon, T. (1994) Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 179, 921-930.

Gavioli, R., Kurilla, M. G., De Campos-Lima, P. O., Wallace, L. E., Dolcetti, R., Murray, R. J., Rickinson, A. B., und Masucci, M. G. (1993) Multiple HLA A11-restricted cytotoxic T-lymphocyte epitopes of different immunogenicities in the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen, 4. *J. Virol.* 67, 1572-1578.

Geluk, A., Van Meijgaarden, K.E., Janson, A.A, Drijfhout, J.W., Melen, R.H., De Vries, R.R., Ottenhoff, T.H.M. (1992) Functional analysis of DR17(DR3)-restricted mycobacterial T cell epitopes reveals DR17-binding motif and enables the design of allele-specific competitor peptides. *J. Immunol.* 149, 2864-2871.

Geluk, A., van Meijgaarden, K.E., Southwood, S., Oseroff, C., Drijfhout, J.W., de Vries, R.R., Ottenhoff, T.H., Sette, A. (1994) HLA-DR3 molecules can bind peptides carrying two alternative specific submotifs. *J. Immunol.* 152, 5742-5748.

Geluk, A., van Meijgaarden, K.E., de Vries, R.R., Ottenhoff, T.H. (1997) A DR17-restricted T cell epitope from a secreted Mycobacterium tuberculosis antigen only binds to DR17 molecules at neutral pH. *Eur. J. Immunol.* 27, 842-847.

Germain, R.N. (1994) MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation, *Cell* 76, 287-299.

Ghosh, P., Amaya, M., Mellins, E., and Wiley, D. C. (1995). The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to DR3. *Nature* 378, 457-462

Goldberg, A.L., and Rock, K.L. (1992) Proteolysis, proteosomes and antigen presentation, *Nature* 357, 375-379.

Guo, H.C., Jardetzky, T.S., Garret, T.R.J., Lane, W.S., Strominger, J.L., and Wiley, D.C. (1992) Different length peptides bind to HLA-Aw68 similarly at their ends but bulge out in the middle. *Nature* 360, 364-366.

Hadida, F., Haas, G., Zimmermann, N., Hosmalin, A., Spohn, R., Samri, A., Jung, G., Debre, P., Autran, B. (1995) CTLs from lymphoid organs recognize an optimal HLA-A2-restricted and HLA-B52-restricted nonapeptide and several epitopes in the C-terminal region of HIV-1 Nef. *J. Immunol.* 154, 4174-4186.

Hammer, J., P. Valsasnini, K. Tolba, D. Bolin, J. Higelin, B. Takaes, und F. Sinigaglia. (1993) Promiscuous and Allele-Specific Anchors in HLA-DR-Binding Peptides. *Cell* 74, 197.

Hammer, J., P. Bono, E., Gallazzi, F., Belunis, C., Nagy, Z., und Sinigaglia, F. (1994) Precise prediction of major histocompatibility complex class II-peptide interaction based on peptide side chain scanning. *J. Exp. Med.* 180, 2353-2358.

Hammer, J., P., Gallazzi, F., Bono, E., Karr, R.W., Guenot, J., Valsaanini, P., Nagy, Z.A., und Sinigaglia, F. (1995) Peptide binding specificity of HLA-DR4 molecules: correlation with rheumatoid arthritis association. *J. Exp. Med.* 181, 1847-1855.

Hawes, G.E., Struyk, L., Godthelp, B.C., van den Elsen, P.J. (1995) Limited restriction in the TCR-alpha beta V region usage of antigen-specific clones. Recognition of myelin basic protein (amino acids 84-102) and Mycobacterium bovis 65-kDa heat shock protein (amino acids 3-13) by T cell clones established from peripheral blood mononuclear cells of monozygotic twins and HLA-identical individuals. *J. Immunol.* 154, 555-566.

Hill, C.M., Liu, A., Marshall, K.W., Mayer, J., Jorgensen, B., Yuan, B., Cubbon, R.M., Nicholas, E.A., Wicker, L.S., und Rothbard, J.B. (1994) Exploration of requirements for peptide binding to HLA DRB1\*0101 and DRB1\*0401. *J. Immunol.* 152, 2890-2898.

Hill, A.B., Lee, S.P., Haurum, J.S., Murray, N., Yao, Q.Y., Rowe, M., Signoret, N., Rickinson AB, McMichael AJ. (1995) Class I major histocompatibility complex-restricted cytotoxic T lymphocytes specific for Epstein-Barr virus (EBV)-transformed B lymphoblastoid cell lines against which they were raised. *J. Exp. Med.* 181, 2221-2228.

Houghten, R.A. (1993) Peptide libraries: criteria and trends, *Trends Genet.* 9, 235-239.

Huet, S., Nixon, D.F., Rothbard, J.B., Townsend, A., Ellis, S.A., McMichael, A.J. (1990) Structural homologies between two HLA B27-restricted peptides suggest residues important for interaction with HLA B27. *Int. Immunol.* 2, 311-316.

Hunt, D. F., Michel, H., Dickinsen, T. A., Shabanowitz, J., Cox, A. L., Sakaguchi, K., Appella, E., Grey, H. M., Sette, A. (1992) Peptides presented to the immune system by the murine class II Major Histocompatibility Complex molecule 1-A<sup>d</sup>. *Science* 256, 1817-1820.

Jardetzky, T.S., Gorga, J.C., Bush, R., Rothbard, Strominger, J.L., und Wiley, D.C. (1990) Peptid binding to HLA-DR1: A peptide with most residues substituted to alanine retains MHC binding. *EMBO J.* 9, 1797-1803.

Jardetzky T.S., Lane W.S., Robinson R.A., Madden D.R., Wiley D.C. (1991) Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature* 353, 326-329.

Jardetzky, T.S., Brown, J.H., Gorga, J.C., Stern, L.J., Urban, R.G., Strominger, J.L., und Wiley, D.C. (1996) Crystallographic analysis of endogenous peptides associated with HLA-DR1: suggests a common, polyproline II-like conformation for bound peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 734-738.

Johnson, R.P., Hammond, S.A., Trocha, A., Siliciano, R.F., Walker, B.D. (1994) Induction of a major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T-lymphocyte response to a highly conserved region of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) gp120 in seronegative humans immunized with a candidate HIV-1 vaccine. *J. Virol.* 68, 3145-3153.

Jung, G., und Beck-Sickinger, A.G. (1992) Methoden der multiplen Peptidsynthese und ihre Anwendungen. *Angew. Chem.* 104, 375-391.

Kang, X., Kawakami, Y., el-Gamil, M., Wang, R., Sakaguchi, K., Yannelli, J.R., Appella, E., Rosenberg, S.A., Robbins, P.F. (1995) Identification of a tyrosinase epitope recognized by HLA-A24-restricted, tumor-infiltrating lymphocytes. *J. Immunol.* 155, 1343-1348.

Kato, N., Kikuchi, A., Kano, K., Egawa, K., und Takiguchi, M. (1993) Molecular analysis of a novel HLA-A33 subtype associated with HLA-B44. *Tissue Antigens* 41, 211-213.

Kellner, R., Jung, G., Hörner, T., Zähner, H., Schnell, N., Entian und Götz, F. (1988) Gallidermin: A new lanthionine-containing polypeptide antibiotic. *Eur. J. Biochem.* 177, 53-59.

King, D., Fields, C.G., Fields, G.B. (1990) *Int. J. Peptide. Protein. Res.* 35, 255-266.

Koenig, S., Fuerst, T. R., Wood, L. V., Woods, R. M., Suzich, J. A., Jones, G. M., de la Cruz, V. F., Davey, R. T. J., Venkatesan, S., Moss, B., Biddison, W. E., und Fauci, A. S. (1990) Mapping the fine specificity of a cytolytic T cell response to HIV-1 nef protein. *J. Immunol.* 145, 127-135.

Kinouchi, R., Kobayasi, H., Sato, K., Kimura, S., und Katagiri, M. (1994) Peptide motifs of HLA-DR4/DR53 (DRB1\*0405/DRB4\*0101) molecules. *Immunogenetics* 40, 376-378.

Koziel, M.J., Dudley, D., Afdhal, N., Grakoui, A., Rice, C.M., Choo, Q.L., Houghton, M., Walker, B.D. (1995) HLA class I-restricted cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus. Identification of multiple epitopes and characterization of patterns of cytokine release. *J. Clin. Invest.* 96, 2311-2321.

Kropshofer, H., Max, H., Halder, T., Kalbus, M., Müller, C.A., und Kalbacher, H., 1993 Self-peptides from four HLA-DR alleles share hydrophobic anchor residues near the NH<sub>2</sub>-terminal including proline as a stop signal for trimming. *J. Immunol.* 151, 4732-4742.

Kubo, R.T., Sette, A., Grey, H.M., Appella, E., Sakaguchi, K., Zhu, N.Z., Arnott, D., Sherman, N., Shabanowitz, J., Michel, H. (1994) Definition of specific peptide motifs for four major HLA-A alleles. *J. Immunol.* 152, 3913-3924.

Kupke, T., Kempfer, C. Gnau, V. Jung, G. und Götz, F. (1994) Mass spectroscopic analysis of a novel enzymatic reaction, *J. Biol. Chem.* 269, 5653-5659.

Lipman, F. Gevers, W., Kleinkauf, H., Roskowski, R. (1971), *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 35 64.

Löwe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickel, P., Baumeister, W., und Huber, R. (1995), *Science* 268, 533-539.

Madden, D.R., Gorga. J.C., Strominger, J.L., und Wiley, D.C. (1992) The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC, *Cell* 70, 1035-1048.

Maier, R., Falk, K., Rötzschke, O., Maier, B., Gnau V., Stevanovic, S., Jung, G., Rammensee, H.G., Meyerhans, A. (1994) Peptide motifs of HLA-A3, -A24, and -B7 molecules as determined by pool sequencing. *Immunogenetics* 40, 306-308.

Malcherek, G, Falk, K., Rötzschke, O., Rammensee, H.G., Stevanovic, S., Gnau, V., Jung, G., Melms, A. (1993) Natural peptide ligand motifs of two HLA molecules associated with myasthenia gravis. *Int. Immunol.* 10, 1229-1237.

Malcherek, G., Gnau, V., Stevanovic, S., Rammensee, H.G., Jung, G., Melms, A. (1994) Analysis of allele-specific contact sites of natural HLA-DR17 ligands. *J. Immunol.* 153, 1141-1149.

Malcherek, G., Gnau, V., Jung, G., Rammensee, H.G., Melms, A. (1995) Supermotifs enable natural invariant chain-derived peptides to interact with many major histocompatibility complex-class II molecules. *J. Exp. Med.* 181, 527-536.

Matsushita, S., Takahashi, K., Motoki, M., Komoriya, K., Ikagawa, S., und Nishimura, Y. (1994) Allele specificity of structural requirement for peptides bound to HLA-DRB1\*0405 and DRB1\*0406 complexes: Implication for the HLA-associated susceptibility to methimazole-induced insulin autoimmune syndrome. *J. Exp. Med.* 180, 873-883.

Meyer, H. E., Heber, M., Eisermann, B., Korte, H., Metzger, J. W. und Jung, G. (1994) Sequence analysis of lantibiotics: Chemical derivization procedures allow a fast access to complete Edman degradation, *Anal. Biochem.*, 223, 185-190.

Missale, G., Redeker, A., Person, J., Fowler, P., Guilhot, S., Schlicht, U. J., Ferrari, C., und Chisari, E V. (1993) HLA-A31- and HLA-Aw68- restricted cytotoxic T cell responses to a single hepatitis B virus nucleocapsid epitope during acute viral hepatitis, *J. Exp. Med.* 177, 751-762.

Momburg, F., Orlicz-Navarrete, V., Neefjes, J., Goulmy, E., van de Wal, Y., Spits, H., Powis, S.J., Butcher, G.W., Howaro, J.C., Walden, P., und Hämmerling, G.J (1992) Proteasome subunits encoded in the major histocompatibility complex are not essential for antigen presentation, *Nature* 360. 174-177.

Monaco, J.J., (1992) Genes in the MHC that may, affect antigen processing, *Curr. Opin. Immunol.* 4, 70-73.

Morris, P., Shaman, J., Attaya, M., Amaye, M., Goodman, S., Bergman, C., Monaco, J.J., und Mellins, E. (1994) An essential role for HLA-DM in antigen presentation by major histocompatibility molecules, *Nature* 368, 551-554.

Nietfield, W., Bauer, M., Fevrier, M., Maier, R., Holzwarth, B., Frank, R., Maier, B., Riviere, Y., Meyerhans, A. (1995) Sequence constraints and recognition by CTL of an HLA-B27-restricted HIV-1 gag epitope. *J. Immunol.* 154, 2189-2197.

O'Sullivan, D., Arrhenius, T., Sidney, J., Del Guercio, M.F., Albertson, M., Wall, M., Oseroff, C., Southwood, S., Colon, S.M., Gaeta, F.C.A., und Sette, A., (1994) On the interaction of promiscuous antigenic peptides with different DR alleles. *J. Immunol.* 147, 2663-2669.

Powis, S.J., Deverson, E.V., Coadwell, W.J., Ciruela, A., Huskisson, N.S., Smith, H., Butcher, G.W. und Howard, J.C (1992) Effect of polymorphism of an MHC-linked transporter on the peptides assembled in a class-I molecule, *Nature* 357, 211-215.

Rammensee, H.G., Friede, T., Stevanovic, S. (1995) MHC ligands and peptide motifs: first listing, *Immunogenetics* 41, 178-228.

Riberdy, J.M., Newcomb, J. R., Surman, M. J., Barbosa, J, A., und Cresswell, P. (1992) HLA-DR molecules from an antigen processing mutant cell line are associated with invariant chain peptides. *Nature* 360, 474-477.

Robbins, P.F., el-Gamil, M., Li, Y.F., Topalian, S.L., Rivoltini, L., Sakaguchi, K., Appella, E., Kawakami, Y., Rosenberg, S.A. (1995) Cloning of a new gene encoding an antigen recognized by melanoma-specific HLA-A24-restricted tumor-infiltrating lymphocytes. *J. Immunol.* 154, 5944-5950.

Roche, P.A. und Cresswell, P. (1990) Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding, *Nature* 345,615-618.

Ruegg, V.T. und Rudinger, J. (1977) Reductive cleavage of cystine disulfides with tributylphosphine, *Methods Enzymol.*47, 111-116.

Rötzschke, O, Falk, K., Stevanovic, S., Gnau, V., Jung, G., Rammensee, H.G. (1994) Dominant aromatic/aliphatic C-terminal anchor in HLA-B\*2702 and B\*2705 peptide motifs. *Immunogenetics* 39, 74-77.

Rudensky, A. Yu., Preston-Hurlburt, P., AJ-Ramadi, B. K., Rothbard, J., und Janeway, Jr., C. A. (1992) Truncation variants of peptides isolated from MHC class II molecules suggest sequence motifs. *Nature* 359, 429-431.

Sadasivan, B., Lehner, P.J., Ortmann, B., Spies, T. und Cresswell, P. (1996) *Curr. Opin. Immunol.* 6, 32-37.

Safrit, J.T., Andrews, C.A., Zhu, T., Ho, D.D., Koup, R.A. (1994) Characterization of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocyte clones isolated during acute seroconversion: recognition of autologous virus sequences within a conserved immunodominant epitope. *J. Exp. Med.* 179, 463-472.

Sahl, H.G. (1991) in Nisin und Novel Lanibiotics (Jung, G. und Sahl, H.G., Hrsg.) pp.347-358, ESCOM, Leiden.

Saper, M.A., Bjorkman, P.J., und Wiley, D.C. (1991) Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution, *J. Mol. Biol.* 219, 277-319.

Schäfer, P.H., und Pierce, S, (1994) Evidence for Dimers of MHC class II molecules in B lymphomes and their role in low affinity T cell response, *Immunity* 1, 699-707.

Schnell; N.F. (1989) Biosynthese der Peptid-Antibiotika Epidermin und Gallidermin und Untersuchungen zum Eisenmetabolismus von Hefen. *Dissertation. Eberhard-Karls-Universität Tübingen.*

Schnell, N., Entian, K. D., Götz, F., Hörner, T., Kellner, R. und Jung, G. (1989) Structural gene isolation and prepeptide sequence of gallidermin, a new lanthionine containing antibiotic, *FEMS Microbiol. Lett.* 58, 263-268.

Schwartz, A.H. (1985) T-lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of the major histocompatibility complex, *Annu. Rev. Immunol.* 3, 237-261.

Sette, A., Cenian, S., Kubc, R. T., Sakaguchi, K., Appella, E., llunt, D. F., Davis, T. A., Nlichei, H., Shabanovitz, J., Rudersdorf, R., Grey, H. M., DeMars, R. (1992) Invariant chain peptides in most HLA-DR molecules of an antigen-processing mutant. *Science* 258, 1801-1804.

Sette, A., J. Sidney, C. Oseroff, M.F. Delguereio, S. Southwood, T. Arrhenius, M.F. Powell, S.M. Colon, F.C.A. Gaeta, und H.M. Grey. (1993) HLA-DR4w4-binding motifs illustrate the biochemical basis of degeneracy and specificity in peptide-DR interactions. *J. Immunol.* 151, 3163.

Sette, A., Sidney, J., del Guercio, M.F., Southwood, S., Ruppert, J., Dahlberg, C., Grey, H.M., Kubo, R.T. (1994) Peptide binding to the most frequent HLA-A class I alleles measured by quantitative molecular binding assays. *Mol. Immunol.* 31, 813-822.

Shachar, I., Elliott, E.A, Chasnoff, B., Grewal, I., und Flavell, R.A. (1995) Reconstitution of invariant chain function in transgenic mice in vivo by individual p31 and p41 isoforms. *Immunity* 3, 373-383.

Sherman, M.A., Weber, D.A., und Jensen, P. (1995) DM enhances peptide binding to class II MHC by release of invariant chain-derived peptide, *Immunity* 3, 197-205.

Skaugen, M., Nissen-Meyer, J., Jung, G., Stevanovic, S., Sletten, K., Mortvedt Abildgaard, C. I, und Nes, I. F. (1994) In vivo conversion of L-serine to D-alanine in a ribosomally synthesized polypeptide *J. Biol. Chem.* 269, 27183-27185.

Sloan, V.S., Cameron, P., Porter, G., Gammon, M., Amaya, M., Mellins, E., und Zaller, D.M. (1995) Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR, *Nature* 375, 802-806.

Stern, L.J., Brown, J.H., Jardetzky, T.S., Gorge, J.C., Urban, R.G., Strominger, J.L. und Wiley, D.C. (1994) Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide, *Nature* 368, 215-221.

Stevanovic, S. (1992) Multiple Sequenzanalyse, *Dissertation. Eberhard-Karls-Universität Tübingen.*

Stevanovic, S. und Jung, G. (1993) Multiple sequence analysis: Pool sequencing of synthetic and natural peptide libraries, *Anal. Biochem.* 212, 212-220.

Strubin, M., Mach, B. und Long, E.O. (1984) The complete sequence of the mRNA for the HLA-DR-associated invariant chain reveals a polypeptide with an unusual transmembrane polarity, *EMBO J.* 3, 869-872.

Strubin, M., Berte, C, und Mach, B. (1986) Alternative splicing and alternative initiation of translation explain the four forms of the Ia antigen-associated invariant chain, *EMBO J.* 5, 3483-3488.

Takaesu, N.T., Lower, J.A., Robertson, E.J., und Bikoff, E. (1995) MHC class II peptide occupancy, antigen presentation, and CD4<sup>+</sup> T cell function in mice lacking the p41 isoform of invariant chain. *Immunity* 3, 385-396.

Takahashi, K., Dai, L. C., Fuerst, T., Biddison, W. E., Earl, P., Moss, B., und Ennis, F. A. (1991) Specific lysis of human immunodeficiency virus type 1-infected cells by a HLA-A3.1-restricted CD8 cytotoxic T-lymphocyte clone that recognizes a conserved peptide sequence within the gp41 subunit of the envelope protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10277-10281.

Teyton, L., O' Sullivan, D., Dickson, P. W., Lotteau, V., Seite, A., Fink, P., und Peterson, F. A. (1990) Invariant chain distinguishes between exogenous and endogenous antigen presentation pathways. *Nature* 343, 39-44.

Townsend, A., Öhlen, C., Bastin, J., Ljunggren, H.G., Foster, L., und Kärre, K. (1989) Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides, *Nature* 340, 443-448.

Traversari, C., van der Bruggen, P., Luescher, I.F., Lurquin, C., Chomez, P., Van Pel, A., De Plaen, E., Amar-Costesec, A., Boon, T. (1992) A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E. *J. Exp. Med.* 176, 1453-1457.

Tussey, L.G., Rowland-Jones, S., Zheng, T.S., Androlewicz, M.J., Cresswell, P., Frelinger, J.A., McMichael, A.J. (1995) Different MHC class I alleles compete for presentation of overlapping viral epitopes. *Immunity* 1, 65-77.

van Binnendijk, R.S., Versteeg-van Oosten, J.P., Poelen, M.C., Brugghe, H.F., Hoogerhout, P., Osterhaus, A.D., Uytdehaag, F.G. (1993) Human HLA class I- and HLA class II-restricted cloned cytotoxic T lymphocytes identify a cluster of epitopes on the measles virus fusion protein. *J. Virol.* 4, 2276-2284.

Van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., Deplaen, E., Vandeneuynde, B., Knuth, A., und Boon, T. (1991) A Gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma, *Science* 254, 1643-1647.

Venet, A., Bourgault, I., Aubertin, A.M., Kieny, M.P., Levy, J.P. (1992) Cytotoxic T lymphocyte response against multiple simian immunodeficiency virusA (SIV) proteins in SIV-infected macaques. *J. Immunol.* 148, 2899-2908.

Venet, A. und Walker, B. D. (1993) Cytotoxic T-cell epitopes in HIV/SIV infection, *AIDS* 7 (Suppl 1), 117-128.

Wang, S.S. (1973) p-alkoxybenzyl alcohol resin and p-alkoxybenzyloxycarbonyl-hydrazide resin for solid phase synthesis of protected peptide fragments *J. Am. Chem. Soc.* 95, 1328-1333.

Zhang, Q.J., Gavioli, R., Klein, G., und Masucci, M. G. (1993) An HLA-A11-specific motif in nonamer peptides derived from viral and cellular proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 2217-2221.

**Verwendete Quellen aus dem Internet:**

- National Center for Biotechnology Information (**NCBI**), Datenbanken, Bethesda, MD (USA); [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>].
- Entrez search and retrieval systems, Datenbanken; [<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/index.html>]
- SWISS-Prot and TrEMBL, Datenbanken; [<http://www.expasy.ch/sprot/>]
- Sequence Retrieval Systems, Datenbanken; [<http://srs.ebi.ac.uk/srs6bin/cgi-bin/wgetz?-page+top+-newId>]
- EMBL, Heidelberg; [<http://www.embl.de/srs5/>]

Meine akademischen Lehrer waren:

Prof. Dr. K. Albert  
Prof. Dr. E. Bayer  
Prof. Dr. D. Christen  
Prof. Dr. H. Eckstein  
Prof. Dr. H. Frank  
Prof. Dr. G. Gauglitz  
Prof. Dr. J. Gelinek  
Prof. Dr. W. Göpel  
Prof. Dr. B. Haas  
Prof. Dr. G. Häfelinger  
Prof. Dr. H.-P. Hagenmaier  
Prof. Dr. M. Hanack  
Prof. Dr. V. Hoffmann  
Prof. Dr. G. Jung  
Prof. Dr. S. Kemmler-Sack  
Prof. Dr. D. Krug  
Prof. Dr. U. Kunze  
Prof. Dr. E. Lindner  
Prof. Dr. I.-P. Lorenz  
Prof. Dr. W. Nakel  
Prof. Dr. H. Oberhammer  
Prof. Dr. D. Oelkrug  
Prof. Dr. H. Pauschmann  
Prof. Dr. G. Pausewang  
Prof. Dr. H. Pommer  
Prof. Dr. A. Rieker  
Prof. Dr. W. Rundel  
Prof. Dr. V. Schurig  
Prof. Dr. F.F. Seelig  
Prof. Dr. H.U. Siehl  
Prof. Dr. H. Stegmann  
Prof. Dr. J. Strähle  
Prof. Dr. H. Suhr  
Prof. Dr. W. Voelter  
Prof. Dr. K.-P. Zeller.

## Lebenslauf

## Volker Gnau

04. März 1964	geboren in Sindelfingen Vater: Hans Gnau Mutter: Renate Gnau, geb. Kaufmann
1970-1974	Grundschule in Herrenberg
1974-1983	Schickhardt Gymnasium in Herrenberg
Juni 1983	Abitur
Okt. 1983-Dez. 1983	Wehrdienst in Dillingen an der Donau
Jan. 1984-Mai 1985	Zivildienst am Paul-Lechler-Krankenhaus Tübingen
1985-1992	Studium der Chemie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
Apr. 1989-Nov. 1989	Auslandsaufenthalt an der Scripps Clinic & Research Foundation, La Jolla, Californien
Mai 1992	Mündliche Diplomhauptprüfung in Chemie
Juni 1992-Dez. 1992	Diplomarbeit: „Analyse von natürlichen und synthetischen Peptidbibliotheken“ unter Anleitung von Prof. Dr. G. Jung
July 1995-Sep. 1995	Forschungsaufenthalt bei Prof. J.L. Strominger, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Harvard University, Cambridge, Massachusetts, USA.
Jan. 1996-Mai 2000	Applications Spezialist für Edman Sequenzierung und für Massenspektrometrie (Tripple Quadrupol und Hybrid Quadrupol/Time of Flight Massenspectrometer) bei der Firma PE-Biosystems in Langen.
Seit Juni 2000	Verantwortlich für den Bereich Bioanalytik bei der Firma CellZome in Heidelberg
Seit 25.04.1997	Verheiratet mit Karin Schurr Kinder: Jonas, Nora und Katja