

Analyse des HLA-Ligandoms zur Identifizierung tumorassoziierter Peptide

Stefan Stevanović

Wissenschaftliche Grundlagen

Praktisch jedes Protein einer Zelle wird auf der Zelloberfläche durch ein kurzes Peptid repräsentiert. Diese Peptide stammen aus dem normalen Proteinstoffwechsel und werden durch spezielle Rezeptoren, die HLA-Moleküle, innerhalb der Zelle gebunden und anschließend auf der Zelloberfläche präsentiert. Solche HLA-Peptidkomplexe werden ständig von T-Zellrezeptoren abgetastet: T-Zellen sind in der Lage, unerwünschte Veränderungen in der Gesamtheit der HLA-präsentierten Peptide - dem HLA-Ligandom - zu erkennen und darauf zu reagieren. Im Falle einer Virusinfektion, aber auch während einer Tumorerkrankung werden auf der Zelloberfläche fremde oder abnormale (z.B. mutierte) Peptide durch HLA präsentiert, worauf zytotoxische T-Zellen die befallenen Körperzellen eliminieren.

Daher ist die molekulare Analyse des HLA-Ligandoms essenziell für die Charakterisierung von Peptiden, die spezifisch für Tumorzellen sind und über die das T-Zellsystem effizient gegen Tumor vorgehen kann. Drei verschiedene Strategien wurden erfolgreich etabliert und werden parallel verfolgt, um HLA-Liganden als neue Biomarker für Tumoren zu etablieren: Eine Katalogisierung aller HLA-Liganden des Menschen, eine gezielte Suche besonders interessanter Kandidatenpeptide durch synthetische Eichsubstanzen sowie der quantitative Vergleich der HLA-Liganden zwischen Tumor- und Normalgewebe eines einzelnen Patienten.

Ziele

Neben der Identifizierung neuer Zielstrukturen auf Tumorzellen zielt das Projekt auf die Analyse der Individualität: Welche Überlappungen oder Unterschiede bestehen zwischen den HLA-Ligandomen von Primärtumoren und Metastasen? Können tumorassoziierte HLA-Liganden zwischen verschiedenen Patienten oder zwischen Tumoren verschiedenen Ursprungsgewebes identisch sein?

Aus den Ergebnissen der Analysen lassen sich für jeden Patienten individuell Peptidmischungen zusammenstellen, die über eine Impfung sein Immunsystem gegen den eigenen Tumor lenken sollen. Primäres Ziel des Projekts ist es daher, pro Tumorprobe einen Satz von 5-10 tumorassoziier-

ten HLA-Liganden zu identifizieren und für den Einsatz in klinischen Studien als Impfstoff bereitzustellen.

Strategie

Aus Tumorgewebe werden die HLA-Moleküle isoliert und ihre Liganden freigesetzt. Die molekulare Analyse erfolgt durch eine Kombination von Chromatografie und Massenspektrometrie, wobei Peptide in Mengen von wenigen Pikogramm charakterisiert werden können. Umfangreiche Datenbankvergleiche überprüfen die Peptide auf ihren tumorassozierten Charakter, Stimulationen *in vitro* ermöglichen Aussagen über die Reaktionsmöglichkeit von T-Zellen gegen die neu entdeckten Peptide. Die Herstellung der tumorassozierten Peptide durch chemische Synthese erfolgt nach GMP-Richtlinien, der für die pharmazeutische Produktion erforderliche Antrag auf Herstellungserlaubnis nach dem Arzneimittelgesetz durchläuft derzeit das Prüfverfahren.

HLA ligandome analysis for the identification of tumor-associated peptides

Essentially all human cells express surface molecules (HLA) that perform a kind of "showcase function": Samples of peptides representing most cellular proteins are presented by HLA molecules. This allows T cells to sense the integrity of all cells. Alterations, for example after viral infections or tumor-specific mutations can thus

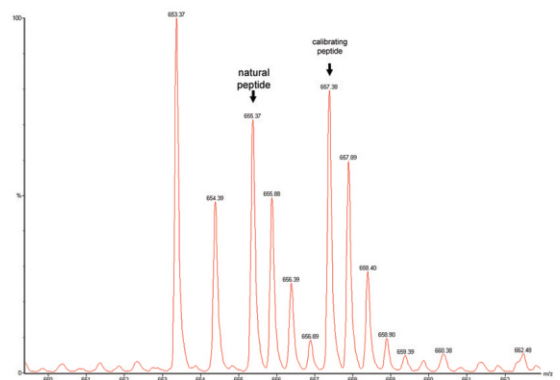


Abb. 1: Massenspektrometrischer Nachweis des Epitops ELTLGEFLKL aus dem Tumorantigen Survivin mit Hilfe eines isotopenmarkierten synthetischen Eichpeptids (*calibrating peptide*).

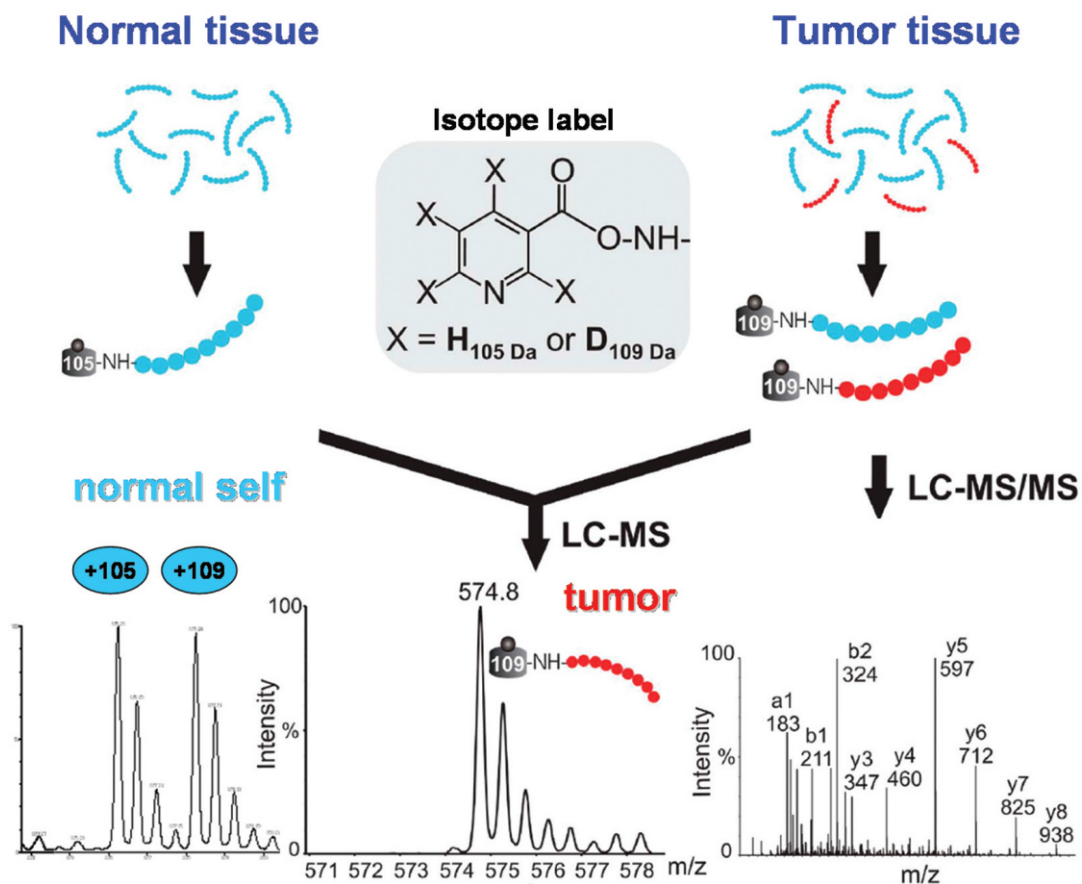


Abb. 2: Unterscheidung „normaler“ (blau) und tumor-assoziiertes (rot) HLA-Liganden. Aus gesundem Gewebe und dem Tumor werden die HLA-präsentierten Peptide isoliert und unterschiedlich isotopenmarkiert. Alle Peptide, die für den gesunden Zustand repräsentativ sind, tauchen in der Analyse als Signalpärchen auf (links unten), während die tumor-assoziierten Peptide als Einzelsignale sichtbar werden (unten Mitte).

be sensed by T cells. Each individual tumor expresses its own set of tumor antigens (overexpressed, mutated, derived from tumor viruses, fusion proteins etc.) some of which are essential for tumor growth, others being passenger alterations of “normal self”. All categories of tumor antigens can give rise to immunogenic peptides recognizable by T cells that can kill the tumor cells. Within this project, HLA ligandomes of tumor and normal tissues of different origin will be analyzed in order to identify novel target structures for immunotherapy: Immunoprecipitation of HLA molecules is followed by peptide extraction and identification using capillary HPLC and mass spectrometry, sensitive down to low picogram levels. Tumor-associated peptides will be synthesized under GMP conditions individually for each patient and provided for vaccination studies using appropriate adjuvants and conditions. Two layers of individuality – the genotype of the HLA system on the one hand, and the accumulated genomic and proteomic changes of the cells within a tumor on the other, are addressed for an individualized vaccination against cancer, using only molecularly defined therapeutics. In addition, insight into molecular differences between primary

tumors and their metastases, between tumors of different origin and of different hosts will be provided.

Projektleitung

Prof. Dr. Stefan Stevanović

Interfakultäres Institut für Zellbiologie
Abteilung Immunologie
Auf der Morgenstelle 15
72076 Tübingen

Tel.: 0049/(0)7071/29 87645

Fax: 0049/(0)7071/29 5653

stefan.stevanovic@uni-tuebingen.de

<http://cms.elchtools.de/>

