

Aus dem Interfakultären Institut für Zellbiologie der Universität
Tübingen
Abteilung: Immunologie
Abteilungsleiter: Professor Dr. H.-G. Rammensee

*HLA-Ligandom-, Genexpressions- und T-Zell-Analysen zur
Identifizierung tumorassoziierter Peptide des
Nierenzellkarzinoms und der Akuten Myeloischen Leukämie*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Tobias Hermann Arnold Krüger
aus
Heidelberg

2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Stevanović
2. Berichterstatter: Professor Dr. A. Stenzl

Für Henrike und Nora

Inhalt:

1. Einleitung	- 3 -
1.1. Das Immunsystem	- 3 -
1.1.1. Aufbau und Systematik des Immunsystems	- 3 -
1.1.2. MHC-Moleküle, Antigenpräsentation und Antigenprozessierung	- 3 -
1.1.3. T-Zellen und ihre Funktion	- 3 -
1.1.4. Tumorimmunologie: Zielstrukturen, Methoden und Limitationen	- 3 -
1.2. Das Nierenzellkarzinom	- 3 -
1.2.1. Nierentumoren	- 3 -
1.2.2. Epidemiologie des Nierenzellkarzinoms	- 3 -
1.2.3. Pathologie, Systematik und Stadieneinteilung des Nierenzellkarzinoms	- 3 -
1.2.4. Klinik und Diagnostik des Nierenzellkarzinoms	- 3 -
1.2.5. Etablierte und experimentelle Therapieverfahren des Nierenzellkarzinoms	- 3 -
1.3. Die akute myeloische Leukämie	- 3 -
1.3.1. Pathologie und Systematik der akuten myeloischen Leukämie	- 3 -
1.3.2. Etablierte und experimentelle Therapien der akuten myeloischen Leukämie	- 3 -
1.4. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	- 3 -
2. Material und Methoden	- 3 -
2.1 Methoden zur Analyse des HLA-Ligandoms	- 3 -
2.1.1. Isolierung MHC- Klasse I gebundener Peptide	- 3 -
2.1.2 Quantifizierung der β 2-Mikroglobulin-Konzentration in Tumorlysaten und Eluaten durch diskontinuierliche Polyacrylamid- Gelelektrophorese und Westernblot zur näherungsweisen Bestimmung der MHC-Ausbeute	- 3 -
2.1.3 Peptidsynthese	- 3 -
2.1.4 Massenspektrometrische Sequenzierung von MHC-gebundenen Peptiden	- 3 -
2.1.4.1. Theoretischer Hintergrund und apparative Lösung der massenspektrometrischen Sequenzierung von Peptiden	- 3 -
2.1.4.2. Praktische Durchführung der LC-MS/MS-Analytik	- 3 -
2.1.5. Interpretation von MS/MS-Spektren zur Peptidsequenzanalyse	- 3 -
2.2. Methoden der Genexpressionsanalyse	- 3 -
2.2.1. <i>GeneChip</i> -basierte Genexpressionsanalyse	- 3 -
2.2.2. RNA-Extraktion, -Aufreinigung, -Amplifikation und -Fragmentation zur Vorbereitung der <i>GeneChip</i> -basierten Genexpressionsanalyse	- 3 -
2.2.3. Statistische Methoden zur Auswertung der Genexpressionsanalysen	- 3 -
2.3. Methoden zur Kultivierung und Analyse von Tumorzellen	- 3 -
2.3.1. Kultivierung von Tumorzelllinien	- 3 -
2.3.2. Zellernte	- 3 -

2.3.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen	- 3 -
2.3.4. Bestimmung der Lebendzellzahl und Anlegen einer Wachstumskurve	- 3 -
2.3.5. Primärkultur und Etablierung einer Zelllinie aus soliden Nierenzellkarzinomen	- 3 -
2.3.6. Durchflusszytometrische qualitative und quantitative HLA- Bestimmung auf Tumorzelllinien	- 3 -
2.4 Methoden zur Kultivierung und Analyse von T-Zellen	- 3 -
2.4.1. Aufreinigung mononukleärer Zellen aus Blutprodukten	- 3 -
2.4.2. Aufreinigung CD8 ⁺ T- Zellen durch magnetically activated cell sorting (MACS)	- 3 -
2.4.3. Synthese von MHC/anti-CD28-Microbeads zur Stimulation CD8 ⁺ T- Zellen	- 3 -
2.4.4. Kultivierung und Stimulation von T-Zellen	- 3 -
2.4.5. MHC-Monomersynthese	- 3 -
2.4.6. MHC-Tetramersynthese	- 3 -
2.4.7. Tetramerfärbung	- 3 -
2.4.8. Durchflusszytometrische Bestimmung der Antigenpezifität von T-Zellen	- 3 -
3. Ergebnisse	- 3 -
3.1. Analyse des HLA Ligandoms solider Nierenzellkarzinome	- 3 -
3.1.1. Orientierende Übersicht über den Datensatz	- 3 -
3.1.2. Peptide aus konstitutiv exprimierten Proteinen, „Selbstpeptide“	- 3 -
3.1.3. Peptide aus etablierten Tumorantigenen des Nierenzellkarzinoms	- 3 -
3.1.4. Peptide aus Quellproteinen die in mehreren oder einzelnen Tumoren überexprimiert waren	- 3 -
3.1.4. Stark überexprimierte Gene, aus denen bisher keine Peptide bekannt sind.	- 3 -
3.2. Anlage von primären Zelllinien aus soliden Nierenzellkarzinomen	- 3 -
3.3. Analyse des HLA-Ligandoms der Nierenzellkarzinomzelllinie RCC68	- 3 -
3.3.1. Einführung in den Datensatz und Charakterisierung der Zelllinie RCC68CL	- 3 -
3.3.2. Vergleich des Genexpressions- und Peptidpräsentationsmusters zwischen der Zelllinie und dem soliden Tumor RCC68	- 3 -
3.3.3. Tumorassoziierte Peptide auf der Zelllinie RCC68CL	- 3 -
3.4. T-Zell-Studien mit RCC68-Peptiden	- 3 -
3.5. Analyse des HLA-Ligandoms akuter myeloischer Leukämien inv(16)	- 3 -
3.5.1. Einführung und Übersicht über den Datensatz	- 3 -
3.5.2. Versuch des molekularen Nachweises eines Peptids aus der Fusionssequenz von CBF β -MYH11	- 3 -
3.5.3. Peptide aus Proteinen, für die sich kein Hinweis auf Tumorassoziation ergab	- 3 -
3.5.4. AML-Peptide aus potentiell tumorassoziierten Proteinen	- 3 -
3.5.5. AML-Peptide aus Quellproteinen, die bereits als immunreaktive Tumorantigene beschrieben sind.	- 3 -

4. Diskussion	- 3 -4.1.
Diskussion ausgewählter, in dieser Arbeit verwendeter Methoden	- 3 -
4.1.1. Diskussion der Methodik: Massenspektrometrische Peptidsequenzierung und <i>GeneChip</i> -basierte Expressionsanalyse: Aussagekraft und Anwendbarkeit der verwendeten Strategie zur Identifizierung tumorassoziierter Peptide	- 3 -
4.1.2. Diskussion der Methodik: Etablierung von Zelllinien aus soliden Tumoren	- 3 -
4.1.3. Diskussion der Methodik: T-Zellstimulationsanalysen mit Peptiden der Zelllinie RCC68CL	- 3 -
4.2. Zusammenfassende Diskussion der durch Nierenzellkarzinome präsentierten Peptide (solide Tumoren und Zelllinie)	- 3 -
4.2.1. Gruppe 1: Peptide aus dominanten Peptidquellen und konstitutiv in Nierenzellkarzinomen überexprimierten Quellproteinen	- 3 -
4.2.2. Gruppe 2: Peptide aus Proteinen, für die nur in individuellen Fällen eine Tumorassoziation vermutet werden darf	- 3 -
4.2.3. Gruppe 3: Peptide aus klassischen Tumorantigenen	- 3 -
4.3. Einflüsse der spezifischen Onkobiologie klarzelliger Nierenzellkarzinome auf deren HLA-Ligandom	- 3 -
4.3.1. Die Überexpression von verschiedenen tumorassozierten Genprodukten des Nierenzellkarzinoms scheint mit dem klarzelligen Phänotyp assoziiert zu sein	- 3 -
4.3.2. Die VHL-Mutation, der Transkriptionsfaktor HIF, und ihr Einfluss auf die Tumorantigene des Nierenzellkarzinoms	- 3 -
4.4. Vergleichbarkeit von onkoimmunologischen Daten aus der <i>in vitro</i> - und der <i>ex vivo</i> -Analyse	- 3 -
4.5. Zusammenfassende Diskussion der, durch Blasten der akuten myeloischen Leukämie präsentierten Peptide	- 3 -
4.5.1. HLA-Liganden aus der CBF β -MYH11-Fusionssequenz	- 3 -
4.5.2. Dominante Peptidquellen in den AML-Proben: Peptide ribosomalen und hämoglobinen Ursprunges	- 3 -
4.5.3 Potentiell tumorassoziierte Peptide der AML	- 3 -
5. Zusammenfassung	- 3 -
6. Literaturverzeichnis	- 3 -
7. Danksagung	- 3 -
8. Lebenslauf und Publikationen	- 3 -

1. Einleitung

1.1. Das Immunsystem

1.1.1. Aufbau und Systematik des Immunsystems

Der menschliche Körper ist permanent Pathogenen aus der Umwelt, Viren, Bakterien, Parasiten, und körperfremden Proteinen (z.B. Toxinen) ausgesetzt. Seine Fähigkeit auf diese Einflüsse zu reagieren bezeichnet man als Immunität, das Organsystem, das diese Abwehrfunktion realisiert ist das Immunsystem.

Auch in körpereigenen Zellen selbst entstehen Krankheiten. Durch Veränderung des Erbgutes entstehen Tumoren, die aufgrund ihres veränderten Genoms und ihrer folglich veränderten Proteine vom Immunsystem erkannt und bekämpft werden können. Jedoch führt auch eine fehlgeleitete Immunreaktion, die sich gegen körpereigenes Gewebe richtet zu Krankheit; Krankheiten die auf diese Weise entstehen gehören zur großen Gruppe der Autoimmunerkrankungen.

Die zentrale Funktion des Immunsystems, die Unterscheidung zwischen „Fremd“ und „Selbst“ auf molekularer Ebene und seine fehlerlose Funktionalität ist also ein grundlegender Faktor zur Erhaltung der Gesundheit.

Spezifische und unspezifische Anteile des Immunsystems lassen sich unterscheiden. Zur unspezifischen Immunität zählen die Integrität der inneren und äußeren Körperoberflächen, die ein Eindringen und eine Ausbreitung von Pathogenen verhindert und die Ausscheidung von Pathogenen bewerkstelligt, aber insbesondere auch zelluläre und molekulare Systeme wie die Granulozyten und Mastzellen, die Makrophagen, die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und das Komplementsystem. Das unspezifische, angeborene Immunsystem dient einer ersten, hoch effizienten Abwehr von Pathogenen, es kann Krankheitserreger aufgrund konservierter, immer wiederkehrender Strukturen erkennen und bekämpfen.

Die Akteure der spezifischen oder adaptiven Immunität hingegen, die T- und die B-Zellen sind befähigt durch ein kompliziertes und hochspezialisiertes molekulares System eine große Bandbreite fremder Antigene zu erkennen, zu bekämpfen, und sich im Sinne eines immunologischen Gedächtnisses an diese Antigene bei einem Zweitkontakt zu erinnern. Das adaptive Immunsystem lässt sich weiter unterteilen in eine humorale und eine zelluläre Immunität. B-Lymphozyten als Vermittler der humoralen Immunität sezernieren nach Stimulation Antikörper verschiedener Klassen, die befähigt sind hochmolekulare extrazelluläre Strukturen praktisch aller Stoffklassen spezifisch zu erkennen. Die Bindung eines Antikörpers an ein Antigen bzw. an ein Pathogen kann eine ganze Reihe weiterer Mechanismen induzieren, die zur Inaktivierung, Unschädlichmachung und zur Entfernung des pathologischen Agens führen. Im Zentrum der zellulären Immunität hingegen stehen die T-Lymphozyten, die über ein komplexes System der Antigenpräsentation und -erkennung in der Lage sind auch solche Pathogene aufzuspüren, die intrazellulär in Zielzellen liegen bzw. befähigt sind Zellen zu erkennen, die aufgrund viraler oder mutagener Einflüsse in ihrer molekularen Biologie pathologisch verändert sind. Im Falle der Erkennung einer derart pathologisch veränderten Zielzelle kommen verschiedenen Untergruppen von T-Lymphozyten verschiedene Aufgaben wie die Stimulation anderer Immunzellen und schließlich die effektive Bekämpfung der Zielzelle zu.

Natürlich interagieren der humorale und der zelluläre Arm des adaptiven Immunsystems in der Natur vielfältig, eine Trennung im Detail ist daher nicht immer möglich. Von zentraler Bedeutung für diese Arbeit allerdings ist der T-Lymphozytäre Anteil des spezifischen Immunsystems, entsprechend soll im Folgenden auf die anderen hier erwähnten Anteile nicht mehr eingegangen werden.

1.1.2. MHC-Moleküle, Antigenpräsentation und Antigenprozessierung

Die grundlegende Aufgabe des Immunsystems ist es, zwischen Fremd und Selbst zu unterscheiden. Von großer Bedeutung in diesem Zusammenhang ist

die Rolle der MHC-Moleküle. Der Terminus MHC (*major histocompatibility complex*) bezeichnet eine Gruppe von Genen, die im humanen Organismus auf Chromosom 6 liegen, und für die MHC-Proteine kodieren. Für die Namensgebung, zurückgehend auf Snell, 1948, ausschlaggebend war die Tatsache, dass diese Moleküle die Hauptverantwortlichen für die Gewebsverträglichkeit, zum Beispiel im Szenario der Organtransplantation sind. Im Menschen spricht man synonym zu den MHC-Proteinen auch von HLA-Molekülen (*human leukocyte antigen*). Menschliche MHC-Moleküle werden formal in 4 Klassen eingeteilt (144): MHC-Moleküle der Klasse I finden sich in nahezu allen kernhaltigen Zellen des Körpers. Es handelt sich um membranständige Proteine, bestehend aus einer schweren α -Kette mit 45 kDa (MHC-kodiert) sowie einer leichten β -Kette mit 12 kDa, (β_2 -Mikroglobulin, nicht MHC-kodiert) die nichtkovalent an den extrazellulären Teil der α -Kette gebunden ist. Die schwere α -Kette besteht aus einer intrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne und drei extrazellulären Domänen ($\alpha 1-3$).

MHC Klasse II-Proteine finden sich praktisch nur auf spezialisierten antigenpräsentierenden Zellen (APCs). Sie bestehen aus zwei nichtkovalent verbundenen Ketten, α (34kDa) und β (29kDa), die beide über eine Transmembrandomäne verfügen.

Die Moleküle der Klassen MHC I und II zeigen also strukturell und auch funktionell einige Gemeinsamkeiten. Die Genregionen der MHC-Klassen III und IV hingegen kodieren für eine recht heterogene Gruppe von Proteinen, unter ihnen Serumproteine wie Komplementfaktoren und Zytokine. Für die Histokompatibilität im eigentlichen Sinne sind lediglich die Moleküle der MHC-Klassen I und II verantwortlich. Die einzelnen Subtypen der MHC-Molekülklassen I und II liegen in der Bevölkerung in einer außerordentlichen Vielfalt vor, wodurch sich eine Abgrenzbarkeit des eigenen Organismus gegenüber fremden Geweben ergibt: Die menschlichen MHC-Gene der Klasse I kodieren für die Moleküle HLA-A, -B und -C, die der Klasse II für die Moleküle HLA-DR, -DP, und -DQ. Für jedes dieser einzelnen Gene wiederum besteht ein ausgeprägter Polymorphismus, für jedes einzelne Gen existieren in der Bevölkerung also viele verschiedene Allele. Am 01.07.2006 waren für das Gen

HLA-A 451 Allele, für das Gen HLA-B 782 Allele usw. bekannt (www.anthonynolan.org.uk/HIG/). Die Gene des MHC werden kodominant vererbt, folglich ergibt sich für jeden Menschen eine HLA-Typisierung, die, Heterozygotie vorausgesetzt, jeweils zwei spezifische Allele für HLA-A, -B, -C, -DR, -DP und -DQ umfasst. Vor dem Hintergrund der multiplen Allelie ergibt sich so eine unerhörte Anzahl von Kombinationsmöglichkeiten, die eine nahezu disjunkte Identifikation eines Individuums auf molekularer Ebene zulässt.

Neben dieser Rolle als „Selbsterkennungsmerkmale“ des Organismus haben die MHC Klasse I- und II-Moleküle noch eine weitere für die Erkennung einer Pathologie der Zelle zentrale Funktion, nämlich die der Peptidpräsentation. Da im Rahmen dieser Arbeit praktisch nur MHC Klasse I-Moleküle von Bedeutung sind soll der Mechanismus der Peptidpräsentation im Folgenden auch nur anhand dieser Molekülklasse beschrieben werden:

Die extrazellulären Domänen $\alpha 1$ und $\alpha 2$ der MHC Klasse I-Moleküle formen eine Grube in der Peptide mit einer Länge von zumeist 8-10 Aminosäuren gebunden werden. Die Bindung von Peptiden in dieser Grube geschieht zum einen über nichtkovalente Wechselwirkungen in den zentralen Bereichen der Peptide, zum anderen über Wasserstoffbrücken am N- und C-terminalen Ende des Peptids (40). Zur Ausbildung der nichtkovalenten Wechselwirkungen zwischen dem HLA-Molekül und dem Peptid sind in „Taschen“ innerhalb der Peptidbindungsgrube definierte Aminosäurereste vorhanden, die nichtkovalente Bindungen mit ebenso definierten Aminosäuren (Ankeraminosäuren) an spezifischen Stellen des Peptids ausbilden können. Hierdurch entsteht das sogenannte Peptidbindungsmotiv des HLA-Moleküls, das also spezifische Ankeraminosäurereste an einer bestimmten Stelle innerhalb des Peptids erfordert, um eine Bindung des Peptids auf dem HLA-Molekül zu ermöglichen (98). Da die einzelnen Allele der HLA-Moleküle sich insbesondere im Aufbau ihrer Peptidbindungsgrube unterscheiden, existiert für jedes HLA-Allel ein mehr oder weniger typisches Peptidbindungsmotiv. Durch Kenntnis der Peptidbindungsmotive lassen sich folglich Peptide anhand ihrer Sequenz einzelnen HLA-Allelen zuordnen. Neben dem Peptidbindungsmotiv entscheiden

auch sterische Effekte über die Bindungsfähigkeit eines Peptids auf einem HLA-Molekül (311).

Die auf MHC Klasse I-Molekülen präsentierten Peptide sind Fragmente hauptsächlich zytosolischer Proteine, durch das Phänomen der „Kreuzpräsentation“ (*cross-presentation*) können jedoch auch Peptide aus Proteinen extrazellulären Ursprungs auf MHC Klasse I-Molekülen präsentiert werden (363). Zelluläre Proteine und auch „defekte ribosomale Translationsprodukte“ (DRIPs) (450) unterliegen der Degradation durch das konstitutiv exprimierte Proteasom (323), das Immunproteasom (395) und einige andere Proteasen (384). Durch die proteasomale Prozessierung entstehen vorzugsweise Peptide mit 8-11 Aminosäuren Länge (201). Bereits durch den proteasomalen Verdau entstehen Peptide, die C-terminal Aminosäuren besitzen die zum Peptidbindungsmotiv der meisten MHC Klasse I-Moleküle passen, N-terminal ist jedoch eine weitere Kürzung der Peptide („trimming“) durch zytosolische Proteasen möglich (385). Die zytosolischen Peptide werden im Folgenden durch den *transporter-associated-with-antigen-processing* (TAP), einem heterodimeren (TAP1; TAP2), transmembranen Protein des endoplasmatischen Retikulums (ER) in einem energieabhängigen (ATP) Prozess ins Lumen des ER befördert. Auch in diesem Schritt der Translokation geschieht eine positive Selektion von Peptiden die auf MHC Klasse I-Moleküle binden können (279), und auch im ER können Peptide durch die *aminopeptidase associated with antigen processing* (ERAAP) auf die zur MHC-Bindung erforderliche Länge zugeschnitten werden (360).

Neu synthetisierte α -Ketten der MHC Klasse I-Moleküle, die noch kein Peptid gebunden haben, liegen noch nicht in ihrer endgültigen Tertiärstruktur vor und sind instabil. Sie werden in diesem Zustand im ER durch das Chaperon *Calnexin* stabilisiert. Erst die Bindung von β_2 -Mikroglobulin an die MHC- α -Kette führt zur Auflösung des Komplexes *Calnexin*:MHC Klasse I- α -Kette. Das so gebildete Heterodimer bildet mit *Calreticulin*, *Tapasin* und *Erp57* einen neuen Komplex. *Tapasin* bindet den Komplex an den transmembranen Peptidtransporter TAP (227). Die Bindung eines passenden Peptids in die Peptidbindungsgrube der α -Kette führt zur endgültigen Faltung des MHC-

Proteins, die durch *Erp57* unterstützt wird und zur Auflösung des Komplexes. Erst also die Bildung des Heterotrimers Peptid:MHC Klasse I- α -Kette: β_2 -Mikroglobulin führt zu einer stabilen Konformation des MHC-Moleküls. Über den vesikulären Transport vom ER über den Golgi-Apparat zur Zellmembran gelangt das MHC-Molekül schließlich auf die Zelloberfläche, wo es seine Aufgaben der Peptidpräsentation und der Vermittlung der Histokompatibilität erfüllen kann. Auf diese Weise werden schätzungsweise 10^4 verschiedene Peptide aus physiologischerweise in der Zelle vorhandenen Proteinen (Selbstpeptide) als auch aus Proteinen aus Pathogenen, z.B. Viren auf der Zelloberfläche auf ca. 10^5 bis 10^6 MHC Klasse I-Molekülen präsentiert.

1.1.3. T-Zellen und ihre Funktion

Der Ligand des MHC-Moleküls ist der T-Zell-Rezeptor (TCR) auf T-Lymphozyten. T-Zellen die diesen Rezeptor an ihrer Oberfläche exprimieren sind befähigt Fremdpeptid, das ihnen auf MHC-Molekülen präsentiert wird, zu erkennen, und Selbstpeptid zu tolerieren. Verschiedene Subklassen von T-Zellen sind bekannt: T-Helferzellen (T_H1 ; T_H2), T-Killerzellen (zytotoxische T-Lymphozyten, CTL), T-Regulatorzellen (T_{reg}), NK-T-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen.

Der T-Zellrezeptor (TCR) ist ein Heterodimer, bestehend aus einer α - und einer β - Kette, bzw. im Falle der $\gamma\delta$ -T-Zellen aus einer γ - und einer δ -Kette. Damit eine T-Zelle einen MHC:Peptid-Komplex einer anderen Zelle erkennen kann, sind sogenannte Korezeptoren nötig, namentlich CD8 bzw. $CD4^a$. $CD8^+$ T-Zellen können MHC-Moleküle der Klasse I, $CD4^+$ Zellen können solche der Klasse II erkennen. T-Killerzellen (CTL) sind klassischerweise $CD8^+$ und tragen den $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor. Vorläufer der T-Zellen entstammen dem Knochenmark und differenzieren im Thymus zu adulten T-Zellen aus. Während dieser Ausdifferenzierung im Thymus kommt es durch negative Selektion von solchen T-Zellen die mit Eigenpeptid reagieren und durch positive Selektion solcher, die nicht mit Eigenpeptid reagieren, zur Entwicklung der Selbsttoleranz.

^a CD: Cluster of differentiation

Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich $CD8^+$ T-Killerzellen in Experimenten eine Rolle spielen, seien auch nur diese weiter im Detail behandelt.

Der T-Zellrezeptor der $CD8^+$ T-Killerzellen kann also „Fremdpeptid“, das durch MHC Klasse I-Moleküle präsentiert wird, erkennen und Zellen, die solches Peptid präsentieren, angreifen. Zur Auslösung einer Immunantwort durch T-Killerzellen sind neben dem T-Zellrezeptor und dem CD8 noch eine Reihe weiterer kostimulatorischer Moleküle notwendig, die auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC), z.B. dendritischen Zellen (DC) exprimiert werden. Zu diesen kostimulatorischen Molekülen gehören das CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) auf Seiten der APCs sowie das CD28 auf Seiten der T-Killerzelle (133;141). Die Auslösung einer T-Killerzell-Immunantwort geschieht über die Präsentation eines Fremdpeptids und die gleichzeitige „Kostimulation“ durch eine professionelle antigenpräsentierende Zelle. Naive T-Killerzellen werden durch diese APCs aktiviert, und greifen im Folgenden Zellen an, die auf ihrer Oberfläche das Fremdpeptid auf MHC-Molekülen, jedoch keine kostimulatorischen Moleküle tragen. Dazu stehen aktivierten T-Killerzellen eine Reihe von Mechanismen zur Verfügung, z.B. das „Membrantoxin“ *Perforin*, oder die *Granzyme* und der *Fas-Ligand*, die beide die Apoptose auslösen (161).

1.1.4. Tumorummunologie: Zielstrukturen, Methoden und Limitationen

Entartete Zellen können vom Immunsystem erkannt werden. Einerseits produzieren Tumoren aufgrund von Mutationen qualitativ andere Peptide, die analog den Fremdpeptiden aus z.B. Viren durch T-Zellen erkannt werden können, zum anderen existieren quantitative Unterschiede in der Präsentation von Normalpeptiden, die aus der Dysregulation der Transkription, der Translation und der Degradation resultieren. Es ist nachgewiesen, dass $CD8^+$ T-Killerzellen Tumorzellen angreifen können, die Selbstpeptide in deutlich höherer Dichte präsentieren als gesunde Zellen (192). Ebenso von Bedeutung in diesem Zusammenhang ist, dass nekrotisch zerfallende Tumoren per se einen inflammatorischen Stimulus darstellen. Die Einwanderung von Zellen des

angeborenen Immunsystems, die Phagozytose und Kreuzpräsentation von Peptiden aufgenommener Tumorantigene durch das Tumorstroma und die eingewanderten Immunzellen stellen ebenso eine Grundlage für eine effiziente spezifische Immunantwort gegen den Tumor dar (154;374).

Eine Einteilung von Tumorantigenen und ihren Entstehungsmechanismen lässt sich, leicht modifiziert nach Rammensee *et al.* (312), folgendermaßen darstellen:

Von Natur aus absolut tumorspezifisch sind solche Antigene, die aus Mutationen in den neoplastischen Zellen entstehen. So sind Antigene aus Punktmutationen (CDK4 (445)), Leserastermutationen (TGFbRII (338)), und Translokationen mit folgender Fusionsproteinbildung (BCR-ABL (73)) bekannt. Weiter sind tumorspezifische Antigene aus Antisense-Transkripten von normalen Genen bekannt (RU2AS (413)). Auch posttranslationale Modifikationen (*Tyrosinase* (369)) und tumorvirale Proteine (HPV16 E7 (397)) können zur Entstehung von tumorspezifischen Antigenen führen.

Proteine aus im adulten Organismus nicht mehr exprimierten Genen, z.B. dem karzinoembryonalen Antigen (CEA (402)) oder aus solchen Genen die im adulten Organismus nur in immunprivilegierten Organen, z.B. den Hoden exprimiert werden (*Cancer testis antigens, MAGE-family* (401)) sind zwar nicht ausschließlich im Tumor anzutreffen, sind jedoch im Rahmen der Tumorimmunologie als tumorspezifisch anzusehen. Ähnliches gilt für Proteine und nichtproteinogene Strukturen, die im Tumor gegenüber den Normalgeweben stark überexprimiert sind (Her2/neu (87), MUC1 (187), Gangliosid GD3 (68), NY-ESO-I (175)), auch diese sind in Normalgeweben anzutreffen, wirken jedoch aufgrund quantitativer Effekte nur im Tumor immunogen (317).

Spontane Immunantworten gegen Tumoren sind inzwischen vielfältig, u.a. durch die oben genannten Literaturstellen, dokumentiert. Das erste Mal konnte die Existenz dieses Phänomens Anfang der neunziger Jahre auf molekularer Ebene für das Melanom nachgewiesen werden (415). Vielfältige experimentelle Ansätze haben zum Ziel, die Tumorimmunologie therapeutisch nutzbar zu machen: Unspezifische Immuntherapien mit Zytokinen, z.B. Interferonen und

Interleukinen gehören inzwischen zu den etablierten therapeutischen Strategien bei verschiedenen Tumoren.

Adoptive immuntherapeutische Ansätze, bei denen u.a. autologe tumorspezifische T-Zellen des Patienten *in vitro* stimuliert werden um sie später dem Patienten zu reinfundieren befinden sich für verschiedene Neoplasien im Stadium der klinischen Testung. In diesem Zusammenhang sind auch die Erfolge der allogenen Stammzelltransplantationen in der Therapie hämatologischer Neoplasien zu erwähnen.

Gentherapeutische Strategien setzen darauf, Tumorzellen mit kostimulatorischen Molekülen zu transfizieren, sie also zu artifiziellen antigenpräsentierenden Zellen zu machen, um so die Effektivität der T-Zellstimulation zu erhöhen. Auch diese Methodik wird insbesondere auf ihre Anwendbarkeit in hämatologischen Neoplasien getestet.

Eine hohe methodische Diversität zeigen die Ansätze der Vaccinierungstherapien. Als Impfstoffe in experimenteller Erprobung bei den verschiedensten Tumoren finden sich DNA-, RNA-, Protein-, Peptid-, Lysat- und Ganzzellvaccinen jeweils als „Reinsubstanzen“ oder in unterschiedlichsten Präparationen mit verschiedenen Adjuvantien. Besondere Aufmerksamkeit aufgrund vielversprechender experimenteller Ergebnisse kam in den letzten Jahren den autologen antigenpräsentierenden dendritischen Zellen als „Adjuvans“ zugute; diese wurden auf verschiedenste Weise *ex vivo* modifiziert, immer mit dem Ziel tumorassoziierte Peptide zu präsentieren und so zu einer effizienten Immunantwort gegen den Tumor *in vivo* zu führen.

Eine detailliertere Besprechung der verschiedenen relevanten immuntherapeutischen Strategien findet im Rahmen dieser Arbeit bei der Darstellung der experimentellen Therapieansätze des Nierenzellkarzinoms (Kap. 1.2.5) sowie der akuten myeloischen Leukämie (Kap. 1.3.2) statt.

Immuntherapeutische Ansätze sind mehreren natürlichen Limitationen unterworfen. So sind Tumoren generell auch intraindividuell als äußerst heterogene und genetisch sehr dynamische Zellkonglomerate zu betrachten. Eine Immunantwort gegen ein spezielles Epitop, und sei sie noch so effizient, bekämpft unter Umständen nur eine Subpopulation der Tumorzellen. Weiter ist

davon auszugehen, dass Tumorzellen, analog dem in der Chemotherapie beobachteten Phänomen der Medikamentenresistenz, unter dem Selektionsdruck einer effizienten Immuntherapie „immunresistente Klone“ ausbilden werden, die also z.B. das entsprechende T-Zellepitop nicht mehr präsentieren. Zusätzlich ist eine große Vielfalt spezieller „Fluchtmechanismen“ des Tumors vor dem Immunsystem (*immune escape*) beschrieben, so zum Beispiel die Induktion von Anergie der T-Lymphozyten, die Herabregulierung der MHC-Expression, die Resistenz gegen verschiedene proapoptotische Signale, die Stimulation apoptotischer Kaskaden in Immunzellen und die Sekretion immunmodulatorischer Zytokine u.v.a. (54;358;425).

Weiter muss davon ausgegangen werden, dass Patienten, die an fortgeschrittenen Malignitäten leiden aufgrund der Kachexie generell deutlich in ihrer Fähigkeit eine effiziente Immunantwort zu generieren eingeschränkt sind.

Zur Überwindung dieser Hindernisse bieten sich generell multimodale Therapiekonzepte mit mehreren Zielstrukturen, also z.B. mehreren Vaccinierungspeptiden, oder die Kombination der Immuntherapie mit pharmakologischen Therapien an. Wenig erfolgversprechend erscheint in diesem Zusammenhang allerdings die Kombination von Vaccinierungsstrategien mit etablierten chemo- oder radiotherapeutischen Regimen, da durch diese generell eine Kompromittierung des Immunsystems zu erwarten ist.

Wenig ist bekannt über das Risiko der Auslösung einer Autoimmunität im Rahmen von Immuntherapien. Generell wird dieses Risiko jedoch als recht niedrig eingestuft, wiederholt beobachtet wurde bisher lediglich das Auftreten einer Vitiligo als Nebenwirkung der Immuntherapie des Melanoms. Gogas *et al.* konnten 2006 in einer prospektiven Studie jedoch zeigen, dass im Rahmen der unspezifischen Immuntherapie des Melanoms mit Interferon- α 2b 26% der Patienten serologisch oder klinisch Zeichen der Autoimmunität entwickeln, dass diese aber auch eine deutlich bessere Prognose hinsichtlich des Gesamtüberlebens haben (131).

Auch methodische Limitationen der Immuntherapie sind zu nennen. So ist von einer ausgeprägten interindividuellen Heterogenität von Neoplasien auf

genetischer und molekularer Ebene auszugehen, auch dann wenn sie derselben pathologischen Entität angehören. Dies hat zur Folge, dass Impfstoffe in ihrer Zusammensetzung im Idealfall auf den entsprechenden Patienten bzw. dessen Tumor und dessen Tumorgenetik zugeschnitten sein müssen. Weiter verkompliziert sich die Situation bei HLA-restringierten Peptidvaccinen. Hier ist zusätzlich die HLA-Typisierung des Patienten bei der Zusammenstellung der Peptidvaccine zu beachten, was ein umfassendes Wissen über immunogene Tumorepitope erfordert. Diese Faktoren führen dazu, dass, je nach Protokoll der Immuntherapie eine umfassende Diagnostik hinsichtlich der Genetik, der HLA-Typisierung und im Idealfall auch der Peptidanalytik erforderlich ist. Zudem ist die Impfstoffherstellung, insbesondere dann wenn es sich um protein- oder zellbasierte Strategien handelt, zeit-, arbeits- und kostenintensiv.

1.2. Das Nierenzellkarzinom

1.2.1. Nierentumoren

Primäre Nierentumoren werden systematisch nach ihrem Ursprungsgewebe in Neoplasien mesenchymalen und Neoplasien epithelialen Ursprungs eingeteilt. Des Weiteren erfolgt die Einteilung nach ihrem Wachstumsverhalten in benigne und maligne Geschwulste. Eine systematische Einteilung aller Nierentumoren und tumorähnlicher Veränderungen der Niere geht auf F. Mostofi zurück (271;272).

Neoplasien der ableitenden Harnwege, des Nierenbeckens und der Harnleiter betreffen häufig auch die Niere, sind jedoch anderen feingeweblichen Ursprungs und sollen daher in der vorliegenden Darstellung nicht behandelt werden, das gleiche gilt für Nierenmetastasen anderer Primärtumore.

In der Häufigkeit überwiegen die Neoplasien epithelialen Ursprungs bei weitem, epitheliale Neoplasien der Niere sind das gutartige Nierenrindenadenom und das gutartige Onkozytom, das Nierenzellkarzinom ist die maligne epitheliale Neoplasie der Niere. Epitheliale Neoplasien der Niere entstehen aus dem tubulären System der Niere, mesenchymale Tumore der Niere haben ihren

histologischen Ursprung in Fettgewebe, Blutgefäßen, glatten Muskelzellen und Binde- und Stützgewebe der Niere. Dementsprechend umfasst das Spektrum benigner mesenchymaler Nierentumore unter anderen Angiome, Leiomyome, Lipome, Neurinome, Fibrome sowie Mischtumoren der genannten Gewebe. Sarkome, maligne mesenchymale Neoplasien können ebenso aus allen genannten Geweben entstehen. Insgesamt sind mesenchymale Tumore der Niere sehr viel seltener als epitheliale.

Eine Sonderstellung innerhalb der Nierentumore nimmt das Nephroblastom (syn. Wilms-Tumor) ein. Hierbei handelt es sich um ein malignes embryonales nephrogenes Geschwulst. Ungefähr 0,01% der lebendgeborenen Kinder sind betroffen, der Altersgipfel liegt im 2. und 3. Lebensjahr. Die Pathogenese des Nephroblastoms ist relativ gut erforscht, vier Gene sind bekannt, die mit der Entstehung des Nephroblastoms assoziiert sind, *Wilms Tumor-1* bis *Wilms Tumor-4* (WT1 bis WT4; Entrez Gene: 7490, 7491, 8136, 8151). Bei WT1 handelt es sich um ein Tumorsuppressorgen, dessen Genprodukt durch Interaktion mit der DNA die Expression verschiedener Wachstumsfaktoren unterdrückt. Entsprechend führt der Verlust beider Allele von WT1 zur Expression dieser Wachstumsfaktoren, ein Mechanismus der eine zentrale Rolle in der Pathogenese des Nephroblastoms spielt.

1.2.2. Epidemiologie des Nierenzellkarzinoms

Das Nierenzellkarzinom (engl.: *renal cell carcinoma*, RCC) ist mit 80-90% die häufigste Neoplasie der Niere und macht rund 3% aller malignen Geschwulste des Menschen aus. Im Jahre 2006 wurden für die Vereinigten Staaten von Amerika 38.890 Neuerkrankungen am Nierenzellkarzinom sowie 12.800 nierenzellkarzinomassoziierte Todesfälle geschätzt, wobei zwei Drittel der Erkrankungen Männer, ein Drittel Frauen betraf (180). In Deutschland wird die Inzidenz mit 6-7 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr angegeben, wobei ein Anstieg der Neuerkrankungsrate wahrscheinlich ist (447). Dieser Anstieg der Inzidenz wurde bereits für die USA nachgewiesen (295).

Das Nierenzellkarzinom kommt in allen ethnischen Gruppen vor, allerdings sind international deutliche Unterschiede in der Inzidenz zu verzeichnen. Tabelle 1

zeigt die von *Cancer Mondial, International Agency for research on Cancer* (298) in der Datenbank *Globocan2002^a* veröffentlichten altersstandardisierten, weltstandardisierten Inzidenzraten (ASR(w)) ausgewählter Staaten pro 100.000 Einwohner. Die Zahlen zeigen die theoretischen Inzidenzen wenn die untereinander verglichenen Länder alle die gleiche demographische Struktur (world-standard-population) hätten. Dabei wurde die weltweit höchste Inzidenzrate für Estland geschätzt, weiter zeigten sich die vergleichsweise höchsten Inzidenzraten in den industrialisierten Staaten. Die Neuerkrankungswahrscheinlichkeit für das Nierenzellkarzinom steigt ab dem 35. Lebensjahr kontinuierlich an und erreicht ihr Maximum in der 7. Lebensdekade (46). Das mediane Erkrankungsalter liegt bei 66 Jahren, das mediane nierenzellkarzinomassoziierte Todesalter bei 70 Jahren.

Tabelle 1: Altersstandardisierte, weltstandardisierte geschätzte Inzidenzraten (ASR(w)) des Nierenzellkarzinoms in ausgewählten Staaten. *Cancer Mondial, International Agency for research on Cancer*

<i>Land</i>	<i>Inzidenzrate ASR(W) pro 100.000 Einw.</i>
Estland	17.3
USA	12.8
Deutschland	12.3
Australien	11.6
Russische Föderation	10.5
Frankreich	10.4
Großbritannien	8.6
Japan	6.1
Brasilien	3.4
Indien	1.2
Angola	0.3

1.2.3. Pathologie, Systematik und Stadieneinteilung des Nierenzellkarzinoms

Pathohistologische und molekularbiologische Einteilung des Nierenzellkarzinoms:

Histologisch werden verschiedene Phänotypen des Nierenzellkarzinoms differenziert, die sich hinsichtlich ihrer Häufigkeit und ihrer pathologischen Charakteristika unterscheiden. Es existieren mehrere histologische Klassifikationssysteme für diese Phänotypen, die sich zum Teil nur im Detail

^a Globocan2002: www-dep.iarc.fr

und in der Nomenklatur unterscheiden. Maligne epitheliale Neoplasien der Niere werden gemäß der histologischen Klassifikation renaler Tumoren der *Union Internationale Contre le Cancer* (UICC) und des *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (387) sowie nach der „*Heidelberger Klassifikation*“ (210) typisiert. Diese Klassifikationssysteme unterscheiden 5 Phänotypen des Nierenzellkarzinoms:

1. Conventional (clear cell) renal carcinoma (Dt.: Klarzelliges N.-Karzinom)
2. Papillary renal cell carcinoma (Dt.: papilläres oder chromophiles Nierenzellkarzinom)
3. Chromophobe renal carcinoma (Dt.: Chromophobes N.-Karzinom)
4. Collecting duct carcinoma (Dt.: Sammelrohr-, oder Ductus Bellini-Karzinom)
5. Renal cell carcinoma, unclassified (Dt.: Unklassifizierbares N.-Karzinom)

Insbesondere im deutschsprachigen Raum hat weiterhin die von W. Thoenes vorgeschlagene „*Mainz-Klassifikation*“ (399;400) Bedeutung. Neben den oben genannten Phänotypen werden hier noch weitere untergeordnete Varianten unterschieden.

In der vorliegenden Arbeit werden lediglich Termini der UICC/AJCC-Klassifikation, beziehungsweise die oben gezeigten, gebräuchlichen deutschen Übersetzungen verwendet. Insbesondere wird der Terminus „papilläres Nierenzellkarzinom“ verwendet, und nicht der im deutschen Sprachgebrauch häufig verwendete, und aus der Mainzer Klassifikation stammende Begriff „chromophiles Nierenzellkarzinom“.

Als Abkürzung für den Terminus „Nierenzellkarzinom“ wird in der vorliegenden Arbeit regelhaft „RCC“ (engl.: renal cell carcinoma) verwendet.

Das klarzellige Nierenzellkarzinom ist mit 70-80% der häufigste histologische Phänotyp. Ursprungszellen sind die Epithelzellen des proximalen Tubulus. In Routineschnitten stellt sich das klarzellige RCC mit polygonalen Zellen mit wasserklarem Zytoplasma dar, vereinzelte eingesprengte Areale mit eosinophilen Zellen sind häufig anzutreffen. Der Zellkern stellt sich zumeist

klein und rund dar. Weiter charakteristisch ist ein feines, stark verzweigtes, fragiles Gefäßsystem der Tumoren. Makroskopisch finden sich zystische neben soliden Arealen in klarzelligen RCCs. Häufige molekulargenetische Alterationen in klarzelligen RCCs sind die Deletion des kurzen Arms von Chromosom 3 (3p) (212), sowie somatische Mutationen und epigenetische Veränderungen (Hypermethylierung) die das von Hippel-Lindau (VHL) Gen betreffen (130), und die sich in 50-60% der Tumoren finden. Weiter ist bekannt, dass der Verlust des langen Arms von Chromosom 14 (14q) mit steigender Aggressivität des Tumors einhergeht (446).

Der zweithäufigste mikroskopische Phänotyp des Nierenzellkarzinoms ist mit 10-15% das papilläre Nierenzellkarzinom. Namensgebend war die feingewebliche papilläre Architektur des Tumors. Die Zellen dieser Papillen haben heterologe Größen und zeigen ein unterschiedliches Färbeverhalten. Häufig finden sich dystrophische Verkalkungen (Psammom-Körper). Trisomien sind charakteristische genetische Alterationen des papillären RCCs, hierbei finden sich insbesondere Trisomien der Chromosomen 3, 7, 12, 16, 17 und 20 (209;211). Diese Trisomien sind derart typisch für das papilläre RCC, dass sie nach der UICC/AJCC-Klassifikation praktisch zu den Diagnosekriterien gezählt werden. Eine weitere häufige genetische Alteration dieses Nierenkarzinomphänotyps ist der Verlust des Y-Chromosoms. Ursprungsgewebe des papillären Nierenzellkarzinoms sind, wie beim klarzelligen auch, die Epithelzellen des proximalen Tubulus.

Bei den chromophoben Nierenzellkarzinomen handelt es sich mit ca. 5% relativer Häufigkeit um den dritthäufigsten Phänotyp. Zellen dieser Entität haben zumeist ein blasses Zytoplasma das sich jedoch charakteristischerweise mit der *Hale-Färbung* kräftig blau anfärben lässt (399). In Routinefärbungen kondensiert das Zytoplasma zumeist an der Zellmembran und hinterlässt damit einen charakteristischen Halo um den Zellkern. Das chromophobe Nierenzellkarzinom entsteht, anders als das klarzellige und das papilläre, im distalen Tubulus. Häufige Erbgutveränderungen in chromophoben Nierenzellkarzinomen sind Chromosomenverluste und daraus resultierende

Monosomien insbesondere der Chromosomen 1, 2, 6, 10, 13, 17 und 21 (2;373).

Sammelrohrkarzinome sind äußerst selten, sie stellen <1% der Resektate. Namensgebend ist ihr Ursprungsgewebe, das Epithel des Sammelrohres. Morphologische Kriterien für diesen Phänotyp sind weit weniger etabliert als für die bereits dargestellten Vertreter, mikroskopisch finden sich irreguläre Kanälchen mit atypischem Epithel, häufig eingebettet in inflammatorisch und desmoplastisch verändertem Stroma (111). Typische molekulargenetische Veränderungen dieses Phänotyps sind nicht etabliert.

Das unklassifizierbare Nierenzellkarzinom findet sich als histopathologische Diagnose schließlich in ca. 3-5% der rezierten malignen Nierentumoren.

Der histologische Phänotyp des Nierenzellkarzinoms hat sich als Prognosefaktor für den Krankheitsverlauf erwiesen, wobei eine chromophobe Histologie mit einer vergleichsweise guten Prognose verbunden ist, die Überlebensraten sinken in der Reihenfolge papilläres-, klarzelliges-, unklassifizierbares Nierenzellkarzinom (6).

Insgesamt muss in pathologischer wie auch in klinischer Hinsicht der Begriff „Nierenzellkarzinom“ als Überbegriff über verschiedene maligne neoplastische Erkrankungen der Niere verstanden werden, die sich hinsichtlich ihrer Prognose aber insbesondere auch hinsichtlich ihrer molekularbiologischen Entstehungsmechanismen unterscheiden.

Von den vielen molekularpathologischen Mechanismen die der Entstehung des Nierenzellkarzinoms zu Grunde liegen sei ein einziger hier namentlich genannt, zum einen weil er als zentraler Mechanismus in der Entstehung des klarzelligen Nierenzellkarzinoms angesehen wird, zum anderen weil er von zentraler Bedeutung für das Verständnis der Dysregulation verschiedener immuntherapeutisch wichtiger tumorassoziierter Antigene ist: Es wird angenommen, dass, neben der von-Hippel-Lindau-Erkrankung, insbesondere klarzellige Nierenzellkarzinome durch eine Mutation des von *Hippel-Lindau tumor suppressor Genes* (VHL) mitverursacht werden. Das VHL-Protein ist essentieller Bestandteil des VEC genannten E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes.

VEC spielt eine zentrale Rolle in der schnellen Degradation des konstitutiv exprimierten *hypoxia-inducible factor* (HIF) unter normoxischen Bedingungen. HIF wirkt als Transkriptionsfaktor, der, wenn er physiologischerweise unter hypoxischen Bedingungen nicht abgebaut wird zu einer Reaktion des zellulären Stoffwechsels auf Transkriptionsebene führt. Folge des mutierten VHL-Proteins ist ein defekter VEC und damit eine verminderte Degradation und somit erhöhte Konzentration von HIF in der RCC-Zelle, was wiederum zur Deregulation der Transkription und anderer zellulärer Prozesse führt (294;390). Dieser Mechanismus führt auch zur Hochregulation verschiedener immunologisch relevanter tumorassoziierter Antigene wie dem MET-Protoonkogen, dem Adipophilin und der Carboanhydrase 9 (u.a.) die im Ergebnis- und Diskussionsteil (Kap. 4.3.2) dieser Arbeit ausführlich thematisiert werden.

Klinisch-pathologische Stadieneinteilung des Nierenzellkarzinoms:

Die histologische Bestimmung des Grades der Entdifferenzierung, das „grading“ erfolgt beim Nierenzellkarzinom analog zum grading anderer solider Tumoren ebenfalls nach dem von der UICC/AJCC vorgeschlagenen System. Dabei steht das Kürzel „G“ für „*histologic grade*“. In ihrer Klassifikation von 2002 (AJCC Cancer Staging Handbook, 6. Edition, Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo, 2002) definierte die UICC/AJCC die Entdifferenzierungsgrade des Nierenzellkarzinoms folgendermaßen:

- GX Ein Entdifferenzierungsgrad kann nicht angegeben werden
- G1 Gut differenziertes Nierenzellkarzinom
- G2 Moderat differenziertes Nierenzellkarzinom
- G3-4 schlecht bis undifferenziertes Nierenzellkarzinom

Neben dem dargestellten Grading-System existieren noch weitere, z.B. im Rahmen der Mainz-Klassifikation oder das Erlanger-Grading, die weitere Aspekte der Tumormorphologie berücksichtigen. Auf diese Systeme soll hier jedoch nicht weiter eingegangen werden.

Die klinische Einteilung des Krankheitsstadiums erfolgt für das Nierenzellkarzinom, wie auch für die meisten anderen soliden Tumore anderer Organe, mit Hilfe des vom *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) publizierten TNM-Systems. Dabei handelt es sich um ein mehrdimensionales Klassifikations- und Verschlüsselungssystem, das in den drei Dimensionen Primärtumor (T), regionäre Lymphknotenmetastasen (N) und Fernmetastasen (M) die Ausprägung einer malignen Neoplasie verschlüsselt. In älteren Fassungen der TNM-Klassifikation existiert für das Nierenzellkarzinom noch eine weitere Dimension, die den Befall der großen abdominalen und thorakalen Venen (V) beschreibt, diese Dimension wurde jedoch in der aktuellen Auflage in die Dimension „T“ integriert. Tabelle 2 zeigt die TNM-Klassifikation für das Nierenzellkarzinom in der aktuell geltenden Auflage von 2002 (AJCC Cancer Staging Handbook, 6. Edition, Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo, 2002). Hierbei muss insbesondere beachtet werden, dass als Lymphknotenmetastasen (L) nur Metastasen in renal-hilären, paracavalen, aortalen und retroperitonealen Lymphknoten angesehen werden. Metastasen in Lymphknoten anderer Regionen gelten als Fernmetastasen. Die Festlegung des pathologischen N-Stadiums bedarf der Diagnostik von mindestens 8 resezierten Lymphknoten.

Fernmetastasen (M) des Nierenzellkarzinoms bevorzugen folgende Organe (Mehrfachnennungen möglich):

55% Lunge,
35% retroperitoneale und mediastinale Lymphknoten,
33% Leber
32% Knochen
11% kontralaterale Niere
5% ZNS
5% Herz

Tabelle 2: TNM-Klassifikation des Nierenzellkarzinoms, 2002 (AJCC Cancer Staging Handbook, 6. Edition, Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo, 2002)

<i>TNM</i>	<i>UICC 2002 Definition</i>
<i>T = Primärtumor</i>	
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt auf Primärtumor
T1	Tumor durchmisst maximal 7 cm in seiner größten Ausdehnung, ist begrenzt auf Niere T1a Tumor durchmisst maximal 4 cm in seiner größten Ausdehnung T1b Tumor durchmisst mehr als 4 cm, jedoch maximal 7 cm in seiner größten Ausdehnung
T2	Tumor durchmisst mehr als 7 cm, ist jedoch auf die Niere begrenzt
T3	Tumor infiltriert perirenale Strukturen, jedoch durchbricht er nicht die Gerota-Faszie T3a Tumor infiltriert die Nebenniere oder perirenales Fettgewebe T3b makroskopische Ausbreitung in Nierenvene(n) oder Vena cava caudal des Zwerchfells T3c Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in Vena cava cranial des Zwerchfells
T4	Tumor durchbricht die Gerota-Faszie.
<i>N = regionäre Lymphknoten, (engl. Nodes, lat. Noduli)</i>	
Nx	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase in einem regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in mehr als einem regionären Lymphknoten
<i>M = Fernmetastasen</i>	
Mx	Vorhandensein von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen vorhanden
M1	Fernmetastasen vorhanden

Die einzelnen Ausprägungen der TNM-Klassifikation wurden für das Nierenzellkarzinom zu vier Krankheitsstadien zusammengefasst. Diese Stadieneinteilung ist in Tabelle 3 wiedergegeben. Neben der Stadieneinteilung nach UICC existieren noch weitere, alternative Stadieneinteilungen z.B. nach Flocks (112) und nach Robson (326) die regional unterschiedliche Bedeutung haben, auf die hier jedoch nicht weiter eingegangen werden soll.

In dieser Arbeit wird ausschließlich die Terminologie der UICC TNM-Klassifikation 2002 verwendet.

Tabelle 3: Stadieneinteilung des Nierenzellkarzinoms nach UICC (Union Internationale Contre le Cancer).

<i>UICC-Stadium</i>	<i>UICC 2002 TNM-Klassifikation</i>		
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
IV	T4	N0, N1	M0
	Jedes T	N2	M0
	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle 4: Prognosestratifizierung des Nierenzellkarzinoms: Stadienabhängige (UICC) Fünfjahresüberlebensraten in Serien verschiedener Autoren.

<i>Größere Serien verschiedener Autoren</i>	<i>5J Überleben in %, nach TNM Stadium</i>			
	I	II	III	IV
Javidan <i>et al.</i> 1999 (178)	95	88	59	20
Tsui <i>et al.</i> 2000 (404)	91	74	67	32
Kinouchi <i>et al.</i> 1999 (200)	96	95	70	24
Stein <i>et al.</i> 1998 (377)	95	85	60	23
Ficarra <i>et al.</i> 2002 (103)	94	90	63	28

Die UICC-Stadieneinteilung kann zur Prognosestratifizierung genutzt werden: Tabelle 4 zeigt die stadienabhängigen Fünfjahresüberlebensraten in Serien verschiedener Autoren. Dabei muss angemerkt werden, dass die oben gezeigte UICC-Stadieneinteilung von 2002 auch hier angewendet werden kann, obwohl einige Publikationen älter sind, weil alle Veränderungen im TNM-System seit 1997 ohne Einfluss auf die Stadieneinteilung blieben. Aus den Zahlen der verschiedenen Publikationen kann abgeleitet werden, dass es sich bei einem lokalisierten Nierenzellkarzinom im Stadium I um ein therapeutisch gut beherrschbares Krankheitsbild handelt, kommt es jedoch zur Ausbreitung jenseits der Niere (Stadium III und insbesondere Stadium IV) so ist die Prognose trotz jeder Art von therapeutischer Bemühung als schlecht einzustufen. Betrachtet man alle Tumorstadien gemeinsam, so ist, historisch gesehen, eine Verdoppelung der Fünfjahresüberlebensraten im Zeitraum von 1954 (34% 5J-ÜLR) bis 1996 (62% 5J-ÜLR) zu verzeichnen. Laut Pantuck *et al.* (295) ist diese Entwicklung insbesondere zwei Einflüssen zu verdanken,

nämlich zum einen der Standardisierung und Verbesserung der Technik der Radikalen Nephrektomie und der operativen Verfahren generell ab den sechziger Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts, zum anderen der Einführung und Verbreitung sensitiver Diagnoseverfahren wie Sonographie, Computertomographie und Magnetresonanztomographie in den achtziger und neunziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts.

1.2.4. Klinik und Diagnostik des Nierenzellkarzinoms

Das Nierenzellkarzinom ist besonders in frühen Stadien symptomarm und einer nichtaparativen klinischen Diagnostik nur wenig zugänglich. Die klassische Symptomentrias der nephrogenen Neoplasie besteht aus Flankenschmerz, Hämaturie und tastbarer abdomineller Raumforderung. Anzumerken ist, dass all diese Symptome als Spätsymptome einzuordnen sind, die auf ein fortgeschrittenes Tumorstadium hinweisen, eine tastbare Raumforderung bedeutet in der Regel Inoperabilität. Weitere klinische Symptome des RCCs sind ein unspezifischer Gewichtsverlust, Fieber, arterielle Hypertonie, sowie die Varikozele testis, insbesondere des linken Hodens bei Kompromittierung des venösen Abstroms aus dem Hoden via Vena testicularis und Vena renalis.

Als mögliche laborchemische Symptome des Nierenzellkarzinoms sind eine Beschleunigung der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG) sowie eine Tumoranämie zu nennen.

Weiter können aufgrund von inkretorischer Aktivität der Nierenzellkarzinome zum Teil paraneoplastische Syndrome beobachtet werden, so kann es Hyperkalziämie (Parathormon-related protein, PTH), Hypertonie (Renin) oder Polyglobulie (Erythropoetin, EPO) kommen. Das bekannteste paraneoplastische Syndrom bei Nierenzellkarzinom jedoch ist das Stauffer-Syndrom, das als paraneoplastische Leberfunktionsstörung aufzufassen ist. Hierbei kommt es neben einer BSG-Beschleunigung zu erhöhten Werten für α -2-Globulin, alkalische Phosphatase (AP) und der γ -Glutamyltransferase (gGT) sowie zu einer Hypalbuminämie und einer Erniedrigung des Quickwertes als Ausdruck der eingeschränkten hepatischen Funktion.

All diese klinischen Symptome sind weder spezifisch noch besonders sensitiv, insbesondere deswegen sind in der modernen Diagnosestellung die bildgebenden Verfahren von größter Bedeutung.

Für die renale Sonographie als Suchverfahren auf ein Nierenzellkarzinom wird die Sensitivität mit mindestens 82% (107), teilweise auch deutlich höher angegeben. Die Durchführung als Dopplersonographie kann den Informationsgewinn insbesondere hinsichtlich einer Gefäßinvasion noch deutlich steigern.

Besonders in der Ausbreitungsdiagnostik (Staging) und in der OP-Planung sind neben der klassischen Röntgendiagnostik die modernen Schnittbildverfahren Computertomographie (CT) oder alternativ Magnetresonanztomographie (MRT) heute unverzichtbarer und hochsensitiver Standard. Weitere bildgebende Verfahren, die die moderne Diagnostik ergänzen, sind die Angiographie, die Cavographie, die Nierenfunktionsszintigraphie, die Skelettszintigraphie und andere nuklearmedizinische Verfahren. Diese modernen diagnostischen Möglichkeiten führten dazu, dass mehr Karzinome in früheren Stadien diagnostiziert werden, wurden noch in den frühen 1970er Jahren nur 10% der RCCs in asymptomatischen Stadien diagnostiziert (368), so waren es 1998 bereits 61% (179).

Viele experimentelle Bestrebungen wurden unternommen, einen im Serum nachweisbaren Tumormarker zur Diagnose und Verlaufsbeurteilung des Nierenzellkarzinoms zu definieren, unter den diskutierten Markern ist z.B. TuM2-Pk (433), jedoch ist aktuell kein Serummarker in der klinischen Standarddiagnostik etabliert.

1.2.5. Etablierte und experimentelle Therapieverfahren des Nierenzellkarzinoms

Die klassische Therapie des Nierenzellkarzinoms ist die radikale Nephrektomie durch Exzision der Gerotaschen Faszie und ihres Inhalts unter Mitnahme des perirenen Fettgewebes mit ipsilateraler Adrenaektomie und regionaler Lymphadenektomie. Diese Operation wurde 1963 und 1969 durch Robson *et al.* publiziert (325;326) und stellte einen Meilenstein in der Therapie des

Nierenzellkarzinoms dar. Noch heute kann die radikale Nephrektomie als Standardtherapie des lokalisierten Nierenzellkarzinoms gelten, wobei im Zeitalter der hochsensitiven bildgebenden Diagnoseverfahren Modifikationen hinsichtlich der Ausdehnung der Operation angewandt werden. So ist z.B. der Stellenwert der ipsilateralen Adrenaektomie umstritten (403). Bei kleinen, monofokalen Tumoren (T1) und insbesondere bei Funktionseinschränkung der kontralateralen Niere werden in individuellen Fällen organerhaltende Operationen („Nephronsparend“) im Sinne einer Tumorenukleation durchgeführt. Dabei sind die Ergebnisse bei entsprechend kleinen Tumoren mit jenen der radikalen Nephrektomie vergleichbar (102;232;380). Besonderen Indikationen vorbehalten und nicht als Standardtherapie anzusehen sind Extremvarianten wie „Work-bench-Operationen“ mit Explantation der Niere, *ex vivo* Präparation und Resektion des Tumors und anschließender Replantation der Restniere (303;304).

Im Gegensatz zu den guten Ergebnissen der chirurgischen Therapie des Nierenzellkarzinoms im lokalisierten Stadium sind die Therapieoptionen bei generalisierter, also metastasierter Krankheit stark eingeschränkt, da sich sowohl chemotherapeutische als auch strahlentherapeutische Therapieansätze als wenig wirksam erweisen.

1995 publizierte Yagoda *et al.* eine Metaanalyse, die 3502 an metastasiertem Nierenzellkarzinom erkrankte und chemotherapeutisch behandelte Patienten umfasste. In diesem Kollektiv konnten lediglich in 197 Patienten (5,6%) eine Wirksamkeit der Chemotherapeutika im Sinne einer kompletten oder partiellen Remission nachgewiesen werden (448). Tabelle 5 zeigt einige ausgewählte Chemotherapeutika bzw. deren Kombinationen mit den zugehörigen Remissionsquoten. Da die höchsten in anerkannten Studien gemessenen Ansprechraten für Monosubstanzen und auch für Kombinationen nur zwischen 10-20% lagen, spielt die Chemotherapie weder als Mono- noch als Kombinationstherapie eine Rolle in der Therapie des Nierenzellkarzinoms (152).

Tabelle 5: Ansprechraten einzelner Chemotherapeutika und deren Kombinationen im Nierenzellkarzinom. Modifiziert nach Yagoda *et al.* 1995 (448)

Monosubstanz oder Kombination	Anzahl der Patienten in der Studie	Remissionsquoten [%]
Carboplatin	37	0
Epirubicin	39	0
Floxuridine	265 ; 65	15 ; 12
5-Flourouracil	94	10
Gemcitabine	48	8
Ifosphamid	36	3
Lonidamin	63	9
Mitoguazone	184	6
Vinorelbine	38	3
Paclitaxel	18	0
Taxotere	33	6
Teniposid	95	4
6-Thioguanin	30	7
Vinblastin	137 ; 26	7 ; 4
Topotecan	15	0
Cyclophosphamid + Mitronidazol	31	3
Floxuridin + Vinblastin	11	18
5-Fluorouracil + Leukoverin	14	0
Mitoguazon + Melphalan	16	0
Vinblastin + Adriamycin	28	14
Hydroxyurea + Vinblastin	16	19

Auch die Strahlentherapie spielt eine untergeordnete Rolle in der Behandlung des Nierenzellkarzinoms. Weder für die präoperative (186;437) noch für die postoperative Strahlentherapie konnte eine signifikante Prognoseverbesserung gezeigt werden (108;202). Einzige Ausnahme in diesem Zusammenhang scheinen Patienten in fortgeschrittenen Tumorstadien (T3) zu sein, die lokal nur bedingt operabel sind. Für dieses Patientengut wurde eine Prognoseverbesserung durch postoperative Strahlentherapie nachgewiesen (379). Alternative radiotherapeutische Verfahren stellen die intraoperative Strahlentherapie (93) und die Brachytherapie in Afterlodgingtechnik (217) dar, für beide Methoden sind positive Effekte beschrieben, allerdings ist die Datenlage dürftig.

Anders als in der kurativen Therapie, in der die Radiatio eine untergeordnete Rolle spielt, ist in der palliativen Therapie die Bestrahlung von Metastasen eine wirksame Methode zur Schmerzbekämpfung und Verbesserung der Lebensqualität. Insbesondere für die Bestrahlung von Skelett- und Hirnmetastasen existieren verschiedenste Protokolle (305).

Neben den genannten klassischen radiologischen Methoden gewinnen auch neuere wie die Radiofrequenzablation aufgrund vielversprechender Ergebnisse zunehmend an Bedeutung (165).

Bessere Ergebnisse als die herkömmliche Chemotherapie oder die Radiotherapie liefern immuntherapeutische Ansätze bei der Behandlung des Nierenzellkarzinoms. Unspezifische immunstimulatorische Therapien mit Interleukin 2 (IL-2) und Interferon- α gehören inzwischen zum Standard in der Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms, bereits Anfang der 1990er Jahre wurden die ersten klinischen Erfahrungen mit diesen Substanzen gesammelt. Tabelle 6 zeigt eine Auswahl von klinischen Studien mit verschiedenen Therapieregimen, die IL-2 und Interferone beinhalten. Auf eine detaillierte Angabe von Dosierungen soll in dieser Arbeit mit Verweis auf die Originalliteratur verzichtet werden. Je nach Therapieschema kann mit einer Ansprechrates von 10-20% gerechnet werden, wobei die Therapie mit IL-2 die besseren Ergebnisse zu liefern scheint (48;105), insbesondere im Hinblick auf die Dauer der Remission.

Tabelle 6: Studien verschiedener Autoren zur Ansprechrates der unspezifischen immunstimulatorischen Therapien mit Interferon- α und Interleukin 2

<i>Klinische Studie</i>	<i>Patientenanzahl Versuchsgruppe</i>	<i>Therapeutika</i>	<i>Complete response / Partial response (overall response rate)</i>
Gebrosky 1997 (124)	21	5-FU + IFN-a-2b	4/5 (43%)
Buzio 1997 (52)	21	IL-2 + IFNa	1/3 (17%)
Buzio 2001 (51)	50	IL-2 + IFNa	1/5 (12%)
Savage 1997 (341)	24	5-FU + IL-2	1/3 (17%)
Hofmockel 1997 (169)	23	IFN-a-2b	0/1 (4%)
Negrier 1998 (280)	138	IL-2	1/3 (3%)
Negrier 1998 (280)	147	IFN-a-2a	2/7 (6%)
Negrier 1998 (280)	140	IL-2 + IFN-a-2a	5/14 (14%)
Mc Dermott 2005 (256)	91	IL-2 + IFN-a-2b	3/6 (10%)
Mc Dermott 2005 (256)	95	IL-2 high dose	8/14 (23%)
Dutcher 2000 (89)	50	IL-2 + IFN-a-2b + 5-FU	2/7 (18%)

Unglücklicherweise ist die Hochdosistherapie mit IL-2 mit deutlichen, auch schwerwiegenden Nebenwirkungen wie z.B. generalisierten Ödemen, Lungen- und Hirnödemen und Hirndrucksymptomatik verbunden, die ihren Einsatz limitieren. Die Behandlung mit rekombinantem humanen Interleukin 2 wurde nichtsdestotrotz aufgrund der gut dokumentierten Wirksamkeit bei Nierenzellkarzinom bereits 1992 durch die *Food and Drug administration* (FDA) der Vereinigten Staaten zur Therapie zugelassen. Aktuell werden in Deutschland mehr als 90% der Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom mit immunstimulatorischen Therapien behandelt. Neben den genannten Standardtherapien existiert eine Vielzahl von experimentellen Therapieansätzen. Vertreten sind praktisch alle modernen onkologischen Therapiestrategien wie unter anderem die Inhibition von Tyrosinkinase, die Antiangiogenese, die Gentherapie, Immunmodulation sowie der Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen bestimmte Oberflächenmoleküle. Die detaillierte Besprechung all dieser therapeutischen Strategien würde den Rahmen dieser Arbeit bei weitem sprengen, eine Übersicht über einen Teil der Substanzen, die in aktuellen Studien verwendet werden, ist nichtsdestotrotz in Tabelle 7 gegeben. Von den in der Tabelle genannten Stoffen sind zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit zwei Multityrosinkinaseinhibitoren für die Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms zugelassen: sowohl Sorafenib (Handelsname: Nexavar, Bayer) als auch Sunitinib (Handelsname: Sutent, Pfizer) konnten in großen, multizentrischen Studien ihre Wirksamkeit und Überlegenheit gegenüber Standardtherapie bzw Placebo zeigen (97;273), was im Juli bzw. September 2006 zur Zulassung der Medikamente in der Europäischen Union führte. Breite Aufmerksamkeit finden neben den genannten Therapieansätzen auch onkoimmunologische Strategien. Diesen liegt die Tatsache zugrunde, dass es dem Immunsystem grundsätzlich möglich ist entartete Zellen zu erkennen und zu bekämpfen.

Tabelle 7: Aktuelle experimentelle therapeutische Strategien im Nierenzellkarzinom

Wirkstoff	Stoffgruppe	Wirkmechanismus	Klinische Studien
Bevacizumab	mAb ^a	Bindet zirkulierendes VEGF	(234;278)
Cetuximab (C225)	mAb	Bindet EGFR	(93)
ABX-EGF	mAb	Bindet EGFR	(93;313)
cG250, WX-G250	mAb	Bindet CA9 (G250)	(229;291)
MDX-010	mAb	Bindet CTLA-4, aktiviert Lymphozyten	(244)
Imatinib	SMD ^b	Tkl ^c : c-kit, PDGFR, Bcr-Abl	(306;424)
PTK/ZK	SMD	Tkl: VEGF Rezeptor	(309)
Gefitinib (ZD1839), Erlotinib (OSI 774)	SMD	Tkl: EGFR	(181)
SU5416	SMD	Tkl: VEGF	(216;220)
CCI-779 und Rapamycinanaloga	SMD	Tkl: mTOR	(16;38)
Sunitinib (SU-011248)	SMD	Tkl: VEGFR, PDGFR, FLT3	(274;320)
Bortezomib (PS-341)	SMD	26S Proteasom Inhibitor	(205;332)
Sorafenib (BAY 43- 9006)	SMD	Kinaseinhibitor: RAF	(313;316)
Thalidomide und Analoga	SMD	Immunmodulatorische-, Antiangiogenetische Effekte	(224;251)
Bay 59-8862	Chemotherapie	Taxane	(94)
HSPPC-96	Vaccine	Stimuliert zytotoxische T-Zellen	(60;262)

Im Unterschied zu den unspezifischen immunstimulatorischen Therapien mit IL-2 und Interferon wird versucht mittels tumorspezifischer Strukturen eine Vaccine zu entwickeln, die eine Immunantwort gegen den Tumor hervorruft bzw. verstärkt. Verschiedene Strategien lassen sich unterscheiden:

1. Ganzzellvaccinen aus Tumorzellen:

Allogene oder autologe Tumorzellen werden *in vitro* expandiert, teilweise mit z.B. Zytokin-Genen transfiziert, bestrahlt um ein weiteres Wachstum zu verhindern, und anschließend unter der Vorstellung dem Patienten

^a mAb: engl.: monoclonal antibody, dt.: Monoklonaler Antikörper

^b SMD: engl.: small molecular drug

^c Tkl: Tyrosinkinaseinhibitor

infundiert, dass diese Zellen immunogen wirken und eine T-Zell-Antwort gegen im Körper vorhandene, vitale Tumorzellen auslösen. Diese Technik wurde insbesondere am Prostatakarzinom (90;367), Melanom (268;269) und kolorektalen Karzinom (149) studiert, aber auch in der Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms wurde diese Technik ausgiebig experimentell untersucht (63;101;396).

2. Vaccinen aus Nucleinsäuren

Obwohl bei Anfertigung dieser Arbeit keine Literatur zur Immuntherapie des Nierenzellkarzinoms mit Nucleinsäure-Vaccinen vorlag, sei auch dieser Ansatz hier genannt, da er als Onkoimmunologische Strategie zur Therapie verschiedener Tumore diskutiert wird. Die Effektivität von DNA-Vaccinen wurde unter anderem für das Influenza-Virus nachgewiesen (407;408), in der Tumorimmunologie existieren Daten zur Vaccinierung mit DNA hauptsächlich im Tiermodell (198;231;376). Vaccinen aus RNA wurden zur Immunotherapie des Melanoms vorgeschlagen (57;58;344).

3. Peptid-Vaccinen:

Peptide aus Tumorantigenen als die zentralen Zielstrukturen des T-Zellsystems werden Patienten alleine oder in Kombination mit verschiedenen Adjuvantien verabreicht und sind in der Lage eine T-Zellantwort gegen den Tumor auszulösen. Dabei findet sich in der Literatur eine Vielzahl von Studienprotokollen, die sich hinsichtlich der Neoplasie, der verabreichten Peptide, der Peptidkonzentrationen, der Darreichungsform und -häufigkeit sowie der verwendeten Adjuvantien unterscheiden. Eine umfassende Darstellung aller genannten Varianten wäre bei weitem zu umfangreich für diese Arbeit, Literatur kann hier nur beispielhaft genannt werden (113;128;333;345;346;382;406;428).

4. Vaccinen aus Hitzeschockproteinen:

Das Hitzeschockprotein gp96 bindet Peptide, unter ihnen auch immunogene Tumorpeptide, und kann eine T-Zell-Reaktion stimulieren. Vom autologen

Tumor isolierte Hitzeschockproteine gp96 werden Patienten als Vaccine verabreicht (heat-shock protein-peptide complex vaccine, HSPPC-96). Erfahrungen zu dieser Technik existieren in verschiedenen Tumoren, darunter das Melanom (26), das kolorektale Karzinom (255) und das Nierenzellkarzinom (60;74).

5. Vaccinen auf Basis dendritischer Zellen (DCs):

Dendritische Zellen (DC) sind effektive antigenpräsentierende Zellen. Sie lösen eine Immunantwort aus, indem sie T-Zellen Antigene in Form von Peptiden präsentieren. *Ex vivo* modifizierte und kultivierte DCs wurden vielfach in Vaccinierungsstudien bei verschiedenen Tumoren, darunter das Nierenzellkarzinom, eingesetzt. Dabei wurden DCs mit Tumorzelllysaten (170;281;291) oder spezifischen Peptiden aus Tumorantigenen beladen (62;293;440), oder sie wurden mit RNA (159;160;389) oder mit DNA (427) transfiziert, die für Tumorantigene kodierte, auch wurden DCs mit Tumorzellen (17;132) fusioniert. All diese Modifizierungen haben eine effektive Präsentation von Tumorantigenen auf DCs zum Ziel, die die Auslösung einer Immunantwort gegen den Tumor ermöglicht.

6. Adoptive Immuntherapie:

Die adoptive Immuntherapie nutzt, generell gesagt, die Transfusion allogener oder autologer immunkompetenter Zellen zur Therapie von Erkrankungen.

Die nichtmyeloablative Stammzelltransplantation (NST), die Transplantation von HLA-identen, allogenen Stammzellen ohne vorausgehende myeloablative Chemotherapie stammt aus der Therapie hämatologischer Neoplasien und wird in jüngster Zeit auch mit Erfolg bei soliden Tumoren, unter ihnen das Nierenzellkarzinom, angewendet (70;321;322;331).

Auch die Tatsache, dass Nierenzellkarzinome histopathologisch oft von Lymphozyten infiltriert sind (Tumordinfiltrierende Lymphozyten, TILs) wurde zum Design experimenteller Therapien herangezogen. Tumordinfiltrierende Lymphozyten wurden *ex vivo* expandiert und den Patienten reinfundiert.

Klinische Studien konnten jedoch auch für diese technisch sehr aufwändige therapeutische Strategie bisher keinen Vorteil gegenüber der unspezifischen Immuntherapie mit IL-2 zeigen (106).

Trotz der enormen Fortschritte im Verständnis der Tumorbilologie und -immunologie des Nierenzellkarzinoms gelang es bisher nicht dieses Wissen in gut wirksame Therapiestrategien umzusetzen, die zu einer deutlichen Prognoseverbesserung der metastasierten Krankheit führen.

1.3. Die akute myeloische Leukämie

1.3.1. Pathologie und Systematik der akuten myeloischen Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine klonale Neoplasie hämatopoetischer Stammzellen der myeloischen Reihe. Sie ist durch eine unkontrollierte Proliferation unreifer myeloischer Stammzellen, die als Blasten bezeichnet werden, gekennzeichnet. Die AML ist die bei weitem häufigste akute Leukose des Erwachsenenalters, die Inzidenz wird auf 2,5/100.000 Einwohner und Jahr geschätzt. Die AML ist eine Leukose des Alters, bei den Unterdreißigjährigen liegt die Inzidenz bei <1/100.000, bei den 75 Jährigen bei 14/100.000 (339;340). Durch die exzessive Vermehrung der Blasten kommt es zur Verdrängung der physiologischen Hämatopoese und dadurch zu Thrombozytopenie, Granulozytopenie und Anämie. Dieser Mechanismus und seine Folgen bestimmt auch die Symptomatologie der AML.

Der Begriff „akute myeloische Leukämie“ ist als Überbegriff über eine ganze Reihe verschiedener akuter klonaler Neoplasien der myeloischen Reihe zu verstehen, die sich hinsichtlich ihrer Pathogenese, ihrer Zytogenetik, ihrer Immunologie, ihrer Klinik und ihrer Prognose unterscheiden. Die gebräuchlichste pathologische Einteilung der AML ist die FAB-Klassifikation (French-American-British Classification) (27-30). Sie berücksichtigt zum einen die Morphologie der Blasten in der Papenheimfärbung, zum anderen verschiedene zytochemische Färbungen: Peroxidase (POX), unspezifische Esterase (EST) und Perjodschißsäure (PAS). Neben diesen klassischen

Methoden haben immunologische und zytogenetische Techniken einen festen Platz in der aktuellen Routinediagnostik und Subtypisierung der AML. Teilweise korrelieren einzelne zytogenetische und immunologische Phänotypen gut mit der FAB-Klassifikation, allerdings sind nur zwei zytogenetische Aberrationen spezifisch, pathognomonisch für einzelne FAB-Untergruppen: Die t(15;17) ist pathognomonisch für die AML M3 und, insbesondere wichtig für diese Arbeit, die inv(16) ist pathognomonisch für die AML M4eo. Die FAB-Klassifikation ist in Tabelle 8 dargestellt.

Parallel zur FAB-Klassifikation existiert die WHO-Klassifikation, die morphologische, molekulare und klinische Aspekte der Krankheit berücksichtigt (150).

Es sind verschiedene genetische Aberrationen in der akuten myeloischen Leukämie beschrieben, die hauptsächlich die Funktion von Transkriptionsfaktoren affektieren (238). So kodiert die für die AML M3 typische t(15;17) für ein Fusionsprotein, PML/RAR α , aus dem *retinoic acid receptor α* (RAR α) und dem *promyelocytic leukemia gene* (PML); die für die AML M4eo typische inv(16) sowie die häufig in der AML M2 gefundene t(8;21) führen beide zu Fusionsprodukten, die den *core-binding factor β* (CBF β) affektieren. Diese genetischen Veränderungen haben Einfluss auf die Prognose sowie die erforderliche Therapie.

In dieser Arbeit wurden lediglich Proben des Subtyps AML FAB M4eo verwendet, aus diesem Grunde soll hier auch nur die charakteristische chromosomale Veränderung dieses Subtyps, die inv(16) näher erläutert werden, andere häufige zytogenetische Veränderungen sind Tabelle 8 zu entnehmen. Die charakteristische zytogenetische Abnormalität der AML M4eo ist die Inversion eines Abschnitts auf dem langen Arm des Chromosom 16 (inv(16)) oder seltener ein Austausch der Allele (t(16;16)), wobei eine individuelle AML, in der die inv(16) nachgewiesen ist, nicht zwangsweise auch eine AML M4eo sein muss und nicht jede AML M4eo die inv(16) tragen muss.

Tabelle 8: FAB-Klassifikation der akuten myeloischen Leukämie. Modifiziert nach Lowenberg et al (240)

FAB	Morphologie	Zytochemie	Zytogenetik	Pathogenetisch bedeutsame Gene	Häufigkeit
M0	Akute myeloblastische Leukämie mit minimaler Differenzierung	POX - EST - PAS - SuB -	inv(3q26) und t(3;3) (1%)	EV11	2-3%
M1	Akute myeloblastische Leukämie ohne Ausreifung	POX + EST - PAS - SuB +			15-20%
M2	Akute myeloblastische Leukämie mit Ausreifung	POX + EST - PAS - SuB +	t(8;21) (40%) t(6;9) (1%)	AML1-ETO DEK-CAN	25-30%
M3	Akute promyelozytische Leukämie	POX + EST +/- PAS +/- SuB +	t(15;17) (98%) t(11;17) (1%)	PML-RAR α PLZF-RAR α NPM-RAR α	5-10%
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie	POX + EST + PAS +/- SuB +	11q23 (20%) inv(3q26) und t(3,3) (3%) t(6;9) (1%)	MLL DEK-CAN EV11	20-30%
M4eo	Akute myelomonozytäre Leukämie mit abnormalen Eosinophilen	POX + EST + PAS +/- SuB +	inv(16), t(16;16) (80%)	CBF β -MYH11	5-10%
M5	Akute monozytäre Leukämie	POX +/- EST + PAS +/- SuB -	11q23 (20%) t(8;16) (2%)	MLL MOZ-CBP	2-9%
M6	Akute erythroblastäre Leukämie, Erythroleukämie (Morbus DiGuglielmo)	POX + EST +/- PAS + SuB +			3-5%
M7	Akute megakaryozytäre Leukämie	POX - EST +/- PAS +/- SuB -	t(1;22) (5%)		3-12%

Bei dem Rearrangement der Inversion 16 ist der Transkriptionsfaktor *Core binding factor beta* (CBF β) auf dem langen Arm des Chromosoms 16 (Bande q22) mit dem Gen für die schwere Kette des Myosins glatter Muskelzellen (MYH11) des Chromosoms 16 mit der Lokalisation Bande p23 auf dem kurzen Arm des Chromosoms verschmolzen (236;237). Physiologischerweise wirkt das

heterodimere CBF als Transkriptionsfaktor, welcher unter anderem für die Hämatopoese und Osteogenese essentiell ist. Als Folge der Inversion in der AML M4eo entsteht das nichtfunktionelle Fusionsprodukt CBF β -MYH11. Die folgende Dysregulation auf transkriptiver Ebene wird als mitursächlich für die Entartung der hämatopoetischen Stammzellen zur AML M4eo angesehen. Der diagnostische Nachweis der Inversion 16 und damit der AML M4eo ist durch die PCR-Methodik möglich.

Der Karyotyp der leukämischen Blasten ist neben dem Alter des individuellen Patienten und dem Ansprechen auf die Induktionschemotherapie, der wichtigste prognostische Faktor der AML (275). Auf der Basis der bekannten chromosomalen Veränderungen der AML-Blasten wurden Risikostratifizierungen der AML-Subtypen vorgenommen, der Nachweis der t(8;21), der t(15;17), der t(16;16) und der inv(16) korreliert hierbei mit einer relativ guten Prognose (59;370). Neuere Studien verlassen jedoch diese Risikostratifizierung zunehmend, da sich auch in der genannten Niedrigrisikogruppe Unterschiede hinsichtlich des Therapieansprechens und der Prognose ergaben (249). Zusammenfassend muss gesagt werden, dass die Diagnose einer AML M4eo mit dem Nachweis der inv(16) mit einer vergleichsweise guten Prognose korreliert: Studien, die die AML inv(16) als unabhängige Entität ansahen, berichten von Ansprechraten auf die Induktionstherapie von 87%, von 5-Jahres Überlebensraten von 54% sowie von Zehnjahresüberlebensraten von 48% (249).

1.3.2. Etablierte und experimentelle Therapien der akuten myeloischen Leukämie

Die Therapie der AML wird klassischerweise in eine Induktions- und Postremissionstherapie eingeteilt. Ziel der Induktionstherapie ist die „komplette Remission“ (CR), die als Rückgang des Blastenanteils im Knochenmark <5% (keine Leukämischen Blasten), dem Wiedervorhandensein der normalen Hämatopoese (>15% Erythropoese, >25% Granulopoese, normale Megakaryopoese) sowie einer Normalisierung des Blutbildes, einem Verschwinden von extramedullären Manifestationen und dem Rückgang der

klinischen Symptomatik definiert ist. Allerdings lassen sich auch in einer CR Situation mit hoch sensitiven Methoden wie RT-PCR (*reverse transkriptase polymerase chain reaction*) oder FISH (*fluorescence in situ hybridization*) oft noch AML-Zellen nachweisen, dieser Verbleib von Zellen wird als *residual disease* bezeichnet.

Schemata der Induktionstherapie kombinieren Cytarabin (Ara-C) mit einem Anthrazyklin, meist Daunorubicin alternativ auch Idarubicin (32;421;441) oder Mitoxantrone (8;14). Auch die zusätzliche Verwendung von Etoposid in Kombinationsschemata scheint therapeutische Vorteile zu bergen (34). Unabhängig von der FAB-Subtypisierung ist die Standard-Induktionstherapie für alle akuten myeloischen Leukämien gleich, einzige Ausnahme stellt die AML M3 dar, die aufgrund ihrer Molekularbiologie (Fusionsprotein: PML/RAR α , aus dem *retinoic acid receptor α* (RAR α) und dem *promyelocytic leukemia gene* (PML)) einer Therapie mit Transretioninsäure (all-trans-retinoic acid, ATRA), oder seit neuerem auch Arsentrioxid (371) zugänglich ist.

Die klassische Kombinationstherapie mit Daunorubicin und Cytarabin führt in der Induktionstherapie in 70-80% der unter sechzigjährigen Patienten zum Erreichen der kompletten Remission, in älteren Patienten werden Remissionsquoten von ca. 60% erreicht (239). Die Verabreichungs- und Dosierungsschemata sind auch in der Induktionstherapie der AML Gegenstand laufender Diskussionen und Studien, es existieren eine Vielzahl von etablierten und neuen Protokollen, so z.B. das TAD-Regime (45), das HAM-Regime (164), sowie Regime zur Hochdosistherapie mit Cytarabin (35;434) u.v.a.

Nach Erreichen der kompletten Remission wird in der Therapie der AML eine Postremissionstherapie durchgeführt um einem Rezidiv vorzubeugen. Grundsätzliches Ziel dieser Postremissionstherapie ist die vollständige Eradikation aller verbliebenen Leukämiezellen. Drei Strategien der Postinduktionstherapie lassen sich unterscheiden: (i) die allogene, HLA-idente Knochenmarkstransplantation, die (ii) autologe Knochenmarkstransplantation sowie die (iii) Konsolidierungstherapie.

Auch für die Konsolidierungstherapie existieren verschiedenste Protokolle. Wie in der Induktionstherapie, so ist auch in der Konsolidierungstherapie Cytarabin ein wirksames Chemotherapeutikum. In einer klassischen Arbeit der *Cancer and Leukemia Group B* konnte gezeigt werden, dass bei Monotherapie mit Cytarabin eine ausgeprägte Dosis-Wirkungsbeziehung besteht, die besten Therapieerfolge werden dementsprechend mit einer Hochdosis-Cytarabin-Chemotherapie (HiDAC) erzielt (254). Folglich ist die Hochdosistherapie mit Cytarabin Standard in der Postremissionschemotherapie der AML, Verbesserungen der Regime, auch in Kombination mit anderen Substanzen sind Gegenstand fortlaufender Diskussionen (267). In einer aktuellen Studie wurde für die HiDAC-Therapie ein rezidivfreies 5-Jahresüberleben in 35% der Patienten beobachtet, die Ergebnisse mit einer Multichemotherapie waren identisch (267). Alternativen zur Konsolidierungstherapie stellen die autologe und die allogene Stammzelltransplantation dar. Beide Therapiekonzepte nutzen die Möglichkeit einer myeloablativen Konditionierungstherapie durch Chemotherapie und Radiatio. Hierdurch kommt es zur Zerstörung des Knochenmarks, und damit zumindest potentiell auch zu einer Auslöschung der Leukämie. Insbesondere im Falle der allogenen Stammzelltransplantation wird zusätzlich der immunologische *Graft-versus-leukemia*-Effekt (GvL) ausgenutzt, bei dem das Spenderknochenmark respektive daraus entstehende Immunzellen verbleibende Leukämiezellen im Empfänger bekämpfen. Der GvL wird auch im Rahmen allogener Transplantationen ohne vorausgehende myeloablativ Konditionierung ausgenutzt. Genannte Therapieoptionen sind mit dem Risiko schwerster Nebenwirkungen behaftet, die durch die Myeloablation, die daraus resultierende maximale Immunsuppression sowie, zumindest im Falle der allogenen Transplantation, durch die Spender-gegen-Empfänger-Reaktion (*Graft-versus-host-disease*, GvHD) entstehen.

Initial wurden bei AML-Patienten, die durch allogene Knochenmarkstransplantation therapiert wurden, Prognoseverbesserungen gegenüber der Postremissionschemotherapie gemessen (76;86;240;348). Gleiches gilt für die autologe Stammzelltransplantation (49;347;378;457).

Andere Studien können keinen Vorteil der autologen oder allogenen Knochenmarkstransplantation gegenüber der Hochdosischemotherapie zeigen (59).

Unter Ausschöpfung aller genannten therapeutischen Möglichkeiten wurde für AML-Patienten mit nachgewiesener inv(16) oder t(16/16) eine generelle 3-Jahresüberlebensrate von 58% und eine rezidivfreie 3-Jahresüberlebensrate von 48% gemessen, wobei die Prognose in jungen Patienten deutlich besser, in älteren Patienten deutlich schlechter war (81).

Neben den genannten relativ gut etablierten Therapien gibt es eine ganze Reihe moderner Therapieansätze, die aktuell Gegenstand der Forschung sind. Tabelle 9 zählt einige ausgewählte pharmako-therapeutische Strategien auf, die meisten genannten Stoffe werden aktuell auf ihre klinische Wirksamkeit geprüft. Neben pharmakologischen Therapieansätzen zeigen immuntherapeutische Strategien vielversprechende Ergebnisse in der experimentellen Therapie der AML. Die Nutzung des *Graft-versus-leukemia*-Effekts (siehe oben) wird bereits in der allogenen Stammzelltransplantation ausgenutzt. Hierbei richtet sich die zytotoxische Reaktion gegen sogenannte Nebenhistokompatibilitätsantigene (Minor-H-Antigene), also gegen Peptide aus Quellproteinen, die in der Bevölkerung polymorph vorliegen. Neben diesem bereits routinemäßig genutzten therapeutischen Effekt existiert eine Vielzahl immuntherapeutischer Ansätze. Als unspezifische immunstimulatorische Therapie wurde auch in der AML Interleukin-2 mit mäßigem Erfolg eingesetzt (245;246).

Trotz des begrenzten Wissens über die Zielstrukturen des Immunsystems bei der Tumorabwehr konnte durch Molldrem *et al.* bereits im Jahre 2000 für Patienten, die an chronisch myeloischer Leukämie leiden, gezeigt werden, dass das Immunsystem eine zentrale Rolle bei der Erhaltung der Remission spielt (266). Im Hinblick auf eine spezifische peptidbasierte Immuntherapie der AML wurden verschiedene immunogene Peptide auf akuten myeloischen Leukämien definiert: So konnten zum Beispiel die MUC1-Peptide STAPPVHNV (HLA-A*02) und LLLLTVLTV (HLA-A*02) (44) sowie das Survivin-Peptid TLPPAWQPFL (HLA-A*02) (365) auf AML-Zellen als T-Zell-Epitope charakterisiert werden.

Tabelle 9: Auswahl moderner experimenteller Therapieansätze der akuten myeloischen Leukämie

Antileukämische Substanz	Stoffgruppe	Referenzen
Cyclosporin, Valspodar (PSC-833), Zosuquidar	MDR1-Modulatoren	(143;235;334)
Decitabine, 5-Azacytidine	DNA- Methyltransferaseinhibitor	(135)
Phenylbutyrate, Depsipeptide	Histondeacetylase- Inhibitoren	(138;207)
Bortezomib	Proteasominhibitor	(453;454)
Bryostatin, PKC412, UCN-01, CGP41251	Proteinkinase C-Inhibitoren	(309;362;398)
Flavopiridol	Zellzyklus-Modulator	(190;233)
Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg)	Toxingekoppelter Antikörper (Clicheamicin- gekoppelter anti-CD33)	(194;366;418)
Radioaktiv markierter M195 (anti-CD33) 131I-anti-CD45	Radioaktiv markierte Antikörper	(56;185;292)
Tipifarnib (R115777)	Farnesyltransferaseinhibitor	(189;449)
PKC-412, CEP-701, MLN518, SU11248	FLT3- Tyrosinkinaseinhibitoren	(383;386)
G3139 (Genasense)	BCL-2-Antisense- Oligonucleotid	(248;250)
SU5416, Bevacizumab	Angiogenese-Inhibitoren	(104;127;188)

Auch für das Wilmstumor-Antigen WT1 konnte nachgewiesen werden, dass es in AML-Zellen überexprimiert ist (172). Mehrere Peptide, HLA Klasse I- und Klasse II-restringierte, aus WT1 wurden definiert. In Wirksamkeitsstudien im Tiermodell und im Menschen wurden sowohl humorale (95) als auch zelluläre Immunreaktionen (115;285;286;318) gegen WT1 und seine Peptide nachgewiesen, eine antileukämische Immunantwort konnte mehrfach induziert werden.

Aus dem aus der chronisch myeloischen Leukämie (CML) bekannten Antigen Proteinase 3 wurden 2 immunogene Peptide, VLQELNVTV (HLA-A*02) (265) und AHRPPSPAL (HLA-B*1510) (203) gefunden, die von zytotoxischen T-

Lymphozyten erkannt wurden. In AML-Zellen wurde eine ebenfalls sehr hohe Expression von Proteinase 3 nachgewiesen (82), so dass eine Verwendung dieses Peptids als Antigen für die Immuntherapie auch hier diskutiert wird.

Im Hinblick auf eine spezifische Immuntherapie der Leukämien generell erscheinen Peptide aus Fusionsproteinen als besonders vielversprechende Zielstrukturen.

So sind zum Beispiel aus Studien an t(9;22) (Philadelphiachromosom) positiven CML-Zellen HLA Klasse I- und II-präsentierte Peptide aus der Fusionsregion von BCR-ABL bekannt (39;451), die auch *in vitro* von T-Zellen erkannt wurden. Ebenso ist aus der Fusionsregion des PML-RAR Fusionsproteins aus der promyelozytischen Leukämie (AML FAB M3) ein HLA Klasse II-präsentiertes Peptid identifiziert (117). Allerdings ist die Immunogenität von Peptiden aus beiden Quellen zumindest fraglich (84;145).

Verschiedene Wege wurden bisher genutzt um antileukämische T-Zellen *in vitro* zu stimulieren: Dendritische Zellen, beladen mit AML-Lysat (354), oder apoptotischen AML-Zellen (375), Hybride aus dendritischen und leukämischen Zellen (116), dendritische Zellen beladen mit einem MUC1-Peptid (44) oder transfiziert mit Survivin-RNA (456). Anders als bei anderen Neoplasien ist es möglich, AML-Blasten *in vitro* dahingehend zu stimulieren, dass sie sich zu dendritischen Zellen ausdifferenzieren. Diese leukämischen dendritischen Zellen können T-Zellen zumindest *in vitro* stimulieren, welche wiederum AML-Blasten lysieren (71;72;151). Durch all diese Strategien konnten T-Zell-Antworten gegen leukämische Zellen *in vitro* generiert werden.

Neben vielen Versuchen im Tiermodell, die die Durchführbarkeit und Wirksamkeit verschiedenster Vaccinierungsprotokolle belegen (324), werden aktuell eine ganze Reihe von Vaccinierungsstudien am Menschen durchgeführt. Lee *et al.* nutzten 2004 autologe dendritische Zellen, beladen mit autologen leukämischen Zellen zur Vaccinierung von 2 AML-Patienten mit Rückfall der AML nach autologer Stammzelltransplantation und konnten damit die Machbarkeit eines solchen Ansatzes zeigen, klinische Vorteile konnten sie jedoch nicht messen (225). In einer weiteren klinischen Studie konnten Roddie *et al.* in fünf AML-Patienten die Durchführbarkeit eines Vaccinierungsprotokolls

mit zu dendritischen Zellen ausdifferenzierten AML-Blasten zeigen, klinische Prognoseverbesserungen konnten auch hier nicht gemessen werden (327). Oka *et al.* vaccinierten Patienten mit verschiedenen soliden und hämatologischen Neoplasien mit WT1-Peptiden und konnte insbesondere in AML-Patienten klinische Erfolge im Sinne einer Reduzierung verbleibender leukämischer Zellen messen (285). Und Mailänder *et al.* konnten im Rahmen ihrer Vaccinierungsstudie in einem AML FAB M4-Patienten mit Rückfall der Krankheit nach Vaccinierung mit dem WT1-Peptid RMFPNAPYL eine komplette Remission dokumentieren (243).

All diese Studien zeigen, dass eine Vaccinierungsstrategie in der Therapie der AML durchführbar und prinzipiell zielführend ist, sie zeigen jedoch ebenso, dass das Wissen über die Mechanismen und die wahrscheinlich vielfältigen Zielstrukturen des Immunsystems in der Tumorabwehr noch zu begrenzt ist, um effiziente Vaccinierungsprotokolle für eine Vielzahl von individuellen Patienten (gerade im Hinblick auf die HLA-Typisierung) zu entwerfen.

1.4. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die Tumorimmunologie hat in den vergangenen Jahren zur Entwicklung zahlreicher vielversprechender Therapieansätze neoplastischer Erkrankungen geführt. Der Nachweis der Durchführbarkeit und Wirksamkeit von immuntherapeutischen Strategien ist für mehrere Tumorentitäten, unter ihnen das Nierenzellkarzinom und die akute myeloische Leukämie, erbracht.

Die zentralen Zielstrukturen unspezifischer immunstimulatorischer wie auch spezifischer Vaccinierungstherapien jeder Art sind MHC-gebundene tumorassoziierte Peptide (HLA-Liganden). Umfassende Kenntnis des durch Tumorzellen präsentierten HLA-Ligandoms ist demnach Voraussetzung für die Weiterentwicklung immuntherapeutischer Strategien.

Folglich ist die Absicht der vorliegenden Arbeit die Definition neuer tumorassoziierter Peptide für das Nierenzellkarzinom und die akute myeloische Leukämie.

Mehrere untergeordnete Ziele lassen sich dabei unterscheiden:

- (1.) Die möglichst umfassende Sequenzierung der MHC Klasse I-gebundenen Peptide auf soliden Nierenzellkarzinomen, einer Nierenzellkarzinomzelllinie, sowie auf Zelllinien der akuten myeloischen Leukämie inv(16).
- (2.) Die Identifizierung von deutlich überexprimierten Genprodukten in den selben Neoplasien, da massiv überexprimierte Proteine potentielle Quellen tumorassoziierter Peptide darstellen.
- (3.) In der Zusammenschau der Ergebnisse aus (1) und (2) die Identifizierung neuer Peptide aus tumorassozierten Antigenen für das Nierenzellkarzinom und die akute myeloische Leukämie.
- (4.) Die Etablierung von Zelllinien aus soliden Nierenzellkarzinomen, mit dem Ziel die Zellkultur und den soliden Tumor auf ihre Vergleichbarkeit hinsichtlich Genexpression und Peptidpräsentation zu prüfen und damit die Basis für weitere *in-vitro*-Experimente zu schaffen.
- (5.) Die Überprüfung der Immunogenität von einigen der gefundenen Peptide durch Nachweis peptidspezifischer T-Zellen.
- (6.) Der Nachweis eines MHC-präsentierten Peptids aus dem für die AML-inv(16) charakteristischen Fusionsprotein CBF β -MYH11.

2. Material und Methoden

2.1 Methoden zur Analyse des HLA-Ligandoms

2.1.1. Isolierung MHC- Klasse I gebundener Peptide

Verwendetes Gewebe:

Es wurden sowohl Zelllinien aus Nierenzellkarzinomen und akuten myeloischen Leukämien als auch solide Nierenzellkarzinome für die Peptidanalyse aufgearbeitet.

Als Ausgangsmaterial der Analyse solider Nierenzellkarzinome wurden uns frische Resektate freundlicherweise durch die Universitätsklinik für Urologie, Tübingen (Prof. Stenzl) zur Verfügung gestellt. Bei Durchführung einer Tumornephrektomie in der urologischen Universitätsklinik wurde direkt nach Resektion des tumortragenden Gewebes und Sichtung des Präparates durch den Operateur und den Pathologen eine möglichst große Probe des Tumorgewebes sowie autologes gesundes Nierengewebe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Gewebeproben bei -80°C gelagert. Zur HLA- Typisierung wurden intra- oder postoperativ 10 ml EDTA-Blut abgenommen. Die schriftliche Einverständniserklärung der Patienten zur Probeentnahme wurde nach ausführlicher Aufklärung durch einen ärztlichen Mitarbeiter der Klinik für Urologie von allen Patienten eingeholt. Ein Votum der örtlichen Ethikkommission liegt vor (Az. 438/2004V).

Die Zelllinie RCC68CL wurde durch Frau Dr. Cécile Gouttefangeas aus Gewebe des Nierenzellkarzinoms RCC68 etabliert, sie gestattete mir freundlicherweise mit der Zelllinie zu arbeiten.

Die Zelllinien AML01 bis AML04 wurden im Rahmen einer Kooperation mit Herrn Dr. André Banat (Medizinische Klinik IV der Justus-Liebig-Universität Gießen) aufgearbeitet und analysiert. Dr. Banat stellte mir die Zelllinien freundlicherweise zur Verfügung.

Die Methoden zur Kultivierung und Expansion der Zelllinien sind in Kapitel 2.3.1 dargestellt.

Herstellung eines Zell- bzw. Gewebelysates:

Zum Aufschluss der Zellmembran wurde Lysepuffer^a verwendet. Der gesamte Prozess der Lysatherstellung wurde bei 4°C durchgeführt.

Solide Gewebe wurden im gefrorenen Zustand unter Zugabe eines dem Gewebevolumen äquivalenten Volumens doppelt konzentrierten Lysepuffers zunächst im Mixer (Warring Commercial) zerkleinert und während dieses Prozesses aufgetaut. Zur besseren Weiterverarbeitung wurde das Lysat anschließend mit einem weiteren, dem Tumolvolumen äquivalenten Volumen einfach konzentrierten Lysepuffers verdünnt. Der weitere Gewebeaufschluss erfolgte mechanisch zunächst mit dem „Potter“ (Heidolph; RZR2020), anschließend mit dem „Dounce- Homogenisator“ (Sartorius) durch mindestens 5 Stöße bei einer Spaltbreite von 50-70 µm und mindestens 20 Stöße bei einer Spaltbreite von 10-30 µm. Das hierdurch erhaltene Gewebe- bzw. Zellysat wurde nach Zugabe eines weiteren Volumens Lysepuffer unter leichtem Rühren für eine Stunde bei 4°C inkubiert.

Zur Entfernung des Zelldetritus aus dem Lysat wurde zunächst 20 min bei 4000 rpm und 4°C (Heraeus Instruments, Megafuge 1.0 R) und anschließend bei 40000 rpm, 4°C (Beckman L-80 Ultracentrifuge, Rotor Ti45) 1 Stunde zentrifugiert. Die Pellets wurden nach beiden Zentrifugationsschritten verworfen.

Der Überstand wurde zur Entfernung von Fett und letzter kolloidalen Bestandteile sterilfiltriert (Sartolab-P20 plus; Porengröße 0.2 µm). Vom Filtrat wurden 500 µl abgenommen und zur späteren Bestimmung der enthaltenen MHC- Klasse I Menge bei -80°C gelagert.

Affinitätschromatographische Aufreinigung von MHC Klasse I-Molekülen:

^a Lysepuffer: PBS (phosphate buffered saline); 0,6% 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propansulfonate (CHAPS); 3 Tabletten Proteaseinhibitoren „complete“ (Roche) pro 200 ml

Die im Tumor- bzw. Zelllysat enthaltenen MHC Klasse I-Moleküle mit gebundenen Peptiden wurden affinitätschromatographisch aufgereinigt.

Zur Bindung der MHC-Moleküle wurde der anti-HLA-A, -B und -C-spezifische Maus-anti-Mensch IgG_{2a}-Antikörper W6/32 (24) verwendet. Der Antikörper wurde laboratoriumsintern hergestellt, und mir von Frau Claudia Falkenburger freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Dem oben genannten Lysat wurde der Antikörper W6/32 zugesetzt (1mg Antikörper / 1g Zellpellet bzw. Tumor), die Mischung wurde 1h bei 4°C unter leichtem Rühren inkubiert.

Herstellung der Affinitätschromatographiesäulen:

Zur Affinitätschromatographie wurden Protein-A-Sepharose Säulen verwendet (Protein A-Sepharose CL-4B, Pharmacia). 0,6g Protein-A-Sepharose wurden zunächst in 5ml destilliertem Wasser unter leichtem Rütteln suspendiert. Die nun gequollene Protein-A-Sepharose ließ man dann für eine Stunde absitzen. Der Überstand sowie verbleibende größere Sepharose-Partikel wurden abgenommen. Das Protein-A-Sepharose Gelbett wurde anschließend in 8ml PBS^a resuspendiert, und auf die Chromatographiesäule überführt. Das Volumen der gequollenen Protein-A-Sepharose beträgt etwa das fünffache des Trockengewichts (0.6g), das endgültige Säulenvolumen betrug also ca. 3ml. Mit den folgenden Waschschrritten wurde die Protein-A-Sepharose äquibriert: 20min PBS, linearer Fluss; 30min Lysepuffer, linearer Fluss; Flussrate jeweils 2ml/min.

Durchführung der Affinitätschromatographie:

Die Zelllysat-Antikörpermischung wurde nach den genannten Äquibrierungsschritten bei einer Flussrate von 2ml/min zyklisch über die Säule geleitet, und zwar mindestens so lange, dass das Gesamtvolumen des Lysat-Antikörpermischungs theoretisch 5 Mal die Säule passieren konnte. Anschließend folgten drei Wasch- bzw. Äquibrierungsschritte, zunächst 15min Lysepuffer, anschließend 45min PBS und abschließend 45min destilliertes

^a PBS: phosphate buffered saline

Wasser. Dann wurden die gebundenen Antikörper:MHC:Peptid-Komplexe durch Säure-Behandlung eluiert. Hierzu wurde die Säule soweit entleert, dass sich gerade kein Wasserspiegel mehr über dem Säulenmaterial befand, die Protein-A-Sepharose aber nicht trocken lief. Dann wurde dieselbe mit 4ml Elutionspuffer^a überschichtet. Die ersten 500µl des Durchlaufs wurden separat aufgefangen und verworfen, der restliche Durchlauf (ca. 4 ml) wurde direkt in zwei Ultrafiltrationseinheiten (Centrikon, YM-10, Amicon) zu je 2ml aufgefangen. Die beschriebene Affinitätschromatographie wurde bei jedem Lysat insgesamt zwei- bis dreimal durchgeführt um die MHC-Ausbeute zu maximieren. Zwischen den einzelnen Chromatographie-Läufen wurde die Säule jeweils mit Wasser, PBS und Lysepuffer äquilibriert.

Ultrafiltration zur Isolierung der MHC- gebundenen Peptide:

Das Eluat der Affinitätschromatographie wurde direkt in Ultrafiltrationseinheiten (Centrikon, YM-10, Amicon) geleitet. Die Filter waren zuvor zweimal mit 0,1% TFA^b in Elutionspuffer (pH 3) gewaschen worden um eine Kontamination der Probe mit im Filtermaterial enthaltenen Polyethylenglykol zu vermeiden. Die verwendeten Filter lassen Moleküle bis zu einem maximalen Molekulargewicht von 10kDa passieren, und trennen damit die im Eluat enthaltenen Peptide (durchschnittliches Molekulargewicht: ca. 1,1 kDa) von den MHC Klasse I- α -Ketten (Molekulargewicht: 43kDa), dem β_2 -Mikroglobulin (Molekulargewicht: 12kDa), den IgG-Antikörpern (Molekulargewicht der Untereinheiten: 22 kDa für die λ -Kette und 55 kDa für die γ -Kette), sowie anderen das Eluat kontaminierenden Makromolekülen. Den in jeder Filtrationseinheit befindlichen 2ml Eluat wurden 20µl 25%iges TFA zugefügt. Durch diese starke Ansäuerung des Milieus wurde eine Abdiffusion des Peptids vom MHC- Molekül erreicht. Die eigentliche Ultrafiltration erfolgte bei Zentrifugation mit 4000rpm, 4°C, (Heraeus Instruments, Megafuge 1.0 R) bis das gesamte Volumen den Filter passiert hatte. Das Ultrafiltrat wurde vor der Lyophilisation bei -80°C eingefroren.

^a Elutionspuffer: 50mM Zitratpuffer, pH 3

^b TFA: engl. Trifluoracetate; deut. Trifluoressigsäure

Aufkonzentrierung des die Peptide enthaltenden Ultrafiltrats:

Das Ultrafiltrat wurde über Nacht lyophilisiert (Vaco5, ZIRBUS). Nach vollständiger Sublimation des Lösungsmittels wurde das Lyophilisat in 500µl LC/MS-Lösungsmittel A^a resuspendiert.

2.1.2 Quantifizierung der β 2-Mikroglobulin-Konzentration in Tumorlysaten und Eluaten durch diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Westernblot zur näherungsweise Bestimmung der MHC-Ausbeute

Theoretischer Hintergrund:

Die Auftrennung von Proteinen aus Tumorlysaten und Eluaten der Affinitätschromatographie erfolgte mittels einer Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (218). Dabei werden die Proteine in einem die Schwefelbrücken reduzierenden Ladepuffer auf ein diskontinuierliches Polyacrylamid-Gel, bestehend aus einem Sammelgel und einem Trenngel, aufgetragen. Das im Ladepuffer und im Gel enthaltene Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet an Protein in einem stöchiometrischen Verhältnis von ca. 1,4g SDS/1g Protein, wobei jedes SDS-Molekül eine negative Ladung beisteuert. Dadurch wird die Eigenladung der Proteine maskiert, die negative Ladung und damit die Mobilität der Proteine im elektrischen Feld ist also proportional zu ihrem Molekulargewicht. Die Proteine durchwandern im elektrischen Feld zunächst das Sammel-, dann das Trenngel. Die Porengröße des Sammelgels ist so groß, dass kein Molekularsiebeffekt auftritt. Ebenso ist der pH im Sammelgel (pH6,8) so gewählt, dass die im Laufpuffer enthaltenen Glycinionen mehrheitlich als Zwitterionen und nicht als Anionen vorliegen. Damit ist die elektrophoretische Mobilität des Glycins im Sammelgel geringer als die der Protein-SDS-Aggregate. Die elektrische Mobilität der ebenfalls im Laufpuffer enthaltenen Chloridionen ist größer als die der Glycin-Zwitterionen und der Protein-SDS-Aggregate. Unter den Bedingungen der Elektrophorese können sich beide „Banden“ (Chlorid und Glycin) nicht trennen, da sonst eine positiv geladene Zone entstünde

^a LC/MS-Lösungsmittel A: 4 mM NH₄Ac; pH 3,0 mit Acetat eingestellt

(Kirchhofsches Gesetz). Die Protein-SDS-Aggregate werden gewissermaßen zwischen der Chlorid- und der Glycinbande fokussiert (Prinzip der Isotachophorese). Beim Übertritt der Protein-SDS-Aggregate in das Trenngel fällt zum einen durch die Änderung des pH (pH 8,6) der Konzentrierungseffekt der Isotachophorese weg, zum anderen entsteht durch die höhere Dichte des Gels der gewünschte Molekularsiebeffekt. Im Trenngel besteht bei einer gegebenen Spannung ein linearer Zusammenhang zwischen der Wanderungstrecke des Proteins und seinem Molekulargewicht. Durch den Vergleich der Laufstrecke des Probenproteins mit den Laufstrecken von Proteinen bekannter Massen lässt sich auf das Molekulargewicht des Probenproteins rückschließen.

Um ein Protein aus einem elektrophoretisch getrennten Proteingemisch immunologisch zu identifizieren, überträgt man die Proteine zunächst durch ElektrobloTTing aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran. Diese wird anschließend mit einem Antikörper gegen das zu detektierende Protein inkubiert. Die so markierte Bande wird schließlich zumeist mithilfe eines Chemolumineszenzsystems detektierbar gemacht. Diese Detektionssysteme bestehen aus einem gegen den Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörper, an welchen ein Enzym gekoppelt ist, das einen autolumineszierenden Farbstoff aktivieren kann. Die Autolumineszenz ist durch entsprechende Kameras detektierbar. Diese Methodik wird als ImmunobloTTing oder synonym als WesternbloTTing bezeichnet.

Praktische Durchführung:

Zur Anfertigung dieser Arbeit wurden Westenblots gegen β_2 -Mikroglobulin mit dem Ziel der Quantifizierung der MHC-Isolierung aus Tumoren angefertigt. Da β_2 -Mikroglobulin im MHC Klasse I-Molekül in äquimolarer Konzentration zur α -Kette vorliegt, lässt sich die Konzentration von MHC-Molekülen durch Bestimmung von β_2 -Mikroglobulin näherungsweise ermitteln.

Folgende Reagentien wurden für die Herstellung der PAGE-Gele verwendet (Tabelle 10):

Tabelle 10: Verwendete Reagentien zur Herstellung der PAGE-Gele

	Sammelgel, 5% (w/v)	Trenngel, 15% (w/v)
ddH ₂ O	12,8ml	7,3ml
1,5M Tris ^a pH8,6	--	5ml
1M Tris pH6,8	5ml	--
40% Acrylamid - Mix	2ml	7.5ml
10% SDS ^b	200µl	200µl
TEMED ^c	20µl	20µl
10% APS ^d	100µl	100µl

Zunächst wurde das Trenngel hergestellt, zwischen die Platten der Elektrophoreseapparatur (Mini-Protean II Electrophoresis Cell, Biorad) gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nachdem das Trenngel ausgehärtet war, wurde es mit dem Sammelgel überschichtet. Nach abgeschlossener Polymerisierung wurde das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingespannt, welche anschließend mit Laufpuffer^e befüllt wurde.

Zur Bestimmung der MHC-Ausbeute aus der in Kapitel 2.1.1. beschriebenen Tumoraufarbeitung wurden jeweils 10µl Tumorlysat und 10µl von jedem Eluat der Affinitätschromatographie verwendet. Die Proben aus den Eluaten (Lösungsmittel: Citratpuffer, 50mM, pH 3) wurden zunächst mit 1µl 1M NaOH neutralisiert. Alle Proben wurden mit einer dem Probenvolumen äquivalenten Menge Ladepuffer^f versetzt, auf dem Heizblock (Thermomixer 5436, Eppendorf) 5 min bei 95°C inkubiert, und anschließend in die Taschen des Gels geladen. Eine Tasche wurde mit einem Proteinstandard (SeeBlue Pre-Stained Standard, Invitrogen) zur Bestimmung des Molekulargewichtes beschickt. Zur Bestimmung des MHC-Gehaltes in den Proben anhand einer Eichgeraden wurde eine Verdünnungsreihe mit MHC-Monomeren (HLA-A*0201, ILKEPVHGV), 2µg, 4µg, 6µg, 8µg, 10µg, 12µg, 14µg Monomer, angelegt.

^a Tris: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

^b SDS: engl. sodium dodecyl sulfate; deut. Natriumdodecylsulfat

^c TEMED: Tetramethylethylenediamin

^d APS: Ammoniumpersulfat

^e Laufpuffer: 25 mM Tris-Base, 190 mM Glycin, 0,1% SDS, pH 8,75

^f Ladepuffer: 250mM Tris-HCL; pH6,8; 4% (w/v) SDS; 20% (w/v) Glycerin; 10% (v/v) β-Mercaptoethanol; 0,002% (w/v) Bromphenolblau; durch Wathmann 3MM Papier gefiltert

Die Elektrophorese wurde mit Spannungen von 110V im Sammelgel und 140V im Trenngel durchgeführt.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Proben mit einer Semidry-Blotting-Apparatur (Transfer-Blot Kammer SDI, CTI) auf eine Nitrocellulosemembran (Hybond ECL, Pharmacia) transferiert. In der Blottingvorrichtung lagen Gel und Nitrocellulosemembran als „sandwich“ zwischen puffergetränkten^a Filterpapieren. Dabei wurde das Gel und die Nitrocellulosemembran, welche zuvor auch in Anodenpuffer getränkt wurde, so zwischen die Elektroden der Blotting-Apparatur gelegt, dass das Gel kathodennah, die Nitrocellulosemembran anodennah zu liegen kam. Das Elektroblothing wurde mit einer Stromstärke von 60mA pro in der Apparatur befindlichem Gel für 1,5 Stunden durchgeführt. Diese vergleichsweise kurze Blottingzeit erwies sich angesichts der geringen Molekülgröße von β_2 -Mikroglobulin als völlig ausreichend und hinsichtlich der Blottingqualität als vorteilhaft.

Nach dem Elektroblothing wurden die unspezifischen Bindungen der Nitrocellulosemembran durch eine einstündige Inkubation in TBB^b geblockt. Als Erstantikörper wurde ein polyklonaler Antikörper (Kaninchen-Anti-Mensch) gegen β_2 -Mikroglobulin-IgG (Abcam) in einer Verdünnung 1:50000 in TBB eingesetzt. Die Blottingmembran wurde 1,5h bei 4°C und leichtem Schwenken mit diesem Antikörper inkubiert. Anschließend wurde der Blot drei mal 5min in TWB^c gewaschen. Als Zweitantikörper wurde ein Meerrettichperoxidase-konjugiertes Esel-Anti-Kaninchen-IgG F(ab)₂-Fragment (Amersham) in einer Verdünnung von 1:5000 in TBB eingesetzt. Hier betrug die Inkubationszeit 1h bei 4°C und leichtem Schwenken. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper wurde die Nitrocellulosemembran vor der Visualisierung der Banden zunächst einmal 5min in TBS^d, dann dreimal 10min in TWB, und schließlich noch zweimal 5min in TBS gewaschen.

^a Anodenpuffer: 50 mM Natriumborat, 20% Methanol, pH 9; Kathodenpuffer: 50 mM Natriumborat, 0,05% SDS, pH 9

^b TBB: 0,1% (w/v) Nonidet P-40; 3% (w/v) Rinder-Serum-Albumin, 5mM EDTA in TBS (siehe unten)

^c TWB: 0,1% (w/v) Nonidet P-40 in TBS (siehe unten)

^d TBS: 50mM Tris-Base; 150mM NaCl; pH 8,0

Die Visualisierung der Banden erfolgte unter Ausnützung der Luminolreaktion, Luminol wird durch die Meerrettichperoxidase unter Lichtemission ($\lambda = 428 \text{ nm}$) oxidiert. Das Luminol enthaltende Entwicklungsreagenz (Western Lightning, PerkinElmer) wurde für 1min dünn auf die Nitrocellulosemembran aufgetragen. Die Detektion der Lichtemission erfolgte mit einer Kamera (Fuji Film, LAS-1000). Mit der Software *Image Gauge* (Fuji Film) wurde das Foto digital ausgewertet, die aus der Verdünnungsreihe bekannter MHC-Konzentrationen erstellte Eichgerade wurde zur Bestimmung der MHC-Konzentration in den Proben herangezogen.

2.1.3 Peptidsynthese

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl für die Verifikation experimenteller LC/MS-Spektren, als auch für die T-Zell-Experimente synthetische Peptide verwendet. Die Synthese aller Peptide wurde nach der Standardmethode der Solide-Phase-Fmoc- Chemie (64) in einem *Abimed Economy Peptide Synthesizer* (EPS 221) hauptsächlich von Frau Patricia Hrstic durchgeführt.

2.1.4 Massenspektrometrische Sequenzierung von MHC-gebundenen Peptiden

2.1.4.1. Theoretischer Hintergrund und apparative Lösung der massenspektrometrischen Sequenzierung von Peptiden

Die Massenspektrometrie (MS) bietet die Möglichkeit die Bestimmung der Masse sowohl mikro- wie makromolekularer Ionen. Damit ist Massenspektrometrie neben vielen anderen Anwendungsbereichen die zentrale Methodik in der modernen Protein- und Peptidanalytik. Prinzipiell verfügt ein Massenspektrometer über drei Komponenten, eine Ionenquelle, einen Massenanalysator, sowie einen Detektor.

Die Technologie der Massenspektrometrie ist weit fortgeschritten und es existieren zahlreiche, zum Teil stark unterschiedliche apparative Lösungen für die genannten drei Komponenten. In der vorliegenden Arbeit soll keineswegs ein umfassender Überblick über die Methodik der Massenspektrometrie

gegeben werden, vielmehr wird folgend nur die Funktionsweise des bei der Entstehung der Arbeit zum Einsatz gekommenen Gerätetyps erläutert. Die in dieser Arbeit verwendeten massenspektrometrischen Daten wurden allesamt mit einem *Hybrid-Quadrupol-time-of-flight-Massenspektrometer* (Q-TOF; Micromass, Manchester, UK) produziert. Abbildung 1 zeigt schematisch den Aufbau des Gerätes. Die Elektrospray- Ionenquelle (Abbildung 1, Punkt 1, ESI-Quelle) dient der Desolvatisierung der zu analysierenden Peptide bei Atmosphärendruck. Das *Interface* (Abbildung 1, Punkt 2) ermöglicht den Übertritt der Peptide von der ESI-Quelle in das Hochvakuum der ersten massenspektrometrischen Einheit, die zum einen als Massenfilter und -selektor wirkt, zum anderen durch den Einsatz einer Edelgas-befüllten Kollisionskammer die für die Sequenzanalyse ausschlaggebende Peptidfragmentierung ermöglicht. Die zweite massenspektrometrische Einheit schließlich dient der Bestimmung der „Masse-pro-Ladung-Werte“ (m/z – Werte) der einzelnen Peptidfragmente. Den genannten Komponenten sind im Folgenden einzelne kurze Abschnitte gewidmet.

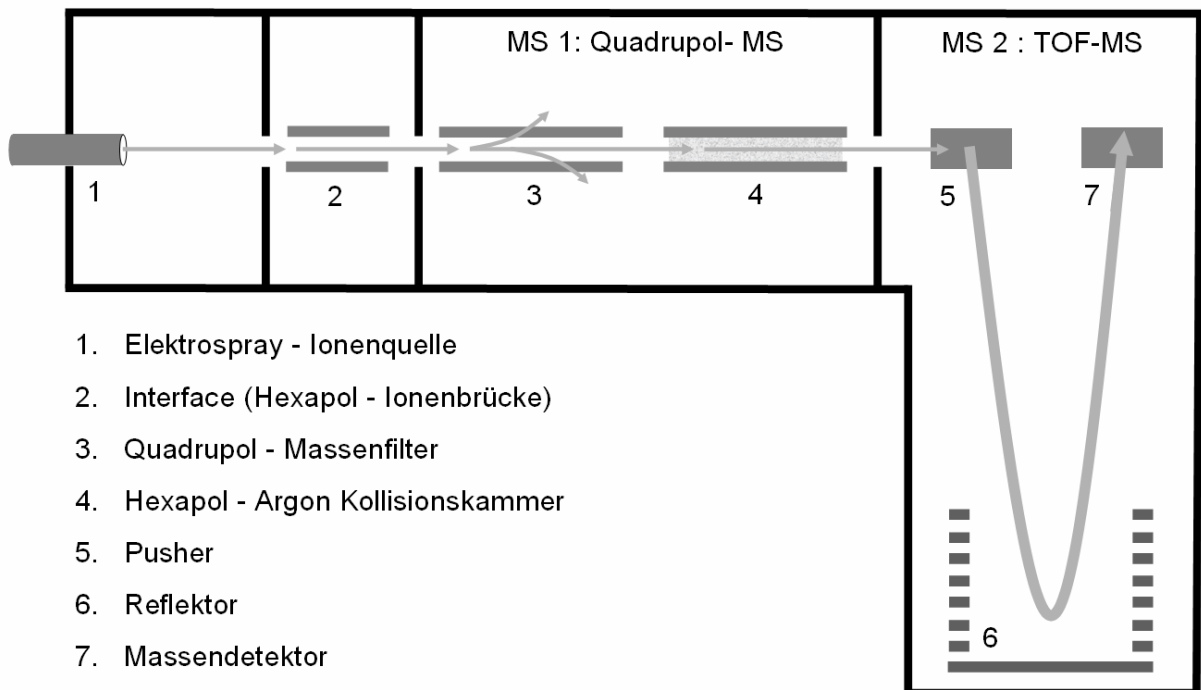


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Q-TOF Massenspektrometers (Micromass, Manchester)

Elektrospray-Ionisation (ESI):

Zwei Prinzipien der Ionisation sind in der massenspektrometrischen Analytik von Biomolekülen relevant: die Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS, *Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-MS*) und die Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS, *Elektrospray-Ionisation-Mass-Spectrometry*). Zur Anfertigung der vorliegenden Arbeit wurde nur das Prinzip der ESI-MS verwendet, so dass im Folgenden auch nur auf diese Technologie Bezug genommen wird.

Das Grundprinzip der ESI-MS beruht auf der Dispersion des Lösungsmittels im elektrischen Feld und der folgenden Desolvatisierung der gelösten Ionen. Durch eine wenige Mikrometer durchmessende Kapillare wird die Analytlösung in die Ionenquelle geführt. Zwischen der Kapillare und dem Eingang ins eigentliche Massenspektrometer liegt eine Potentialdifferenz von 800-2000V an. Im elektrischen Feld werden die gelösten Ionen bzw. die Lösungsmitteltropfen beschleunigt. Das Lösungsmittel verdampft, wobei der Radius der Tröpfchen kleiner wird und sich die gleichsinnigen Ladungen annähern, die Ladungsdichte an der Tröpfchenoberfläche nimmt also zu. Die Tröpfchen werden durch die Oberflächenspannung des Lösungsmittels stabilisiert, durch die Coulomb-Kräfte destabilisiert. Wird das Stabilitätslimit (Rayleigh-Limit) überschritten, gleicht also die Ladung des Tröpfchens die Oberflächenspannung gerade aus, kommt es zur Coulomb-Explosion, d.h. zum Zerfall des Ausgangstropfens in viele, nur wenige Nanometer durchmessende Tröpfchen (20;122;193;443). Aus diesen kleinsten Tröpfchen folgt der endgültige Übergang der Analytmoleküle in die Gasphase. Zur Erklärung dieses Prozesses existieren zwei Theorien: Die *single-ion-in-droplet*-Theorie nach Dole und Röllgen geht von der Existenz kleinster Tropfen aus, die aus einer Reihe von Coulomb-Explosionen entstehen und die nur noch ein Analytmolekül enthalten. Dieses einzelne Analytmolekül geht dann durch vollständige Desolvatisierung des Lösungsmittels in die Gasphase über (350). Das *ion-evaporation*-Modell nach Iribarne und Thomson hingegen schlägt die direkte Emission der Analytionen in die Gasphase aus

Tröpfchen mit sehr hoher Ladungsdichte vor (173). Die in der ESI- Ionenquelle ablaufenden Prozesse sind schematisch in Abbildung 2 dargestellt.

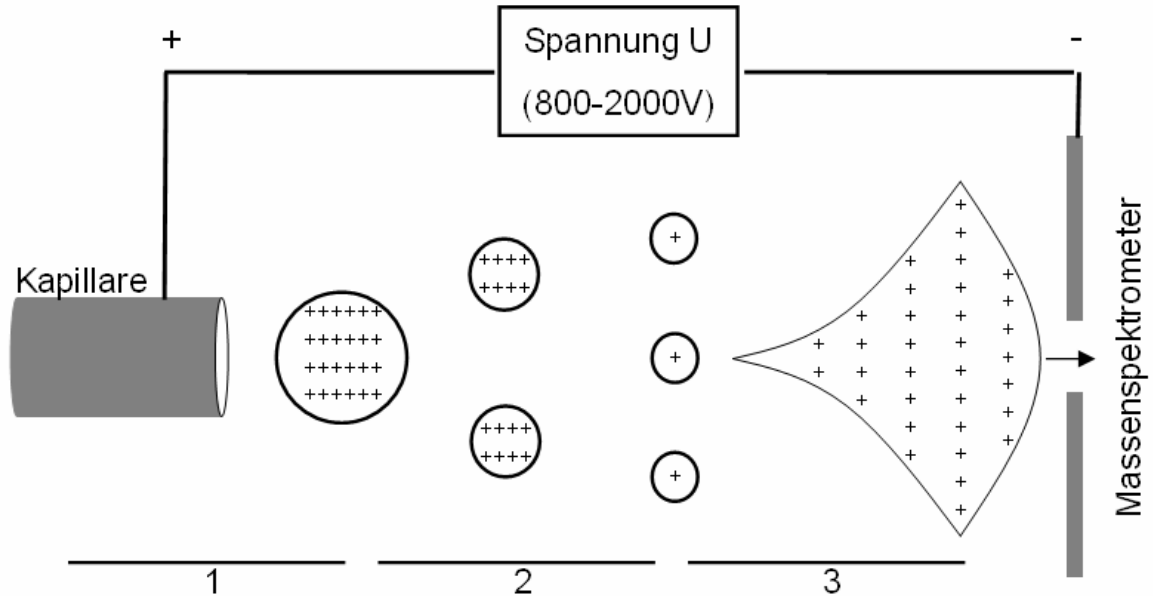


Abbildung 2: Schematischer Aufbau der Ionenquelle eines ESI-MS sowie Darstellung des Ionisierungsprinzips

1. Bildung geladener Tröpfchen an der Spitze der Kapillare
2. Evaporation des Lösungsmittels und räumliche Annäherung der Kationen
3. Spontaner Zerfall der Tröpfchen (Coulomb-Explosionen) und Desolvatisierung der Analytmoleküle

Ionenbrücke (*Interface*):

Die Desolvatisierung des Analyten in der ESI-Quelle findet bei Atmosphärendruck statt, das eigentliche MS jedoch arbeitet im Hochvakuum. Es ist also zur Kopplung beider Komponenten die Zwischenschaltung einer drucktrennenden Schnittstelle nötig. Die Verbindung zwischen Ionenquelle und Massenspektrometer besteht lediglich aus einer ca. 100µm durchmessenden Öffnung. Die Drucktrennung an dieser Schnittstelle (*Interface*) erfolgt durch die Einleitung geheizten Stickstoffes (*curtain gas*), welcher dem geringeren Widerstand folgend in die Ionenquelle, also dem Ionenstrom entgegen strömt. Das *curtain gas* unterstützt den Desolvatisierungsprozess und verhindert das Eindringen ungeladener Teilchen in das Massenspektrometer.

MS1: Quadrupol-MS und Edelgas-Kollisionskammer:

Dem beschriebenen *Interface* ist das erste Massenspektrometer nachgeschaltet. Hierbei handelt es sich um ein Quadrupolmassenspektrometer, welches praktisch als Massenfilter wirkt. Vier stabförmige Elektroden sind hierbei parallel zum Ionenstrom positioniert. An den Elektroden liegt eine Gleich- und eine Wechselspannung an, wobei die jeweils gegenüberliegenden Elektroden gleichsinnig geladen sind, das elektrische Feld also orthogonal zum Ionenstrom steht. Für Ionen mit definierter Masse und Ladung (m/z) existieren bei entsprechender Einstellung von Gleich- und Wechselspannung sowie Frequenz der Wechselspannung stabile oszillierende Flugbahnen durch den Quadrupol, wohingegen Ionen mit anderen m/z -Werten auf instabilen Bahnen abgelenkt werden. Hierdurch ergibt sich praktisch die Möglichkeit aus einem Peptidgemisch einzelne Peptidspezies definierter Masse und Ladung herauszufiltern und gezielt zu analysieren.

Zur Sequenzierung von Peptiden ist es nötig diese zu fragmentieren (*collision-induced decomposition*, CID). Zu diesem Zwecke ist dem Quadrupol eine edelgasbefüllte Kollisionskammer nachgeschaltet. Während eines Fragmentierungslaufs durchfliegen die Peptide die mit Argon befüllte Kammer, durch inelastische Stöße zerfallen die Peptide bevorzugt zwischen dem Carbonylkohlenstoff und dem Amidstickstoff der Peptidbindung. Hierbei handelt es sich um einen statistischen Prozess, es werden also nicht alle Peptidbindungen, sondern idealerweise nur eine Peptidbindung pro Peptid gespalten. Hierdurch entstehen die unter Punkt 2.5.1. beschriebenen charakteristischen Fragmente, die eine Sequenzierung des Ausgangspeptids ermöglichen.

MS2: *Time-of-flight*-Massenspektrometer (TOF-MS):

Der Kollisionskammer folgt das eigentliche analytische Massenspektrometer, welches nach dem Prinzip der Flugzeitmessung arbeitet (TOF, *time of flight*). Durch eine Hexapol-Transferlinse wird der Ionenstrom auf den *Pusher* fokussiert, der diesen auf die Driftstrecke der analytischen MS-Einheit ablenkt. Auf der

Driftstrecke beeinflusst kein elektrisches Feld den Ionenstrom, hier trennen sich die verschiedenen Fragmente gemäß ihrer Masse und Ladung und daraus resultierenden unterschiedlichen Geschwindigkeit räumlich auf.

Die Detektion der Ionen am Ende der Driftstrecke erfolgt mit Hilfe eines Sekundärelektronenvervielfachers (SEV). Das Auftreffen des Ionenstroms auf eine Konversionsdynode erzeugt einen Sekundärelektronenstrom, der seinerseits beim Auftreffen auf nachgeschaltete Dynoden stärkere Ströme im Sinne einer Elektronenkaskade erzeugt. Hierfür ist ein Potentialgefälle zwischen den einzelnen Dynoden nötig. Das so verstärkte Signal setzt den Endpunkt für die Flugzeitmessung auf der Driftstrecke.

Die kinetische Energie ist für alle Ionen bzw. Peptidfragmente nach Durchlaufen der Beschleunigungsspannung (U) vor Eintritt in die Driftstrecke identisch, aus den unterschiedlichen Massen (m) und Ladungen (z), d.h. aus den unterschiedlichen m/z-Werten resultieren jedoch unterschiedliche Geschwindigkeiten (v) und damit unterschiedliche Flugzeiten (t), mit denen die Driftstrecke (L) zwischen Pusher und Detektor zurückgelegt wird. (e = Elementarladung = $1.6 \cdot 10^{-19} \text{C}$)

$$E_{kin} = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2 = \frac{1}{2} \cdot m \cdot \left(\frac{L}{t}\right)^2 = z \cdot e \cdot U$$

Durch Messung der Flugzeit zwischen Pusher und Detektor lassen sich also die m/z-Werte der Peptide bzw. Peptidfragmente ermitteln.

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

Mit Kenntnis der m/z- Werte einzelner Fragmente des Ausgangspeptids lassen sich Rückschlüsse über dessen Sequenz gewinnen.

Die Driftstrecke zwischen Pusher und Detektor ist nicht linear angelegt, sondern wird durch einen Reflektor in zwei Hälften geteilt. Dieser besteht aus einem elektrischen Feld, das den Ionenstrom umlenkt. Naturgemäß unterscheiden sich die Geschwindigkeiten von einzelnen Vertretern einer Ionenspezies

geringfügig. Dies würde bei einer linearen Driftstrecke zu einer Unschärfe der Flugzeitmessung führen. Schnellere Ionen dringen tiefer in das elektrische Feld des Reflektors ein und legen damit einen weiteren Weg zurück als langsamere Ionen. Dadurch kommt es zu einem Ausgleich der Geschwindigkeitsdifferenz und damit zu einem schärferen Signal, zu einer höheren zeitlichen Auflösung.

2.1.4.2. Praktische Durchführung der LC-MS/MS-Analytik

Um eine kontinuierliche Sequenzierung der einzelnen Peptide aus dem komplexen Peptidgemisch, das aus der Aufarbeitung der Tumoren erhalten wurde, zu ermöglichen, war die chromatographische Auftrennung der Peptide vor der massenspektrometrischen Sequenzierung nötig. Hierzu wurde ein HPLC^a-System (μ Kapillar-LC-System Ultimate, Dionex) direkt mit der Elektrospray-Einheit des Massenspektrometers (Q-TOF; Micromass, Manchester, UK) gekoppelt. Diese „*Liquid Chromatography Mass Spectrometry* (LC-MS)-Kopplung“ ermöglichte die kontinuierliche *online*-Detektion und Sequenzierung der verschiedenen Einzelpeptide. Das Pumpsystem der HPLC-Einheit (Ultimate, Dionex) wurde mit einer Flussrate von 150-200 μ l/min betrieben, durch Splitting des Flüssigkeitsstromes wurde die Flussrate auf ca. 300nl/min reduziert.

Vor Befahrung wurde das System zunächst 10min mit 100% Lösungsmittel B^b gewaschen und anschließend mit 15% Lösungsmittel B äquilibriert. Die in 150 μ l Lösungsmittel A^c gelösten Peptid-Proben wurden zur Entsalzung und Volumenreduktion zunächst auf die C18-Vorsäule^d geladen (Flussrate: 20 μ l/min). Die eigentliche Chromatographie erfolgte in der in Reihe geschalteten Mikrokapillarsäule^e. Die Ladezeit der Säule betrug 30min mit 15% Lösungsmittel B. Die Elution erfolgte durch kontinuierliche Konzentrationssteigerung des Lösungsmittel B über einen 120-minütigen Gradienten von 15-45% Lösungsmittel B (ca. 0,3% Konzentrationssteigerung

^a HPLC: High Performance Liquid Chromatography

^b Lösungsmittel B: 2mM NH₄Ac in 80% Acetonitril, pH3 eingestellt mit Formiat

^c Lösungsmittel A: 4mM NH₄Ac, pH3 eingestellt mit Formiat

^d Vorsäule: C18, 300 μ m, 10mm, Dionex

^e *fused-silica*-Mikrokapillarsäule: 5 μ m C18, 75 μ m x 250 mm, Dionex

des Lösungsmittel B pro Minute) online in die MS/MS-Einheit. In der Elektrospray-Einheit des Massenspektrometers wurden goldbeschichtete Glaskapillaren^a als Ionenquellen verwendet.

Die Aufnahme der MS-Daten erfolgte mit einer Integrationszeit des TOF-Analysators von 1s und einer Interscanverzögerung von 0,1s, für die Aufnahme der MS/MS-Spektren betrug die Integrationszeit 4s bei identischer Interscanverzögerung. Die Fragmentierung der Peptide ($[M+H]^+$ oder $[M+2H]^{2+}$) in der Argon-befüllten Kollisionskammer erfolgte durch automatisches Umschalten zwischen dem MS- und MS/MS-Modus. Die Steuerung des MS/MS-Gerätes, die Aufzeichnung der Fragmentspektren sowie deren Auswertung erfolgten computergestützt mit Hilfe des Programmes *MassLynx V4.0* (Micromass, Manchester, UK).

2.1.5. Interpretation von MS/MS-Spektren zur Peptidsequenzanalyse

Die Auswertung von CID-MS/MS^b-Spektren zur Sequenzierung MHC-gebundener Peptide gehörte zu den zentralen Aufgaben bei der Anfertigung dieser Arbeit. Sie wurde manuell mit Unterstützung des Computerprogramms *MassLynx V4.0* (Micromass, Manchester, UK) durchgeführt.

Die Grundbausteine der Peptide sind die zwanzig proteinogenen Aminosäuren. Diese unterscheiden sich in ihren Massen, nur Leucin und Isoleucin sowie Lysin und Glutamin haben die gleiche Masse. Die Unterscheidbarkeit der Aminosäuren anhand ihrer Masse bildet die Grundlage zur Sequenzierung von Peptiden mit der CID-MS/MS. Tabelle 11 listet die proteinogenen Aminosäuren mit ihren Massen auf.

Tabelle 11 (folgende Seite): Darstellung der proteinogenen Aminosäuren mit den entsprechenden molekularen Massen

^a Glaskapillaren (360/20 µm OD/ID Kapillare, 10 µm Auslassöffnung, PicoTip, New Objective)

^b CID-MS/MS: Kollisionsinduzierte Tandem-Massenspektrometrie

Aminosäure	1- Buchstaben Code	3- Buchstaben Code	Struktur	Masse der Aminosäure (wasserfrei)	Masse des Immoniumions
Glycin	G	Gly	—H	57	30
<u>Aminosäuren mit unpolaren hydrophoben Seitenketten</u>					
Alanin	A	Ala	—CH ₃	71	44
Valin	V	Val	—CH—CH ₃ CH ₃	99	72
Leucin	L	Leu	—CH ₂ —CH—CH ₃ CH ₃	113	86
Isoleucin	I	Ile	—CH—CH ₂ —CH ₃ CH ₃	113	86
Methionin	M	Met	—CH ₂ —CH ₂ —S—CH ₃	131	104
Prolin	P	Pro		97	70
Phenylalanin	F	Phe	—CH ₂ —	147	120
Tryptophan	W	Try	—CH ₂ —	186	159
<u>Aminosäuren mit ungeladenen polaren Seitenketten</u>					
Serin	S	Ser	—CH ₂ —OH	87	60
Threonin	T	Thr	—CH—CH ₃ OH	101	74
Cystein	C	Cys	—CH ₂ —SH	103	76
Tyrosin	Y	Tyr	—CH ₂ —	163	136
Asparagin	N	Asn	—CH ₂ —C(=O)—NH ₂	114	87
Glutamin	Q	Gln	—CH ₂ —CH ₂ —C(=O)—NH ₂	128	101
<u>Aminosäuren mit geladenen polaren Seitenketten</u>					
Lysin	K	Lys	—[CH ₂] ₄ —NH ₃ ⁺	128	101
Arginin	R	Arg	—[CH ₂] ₃ —NH—C(=NH ₂ ⁺)—NH ₂	156	129
Histidin	H	His	—CH ₂ —	137	110
Aspartat	D	Asp	—CH ₂ —C(=O)—O ⁻	115	88
Glutamat	E	Glu	—CH ₂ —CH ₂ —C(=O)—O ⁻	129	102

Die Fragmentierung der Peptide in der Edelgaskollisionskammer (siehe Kap. 2.1.4.1.) geschieht hauptsächlich im Peptidrückgrat. Dabei entstehen Fragmente die entweder den N- oder den C-Terminus des Ausgangspeptids enthalten. Nur ladungstragende Fragmente werden im MS detektiert. Die Nomenklatur der Peptidfragment-Ionen (182;328) hängt davon ab, welcher Terminus im Fragment enthalten ist. Handelt es sich um ein N-terminales Fragment, so gehört es je nach Bruchstelle im Peptidrückgrat der a-, b-, oder c-Serie an. Enthält das Fragment hingegen den C-Terminus des Peptids so handelt es sich um ein x-, y-, oder z-Ion. Die Position der genauen Bruchstelle im Peptidrückgrat wird zum einen über die genannten Buchstaben (Bruchstelle an Peptidbindung – y- oder b-Serie; Bruchstelle zwischen C1 und C2 eines Aminosäurerestes – x- oder a-Serie; Bruchstelle zwischen C2 und Aminogruppe eines Aminosäurerestes – c- oder z-Serie) zum anderen über Zahlen, welche die Anzahl der im Fragment enthaltenen vollständigen Aminosäurereste wiedergibt, definiert. Die Peptidfragmentnomenklatur ist schematisch in Abbildung 3a,b,c dargestellt. Die y- und c-Ionen entstehen dabei durch Wasserstoff-Transfer von anderen Aminosäuren.

Neben den bereits erwähnten entstehen bei der Fragmentation noch so genannte interne Fragmente sowie Immoniumionen.

Die internen Fragmente entstehen durch mehrfache Brüche im Peptidrückgrat und enthalten weder den N-noch den C-Terminus des ursprünglichen Peptids. Zumeist jedoch liegen die zwei Bruchstellen der internen Fragmente an den Peptidbindungen, so dass ein Ende des Fragments einer y-Serie, das andere einer b-Serie entspricht. Es entsteht also ein Amino-Acylum-Ion (Abbildung 3d). Entsprechend ist die Nomenklatur der internen Fragmente: die Bruchstellen werden mit dem Buchstaben der Serie und der Anzahl der Aminosäurereste, gezählt vom gegenüberliegenden Terminus des Ausgangspeptids, versehen und zusammengefügt ($y_i b_j$). Alternativ wird die Aminosäuresequenz des Fragments mit dem Einbuchstabencode angegeben. Interne Fragmente, die nur einen Aminosäurerest enthalten und aus der Kombination eines y- und a-Bruchs entstanden sind werden als Immoniumionen bezeichnet (Abbildung 3e).

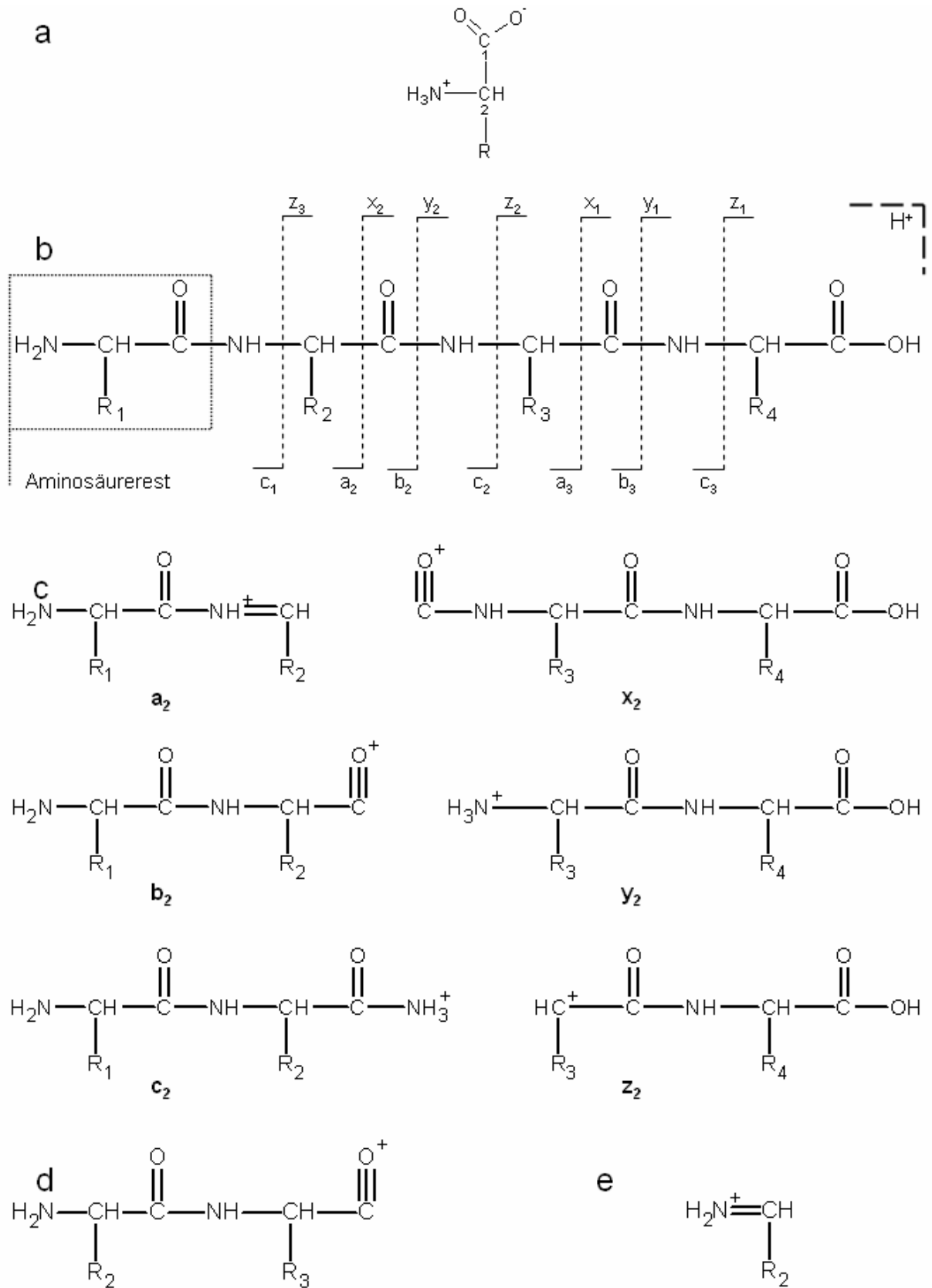


Abbildung 3 (vorangegangene Seite): Nomenklatur der Peptidfragment-Ionen:

- a) Grundstruktur einer Aminosäure
- b) Aufbau eines Peptidrückgrats (4 Aminosäuren R1-R4 von N- nach C-terminal), Peptidbindung und Nomenklatur der Bruchstellen innerhalb des Rückgrats. Handelt es sich um ein N-terminales Fragment, so gehört es je nach Bruchstelle im Peptidrückgrat der a-, b-, oder c-Serie an. Enthält das Fragment hingegen den C-Terminus des Peptids so handelt es sich um ein x-, y-, oder z-Ion. Die Position der genauen Bruchstelle im Peptidrückgrat wird zum einen über die genannten Buchstaben zum anderen über Zahlen, welche die Anzahl der im Fragment enthaltenen vollständigen Aminosäurereste wiedergibt, definiert.
- c) Strukturformeln der Fragmentionen: links N-terminale Fragmente (a;b;c), rechts C-terminale Fragmente (x;y,z)
- d) Strukturformel eines internen Fragmentions: Amino-Acylum-Ion
- e) Strukturformel eines internen Fragmentions: Immoniumion

Immoniumionen werden mit dem Einbuchstabencode der entsprechenden Aminosäure beschriftet. Die Immoniumionen einiger Aminosäuren zeigen regelmäßig in den CID-MS/MS Spektren eine hohe Intensität, sodass bei Vorhandensein des entsprechenden Signals auf die Präsenz der Aminosäure im zu analysierenden Peptid geschlossen werden kann. Die Massen der Immoniumionen, die regelmäßig ein starkes Signal verursachen sind in Tabelle 11 durch Fettdruck gekennzeichnet.

Bei der Fragmentation der Peptide und entsprechend bei der Auswertung der CID-MS/MS Spektren treten entweder die xyz- oder die abc-Ionen dominant in ihrer Intensität in den Vordergrund. Gewöhnlich zeigen y- oder b-Ionen die höchste Intensität.

Ist das Peptid hauptsächlich als b-Serie fragmentiert, so finden sich zumeist auch Ionen der a-Serie. Da Ionen der a-Serie sich von denen der b-Serie formell durch den Verlust von Kohlenmonoxyd (Masse: 28Da) unterscheiden treten die Signale der a-Serie charakteristischerweise mit einer Massendifferenz von 28Da neben jenen der b-Serie auf.

Der Verlust eines Wassermoleküls (Masse: 18Da) in einem Peptidfragment führt zu einem Begleitsignal mit einer Massendifferenz von 18Da. Dies ist bei den Aminosäuren S, T, D und E ein häufiges Phänomen, was zu ihrer Identifizierung beitragen kann. Ähnliches gilt für die Aminosäuren Q, K und R: durch den Verlust von Ammoniak kommt es bei diesen Aminosäuren häufig zum Auftreten von Begleitsignalen mit einer Massendifferenz von 17Da.

Praktisch werden bei der Interpretation von CID-MS/MS Spektren zunächst möglichst viele Signale einer Serie, möglichst y- oder b-Serie zugeordnet. Die Massendifferenzen zwischen den Signalen einer Serie entsprechen denen der Aminosäuren. Lassen sich also einige Signale einer Serie zuordnen, so lässt sich aufgrund der Massendifferenzen zwischen den einzelnen Signalen auf die Sequenz des zugrunde liegenden Peptids schließen (siehe Abbildung 4). Die Kenntnis der Gesamtmasse des Peptids, das Auftreten charakteristischer Immoniumionen sowie die Identifikation der oben erwähnten Begleitsignale liefert zusätzliche Information über die dem Spektrum zugrunde liegende Sequenz.

Das im world-wide-web (www) frei zugängliche Programm *MASCOT*^a (Matrix Science Ltd., London, UK) bietet die Möglichkeit Proteindatenbanken speziell mit massenspektrometrisch gewonnenen Daten zu durchsuchen (302). Hierbei werden die experimentellen Massen der Fragmentationen mit Proteinsequenzen in entsprechenden Datenbanken verglichen und Proteine bzw. aus diesen prozessierbare Peptide, die entsprechende Sequenzen enthalten, aufgelistet. Über ein statistisches Verfahren wird die Wahrscheinlichkeit errechnet, mit der die zur Suche verwendeten Daten ein Protein bzw. Peptid identifizieren. Das von MASCOT verwendete statistische Verfahren zur Gewichtung der Peptid-Quellproteine beruht auf dem Mowse-Algorithmus (296).

Praktisch wurden bei der Anfertigung dieser Arbeit Fragmentspektren zunächst so umfassend wie möglich ausgewertet. Mit den gewonnenen Daten wurde zunächst über MASCOT die NCBIInr-Datenbank^b durchsucht. Diese Datenbank enthält redundanzbereinigt Proteinsequenzen, zusammengetragen aus anderen Datenbanken, nämlich: GenBank^c, PDB^d, Swiss-Prot^e, PIR^f und PRF^g. War das Ergebnis dieser Suche nicht eindeutig, so wurden die prinzipiell möglichen Peptidsequenzen einzeln mit dem Fragmentspektrum verglichen. Konnte so immer noch kein Peptid, bzw. Quellprotein mit ausreichender Sicherheit

^a MASCOT: www.matrixscience.com

^b NCBIInr: www.protein.sdu.dk/gpmaw/GPMAW/Databases/NCBIInr/ncbinr.html

^c GenBank: www.ncbi.nih.gov/Genbank/GenbankOverview.html

^d PDB: www.rcsb.org/pdb/

^e Swiss-Prot: www.expasy.org/sprot/

^f PIR: <http://pir.georgetown.edu/pirwww/>

^g PRF: www4.prf.or.jp/en/

identifiziert werden, wurde dem Sequenzfragment die Datenbank dbEST^a, die auf cDNA Fragmenten basiert (36;37) durchsucht. Ergebnisse dieser Suche wurden allerdings nur selten berücksichtigt, da Peptide zumeist nicht zweifelsfrei identifiziert werden konnten.

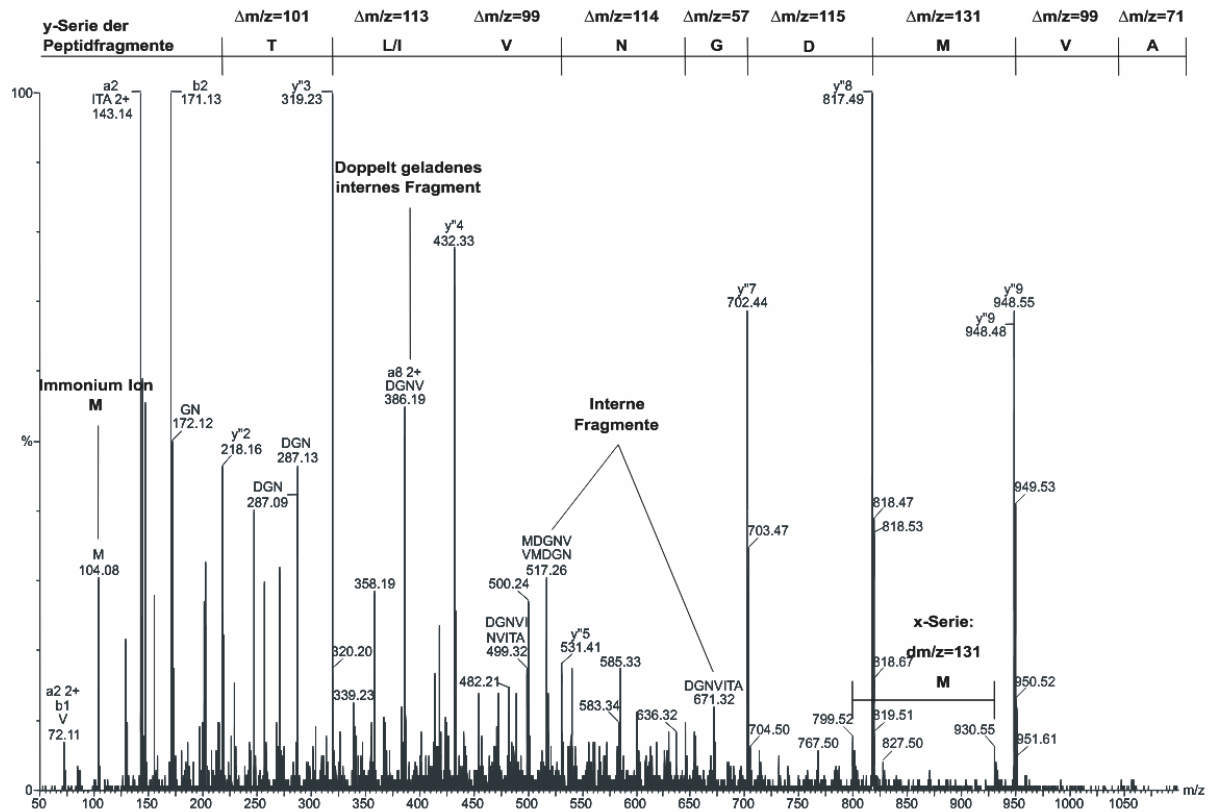


Abbildung 4: Fragmentspektrum des Peptids AVMDGNVITAK. Die y-Serie, also C-terminale Fragmente sind dominant. Durch die Massendifferenz der einzelnen Fragmente lässt sich auf die Aminosäuresequenz rückschließen.

2.2. Methoden der Genexpressionsanalyse

2.2.1. GeneChip-basierte Genexpressionsanalyse

Die RNA-Extraktion, die Qualitätskontrolle der RNA sowie die RNA-Amplifikation wurden von Herrn Dr. rer. nat. Oliver Schoor durchgeführt, ich habe die Methodik im Zuge einer Hospitation kennen gelernt.

^a dbEST: www.ncbi.nih.gov/dbEST/index.html

Die Beschickung der *GeneChips* (Affymetrix) sowie die Messung der einzelnen Proben erfolgte in der *Microarray facility* (Leitung: Dr. Michael Bonin) des Instituts für Medizinische Genetik Tübingen (Prof. Dr. Olaf Rieß).

Die Auswertung der Datensätze oblag Herrn Dr. Schoor, die statistischen Vergleiche der einzelnen Tumorproben sowie Zelllinien wurden durch den Verfasser dieser Arbeit angefertigt.

Das methodische Vorgehen zur RNA-Extraktion und Amplifikation sei hier nur in Kürze erwähnt.

2.2.2. RNA-Extraktion, -Aufreinigung, -Amplifikation und -Fragmentation zur Vorbereitung der *GeneChip*-basierten Genexpressionsanalyse

Gefrorene, kleine Fragmente von Tumor- und Normalgeweben wurden vor der RNA- Extraktion zunächst mit dem Mörser unter flüssigem Stickstoff homogenisiert, kultivierte Zellen wurden direkt in TRIzol (Invitrogen, Karlsruhe) resuspendiert (1mlTRIzol / Zellkulturflasche).

Die Extraktion der zellulären gesamt-RNA erfolgte mit TRIzol. Die Zellen wurden zunächst 5min bei Raumtemperatur in TRIzol inkubiert. 200µl Chloroform wurden zugegeben, die Phasen wurden gut durchmischt, und schließlich drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Phasentrennung erfolgte unter Zentrifugation mit 15000g für 15min bei 4°C. Die überstehende, die RNA enthaltende wässrige Phase wurde abpipettiert und mit 1 ml TRIzol / 0,5ml Lösung durchmischt und für 10min auf Eis inkubiert. Folgend wurde die RNA bei 12000g für 10min bei 4°C abzentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde in 1ml 75% Ethanol / 1ml TRIzol gewaschen, und wiederum mit diesmal 7500g bei 4°C für 5min abzentrifugiert. Das überstehende Ethanol wurde abpipettiert, das Pellet für 5-10min an der Luft getrocknet, und anschließend in 100µl Rnase-freiem Wasser (Qiagen) bei 60°C (PCR-Heizblock) resuspendiert.

Folgend wurde die extrahierte zelluläre gesamt-RNA aufgereinigt, hierzu wurde das kommerzielle *RNeasy Mini* – Kit (Qiagen) verwendet. Dabei wurde streng nach dem Protokoll des Herstellers (*RNeasy Mini Protocol for RNA Cleanup*,

Qiagen)^a vorgegangen. Nach diesem Aufreinigungsschritt lag die zelluläre gesamt RNA in 30µl Rnase-freiem Wasser vor.

Zur qualitativen und quantitativen Überprüfung des Aufreinigungsergebnisses wurde 1µl der Lösung entnommen und 1:100 in Rnase-freiem Wasser verdünnt. Die quantitative RNA-Ausbeute wurde photometrisch bei 260nm (Absorptionswellenlänge der Basen) bestimmt. Die Konzentration in der Probe

wurde nach der Formel $c_{[\mu\text{g}/\mu\text{l}]} = \frac{E_{260} \times VF \times 40}{V}$ berechnet, wobei VF der

Verdünnungsfaktor der gemessenen Probe und V das Volumen der gemessenen Probe darstellt. Der Reinheitsgrad der Präparation wurde aus dem Verhältnis der Extinktionen bei 260nm (Nucleinsäuren) und 280nm (aromatische Seitenketten der Aminosäuren) abgeschätzt. Die Qualitätskontrolle der präparierten RNA erfolgte mit dem automatisierten Kapillarelektrophoresesystem *RNA 6000 Pico LabChip Kit* (Agilent) auf dem *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent)^b. Dabei wurde methodisch streng nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen. Mit der Elektrophorese sollte gezeigt werden, dass im idealen Fall die ribosomale RNA (rRNA) weitgehend unverdaut vorliegt. Abbildung 5 zeigt das Ergebnis einer solchen Kapillarelektrophorese, Kriterien für eine qualitativ hochwertige RNA Präparation waren das Vorhandensein zweier deutlich abgrenzbarer Peaks der 18S- und 28S-rRNA sowie das quantitative Verhältnis beider rRNA-Spezies zueinander, welches aus der Breite der Peakbasen abgeschätzt wurde. Bei der Extraktion der zellulären gesamt-RNA aus soliden Tumoren und Zelllinien wurden RNA-Mengen zwischen 5-100µg gewonnen. Zur suffizienten Analyse der extrahierten und gereinigten RNA mit Hilfe der *GeneChip*-Technologie war es nötig die RNA zu amplifizieren.

^a RNeasy Mini Protocol for RNA Cleanup, Qiagen:
www1.qiagen.com/literature/handbooks/PDF/RNASTabilizationAndPurification/FromAnimalAndPlantTissuesBacteriaYeastAndFungi/RNY_Mini/1035969_HB.pdf

^b *RNA 6000 Pico LabChip Kit* (Agilent) und *Agilent 2100 Bioanalyzer* Manuals:
www.chem.agilent.com/scripts/literatureresults.asp?irecordcount=1000&iLanguage=8&imodel=1153&iproducttype=99

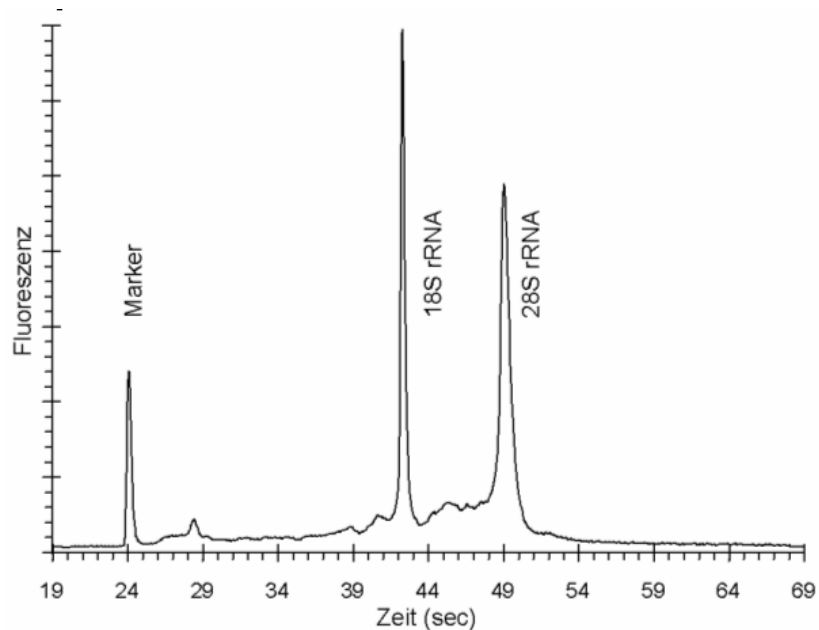


Abbildung 5: Qualitätskontrolle der Gesamt-RNA-Präparation mit dem Kapillarelektrophoresesystem *RNA 6000 Pico LabChip Kit* (Agilent): Kriterium für eine qualitativ hochwertige RNA-Präparation ist das Vorhandensein zweier deutlich abgrenzbarer Peaks der 18S- und 28S-rRNA sowie das quantitative Verhältnis beider rRNA-Spezies zueinander.

Dabei ging man von 5-8µg gereinigter RNA aus, der Rest wurde asserviert. Auch hierbei wurden methodisch die Anweisungen des Chipherstellers *Affymetrix* befolgt^a. Abbildung 6 zeigt schematisch den Ablauf der ersten Amplifikationsrunde. Die gesamt-RNA wurde zunächst in doppelsträngige cDNA transkribiert. Vorgelegt wurden 5µg RNA/11µl H₂O (RNase frei). 100pmol des T7-(dT)₂₄-Primers (MWG Biotech), der mit seinem 3'poly- dT Ende an das 3'poly- A Ende der mRNA bindet,



wurden in einem Volumen von 1µl hinzugefügt, zur Primerhybridisierung wurde für 10min bei 70°C inkubiert, kurz abzentrifugiert und auf Eis inkubiert (25;416). Dann wurden die dNTP (10mM, 1µl) sowie die vom Hersteller gelieferten Puffer zugegeben und für 2min auf 42°C erhitzt.

^a Affymetrix Manual: Eukaryotic Sample and Array Processing:
www.affymetrix.com/support/downloads/manuals/expression_s2_manual.pdf

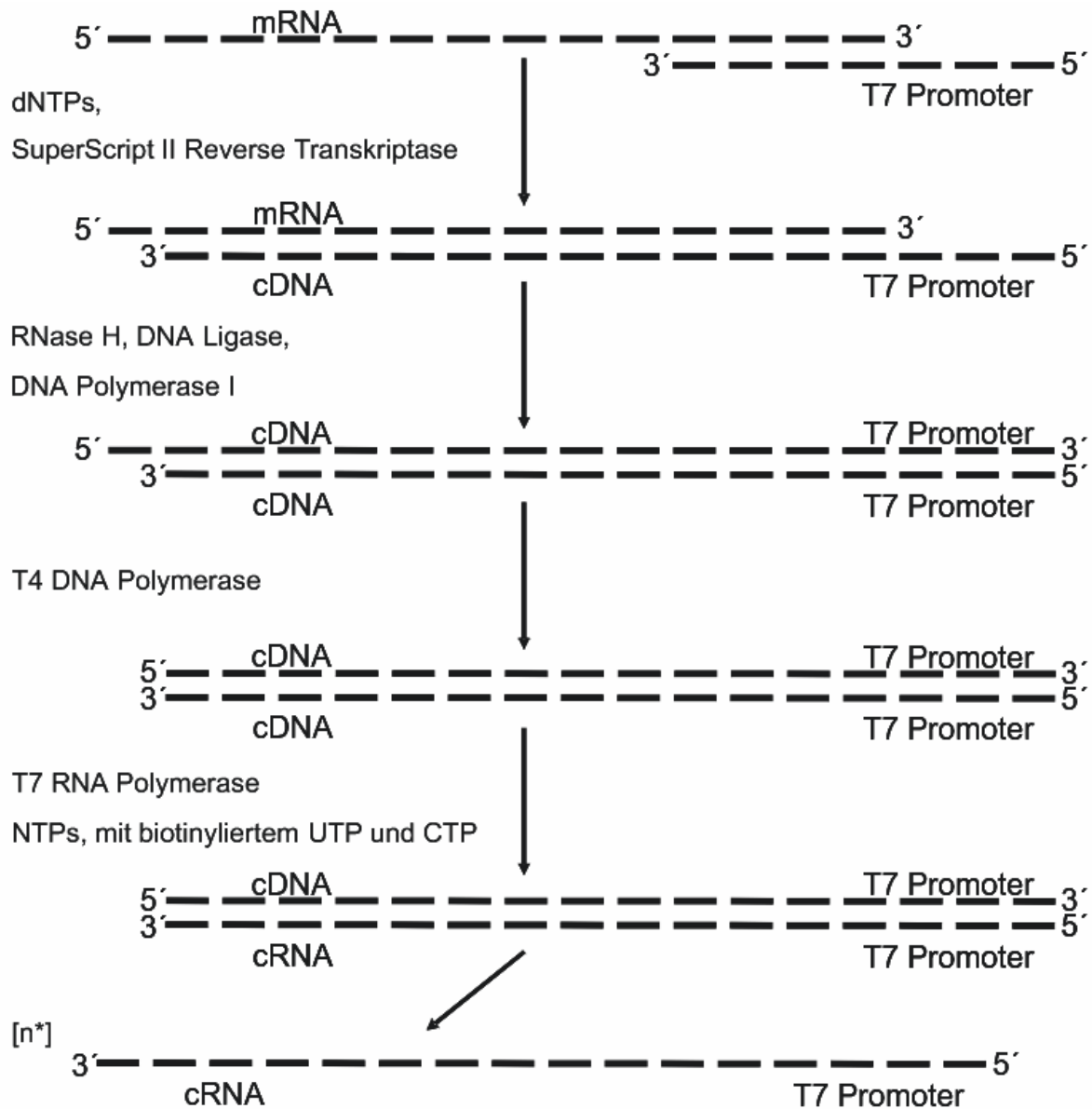


Abbildung 6: Schematische Darstellung der ersten Runde der Amplifikation der zellulären gesamt-RNA

Zum eigentlichen Reaktionsstart wurden 200U der *SuperScript II RT* (Invitrogen) zugefügt und bei 42°C im Thermocycler für eine Stunde inkubiert. Durch diese Reaktion wurde der erste Strang der cDNA synthetisiert.

Zur Synthese doppelsträngiger cDNA wurden folgende Komponenten zugefügt: 10U DNA-Ligase (E.coli), 40U DNA-Polymerase I (E.coli), 2U RNase H (E.coli), 200µM dNTPs, Rnase-freies Wasser. Es ergab sich so ein Probenvolumen von 150µl. Inkubiert wurde für 2h bei 16°C im Wasserbad.

Zur Trimmung verbliebener RNA-Reste am 5'-Ende des neu synthetisierten cDNA-Stranges wurden 10U T4 DNA-Polymerase zugegeben, und nochmals für 5min bei 16°C inkubiert.

Es folgte eine Aufreinigung der doppelsträngigen cDNA, dabei wurde nach der Methode der Phenol/Chloroform-Extraktion vorgegangen, wobei ein *Phase Lock Gel* (Eppendorf) verwendet wurde, um die Handhabung der Phasen zu erleichtern, anschließend wurde die cDNA mit Ethanol gewaschen und präzipitiert. Bei der Präzipitation wurde lineares Polyacrylamid als sog. *carrier* verwendet, um die Ausbeute zu erhöhen. Auch hierbei wurde das Protokoll der Firma Affymetrix befolgt^a. Nach den Aufreinigungsschritten wurde die cDNA in 10µl Rnase-freiem Wasser resuspendiert.

Für die folgende *in vitro*-Transkription und Amplifikation wurden biotinylierte NTPs verwendet, um die zur Auswertung des *GeneChips* nötige Färbereaktion zu ermöglichen. Hierzu wurde das von *Affymetrix* empfohlene *BioArray High Yield RNA Transcript labeling Kit* (Enzo) verwendet. Die zentralen Bestandteile dieses Kits sind die T7 RNA-Polymerase sowie Ribonukleotide, wobei UTP und CTP biotinyliert vorliegen (genaue Konzentrationsangaben sind den Unterlagen des Herstellers nicht zu entnehmen). Die Reagenzien wurden nach Angaben des Herstellers^b der in 10µl H₂O vorliegenden cDNA zugefügt, es ergab sich ein Reaktionsvolumen von 40µl. Der Reaktionsmix wurde über Nacht bei 40°C im Thermocycler inkubiert. Hierdurch konnte eine ca. fünfhundertfache Amplifikation der ursprünglichen mRNA erreicht werden.

Um nicht in die amplifizierte cRNA eingebaute Ribonucleotide, sowie andere Reagenzien zu entfernen musste nochmals ein Reinigungsschritt erfolgen. Dieser wurde wiederum, wie bereits bei der Aufreinigung der gesamten zellulären RNA, mit dem *RNeasy Mini* – Kit (Qiagen) durchgeführt. Nach diesem Aufreinigungsschritt lag die zelluläre gesamt-cRNA in 30µl RNase-freiem Wasser vor, die cRNA-Ausbeute wurde photometrisch bei 260nm bestimmt.

^a Affymetrix Manual: Eukaryotic Sample and Array Processing:
www.affymetrix.com/support/downloads/manuals/expression_s2_manual.pdf

^b Enzo BioArray HighYield RNA Transcript Labeling Kit, Manual:
www.enzobio.com/lifesciences/static/product_details.asp?pid=154&catid=200#=>42665.pdf

Vor der Hybridisierung der cRNA auf den *GeneChip* war es nötig diese zu fragmentieren. 20µg der cRNA-Ausbeute wurden mit dem von *Affymetrix* gelieferten Fragmentationspuffer (Magnesiumacetat) in einem Volumen von 40µl gespalten. Nach Herstellerangaben haben die entstehenden Fragmente eine Länge von 35-200 Basen. Inkubiert wurde bei 94°C für 35min. Die so für die Beladung des *GeneChips* vorbereiteten Proben wurden bei -20°C eingefroren.

Die Proben RCC130, RCC133 sowie RCC68ZL wurden mit dem *GeneChip* HG-U133 Plus 2.0 (*Affymetrix*), alle anderen Proben mit dem Vorgängermodell HG-U133A (*Affymetrix*) gemessen.

Die Beladung der *GeneChips*, die Färbung sowie ihre Auslesung fand in der *Microarray facility* Tübingen statt. Gefärbt wurde mit Streptavidin-Phycoerythrin und einem biotinylierten *anti-streptavidin* Antikörper (Molecular Probes). Die *GeneChips* wurden je nach Chiptyp ausgelesen mit dem *Agilent 2500A GeneArray Scanner* (U133A) bzw. mit dem *Affymetrix GeneChip Scanner 3000* (U133 Plus 2.0). Die Datenanalyse erfolgte mit der Software *MAS 5.0* (U133A) bzw. *GCOS* (U133 Plus 2.0) (*Affymetrix*), es wurden alle Standardeinstellungen des Herstellers übernommen. Der statistische Vergleich der Genexpressionen der einzelnen Gewebe wurde mit Microsoft Excel angefertigt.

Die gesamt-RNA der gezeigten gesunden Gewebe wurde kommerziell von verschiedenen Firmen erworben (Ambion, Clontech, Stratagene), die einzelnen Proben stellen Mixturen der organspezifischen gesamt-RNA von 2 bis 62 Individuen dar.

2.2.3. Statistische Methoden zur Auswertung der Genexpressionsanalysen

Da es sich bei den Genexpressionsdaten definierter Gene im Vergleich zwischen verschiedenen Tumoren und Geweben um nicht normalverteilte Daten handelt, wurde als zulässiger Lageparameter der Median verwendet.

Median:

$$\tilde{x} = x_{(n+1)/2} \quad \text{für ungerades } n$$

$$\tilde{x} = 1/2(x_{n/2} + x_{n/2+1}) \quad \text{für gerades } n$$

(x_i : Werte einer geordneten Urliste; n : Umfang der Stichprobe)

Weiterer Vorteil des Medians in diesem Zusammenhang ist seine Stabilität gegenüber einzelnen Extremwerten, also „Ausreißern“ im Datensatz.

Als Maß der Streuung (Dispersionsmaß) diente durchgehend der *range*.

Range:

$$R = x_{\max} - x_{\min}$$

Der *range* ist die Spannweite der Daten, gibt also den größten und den kleinsten gemessenen Wert wieder.

Zur Extraktion jener Genprodukte aus dem Datensatz, die in einer großen Anzahl von Tumoren hoch gegenüber der Normalniere exprimiert waren, genügte es, die Mediane der Überexpression in den Tumoren dem Betrag nach absteigend zu sortieren, da der gesamte Datensatz im Vorfeld auf die Normalniere normalisiert worden war.

Zur Identifizierung jener Genprodukte, die in den meisten oder in einzelnen Tumoren gegenüber allen Normalgeweben maximal überexprimiert waren wurden die Differenz zwischen dem Median der Expression in den Tumoren und dem Extremwert der Expression in den Normalgeweben bzw. die Differenz zwischen dem Extremwert der Expression in den Tumoren und dem Extremwert der Expression in den Normalgeweben herangezogen.

Zur statistischen Auswertung der Daten wurde lediglich die Software *Microsoft Excel* (Microsoft) verwendet. Bei der Auswertung der Genexpressionsanalysen wurden relative Überexpressionen eines definierten Genprodukts um mindestens Faktor 3 oder größer im Tumor gegenüber dem entsprechenden Normalgewebe als relevant betrachtet.

2.3. Methoden zur Kultivierung und Analyse von Tumorzellen

2.3.1. Kultivierung von Tumorzelllinien

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte bei 37°C in feuchtigkeitsgesättigter und Kohlendioxyd-angereicherter (7,5% CO₂) Atmosphäre im Inkubator (Labotect, Forma Scientific). Es wurden Zellkulturflaschen verschiedener Größe (100, 250 und 550ml Cellstar, Greiner Bio-One GmbH), sowie 12-Loch Platten (Becton Dickinson) als Kulturgefäße verwendet. Die Großkultur der adherenten sowie der Suspensionszellen erfolgte in 2 l-Rollerflaschen (Schott), die mit 500 bis 750ml Kulturmedium befüllt im Wärmeraum unter ständiger Rotation mit ca. 1,5 rpm gelagert wurden. Als Kulturmedium für Tumorzellen wurde durchgehend RPMI-1640 (Gibco) mit folgenden Zusätzen verwendet: NaHCO₃ (2 g/l), HEPES (2,4 g/l), L-Glutamin (2 µmol/l, PAA Laboratories), 2-Mercaptoethanol (30 µmol/l, Roth), nicht-essentielle Aminosäuren (100fach, Sigma), 1mM Na-Pyruvat, Penicillin (50µg/ml, PAA Laboratories), Streptomycin (50µg/ml, PAA Laboratories) und 10% fötales Kälberserum (Fetal Calf Serum, FCS; PAA Laboratories). Das Medium wurde mindestens 2mal pro Woche gewechselt. Adherente Zellen wurden täglich mikroskopisch auf die Zelldichte hin untersucht, war ca. 90% Konfluenz erreicht wurden sie im Verhältnis 1:2 oder 1:3 gesplittet. Hierzu wurde das Kulturmedium entfernt, der Zellrasen wurde einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde der Zellrasen mit einer Trypsin- EDTA Lösung (Gibco) benetzt und für 3 - 5min bei 37°C inkubiert. Unter dem Mikroskop wurde die Ablösung der Zellen von Zeit zu Zeit kontrolliert und durch leichtes Klopfen beschleunigt um die Einwirkzeit der Trypsin-EDTA Lösung zu minimieren. Sobald sich die Zellen abgelöst hatten wurde der Suspension etwas RPMI-1640 und FCS zugesetzt, um das Trypsin zu inaktivieren. Die Zellen wurden bei 1600rpm für 5min abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen, dann erneut in Medium aufgenommen und ausgesät. Suspensionszellen wurden zum Splitten nur abzentrifugiert und in frischem Medium aufgenommen.

Ziel der Großkultur der verschiedenen Zelllinien war es, 50-100g Zellpellets zu produzieren, um möglichst große Peptidmengen präparieren zu können. Um solche Zellmengen effizient produzieren zu können wurden 24 Rollerflaschen, jeweils mit 600ml Medium befüllt, parallel kultiviert. Bei jeder Zellernte wurde der Inhalt von 12 Flaschen geerntet, die restlichen 12 Flaschen wurden 1:2 gesplittet.

2.3.2. Zellernte

Zur Ernte adherenter Zellen mussten diese vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst werden, hierzu wurde Trypsin-EDTA (Gibco) verwendet und analog dem unter Punkt 2.3.1. beschriebenen Zellsplitting verfahren. Bei der Ernte adherenter Zellkulturen aus 2 l-Rollerflaschen erhielt man so ca. 25 ml Zellsuspension in Trypsin-EDTA. Die Zellen wurden abzentrifugiert, gewaschen, die einzelligen Pellets wurden vereinigt, und in Aliquots von ca. 5g im Stickstoff als trockenes Pellet schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

Suspensionszellen wurden in 500 ml-Zentrifugenbechern bei 1600rpm (ca.500g) und 4°C (Sorvall RC 5C Plus, Rotor GS-3) abzentrifugiert, anschließend wurde das Pellet einmal mit kaltem PBS gewaschen. Die Pellets wurden vereinigt, im Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.3.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Einzufrierende Zellen wurden in einer Konzentration von $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in eiskaltem Einfriermedium (90% FCS, 10% DMSO^a) aufgenommen und zu je 1ml in Kryoröhrchen (Merck) aliquotiert. Diese wurden dann in einer mit Isopropanol befüllten Kryobox bei -80°C für 24h eingefroren, bevor sie in flüssigem Stickstoff endgültig gelagert wurden.

Neu zu kultivierende Zellen wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. So früh wie möglich wurden die Zellen in 5ml Kulturmedium überführt und abzentrifugiert (1500 rpm, 3 min, Raumtemp., Eppendorf Centrifuge 5416). Das Zellpellet wurde nochmals in Kulturmedium gewaschen und abzentrifugiert, um

^a DMSO: Dimethylsulfoxid

eine Kontamination der Zellkultur mit DMSO zu vermeiden. Um eine Verdünnungsreihe anlegen zu können, wurden in einer 6-Lochplatte (Cellstar, Grainer Bio-One GmbH) 5ml, 3ml und 2ml Kulturmedium vorgelegt. Das gewaschene Zellpellet wurde in 2ml Kulturmedium aufgenommen und in der mit 5ml Kulturmedium befüllten Kavität suspendiert. Von dieser Suspension wurden 2ml abgenommen und in die mit 3ml Kulturmedium befüllte Kavität überführt und aus dieser wurden schließlich wieder 2ml in die letzte Kavität überführt. Die Zellen wurden im Inkubator kultiviert und wenn sie nahezu Konfluenz erreicht hatten „gesplittet“.

2.3.4. Bestimmung der Lebendzellzahl und Anlegen einer Wachstumskurve

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte lichtmikroskopisch unter Zuhilfenahme eines Hämozytometers nach Neubauer (Neubauer, Tiefe: 0,1 mm). Aus der zu bestimmenden Zellsuspension wurden 50µl entnommen, und 1:2 mit 0.05%iger (w/v) Trypanblaulösung (Gibco) verdünnt. Die Neubauerzählkammer wurde beschickt. In lichtmikroskopischer Betrachtung erscheinen vitale Zellen farblos, tote Zellen hingegen blau, da ihre Zellmembran für das Trypanblau durchlässig ist. Die Großquadrate der Zählkammer, welche weiter in 16 Kleinquadrate unterteilt sind fassen ein Probenvolumen von 1µl (0.1mm^3). Hiermit ergibt sich die Zellzahl / ml aus den je Großquadrat gezählten, vitalen Zellen multipliziert mit 10^4 und dem Verdünnungsfaktor. Zur genauen Zellzahlbestimmung wurden 4 Großquadrate ausgezählt und der Mittelwert gebildet, sollte die Zellzahl nur orientierend bestimmt werden, wurden nur zwei Großquadrate ausgezählt.

Zur Bestimmung der Wachstumskurve der Zelllinie RCC68CL wurden 24 große Kulturflaschen mit je 25 ml Kulturmedium beschickt und mit jeweils $2 \cdot 10^6$ Zellen angeimpft. Im Folgenden wurden jeden Tag alle Flaschen auf Konfluenz hin mikroskopisch untersucht, und täglich wurde aus drei Flaschen die Zellzahl bestimmt. Hierzu wurden die Flaschen abgeerntet und für jede Flasche wurden 8 Großquadrate in der Neubauerzählkammer ausgezählt. Die Zellzahl je Flasche wurde also aus dem Mittelwert von 8 ausgezählten Quadraten ermittelt,

die durchschnittliche Zellzahl je Flasche ergab sich aus dem Mittelwert der 3 Flaschen.

Bei jenen Flaschen, die nicht abgeerntet wurden, wurde an jedem dritten Tag ein Mediumwechsel durchgeführt. Somit wurden die Bedingungen in der Expansionskultur nachgestellt, so dass sich eine realistische Aussage über Replikationsgeschwindigkeit und optimale Zelldichte in der Großkultur treffen ließ.

2.3.5. Primärkultur und Etablierung einer Zelllinie aus soliden Nierenzellkarzinomen

Die Primärkultur von Zellen aus soliden Nierenzellkarzinomen erfolgte mit dem Ziel der Etablierung von Tumorzelllinien.

Ungefähr 1g vitales Tumorgewebe wurde direkt nach Resektion der tumorösen Niere steril aus dem Tumor enukleiert und in ein verschließbares Gefäß mit Transportmedium^a überführt.

Im Labor wurde das Gewebestück unter der Sterilbank zunächst mit einer Pinzette in eine Petrischale überführt, und dort mit etwas PBS angefeuchtet. Das Gewebestück wurde zunächst mit einem Skalpell in möglichst kleine Stücke zerteilt. War mit dem Skalpell keine weitere Zerkleinerung des Gewebes mehr zu erreichen, wurde die Gewebssuspension in ein steriles Zentrifugengefäß überführt, die Petrischale wurde mehrfach mit PBS gespült, auch die hierbei anfallende Flüssigkeit wurde in das Zentrifugengefäß überführt. Die Gewebesuspension wurde bei 1500rpm, RT, 5min zentrifugiert. Das Pellet wurde noch zweimal mit PBS gewaschen und abzentrifugiert, der Überstand wurde jeweils verworfen, um die Kontamination der Zellsuspension mit Plasma- und Gewebsproteinen, insbesondere Proteaseinhibitoren, möglichst gering zu halten. Anschließend wurde das Pellet in einer Enzymlösung, bestehend aus RPMI-1640, 0,2mg/ml Collagenase IV (Sigma), 0,1mg/ml Hyaluronidase V (Sigma) und 40U/ml Desoxyribonuklease I (Sigma) resuspendiert, und für ca. 4h bei 36°C rotierend inkubiert, um verbliebene interzelluläre Strukturproteine

^a Transportmedium: Tumorzellkulturmedium (RPMI-1640 und Zusätze, siehe Kap. 2.3.1.) zuzüglich 20µg/ml Gentamycin (Cambrex)

zu degradieren. Nach diesem enzymatischen Verdau wurden die Zellen abzentrifugiert (1500rpm, Raumtemp., 5min) und zweimal zur Entfernung der Enzyme mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde anschließend in 5-10ml PBS aufgenommen und vorsichtig in ein Zellsieb der Maschengröße 40µm (Cell strainer 40µm, BD Biosciences) überführt. Dabei wurde immer darauf geachtet, dass das Sieb nicht verstopfte, nötigenfalls wurden das Pellet auch in mehreren Schritten auf das Sieb übertragen, oder es wurden zwei Siebe verwendet. Die Zellen wurden mit Hilfe eines sterilen Spritzenkolbens (5 ml-Spritzen) und unter ständigem, leichtem Spülen mit PBS durch das Sieb gedrückt. Das Sieb wurde solange gespült, bis 50ml Durchfluss gesammelt waren. Im Durchfluss sollten sich aufgrund der Vorbehandlung und der Maschengröße des Siebes nur noch Einzelzellen, allenfalls kleine Zellklumpen befinden. Der Durchfluss wurde erneut abzentrifugiert (1500 rpm, RT, 5min) und nochmals mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in Primärkulturmedium^a aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in 4 verschiedenen Verdünnungen, (unverdünnt, 1:2, 1:3, 1:6) in einer 12 Loch-Platte ausplattiert und bei 7,5% CO₂ und 37°C in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre kultiviert.

24h nach Anlegen der Primärkultur wurden, wenn nötig, alle nicht adherenten Zellen im Zuge eines Mediumwechsels entfernt. Die Zelldichte der Primärkulturen wurde täglich mikroskopisch überprüft, waren die Zellen nahezu konfluent, wurden sie passagiert. In den ersten Tagen und Wochen der Primärkultur wurde das Kulturmedium nur sehr zurückhaltend und höchstens zur Hälfte gewechselt, da die Zellen auf zu radikalen Mediumwechsel sehr sensibel reagierten. Jene Kavitäten der 12 Loch-Platten, welche hauptsächlich Zellen enthielten, die mikroskopisch die charakteristische fibroblastäre Morphologie (spindelförmige Zellen, in „Wirbeln“ wachsend, Fotos siehe Kapitel 3.2.) aufwiesen wurden nicht weiter kultiviert. Zeigten die Zellen ein konstantes und stabiles Wachstumsverhalten, wurden die Wachstumsfaktoren (EGF und bFGF) über mehrere Passagen ausgeschlichen.

^a Primärkulturmedium: Tumorzellkulturmedium (RPMI-1640 und Zusätze, siehe Kap.2.3.1.) zuzüglich Gentamycin (100fach, PAA Laboratories), Epidermal growth factor (EGF, 10ng/ml, Invitrogen), Fibroblast growth factor (bFGF, 5ng/ml, Invitrogen), Insulin-Transferrin-Selenium X (1%, Gibco) und 10% FCS.

Insgesamt wurden auf diese Weise die folgenden Nierenzellkarzinome aufgearbeitet: RCC110, RCC111, RCC113, RCC115, RCC116, RCC117, RCC121, RCC125, RCC126, RCC130, RCC131, RCC132, RCC134.

2.3.6. Durchflusszytometrische qualitative und quantitative HLA-Bestimmung auf Tumorzelllinien

Die Funktionsweise und der theoretische Hintergrund der Durchflusszytometrie (*Fluorescence activated cell sorting*, FACS) wird an anderer Stelle in dieser Arbeit (Kapitel 2.4.8.) bei der Darstellung der Methoden zur T-Zell-Analytik beschrieben.

Die Färbung der Tumorzellen zur durchflusszytometrischen Bestimmung der HLA- Oberflächenexpression fand in 96-well Rundboden-Mikrotiterplatten (Greiner bio-one) statt. Ca. $1 \cdot 10^5$ Zellen je Kavität wurden in 100µl FACS-Puffer^a vorgelegt. Es folgte ein Waschschrift mit 200µl FACS Puffer je Well, alle Zentrifugationen wurden bei 1500rpm, 4°C für 3min durchgeführt (Heraeus Instruments; Megafuge 1.0 R), der Überstand wurde abdekantiert und verworfen. Die Färbung der einzelnen auf der Zelloberfläche exprimierten HLA-Allele erfolgte mit den monoklonalen IgG₂ Maus-anti-Mensch Antikörpern W6/32 (24) (anti-HLA-A, B, C), B1.23.2 (315) (anti-HLA-B, C), BB7.2 (297) (anti-HLA-A*02), GAP A3 (31) (anti-HLA-A*03) und L243 (219) (anti-HLA-DR) (Abcam). Die Primärantikörper wurden in zwei Konzentrationen, 5 µg/ml und 0,5 µg/ml, in 100µl/well eiskaltem FACS Puffer eingesetzt, es wurde 30min auf Eis inkubiert. Jede Färbung wurde als Doppelbestimmung durchgeführt. Folgend wurden die Zellen dreimal mit 200µl/well FACS-Puffer gewaschen, alle Zentrifugationsschritte wurden bei 1500rpm, 4°C für 3min durchgeführt, die Überstände wurden jeweils dekantiert und verworfen. Die eigentliche Färbung der Zellen mit einem Fluorochrom erfolgte schließlich mit einem FITC^b-gekoppelten Ziege-anti-Maus Zweitantikörper (Jackson Immuno Research), 0,5 µg/ml in eiskaltem FACS-Puffer (100µl), mit dem die Zellen 30min auf Eis und in der Dunkelheit inkubiert wurden. Die folgenden drei Waschschriffe wurden

^a FACS-Puffer: PBS; 2% FCS; 0,02% NaN₃

^b FITC: Fluoresceinisothiocyanat

wie oben beschrieben durchgeführt. Schließlich wurden die Zellen in 200µl FACS-Puffer aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Die Messung erfolgte sogleich.

Als Negativkontrolle bei der Messung dienten vier Ansätze, die nicht mit Antikörper inkubiert und zwei, die nur mit dem Zweitantikörper inkubiert worden waren.

Da unter diesen experimentellen Bedingungen eine absolute Aussage über die Anzahl der an der Zelloberfläche exprimierten HLA-Moleküle nicht möglich war, wurde die HLA-Dichte auf Tumorzellen in jeder Bestimmung relativ zu der auf der Zelllinie JY^a gemessen.

Die durchflusszytometrische Messung der HLA-Dichte auf Tumorzellen erfolgte an einem FACS-Gerät des Typus *FacsCalibur* (BD Biosciences). Zum Spülen und zum Betrieb des FACS-Gerätes wurden die vom Hersteller empfohlenen Puffer FACS-Flow und FACS-Rinse (beide BD Biosciences) verwendet. Die Steuerung des Gerätes sowie die Auswertung und graphische Aufbereitung der Daten erfolgte mit dem Computerprogramm *CellQuest* (BD Biosciences).

Zunächst wurden im dot-blot-Modus die Spannungen der FSC- und SSC-Detektoren kalibriert. Folgend wurde durch Setzen eines Rahmens (*gate*) die Population vitaler Zellen definiert. Anhand der Negativkontrollen (ungefärbt) wurden die Fluoreszenzdetektoren kalibriert, und zwar so, dass im Histogramm-Modus die ungefärbten Zellen endständig am linken Rand des Histogramms dargestellt wurden. Die Signale der Fluoreszenzdetektoren (FITC in FL1) wurden logarithmisch aufgetragen. Anschließend erfolgte mit denselben Einstellungen die Messung der gefärbten Zellen, wobei die Histogramme der gefärbten Zellen jeweils mit jenen der Negativkontrollen graphisch kombiniert wurden.

^a JY: EBV-transformierte humane lymphoblastoide Zelllinie, HLA-A*0201, -B*0702, -Cw*0702

2.4 Methoden zur Kultivierung und Analyse von T-Zellen

2.4.1. Aufreinigung mononukleärer Zellen aus Blutprodukten

Als Ausgangsmaterial zur Aufreinigung von CD8⁺ Lymphozyten aus Blutprodukten wurden Buffy-Coats sowie Leukapherese-Produkte verwendet, die von der Klinik für Transfusionsmedizin der Universität Tübingen bereitgestellt wurden.

Das Blutprodukt wurde zunächst steril aus dem Infusionsbeutel in eine Zellkulturflasche umgefüllt, der Beutel wurde mit etwas PBS durchgespült, um die Zellausbeute zu maximieren. Anschließend wurde das Blutprodukt mit PBS auf ein Volumen von 120ml (Buffy-Coat) oder 240ml (Leukapherese-Produkt) verdünnt. Je nach Probenvolumen wurden in 4 oder 8 Reaktionsgefäßen (Falcon-Tubes, BD Bioscience) je 15ml Lymphozytenseparationsmedium^a (Ficolite H, Linaris) vorgelegt und mit dem Blutprodukt vorsichtig überschichtet, so dass die Durchmischung beider Phasen möglichst vermieden wurde. Die Gradientenzentrifugation erfolgte anschließend für 20min bei 2000rpm (Heraeus Instruments, Megafuge 1.0 R) mit ausgeschalteter Bremsfunktion um eine Phasendurchmischung bei Beschleunigung und Verzögerung zu vermeiden. Nach erfolgter Zellseparation wurde die Leukozytenfraktion vorsichtig abpipettiert, in 2 Reaktionsgefäßen gesammelt und zweimal mit PBS gewaschen (Zentrifugation: 5min, 1500rpm). Anschließend wurden die Zellen gezählt, zwei Proben zu je $1 \cdot 10^6$ Zellen wurden in Einfriermedium (90% FCS, 10% DMSO) bei -80°C asserviert. Aus einem Buffy-Coat konnten regelmäßig zwischen $0,6$ und $1 \cdot 10^9$ Leukozyten isoliert werden.

Die isolierten Leukozyten wurden entweder direkt weiter verarbeitet oder eine Nacht in T-Zell-Medium kultiviert^b.

^a Lymphozytenseparationsmedium: Ficoll-Hypaque (spez. Dichte 1.077 g/ml), Ficolite H, Linaris

^b T-Zell-Medium: RPMI-1640 (Gibco) zuzüglich 25mM HEPES, 2mM L-Glutamin (Invitrogen), 50 µg/ml Penicillin (PAA Laboratories), 50 µg/ml Streptomycin (PAA Laboratories), 20µg/ml Gentamycin (Cambrex), zuzüglich 10% hitzeinaktiviertes humanes Serum (Invitrogen)

2.4.2. Aufreinigung CD8⁺ T- Zellen durch *magnetically activated cell sorting* (MACS)

Die Aufreinigung CD8⁺ T- Zellen aus der Leukozytenfraktion humaner Blutprodukte erfolgte unter Verwendung der Methodik der magnetischen Zellsortierung (*magnetically activated cell sorting*, MACS).

Im Prinzip beruht die Methodik darauf, Zellen die ein bestimmtes Oberflächenprotein tragen dadurch positiv aufzureinigen, dass man zunächst einen biotinylierten Primärantikörper gegen eben dieses Oberflächenprotein und anschließend Streptavidin-gekoppelte, magnetische Partikel (Microbeads) zugibt. Die so gefärbten Zellen werden in speziellen, magnetischen Säulen zurückgehalten, während ungefärbte Zellen ausgewaschen werden können.

Die gesamte Aufreinigung CD8⁺ Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen. In T-Zell-Medium kultivierte Leukozyten wurden zunächst abzentrifugiert, zweimal in eiskaltem PBE^a und anschließend in einer Zelldichte von $2 \cdot 10^8$ Zellen/ml in PBE resuspendiert. Als Primärantikörper wurde biotinylierter OKT8 (anti-CD8-Antikörper) (Abcam) in einer Endkonzentration von 5µg/ml zugegeben. Die Zellsuspension wurde anschließend 15min bei 4°C unter gelegentlichem Invertieren mit dem Antikörper inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte mit PBE (1500rpm, 10min). Die Zellen wurden erneut in einer Dichte von $2 \cdot 10^8$ Zellen/ml resuspendiert, dann wurden magnetische streptavidinkonjugierte Mikropartikel (*Streptavidin MicroBeads*, Miltenyi Biotec) (10µl/ $1 \cdot 10^8$ Zellen) zugegeben, die Suspension wurde erneut 15min bei 4°C bei gelegentlichem Invertieren inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBE gewaschen (1500rpm, 10min).

Die eigentliche Aufreinigung der nun magnetisch „gefärbten“ CD8⁺ Zellen erfolgte unter Verwendung kommerzieller „MACS-Säulen“ (LS-Column, Miltenyi Biotec) sowie unter Verwendung des dafür vorgesehenen Magneten (Miltenyi Biotec). Die in den Magneten eingespannte Säule wurde zunächst mit 3ml PBE äquilibriert, die Zellen wurden in einem Volumen von 500-1000µl auf die Säule gegeben, der Durchlauf, der die CD8⁻ Zellfraktion umfasste wurde, aufgefangen. Die Säule und damit die magnetisch gebundenen CD8⁺ Zellen

^a PBE: PBS; 2mM EDTA; 0.5% Rinderserumalbumin (BSA, Biotinfrei, Sigma A3059); sterilfiltriert

wurden dreimal mit je 3ml PBE gewaschen, der Durchlauf mit CD8⁻ Zellen wurde aufgefangen.

Zum Eluieren wurde die Säule aus dem Magneten genommen, mit 4ml PBE beschickt. Unter Druck mit dem dafür vorgesehenen Spritzenstempel wurden die CD8⁺ Zellen in ein 15 ml-Reaktionsgefäß eluiert.

Die so erhaltenen Zellfraktionen CD8⁺ und CD8⁻ Zellen wurden abzentrifugiert (1500rpm, 10min, 4°C), gezählt und in T-Zellmedium resuspendiert. 10*10⁶ CD8⁻ und 1*10⁶ CD8⁺ Zellen wurden eingefroren, Der Rest wurde in T- Zell Medium kultiviert. Die CD8⁺ Zellen wurden für die Stimulationsversuche verwendet, die CD8⁻ Fraktion wurde für Experimente von Mitarbeitern zur Verfügung gestellt.

2.4.3. Synthese von MHC/anti-CD28-Microbeads zur Stimulation CD8⁺ T- Zellen

Zur Stimulation von T-Zellen wurden Peptid:MHC-, anti-CD28-, anti-4-1BB-beschichtete Mikrosphären als sogenannte artifizielle antigenpräsentierende Zellen verwendet. Diese Methodik bietet eine effiziente Alternative zur herkömmlichen T-Zellstimulation mit dendritischen Zellen(426).

Die Synthese der MHC/anti-CD28-Microbeads fand unter sterilen Bedingungen in 96-Lochplatten (*96-well-plates*, greiner, bio-one) statt, das Synthesevolumen war 250µl/well, Synthesemedium war PBE. Tabelle 12 zeigt die für die Beadsynthese eingesetzten Reagenzien. Zunächst wurde die benötigte Anzahl Beads, 5,6-µm durchmessende, Streptavidin-beladene Polystyrol-Partikel mit einer Bindungskapazität von 0.064µg Biotin/mg (Bangs Laboratories), aus dem Stock entnommen und zweimal mit PBE gewaschen (2500rpm, 10min, 4°C). Die benötigte Beadzahl ergab sich aus der Formel:

$$\text{Beadzahl} = [\text{Anzahl der zu stimulierenden Wells}] * [\text{Anzahl Restimulationen (4)}] * [200000 \text{ Beads}]$$

Die Beads wurden in einer Dichte von 800.000 Beads/150µl (150µl/zu stimulierendem Ansatz) in PBE resuspendiert.

Tabelle 12: Verwendete Reagentien und deren Konzentrationen zur Synthese der MHC/anti-CD28-Microbeads

Komponenten der MHC/anti-CD28-Microbeads	Konzentration der Komponenten im Synthesemix (Synthesevolumen: 250µl)	Konzentrationen der Komponenten in den Stammlösungen (für Synthese eingesetztes Volumen)
Beads	800000 Beads/well	800000 Beads/150µl (150µl)
Monomere:		
High-density	20nM	100nM (50µl)
Low-density	200pM	1nM (50µl)
Antikörper:		
anti-CD28	10nM	50nM (50µl)
anti-4-1BB	15nM	75nM (50µl)

Die Stammlösungen der MHC-Peptidmonomere hatten die Konzentrationen 100nM für die „high-density Beads“ bzw. 1nM für die „low-density Beads“. Lösungsmittel war auch hier PBE.

Die verwendete Antikörper-Stammlösung enthielt 10nM anti-CD28 (AK9.3) (184) (Perbio Science, Bonn), sowie 15nM anti-4-1BB (121) (anti-CDw137, Abcam). Lösungsmittel war ebenso PBE.

Für jede einzelne Stimulation wurden die Beads separat synthetisiert. Dies geschah in 96 Loch-Platten. Die Kavitäten wurden in folgender Reihenfolge mit in Tabelle 12 genannten Reagenzien beschickt: Zunächst 50µl Monomer-Stammlösung, entweder high- oder low-density, dann 50µl der Antikörper-Stammlösungen und zum Reaktionsstart schließlich 150µl der Streptavidin-Microbeads-Stammsuspension. Die 96-Lochplatten wurden folgend 30min bei Raumtemperatur auf einem Flaschenschüttler unter Vibration inkubiert.

Nach abgeschlossener Synthese wurden die MHC-antiCD28-Microbeads noch viermal mit 200µl PBE/well gewaschen (2500rpm, 2min, 4°C), in 200µl PBE/well resuspendiert, und schließlich bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank gelagert.

Für jeden Stimulationszyklus wurden aus jedem well 50µl mit also 200.000 Beads entnommen, so war es möglich mit jedem synthetisierten well 4 Stimulationszyklen durchzuführen.

2.4.4. Kultivierung und Stimulation von T-Zellen

Die Kultur und Stimulation der CD8⁺ T- Zellen wurde in 96-Loch-Rundbodenplatten (greiner, bio-one) durchgeführt.

Die gesamte Stimulation CD8⁺ Zellen eines Spenders erstreckte sich über etwas mehr als 3 Wochen, bestehend aus 3 identischen Zyklen zu je einer Woche. Am Tag 1 der Stimulation wurden die Zellen in einer Dichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen/well mit 200.000 Microbeads/well in 200µl T-Zellmedium^a/well zuzüglich 5ng/ml IL-12 p70 (R&D Systems) kultiviert. An Tag 4 erfolgte ein Austausch von 100µl Kulturmedium unter Zugabe von 160U/ml IL-2 (R&D Systems) (80U/ml IL-2 Konzentration in 200µl Kulturmedium). An Tag 8 und 15 erfolgten jeweils Restimulationen durch Zugabe von weiteren 200000 Beads und 10ng/ml IL-12 p70 unter Austausch von 100µl Kulturmedium, an den Tagen 11 und 18 wurden analog zur ersten Woche 100µl Medium gewechselt und 80U/ml IL-2 zugegeben. Fünf bis sechs Tage nach dem letzten Mediumwechsel erfolgte die Tetramerfärbung der Zellen.

Bei jedem Mediumwechsel erfolgte die mikroskopische Kontrolle der Kulturen.

2.4.5. MHC-Monomersynthese

Die Herstellung der MHC-Klasse-I-Monomere (4), die im Rahmen dieser Arbeit zum einen zur Kalibrierung des Immunoblots zur Bestimmung der MHC-Ausbeute aus Tumoraufarbeitungen, zum anderen zur MHC-Tetramersynthese verwendet wurden, wurde nicht von mir, sondern von verschiedenen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, insbesondere von Herrn Steffen Walter und Frau Dr. Dagmar Sigurdardottir durchgeführt. Die Darstellung der Monomerproduktion soll hier also nur oberflächlich und in aller Kürze geschehen.

Die α -Kette der verschiedenen HLA-Allele sowie das invariante β_2 -Mikroglobulin wurden in Bakterien (*E.coli*) gentechnologisch produziert. Die *inclusion bodies* der Bakterien wurden durch Ultrazentrifugation präpariert, aus ihnen wurden die

^a T-Zell-Medium: RPMI-1640 (Gibco) zuzüglich 25mM HEPES, 2mM L-Glutamin (Invitrogen), 50 µg/ml Penicillin (PAA Laboratories), 50 µg/ml Streptomycin (PAA Laboratories), 20µg/ml Gentamycin (Cambrex), zuzüglich 10% hitzeinaktiviertes humanes Serum (Invitrogen)

Proteine schließlich aufgereinigt. Um aus den so erhaltenen denaturierten Proteinen native MHC-Moleküle zu herzustellen wird die α -Kette unter Zugabe von β_2 -Mikroglobulin, synthetischem Peptid und Harnstoff „rückgefaltet“ und anschließend durch Ultrafiltration aufkonzentriert. Zur Vorbereitung der Tetramersynthese wurden die, nun in ihrer nativen Konformation vorliegenden MHC-Monomere biotinyliert.

2.4.6. MHC-Tetramersynthese

Zur durchflusszytometrischen Detektion epitidspezifischer T-Zellen wurden fluoreszenzfarbstoffkonjugierte Peptid:MHC-Tetramere (4) verwendet.

Die Peptid:MHC-Komplexe (Monomere) lagen in Aliquots zu 50 μ g in einer Konzentration von 2mg/ml in biotinylierter Form vor. Zwei verschiedene Streptavidin- Konjugate wurden zur Tetramersynthese verwendet, nämlich Streptavidin- Phycoerythrin (Strep-PE, 1mg/ml, Molecular Probes) und Streptavidin- Allophycocyanin (Strep-APC, 1mg/ml, Molecular Probes). Alle getesteten Tumorpeptide sowie das *met*-Kontrollpeptid wurden mit Strep-PE gefärbt, alle CMV-Peptide wurden mit Strep-APC gefärbt.

Die Synthese der Tetramere fand in lichtundurchlässigen 1,5ml-Cryoröhrchen unter fortwährender Rotation und bei 4°C im Kühlraum statt. Prinzipiell wurden 50 μ g Monomer vorgelegt und mit 78,5 μ g Strep-PE bzw. 43,5 μ g Strep-APC zur Reaktion gebracht. Praktisch wurden stündlich 10% des Streptavidin-Konjugat-Gesamtvolumens in das Reaktionsgefäß pipettiert, so dass nach 10 Stunden die Synthese abgeschlossen war.

Die Tetramere wurden bei 4°C in lichtundurchlässigen PE-Reaktionsgefäßen (Eppendorf) gelagert und binnen 4 Wochen aufgebraucht.

2.4.7. Tetramerfärbung

Ungefähr die Hälfte der in einer Kavität der Stimulationskultur enthaltenen Zellen wurde zur Färbung entnommen und in ein *well* einer neuen 96-

Lochplatte transferiert. Folgend wurden die Zellen zweimal mit PBEA^a gewaschen (1800rpm, 2min, 4°C) und anschließend zur Blockierung unspezifischer Bindungen 20min bei 4°C in einer Streptavidinlösung (10µg/ml, 50µl/well, Sigma) inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte (1800rpm, 2min, 4°C) in PFEA^b.

Die eigentliche Tetramerfärbung erfolgte bei 4°C in der Dunkelheit nach Resuspension der Zellen in 50µl Tetramer gelöst zu 5mg/ml in TSB^c. Nach einer Inkubationszeit von 30min wurden ungebundene Tetramere in zwei Waschschrten (PFEA, 1800rpm, 2min, 4°C) entfernt.

Die Zellen wurden mit anti-CD8-FITC (Becton Dickinson) gegengefärbt, um tetramerspezifische CD8-positive Zellen im FACS identifizieren zu können. Zur Färbung wurden die Zellen in 50µl anti-CD8-FITC Lösung (10µg/ml, Lösungsmittel PBEA) für 20min bei 4°C in der Dunkelheit inkubiert.

Als Kontrollen und zur späteren Kalibrierung des Durchflusszytometers wurden Zellen noch mit anti-CD8-APC^d, anti-CD8-PerCP^e und anti-CD8-PE^f gefärbt (Becton Dickinson).

Zur Entfernung aller färbenden Reagenzien wurde abschließend dreimal mit PFEA gewaschen (1800rpm, 2min, 4°C), schließlich wurden die gefärbten Zellen in FACS-Fix^g fixiert.

2.4.8. Durchflusszytometrische Bestimmung der Antigenpezifität von T-Zellen

Theoretischer Hintergrund der Durchflusszytometrie:

Die Durchflusszytometrie (FACS, *Fluorescence-activated cell sorter*) ermöglicht zum einen die Charakterisierung einer Zellsuspension hinsichtlich Zellzahl, Zellgröße und Granularität, zum anderen unter Verwendung

^a PBEA: 0,5% w/v Rinderserumalbumin (BSA, Sigma), 2mM EDTA, 0,1% w/v Natriumazid in PBS

^b PFEA: 2% w/v hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum, 2mM EDTA, 0,01% w/v Natriumazid

^c TSB: 50% v/v PBS, 50%v/v hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum, 2mM EDTA, 0,01% w/v Natriumazid

^d APC: Allophycocyanin

^e PerCP: Peridinin chlorophyll protein complex

^f PE: Phycoerythrin

^g FACS-FIX: PFEA, 1%v/v Formaldehyd

farbstoffgekoppelter Markermoleküle (monoklonale Antikörper, Tetramere) Aussagen zur Proteinexpression an der Zelloberfläche sowie eine Fülle weiterer Anwendungen (410).

Zellen werden in Suspension in einem Flüssigkeitsstrom durch das Gerät geleitet. Das zur Detektion verwendete Laserlicht (Wellenlängen: Argonlaser 488nm, Diodenlaser 633nm) wird durch die Zellen gestreut. Die Streuung in Einstrahlrichtung (*forward scatter*, FSC) ist abhängig von der Größe der Zellen, die Seitwärtsstreuung (*side scatter*, SSC) von deren Granularität. Anhand beider Größen lassen sich Zellpopulationen unterscheiden.

Fluochrom-gekoppelte Markermoleküle können aufgrund ihrer spezifischen Absorptions- und Emissionsmaxima im FACS detektiert werden. Tabelle 13 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Fluochrome.

Tabelle 13: In dieser Arbeit verwendete Fluorochrome zur durchflusszytometrischen Detektion von Markermolekülen und deren Absorptions- und Emissionsmaxima sowie der zugehörige optische Kanal des verwendeten Durchflusszytometers.

Fluochrom	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum	Detektionskanal
FITC (Fluoresceinisothiocyanat)	495nm	520nm	FL1
PE (Phycoerythrin)	564nm	575nm	FL2
PerCP (Peridininiumchlorophyllprot.)	490nm	675nm	FL3
APC (Allophycocyanin)	650nm	660nm	FL4

Praktische Durchführung der durchflusszytometrischen Bestimmung der Antigen-spezifität von T-Zellen:

Die durchflusszytometrische Messung der Antigen-spezifität der kultivierten und mit MHC/anti-CD28-Microbeads stimulierten Zellen erfolgte analog der durchflusszytometrischen Bestimmung der HLA-Expression auf Tumorzellen (Kap. 2.3.6.) an einem FACS-Gerät des Typus *FacsCalibur* und unter Verwendung der Software *CellQuest* (beides: BD Biosciences).

An ungefärbten Zellen wurden im dot-blot-Modus zunächst die Spannungen der FSC- und SSC-Detektoren kalibriert und durch Setzen eines Rahmens (*gate*) die Population der zu messenden vitalen Zellen definiert. Unter Verwendung der anti-CD8-FITC, anti-CD8-APC, anti-CD8-PerCP und anti-CD8-PE gefärbten Kontrollen wurden die Fluoreszenzdetektionskanäle (FL1-FL4) kalibriert. Durch graphische Auftragung des anti-CD8-FITC Signals gegen das Tetramersignal

(PE oder APC) erfolgte die Detektion antigenspezifischer CD8-positiver Zellen. Zur Darstellung der Ergebnisse wurden durchgehend „dot-blots“ verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Analyse des HLA Ligandoms solider Nierenzellkarzinome

3.1.1. Orientierende Übersicht über den Datensatz

Durch den Verfasser dieser Arbeit wurden Peptide aus insgesamt 25 Nierenzellkarzinomen (Laufnummern RCC109-RCC133) präpariert. Aus vier dieser Tumoren (RCC112, 115, 116, 130) wurden massenspektrometrisch Peptide sequenziert. Der Verfasser dieser Arbeit war an der Auswertung der massenspektrometrischen Daten der genannten Tumoren beteiligt. Die Generierung der Peptidsequenzen der Tumoren RCC001, -13, -44, -68, -75, -98 und -103 oblag verschiedenen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe. Die hier gezeigte Analyse des Datensatzes, auch die statistische, wurde ausschließlich durch den Verfasser dieser Arbeit angefertigt.

Der in diesem Kapitel besprochene Datensatz entstand aus der Analyse der in Tabelle 14 gezeigten Nierenzellkarzinome. Von insgesamt 13 Tumoren wurden Genexpressionsanalysen durchgeführt, von 11 Tumoren wurden Peptide sequenziert. Zwölf der Tumoren entsprachen histologisch dem klarzelligen, zwei dem papillären Subtyp, eine Probe, RCC112 entspricht einer Nebennierenmetastase eines klarzelligen Nierenzellkarzinoms. Die Anzahl der je Tumor gefundenen Peptide variierte stark (Abbildung 7, links), im Mittel konnten jedoch aus einem Tumor ca. 90 verschiedene Peptide sequenziert werden. Insgesamt konnten 725 verschiedene Peptidsequenzen im Zuge der Analyse der gezeigten Tumoren bestimmt werden. Dabei wurden nur wenige definierte Peptidsequenzen auf zwei oder mehr Tumoren gefunden (Abbildung 7, rechts).

Tabelle 14: Proben solider Nierenzellkarzinome, die zur Erhebung des dargestellten Datensatzes analysiert wurden.

<i>Tumor Probe</i>	<i>Histologie</i>	<i>Tumor Grade und Stage</i>	<i>HLA-Typisierung</i>	<i>Gene Chip</i>	<i>Peptide</i>
RCC001	Klarzellig	T3; G2	A*02; A*68; B*18; B*44		+
RCC013	Klarzellig	T2; G3	A*02; A*24; B*07; B*40		+
RCC044	Papillär	T1; G2	A*03; A*11; B*27	+	+
RCC068	Klarzellig	T3a; G3	A*02; A*29; B*15; B*45	+	+
RCC070	Klarzellig	T3; G2	A*01; A*02; B*07; B*08	+	
RCC073	Klarzellig	T3b; G2	A*02; A*03; B*07; B*57	+	
RCC075	Papillär	T4; G2-3	A*03; B*07; B*40	+	+
RCC098	Klarzellig	T3a; G2-3	A*01; A*03; B*07; B*18	+	+
RCC103	Klarzellig	T3c; G2	A*11; A*25; B*15; B*44	+	+
RCC112	Nebennieren-Metastase eines klarzelligeren RCCs		A*01; A*31; B*08; B*27	+	+
RCC115	Klarzellig	T3; G2	A*02; A*03; B*15; B*18	+	+
RCC116	Klarzellig	T3b; G2	A*01; A*02; B*27; B*37	+	+
RCC119	Klarzellig	T3; G2	n.a.	+	
RCC130	Klarzellig	T1; G3	A*02; A*24; B*07; B*44	+	+
RCC133	Klarzellig	T3a; G3	n.a.	+	

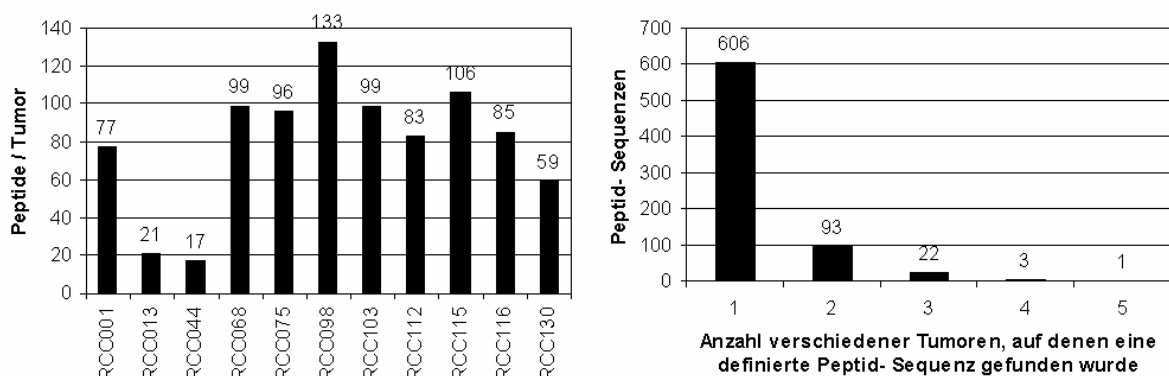


Abbildung 7: Links: Anzahl der verschiedenen Peptidsequenzen, die auf den einzelnen analysierten Tumoren gefunden wurden. Rechts: Mehrfachfunde einzelner Peptide auf mehreren Tumoren.

So konnte nur ein Peptid auf fünf verschiedenen Tumoren gefunden werden, hierbei handelt es sich um das aus Hämoglobin β (HBB, Entrez Gene ID: 3043) stammende Peptid LVVYPWTQRF, das auf den Tumoren RCC075, 103, 112, 115 und 130 gefunden wurde. Die kürzere Variante desselben Peptids, VVYPWTQRF, wurde aus den Proben RCC075, 112, 115, 116 sequenziert. Dabei ist unklar, auf welchen HLA-Allotypen diese Peptide präsentiert werden könnten, da sich die genannten Tumoren nicht in ihrer HLA-Typisierung überschneiden. Ebenso scheint es unwahrscheinlich, dass Hämoglobin-Peptide

aus dem tumorzeleigenen Proteom bzw. aus deren Peptidprozessierung stammen, dies legen auch die gewonnenen Genexpressionsdaten nahe, es wurde in keiner der analysierten Proben eine HBB-Expression gemessen (Median der Expression: 0,1; Range der Expression: 0,0-0,5). Das gilt in gleicher Weise für die Hämoglobin α 1-Peptide LASVSTVL (RCC001) und SLDKFLASVSTVL (RCC115). Es scheint vielmehr wahrscheinlicher, dass diese Peptide einer Kontamination der Tumorproben mit Blut entstammen.

Die durch den Tumor präsentierten Peptide lassen sich in drei Gruppen einteilen, denen im Folgenden einzelne Kapitel gewidmet sind: Die erste (i) und zugleich größte Gruppe von Peptiden entstammt Proteinen des normalen und grundlegenden Zellstoffwechsels, hauptsächlich also konstitutiv in den meisten Körperzellen exprimierten Strukturproteinen, Enzymen und Rezeptoren. Diese Peptide repräsentieren klassische „Selbstpeptide“ und sind im Hinblick auf eine tumorspezifische Immuntherapie irrelevant.

Die zweite (ii) Gruppe umfasst neue und klassische Peptide aus etablierten tumorassoziierten Antigenen des Nierenzellkarzinoms, Peptide aus z.B. dem met- Protoonkogen (met), aus Adipophilin (Adipose differentiation-related protein, ADFP) sowie aus der Carboanhydrase 9 (CA9). Die Proteine dieser Gruppe sind in der Literatur als Quellen immunogener Peptide beschrieben, einige dieser Peptide kamen bereits in Vaccinierungsstudien zum Einsatz.

In der dritten (iii) Gruppe finden sich Peptide und deren Quellproteine, die noch nicht als tumorassoziierte Antigene bekannt sind, deren Expressionsschema jedoch eine solche Tumorassoziation in allen oder aber individuellen Tumoren nahe legt. Beispiele dieser Gruppe sind u.a. die *matrix metalloproteinase 7* (MMP7), das *apolipoprotein L, 1* (APOL1), die *acyl-CoA synthetase long-chain family member 4* (ACSL4), das *insulin-like growth factor binding protein 3* (IGFBP3) sowie der *regulator of G-protein signalling 5* (RGS5).

In den Genexpressionsanalysen wurden relative Überexpressionen eines definierten Genprodukts um mindestens Faktor 3 oder größer im Tumor gegenüber dem Normalgewebe „Niere“ als relevant betrachtet.

Jeder der 3 genannten Gruppen ist im Folgenden ein Kapitel gewidmet.

3.1.2. Peptide aus konstitutiv exprimierten Proteinen, „Selbstpeptide“

Die meisten bei der Analyse der Nierenzellkarzinome sequenzierten Peptide entstammten konstitutiv exprimierten Strukturproteinen und Enzymen des grundlegenden Zellstoffwechsels. Peptide aus diesen Proteinen repräsentieren klassische „Selbst- Peptide“. Tabelle 15 zeigt eine Auflistung von Quellproteinen aus denen wiederholt Peptide auf verschiedenen Tumoren gefunden wurden.

Die meisten aus einem definierten Protein stammenden Peptide konnten aus *Vimentin* (VIM, Entrez Gene ID: 7431) sequenziert werden. In 8 von 11 Tumoren wurden insgesamt 15 verschiedene Sequenzen aus diesem Strukturprotein gefunden (siehe Tabelle 15). Die gefundenen Peptide decken damit 26% der 466 Aminosäuren langen Proteinsequenz von Vimentin ab. Dies erscheint wenig verwunderlich, da Vimentin bekanntermaßen in klarzelligem Nierenzellkarzinomen, nicht jedoch in den anderen histopathologischen Phänotypen, stark exprimiert wird (452) und in der Pathologie als immunhistochemischer Marker für u.a. diese Tumorentität verwendet wird. Dies spiegelt sich auch in den gewonnenen Genexpressionsdaten wieder. So ergibt sich in 13 analysierten Tumoren eine mediane Überexpression um den Faktor 3,5 von Vimentin im Vergleich zur Normalniere, die Spannweite der relativen Überexpression reicht von 0,2- bis 6,5-fach. Vimentin erfüllt in 8 von 13 Tumoren unser Kriterium einer mindestens 3-fachen Überexpression gegenüber der Normalniere. Alle klarzelligen Nierenzellkarzinome zeigten relativ hohe Expressionen von Vimentin, wohingegen die beiden papillären Tumoren im Datensatz, RCC044 und 75, mit einer relativen Expression von 0,2 bzw. 2,3 die niedrigsten Werte aufwiesen. Durch die weit verbreitete Expression von Vimentin in den verschiedenen Körpergeweben, besonders solchen mesenchymalen Ursprunges, kann trotz der Überexpression von Vimentin in den Tumoren keinesfalls von einer immunologisch relevanten Tumorassoziation ausgegangen werden.

Weitere Proteine, die besonders häufig als Quelle von HLA-präsentierten Peptiden identifiziert werden konnten, sind *β -Actin* (ACTB), *Myosin light chain* (MYL6), *non-erythrocytic beta* (SPTBN1) und *alpha spectrin* (SPTAN1),

Aldolase A (ALDOA), sowie HLA Klasse I-Moleküle u.v.a. Das Expressionsmuster all dieser Proteine war hinsichtlich einer relevanten Überexpression unauffällig (Tabelle 15).

Im Gegensatz hierzu finden sich in der Gruppe der wiederholt als Quellen von Peptiden identifizierten Proteine (Tabelle 15) auch solche, deren Expressionsmuster eine Tumorassoziation nahe liegend erscheinen lassen. Neben dem *Apolipoprotein L, 1* (APOL1) und der *Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4* (ACSL4) aus denen Peptide in 4 bzw. 3 der analysierten Tumoren gefunden wurden, ist hier insbesondere das *adipose differentiation-related protein* (ADFP, Adipophilin) zu nennen, aus dem sieben verschiedene Peptide auf fünf der analysierten Tumoren gefunden wurden. Diese Proteine bzw. Peptide werden in den folgenden Kapiteln detailliert besprochen (Siehe Kap. 3.1.3. und 3.1.4.).

Tabelle 15 (folgende Seite): Dominante Peptid-Quellproteine in der Analyse der soliden Nierenzellkarzinome: Proteine aus denen viele verschiedene Peptide oder einzelne Peptide wiederholt identifiziert werden konnten.

Quellprotein, Überexpression in X/13 Tumoren, Median und Range der relativen Expression	Entrez Gene ID	Peptid- Sequenz	HLA- Restriktion	Tumor Probe	Peptide gefunden in X/11 Tumoren
Vimentin (VIM), 8/13 (M 3,5; R 0,2-6,5)	7431	ALRDVRQQY	B*15	RCC068/RCC115	8
		ALRPSTSRSLY	A*03	RCC098	
		DLERKVESL	B*08	RCC112	
		EEIAFLKKL	B*44/B*18	RCC001	
		EENFAVEA	B*45	RCC068	
		MEENFAVEA	B*45	RCC068	
		NLRETNLDSLP	n.a.	RCC098	
		NYIDKVRFL	A*29	RCC068/RCC130	
		REKLQEEML	B*40	RCC075	
		RETNLDSLP	B*37	RCC116	
		SLYASSPGGVYATR	A*03	RCC075	
		SRISLPLPNF	B*27	RCC112	
		SSVPGVRL	n.a.	RCC116	
		SSVPGVRLQLQSVDF	n.a.	RCC098	
		SSVPGVRLQLQSVDFSL	n.a.	RCC098	
Adipose differentiation-related protein (ADFP), 5/13 (M 2,6; R 0,1-5,7)	123	IARNLTQQL	B*07	RCC098	5
		MAGDIYSVFR	A*68	RCC001	
		MTSALPIIQK	A*68	RCC001	
		SLLTSSKGQLQK	A*03	RCC098/RCC115	
		SVASTITGV	A*02	RCC001	
		TSALPIIQK	A*03/A*11	RCC098/RCC103/RCC115	
Actin, beta (ACTB), 1/13 (M 1,4; R 0,6-3,5)	60	VQKPSYYVR	A*31	RCC112	4
		LRVAPEEHPVL	n.a.	RCC098	
		MEKIWHHTF	B*18	RCC098	
		MQKEITAL	B*15	RCC068	
		RVAPPEHPV	A*02	RCC115	
		RVAPPEHPVL	A*02	RCC115/RCC116	
major histocompatibility complex, class I, A (HLA-A) 0/13 (M 1,1; R 0,5-1,7)	3105	RVAPPEHPVLLT	n.a.	RCC115	5
		APRTLVL	B*07	RCC130	
		GSHSMRYF	n.a.	RCC116	
		GSHSMRYFF	n.a.	RCC115	
		GSHSMRYFFT	n.a.	RCC115/RCC116	
		VMAPRTL	n.a.	RCC112/RCC115/RCC116	
major histocompatibility complex, class I, B (HLA-B) 2/13 (M 2,1; R 0,5-3,2)	3106	VMAPRTLVL	n.a.	RCC001	6
		APRTLVL	B*07	RCC098/RCC130	
		GSHSMRYFH	n.a.	RCC115	
		RYFDTAMSR	A*31	RCC112	
		VMAPRTL	n.a.	RCC075/RCC098/RCC112/ RCC130	
		YAYDGKDYIAL	A*02	RCC068	
major histocompatibility complex, class I, C (HLA-C) 0/13 (M 1,1; R 0,7-1,9)	3107	YVDGTQFVRF	B*15	RCC115	5
		APRALL	B*07	RCC098/RCC130	
		AVLGAVVAV	A*02	RCC068	
		GEPRFISVGY	B*45	RCC068	
		RVMAPRALL	B*07	RCC098	
		RYFDTAVSR	A*31	RCC112	
aldolase A (ALDOA) 0/13 (M 1,2; R 0,4-1,9)	226	SEAGSHTLQW	B*44/B*18	RCC001	3
		ALSDHHIYL	A*02	RCC001/RCC013/RCC068	
		EIAMATVTALR	A*6801	RCC001	

		IAMATVTAL	A*02	RCC068	
		SDHHIYL	B*45	RCC068	
		SLFVSNHAY	B*15	RCC068	
Spectrin beta, non-erythrocytic 1 (SPTBN1)	6711	AVCEVALDY	B*15	RCC068	5
0/13 (M 0,6; R 0,1- 1,7)		DEKSIITY	B*18	RCC098	
		DEMKVLVL	B*44/ B*18	RCC001/RCC098	
		EEASLLHQF	B*44	RCC103	
		KPRDVSSVEL	B*07	RCC075	
EH-domain containing 2 (EHD2)	30846	ALASHLIEA	A*02	RCC001	6
9/13 (M 4,3; R 0,4-8,6)		HEDKIRVVL	B*40	RCC075	
		KYDEIFYNL	A*24	RCC130	
		MPLLRQEEL	B*08	RCC112	
		RVHAYIISY	A*03	RCC098/RCC115	
Myosin light chain alkali non-muscle isoform (MYL6)	4637	AEIRHVLVTL	B*40	RCC075	3
0/13 (M 0,7; R 0,4-1,0)		EAFVRHIL	B*08	RCC112	
		LVRMVLNG	n.a.	RCC115	
		YEELVRMVL	B*40	RCC075	
ATPase, Na⁺/K⁺ transporting, beta 1 polypeptide (ATP1B1)	481	GLNDETYGY	B*15	RCC068	3
0/13 (M 0,4; R 0,1-0,7)		GRFDVKIEV	B*27	RCC044/RCC112	
		GRTGGSWFK	B*27	RCC044	
catenin (cadherin-associated protein), alpha 1, 102kDa (CTNNA1)	1495	FIDASRLVY	A*01	RCC112	3
0/13 (M 0,7; R 0,5-2,0)		LQHPDVAAY	B*15	RCC068	
		NEQDLGIQY	B*44/ B*18	RCC001	
damage-specific DNA binding protein 1, 127kDa (DDB1)	1642	HVIDVKFLY	B*15	RCC068	3
0/13 (M 0,6; R 0,3-0,8)		VAVGRALYY	n.a.	RCC116	
		YLDNGVVVFV	A*02	RCC013	
hemoglobin, beta (HBB)	3043	EVGGEALGRLL	A*02	RCC115	6
0/13 (M 0,1; R 0,0-0,5)		LVVYPWTQRF	n.a.	RCC075/RCC103/RCC112/ RCC115/RCC130	
		VVYPWTQRF	n.a.	RCC075/RCC112/RCC115/ RCC116	
hemoglobin, alpha 1(HBA1) keine Genexpressionsdaten	3039	LASVSTVL	RCC001	HBA1	2
		SLDKFLASVSTVL	RCC115	HBA1	
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (HNRPK)	3190	ETIGEILKK	A*6801	RCC001	2
0/13 (M 1,0; R 0,7-1,9)		SLAGGIIGV	A*02	RCC001	
		VPDSSGPERIL	B*07	RCC075	
spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (SPTAN1)	6709	ADSLRLQQL	B*37	RCC116	3
0/13 (M 0,9; R 0,6-1,6)		ETFDAGLQAF	A*25	RCC103	
		RQGFVPAAY	B*15	RCC068	
ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1 (UBA52)	7311	GRTLSDYNI	B*27	RCC112	4
0/13 (M 0,8; R 0,4-1,0)		IQKESTLHL	B*15	RCC068	
		QIFVKTLTGK	A*03	RCC075/RCC098	
Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 (ACSL4)	2182	KLFDHAVSKF	A*03	RCC075/RCC098	3
3/13 (M 1,4; R 0,8-7,0)		VPNQKRLTLL	B*07	RCC075/RCC130	
glutathione peroxidase 1 (GPX1)	2876	LLIENVASL	A*02	RCC068/RCC115/RCC116	3
0/13 (M 0,9; R 0,6-2,1)		RLAAAAAQSIVY	B*15	RCC068/RCC115	

Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) 0/13 (M 0,7; R 0,3-1,1)	6774	EELQQKVSY EERIVELF	B*18 B*18	RCC098 RCC001/RCC098/RCC115	3
ubiquitin B (UBB) 0/13 (M 0,5; R 0,3-0,7)	7314	KESTLHLVL QLEDGRTLSDY	B*44/ B*18 A*01	RCC001/RCC013/RCC075 RCC098/RCC116	5
Apolipoprotein L, 1 (APOL1) 10/13 (M 5,7; R1,1-39,4)	8542	ALADGVQKV FLGENISNFL	A*02 A*02	RCC013/RCC068/RCC130 RCC013/RCC115	4
proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 14 (PSMD14) 2/13 (M 2,1; R 1,1-4,0)	10213	AAMLDTVVFVK AMLDTVVFVK	A*11 A*03	RCC103 RCC075/RCC098/RCC103	3
transmembrane and coiled-coil domains 1 (TMCO1) 0/13 (M 1,5; R 0,8-2,1)	54499	SIFDGRVVAK	n.a.	RCC001/RCC044/RCC075/ RCC103	4

3.1.3. Peptide aus etablierten Tumorantigenen des Nierenzellkarzinoms

Mehrere tumorassoziierte Antigene sind in der Literatur für das Nierenzellkarzinom beschrieben und wurden bereits zur Vaccinierung in verschiedenen immuntherapeutischen Studien eingesetzt. Tabelle 16 zeigt eine Übersicht über diese bekannten T-Zellepitope sowie die in dieser Arbeit generierten korrespondierenden Peptid- und Genexpressionsdaten. Nur aus vier der etablierten tumorassoziierten Proteine konnten im Rahmen dieser Arbeit neue Peptide sequenziert werden, nämlich aus Adipophilin (ADFP, Entrez Gene ID: 123), aus dem met-Protoonkogen (MET, Entrez Gene ID: 4233), der Carboanhydrase 9 (CA9, Entrez Gene ID: 768) und aus Cyclin D1 (CCND1, Entrez Gene ID: 595), nicht jedoch aus den anderen klassischen Antigenen.

Tabelle 16 (folgende Seite): Etablierte tumorassoziierte T-Zellepitope. Nur aus MET, CA9, ADFP und CCND1 konnten in dieser Arbeit Peptide gewonnen werden. Nur MET, CA9 und ADFP wurden in mehreren der analysierten Tumoren als relevant gegenüber dem renalen Normalgewebe überexpressiert gemessen werden. Für die anderen genannten Antigene konnte eine Tumorassoziation in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

RCC-assoziierte Tumorantigene Überexpression > 3-fach in X/13 RCCs (M, Median; R, Range der Überexpression)	Entrez Gene ID	Bekannte T-Zell Epitope	HLA - Restriktion	Literatur	Peptide, die in dieser Arbeit gefunden wurden.
Met proto-oncogene (MET) 12/13 (M 13,0; R 0,7 – 26,0)	4233	YVDPVITSI	A*02	(343)	YVDPVITSI (A*02) RCC001, RCC013 (435)
carbonic anhydrase isoform IX (CA9) 8/13 (M 4,0; R 0,4 – 9,2)	768	HLSTAFARV	A*02	(420)	SPRAAEPVQL (B*07) RCC130 (214)
adipose differentiation-related protein (ADFP) 5/13 (M 2,6; R 0,1-5,7)	123	SVASTITGV	A*02	(351)	Siehe Tabelle 15
Cyclin D1 (CCND1) 1/13 (M 0,9; R 0,2 – 5,3)	595	RLTRFLSRV LLGATCMFV	A*02 A*02	(337) (337)	ETIPLTAEKL (A*6801) RCC001 (435)
survivin (BIRC5) 3/13 (M 0,9; R 0,1 – 1,6)	332	ELTLGEFLKL	A*02	(352)	
preferentially expressed antigen in melanoma (PRAME) 1/13 (M 0,4; R 0,1 – 4,6)	23532	SLLQHLIGL ALYVDSLFFL VLDGLDVLL SLYSFPEPEA LYVDSLFFL	A*02 A*02 A*02 A*02 A*24	(197) (197) (197) (197) (171)	
melanoma antigen, family A, 3 (MAGEA3) 3/13 (M 0,6; R 0,1 – 3,2)	4102	FLWGPRALV KVAELVHFL EVDPIGHLY IMPKAGLLI TFPDLESEF MEVDPIGHLY	A*02 A*0201 A*01, B*35 A*24 A*2402 B*44	(110;414) (414) (61;356) (394) (284) (162)	
renal tumor antigen (RAGE) 0/13 (M 0,5; R 0,1 – 1,1)	5891	PASKKTDQPQK SPSSNRIRNT	B*08 B*07	(109) (123)	
cancer/testis antigen 1B (NY-ESO-1) 0/13 (M 0,8; R 0,5 – 1,5)	1485	SLLMWITQC	A*0201	(175)	
melanoma antigen, family A, 1 (MAGEA1) 0/13 (M 0,1; R 0,0 – 0,9)	4100	KVLEYVIKV u.v.a.	A*0201	(299)	
Mucin 1 (MUC1) 0/13 (M 0,3; R 0,1 – 0,9)	4582	LLLLTVLTV STAPPVHNV u.v.a.	A*02 A*0201	(43) (9;43)	
telomerase reverse transcriptase (TERT) 0/13 (M 0,7; R 0,5 – 1,1)	7015	ILAKFLHWL KLFGLRLK VYGFVRACL VYAETKHFL	A*0201 A*03 A*2402 A*2402	(423) (422) (12) (12)	

Das etablierte Tumorantigen, aus dem die meisten Peptide sequenziert werden konnten und das in insgesamt fünf analysierten Tumoren Quelle mindestens eines Peptids war, war das *Adipose differentiation-related protein* (ADFP, Adipophilin, Entrez Gene ID: 123). Im Gegensatz zu den anderen tumorassoziierten Proteinen, aus denen jeweils nur ein Peptid massenspektrometrisch identifiziert wurde, konnten aus ADFP insgesamt sieben verschiedene Peptide sequenziert werden. Damit ist es nach Vimentin das Quellprotein aus dem am meisten Peptide sequenziert wurden und somit wie Vimentin eine dominante Quelle HLA-präsentierter Peptide.

Dementsprechend werden die Peptide aus ADFP wie die Peptide aus den anderen dominanten Quellproteinen in Tabelle 15 aufgelistet. Ebenso erlaubt die Häufigkeit mit der Adipophilin-Peptide gefunden wurden, die Vermutung, dass Peptide dieses Quellproteins auf der Tumorzelloberfläche in großer Zahl bzw. großer Dichte präsentiert werden. Diese Spekulation wird gestützt durch die Tatsache, dass auf einzelnen Tumoren wiederholt gleich mehrere Peptide aus Adipophilin gefunden wurden. So wurden auf RCC001 und RCC098 gleich jeweils drei Peptide, auf RCC115 immerhin noch zwei Peptide aus diesem Protein gefunden (siehe Tabelle 15). Alle drei genannten Proben zeigen in der Expressionsanalyse relative Überexpressionswerte. In den Genexpressionsanalysen konnte in fünf von dreizehn Tumoren eine relevante Überexpression um den Faktor 3 oder größer gegenüber der Normalniere gemessen werden (Abbildung 8).

Die einzigen Tumoren, in denen praktisch keine Expression von ADFP messbar war, waren RCC044, 075 und RCC116, wobei hierbei augenfällig ist, dass RCC044 und RCC075 Nierenzellkarzinome des papillären Subtyps sind, wohingegen alle anderen RCCs einer klarzelligen Histologie entsprechen. Einige gesunde Gewebe zeigen allerdings auch eine relevante Expression von Adipophilin, besonders zu nennen sind hier die Leber und die Plazenta (33). Aus der Literatur ist bekannt, dass Adipophilin in der Mamma hoch exprimiert und in den molekularen Mechanismen der Laktation involviert ist (158).

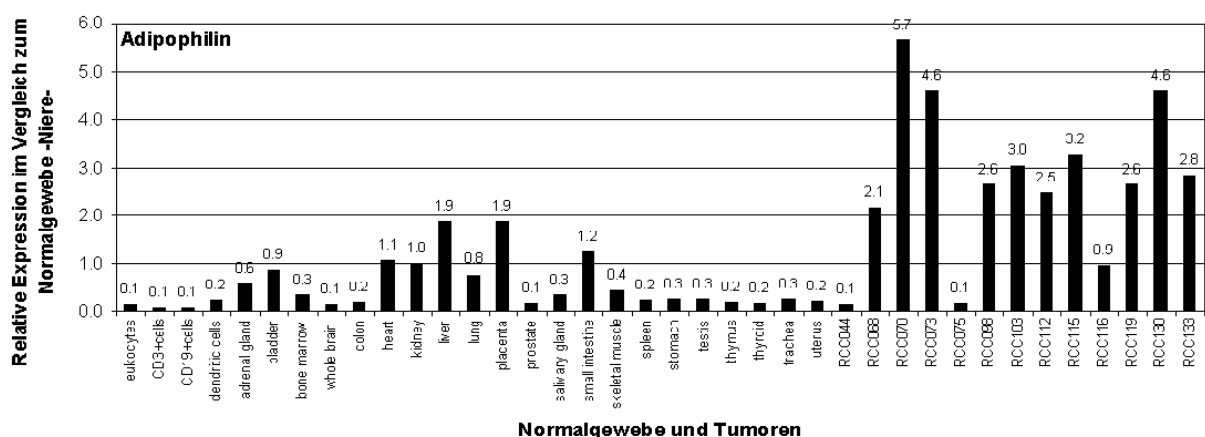


Abbildung 8: Adipophilin: Relative Expressionswerte in den analysierten Tumoren und in verschiedenen Normalgeweben im Vergleich zum Normalgewebe "Niere". Eine relevante Überexpression von Adipophilin größer Faktor 3 findet sich in fünf von dreizehn Tumoren.

Ebenso ist aus der Literatur bekannt, dass Adipophilin in Fettgewebe, Adipozyten enthaltenden und stark an Lipidspeicherung und -metabolismus beteiligten Organen sowie in von fettiger Degeneration betroffenen Organen exprimiert wird (41;118;119;157). Dieses Expressionsmuster schränkt die Verwendbarkeit von Adipophilin-Peptiden in der Immuntherapie des Nierenzellkarzinoms sicherlich ein. Nichtsdestotrotz konnte von einer anderen Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass das HLA-A*02-präsentierte Adipophilin-Peptid SVASTITGV ein T-Zellepitop ist, dass in gesunden Spendern T-Zellen gegen dieses Peptid vorhanden sind, die Tumorzellen *in vitro* lysieren können (351).

Zwei weitere etablierte Tumorantigene des Nierenzellkarzinoms sind das met-Protoonkogen und insbesondere die Carboanhydrase 9. Aus beiden Proteinen konnten im Rahmen dieser Arbeit Peptide sequenziert werden. Sowohl das met-Protoonkogen (5) als auch die Carboanhydrase 9 (140) sind dafür bekannt, in der Großzahl der Nierenzellkarzinome überexprimiert zu sein. Dies bestätigte sich in unseren Daten: das met-Protoonkogen war in 12 der 13 untersuchten Tumoren mehr als dreifach gegenüber dem gesunden Nierengewebe überexprimiert. Dabei ergab sich eine mediane Überexpression des Faktors 13. Nur ein Tumor, nämlich RCC133 zeigte mit einem relativen Expressionsfaktor von 0,7 keine Überexpression des met- Protoonkogens. Kein anderes Protein war in einem so großen Anteil der untersuchten Tumoren so massiv überexprimiert bei gleichzeitig so geringer Expression in gesunden Körpergeweben (siehe Abbildung 9). Das HLA-A*02-präsentierte met-Protoonkogen-Peptid YVDPVITSI wurde auf den Tumoren RCC001 und RCC013 gefunden(435). Die Existenz reaktiver T-Zellen gegen dieses Peptid konnte durch Schag *et al.* aus der Arbeitsgruppe um PD Dr. Peter Brossart nachgewiesen werden (343). Das aus immuntherapeutischer Sicht hervorragende Expressionsschema sowie die Existenz eines reaktiven T-Zellepitops machen das met-Protoonkogen zu einem vielversprechenden Ziel einer immunologischen Tumortherapie.

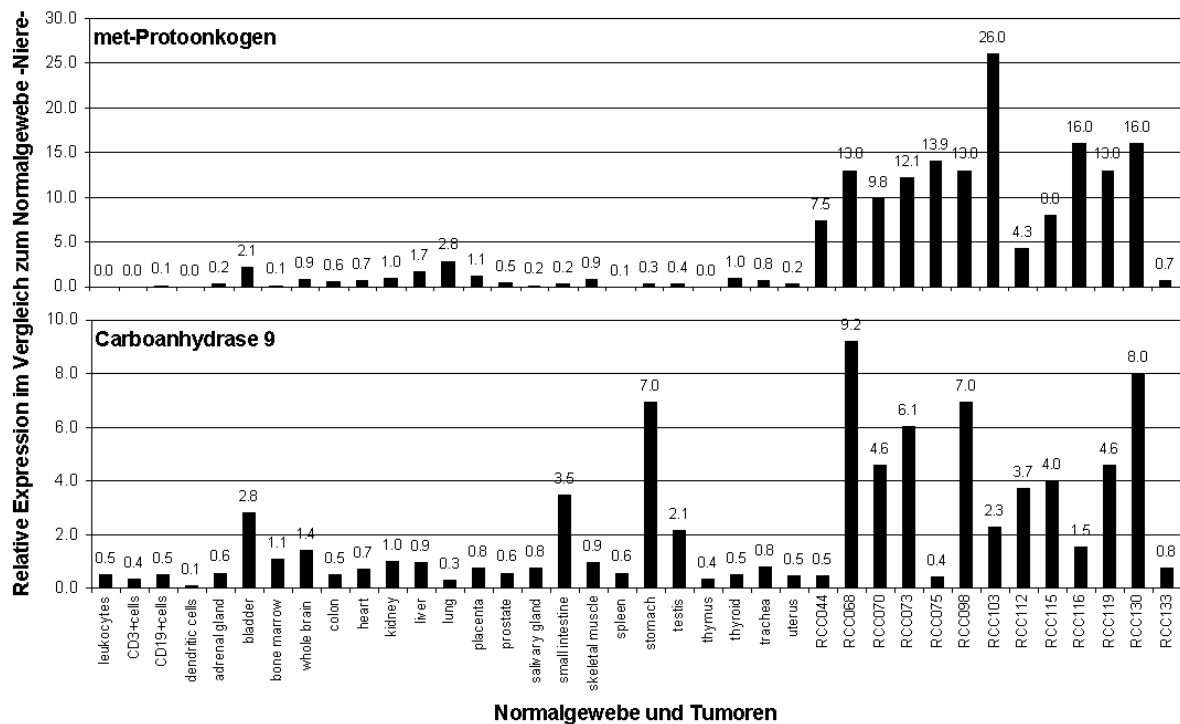


Abbildung 9: MET und CA9: Relative Expressionswerte in den analysierten Tumoren und in verschiedenen Normalgeweben im Vergleich zum Normalgewebe "Niere".

Die Carboanhydrase 9 (CA9; G250) ist die einzige bekannte tumorassoziierte Isoform der Carboanhydrasen und das tumorassoziierte Antigen des Nierenzellkarzinoms, das als erstes entdeckt wurde und am besten etabliert ist (140;290). Es konnte gezeigt werden, dass die Höhe der CA9-Expression in Zellen des Nierenzellkarzinoms ein unabhängiger prognostischer Marker für die Erkrankung ist (47) und dass der monoklonale Antikörper gegen CA9, G250, auch *in vivo* praktisch selektiv Tumorzellen bindet, dass CA9 somit als therapeutische Zielstruktur verwendet werden kann (88;287;288). Konsequenterweise wurde die CA9 auch in mehreren therapeutischen Studien als solche Zielstruktur genutzt (163;183;213). Ein HLA-A*02-restringiertes T-Zellepitop, HLSTAFARV, aus der CA9 (420) ist ebenso gut etabliert, konnte jedoch bisher nicht massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Ein anderes, bisher unbekanntes Peptid aus diesem Protein, das HLA-B*07-präsentierte Peptid SPRAAEPVQL wurde jedoch im Zuge der Analyse des Tumors RCC130 sequenziert. Abbildung 10 zeigt das bei der Tumoranalyse

gewonnene LC/MS-Spektrum sowie das Fragmentspektrum eines synthetischen Peptids gleicher Sequenz. Die Übereinstimmung der Signale bezeugt die Richtigkeit der Sequenz. Das Expressionsmuster der CA9 ist in Abbildung 9 dargestellt. In 8 von 13 Tumoren ist die CA9 mindestens mit einem Faktor von 3 und damit nach unseren Kriterien relevant gegenüber der Normalniere überexprimiert. Augenfällig ist die niedrige Expression in den Tumoren RCC044, 075 und 133, wobei auch hier wie schon bei der Besprechung des Vimentins und Adipophilins anzumerken ist, dass es sich bei den Tumoren RCC044 und RCC075 histologisch um papilläre, bei allen anderen um klarzellige Nierenzellkarzinome handelt. Eine relevante Expression der CA9 in gesunden Körpergeweben beschränkt sich auf den Magen, den Dünndarm sowie die Blase. Die beobachtete Überexpression der CA9 in klarzelligen Tumoren sowie in den genannten gesunden Geweben deckt sich sehr gut mit Beschreibungen in der Literatur (287;289).

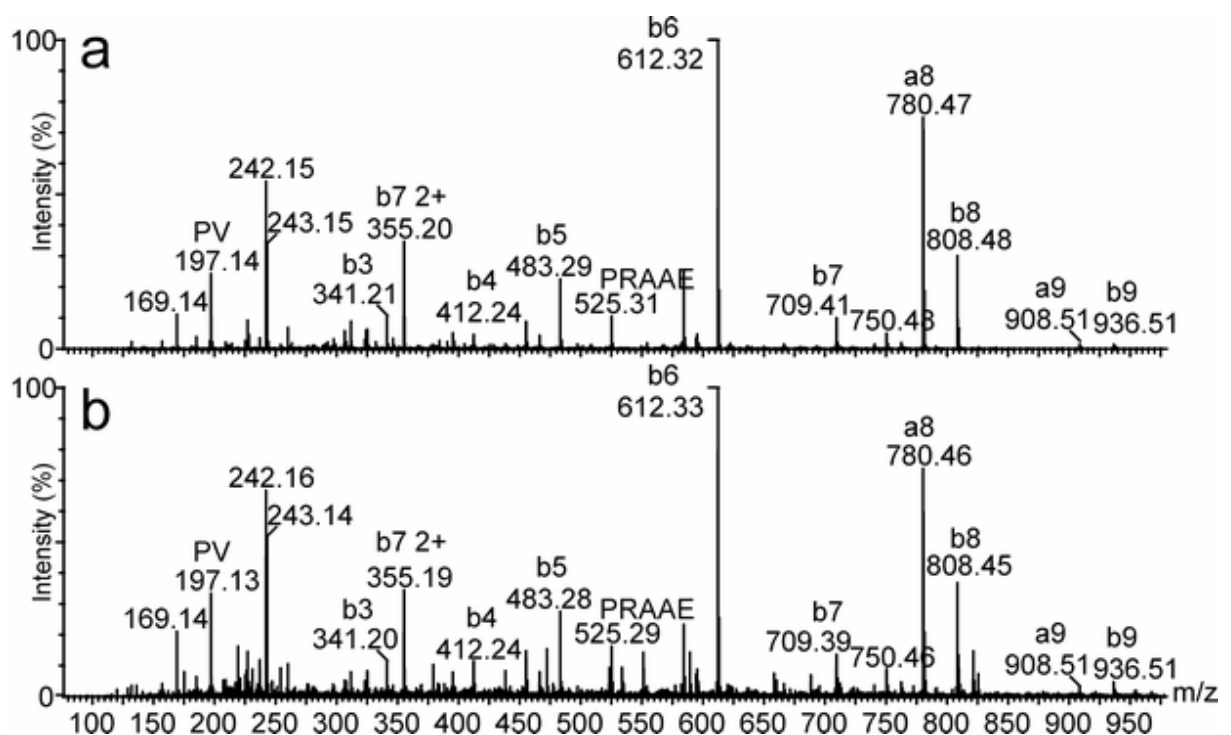


Abbildung 10: Fragmentspektrum des Peptids SPRAAEPVQL aus der Carboanhydrase 9 (CA9).

- a) Fragmentspektrum aus der Analyse des soliden Tumors RCC130
- b) Fragmentspektrum eines synthetischen Peptids gleicher Sequenz zur Verifikation der Originalsequenz

Neben ADFP, MET und CA9 war Cyclin D1 (CCND1, Entrez-Gene ID:595) das vierte etablierte Tumorantigen des Nierenzellkarzinoms aus dem in dieser Arbeit Peptide sequenziert werden konnten. Zwei HLA*A02-präsentierte T-Zellepitope aus Cyclin D1 sind in der Literatur beschrieben und gut etabliert: RLTRFLSRV und LLGATCMFV (337). Ein bisher unbekanntes HLA*A68-präsentierte Peptid, ETIPLTAEKL (435), wurde auf RCC001 gefunden (siehe Tabelle 16). Unsere Expressionsdaten jedoch zeigen nur in einem von dreizehn analysierten Tumoren eine relevante Überexpression von Faktor 5,3. Die mediane relative Expression von Cyclin D1 in den getesteten Tumoren liegt bei 0,9 (Range: 0,2-5,3) und ist damit nicht gegenüber der Normalniere erhöht.

Das met-Protoonkogen, die CA9, Adipophilin und Cyclin D1 waren die einzigen etablierten Tumorantigene aus denen im Zuge dieser Arbeit Peptide sequenziert werden konnten. Tabelle 16 zeigt eine Reihe weiterer Proteine, aus denen Peptide in der Literatur als auf Nierenzellkarzinomen präsentierte T-Zellepitope beschrieben sind, aus denen wir jedoch keine Peptide gewinnen konnten. Auch die im Zuge dieser Arbeit gewonnenen Expressionsdaten zeigen für diese Proteine nur in wenigen oder keinen Fällen eine Überexpression.

So sind die Antigene *survivin* (BIRC5; Entrez Gene ID: 332) (206;242;352), *preferentially expressed antigen in melanoma* (PRAME; Entrez Gene ID: 23532) und *melanoma antigen, family A, 3* (MAGEA3), die als Tumorantigene unter anderem auch für das Nierenzellkarzinom beschrieben sind nur in einzelnen der getesteten Tumoren größer als Faktor 3 überexprimiert (siehe Tabelle 16), wohingegen das *renal tumor antigen* (RAGE), das *cancer/testis antigen 1B* (NY-ESO-1) sowie das *melanoma antigen, family A, 1* (MAGEA1), *mucin 1* (MUC1) und die *telomerase reverse transcriptase* (TERT) in keinem der Tumoren unser Kriterium einer relativen Überexpression gegenüber der Normalniere erfüllten.

3.1.4. Peptide aus Quellproteinen die in mehreren oder einzelnen Tumoren überexprimiert waren

Tabelle 17 zeigt eine Reihe von Proteinen, die in mehreren Tumoren deutlich überexprimiert waren und aus denen Peptide zumeist sogar wiederholt gefunden wurden, die jedoch nicht als tumorassoziiert vorbeschrieben sind. Die hier gezeigten Proteine erfüllen alle unserer Ansicht nach die Kriterien einer Tumorassoziation.

Das *Apolipoprotein L1* (APOL1; Entrez Gene ID: 8542) war in zehn von dreizehn Tumoren relevant, größer Faktor 3 gegenüber der Normalniere überexprimiert, wobei die relativen Expressionsfaktoren der einzelnen Tumoren recht heterogen waren (siehe Abbildung 11). Zwei Peptide aus APOL1, FLGENISNFL und ALADGVQKV (beide auf HLA-A*0201 präsentiert) wurden auf vier verschiedenen Tumoren gefunden. Damit gehörte APOL1 sowohl zu den dominanten Peptidquellen, die in dieser Arbeit identifiziert wurden (Tabelle 15), als auch zu jenen Genprodukten die in der überwiegenden Mehrzahl der Tumore als überexprimiert gemessen wurden. Die wiederholte Detektion von HLA-Liganden aus APOL1 und seine exzessive Überexpression, besonders in den Tumoren RCC068, RCC098, RCC115 und RCC130 rechtfertigt unserer Meinung nach die Verwendung von APOL1-Peptiden in immuntherapeutischen Studien, auch vor dem Hintergrund, dass die Expression dieses Proteins in den getesteten Normalgeweben relativ gering ist.

Tabelle 17: Peptide aus Quellproteinen, für die aufgrund ihrer Expressionsmuster eine Tumorassoziation vermutet werden darf.

Quellprotein Überexpression > 3-fach in X/13 RCCs (M, Median; R, Range der Überexpression)	Entrez Gene ID	Sequenz	HLA Restriktion	Tumor- Probe	Literatur
Apolipoprotein L, 1 (APOL1) 10/13 (M 5,7; R 1,1 – 39,4)	8542	FLGENISNFL ALADGVQKV	A*0201 A*0201	RCC013; RCC115 RCC013; 068; 130	(109;435) (109;435)
insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3) 9/13 (M 6,1; R 1,1 – 9,8)	3486	RPTLWAAAL	B*07	RCC098	
regulator of G-protein signalling 5 (RGS5) 8/13 (M 7,5; R 1,2 – 14,9)	8490	GLAFKSFSLK LAALPHSCL	A*03 A*02	RCC075, RCC098 RCC115	
matrix metalloproteinase 7, matrilysin (MMP7) 5/13 (M 2,5; R 0,3 – 14,9)	4316	FPNSPKWTSK SLFPNSPKWTSK	A*03 A*03	RCC075 RCC075; RCC098	
cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1 (CYP1B1) 4/13 (M 0,8; R 0,4 – 24,3)	1545	FLDPRPLTV	A*02	RCC115; RCC116	
acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 (ACSL4) 3/13 (M 1,4; R 0,8 – 7,0)	2182	KLFDHAVSKF VPNQKRLTLL	A*03 B*07	RCC075; RCC098 RCC075; RCC130	

Ähnlich verhält es sich mit dem *insulin-like growth factor binding protein 3* (IGFBP3; Entrez Gene ID: 3486). Es ist bekannt, dass der *Insulin-like growth factor 1* (IGF1) funktionell in die Progression von Neoplasien aus dem proximalen Tubulusepithel involviert ist und dass IGFBP3 in Nierenzellkarzinomen überexprimiert wird (5;69;166). In unseren Untersuchungen zur Genexpression zeigte sich IGFBP3 in neun von dreizehn Tumoren überexprimiert, wobei die einzige in unseren Augen relevante Expression in gesunden Geweben die Plazenta betrifft, welche im Hinblick auf eine Immuntherapie wohl zu vernachlässigen ist (Abbildung 11). Ein *in vivo* präsentierte Peptid, RPTLWAAAL (HLA-B*07), konnten wir auf RCC098 sequenzieren.

Der *regulator of G-Protein signalling 5* (RGS5; Entrez Gene ID: 8490) aus dem zwei verschiedene HLA-Liganden auf drei verschiedenen Tumoren gefunden wurden (siehe Tabelle 17) ist ebenfalls dafür bekannt, in Nierenzellkarzinomen und deren Blutgefäßen überexprimiert zu sein (5;114). In unseren Analysen war RGS5 in acht von dreizehn Tumoren relevant überexprimiert. Im Vergleich zwischen den einzelnen Tumoren erscheint die RGS5-Expression allerdings recht heterogen, zudem exprimieren einige gesunde Gewebe nicht unwesentliche Mengen dieses Proteins (Abbildung 11). Aufgrund der massiven Überexpression von RGS5 in der Mehrzahl der Tumoren kann eine Tumorassoziation des Proteins und seiner Peptide unserer Ansicht nach postuliert werden.

Etablierte Tumorantigene wie das MET-Protoonkogen oder die CA9, aber auch APOL1 oder IGFBP3 sind in praktisch allen klarzelligen Nierenzellkarzinomen hoch exprimiert und stellen damit Quellproteine für Peptide die, Immunogenität vorausgesetzt, in den meisten Patienten zur experimentellen Immuntherapie zum Einsatz kommen können. Es gibt aber auch solche Proteine, die nur in einzelnen, individuellen Tumoren zum Teil extrem überexprimiert sind, die auch nur in diesen Patienten als tumorassoziiert zu werten sind.

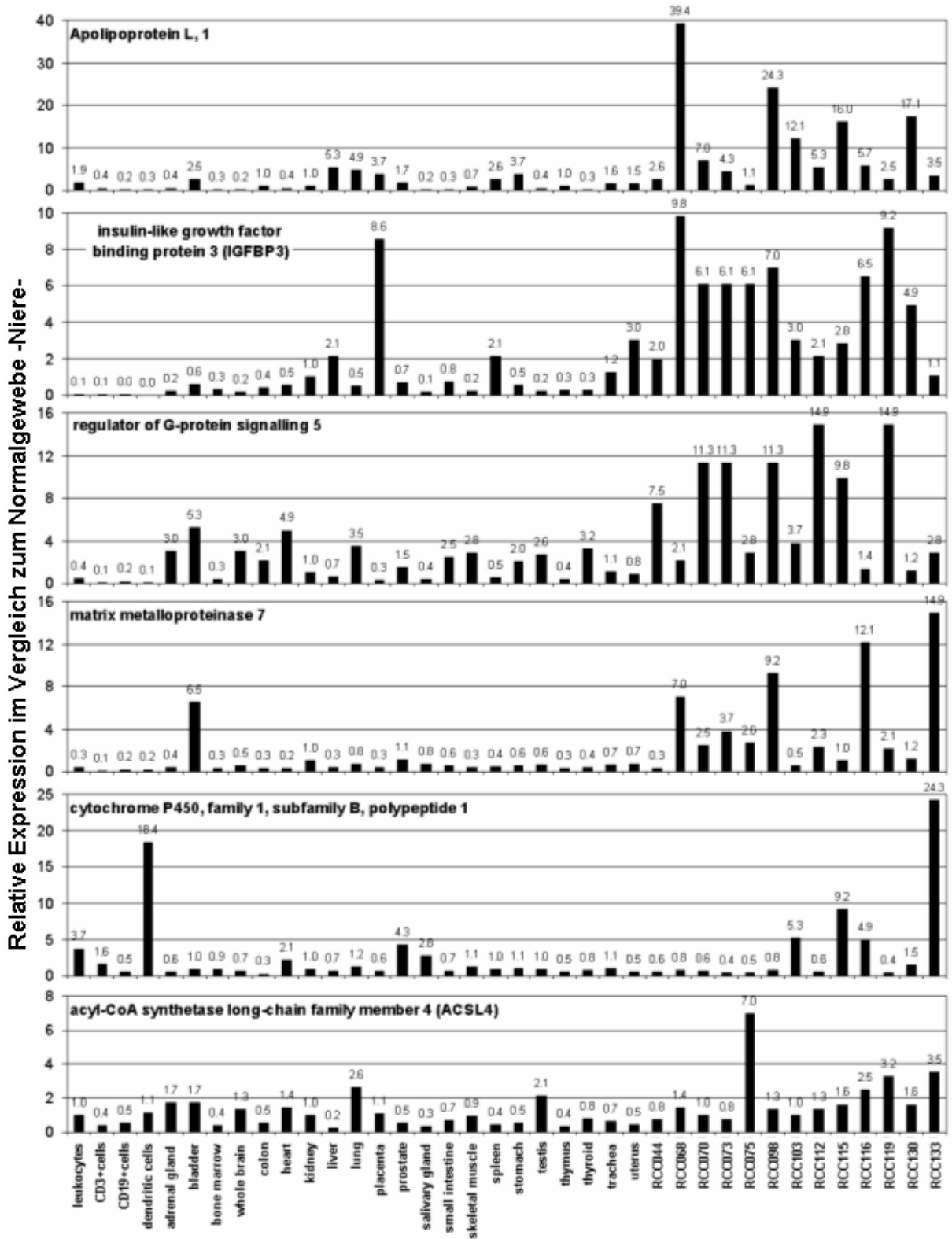


Abbildung 11: Relative Expressionswerte in den analysierten Tumoren und in verschiedenen Normalgeweben im Vergleich zum Normalgewebe "Niere".

Solche Quellproteine sind unserer Meinung nach z.B. die *matrix metalloproteinase 7* (MMP7; matrilysin; Entrez Gene ID: 4316), das *cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1* (CYP1B1; Entrez Gene ID: 1545) sowie die *acyl-CoA synthetase long-chain family member 4* (ACSL4; Entrez Gene ID: 2182).

MMP7 wird in malignen Zellen verschiedenen Ursprunges exprimiert und spielt in den molekularen Prozessen der Metastasierung eine wichtige Rolle (307;335;444). Neben einer hohen relativen Expression der MMP7 in RCC068, RCC098, RCC116 und RCC133 konnten wir eine relevante Expression dieses Proteins nur in der Blase detektieren (siehe Abbildung 11). Der HLA-A*03-Ligand SLFPNSPKWTSK und seine kürzere Variante FPNSPKWTSK konnten in RCC075 und RCC098 gefunden werden.

Das CYP1B1 gehört zur Cytochrom P450 Monooxygenasen-Superfamilie und ist funktionell u.a. in Mechanismen der Resistenz von Tumorzellen gegen Chemotherapeutika verwickelt (259). In diesem Zusammenhang ist eine starke Expression des Gens in verschiedenen Tumorentitäten u.a. im Nierenzellkarzinom bekannt (257;258;260;276). In unseren Genexpressionsanalysen konnten wir eine sehr hohe Expression in dendritischen Zellen sowie in dem Tumor RCC133 sowie eine recht hohe Expression in den Tumoren RCC115 und RCC116 detektieren (siehe Abbildung 11). In beiden letztgenannten Tumoren wurde das CYP1B1-Peptid FL DPRPLTV (HLA-A*02) sequenziert.

Weitere Peptide, für die aufgrund der Expression ihres Quellproteins eine Tumorassoziation lediglich in individuellen Patienten postuliert werden kann, entstammen der *acyl-CoA synthetase long-chain family member 4* (ACSL4; Entrez Gene ID: 2182). In unseren Analysen war dieses Protein nur in RCC75, einem histologisch papillären Nierenzellkarzinom massiv gegenüber allen anderen Normalgeweben überexprimiert. Aus der Literatur ist eine Überexpression der ACSL4 aus Adenokarzinomen des Colons (55) sowie aus hepatozellulären Karzinomen (391) bekannt. Zwei Peptide aus diesem Protein konnten identifiziert werden: KLFDHAVSKF (HLA-A*03) und VPNQKRLTLL (HLA-B*07). Auf RCC075 wurden beide gefunden, jeweils eins nochmals auf

RCC098 und RCC130. Diese wiederholte Detektion von ACSL4-Peptiden auf Tumoren steht im Kontrast zu dem eher schwachen Genexpressionsprofil.

3.1.4. Stark überexprimierte Gene, aus denen bisher keine Peptide bekannt sind.

Dieses Kapitel beschreibt Gene die in den meisten, oder aber auch in einzelnen Tumoren massiv überexprimiert sind und damit eine Tumorassoziation entweder für die gesamte Tumorentität des Nierenzellkarzinoms oder für individuelle Tumoren vermuten lassen. Peptide aus diesen Proteinen wären zumindest in einzelnen Patienten interessante Kandidaten für eine Immuntherapie, nichts desto trotz konnten wir aus keinem der hier gezeigten Proteine im Zuge dieser Arbeit Peptide aus soliden Nierenzellkarzinomen gewinnen. Kriterium für die Auswahl der hier gezeigten Gene waren die Überexpression des betreffenden Gens in möglichst vielen der Proben um einen möglichst hohen Faktor gegenüber möglichst allen Normalgeweben. In die Auswertung gingen alle Normalgewebe mit Ausnahme der Testes ein, da es sich bei jenen um Keimepithel handelt, das zum einen ein exklusives Genexpressionsmuster hat, zum anderen immunologisch privilegiert ist. Bei den gezeigten Genen handelt es sich nur um eine kleine Auswahl, da eine umfassende Darstellung aller überexprimierten Gene den hiesigen Rahmen sprengen würde. Abbildung 12 zeigt die Expressionsmuster der im Text besprochenen Gene.

Für eine Reihe der hier gezeigten Gene ist bekannt, dass sie in gesunden Zellen durch Hypoxie induzierbar sind. Das Wissen über die im Nierenzellkarzinom häufige Deletion des VHL-Gens und die daraus folgende, Überexpression von hypoxieinduzierbaren Genen macht diesen Mechanismus auch für die im Folgenden gezeigten Gene wahrscheinlich.

So ist zum Beispiel das Gen der *procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2* (PLOD2; Entrez Gene ID: 5352) ein durch Hypoxie induzierbares Gen, wobei als vermittelnder Transkriptionsfaktor wieder HIF1 α zu sehen ist (13;167). Expressionsdaten die das Nierenzellkarzinom betreffen sind für dieses Gen in der Literatur nicht zu finden.

Relative Expression im Vergleich zum Normalgewebe -Niere-

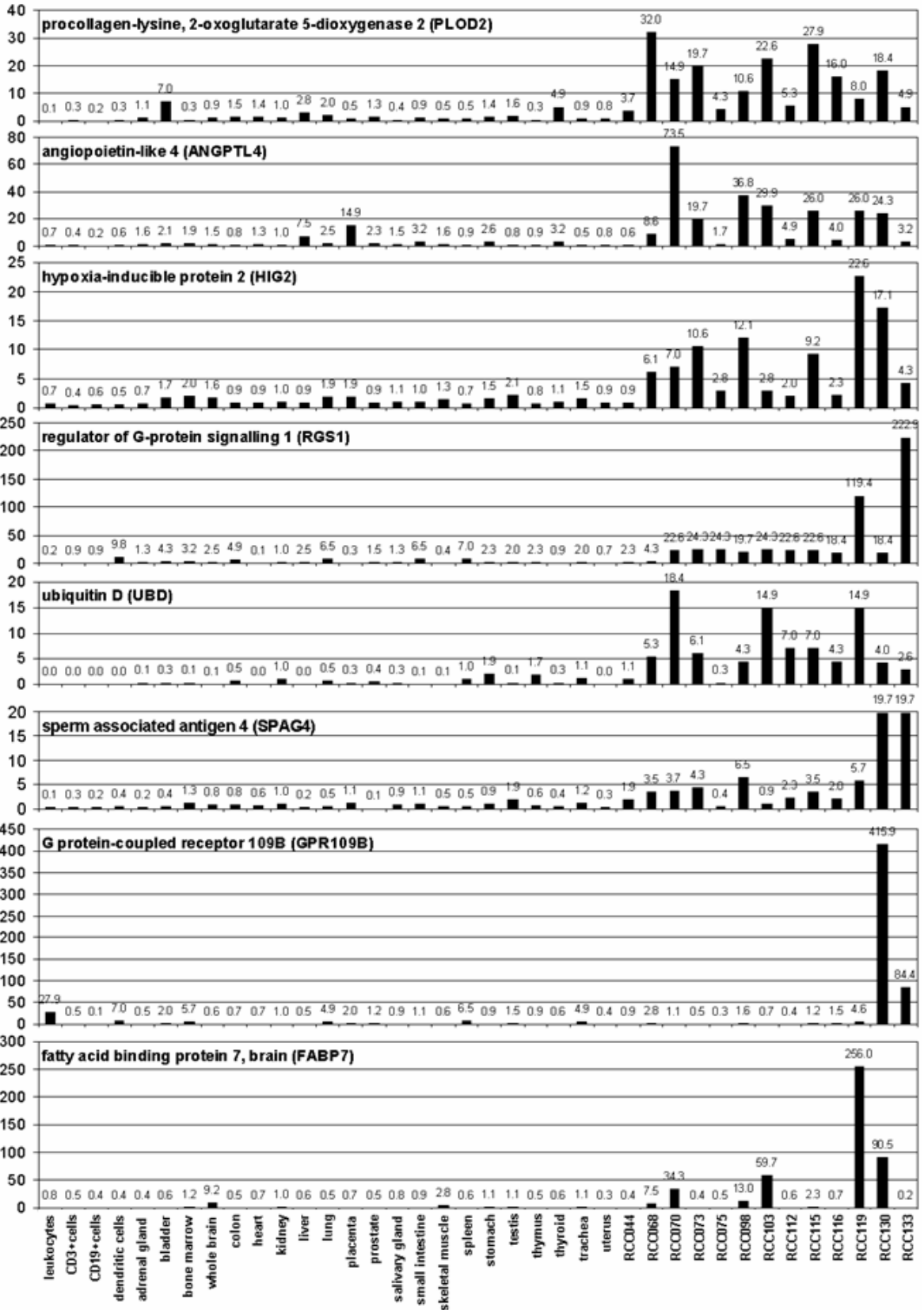


Abbildung 12 (vorangegangene Seite): Genprodukte, die in den meisten oder in einzelnen Proben stark überexprimiert waren, aus denen jedoch keine Peptide auf soliden Nierenzellkarzinomen gefunden werden konnten: Relative Expressionswerte in den analysierten Tumoren und in verschiedenen Normalgeweben im Vergleich zum Normalgewebe "Niere".

Ebenso ist *Angiopoietin-like 4* (ANGPTL4; Entrez Gene ID: 51129) zum einen dafür bekannt durch Hypoxie induzierbar, zum anderen dafür in Nierenzellkarzinomen überexprimiert zu sein, es wurde sogar schon als molekularer Marker in Nierenzellkarzinomen diskutiert (222). Ein weiteres hypoxieinduzierbares Gen ist das *hypoxia-inducible protein 2* (HIG2; Entrez Gene ID: 29923) (83). Alle drei Gene fielen in unseren Analysen durch eine massive Überexpression in den meisten Tumoren gegenüber allen Normalgeweben auf (siehe Abbildung 12).

Andere Gene die in einer Vielzahl der Tumoren überexprimiert waren, für die sich aus der Literatur jedoch keine Hinweise zum Mechanismus der Induktion ergeben sind *Ubiquitin D*, der *regulator of G-protein signalling 1*, sowie das *sperm associated antigen 4*.

Ubiquitin D (UBD, Entrez Gene ID: 10537) war in 10 von 13 Tumoren relevant über den Faktor 3 gegenüber dem Normalgewebe Niere überexprimiert, in den meisten Normalgeweben war es praktisch nicht detektierbar (Abbildung 12), und erfüllt damit die Kriterien einer immunologisch relevanten Tumorassoziation. Zwei der drei Tumoren, die keine hohe Expression des Genes zeigten waren RCC044 und RCC075, die beiden papillären Nierenzellkarzinome. Eine Überexpression von UBD ist aus gastrointestinalen Tumoren bekannt (223). Ein Peptid aus dem Protein konnten wir leider nicht detektieren, aus der Literatur ist jedoch das HLA-B*51-Epitop DANPYDSVKKI bekannt (241).

Der *regulator of G-protein signalling 1* (RGS1; Entrez Gene ID: 5996) war in 9 von 13 Tumoren sogar um den Faktor 20 relativ überexprimiert, in RCC116 sogar um den Faktor 119, in RCC133 um den Faktor 223. Eine relevante Expression von RGS1 in den Normalgeweben war praktisch nicht zu detektieren. Im Kontrast zu dem obig beschriebenen RGS5, das bereits als tumorassoziiert beschrieben ist und aus dem Peptide gefunden werden

konnten, findet sich im Falle von RGS1 in der Literatur kein Hinweis auf eine Tumorassoziation. In unseren Analysen zeigt RGS1 aber ein Expressionsmuster, das eine Immuntherapie mit aus ihm prozessierten Peptiden rechtfertigen würde.

Das Gesagte gilt in gleicher Weise für das *sperm associated antigen 4* (SPAG4; Entrez Gene ID: 6676), einem Protein, das im Flagellum von Spermien gefunden wird. Genexpressionsstudien legen nahe, dass SPAG4 praktisch nur in den Testes sowie geringfügig im Pankreas exprimiert, jedoch in einer großen Vielzahl von Neoplasien hochreguliert gefunden wird. Sein Einsatz als klinischer Tumormarker wurde vor diesem Hintergrund diskutiert (196).

Für einzelne Gene konnte, wie bereits erwähnt, nur in individuellen Tumoren eine starke Überexpression gefunden werden. Beispiele hierfür sind der *G protein-coupled receptor 109B* (GPR109B; Entrez Gene ID: 8843) sowie das *fatty acid binding protein 7, brain* (FABP7; Entrez Gene ID: 2173). Beide wurden in individuellen Tumoren um mehr als den Faktor 100 überexprimiert gefunden, ohne dass eine relevante Expression in den Normalgeweben zu detektieren gewesen wäre (siehe Abbildung 12).

Im Zuge der Analyse der soliden Tumoren konnte aus keinem dieser Proteine ein Peptid sequenziert werden. Aus FABP7 konnte im Verlauf dieser Arbeit zu einem späteren Zeitpunkt ein HLA-A*02-präsentiertes Peptid aus der Zelllinie RCC68CL gewonnen werden, welches in Kapitel 3.3.3. besprochen wird. Die in Abbildung 12 gezeigten Genexpressionsmuster legen eine Tumorassoziation nahe und rechtfertigen damit eventuelle zukünftige experimentelle Anstrengungen aus diesen Proteinen HLA-Liganden zu gewinnen.

3.2. Anlage von primären Zelllinien aus soliden Nierenzellkarzinomen

Alle in diesem Kapitel dargestellten Arbeiten wurden ausschließlich durch den Verfasser dieser Arbeit durchgeführt.

Als Ausgangsmaterial zur Gewinnung HLA-präsentierter Peptide des Nierenzellkarzinoms wurden in dieser Arbeit hauptsächlich solide Tumoren nach chirurgischer Resektion und sofortiger Tiefkühlung verwendet. Diese Vorgehensweise bietet die Möglichkeit experimentell die *in vivo* vorliegende Tumorbiologie abzubilden und damit letztendlich Peptidsequenzen und Genexpressionsdaten zu gewinnen, die klinisch und immuntherapeutisch große Relevanz haben. Gleichzeitig ist die Vorgehensweise jedoch mit einigen Nachteilen vergesellschaftet, so ist die Anzahl der gewonnenen Peptide zum einen vom Gewicht des Ausgangsmaterials abhängig und damit begrenzt, zum anderen muss davon ausgegangen werden, dass es sich bei einem soliden Tumor um recht heterogenes Gewebe handelt, dass also neben dem Tumorparenchym, den eigentlichen Tumorzellen, auch relativ große Mengen von Tumorstroma, also von u.a. Bindegewebe, Blutgefäßen und Zellen des Immunsystems vorliegen, die die gewonnenen Daten beeinflussen. Weiter ist ebenso davon auszugehen, dass die Zellen des Tumorparenchyms selbst untereinander nicht identisch sind, dass in bestimmten Bereichen des Tumors unterschiedliche metabolische Bedingungen herrschen, dass Zellen in verschiedenen Bereichen des Tumors mehr oder weniger entartet sind. Auch dies sind Faktoren die die Aussagekraft von Genexpressions- und Peptiddaten beeinflussen. Zuletzt sind Experimente mit solidem Tumorgewebe kaum mit der identischen Probe wiederholbar, Mehrfachbestimmungen sind schwierig realisierbar und damit sind die Daten begrenzt reproduzierbar.

Dem gegenüber steht die Möglichkeit als Ausgangsmaterial für Peptidsequenz- und Genexpressionsanalysen etablierte Tumorzelllinien zu verwenden, dies mit dem Vorteil, dass man praktisch beliebig viel Ausgangsmaterial für Experimente gewinnen kann und damit diese Experimente auch wiederholbar sind. Weiter wird der Einfluss des Tumorstromas auf das Ergebnis der Experimente in der Zellkultur minimiert, da unter optimalen Kulturbedingungen praktisch nur immortalisierte, also maligne Zellen überleben sollten. *In vitro* bestehen zudem definierte metabolische Bedingungen, damit entsteht weniger Selektionsdruck für den einzelnen Zellklon.

Tabelle 18: Proben solider Nierenzellkarzinome, aus denen in Kultur adherente Zellen gewonnen werden konnten.

Tumor Probe	Histologie	Tumor Grade und Stage	Kultivierbare Tumorzellen	Zahl der Passagierungen	Kulturzeitraum (Wochen)
RCC110	Klarzellig	T3; G2	+	7	3
RCC111	Klarzellig	T1; G2	+	10	7
RCC113	Klarzellig	T3; G1	-	2	2
RCC115	Klarzellig	T3; G2	-	2	2
RCC116	Klarzellig	T3; G2	+	18	12
RCC117	Papillär	T2; G1	+	6	3
RCC121	Klarzellig	T1; G2	+	12	8
RCC125	Klarzellig	T2; G2	+	15	9
RCC126	Papillär	T3; G2	+	6	4
RCC127	Klarzellig	T1; G2	-	2	2
RCC130	Klarzellig	T1; G2	-	2	2
RCC131	Klarzellig	T2; G2	-	2	2
RCC133	Klarzellig	T3; G3	+	9	6

Aufgrund des minimierten Selektionsdruckes darf davon ausgegangen werden, dass ein Zellklon die anderen überwächst und nach einer gewissen Zeit die in Kultur befindlichen Zellen in ihrer genetischen Struktur relativ homogen sind. Diese Vorteile sind mit dem Nachteil erkaufte, dass *in vitro* gewonnene Daten nur begrenzt auf die *in vivo* vorliegende Situation übertragen werden können.

Die meisten in der Literatur zu findenden Studien zur Peptidpräsentation arbeiten mit kultivierten Zellen. Die Bestrebungen zum einen die genannten Vorteile der Zellkultur nutzen zu können, zum anderen einen Vergleich zwischen den aus dem Tumor und den aus der Zellkultur gewonnenen Daten durchführen zu können, führten zu dem Versuch Zelllinien aus soliden Tumoren anzulegen.

Aus insgesamt 14 Tumoren wurden nach dem in Kapitel 2.3.5. beschriebenen Protokoll Zellen isoliert und kultiviert. Tabelle 18 zeigt die genannten Proben und die Dauer über die sie jeweils kultiviert wurden. Aus allen gezeigten Proben konnten adherente Zellen isoliert werden. Abbildung 13a zeigt die durch die beschriebene Methodik gewonnene Zellsuspension Minuten nach der Aussaat, es finden sich noch deutlich sichtbare Kontaminationen mit Blutzellen, die erst durch wiederholten Mediumwechsel nach Absinken der adherenten Zellen zu entfernen waren.

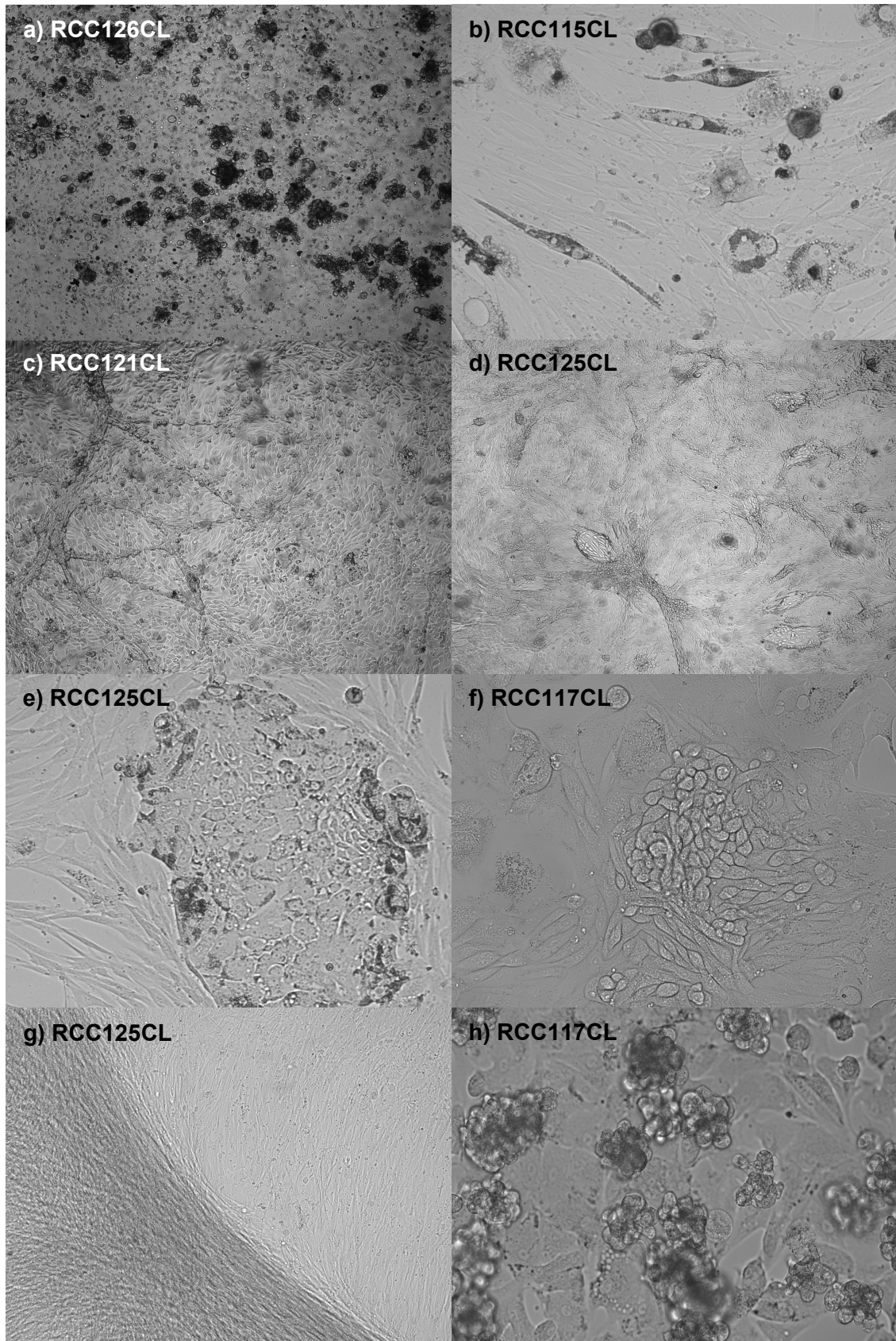


Abbildung 13: Mikroskopische Bilder der Primärkultur von Nierenzellkarzinomzellen, detaillierte Beschreibung siehe Text.

Die Kultivierbarkeit der einzelnen Tumoren unterschied sich erheblich: Aus manchen Resektaten konnten zwar adherente Zellen gewonnen werden, diese ließen sich mikroskopisch-phänotypisch jedoch nicht zuordnen, wurden nicht konfluent und stellten sehr schnell ihr Wachstum ein.

Beispielhaft hierfür sei die Probe RCC115 genannt: Abbildung 13b zeigt das mikroskopische Bild von RCC115CL^a eine Woche nach Ansatz der Primärkultur. Man sieht einige zarte Fibroblasten, die locker den Boden des Kulturgefäßes bedecken sowie morphologisch heterogene, stark granuliert, großkernige Zellen die sich keinem Zelltyp zuordnen lassen und die im Verlauf der Kultur auch nicht expandierbar waren. Nach dem probatorischen Splitten einiger Kulturansätze dieser Probe wurden die letztgenannten Zellen nicht mehr adherent und die Fibroblasten stellten schnell ihr Wachstum ein, so dass die Kultur von RCC115CL nach 2 Wochen Beobachtung aufgegeben wurde.

Sehr häufig zeigte sich gerade in den ersten Passagen einer Kultur eine Koexistenz von Fibroblasten und malignen Zellen. Beispielhaft hierfür seien die Abbildung 13c und d der Proben RCC121CL und RCC125CL gezeigt. Auf beiden Bildern sieht man einen dichten Zellrasen, der am ehesten den Tumorzellen entspricht, durchzogen von einem spinnengewebsartig organisierten Netz von Fibroblasten. Besonders im Beispiel von RCC125CL (Abbildung 13d) sieht man eingestreut dichte Zellnester. Bei stärkerer Vergrößerung wird die unterschiedliche Morphologie der sich in den Zellnestern befindlichen Zellen im Vergleich zu den umliegenden Fibroblasten deutlich. Als Beispiele für dieses Phänomen seien die Abbildung 13e und f von RCC125CL und RCC117CL genannt. Wie bei einigen anderen Proben auch entwickelten sich verschiedene Kulturansätze aus der Primärkultur RCC125CL deutlich unterschiedlich: So waren nach mehreren Passagen in manchen Kavitäten praktisch nur noch Fibroblasten zu sehen (Abbildung 13g), die sich organisierten, wohingegen sich in anderen Kulturansätzen erwartungsgemäß ein dichter Rasen von morphologisch deutlich differenten Tumorzellen bildete (Abbildung 14e).

^a CL = Cell Line, zur besseren nomenklatorischen Unterscheidbarkeit zum soliden Ausgangsgewebe

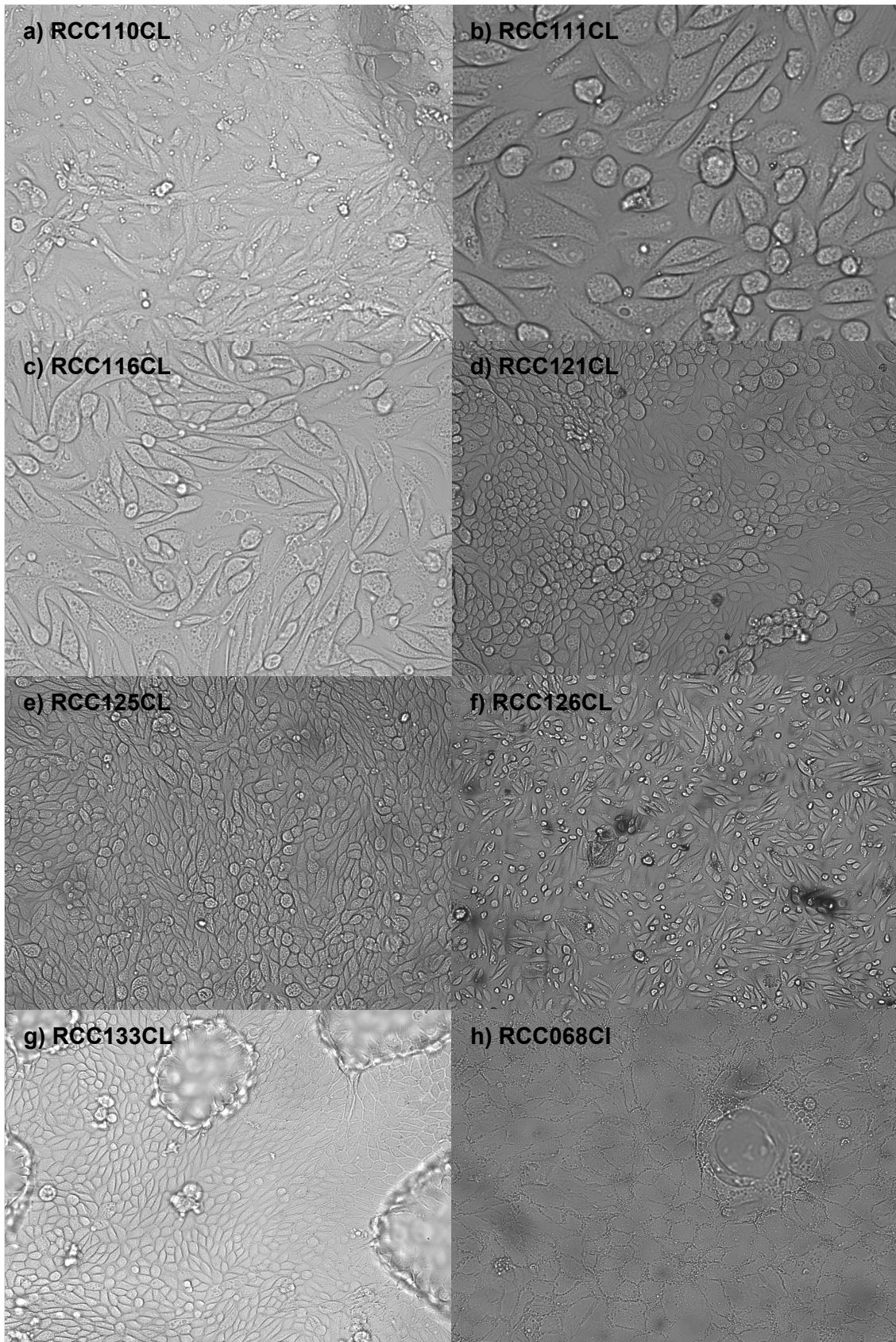


Abbildung 14: Mikroskopische Bilder der Primärkultur von Nierenzellkarzinomzellen, detaillierte Beschreibung siehe Text.

Über solchen Rasen von Tumorzellen kam es, besonders wenn nahezu Konfluenz erreicht war wiederholt zu Abschnürungen größerer weintraubenförmiger Zellkonglomerate (Abbildung 13h und Abbildung 14g). Wurden diese Konglomerate vorsichtig mit dem Überstand abgenommen und neu ausgesät, ohne den Zellrasen zu beschädigen, so wurden sie in einem neuen Kulturgefäß erneut adherent und konfluent und waren mikroskopisch nicht von den anderen adherenten Tumorzellen zu unterscheiden.

Abbildung 14a-g zeigt konfluente Tumorzellen verschiedener solider Tumorsektate. Die gezeigten Kulturen wuchsen jeweils über viele Wochen und über 7-18 Passagen stabil weiter, die Anzahl der Passagen ist Tabelle 18 zu entnehmen, allerdings stellten die meisten Linien nach dieser Zeit ihr Wachstum ein. Von vielen der gezeigten Proben wurde kultiviertes Material kryokonserviert.

Nach Anlage einer Kultur waren regelmäßig nach 24h adherente Zellen zu sehen. Häufig setzte das Wachstum der Zellen erst nach einigen Tagen bis zu zwei Wochen ein, stabilisierte sich dann. Bemerkenswert ist, dass in mehreren Fällen nach 4-8 Wochen das Zellwachstum einer Linie schlagartig sistierte, auch wenn mehrere verschiedene Kulturgefäße gleichzeitig verwendet wurden.

Die Zelllinie mit dem längsten gemessenen Wachstum war RCC116CL, ein Wachstumsstillstand konnte bei ihr nicht festgestellt werden, es wurde viel Material dieser Zelllinie kryokonserviert. Abbildung 15 zeigt die durchflusszytometrische, semiquantitative HLA-Typisierung von RCC116CL im Vergleich mit der Zelllinie JY die als Kontrolle verwendet wurde und die für ihre extrem hohe HLA-Expression bekannt ist. Die Färbung mit anti-HLA-A, -B, -C (Antikörper: W6/32) macht eine ordentliche HLA-Expression deutlich, die allerdings eine Zehnerpotenz unter der von JY-Zellen liegt. Des Weiteren ist RCC116CL durchflusszytometrisch HLA-A*02-positiv und negativ für HLA-A*03, was der HLA-Typisierung des Spenders aus EDTA-Blut entspricht. Die Tumorzellen von RCC116CI sind HLA-DR-negativ. Auf eine Großkultur von RCC116CL mit Genexpressionsanalyse und Peptidsequenzierung wurde aus Zeitgründen verzichtet. Zusammenfassend muss gesagt werden, dass mit Ausnahme von RCC116CL alle Linien im Laufe der Kultur ihr Wachstum

eingestellt haben, allerdings nach z.T. sehr langen Kulturdauern. Es ist bei diesen Zelllinien also letztendlich fraglich ob ein maligner, in Kultur immortalisiert wachsender Zellklon kultiviert wurde.

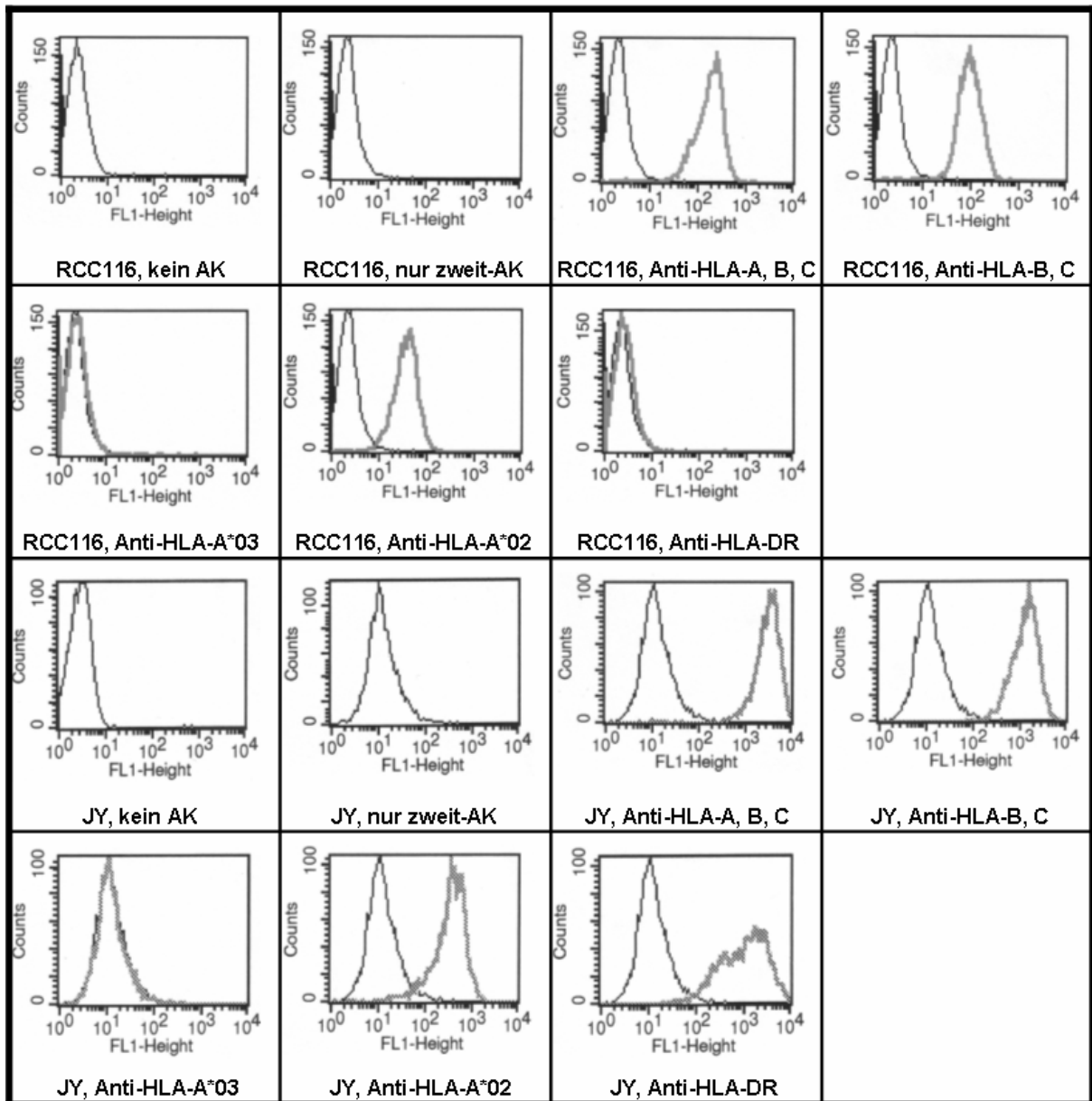


Abbildung 15: Durchflusszytometrische, semiquantitative HLA-Typisierung von RCC116CL im Vergleich mit der Zelllinie JY (Kontrolle).

3.3. Analyse des HLA-Ligandoms der Nierenzellkarzinomzelllinie RCC68

Alle in diesem Kapitel dargestellten Daten wurden ausschließlich durch den Verfasser dieser Arbeit generiert.

3.3.1. Einführung in den Datensatz und Charakterisierung der Zelllinie RCC68CL

Bereits in Kapitel 3.2. wurde begründet warum es uns wichtig erschien solide Nierenzellkarzinome mit korrespondierenden Zelllinien hinsichtlich ihrer Genexpression und Peptidpräsentation zu vergleichen. Dieses Bestreben wurde mit der Probe RCC068 verwirklicht. Die Zelllinie RCC068CL wurde von Frau Dr. Cécile Gouttefangeas im Zuge der Kultur von Tumor infiltrierenden Lymphozyten (TILs) gewonnen, was vor dem Hintergrund unserer systematischen Versuche Tumorzelllinien anzulegen, besonders bemerkenswert erscheint. Abbildung 16 zeigt das mikroskopische Bild der konfluenten Kultur sowie die Wachstumskurve von RCC068CL. Zur Bestimmung dieser Wachstumskurve wurden je $2 \cdot 10^6$ Zellen in große Kulturflaschen (550ml Cellstar, Greiner Bio-One GmbH) ausgesät. Alle 24h wurden 3 Flaschen abgeerntet und aus jeder Flasche durch Auszählung von vier Großquadraten in der Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt.

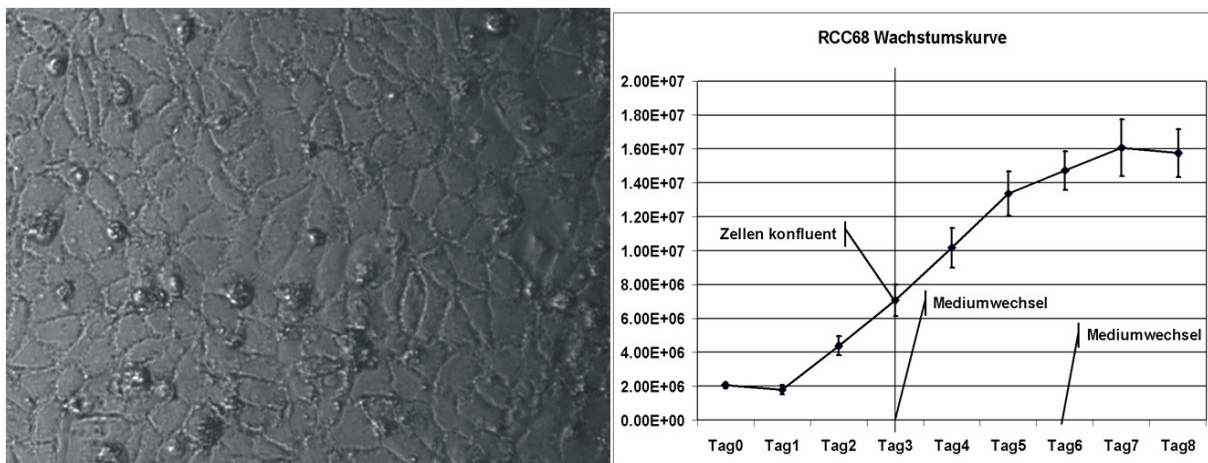


Abbildung 16: Links: Mikroskopisches Bild der Zelllinie RCC68CL bei Konfluens. Rechts: Wachstumskurve der Zelllinie RCC68CL unter optimalen Kulturbedingungen.

Die gewonnenen Lage- und Dispersionsparameter sind in Abbildung 16b angegeben. Um die Verhältnisse in der Großkultur zu imitieren wurde im Dreitagesrhythmus ein Mediumwechsel durchgeführt. Aus der Abbildung wird deutlich, dass die Zellen nach einem ca. 24h langen, durch das Splitten bedingten Wachstumsarrest einen massiven Wachstumsschub durchmachen und sich zwischen 24h und 48h Kulturzeit verdoppeln. Am dritten Tag der Kultur wird diese hohe Teilungsrate nicht ganz beibehalten, trotzdem hat sich nach Ablauf des dritten Kulturtages die Zellzahl nahezu verdreifacht und Konfluenz ist erreicht. Die Zellen wachsen mit verminderter Teilungsrate weiter, am Tag 7 der Kultur ist eine Zellzahl von $16 \cdot 10^6$ Zellen, also das achtfache der Ausgangsmenge erreicht, was einem zweischichtig konfluenten Zell-Rasen entspricht. Erst dann stellen die Zellen, wahrscheinlich aufgrund von Nährstoffmangel der unteren Schicht, ihr Wachstum ein. Dieses außerordentlich aggressive Wachstumsverhalten von RCC068CL, der korrespondierende solide Tumor RCC68sT wurde pathologisch mit dem Tumorgrad G3 charakterisiert, prädestinierte sie zur Großkultur, auch hier behielt sie diese Charakteristik bei und konnte problemlos über ca. 31 Passagen expandiert werden, so dass am Ende 81g Zellmaterial zur Peptidextraktion bereit standen.

Über die gesamte Dauer der Großkultur wurde im zwei- bis dreiwöchigen Rhythmus die HLA-Expression durchflusszytometrisch bestimmt, zum einen um die Reinheit der Kultur zu nachzuweisen, zum anderen um die Beständigkeit der HLA-Expression zu bestätigen. Abbildung 17 zeigt die durchflusszytometrische HLA-Expression von RCC068CL. Es wird deutlich, dass die Expression nur wenig unter der von der als Kontrolle verwendeten Zelllinie JY, die für ihre hohe HLA-Expression bekannt ist liegt. Zudem korrespondiert die HLA-Expression auf RCC68CL qualitativ mit der im Blut des Patienten durchgeführten HLA-Typisierung (HLA-A*02; -A*29; -B*15; -B*45). Die Expression der gezeigten HLA-Moleküle blieb über die gesamte Dauer der Kultur konstant.

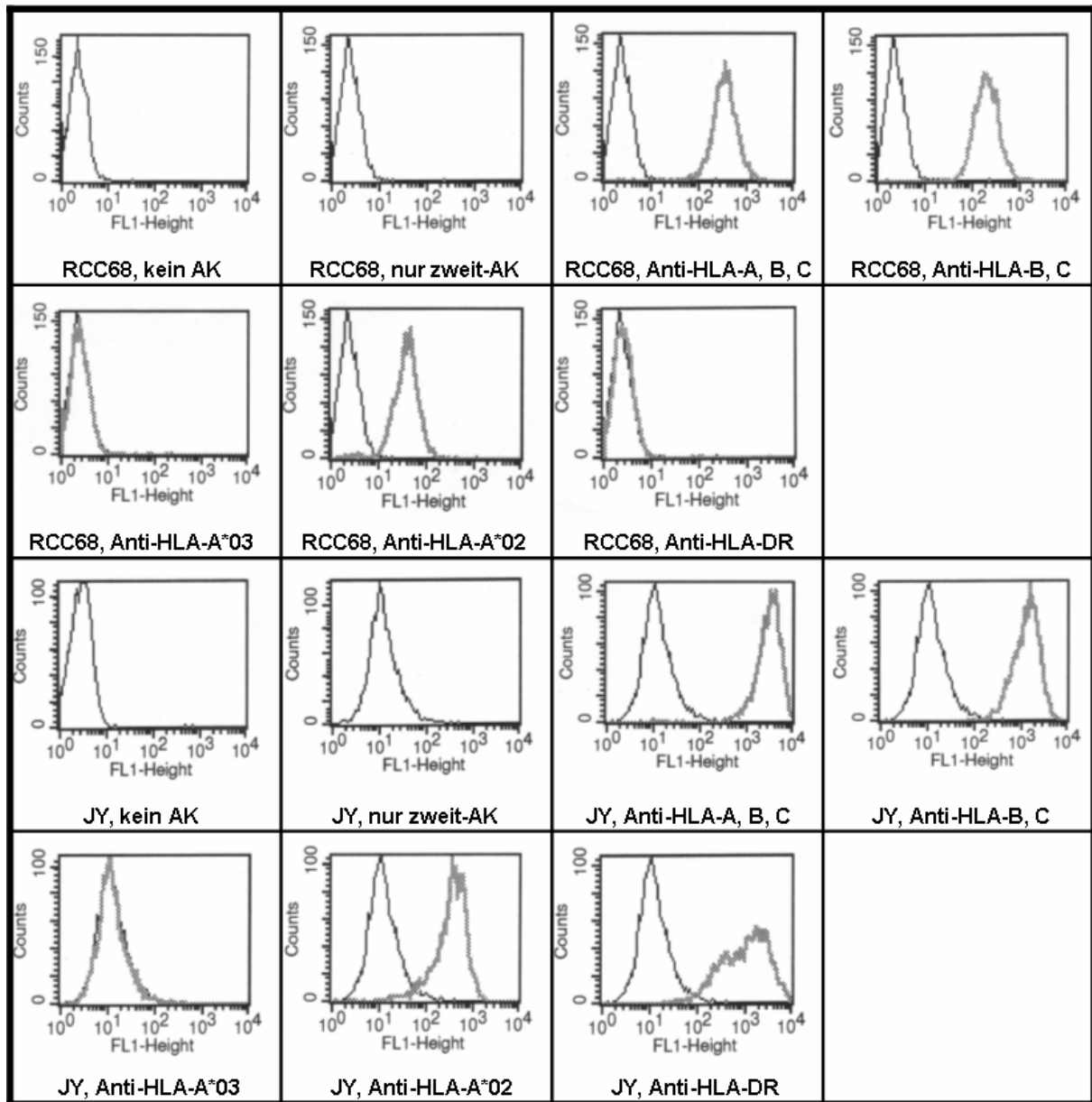


Abbildung 17: Durchflusszytometrische, semiquantitative HLA-Typisierung von RCC68CL im Vergleich mit der Zelllinie JY (Kontrolle).

3.3.2. Vergleich des Genexpressions- und Peptidpräsentationsmusters zwischen der Zelllinie und dem soliden Tumor RCC68

Um einen Vergleich der Zelllinie mit dem soliden Tumor auf Transkriptionsebene zu gewährleisten wurden von beiden Proben *GeneChip*-Analysen durchgeführt. Da ein direkter Vergleich einzelner Gene mit dem Chip aus methodischen Gründen schwierig ist, bevorzugten wir für diese Analyse

den Vergleich der einzelnen, vom Hersteller *Affymetrix* definierten „Probe Sets“, die besonders charakteristischen Bereichen innerhalb einzelner Gene entsprechen. Es erfolgte der paarweise Vergleich der relativen Expressionen der *ProbeSets* in RCC068CL im Vergleich zu RCC068sT. Abbildung 18 zeigt die Häufigkeitsverteilung der relativen Expressionen. Auf der Abszisse sind die Faktoren der relativen Expressionen von RCC068CL im Vergleich zu RCC068sT aufgetragen, auf der Ordinate die Anzahl der *ProbeSets*, die in den entsprechenden Bereich (Klasse) der relativen Expression fallen. Nur 6,6% der *ProbeSets* sind in der Zelllinie gegenüber dem soliden Tumor relevant um den Faktor 3 oder größer überexprimiert, wohingegen 19,2% der *ProbeSets* in der Zelllinie relativ um den Faktor 1/3 oder geringer exprimiert sind. 74,2% der *ProbeSets* zeigen nach unseren Kriterien keine relevante Differenz in der Expression.

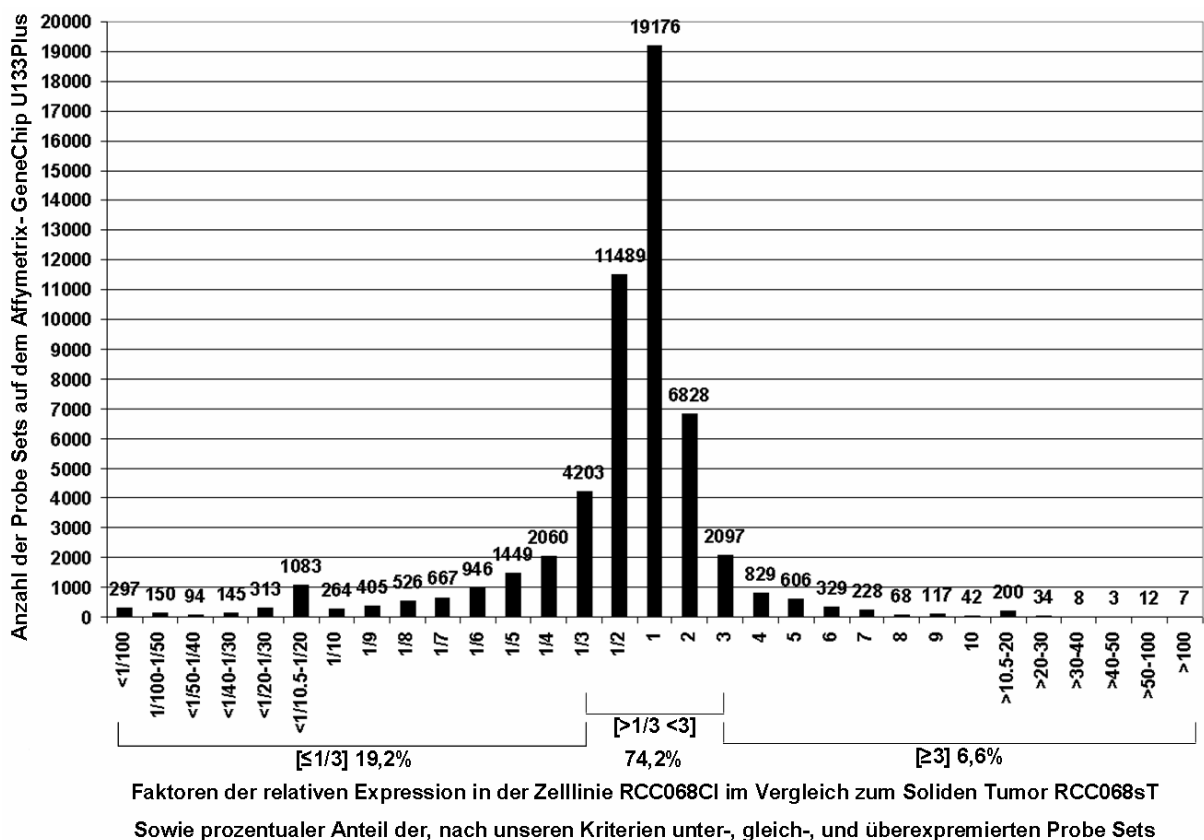


Abbildung 18: Häufigkeitsverteilung der relativen Überexpressionen der *ProbeSets* (Affymetrix) in der Zelllinie RCC68CL im Vergleich zur Expression im soliden Tumor RCC68sT.

Hieraus lässt sich spekulieren, dass die Zellen eines soliden Tumors in der Kultur die Expression einer ganzen Reihe von Genen drosseln bzw. sogar verlieren, ein nahe liegender Grund hierfür wären die optimierten metabolischen Verhältnisse in der Kultur gegenüber der Situation *in vivo*. Des Weiteren unterstreicht diese Analyse, dass *in vitro* gewonnene tumorbiologische Daten nicht ohne weiteres auf die Situation *in vivo* übertragen werden können, und dass im Hinblick auf die Gewinnung immuntherapeutisch relevanter Daten die Analyse von *ex vivo* Material, also in unserem Falle von Tumorresektaten unumgänglich ist.

Auch in der Peptidanalyse ergaben sich große Unterschiede zwischen RCC068Cl und RCC068sT. Bei der Analyse des soliden Tumors RCC068sT konnten 101 verschiedene Peptide sequenziert werden, bei der Analyse der Zelllinie RCC068CL sogar 204 Peptide aus 180 verschiedenen Proteinen. Nur 20 Peptide konnten in beiden Proben gefunden werden. Die Übereinstimmung der gefundenen Peptide zwischen den beiden Proben war aus unserer Sicht überraschend gering. Alle Peptide, die bei der Analyse der Zelllinie RCC068CL sequenziert wurden, sind in Tabelle 19 aufgelistet. In Zeile 1 bis 15 sind jene Proteine aufgeführt, aus denen 2 oder mehr Peptide gewonnen werden konnten. Die 20 Peptide, die sowohl in RCC068CL als auch in RCC068sT gefunden wurden, sind in der letzten Spalte der Tabelle durch das Kürzel „sT“ (solider Tumor) gekennzeichnet. Für jedes Gen sind wie in den vorangegangenen Tabellen die Expressionsdaten als Median und Range der relativen Expressionen in den 13 soliden Tumoren im Vergleich zum Normalgewebe Niere dargestellt und um den relativen Expressionsfaktor in RCC068CL ergänzt. Die meisten soliden Tumoren wurden mit dem Affymetrix *GeneChip* U133A gemessen, auf dem für manche Gene keine *ProbeSets* existieren, diese sind durch den Vermerk „no probeset“ gekennzeichnet. Obwohl RCC068CL mit dem Chip U133Plus gemessen wurde, der einige der auf dem Chip U133A nicht enthaltene Gene zusätzlich misst, wurde auf eine Angabe von Expressionsfaktoren aus diesen zusätzlichen *ProbeSets* aus Gründen der eingeschränkten Vergleichbarkeit verzichtet.

Bereits bei der Analyse der soliden Tumoren (Kapitel 3.1.2.) wurde eine Reihe von Proteinen identifiziert, die dominante Quellen von HLA-präsentierten Peptiden waren, aus denen also mehrfach HLA-Liganden identifiziert wurden (siehe Tabelle 15). Besonders *Vimentin*, die HLA Klasse I-Antigene, die *Aldolase A* und *Catenin* waren als solche dominanten Peptidquellen aufgefallen. Auch im Zuge der Analyse von RCC068CL wurden wiederholt Peptide aus diesen Proteinen identifiziert (siehe Tabelle 19, Zeilen 1, 3, 5, 7). Bei keinem der genannten Proteine zeigte sich eine relevante Änderung der Expression durch die Kulturbedingungen. Dies unterstreicht wiederum den herausragenden Status von konstitutiv exprimierten Strukturproteinen und Enzymen als Quelle von HLA-Liganden, die als „Selbstantigene“ fungieren. Bemerkenswert erscheint, dass in RCC68CL vier völlig neue Peptide aus *Vimentin* gewonnen werden konnten, die den 15 bereits aus der Analyse der soliden Tumoren bekannten Peptiden (Tabelle 15) hinzugezählt werden können.

Tabelle 19 (folgende Seite): Peptide, die im Rahmen der Analyse der Zelllinie RCC68CL sequenziert werden konnten.

	Gen- Name Überexpression > 3-fach in X/13 soliden RCCs (M, Median; R, Range der Überexpression) <i>Überexpression des Gens in RCC068CI als Vielfaches der Expression im Normalgewebe –Niere–</i>	Entrez Gene ID	Sequenz	HLA- Restriktion	
1	HLA class I antigen [Homo sapiens] no probeset	n.a.	GEPRFISVGY VMAPRTLLL VMAPRTLVL YAYDGKDYIAL	A*29 A*02 A*02 A*02	sT
2	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase) (SCD) 7/13 (M 5,7; R 0,5-29,9) 4,6	6319	ITAPPSRVL SLLHLGALY SLLHLGALYGI VVFATFLRY	A*02 B*15 A*02 A*29	sT
3	vimentin (VIM) 8/13 (M 3,5; R 0,2-6,5) 2,3	7431	IDKVRFL KLEGEESRISL NLAEDIMRL NYIDKVRFL	A*02 A*02 A*02 A*02	
4	keratin 19 (KRT19) 6/13 (M 1,6; R 0,0-13,0) 24,3	3880	ILSDMRSQY KSRLEQEIATY RLASYLDKV	B*15 A*29/B*15 A*02	sT
5	aldolase A, fructose-bisphosphate (ALDOA) 0/13 (M 1,2; R 0,4-1,9) 3,0	226	ALSDHHIYL SLFVSNHAY GLSERCAQY	A*02 B*15 A*02	sT
6	fatty acid desaturase 2 (FADS2) 0/13 (M 0,6; R 0,3-0,7) 2,1	9415	ALLDIIRSL AQAGWLQHDY LPYNHQHEY	A*02 B*15 A*29/B15	
7	catenin (cadherin-associated protein), alpha 1, 102kDa (CTNNA1) 0/13 (M 0,7; R 0,5-2,0) 0,5	1495	LQHPDVAAY FIDASRLVY	B*15 B*15	sT
8	histone deacetylase 1 (HDAC1) 0/13 (M 0,6; R 0,2-0,9) 1,3	3065	MTHNLLLY RMLPHAPGV	A*29/B*15 A*02	
9	dyskeratosis congenita 1, dyskerin (DKC1) 1/13 (M 1,3; R 0,7-4,3) 7,0	1736	ALFQRPLI IMLPGVLRV	A*02 A*29/B*15	
10	eukaryotic translation elongation factor 2 (EEF2) 0/13 (M 0,7; R 0,5-1,1) 0,5	1938	ALCEENMRGV ILTDITKGV	A*02 A*02	
11	cyclin I (CCNI) 0/13 (M 1,1; R 0,5-1,9) 1,1	10983	LLDRFLATV SLLDRFLATV	A*02 A*02	
12	activating signal cointegrator 1 complex subunit 3-like 1 (ASCC3L1) 1/13 (M 0,8; R 0,1-4,3) 0,7	23020	AQDEHLITF SQIADVARF	B*15 B*15	
13	collagen, type XVIII, alpha 1 (COL18A1) 0/13 (M 0,6; R 0,1-1,1) 0,4	80781	RLLDVLAPL RLLDVLAPLVL	A*02 A*02	
14	ATPase, H+ transporting, lysosomal 31kDa, V1 subunit E isoform 2 (ATP6V1E2) no probeset	90423	DLISDLLSEA TQRLKIMEY	B*45 B*15	
15	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6 48kDa (EIF3S6) 13/13 (M 4,6; R 3,2-10,6) 7,5	3646	MCPHILRY TMCPHILRY	A*29/B*15 A*29/B*15	
16	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase (UDP-N-acetylglucosamine:polypeptide-N-acetylglucosaminyl transferase) (OGT) 0/13 (M 0,9; R 0,6-2,1) 0,5	8473	AEANHFIDL	A*02	
17	downregulated in ovarian cancer 1 (DOC1) 7/13 (M 3,0; R 1,1-14,9) 0,4	11259	AKSGHLSREV	A*02	
18	COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 7A (COPS7A) 0/13 (M 0,6; R 0,3-0,9) 0,7	50813	ALATLIHQV	A*02	
19	down-regulated in metastasis (DRIM) 1/13 (M 1,2; R 0,7-3,0) 1,3	27340	ALMELFPKL	A*02	

20	tal1 1 (TLN1) 0/13 (M 1,1; R 0,3-1,4) 0,7	7094	ALNELLQHV	A*02	
21	LOC441439: hypothetical gene supported by AK131029; BC002886 No probeset	InterimID: 441439	ARAVSPVTV	A*02	
22	inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 1 (IMPA1) 1/13 (M 1,4; R 0,8-3,0) 2,3	3612	AVTLARQAGEV V	A*02	
23	elongation factor RNA polymerase II (ELL) 1/13 (M 1,5; R 0,3-3,2) 0,7	8178	DALDGLLQQV	A*02	
24	calnexin (CANX) 1/13 (M 1,7; R 0,5-3,5) 6,5	821	EERPWLWVV	A*02	
25	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian) (JUN) 0/13 (M 1,0; R 0,7-1,7) 0,4	3725	FAEGFVRAL	A*02	sT
26	coiled-coil domain containing 99 (CCDC99) 9/13 (M 3,7; R 0,3-39,4) 222,9	54908	FANERCLQL	A*02	
27	ADP-ribosylation factor GTPase activating protein 3 (ARFGAP3) 0/13 (M 1,6; R 1,0-2,5) 3,5	26286	FASHVSPEV	A*02	
28	hypothetical protein HSPC152 (HSPC152) 0/13 (M 0,7; R 0,3-0,9) 0,8	51504	FLEAADNLRL	A*02	
29	chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta) (CCT2) 1/13 (M 1,7; R 1,1-3,0) 5,7	10576	FLLDKKIGV	A*02	
30	Rho GTPase activating protein 12 (ARHGAP12) 3/13 (M 2,3; R 1,4-4,6) 3,0	94134	GLDIDGIYRV	A*02	
31	filamin C, gamma (actin binding protein 280) (FLNC) 0/13 (M 0,5; R 0,1-1,1) 8,0	2318	GLGACLGPRI	A*02	
32	LOC455920: similar to programmed cell death 5; TFAR19 novel apoptosis-related gene; TF1 cell apoptosis-related gene 19 No probeset	InterimID: 455920	GLIEILKKV	A*02	
33	kinetochore associated 2 (KNTC2) 12/13 (M 5,7; R 0,5-128,0) 337,8	10403	GLNEEIARV	A*02	
34	cellular senescence inhibited gene protein (CSIG) 0/13 (M 0,7; R 0,3-1,2) 0,6	26156	HIIENIVAV	A*02	
35	zinc finger protein 630 (ZNF630) no probeset	57232	HLFIHQI	A*02	
36	LOC286348: similar to 60S ribosomal protein L7 No probeset	InterimID: 286348	IALIENALI	A*02	
37	cullin 4A (CUL4A) 0/13 (M 1,0; R 0,6-1,5) 0,4	8451	IMKMRKTL	A*02	
38	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide G (Mus musculus) (Snrgg) no probeset	68011	IMLEALERV	A*02	
39	ribosomal protein L5 (RPL5) 0/13 (M1,1; R 0,9-2,3) 1,7	6125	KIYEGQVEV	A*02	
40	RNA binding motif protein 4 (RBM4) 0/13 (M 0,6; R 0,5-0,7) 1,2	5936	KLHGVNINV	A*02	sT
41	I factor (complement) (IF) 0/13 (M 0,9; R 0,1-1,9) 0,0	3426	KLLHVFL	A*02	
42	PP784 protein (PP784) no probeset	114932	KLWEMDNMLI	A*02	
43	serine/threonine kinase 17b (apoptosis-inducing) (STK17B) 11/13 (M 8,0; R 1,9-16,0) 3,0	9262	LATDFIQSL	A*02	
44	unnamed protein product [Homo sapiens] no probeset	gi 10433149	LCRRIPYL	A*02	
45	fatty acid binding protein 7, brain (FABP7) 6/13 (M 2,3; R 0,2-256,0) 0,2	2173	LDGDKLVHI	B*45	
46	Phospholipase C, epsilon 1 (PLCE1) 5/13 (M 2,3; R 0,2-4,3) 0,9	51196	LHGQLVAL	A*02	
47	leucyl-tRNA synthetase (LARS) 0/13 (M 0,8; R 0,4-1,9) 1,2	51520	LLAPFCPHL	A*02	
48	endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 1 (EDG1) 0/13 (M 0,8; R 0,3-1,6) 0,4	1901	LLLLSIVIL	A*02	
49	pyrophosphatase [Homo sapiens] no probeset	gi 5931600	LLMKNCNGGAI	A*02	
50	syndecan binding protein (syntenin) (SDCBP) 2/13 (M 1,6; R 0,9-4,9) 1,5	6386	LMDHTIPEV	A*02	sT
51	mucin 20 (MUC20) no probeset	200958	LMQQLHREL	A*02	
52	microfibrillar protein 2 [Homo sapiens]	gi 7417003	LQLSAIII	A*02	

53	no probeset KIAA0406: KIAA0406 gene product 0/13 (M 0,7; R 0,2-1,0) 1,6	9675	LSLLLGYLKL	A*02	
54	transforming protein sno-A – human no probeset	gij68924	LYQFLIMV	A*02	
55	sorting nexin 7 (SNX7) 0/13 (M 1,3; R 0,4-2,0) 1,6	51375	MSGLSEALLPV	A*02	
56	phosphorylase, glycogen; muscle (McArdle syndrome, glycogen storage disease type V) (PYGM) 0/13 (M 0,6; R 0,1-0,8) 1,6 oder: phosphorylase, glycogen; brain (PYGB) 1/13 (M 0,8; R 0,3-4,6) 10,6 oder: phosphorylase, glycogen; liver (PYGL) (Hers disease, glycogen storage disease type VI) 2/13 (M 1,5; R 0,7-4,3) 4,6	5837 5834 5836	NLAENISRV	A*02	
57	DNA polymerase-transactivated protein 6 (DNAPT6) 1/13 (M 1,1; R 0,4-3,0) 1,4	26010	NLCPTRIEV	A*02	
58	chloride intracellular channel 1 (CLIC1) 0/13 (M 1,4; R 0,5-2,5) 2,3	1192	NLLPKLHIV	A*02	
59	melanophilin (MLPH) 1/13 (M 0,7; R 0,4-3,0) 6,1	79083	NLPIFLPRV	A*02	
60	chromosome 12 open reading frame 4 (C12orf4) 1/13 (M 1,4; R 0,6-3,2) 4,6	57102	NMLPQIFRV	A*02	
61	unnamed protein product [Homo sapiens] no probeset	gij34533999	PIVFRPL	A*02	
62	regulator of G-protein signalling 10 (RGS10) 1/13 (M 1,2; R 0,7-4,0) 1,4	6001	QMQEKAKEI	A*02	
63	ataxin 10 (ATXN10) 0/13 (M 0,9; R 0,5-1,1) 1,4	25814	QVFPGLLERV	A*02	
64	ribophorin II (RPN2) 0/13 (M 0,9; R 0,5-1,7) 0,9	6185	RLDELGGVYL	A*02	
65	cytoplasmic linker associated protein 1 (CLASP1) 0/13 (M 1,1; R 0,6-1,2) 0,8	23332	RLLDGAFKL	A*02	
66	ankyrin repeat domain 25 (ANKRD25) 0/13 (M 0,3; R 0,1-0,8) 0,1	25959	RLLDYVUNI	A*02	
67	keratin 18 (KRT18) 0/13 (M 0,7; R 0,5-2,1) 1,9	3875	RLLEDGEDFNL	A*02	
68	ubiquitin specific protease 9, X-linked (fat facets-like, Drosophila) (USP9X) 0/13 (M 1,7; R 1,3-2,3) 1,6 oder: ubiquitin specific protease 9, Y-linked (fat facets-like, Drosophila) (USP9Y) 0/13 (M 0,3; R 0,0-1,3) 1,4	8239 8287	RLWGEPVNL	A*02	
69	phosphatidylinositol glycan, class Q (PIGQ) 0/12 (M 0,8; R 0,4-1,2) 1,6	9091	RMFPGEVAL	A*02	
70	serine/threonine kinase 17a (apoptosis-inducing) (STK17A) 2/13 (M 1,3; R 0,3-9,8) 6,1	9263	SAVDFIRTL	A*02	
71	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 2 (KCNH2) 1/13 (M 0,6; R 0,3-7,0) 0,3 oder: potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 6 (KCNH6) 0/13 (M 0,5; R 0,2-1,7) 0,4	3757 81033	SIFGNVSAI	A*02	
72	protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform (PPP1CA) 0/13 (M 0,6; R 0,5-1,0) 1,3	5499	SIIGRLLEV	A*02	
73	flightless I homolog (Drosophila) (FLII) 0/13 (M 0,9; R 0,7-1,7) 1,6	2314	SLFPGKLEV	A*02	
74	protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform (PPP1CB) no probeset	397378	SLITRLLLEV	A*02	
75	tuberous sclerosis 2 (TSC2) 0/13 (M 0,4; R 0,1-1,3) 0,3	7249	SLLDIEKV	A*02	
76	forkhead box A2 (FOXA2) 3/13 (M 1,1; R 0,4-9,8) 6,1 oder: neuronal thread protein AD7c-NTP (AD7C-NTP) 1/13 (M 0,7; R 0,3-3,0) 0,4	3170 27308	SLLLPRL	A*02	
77	reticulon 3-A [Homo sapiens] no probeset	gij37777824	TDFSVHDL	A*02	
78	KIAA1305: KIAA1305 0/13 (M 0,5; R 0,3-1,4) 0,1	57523	TLADIIARL	A*02	
79	transformation/transcription domain-associated protein	8295	TLADLVHHV	A*02	sT

	(TRRAP) 0/13 (M 1,0 ; R 0,4-1,5) 1,2			
80	ash2 (absent, small, or homeotic)-like (Drosophila) (ASH2L) 0/13 (M 0,8; R 0,4-0,9) 0,9	9070	TLADVLYHV	A*02
81	HSCARG protein (HSCARG) no probeset	57407	TLLEDGTFKV	A*02
82	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 1 (ITPR1) 0/13 (M 1,1; R 0,5-1,5) 0,2 oder: inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 2 (ITPR2) 1/13 (M 2,1; R 1,0-3,7) 8,0	3708 3709	TLLNVIKSV	A*02
83	thrombospondin 1 (Thbs1) no probeset	21825	TLLPLRVFL	A*02
84	hypothetical protein FLJ33817 (FLJ33817) no probeset	124997	TLMDILPRI	A*02
85	chromosome 20 open reading frame 139 (C20orf139) no probeset	140809	TLSDLRVYL	A*02
86	ribosomal protein L10a (RPL10A) 0/13 (M 0,9; R 0,8-1,2) 0,9	4736	TYEAVREV	A*02
87	BiP [Homo sapiens] no probeset	gij1143492	TRIPKIQQL	A*02
88	polo-like kinase 2 (Drosophila) (PLK2) 11/13 (M 10,6; R 0,8-32,0) 32,0	10769	VADTVARVL	A*02
89	602362234F1 NIH_MGC_90 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:4470489 5', mRNA sequence no probeset	gij12759945	VAIPLVTLAVV	A*02
90	transmembrane protein 16F (TMEM16F) no probeset	196527	VLDDKLVFV	A*02
91	exportin 1 (CRM1 homolog, yeast) (XPO1) 0/13 (M 1,6; R 1,0-2,3) 3,3	7514	VLIDYQRNV	A*02
92	ORM1-like 3 (S. cerevisiae) (ORMDL3) no probeset	94103	VLIPKLPQL	A*02
93	signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa (STAT1) 10/13 (M 4,6; R 1,3-13,9) 18,4	6772	VLWDRTFSL	A*02
94	karyopherin alpha 1 (importin alpha 5) (KPNA1) 0/13 (M 1,1; R 0,6-1,5) 1,1 oder: karyopherin alpha 5 (importin alpha 6) (KPNA5) 9/13 (M 4,3; R 0,8-8,0) 0,7	3836 3841	VMDSKIVQV	A*02 sT
95	ankyrin repeat domain 17 (ANKRD17) 0/13 (M 1,0; R 0,5-1,4) 1,2 oder: MASK-4E-BP3 alternate reading frame gene (MASK-BP3) 0/13 (M 0,8; R 0,3-1,2) 0,2	26057 404734	YAEVGRVL	A*02
96	egl nine homolog 3 (C. elegans) (EGLN3) 7/13 (M 3,5; R 0,4-17,1) 1,5	112399	YIVPCLHEV	A*02
97	S-phase kinase-associated protein 1A (p19A) (SKP1A) 0/13 (M 0,8; R 0,3-1,1) 0,6	6500	YLDIKGLLDV	A*02
98	hypothetical protein MGC13114 (MGC13114) no probeset	84326	YLDPAQRGV	A*02
99	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 6 (DDX6) 0/13 (M 0,5; R 0,3-1,1) 0,6	1656	YLIPLLERL	A*02
100	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17 (DDX17) 0/13 (M 0,8; R 0,5-1,2) 0,5	10521	YLLPAIVHI	A*02
101	RAS-like, family 11, member A (RASL11A) no probeset	387496	YLLPKDIKL	A*02
102	interleukin-1 receptor-associated kinase 2 (IRAK2) no probeset	3656	YLPEDFIRV	A*02
103	GlcNAc beta1,3-galactosyltransferase 5 [Homo sapiens] (UDP-Gal) no probeset	gij7593027	AFPKMRLMY	A*29
104	cytochrome c oxidase I (MTCO1) no probeset	4512	FFDPAGGGDPI LY	A*29
105	DEAD (Asp-Glu-Ala-As) box polypeptide 19 (DDX19) 0/13 (M 1,2; R 0,3-1,7) 1,9	11269	FYPELKLAY	A*29
106	mortality factor 4 like 2 (MORF4L2) 0/13 (M 1,0; R 0,7-1,3) 1,2	9643	GYLHDFLKY	A*29 sT
107	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2 [Homo sapiens] no probeset	gij30582099	KYFDEHYEY	A*29 sT
108	transmembrane protein 38B (TMEM38B) 0/13 (M 0,8; R 0,3-2,0) 1,1	55151	MFPFFDIAHY	A*29
109	tRNA (5-methylaminomethyl-2-thiouridylate)-methyltransferase 1 (TRMT1) 0/13 (M 0,4; R 0,1-1,3) 2,5	55687	NFEHLLQY	A*29

110	leprecan-like 1 protein [Homo sapiens] no probeset	gij27526730	NFLPLHYDY	A*29	
111	fatty acid synthase (FASN) 0/13 (M 0,5; R 0,2-1,1) 0,5	2194	SFAARSFYY	A*29	
112	annexin A8 (ANXA8) 1/13 (M 0,7; R 0,3-5,3) 7,0	244	SYFAERLYY	A*29	
113	dermatan 4 sulfotransferase 1 (D4ST1) no probeset	113189	VTFPEFLRY	A*29	
114	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 47 (DDX47) 0/13 (M 1,1; R 0,5-1,4) 4,0	51202	YYIFIPSKF	A*29	
115	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3 (PFKFB3) 0/13 (M 0,9; R 0,2-2,6) 1,3	5209	YYRYPTGESY	A*29	sT
116	MCM5 minichromosome maintenance deficient 5, cell division cycle 46 (S. cerevisiae) (MCM5) 5/13 (M 1,7; R 0,2-7,0) 4,3	4174	AMRPGLEGY	A*29/B*15	
117	dynein, cytoplasmic, heavy polypeptide 1 (DNCH1) 0/13 (M 0,5; R 0,4-0,8) 0,5	1778	AVAPFFKSY	A*29/B*15	
118	wg81d08.x1 Soares_NSF_F8_9W_OT_PA_P_S1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2371503 3', mRNA sequence no probeset	gij5234633	FCLALFLATY	A*29/B*15	
119	matrin 3 (MATR3) 13/13 (M 5,3; R 3,0-7,0) 10,6	9782	FFGETSHNY	A*29/B*15	sT
120	LOC489162: similar to CCR4-NOT transcription complex subunit 8 (CCR4-associated factor 8) (CAF1-like protein) (CALIFp) (CAF2) (Canis familiaris Gene Model) No probeset	n.a.	FFPSIYDVKY	A*29/B*15	
121	expressed in T-cells and eosinophils in atopic dermatitis (ETEA) 0/13 (M 1,3; R 0,9-2,6) 3,0	23197	IMLPFRFTY	A*29/B*15	
122	heat shock 70kDa protein 8 (HSPA8) 0/13 (M 0,9; R 0,5-1,5) 1,2 oder: heat shock 70kDa protein 1B (HSPA1B) 0/13 (M 0,3; R 0,1-1,1) 0,6	3312 3304	KMKEIAEAY	A*29/B*15	sT
123	WD repeat domain 35 (WDR35) no probeset	57539	LAVDSFIY	A*29/B*15	
124	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian) (ERBB3) 0/13 (M 0,2; R 0,1-1,1) 0,4	2065	LKEISAGRIY	A*29/B*15	
125	retinoblastoma-associated factor 600 (RBAF600) 1/13 (M 0,3; R 0,1-8,6) 0,7	23352	LNLPHYFLRY	A*29/B*15	
126	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 42 (DDX42) 0/13 (M 0,9; R 0,7-2,6) 2,5	11325	RMFDMGFY	A*29/B*15	
127	sorting nexin 5 (SNX5) 0/13 (M 0,8; R 0,4-1,1) 0,9	27131	RNFHVFLY	A*29/B*15	
128	cirrhosis, autosomal recessive 1A (cirhin) (CIRH1A) no probeset	84916	STVSRFFLY	A*29/B*15	
129	spastic paraplegia 20, spartin (Troyer syndrome) (SPG20) 11/13 (M 3,5; R 2,1-8,6) 6,1	23111	TGHTLLEDY	A*29/B*15	
130	apolipoprotein A-I (APOA1) 0/13 (M 0,5; R 0,1-1,2) 1,5	335	AAVLTAVLF	B*15	
131	fibronectin 1 (FN1) 5/13 (M 2,3; R 0,2-26,0) 9,2	2335	ALCHFPLY	B*15	
132	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1 (PTP4A1) 3/13 (M 2,1; R 1,3-3,0) 3,7	7803	ALIEGGMKY	B*15	
133	15 kDa selenoprotein (SEP15) 0/13 (M 1,0; R 0,9-2,8) 3,7	9403	AQFETKKLY	B*15	
134	sterol-C4-methyl oxidase-like (SC4MOL) 0/13 (M 0,7; R 0,3-0,9) 1,3	6307	AVIEDTWHY	B*15	
135	ataxia telangiectasia and Rad3 related (ATR) 10/13 (M 9,2; R 0,9-21,1) 11,3	545	FLFKSKSPAIF	B*15	
136	UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A6 (UGT1A6) 0/13 (M 0,2; R 0,0-0,9) 0,3	54578	FQRISAGVF	B*15	
137	filamin A, alpha (actin binding protein 280) (FLNA) 1/13 (M 2,0; R 0,7-6,1) 3,5	2316	GLHSVDVTY	B*15	
138	Cdc42 effector protein 3 [Homo sapiens] oder: MSE55-related protein [Homo sapiens] no probeset	n.a.	GQFPGHNEF	B*15	sT
139	clathrin, heavy polypeptide (Hc) (CLTC) 1/13 (M 0,7; R 0,1-4,9) 1,4	1213	GQVQKIVLY	B*15	
140	MGC11332: hypothetical protein MGC11332	84804	ILTCTLLLY	B*15	

141	no probeset thioredoxin interacting protein (TXNIP) 0/13 (M 0,7; R 0,4-2,3) 0,1	10628	KIKSFEVVF	B*15	
142	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 (HNRPA2B1) 0/13 (M 1,4; R 1,1-2,3) 5,3	3181	KLFIGGLSF	B*15	
143	TBC1 domain family, member 19 (TBC1D19) 0/13 (M 0,8; R 0,4-2,6) 0,7	55296	LLWDRILGY	B*15	
144	adhesion regulating molecule 1 (ADRM1) 0/13 (M 0,8; R 0,5-1,4) 2,6	11047	PQCPGRVY	B*15	
145	glutathione peroxidase [Homo sapiens] no probeset	gij577062	RLAAAAQSVY	B*15	sT
146	interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-6-16) (G1P3) 0/13 (M 0,9; R 0,3-1,6) 0,4	2537	RQKAVSLF	B*15	
147	chromosome 8 open reading frame 4 (C8orf4) 2/13 (M 1,1; R 0,2-4,6) 0,4	56892	RVSPSIHGY	B*15	
148	epithelial cell transforming sequence 2 oncogene (ECT2) 9/13 (M 4,0; R 1,6-119,4) 315,2	1894	SIGDIFLKY	B*15	
149	mitochondrial carrier homolog 1 (C. elegans) (MTCH1) 0/13 (M 0,5; R 0,4-1,3) 0,6	23787	SQALAIRSY	B*15	
150	MKI67 (FHA domain) interacting nucleolar phosphoprotein (MKI67IP) no probeset	84365	SQFGTVTRF	B*15	
151	Fc fragment of IgG, receptor, transporter, alpha (FCGRT) 0/13 (M 0,5; R 0,0-1,0) 0,1	2217	SVLTCSAFSFY	B*15	
152	LOC92691: hypothetical protein BC008604 no probeset	92691	TLICLPVVF	B*15	
153	furin (paired basic amino acid cleaving enzyme) (FURIN) 0/13 (M 0,8; R 0,4-1,1) 0,2	5045	TLTKFTLVLY	B*15	
154	HSPC038 protein (LOC51123) 0/13 (M 1,0; R 0,8-1,5) 1,4	51123	TQMPDPKTF	B*15	
155	collagen, type VI, alpha 2 (COL6A2) 4/13 (M 1,6; R 0,6-4,6) 2,0	1292	TQRPVDIVF	B*15	
156	high density lipoprotein binding protein (vigilin) (HDLBP) 0/13 (M 0,8; R 0,3-1,3) 1,2	3069	VLREIAEEY	B*15	sT
157	signal recognition particle 68kDa (SRP68) no probeset	6730	VLYDRVLKY	B*15	sT
158	NCK-associated protein 1 (NCKAP1) 0/13 (M 1,1; R 0,6-2,0) 3,0	10787	VQIDITRVF	B*15	
159	leukocyte-derived arginine aminopeptidase (LRAP) 7/13 (M 3,5; R 0,5-18,4) 24,3	64167	YLWHIPLTY	B*15	
160	RAP2B, member of RAS oncogene family (Rap2b) no probeset	74012	FVTGSFIEKY	B*15	
161	zinc finger, A20 domain containing 3 (ZA20D3) 0/13 (M 1,1; R 0,7-1,5) 1,9	54469	NVYCGVHRY	B*15	
162	stomatin (EPB72)-like 2 (STOML2) 0/13 (M 0,5; R 0,3-0,6) 0,8	30968	AEAIRILAA	B*45	
163	tripartite motif-containing 25 (TRIM25) 4/13 (M 1,9; R 0,5-10,6) 4,0	7706	AEMPQNYRP	B*45	
164	serine hydroxymethyltransferase 1 (soluble) (SHMT1) 0/13 (M 0,2; R 0,0-0,6) 0,3	6470	EENARLFHP	B*45	
165	NADPH oxidase 4 (NOX4) 0/13 (M 0,2; R 0,1-0,8) 0,0	50507	FLMITASTYA	B*45	
166	transmembrane trafficking protein (TMP21) 0/13 (M 0,7; R 0,3-1,4) 0,7	10972	LLGPRLVLA	B*45	
167	Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor) (HIF1A) 2/13 (M 1,7; R 0,8-5,3) 1,4	3091	MEDIKILIA	B*45	sT
168	UDP-glucuronate decarboxylase 1 (UXS1) 0/13 (M 0,5; R 0,4-0,9) 1,6	80146	QEGVEVRVA	B*45	
169	asparagine-linked glycosylation 8 homolog (yeast, alpha-1,3-glucosyltransferase) (ALG8) 0/13 (M 0,8; R 0,3-1,0) 1,6	79053	FLDPNNIPKA	B*45	
170	FLJ40142 protein (FLJ40142) no probeset	400073	GILCLQAHS	B*45	
171	Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein [Homo sapiens] no probeset	gij54695638	MEEHLEEP	B*45	
172	phosphate regulating endopeptidase homolog, X-linked (hypophosphatemia, vitamin D resistant rickets) (PHEX) 0/13 (M 0,9; R 0,1-1,4) 0,2	5251	VLQTRKYLA	B*45	
173	multiple inositol polyphosphate phosphatase [Homo sapiens]	n.a.	ALLSSLARC	n.a.	

	no probeset			
174	myosin IF (MYO1F) 12/13 (M 6,1; R 2,1-14,9) 0,2	4542	KYIMGYIS	n.a.
175	mitogen-activated protein kinase 14 (MAPK14) 0/14 (M 1,1; R 0,7-1,5) 1,2	1432	LAVDLLEK	n.a.
176	hydrocephalus inducing (HYDIN) 7/13 (M 3,0; R 0,2-7,5) 0,5	54768	PSEFLKEMS	n.a.
177	BCL2-associated X protein (BAX) 4/13 (M 2,8; R 0,5-5,7) 2,8	581	QGMIAAVDTD	n.a.
178	nuclear RNase III Drosha (RNASE3L) 0/13 (M 1,2; R 0,7-1,5) 3,3	29102	SIMQLVATE	n.a.
179	testis specific, 10 interacting protein (TSGA10IP) no Probeset	254187	SLGAEAAER	n.a.
180	F-box and leucine-rich repeat protein 16 (FBXL16) no Probeset	146330	SLRLLSLAG	n.a.

3.3.3. Tumorassoziierte Peptide auf der Zelllinie RCC68CL

Neben Selbstpeptiden aus bekannten Quellproteinen konnten im Zuge der Analyse von RCC68CL auch mehrere HLA-Liganden gewonnen werden, für die aufgrund ihres Genexpressionsprofils oder aufgrund der Literatur eine Tumorassoziation postuliert werden darf. So konnte aus dem *ribosomal protein 10A* (RPL10A; Entrez Gene ID: 4736) das auf HLA-A*02 präsentierte Peptid TLYEAVREV sequenziert werden. Dieses Peptid ist aus der Literatur als Epitop zytotoxischer T-Zellen bekannt, die in entsprechenden Tests Tumorzellen zu lysieren vermochten (204). Die Expressionsdaten für RPL10A aus der Zelllinie und aus dem soliden Tumor RCC68 zeigen jedoch keinerlei veränderte Expression gegenüber dem zugehörigen Normalgewebe. Auch in keinem anderen soliden Tumor konnte eine Überexpression nachgewiesen werden. Zwei HLA-Liganden wurden in der Probe RCC68CL identifiziert, die aus in Nierenzellkarzinomen konstitutiv überexprimierten Genprodukten stammen, nämlich aus dem *eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6* und aus dem *fatty acid binding protein 7*.

Der *eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6* (EIF3S6; Entrez Gene ID: 3646) (Alias: *mammary tumor-associated protein INT6*) wurde zunächst als Faktor der Pathogenese des Mamma-CAs in der Maus identifiziert (53). Weitere Studien implizieren, dass in humanen Tumoren verschiedenster Ursprungsgewebe häufig eine veränderte, dysregulierte Expression des Genprodukts gefunden werden kann (50;247;263;432). Die meisten der hier genannten Quellen sprechen allerdings für eine Korrelation zwischen erniedrigter EIF3S6 (INT6) Expression und aggressiverem Tumorwachstum. In

unseren Expressionsanalysen zeigte sich EIF3S6 mit einer medianen relativen Expression von 4,6 gegenüber dem Normalgewebe in allen 13 Nierenzellkarzinomproben relevant (>3-fach) überexprimiert, in der Zelllinie RCC68CL wurde eine relative Expression von 7,5, im soliden Tumor RCC68sT eine relative Überexpression von 4,9 gefunden. Das Peptid MCPHILRY sowie seine längere Variante TMCPHILRY konnten im Zuge der Analyse der RCC68-Zelllinie identifiziert werden. Beide Peptide werden entweder auf HLA-A*29 oder HLA-B*15 präsentiert. Eine ausschließliche Zuordnung zu einem dieser HLA-Allotypen ist zurzeit nicht möglich. Das Peptid TMCPHILRY wurde auch in zwei Proben der akuten myeloischen Leukämie, AML03 und AML04 gefunden und wird in diesem speziellen Zusammenhang in Kapitel 3.5.4. besprochen.

Ähnliches gilt für das *fatty acid binding protein 7* (FABP7; Entrez Gene ID: 2173). Dieses wurde bereits im Zuge der Analyse der soliden Nierenzellkarzinome als ein Protein identifiziert, das in einigen Proben stark überexprimiert war, jedoch war es nicht möglich aus soliden Tumoren Peptide dieses Proteins zu identifizieren (siehe Kapitel 3.1.4.). FABP7 wurde in 6 von 13 Tumoren als relevant überexprimiert gefunden, mit Ausnahme des als immunprivilegiert geltenden Hirns (relative Expression: 9,2) zeigte kein weiteres der Normalgewebe eine relevante Expression des Genprodukts. Die Tumoren mit den höchsten relativen Expressionswerten von FABP7 waren RCC119 (256 fach), RCC130 (90,5 fach) und RCC103 (59,7 fach). Der solide Tumor RCC68sT zeigte eine relative Expression von 13,0 (siehe Abbildung 12). Im Gegensatz hierzu war die in der Zelllinie RCC68CL gemessene relative Expression des Genproduktes mit 0,2 verschwindend gering. Trotzdem gelang es aus besagter Zelllinie mit dem HLA-B*45-Peptid LDGDKLVHI erstmals einen HLA-Liganden aus FABP7 zu sequenzieren. FABP7 wurde kürzlich von anderen Arbeitsgruppen als Tumorantigen im malignen Melanom identifiziert (137). Ähnliches gilt fürs Glioblastom (228;229) und verschiedene andere Tumoren.

Neben den genannten Proteinen konnten 3 Genprodukte als Quellen von Peptiden in RCC68CL identifiziert werden, die ganz ähnliche Expressionsmuster zeigten, nämlich das *kinetochore associated 2 Protein*, das

cell transforming sequence 2 oncogene sowie das *coiled-coil domain containing 99 Protein*. Für all diese Genprodukte gilt, dass sie im soliden Tumor RCC68sT als stark überexprimiert gemessen wurden, die Expression in der Zelllinie RCC68CL jedoch noch deutlich höher war. Des Weiteren fanden sich für diese Genprodukte auch Überexpressionen in anderen soliden Tumoren, auch wenn diese numerisch deutlich geringer ausfielen. Für alle 3 Genprodukte konnten in den Normalgeweben keine relevanten Expressionen festgestellt werden, die jeweils mit Abstand höchsten Expressionswerte innerhalb der Normalgewebe zeigten sich im immunprivilegierten Hoden. Die Expressionsmuster dieser Proteine sind in Abbildung 19 dargestellt.

Das *kinetochore associated 2 Protein* (KNTC2; Entrez Gene ID: 10403; alias: highly expressed in cancer; Hec1) zeigte sich in den Expressionsanalysen in 12 von 13 getesteten Tumoren über den Faktor 3 überexprimiert. Dabei zeigte der solide Tumor RCC68sT mit 128 facher Überexpression gegenüber dem Normalgewebe Niere die weitaus höchsten Werte unter den soliden Tumoren, gefolgt von RCC116 (32 fach) und RCC119 (24,3 fach). Die höchsten Expressionswerte in Normalgeweben finden sich, wie oben bereits erwähnt, im Hoden (42,2 fach) sowie im Hirn (13,0 fach). Die Tumorzelllinie RCC68CL hingegen zeigte mit 337,8 facher relativer KNTC2-Expression fast doppelt so hohe Werte wie der korrespondierende Tumor (siehe Abbildung 19). Das auf HLA-A*02 präsentierte Peptid GLNEEIARV konnte aus KNTC2 sequenziert werden. In der Literatur wurde für KNTC2 bereits eine Tumorassoziation impliziert und die hohe Expression dieses Genprodukts bereits als Prognosefaktor im Prostatakarzinom und anderen Tumoren vorgeschlagen (129). Ebenso wurde das KNTC2-Gen als molekularer Ansatzpunkt experimenteller gentherapeutischer Therapieansätze diskutiert (148).

Ein ganz ähnliches Expressionsmuster wie KNTC2 bot das *epithelial cell transforming sequence 2 oncogene* (ECT2; Entrez Gene ID: 1894). Dieses zeigte sich in 9 von 13 Tumoren über den Faktor 3 gegenüber dem Normalgewebe Niere überexprimiert.

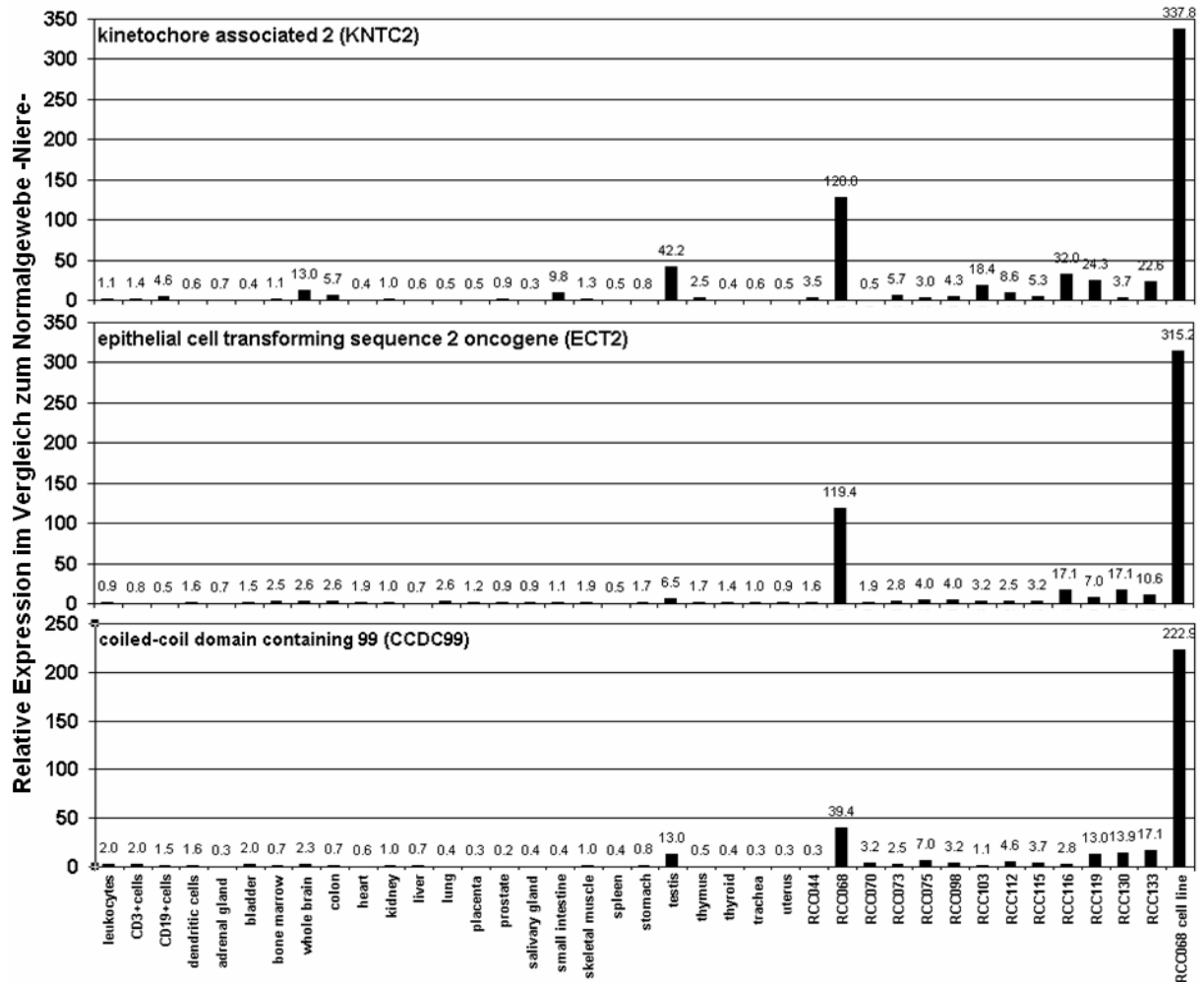


Abbildung 19: Relative Expressionswerte in der Zelllinie RCC68CL, den analysierten soliden Tumoren und in verschiedenen Normalgeweben im Vergleich zum Normalgewebe "Niere". Für alle dargestellten Genprodukte gilt, dass sie im soliden Tumor RCC68sT als stark überexprimiert gemessen wurden, die Expression in der Zelllinie RCC68CL jedoch noch deutlich höher war. In den Normalgeweben konnten keine relevanten Expressionen festgestellt werden, die jeweils mit Abstand höchsten Expressionswerte innerhalb der Normalgewebe zeigten sich im immunprivilegierten Hoden.

Wieder war die mit Abstand höchste relative Expression in RCC68sT zu messen, ebenfalls relativ hohe Expressionswerte zeigten sich mit jeweils 17,1 facher Expression in RCC116 und RCC130. Die einzige relevante Expression von ECT2 in Normalgeweben konnte im Hoden gemessen werden. Die höchste Expression von ECT2 (315,2 fach) fand sich in der Zelllinie RCC68CL, die ECT2 damit nahezu doppelt so hoch exprimierte wie der solide Tumor RCC68sT. Aus ECT2 konnte das HLA-B*15-präsentierte Peptid SIGDIFLKY sequenziert werden.

Auch das *coiled-coil domain containing 99 Protein* (CCDC99; Entrez Gene ID: 54908), fand sich in der Zelllinie mit einem Faktor von 222,9 massiv gegenüber dem Normalgewebe Niere überexprimiert. Eine relevante Überexpression konnte für dieses Genprodukt in 9 von 13 soliden Tumoren gemessen werden, wobei wiederum RCC68sT die höchsten Werte unter den soliden Tumoren aufwies. Das HLA-A*02-Peptid FANERCLQL konnte aus CCDC99 sequenziert werden.

Wie in der Einleitung (Kap 1.2.3) dargelegt spielt die Hochregulation des *hypoxia-inducible factor* (HIF) in der Folge der VHL-Mutation eine zentrale Rolle in der Pathogenese des Nierenzellkarzinoms. Wie schon bei der Analyse der soliden Nierenzellkarzinome, konnte auch in der Zelllinie RCC68CL ein Peptid aus einem Protein identifiziert werden, das mit der Signalkaskade um den *hypoxia inducible Factor 1 α* interferiert. Das *egl nine homolog 3* (*C. elegans*) (EGLN3; Entrez Gene ID: 112399; Alias: PHD3) ist in substantieller Weise beteiligt am sauerstoffabhängigen hydrolytischen Abbau von HIF1 α unter normoxischen Bedingungen (10;11). Weiter wurde in einer breit angelegten Genexpressionsstudie eine konstitutiv hohe Expression von EGLN3 in Nierenzellkarzinomen gezeigt (5). Unsere eigenen Expressionsdaten zeigten eine eher mäßige Überexpression des genannten Genprodukts, relevante Überexpressionen gegenüber dem Normalgewebe Niere konnten in nur 7 von 13 soliden Tumoren gefunden werden. Unter den soliden Tumoren wurden die höchsten relativen Expressionen in RCC68sT (17,1 fach) sowie in RCC119 (12,1 fach) und RCC73 (9,2 fach) gefunden, die relative Expression in der Zelllinie RCC68CL nahm sich mit 1,5 deutlich geringer aus. Massenspektrometrisch konnte aus EGLN3 der HLA-A*02-Ligand YIVPCLHEV sequenziert werden.

Auch aus dem *hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit* (HIF1A; Entrez Gene ID: 3091) selbst konnte ein Peptid, MEDIKILIA, präsentiert auf HLA-B*45 auf RCC68CL, identifiziert werden. Unsere Genexpressionsanalyse erbrachte weder für die soliden Tumoren noch für die Zelllinie RCC68CL eine Überexpression auf Transkriptionsebene. Da die Konzentration von HIF1 α in der Zelle jedoch hauptsächlich über seine Degradation gesteuert wird (siehe

Kapitel 1.2.3.) ist die Genexpressionsanalyse auf Transkriptionsebene in diesem Falle sicherlich als ein insuffizientes Werkzeug zur Bestimmung der intrazellulären Konzentration des Proteins zu werten, und so muss die Frage nach einer hohen Präsenz von HIF1 α in den analysierten Proben unbeantwortet bleiben.

3.4. T-Zell-Studien mit RCC68-Peptiden

Alle in diesem Kapitel dargestellten Arbeiten wurden ausschließlich durch den Verfasser dieser Arbeit durchgeführt.

Die Frage nach der Immunogenität eines Peptids, nach seiner Wirksamkeit als tumorassoziiertes T-Zellepitop lässt sich *in vitro* in letzter Konsequenz nur in T-Zellstimulationsversuchen klären.

Für verschiedene in dieser Arbeit vorgestellte Peptide ergab sich aufgrund der Genexpressionsanalysen, aber auch aufgrund der Literatur der Verdacht auf eine Tumorassoziation, für einige der gezeigten Peptide konnten andere Arbeitsgruppen den Nachweis einer Tumorassoziation bereits erbringen, so zum Beispiel für die Peptide aus dem *MET-Protoonkogen* (343) und aus *Adipophilin* (351).

Nach der Peptid- und Genexpressionsanalyse der Nierenzellkarzinomzelllinie RCC68CL (siehe 3.3.) ergab sich für uns erstmals die Möglichkeit die Immunogenität von HLA-Liganden nachzuweisen, die durch diese Zelllinie präsentiert werden. Hierzu wurden T-Zellen gegen diese Peptide gesucht und stimuliert. Ein positiver Ausgang dieser T-Zellstimulationsversuche hätte uns die Perspektive eröffnet die zytolytische Aktivität der epitopspezifischen T-Zellen gegen die Zelllinie RCC68CL *in vitro* nachzuweisen.

Das prinzipielle experimentelle Vorgehen zur Erbringung eines solchen Nachweises ist in Abbildung 20 dargestellt.

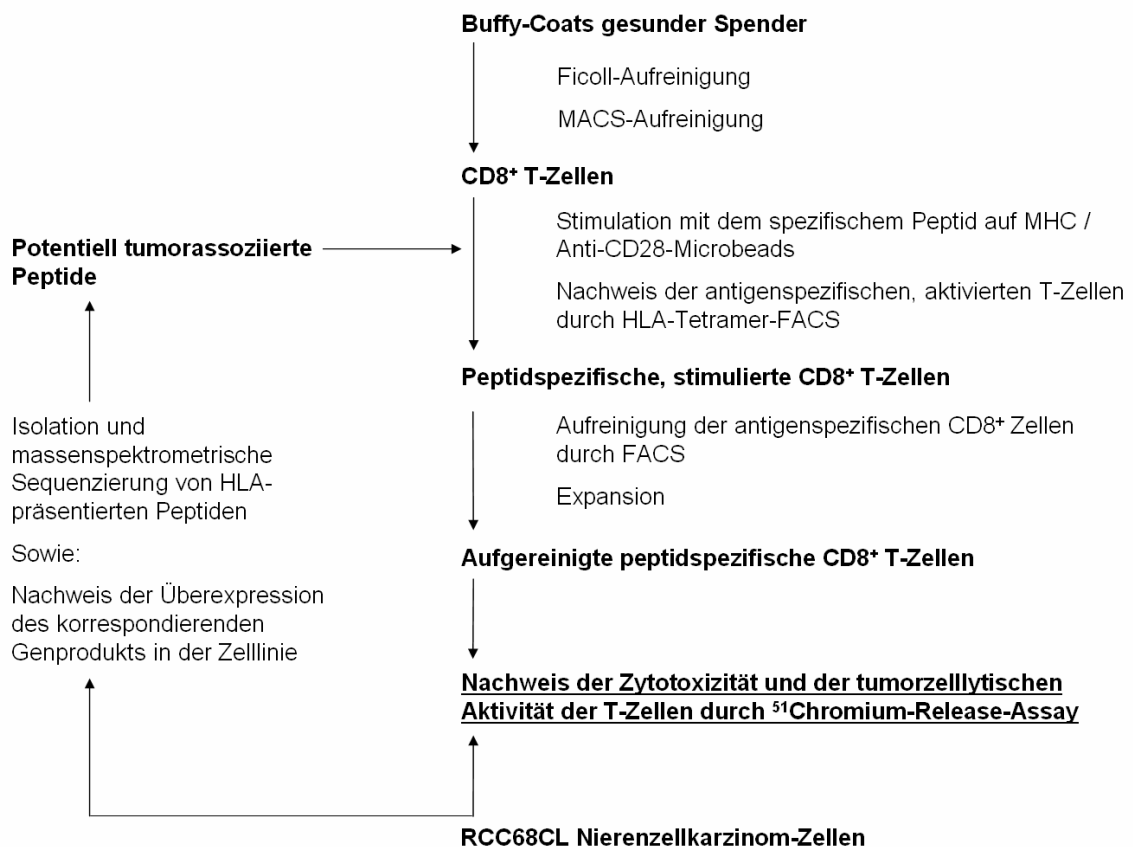


Abbildung 20: Prinzipielles methodisches Vorgehen zur Erbringung des Nachweises der Immunogenität eines massenspektrometrisch sequenzierten HLA-Liganden. Methodisch wurde in dieser Arbeit lediglich die Aufreinigung CD8⁺ T-Zellen, die Stimulation von T-Zellen mit spezifischem Peptid auf MHC/anti-CD28-Microbeads sowie die FACS-Analyse mit Peptid:HLA-Tetrameren durchgeführt.

Methodisch wurde in dieser Arbeit die Aufreinigung CD8⁺ T-Zellen, die Stimulation von T-Zellen mit spezifischem Peptid auf MHC/anti-CD28-Microbeads sowie die FACS-Analyse mit Peptid:HLA-Tetrameren durchgeführt. Dementsprechend sind auch nur diese Arbeitsgänge im Kapitel *Material und Methoden* beschrieben. Ein aus der Literatur bekanntes T-Zellepitop, das HLA-A*02-präsentierte Peptid TLYEAVREV (204) war in der Zelllinie RCC68CL massenspektrometrisch identifiziert worden. Daneben konnte für eine Reihe von neu identifizierten Peptiden aufgrund der Genexpression ihrer Quellproteine oder aufgrund der Literatur eine Tumorassoziation postuliert werden (siehe Kap. 3.3.3).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene Peptide, die in der Zelllinie RCC68 gefunden wurden, in T-Zellstimulationsversuchen auf ihre Immunogenität getestet.:

1. das HLA-A*02-präsentierte Peptid GLNEEIARV aus KNTC2 (Entrez Gene ID: 10403), einem Genprodukt, das in den Nierenzellkarzinomen massiv überexprimiert war (siehe Kapitel 3.3.3.)
2. das HLA-A*02-präsentierte Peptid YIVPCLHEV aus EGLN3 (Entrez Gene ID: 112399), das in der Literatur (5) sowie in unseren eigenen Genexpressionsdaten eine deutliche Überexpression im Nierenzellkarzinom zeigt (siehe Kapitel 3.3.3.)
3. sowie das HLA-B*15-präsentierte Peptid TMCPHILRY, das sowohl in der Zelllinie RCC68CL als auch in zwei AML-Proben identifiziert wurde. Dieses Peptid entstammt dem Protein EIF3S6 (Entrez Gene ID: 3646), das mit der Pathogenese verschiedener Neoplasien in Verbindung gebracht wurde (siehe Kapitel 3.3.3.).

All diese Peptide und ihre Quellproteine wurden in den genannten Kapiteln besprochen, auf eine detaillierte Darstellung soll also an dieser Stelle verzichtet werden. Als Positivkontrollen in den T-Zellstimulationsversuchen wurden je nach HLA-Typisierung des Leukozyten-Spenders verschiedene bekanntermaßen immunogene Peptide verwendet: T-Zellen von HLA-A*02-positiven Spendern wurden mit einem modifizierten Peptid aus Melan-A (Entrez Gene ID: 2315), ELAGIGILTV (191;192;411;412) stimuliert. Ebenso als Positivkontrollen dienten Peptide aus dem Zytomegalievirus (CMV), das CMV pp65-Peptid NLVPMVATV (HLA-A*02) (442), das CMV pp65-Peptid YSEHPTFTSQY (HLA-A*01) (442) sowie das CMV pp50-Peptid VTEHDTLLY (HLA-A*01) (96). Bei all diesen Peptiden handelt es sich um Epitope, gegen die sich in praktisch allen gesunden Spendern eines definierten HLA-Typs T-Zellen finden lassen: Insgesamt wurden CD8⁺ T-Zellen von 9 verschiedenen gesunden Spendern auf ihre Reaktivität gegen die genannten Peptide getestet, viermal wurden T-Zellen aus Buffy-Coats, viermal aus Leukaphereseprodukten verwendet. Diese Leukozytenkonzentrate wurden jeweils vom transfusionsmedizinischen Institut der Universität Tübingen bereitgestellt.

Tabelle 20: Liste der Spender CD8⁺ T-Zellen und Peptide, mit denen diese Zellen jeweils stimuliert wurden.

<i>Spender</i>	<i>Ausgangsmaterial</i>	<i>HLA-Typisierung</i>	<i>CMV Status</i>	<i>Testpeptide (HLA-Restriktion)</i>	<i>Kontrollpeptide (HLA-Restriktion)</i>
1	Buffy-Coat	A*02, A*03, B*52, B60, Cw3	+	- KNTC2: GLNEEIARV (A*02)	- Melan-A: ELAGIGILTV (A*02) - CMV pp65: NLVPMVATV (A*02)
2	Vollblut	A*02	-	- KNTC2: GLNEEIARV (A*02)	- Melan-A: ELAGIGILTV (A*02)
3	Buffy-Coat	A*01, A*30, B*08, B*15, Cw7, Cw3	+	- EIF3S6: TMCPHILRY (B*15)	- CMV pp50: VTEHDLLY (A*01) - CMV pp65: YSEHPTFTSQY (A*01)
4	Buffy-Coat	A*02, B*07, B*44, Cw5, Cw7	+	- KNTC2: GLNEEIARV (A*02)	- Melan-A: ELAGIGILTV (A*02) - CMV pp65: NLVPMVATV (A*02)
5	Buffy-Coat	A*32, A*33, B*41, B*15, Cw3	-	- EIF3S6: TMCPHILRY (B*15)	/
6	Leukapherese	A*01, A*02, B*15, Cw3	+	- EGLN3: YIVPCLHEV (A*02) - EIF3S6: TMCPHILRY (B*15)	- Melan-A: ELAGIGILTV (A*02) - CMV pp65: NLVPMVATV (A*02) - CMV pp50: VTEHDLLY (A*01) - CMV pp65: YSEHPTFTSQY (A*01)
7	Leukapherese	A*02, B*44	+	- KNTC2: GLNEEIARV (A*02) - EGLN3: YIVPCLHEV (A*02)	- Melan-A: ELAGIGILTV (A*02) - CMV pp65: NLVPMVATV (A*02)
8	Leukapherese	A*02, B*07, B*44, Cw2, Cw7	+	- KNTC2: GLNEEIARV (A*02) - EGLN3: YIVPCLHEV (A*02)	- Melan-A: ELAGIGILTV (A*02) - CMV pp65: NLVPMVATV (A*02)
9	Leukapherese	A*02, A*03, B*15, Cw3, Cw5	+	- KNTC2: GLNEEIARV (A*02) - EGLN3: YIVPCLHEV (A*02) - EIF3S6: TMCPHILRY (B*15)	- Melan-A: ELAGIGILTV (A*02) - CMV pp65: NLVPMVATV (A*02) - CMV pp50: VTEHDLLY (A*01) - CMV pp65: YSEHPTFTSQY (A*01)

Einmal wurde peripheres Venenblut eines gesunden Spenders verwendet. Die HLA-Typisierungen und der CMV-Status der Spender sowie die Peptide, mit denen jeweils stimuliert wurde, sind in Tabelle 20 dargestellt. Die Präparation der T-Zellen, die über die Schritte einer Ficoll-Gradientenzentrifugation und die MACS-Aufreinigung erfolgte, erbrachte im Falle der Buffy-Coats jeweils Ausbeuten von ca. $90 \cdot 10^6$ CD8⁺ Zellen, im Falle der Leukaphereseprodukte war die Ausbeute mit durchschnittlich $260 \cdot 10^6$ CD8⁺ Zellen ungefähr dreimal so hoch.

In allen neun Versuchsansätzen konnten kultivierbare CD8⁺ Zellen gewonnen werden. Die Zellen wurden in allen Fällen über 5 Wochen angezüchtet und mit den genannten Peptiden auf MHC/anti-CD28-Microbeads stimuliert.

Die Detektion epitopspezifischer CD8⁺ T-Zellen erfolgte durchflusszytometrisch mittels der Tetramer-/anti-CD8-Färbung. In allen neun Versuchsansätzen konnten nach der fünfwöchigen Phase der Stimulation und Kultivierung lebende CD8⁺ Zellen im FACS nachgewiesen werden. Jedoch erbrachten die Positivkontrollen, CD8⁺ Zellen die mit dem Melan-A Peptid oder mit den entsprechenden CMV Peptiden stimuliert wurden, keinen eindeutigen Nachweis epitopspezifischer Zellen, sie waren also negativ, sodass sich eine weitere Interpretation der Messungen streng genommen verbietet. In der Analyse der Tumorpeptide aus KNTC2, EGLN3 und EIF3S6 konnten ebenfalls keine Hinweise auf epitopspezifischen T-Zellen generiert werden. Leider gelang es uns in der gezeigten Versuchsreihe also nicht schlüssige Ergebnisse zu generieren und epitopspezifische T-Zellen nachzuweisen.

Abbildung 21 und Abbildung 22 zeigen exemplarisch die Ergebnisse der Tetramer- und anti-CD8-Färbungen nach fünfwöchiger Stimulation der T-Zellen. Beispielhaft für alle anderen getesteten Spender sollen in diesen Abbildungen die aus der Analyse der Spender 6 und 8 gewonnenen Daten dargestellt werden. Die *ex vivo*-Färbungen entstanden jeweils kurz nach der Aufreinigung der T-Zellen, also ohne Kultur und Stimulation. Alle anderen in den Abbildungen 21 und 22 gezeigten *dot-blots* spiegeln die Situation nach fünfwöchiger Kultur und Stimulation wider:

Durch die MACS-Aufreinigung konnten CD8⁺ T-Zellen mit hohem Reinheitsgrad gewonnen werden (Abbildung 21a; d und Abbildung 22a-d). Nach fünfwöchiger Stimulation mit MHC/Anti-CD28-Microbeads waren in allen Ansätzen lebende CD8⁺ Zellen nachweisbar. Für die Positivkontrollen Melan-A, HLA-A*02 (Abbildung 21c und Abbildung 22e), CMV pp65, HLA-A*02 (Abbildung 21e und Abbildung 22f) sowie CMV pp50, HLA-A*01 (Abbildung 21j) wurden jedoch niemals spezifische CD8⁺ Zellen nachgewiesen.

In Kulturen die mit dem CMV pp65 HLA-A*02 Peptid stimuliert worden waren, wurden nach Ablauf der fünfwöchiger Kultur nicht mehr CMV pp65 spezifische T-Zellen nachgewiesen (Abbildung 21e), als in Ansätzen, die mit einem anderen Peptid, z.B. Melan-A HLA-A*02 stimuliert worden waren (Abbildung 21f). Das gleiche gilt für Ansätze welche mit dem Melan-A HLA-A*02 Peptid stimuliert worden waren (Abbildung 21c), in ihnen waren nicht mehr Melan-A spezifische T-Zellen detektierbar als in Kulturen die mit dem CMV pp65 HLA-A*02 Peptid stimuliert waren (Abbildung 21b). Einzig für die Positivkontrolle CMV pp65, HLA-A*01 konnte im Falle von Spender 6 ein positives Signal detektiert werden (Abbildung 21h). Hierbei ist allerdings ungeklärt ob es sich tatsächlich um einen epitopspezifischen CD8⁺ Zellklon oder aber um ein Artefakt handelt. Auch wurden keine epitopspezifischen T-Zellen gegen die getesteten Peptide aus EIF3S6 (Abbildung 21i, l) und KNTC2 (Abbildung 22h) nachgewiesen. Das Tetramer des EGLN3 Peptids band in den FACS Analysen zwar sehr deutlich an CD8⁺ Zellen, und zwar auch nur an diese (Abbildung 21k und Abbildung 22i), jedoch war diese Bindung auch in *ex vivo*-Färbungen nachzuweisen (Abbildung 22d). Somit muss davon ausgegangen werden, dass es sich um ein Artefakt aufgrund unspezifischer Bindung des EGLN3-Tetramers, und nicht etwa um die Präsenz EGLN3-spezifischer T-Zellen handelt.

Spender 6

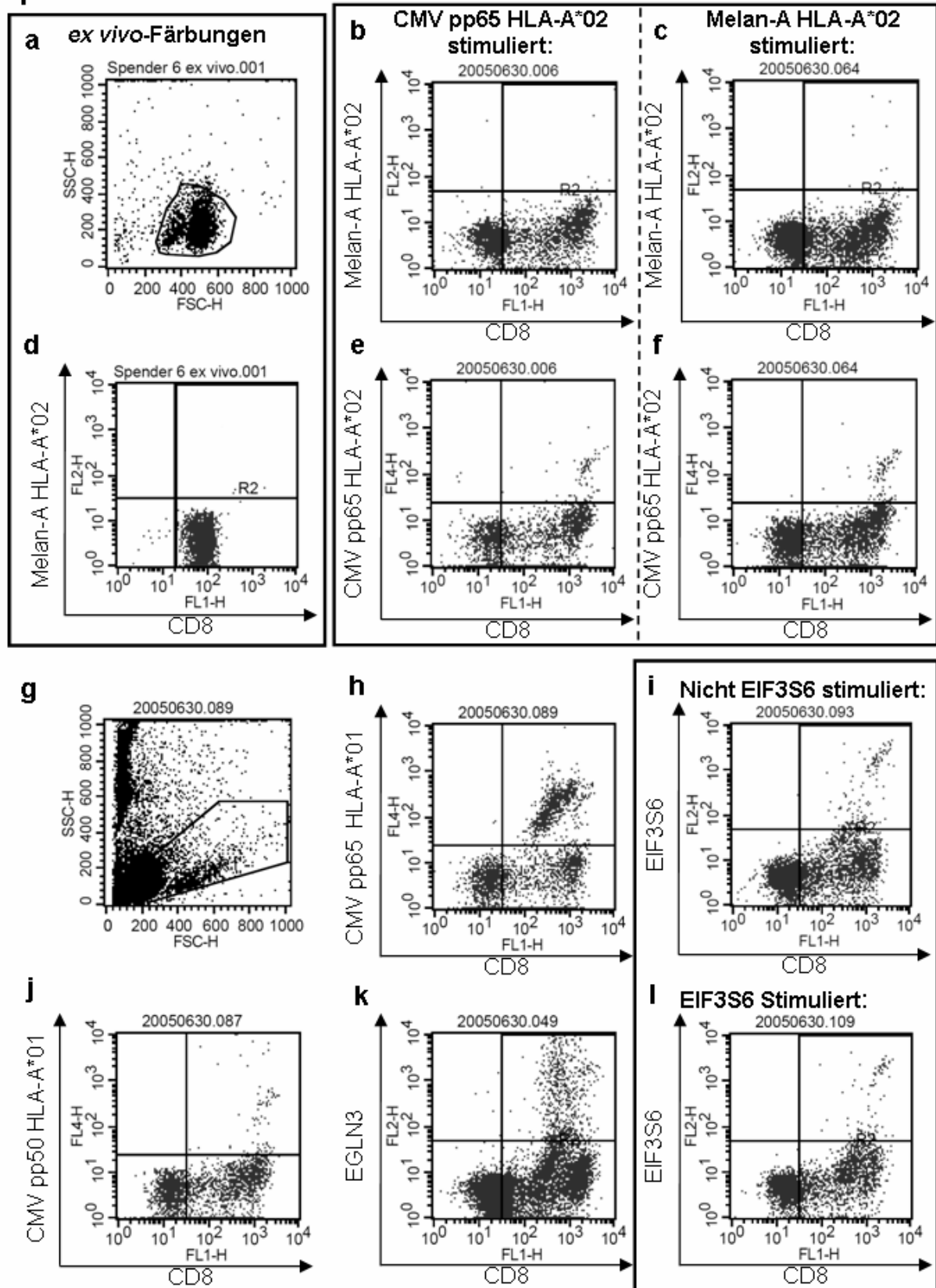


Abbildung 21: Durchflusszytometrische Analyse des Spenders 6. Detaillierte Beschreibung siehe Text.

Spender 8

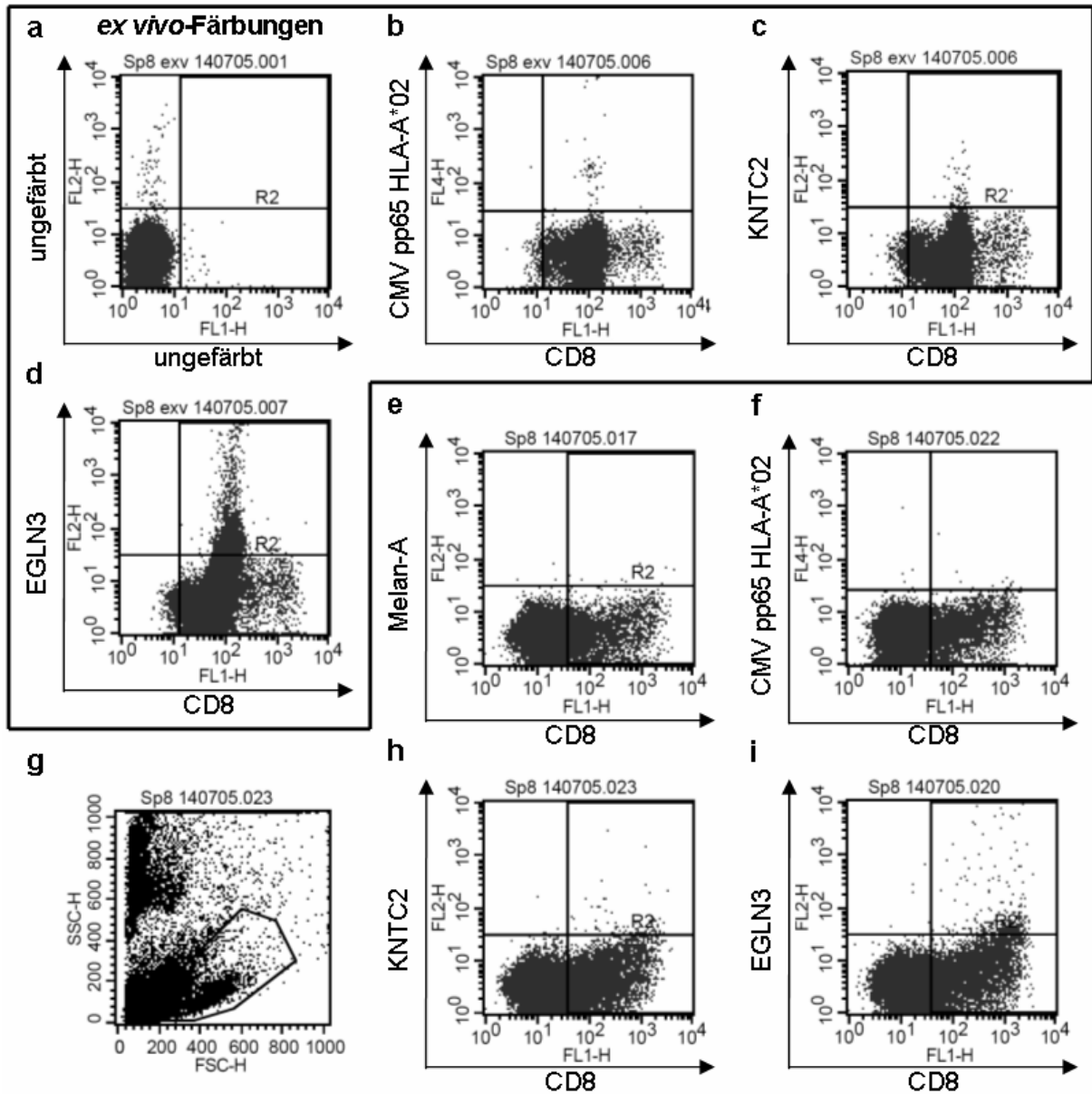


Abbildung 22: Durchflusszytometrische Analyse des Spenders 8. Detaillierte Beschreibung siehe Text.

Die Gründe für das Fehlschlagen der Versuchsreihe sind vielfältig, sie reichen von Problemen in der Synthese und Handhabung der Peptide und der Microbeads über Fehler in der Herstellung und Verwendung der Tetramere bis hin zu ungelösten Problemen in der Kultivierung der CD8⁺ T-Zellen.

Vor dem Hintergrund der Fülle der Fehlermöglichkeiten wurde auf eine weiterführende Evaluation des Versuchsprotokolls im Rahmen der vorliegenden Arbeit verzichtet.

3.5. Analyse des HLA-Ligandoms akuter myeloischer Leukämien inv(16)

3.5.1. Einführung und Übersicht über den Datensatz

Alle in diesem Kapitel dargestellten Arbeiten wurden ausschließlich durch den Verfasser dieser Arbeit durchgeführt.

Die Peptid- und Genexpressionsanalyse der akuten myeloischen Leukämie (inv(16)) erfolgte im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Dr. André Banat, *Abteilung für Innere Medizin IV, Abteilung für Hämatologie, internistische Onkologie und Hämostaseologie* der Universitätsklinik Gießen (Justus-Liebig-Universität, Gießen).

Zielsetzung der Zusammenarbeit war die Identifikation HLA-präsentierter Peptide aus dem für die AMLinv(16) charakteristischen Fusionsprotein CBF β -MYH11 sowie die möglichst umfassende Charakterisierung des durch die AML-Zellen präsentierten HLA-Ligandoms.

Durch die Arbeitsgruppe um Dr. André Banat wurden AML-Blasten aus peripherem Blut oder aus Knochenmark isoliert. Nach der Isolation erfolgte die Etablierung von stabilen primären AML-Blast-Zelllinien, sowie die Expansion dieser Zelllinien. Ebenso wurde zur Subtypisierung der Leukämiezellen die Inversion 16 nachgewiesen. All diese Arbeitsschritte erfolgten durch die Arbeitsgruppe um Dr. Banat.

Die Isolierung der Peptide, die massenspektrometrische Sequenzierung sowie die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte durch den Verfasser dieser Arbeit.

Vier Proben, AML01 bis AML04, lagen zur Analyse vor, jede Probe hatte einen Umfang von 30g Zellpellet. Die HLA-Typisierungen der Zellen sind Tabelle 21 zu entnehmen.

Tabelle 21: HLA-Typisierungen der analysierten AML-Zelllinien.

Probe	HLA-Typisierung
AML01	A*01; A*26; B*08; B*14; Cw*07; Cw*08
AML02	A*02; A*03; B*62; B*60; CW*09
AML03	A*03; A*32; B*35; Cw*04
AML04	A*03; A*32; B*38; B*56; Cw*01

Alle Proben wurden wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet. Die HLA-Ausbeute wurde anhand eines Immunoblots gegen β_2 -Mikroglobulin aus dem Lysat der Zellen sowie aus den Eluaten der Affinitätschromatographie näherungsweise bestimmt (Abbildung 23).

Durch durchflusszytometrische Analysen der Arbeitsgruppe um Dr. Banat hatte sich bereits angedeutet, dass die Zellen der Probe AML02 nur eine kaum messbare HLA-Expression zeigten, wohingegen die Proben AML01, AML03 und AML04 durch eine starke HLA-Expression charakterisiert waren. Dieser Sachverhalt bestätigte sich in unseren β_2 -Mikroglobulin Bestimmungen (Abbildung 23), aus AML02 konnte keine nennenswerte Menge HLA gewonnen werden.

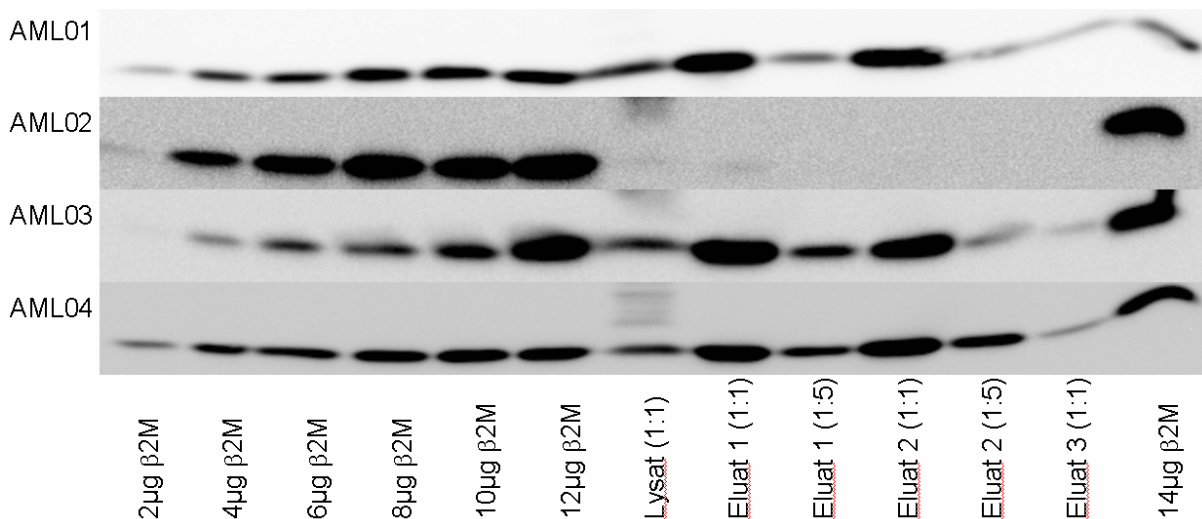


Abbildung 23: Westernblot gegen β_2 -Mikroglobulin: Näherungsweise Bestimmung der HLA-Ausbeute in den Präparationen der AML-Zelllinien

Aus diesem Grunde wurde auf eine weitere massenspektrometrische Analyse der Probe AML02 verzichtet, Peptide wurden im Weiteren nur aus den Proben AML01, AML03 und AML04 sequenziert. Die Zuordnung der in den AML Proben gefundenen Peptide zu den sie präsentierenden HLA-Allelen war nicht immer problemlos und einwandfrei möglich. Zur Bestimmung der HLA-Restriktion wurden die Matrices der Peptid-Datenbank „SYFPEITHI“ (www.syfpeithi.de) verwendet. Diese Matrices sind in Tabelle 22 wiedergegeben. Aminosäuren die der Verankerung des Peptids im HLA-Molekül dienen („*anchor-residues*“) sind fett gedruckt, Aminosäuren die sich gehäuft an entsprechenden Positionen innerhalb des Peptids finden sind im Normaldruck wiedergegeben.

Zum einen waren die Peptidbindungsmuster der einzelnen HLA-Allele untereinander zum Teil recht ähnlich, so dass es schwer fiel HLA-A*03 gebundene Peptide von HLA-B*35 oder HLA-B*38 gebundenen Peptiden sicher zu unterscheiden, zum anderen war das Peptidbindungsmuster von HLA-A*32 nicht sicher bekannt.

Um möglichst viele Peptide eindeutig zumindest HLA-A*03 zuzuordnen, wurde nach einer ersten Analyse aller drei AML-Proben, die Zelllinie AML03 nochmals expandiert und aufgearbeitet, um eine zweite Affinitätschromatographie mit dem HLA-A*03-spezifischen Antikörper GAP A3 durchzuführen. Die mit dem Antikörper GAP A3 aufgereinigten Peptide wurden nochmals massenspektrometrisch sequenziert. In den Tabellen der folgenden Kapitel sind Peptide, die durch diese zweite Analyse eindeutig der Präsentation auf HLA-A*03 zugeordnet werden konnten durch einen fett gedrucktes und unterstrichenes „A03“ gekennzeichnet.

Tabelle 22 (folgende Seite): Matrices der Peptid-Datenbank „SYFPEITHI“ (www.syfpeithi.de), die zur Bestimmung der HLA-Restriktion der einzelnen Peptide verwendet wurden. Aminosäuren, die der Verankerung des Peptids im HLA-Molekül dienen („*anchor-residues*“) sind fett gedruckt, Aminosäuren, die sich gehäuft an entsprechenden Positionen innerhalb des Peptids finden sind im Normaldruck wiedergegeben.

AML01									
Position der Aminosäure	1	2	3	4	5	6	7	8	9
HLA-A*01		T S	D E				L		Y
HLA-A*26	E	V T I L F				I L V F Y			Y F M L
HLA-B*08			K		K R				L
HLA-B*14		R K	L Y F		R H	I L			L

AML03									
Position der Aminosäure	1	2	3	4	5	6	7	8	9
HLA-A*03		L V M	F Y			I M F V L	I L M F		K Y F
HLA-A*32		I							W
HLA-B*35		P							Y F M L I

AML04									
Position der Aminosäure	1	2	3	4	5	6	7	8	9
HLA-A*03		L V M	F Y			I M F V L	I L M F		K Y F
HLA-A*32		I							W
HLA-B*38		H	D E						F L
HLA-B*56	A	P	Y						A

Insgesamt konnten im Zuge der Analyse der 3 AML-Zelllinien 268 verschiedene Peptide sequenziert werden. In der Probe AML01 konnten 92, in AML03 98 sowie in AML04 120 Peptide definiert werden, wobei 40 Peptide in zwei oder mehr Proben gefunden wurden. 36 Peptide konnten sowohl in AML03 als auch in AML04 gefunden werden, womit die Redundanz zwischen diesen Proben unerwartet groß ausfiel. Die Redundanz zwischen AML01 und AML03 sowie zwischen AML01 und AML04 bestand jeweils aus einer Sequenz. Zwei Sequenzen wurden in allen drei Proben gefunden.

Zwei AML-Proben, AML03 und AML04 wurden einer Genexpressionsanalyse unterzogen. In der folgenden Darstellung werden, anders als bei den Nierenzellkarzinomen, Genexpressionsdaten nur für jene Quellproteine angegeben, die genauer besprochen werden, da uns eine umfassendere statistische Aufarbeitung aufgrund der wenigen Proben nicht gerechtfertigt erschien.

3.5.2. Versuch des molekularen Nachweises eines Peptids aus der Fusionssequenz von CBF β -MYH11

Wie in der Einleitung dargestellt, ist die charakteristische zytogenetische Abnormalität der AML M4eo die Inversion eines Abschnitts auf dem langen Arm des Chromosom 16 [inv(16)(p13q22)]. Bei dem Rearrangement der Inversion 16 ist der Transkriptionsfaktor *Core binding factor beta* (CBF β ; Entrez Gene ID: 865) auf dem langen Arm des Chromosoms 16 (Bande q22) mit dem Gen für die schwere Kette des *Myosins* glatter Muskelzellen (MYH11; Entrez Gene ID: 4629) auf dem kurzen Arm des Chromosoms 16 (Bande p23) verschmolzen (237), wobei sich das Fusionsprotein aus den ersten 165 Aminosäuren von CBF β und der endständigen Region von MYH11 zusammensetzt. Abbildung 24 stellt die Sequenz des Fusionsproteins CBF β -MYH11 dar. Peptide, die dieser Fusionsregion entstammen, sollten eine spezifische Erkennung der AML-Blasten durch das Immunsystem ermöglichen.

CBF β -MYH11 Fusionssequenz:

```

1  MPRVVPDQRS  KFENEEFFRK  LSRECEIKYT  GFRDRPHEER  QARFQNACRD  GRSEIAFVAT
61  GTNLSLQFFP  ASWQGEQRQT  PSREYVDLER  EAGKVYLKAP  MILNGVCVIW  KGWIDLQRLD
121  GMGCLFDEE  RAQQEDALAQ  QAFEEARRRT  REFEDRDRSH  REEMENVHEL  EKSKRALETQ
181  MEEMKTQLEE  LEDELQATED  AKLRLEVMQ  ALKGQFERDL  QARDEQNEEK  RRQLQRQLHE
241  YETELEDERK  QRALAAAANK  KLEGLDKLE  LQADSAIKGR  EEAIKQLRKL  QAQMKDFQRE
301  LEDARASRDE  IFATAKENEK  KAKSLEADLM  QLQEDLAAAE  RARKQADLEK  EELAEELASS
361  LSGRNALQDE  KRRLEARIAQ  LEEEELEEQG  NMEAMSDRVR  KATQQAEQLS  NELATERSTA
421  QKNESARQQL  ERQNKELRSK  LHEMEGAVKS  KFKSTIAALE  AKIAQLEEQV  EQEAREKQAA
481  TKSLKQKDKK  LKEILLQVED  ERKMAEQYKE  QAEKGNARVK  QLKROLEEAE  EESQRINANR
541  RKLQRELDEA  TESNEAMGRE  VNALKSKLRR  GNETSFVPSR  RSGGRRVIEN  ADGSEEETDT
601  RDADFNKTKA  SE

```

Abbildung 24: Sequenz des Fusionsproteins CBF β -MYH11. Die grau hinterlegte Region entspricht dem Fusionsort, N-terminal davon handelt es sich um den CBF β -, C-terminal davon um den MYH11-Anteil.

Um in unseren Analysen die höchstmögliche Sensitivität hinsichtlich der Erkennung von Peptiden aus der Fusionsregion zu erreichen wurde zunächst mit Hilfe der im Internet frei zugänglichen Software SYFPEITHI (www.syfpeithi.de) eine Vorhersage von theoretisch möglichen, die Fusionsregion umfassenden Peptiden für jedes auf den AML-Proben vorhandene HLA-Allel angefertigt. Tabelle 23 zeigt die vorhergesagten Peptide. Wie in der Zusammenschau der Tabelle 22 und Tabelle 23 deutlich wird, entsprechen die vorhergesagten Peptide nicht optimal den bekannten Bindungsmotiven der gegebenen HLA-Moleküle. Entsprechend niedrig sind auch die meisten der angegebenen SYFPEITHI-Scores, die durch einen Algorithmus der SYFPEITHI-Software errechnet wurden^a. Die vorhergesagten Sequenzen wurden zur Grundlage der Suche nach Peptiden aus der CBF β -MYH11-Fusionssequenz gemacht. Zum einen wurden einige der vorhergesagten Peptide anhand ihrer zuvor errechneten Massen in separaten LC/MS-Läufen mit hoher Sensitivität gesucht, zum anderen wurden die gezeigten theoretischen Sequenzen im Rahmen der manuellen Auswertung der gewonnenen Spektren berücksichtigt.

^a www.syfpeithi.de/Scripts/MHCServer.dll/Info.htm#scoreswww.syfpeithi.de

Tabelle 23: Theoretische Vorhersage von die Fusionsregion von CBF β -MYH11 umfassenden Peptiden für jedes auf den AML-Proben vorhandene HLA-Allel. Angefertigt unter Zuhilfenahme der Peptidatenbank SYFPEITHI.

HLA-Restriktion	Durch SYFPEITHI vorhergesagtes Peptid	SYFPEITHI-Score
HLA-A*01	HREEMENVH	9
	EMENVHELE	9
	REEMENVHE	8
HLA-A*03	MENVHELEK	13
	HREEMENVH	9
	RSHREEMEN	8
	REEMENVHE	8
HLA-A*26	EEMENVHEL	25
	ENVHELEKS	19
	EMENVHELE	10
HLA-A*32	Keine Vorhersage möglich	/
HLA-B*08	EEMENVHEL	16
	SHREEMENV	10
HLA-B*14	HREEMENVH	11
	EEMENVHEL	10
HLA-B*35	Keine Vorhersage möglich	/
HLA-B*38	Keine Vorhersage möglich	/
HLA-B*56	Keine Vorhersage möglich	/

Tabelle 23 zeigt lediglich die Sequenzen der vorhergesagten Nonamere, im Rahmen der manuellen Auswertung wurden auch längere Varianten der gezeigten Peptide gesucht.

Trotz der genannten Bemühungen konnte kein Peptid aus der Fusionssequenz von CBF β -MYH11 identifiziert werden.

3.5.3. Peptide aus Proteinen, für die sich kein Hinweis auf Tumorassoziation ergab

Wie schon bei der Analyse der Nierenzellkarzinome, so entstammten auch bei den AMLs die meisten der gefundenen Peptide konstitutiv exprimierten Proteinen der physiologischen Zell-Homöostase. Die meisten der identifizierten

Liganden entstammten Strukturproteinen des Zytoskeletts, Enzymen des normalen Zellstoffwechsels und Membranproteinen wie Histokompatibilitätsantigenen. Eine Liste mit all jenen Liganden, für die sich kein Hinweis auf Tumorassoziation ergab und die nicht an anderer Stelle genannt werden, findet sich wegen ihres Umfangs aus praktischen Gründen erst am Ende dieses Kapitels (Tabelle 26).

Drei Gruppen von Quellproteinen sollen an dieser Stelle jedoch gesondert besprochen werden, teils weil sie wiederholt als Quelle von Peptiden identifiziert werden konnten, teils weil die Interpretation ihres Fundes einige Schwierigkeiten bereitet: (i) Peptide aus ribosomalen Proteinen, (ii) Peptide aus dem Globinanteil des Hämoglobins und (iii) das Peptid aus KIAA0020.

Die Familie der ribosomalen Proteine stellt eine Quelle vieler Peptide aus den AML-Proben dar. Aus keiner anderen Gruppe von Proteinen konnten mehr Peptide sequenziert werden.

Ribosomen katalysieren die Proteinbiosynthese und bestehen aus einer kleinen 40S und einer großen 60S Untereinheit. Zusammen sind diese Untereinheiten aus 4 rRNA-Species und ca. 80 Proteinen aufgebaut.

Insgesamt konnten 12 Peptide aus ribosomalen Proteinen identifiziert werden (Tabelle 24), Peptide aus ribosomalen Proteinen konnten in allen 3 analysierten AML-Proben gefunden werden.

Da Ribosomen zum unverzichtbaren Stoffwechsel einer Zelle beitragen und aus diesem Grunde wohl auch in jeder stoffwechselaktiven Zelle in großer Zahl vorliegen, gehören Peptide aus ribosomalen Proteinen zum Repertoire der Selbst-Antigene.

Neben den zahlreichen Funden ribosomaler Peptide in den AMLs konnten erstaunlicherweise wiederholt Peptide aus dem Globinanteil des Hämoglobins gewonnen werden. Insbesondere verwunderte dabei der Fund von Peptiden aus eindeutig fetalen Hämoglobinvarianten. Hämoglobin ist ein tetrameres Molekül, bestehend aus vier Globinketten und vier Hämgruppen. Verschiedene Varianten des Hämoglobins, die sich in der Zusammensetzung ihres Globinanteils unterscheiden, sind bekannt.

Tabelle 24: Peptide aus ribosomalen Proteinen, die der Analyse der AML-Zelllinien entstammen.

Gen-Name Faktor der Überexpression in AML03 und AML04 relativ zum Normalgewebe Knochenmark	Entrez Gene ID	Sequenz	HLA Restriktion	Proben	Referenzen / Weitere Proben in denen ein Peptid gefunden wurde
RPL4: ribosomal protein L4 1,8 ; 1,5	6124	RMFAPTKTW	A*32	AML03/04	/
RPL10: ribosomal protein L10 0,3 ; 0,3	6134	DAKIRIFDL	B*08	AML01	/
RPL13A: ribosomal protein L13a 1,0 ; 1,2	23521	KVFDGIPPPY	A*03	AML04	/
RPL18A: ribosomal protein L18a 0,8 ; 0,9	6142	RIFAPNHVVA K	A*03	AML04	/
RPL36: ribosomal protein L36 2,1 ; 2,6	25873	LRYPMAVGL	B*14	AML01	(79)
RPL37A: ribosomal protein L37a 0,5 ; 1,1	6168	RTKKVGIVGK	A*03	AML03	/
RPL38: ribosomal protein L38 0,6 ; 0,8	6169	SRYLTLVI	B*14	AML01	/
RPLP2: ribosomal protein, large P2 0,6 ; 1,4	6181	MRYVASYLL	B*14	AML01	RCC112
RPS4X: ribosomal protein S4, X- linked 0,7 ; 0,7	6191	TRLSNIFVI	B*14	AML01	/
RPS27A: ribosomal protein S27a 1,4 ; 1,3	6233	QIFVKLTGK	A*03	AML04	RCC75 / 98
RPS29: ribosomal protein S29 0,6 ; 0,5	6235	QLYWSHPRK YWSHPRK	A*03 A*03	AML03/04 AML04	/ /

Relevant hierfür sind die α , β , γ , δ und ε -Ketten, die den Globinanteil in den verschiedenen Hämoglobinformen bilden. Aus all diesen Untereinheiten konnten Peptide in den Proben AML03 und AML04 identifiziert werden.

Da eine exakte Zuordnung der einzelnen Peptide aufgrund der ähnlichen Aminosäuresequenzen der verschiedenen Globinvarianten nicht immer möglich war sind in Tabelle 25 die einzelnen Peptide mit den möglichen Quellhämoglobinen aufgeführt. Adultes tetrameres Hämoglobin besteht zu 97% aus HbA-1 ($\alpha\alpha\beta\beta$) und zu 3% aus HbA-2 ($\alpha\alpha\delta\delta$). Adulte tetramere Hämoglobine bestehen also nur aus den Globin-Ketten Globin α (HBA), Globin β (HBB) und Globin δ (HBD), wobei HBA in zwei Isoformen, HBA1 und HBA2 vorkommt. Beide Isoformen unterscheiden sich nur in ihren untranslatierten Regionen, so dass die prozessierten Proteine HBA1 und HBA2 in ihrer Sequenz identisch sind und daher auch nicht anhand von Peptiden differenziert werden können. Globin α konnten zwei Peptide, nämlich KLRVDPVNFK und SVSTVLTSK, die beide in AML03 und AML04 gefunden wurden, eindeutig zugeordnet werden.

Tabelle 25: Peptide aus dem Globinanteil des Hämoglobins, die auf den analysierten AML-Proben gefunden wurden. Eine einwandfreie Zuordnung einzelner Peptide zu einzelnen Hämoglobinspezies war nicht immer möglich, die alternativen Quellproteine sind jeweils angegeben. 3 Peptide konnten jedoch zweifelsfrei dem embryonalen Hämoglobin ϵ 1, eines dem Hämoglobin γ zugeordnet werden.

<i>Gen-Name</i>	<i>Entrez Gene ID</i>	<i>Sequenz</i>	<i>HLA Restriktion</i>	<i>Proben</i>	<i>Referenzen / Weitere Proben in denen ein Peptid gefunden wurde</i>
HBA1 hemoglobin, alpha 1 oder: HBA2 hemoglobin, alpha 2	3039 3040	KLRVDPVNFK SVSTVLTSK	A*03 A*03	AML03/04 AML03/04	/
HBB hemoglobin, beta oder: HBD hemoglobin, delta	3043 3045	YPWTQRF VVYPWTQRF	n.n. A*03	AML04 AML03/04	/
HBG1 hemoglobin, gamma A oder: HBG2 hemoglobin, gamma G	3047 3048				RCC75 / 112
HBE1: hemoglobin, epsilon 1 HBB hemoglobin, beta oder: HBD hemoglobin, delta	3046 3043 3045	MGNPKVK	A*03	AML03	/
HBG1 hemoglobin, gamma A oder: HBG2 hemoglobin, gamma G	3047 3048				
HBG1: hemoglobin, gamma A oder: HBG2: hemoglobin, gamma G	3047 3048	AIMGNPKVK	A*03	AML03/04	/
HBE1: hemoglobin, epsilon 1	3046	AVAIALAHK VAIALAHKY AILGNPKVK	A*03 A*03 A*03	AML03 AML03 AML03/04	/

Globin β (HBB) und Globin δ (HBD), die ebenso wie Globin α am Aufbau des adulten tetrameren HbA beteiligt sind, unterscheiden sich in ihrer Aminosäuresequenz nur an einzelnen Stellen von Globin γ 1 und γ 2 sowie von Globin ϵ (siehe Abbildung 25). Globin γ und ϵ sind ausschließlich am Aufbau fetaler Hämoglobine beteiligt. Globin γ (HBG) bildet zusammen mit Globin β das fetale HbF, Globin ϵ (HBE) ist Bestandteil des früh-fetalen (embryonalen) Hb-Gower. Durch die ähnliche Primärstruktur der Quellproteine konnte für die Peptide MGNPKVK, YPWTQRF sowie seine längere Variante VVYPWTQRF das Quellprotein nicht zweifelsfrei bestimmt werden. Da es sich bei den Spendern um adulte AML-Patienten handelte scheinen Globin β oder Globin δ als Quellprotein zunächst wahrscheinlich.

HBA1/2	1	mvlspadktn	vkaawgkvga	hageygaeal	ermflsfptt	ktyfphfdls	hgsaqvkgghg
HBB	1	mvhltpeeks	avtalwgkvn	vdevggealg	rllvvypwtg	rfefesfgdls	tpdavgmgnpk
HBD	1	mvhltpeekt	avnalwgkvn	vdavggealg	rllvvypwtg	rfefesfgdls	spdavgmgnpk
HBG1	1	mghfteedka	titslwgkvn	vedaggetlg	rllvvypwtg	rfffdsfgnls	sasaimgnpk
HBG2	1	mghfteedka	titslwgkvn	vedaggetlg	rllvvypwtg	rfffdsfgnls	sasaimgnpk
HBE1	1	mvhftaeeka	avtslwskmn	veeaggealg	rllvvypwtg	rfffdsfgnls	spsailgnpk
HBA1/2	61	kkvadaltna	vahvddmpna	lsalsdlhah	klrvdpvnfk	llshcllvtl	aahlpaeftp
HBB	61	vkahgkkvlg	afsdglahld	nlkgtfatls	elhccklhvd	penfrllgnv	lvcvlahhfg
HBD	61	vkahgkkvlg	afsdglahld	nlkgtfsqsls	elhccklhvd	penfrllgnv	lvcvlarnfg
HBG1	61	vkahgkkvlt	slgdatkhld	dlkgtfaqls	elhccklhvd	penfkllgnv	lvtvlaihfg
HBG2	61	vkahgkkvlt	slgdaikhld	dlkgtfaqls	elhccklhvd	penfkllgnv	lvtvlaihfg
HBE1	61	vkahgkkvlt	sfgdaiknmd	nlkpfafakls	elhccklhvd	penfkllgnv	mviilathfg
HBA1/2	121	avhasldkfl	asvstvltsk	yr			
HBB	121	keftppvqaa	yqkvvagvan	alahkyh			
HBD	121	keftpqmqaa	yqkvvagvan	alahkyh			
HBG1	121	keftpevqas	wqkmvtavas	alssryh			
HBG2	121	keftpevqas	wqkmvtgvas	alssryh			
HBE1	121	keftpevqaa	wqklvsavai	alahkyh			

Abbildung 25: Vergleich der Sequenzen aller als Peptidquellen relevanter Hämoglobine. Die dunkel hinterlegten Bereiche entsprechen den gefundenen Peptiden. Es wird deutlich, dass nicht alle gefundenen Peptide einwandfrei einem Isoprotein zuzuordnen sind. Bemerkenswert jedoch ist die einwandfreie Zuordnung mehrerer Peptide zu den embryonalen Hämoglobinen ϵ und γ .

Jedoch konnte mit der Sequenz AIMGNPKVK ein Peptid eindeutig dem fetalen Globin γ zugeordnet werden. Ähnlich verhält es sich mit dem ebenfalls fetalen Globin ϵ dem die Sequenzen AILGNPKVK, AVAIALAHK und seine längere Variante VAIALAHKY zugeordnet werden konnten. Um diese komplizierten Verhältnisse zu verdeutlichen sind in Abbildung 25 die Proteinsequenzen aller genannten Globine wiedergegeben, die für die besprochenen Peptide relevanten Sequenzabschnitte sind grau hinterlegt.

Die durchgeführte Genexpressionsanalyse der Proben AML03 und AML04 erbrachte hinsichtlich der Expression der genannten Hämoglobine unschlüssige Ergebnisse: Die Hämoglobine α (HBA) und γ_2 (HBG2) sind auf den genutzten *GeneChips* nicht repräsentiert. Für Hämoglobin β (HBB) und Hämoglobin δ (HBD) konnten in beiden Proben keine Expressionen gemessen werden. Für die fetalen Hämoglobine Hämoglobin ϵ (HBE), Hämoglobin γ_1 (HBG1) jedoch konnten interessanterweise starke Expressionen in AML03 gemessen werden, keine Expression fand sich für diese Proteine in AML04 oder den gesunden Normalgeweben.

Ein weiteres interessantes Selbstpeptid aus der Analyse der AML-Proben war das Peptid EAIREAVVY das in der AML04 gefunden wurde, und das aus dem Protein KIAA0020 (Entrez Gene ID: 9933) stammt. Dieses Genprodukt liegt in der Population polymorph vor und ist damit Quelle eines Nebenhistokompatibilitätsantigens (minor H Antigen). Zudem ist das Gen KIAA0020 in unseren Expressionsanalysen in den Proben AML04 und AML03 deutlich gegenüber dem normalen Knochenmark sowie auch gegenüber den anderen Normalgeweben überexprimiert, im Falle von AML03 um den Faktor 13,4, im Falle der AML04 um den Faktor 7,2. KIAA0020 kodiert für das Nebenhistokompatibilitätsantigen HA-8 (42). Sowohl die Recherche der Literatur sowie die manuelle Überprüfung der bekannten Proteinsequenzen als auch die elektronische Analyse des Gens mit Hilfe eines Vorhersagealgorithmus (SNEP; www.elchtools.de) (355) für Nebenhistokompatibilitätsantigene kamen zu dem Ergebnis, dass das Peptid EAIREAVVY nicht aus dem polymorphen Bereich von KIAA0020 stammt, also selbst kein Nebenhistokompatibilitätsantigen darstellt.

Tabelle 26 (folgende Seiten): Darstellung all jener Peptide aus der Analyse der 3 AML-Zelllinien, für die sich keine Hinweise auf eine Tumorassoziation ergaben. Peptide, die auch experimentell eindeutig HLA-A*03 zugeordnet werden konnten sind mit einem fett und unterstrichen gedruckten „A*03“ gekennzeichnet.

Gen-Name Faktor der Überexpression in AML03 und AML04 relativ zum Normalgewebe Knochenmark	Entrez Gene ID	Sequenz	HLA Restriktion	Proben	Referenzen / Weitere Proben in denen ein Peptid gefunden wurde
ACACA: acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha 3,5 ; 7,8	31	WAQTVVVGR	A*03	AML04	/
ACTN4: actinin, alpha 4 1,3 ; 0,8	81	NAFEVAEKY	A*03	AML04	/
AIF1: allograft inflammatory factor 1 0,3 ; 1,7	199	RMLEKLGVPK	A*03	AML03	/
AIM1: absent in melanoma 1 0,0 ; 1,2	202	PTDPKVVVY	A*01	AML01	/
AMFR: autocrine motility factor receptor 0,6 ; 0,4	267	RTAHVILRY	A*03	AML03	/
ANXA11: annexin A11 0,3 ; 0,5	311	ETDLLDIRSEY	A*01	AML01	RCC98 / 112
ARF6: ADP-ribosylation factor 6 0,4 ; 0,2	382	MRDAILIF	B*14	AML01	/
BTK: Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase 2,6 ; 0,8	695	FPYPFQVVY	B*35	AML03	/
CA1: carbonic anhydrase I 0,4 ; 0,7	759	RLFQFHFHW	A*32	AML03/04	/
CAPNS1: calpain, small subunit 1 1,0 ; 1,0	826	AVMDSDTTGKLG F	A*03	AML04	/
CD48: CD48 antigen (B-cell membrane protein) 0,1 ; 13	962	KQLTWFYTF	A*26	AML01	/
CD74: CD74 antigen (invariant polypeptide of major histocompatibility complex, class II antigen-associated) 0,2 ; 2,2	972	MRMATPLLM KVFESWMHHW	B*14 A*32	AML01 AML03	RCC112 / (241)
CRYM: crystallin, mu 17,0 ; 1,0	1428	AVMDGNVITAK	A*03	AML03	/
CYP4A11: cytochrome P450, family 4, subfamily A, polypeptide 11 1,0 ; 1,0	1579	FPDGRSLPK	A*03	AML03	/
DDOST: dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase 2,1 ; 1,6	1650	FPDKPITQY	B*56	AML04	/
DHX15: DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 15 1,3 ; 1,4	1665	RIFEPPPPK	A*03	AML03	/
DIAPH1: diaphanous homolog 1 (Drosophila) 2,5 ; 0,7	1729	MRLGLHQVL	B*14	AML01	/
DNMT1: DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1 1,7 ; 1,1	1786	RLFGNILDK	A*03	AML04	/
EEF2: eukaryotic translation elongation factor 2 1,5 ; 1,5	1938	LTDITKGVQY	A*01	AML01	/
EPB41: erythrocyte membrane protein band 4.1 (elliptocytosis 1, RH-linked) 0,5 ; 0,4	2035	RGVPWNFTF	A*03	AML04	/
EPB41L2: erythrocyte membrane protein band 4.1-like 2 7,5 ; 10,8	2037	RNLPWLFTF	n.a.	AML01	/
FASN: fatty acid synthase 1,0 ; 1,5	2194	TFDDIVHSF	A*03	AML03/04	/
GH1: growth hormone 1 / GH2: growth hormone 2 0,8 ; 0,3	2688 / 2689	NLELLRISLLL	n.a.	AML03/04	/
GNAI1: guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 1 4,0 ; 1,0	2770	KLFDSICNNKW	A*32	AML03/04	/
HIP2: huntingtin interacting protein 2	3093	DRNAVIVAL	B*14	AML01	/

2,0 ; 2,6 HNRPA2B1: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	3181	KLFIGGLSF	A*26	AML01	/
2,1 ; 3,33 HNRPK: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	3190	DRYDGMVGF	B*14	AML01	/
0,9 ; 1,1 HSPD1: heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)	3329	LRLLIHQSL RTVIIEQSW	B*14 A*32	AML01 AML04	/
2,0 ; 3,1 IARS: isoleucine-tRNA synthetase	3376	YRFLIQNVL	B*14	AML01	/
3,3 ; 3,1 ICAM2: intercellular adhesion molecule 2	3384	GTYGVRAAW	A*32	AML03/04	/
4,6 ; 1,9 IL1B: interleukin 1, beta	3553	SVDPKNYPK	A*03	AML03	/
14,1 ; 0,4 IMPDH1: IMP (inosine monophosphate) dehydrogenase 1	3614	MMYSGELKF	A*03	AML04	/
0,3 ; 0,9 ITGA2B integrin, alpha 2b (platelet glycoprotein IIb of IIb/IIIa complex, antigen CD41B)	3674	AMWKVGFFK	A*03	AML03	/
12,3 ; 0,2 LBR: lamin B receptor	3930	KLCGYVIFR	A*03	AML03/04	/
0,4 ; 0,5 LCP2: lymphocyte cytosolic protein 2 (SH2 domain containing leukocyte protein of 76kDa)	3937	KVYNIQIRY	A*03	AML03	RCC75 / 98
1,9 ; 0,5 LIMS1: LIM and senescent cell antigen-like domains 1	3987	HAIIDEQPLIF	B*38	AML04	/
6,1 ; 1,0 LIPA: lipase A, lysosomal acid, cholesterol esterase (Wolman disease)	3988	MRFLGLVV	B*14	AML01	/
0,9 ; 1,2 MAN2B1 mannosidase, alpha, class 2B, member 1	4125	MRFLGLVVC KNLCLKLRL	B*14 A*03	AML01 AML03	/
0,7 ; 1,4 MCP: membrane cofactor protein (CD46, trophoblast-lymphocyte cross-reactive antigen)	4179	WRFPGLLLA	B*14	AML01	/
1,8 ; 1,2 MFAP3: microfibrillar-associated protein 3	4238	VTSPIRASY	A*03	AML04	/
0,6 ; 0,5 MSI1: musashi homolog 1 (Drosophila)	4440	KMFIGGLSW	n.a.	AML01/03/04	/
0,1 ; 0,2 MSN: moesin	4478	KTIGLREVV	A*32	AML03	/
7430 VIL2: villin 2 (ezrin)					
1,0 ; 1,1 – bzw 0,2 ; 0,2 MTCO1: cytochrome c oxidase I	4512	IIAIPGTVK	A*03	AML03/04	/
N0 Probeset NARS: asparaginyl-tRNA synthetase	4677	KVFGWVHRL	n.a.	AML03	/
2,0 ; 2,0 NCBP1: nuclear cap binding protein subunit 1, 80kDa	4686	AVYGMLNLT RILDIVPPTF	A*03 B*38	AML03 AML04	/
1,2 ; 1,3 NDUFC2 NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, subcomplex unknown, 2, 14.5kDa	4718	KTYGEIFEK	A*03	AML03	/
1,0 ; 1,0 NFIC: nuclear factor I/C (CCAAT-binding transcription factor)	4782	AYDLNPASTGL	B*38	AML04	/
0,1 ; 0,2 NRD1: nardilysin (N-arginine dibasic convertase)	4898	RVKPLHYISW	A*32	AML03/04	/
0,1 ; 0,1 PCNA: proliferating cell nuclear antigen	5111	IADMGHLY	A*01	AML01	(215)
1,9 ; 0,8 PDE1C: phosphodiesterase 1C, calmodulin-dependent 70kDa	5137	VLESVYIDE	n.n.	AML04	/
2,2 ; 0,3 PLRG1: pleiotropic regulator 1	5356	AVALPLQTK	A*03	AML04	/

(PRL1homolog, Arabidopsis)						
No Probeset						
POLR2L: polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide L, 7.6kDa	5441	KLLNYAPLEK	A*03	AML04	RCC75 / 98	
3,0 ; 6,0						
PPP1CB: protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform	5500	YTDLLRLFY	A*01	AML01	RCC98	
2,3 ; 1,4						
PPP2R1A: protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit A (PR 65), alpha isoform	5518	MAWLVDHVY	A*03	AML04	/	
1,0 ; 1,2						
PPP6C: protein phosphatase 6, catalytic subunit	5537	RQITQVYGF	A*03	AML04	/	
1,3 ; 1,5						
PRKDC: protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide	5591	DRLLALNSL	B*14	AML01	/	
2,5 ; 1,4						
PSMD1: proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 1	5707	VYDLLKTNL	B*38	AML04	/	
0,9 ; 0,8						
PTGFRN: prostaglandin F2 receptor negative regulator	5738	FKYPLLIGVG	n.n	AML01	/	
No Probeset						
RFC5: replication factor C (activator 1) 5, 36.5kDa	5985	LLYGPPGTGK	A*03	AML04	/	
2,7 ; 2,8						
RRM2: ribonucleotide reductase M2 polypeptide	6241	FPIEYHDIW	B*56	AML04	/	
0,3 ; 0,4						
CCL3L1 chemokine (C-C motif) ligand 3-like 1	6349	SKPSVIFLTK	A*03	AML03	/	
No Probeset						
SEC14L1: SEC14-like 1 (S. cerevisiae)	6397	HQVDYILETW	A*32	AML04	/	
0,4 ; 0,2						
SFRS6: splicing factor, arginine/serine-rich 6 / SFRS4: splicing factor, arginine/serine-rich 4	6431 / 6429	RVYIGRLSY	A*03	AML03/04	(381)	
0,2 ; 5,6 – bzw 1,2 ; 1,1						
SIAH2: seven in absentia homolog 2 (Drosophila)	6478	VFDTAIAHLF	B*38	AML04	/	
0,2 ; 0,3						
SIAT1: sialyltransferase 1 (beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase)	6480	LWDILQEIS	n.n.	AML03/04	/	
0,6 ; 2,4						
SIAT4A: sialyltransferase 4A (beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase)	6482	VLTFVLVLFIF	B*38	AML04	/	
0,2 ; 0,3						
SKIV2L: superkiller viralicidic activity 2-like (S. cerevisiae)	6499	RLIPQPAFQW	A*32	AML04	/	
1,2 ; 1,5						
SMARCA1: SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 1	6594	DRFLICML	B*14	AML01	/	
0,2 ; 0,1						
SMARCA4: SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4	6597	KQYQIKGLEW	A*32	AML04	/	
0,1 ; 2,3						
SNRPA1: small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A'	6627	SILRNPVTNK	A*03	AML03	/	
2,0 ; 1,8						
SNRPD2: small nuclear ribonucleoprotein D2 polypeptide 16.5kDa	6633	DRYISKMFL	B*14	AML01	/	
1,7 ; 1,2						
SNRPE: small nuclear ribonucleoprotein polypeptide E	6635	QPINLIFRY	n.n.	AML03/04	/	
2,5 ; 2,5						
SRP68: signal recognition particle 68kDa	6730	VLYDRVLYK	A*03	AML04	RCC68 / 75 / 115	
No Probeset						
SSR2: signal sequence receptor, beta	6746	YDRVLYK MPTMRLLSF	A*03 B*08	AML01	/	

(translocon-associated protein beta) 0,8 ; 1,0		MRLLSFVVL	B*14	AML01	/
SSRP1 structure specific recognition protein 1 1,4 ; 1,8	6749	KLDFDVNAKK	A*03	AML03	/
SULT1A1 sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member 1 2,1 ; 0,9	6817	GTWDSFLEK	A*03	AML03	/
SUPT5H suppressor of Ty 5 homolog (S. cerevisiae) 1,3 ; 0,9	6829	KILNLRFLGK	A*03	AML03	/
TOP1 : topoisomerase (DNA) I 2,0 ; 0,2	7150	YYDGKVMKL	B*38	AML04	/
TUBB : tubulin, beta polypeptide 0,3 ; 0,6	7280	LRFPGQLNA	B*14	AML01	/
USH2A Usher syndrome 2A (autosomal recessive, mild) 0,2 ; 0,2	7399	VVIINSTAVR	A*03	AML03	/
WNT6 : wingless-type MMTV integration site family, member 6 0,2 ; 0,5	7475	SRLGLLLLL	B*14	AML01	/
PTP4A1 : protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1 1,2 ; 1,9	7803	RPAPVEVTY	B*35 / B*56	AML03/04	/
BAT3 : HLA-B associated transcript 3 2,0 ; 1,2	7917	MPVGPDAILRY	B*56	AML04	/
NCOA4 : nuclear receptor coactivator 4 0,3 ; 0,2	8031	ERLGSRTL	B*14	AML01	/
SYMPK : symplekin 0,9 ; 1,2	8189	VRFLIPVL	B*14	AML01	/
HIST3H3 : histone 3, H3 0,9 ; 1,6	8290	LRFQSSAMV	B*14	AML01	/
CDC45L : CDC45 cell division cycle 45-like (S. cerevisiae) 1,5 ; 3,2	8318	HFDLSVIEL	B*38	AML04	/
HIST1H4A : histone 1, H4a 0,5 ; 0,2	8359	NVIRDAVTY	A*03	AML03/04	/
TAGLN2 : transgelin 2 2,0 ; 0,5	8407	YGMPRQIL	B*08	AML01	/
ENC1 ectodermal-neural cortex (with BTB- like domain) 4,6 ; 0,8	8507	RLFTDVLLH	A*03	AML03	/
LMO4 : LIM domain only 4 1,0 ; 0,6	8543	KIADRFLLY	A*03	AML03/04	RCC75 / 98
EED : embryonic ectoderm development 1,7 ; 3,0	8726	VRWLGDLIL	B*14	AML01	/
HIST1H2BJ histone 1, H2bj 1,6 ; 1,1	8970	SIYVYKVLK	A*03	AML03	/
RQCD1 : RCD1 required for cell differentiation1 homolog (S. pombe) 0,8 ; 1,0	9125	KIYQWINEL	B*38	AML04	/
COPB2 : coatomer protein complex, subunit beta 2 (beta prime) 2,4 ; 1,6	9276	KSFGSAQEFAW	A*32	AML04	/
C6orf11 : chromosome 6 open reading frame 11 1,4 ; 1,0	9277	HFDLNLRFQF	A*03	AML03/04	/
GTF3C5 : general transcription factor IIIC, polypeptide 5, 63kDa 0,4 ; 0,2	9328	KLFDIRPIW	A*32	AML03/04	/
ROCK2 : Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 2 1,3 ; 3,1	9475	HEFIPTLY	A*03	AML04	/
TBPL1 : TBP-like 1 5,4 ; 0,9	9519	MPFEIRLPEF	B*56	AML04	/
CDC42BPB : CDC42 binding protein kinase beta (DMPK-like) 3,0 ; 0,6	9578	RTMEWVQTI	n.n	AML03	/
IER2 : immediate early response 2 0,1 ; 0,3	9592	FPNLARVL	B*08	AML01	/
MORF4L2 : mortality factor 4 like 2 0,8 ; 1,0	9643	HPDAPMSQVY	B*56	AML04	/

BZW1: basic leucine zipper and W2 domains 1 1,5 ; 2,3	9689	FLDASGAKLDY	A*01	AML01	/
SNX17: sorting nexin 17 6,0 ; 6,0	9784	DRLQWVTI	B*14	AML01	/
FARP2: FERM, RhoGEF and pleckstrin domain protein 2 0,3 ; 0,4	9855	VRYSQLLGL TRYLFALQL	B*14	AML01	/
TLK1: tousled-like kinase 1 4,3 ; 5,6	9874	ERYLLLHLL	B*14	AML01	/
KIAA0020: KIAA0020 13,9 ; 7,2	9933	EAIREAVVY	A*03	AML04	/
LNK: lymphocyte adaptor protein 2,1 ; 2,3	10019	VLFPFSLPHW	n.n.	AML01/03	/
ATP9A: ATPase, Class II, type 9A 0,2 ; 0,3	10079	FPEHIFPAL	B*56	AML04	(79)
ARPC4: actin related protein 2/3 complex, subunit 4, 20kDa 0,4 ; 1,0	10093	MRAENFFIL	B*14	AML01	/
ARPC3: actin related protein 2/3 complex, subunit 3, 21kDa 0,8 ; 0,9	10094	DRTLIIYITL	B*14	AML01	/
PBEF1: pre-B-cell colony enhancing factor 1 3,5 ; 11,3	10135	KMWSIENIAF	A*26	AML01	/
PSME3: proteasome (prosome, macropain) activator subunit 3 (PA28 gamma ; Ki) 0,6 ; 0,8	10197	LRLIISEL	B*14	AML01	/
HNRPR: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R 1,7 ; 2,0	10236	RLFVGSIPK	A*03	AML04	RCC75 / 98
SF3A1: splicing factor 3a, subunit 1, 120kDa 1,0 ; 1,3	10291	AFDLDVVKL	B*38	AML04	/
TIMM23: translocase of inner mitochondrial membrane 23 homolog (yeast) 1,0 ; 2,0	10431	GTMTGMLYK	A*03	AML04	RCC75 / 103
MCRS1: microspherule protein 1 0,5 ; 1,1	10445	LYDPVISKL	n.n.	AML03/04	/
COG5: component of oligomeric golgi complex 5 3,1 ; 3,1	10466	RLFDPINLVF	A*26	AML01	/
HKE2: HLA class II region expressed gene KE2 1,4 ; 1,6	10471	ALLDGSNVVFK	A*03	AML04	/
CHERP calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein 0,8 ; 11,5	10523	GLYEFFRAK	A*03	AML03	/
NPC2: Niemann-Pick disease, type C2 0,4 ; 0,4	10577	MRFLAATFL	B*14	AML01	/
PRPF8: PRP8 pre-mRNA processing factor 8 homolog (yeast) 0,6 ; 1,1	10594	DRFLGFFMV	B*14	AML01	/
TXNIP: thioredoxin interacting protein 0,0 ; 0,0	10628	LRYEDTLLL	B*14	AML01	/
RRAGA: Ras-related GTP binding A 3,0 ; 1,3	10670	VRFLGNLVL	B*14	AML01	/
NUDC: nuclear distribution gene C homolog (A. nidulans) 2,6 ; 1,0	10726	ERFDGMLL	B*14	AML01	/
USP19: ubiquitin specific protease 19 0,8 ; 1,4	10869	ERFDGMLLAM WRLPNVLIV	B*14	AML01	/
TLK2: tousled-like kinase 2 0,6 ; 0,8	11011	AFDLTEQRY	A*03	AML03/04	/
CPSF5: cleavage and polyadenylation specific factor 5, 25 kDa 2,1 ; 2,0	11051	HRLPHVLLL	B*14	AML01	/
PTP4A3: protein tyrosine phosphatase type IVA, member 3 0,8 ; 1,1	11156	RPAPVEVSY	B*56	AML04	/
DDX20: DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 20 No Probeset	11218	TPVDDRISL	B*56	AML04	/

EVER1: epidermodysplasia verruciformis 1 0,8 ; 1,9	11322	ALMPWRYAL	B*38	AML04	/
Hnrpk: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K No Probeset	15387	VPDSSGPERIL	B*56	AML04	RCC75
PDCD11 programmed cell death 11 0,6 ; 1,8	22984	KVFERAVQY	A*03	AML03	/
KIAA0265: KIAA0265 protein 0,3 ; 0,7	23008	KLNLQTFQW	A*32	AML04	/
ASCC3L1: activating signal cointegrator 1 complex subunit 3-like 1 0,4 ; 2,3	23020	YAQDEHLTF	B*38	AML04	/
JMJD2B: jumonji domain containing 2B 0,6 ; 1,2	23030	KMTLISPIIL	A*03	AML03/04	/
KIAA0701: KIAA0701 protein 0,9 ; 2,5	23074	LLLFLHESL	B*08	AML01	/
MRPS27 mitochondrial ribosomal protein S27 3,2 ; 2,6	23107	LLSLTTQLVK	A*03	AML03	/
KIAA0143: KIAA0143 protein 2,0 ; 3,0	23167	DRLAQILEL	B*14	AML01	/
MDN1: MDN1, midasin homolog (yeast) 0,8 ; 1,2	23195	KMAEVIGSKL	B*38	AML04	/
AGTPBP1: ATP/GTP binding protein 1 0,2 ; 0,4	23287	VVYDLNPNY	A*32 A*03	AML03	/
RBAF600: retinoblastoma-associated factor 600 1,0 ; 0,5	23352	MRFVPLIL	B*14	AML01	/
ADNP: activity-dependent neuroprotector 1,1 ; 1,8	23394	NRYLPTDTL	B*14	AML01	/
QPRT: quinolate phosphoribosyltransferase (nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase (carboxylating)) 3,0 ; 3,0	23475	RYDLGGLVM	n.n	AML04	/
WBP2: WW domain binding protein 2 1,0 ; 0,6	23558	SYDHVELTF	A*03	AML03/04	/
DKFZP434P1750: DKFZP434P1750 protein 0,5 ; 0,6	26000	RTLPWASVL	B*08	AML01	/
C10orf137 chromosome 10 open reading frame 137 1,7 ; 6,4	26098	AILSKFLYY	A*03	AML03	/
QP-C low molecular mass ubiquinone-binding protein (9.5kD) 1,3 ; 1,0	27089	RAYPHVFTK	A*03	AML03	/
PX19: px19-like protein No Probeset	27166	MVVEERCYV	A*03	AML04	/
eIF3k: eukaryotic translation initiation factor 3 subunit k 2,0 ; 1,0	27335	DRWLLAEML	B*14	AML01	/
SNX11: sorting nexin 11 1,2 ; 4,3	29916	TVSDAILRY	A*03	AML04	/
EHD3: EH-domain containing 3 3,2 ; 0,0	30845	LPLEEHYRF	B*35	AML03	/
C1orf33: chromosome 1 open reading frame 33 3,7 ; 5,3	51154	KLKDIRNAW	A*32	AML04	/
PACAP: proapoptotic caspase adaptor protein 2,3 ; 0,1	51237	MRLSLPLLL MRLSLPLLLL	B*14	AML01	/
MRPL27: mitochondrial ribosomal protein L27 No Probeset	51264	YALEEGIVRY	A*03	AML04	/
SPTBN5: spectrin, beta, non-erythrocytic 5 0,1 ; 0,2	51332	ARLQTALLV	B*14	AML01	/
MRPS17: mitochondrial ribosomal protein S17 1,1 ; 2,1	51373	VLDPYLLKY	A*01	AML01	RCC98 / 112
TRAPPC4: trafficking protein particle complex 4 / Alias: heptacellular carcinoma novel gene 3 1,1 ; 1,1	51399	KTFYPLDLLL	B*08	AML01	/

HSPC121 butyrate-induced transcript 1 0,6 ; 1,0	51495	LIMIFLGLY	A*03	AML03	/
PIAS4: protein inhibitor of activated STAT, 4 0,8 ; 0,9	51588	ATNRITVTW	A*32	AML03/04	/
PSF2 cleavage and polyadenylation specific factor 2, 100kDa No Probeset	53981	AIYATIPVYK	A*03	AML03	/
SLC37A1: solute carrier family 37 (glycerol-3-phosphate transporter), member 1 8,1 ; 1,0	54020	TAWDEADVRF	B*38	AML04	/
C21orf45: chromosome 21 open reading frame 45 2,1 ; 1,4	54069	KLWEAESKLSF	A*03	AML04	/
TLR9: toll-like receptor 9 No probeset	54106	SRLEGLVL	B*14	AML01	/
KIAA1383: KIAA1383 protein No Probeset	54627	RLLDFPTLLVY	A*01	AML01	/
MRPL20: mitochondrial ribosomal protein L20 4,0 ; 3,8	55052	AIYEPKTFK	A*03	AML04	/
KIAA1794 protein No probeset	55215	MRYAVNVAL	B*14	AML01	/
FLJ20297: hypothetical protein FLJ20297 5,9 ; 5,2	55627	YRTLVSLLL	B*14	AML01	/
DDX27: DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 27 5,7 ; 7,7	55661	RILPQDVILKF	n.n	AML01/04	/
VPS11 vacuolar protein sorting 11 (yeast) 1,0 ; 0,4	55823	KLFQQIMHY	A*03	AML03	/
HT007: uncharacterized hypothalamus protein HT007 3,6 ; 2,0	55863	KLMAIPLVF	A*26	AML01	/
PPAN: peter pan homolog (Drosophila) 1,1 ; 1,9	56342	MRLPGGPTL	B*14	AML01	/
XAB2: XPA binding protein 2 2,4 ; 1,4	56949	HPLPETAVRGY	B*56	AML04	/
		NYDEALRLL		AML04	
		IEVLSDEH		AML03	
BIRC6: baculoviral IAP repeat-containing 6 (apollon) No Probeset	57448	RTLPLVLLLY	A*03	AML04	/
PJA1: praja 1 1,0 ; 1,0	64219	YVDPQFLTY	A*01	AML01	RCC98 / 112
VPS16: vacuolar protein sorting 16 (yeast) 0,4 ; 0,5	64601	NRGDFFML	B*14	AML01	/
WARP: von Willebrand factor A domain-related protein 0,0 ; 1,1	64856	FRLAWPPLL	B*14	AML01	/
UPF3B: UPF3 regulator of nonsense transcripts homolog B (yeast) 2,9 ; 3,3	65109	DRFDGYVFL	B*14	AML01	/
UPF3A: UPF3 regulator of nonsense transcripts homolog A (yeast) 2,5 ; 0,4	65110	DRFDGYIFL	B*14	AML01	/
NS3TP2: HCV NS3-transactivated protein 2 No probeset	65983	DRYIFVSL	B*14	AML01	/
ZNF426: zinc finger protein 426 5,9 ; 0,6	79088	RTVQGGVLQGW	A*32	AML04	/
MRPL24: mitochondrial ribosomal protein L24 1,5 ; 1,8	79590	MRLSALLAL	B*14	AML01	/
DHX40: DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 40 3,3 ; 0,8	79665	IVCPIRYEW	A*32	AML04	/
C9orf76: chromosome 9 open reading frame 76 2,7 ; 3,6	80010	LRAETWLLAA	B*14	AML01	/
FLJ21439: hypothetical protein FLJ21439 1,4 ; 1,9	80208	KVANIILSY	A*03	AML04	/
DOCK8: dedicator of cytokinesis 8 No Probeset	81704	SRLEPLVL	B*14	AML01	/

C14orf156: chromosome 14 open reading frame 156 4,6 ; 1,6	81892	LPFDKETGF	B*56	AML04	/
DNCL2A: dynein, cytoplasmic, light polypeptide 2A 1,8 ; 0,8	83658	SLMHSFILK	A*03	AML03	RCC75 / 98 / 103
DKFZp434B227: hypothetical protein DKFZp434B227 0,3 ; 0,0	84223	LELKSVIKL	B*08	AML01	/
SDOS: hypothetical protein MGC11275 No Probeset	84309	MRFDGLLGF	B*14	AML01	/
KIAA1838 KIAA1838 No Probeset	84498	FVYPGNPLRH	A*03	AML03	/
FLJ14668: hypothetical protein FLJ14668 1,3 ; 2,0	84908	RVQEAVESMVK	A*03	AML04	RCC98 / 103 / ...
MGC16279 hypothetical protein MGC16279 0,4 ; 0,6	85002	RSFPWQSLEAK	A*03	AML03	/
KLHL6: kelch-like 6 (Drosophila) No Probeset	89857	RVLEAANLFQF	A*03	AML03/04	/
LOC91137: hypothetical protein BC017169 alias TB1 4,4 ; 3,1	91137	NRFAGFGIGL	B*14	AML01	/
TUBB1: tubulin, beta 1 TUBB3: tubulin, beta 3 0,7 ; 0,1 – bzw 0,6 ; 1,3	81027 10381	LYDICFRTL	B*38	AML04	/
PIGS phosphatidylinositol glycan, class S No Probeset	94005	FFDPSLLHLL	A*03	AML03	/
GNG8: guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 8 No Probeset	94235	KVSQAAAELLAF	A*03	AML03/04	/
H2AFV: H2A histone family, member V No Probeset	94239	HIHKSILIGK	A*03	AML03	/
LENG8: leukocyte receptor cluster (LRC) member 8 No Probeset	114823	LRLEPLVL	B*14	AML01	/
UHMK1 U2AF homology motif (UHM) kinase 1 No Probeset	127933	AIDHIFASK	A*03	AML03	/
SGPP2: sphingosine-1-phosphate phosphatase 2 No Probeset	130367	DRYQYPFVL	B*14	AML01	/
CPEB2: cytoplasmic polyadenylation element binding protein 2 No Probeset	132864	IDIMRAEH	n.n	AML01	/
LOC147991 hypothetical protein LOC147991 No Probeset	147991	RLSDTLLFY	A*03	AML03	/
C9orf154: chromosome 9 open reading frame 154 No Probeset	158326	KMWNIATY	A*03	AML03/04	/
KIAA1946: KIAA1946 No Probeset	165215	LLGLAVVLLK	A*03	AML03	/
LOC219638 hypothetical LOC219638 No Probeset	219638	DYQSIKLIY	A*03	AML03	/
MCOLN2: mucolipin 2 No Probeset	255231	NYDLCSIFLG	n.n.	AML03	/
LOC283050 hypothetical protein LOC283050 No Probeset	283050	LPAGGGLQTK	A*03	AML03	/
NOMO2: NODAL modulator 2 No Probeset	283820	TFDVAPSRL	B*38	AML04	(99)
OC284058 hypothetical protein LOC284058 No Probeset	284058	ATTRVEKLQY	A*03	AML03	/
RPL7L1: ribosomal protein L7-like 1 No Probeset	285855	KIFSGVFVK	A*03	AML04	/
LOC286177 hypothetical protein LOC286177 No Probeset	286177	WKLQRSLLLK	A*03	AML03	/
NMNAT3 nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 3 No Probeset	349565	GLYTKGSTWK	A*03	AML03	/
FLJ35093: FLJ35093 protein No Probeset	374986	RVFDLPLTW	A*32	AML04	/
LOC389203: hypothetical gene supported by	389203	KVWSDPFGRK	A*03	AML03/04	/

BC032431						
No Probeset						
MGC42157 hypothetical locus	439933	LLKSLFTSW	A*32	AML04	/	
No Probeset						
LOC441931 putative G-protein coupled receptor	441931	ISHLPLIHIL	B*08	AML01	/	
No Probeset						
LOC493856 similar to RIKEN cDNA 1500009M05 gene	493856	VLESVARIVK	A*03	AML03	/	
No Probeset						
OACT4 O-acyltransferase (membrane bound) domain containing 4	619373	SYLLFFPAL	n.n.	AML03	/	
No Probeset						
MHC class II antigen	n.n.	FRFDPQFAL	B*14	AML01	/	
No Probeset						
MHC class I antigen	n.n.	VMAPRLLLL	n.n.	AML03/04	/	
No Probeset						
cytochrome c oxidase subunit II	n.n.	KIFEMGPVFTL	n.n.	AML01/03/04	/	
No Probeset						

3.5.4. AML-Peptide aus potentiell tumorassoziierten Proteinen

Im Rahmen der Analyse der drei AML-Proben AML01, AML03 und AML04 ergaben sich für eine ganze Reihe von Peptiden aufgrund ihrer Genexpression oder der Literatur Hinweise auf eine Tumorassoziation. Diese HLA-Liganden sollen im Folgenden besprochen werden.

Die Sequenzen aller in diesem Kapitel genannten HLA-Liganden wurden über den massenspektrometrischen Vergleich mit in ihrer Aminosäuresequenz identischen synthetischen Peptiden verifiziert.

Tabelle 27 gibt einen Überblick über die potentiell tumorassoziierten Peptide der AML-Proben.

Peptide aus zwei Onkogenen, aus MYC und aus PIM1, die beide in die molekulare Pathogenese verschiedenster Neoplasien, unter ihnen die AML, involviert sind konnten im Rahmen der Analyse der AML-Proben identifiziert werden. Das *myelocytomatosis oncogene* (MYC; Entrez Gene ID: 4609) ist ein Protein, das als Transkriptionsfaktor wirkt und das an der Regulation des Zellzyklus, der Apoptose und der malignen Transformation beteiligt ist (78;300). Verschiedenste Alterationen des MYC-Gens, Mutationen, Translokationen sowie die Überexpression sind assoziiert mit der Onkogenese diverser solider Tumoren (65;75;142;195;357), hämatologischer Neoplasien und Lymphome (134;168;359;388). Ebenso wurde beschrieben, dass die Überexpression von MYC *in vivo* Schäden an der DNA erzeugt und damit über einen weiteren Mechanismus onkogen wirkt (100;310;409).

Tabelle 27: Potentiell tumorassoziierte HLA-Liganden der AML: Peptide für die sich aufgrund der Literatur oder der durchgeführten Genexpressionsanalyse Hinweise auf eine Tumorassoziation ergaben.

Gen-Name	Entrez Gene ID	Sequenz	HLA Restriktion	Proben
Faktor der Überexpression in AML03 und AML04 relativ zum Normalgewebe Knochenmark				
MYC: v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian) 4,3 ; 4,3	4609	KLISEEDLLRK	A*03	AML03/04
PIM1: pim-1 oncogene No Probeset	5292	KLIDFGSGALLK	A*03	AML04
MPL: myeloproliferative leukemia virus oncogene 45,1 ; 0,1	4352	KVLEPPLGAR	A*03.	AML03
MKI67: antigen identified by monoclonal antibody Ki-67 6,9 ; 2,3	4288	VIDEPVRL	B*38	AML04
EIF3S6: eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6 48kDa 9,2 ; 6,4	3646	TMCPHILRY	A*03	AML03/04
EIF2S3 eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3 gamma, 52kDa 3,7 ; 9,8	1968	VVCEYIVKK	A*03	AML03
CHEK1: CHK1 checkpoint homolog (S. pombe) 4,7 ; 4,3	1111	DRMVGQVL KLIDIVSSQK	B*14 A*03	AML01 AML04
HDC: histidine decarboxylase 209 ; 0,4	3067	KLWVIRSF	A*03	AML03
		RLFLIPATI	n.a.	AML03/04
TOP2A topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa / TOP2B topoisomerase (DNA) II beta 180kDa 59,66 ; 26,2 bzw 5,0 ; 2,1	7153 / 7155	KLCNIFSTKF	A*03	AML03

Besonders gut erforscht ist die Assoziation der Überexpression von MYC mit der Pathogenese des Mammakarzinoms (146;230). Für diese Entität konnte sogar gezeigt werden, dass eine Ausschaltung der MYC-Expression das Tumorwachstum inhibiert (430) und damit als therapeutische Zielstruktur denkbar ist.

MYC wird bekanntermaßen in unreifen myeloischen Zellen exprimiert (19;139), hingegen ist die Expression in reifen myeloischen Zellen physiologischerweise herabreguliert (308;438).

Eine Dysregulation von MYC in Zellen der AML ist beschrieben (18). Im Mausmodell konnte sogar gezeigt werden, dass die experimentell induzierte Überexpression von MYC akute myeloische Leukämien auslösen kann (100). In beiden Proben, AML03 und AML04 konnte aus MYC das HLA-A*03-präsentierte Peptid KLISEEDLLRK sequenziert werden. Die bei der Analyse der Zellproben gewonnenen Massenspektren wurden zur Verifikation der Sequenz mit dem eines synthetisierten Peptids verglichen.

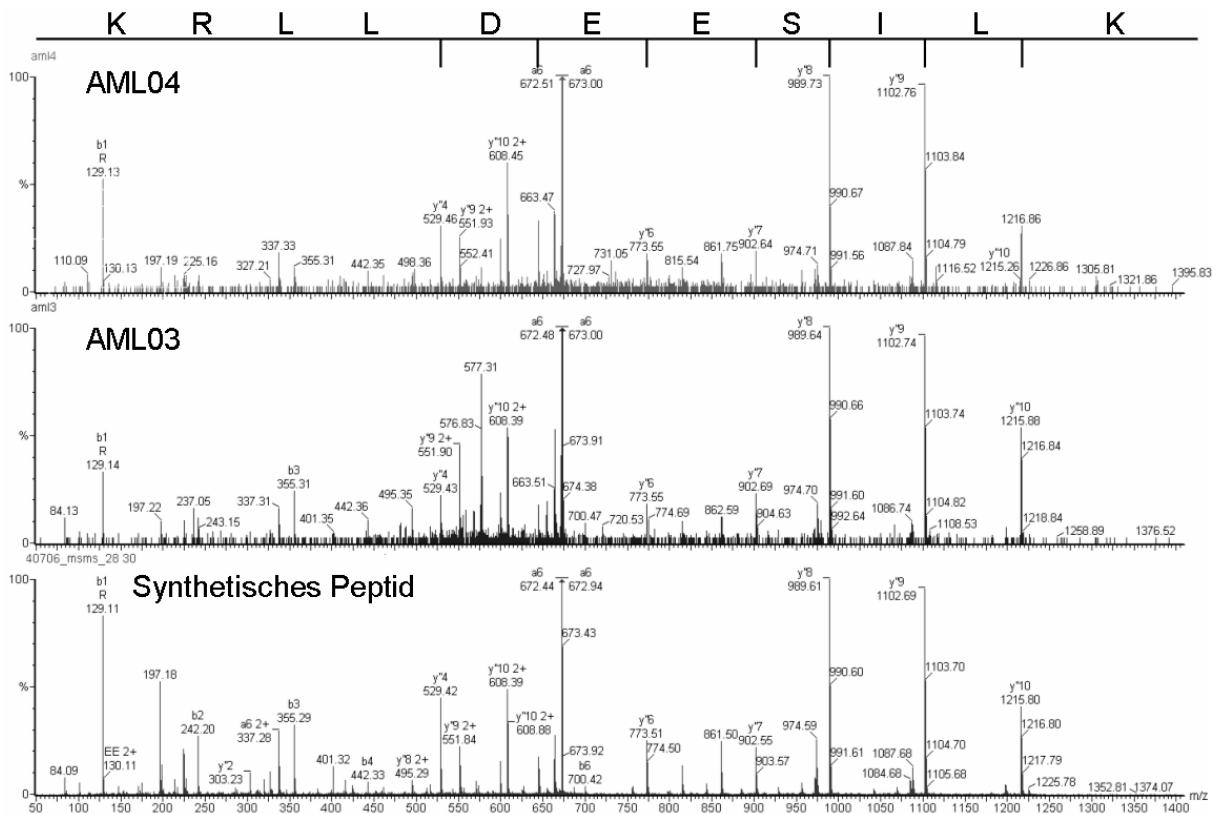


Abbildung 26: Fragmentspektren des Peptids KLISEEDLLRK aus dem MYC-Onkogen: das HLA-A*03-präsentierte Peptid wurde auf den Proben AML03 und AML04 gefunden, das Fragmentspektrum des synthetischen Peptids belegt die Richtigkeit der Sequenz.

Die Übereinstimmung der in Abbildung 26 gezeigten Spektren aus der Analyse der Zellen mit dem des synthetischen Peptids belegt die Richtigkeit der Sequenz. In unseren Genexpressionsanalysen zeigte sich für beide Proben, AML03 und AML04 eine relative Überexpression von MYC gegenüber dem gesunden Knochenmark um den Faktor 4,3. Auch in 12 von 13 gemessenen Nierenzellkarzinomen ist MYC zumeist deutlich über den Faktor 3 gegenüber dem Normalgewebe Niere überexprimiert.

Ein weiteres Peptid aus einem tumorassoziierten Protein, das in der Probe AML04 gefunden werden konnte, ist KLIDFGSGALLK, ein HLA-A*03-präsentierter Ligand aus dem *pim-1 oncogene* (PIM1, Entrez Gene ID 5292).

PIM1 ist eine tumorassoziierte Serin-Threonin-Kinase des Prostatakarzinoms und ist ein prognostisch relevanter Biomarker für diese Neoplasie (85). PIM1 greift regulatorisch in die Mechanismen der mitotischen Zellteilung ein und führt bei Überexpression zu chromosomaler Instabilität (329;330). Die höchsten

Expressionswerte für PIM1 wurden in hämatopoetischen Zellen sowie im Hoden beschrieben, eine ursächliche Rolle von PIM1 in der Onkogenese von Lymphomen (431) und insbesondere in akuten Leukämien wurde impliziert (7;199;282). Dabei wurde ein synergistischer Effekt von PIM1 und MYC bei der malignen Transformation nachgewiesen (264;417). Die Sequenz KLIDFGSGALLK wurde experimentell durch Vergleich der aus der Analyse der AML-Proben stammenden Spektren mit solchen eines synthetischen Peptids verifiziert. Eigene Expressionsdaten konnten im Falle von PIM1 nicht gewonnen werden, da dieses Gen nicht auf dem *Affymetrix* U 133A *GeneChip* repräsentiert ist.

Beide Onkogene, MYC und PIM1 sind also wie in der Literatur beschrieben an der Pathogenese der AML direkt beteiligt. Zusätzlich konnte für MYC eine relevante Überexpression in den getesteten Leukämien sowie in nahezu allen Nierenzellkarzinomen nachgewiesen werden. Diese Datenlage sollte Anlass zur weiteren Evaluation der Peptide hinsichtlich ihrer Immunogenität in T-Zellstimulationsassays sein.

Ein weiteres Protein, das in die molekulare Pathogenese der akuten myeloischen Leukämie verwickelt ist, ist das *myeloproliferative leukemia virus oncogene* (MPL; Entrez Gene ID : 4352). Dieses Protein ist identisch mit dem humanen Thrombopoetinrezeptor (TPO-R, CD110), einem Wachstumsfaktorrezeptor, der physiologischerweise in den Progenitorzellen der Thrombopoese, aber auch auf Leukämiezellen gefunden wird.

In der AML03 konnte aus MPL das Peptid KVLEPPLGAR sequenziert werden. Die Sequenz wurde, wie bei den vorangegangenen Peptiden, über den Vergleich mit dem Spektrum eines synthetischen Peptids gleicher Sequenz verifiziert. Eine Zuordnung zu einem HLA-Molekül der Zelllinie AML03 fällt allerdings schwer, am ehesten handelt es sich um ein HLA-A*03 präsentiertes Peptid.

Thrombopoetin ist physiologischerweise eines der wichtigsten stimulatorischen Zytokine der Thrombopoese. Der Thrombopoetinrezeptor MPL wird aber auch in einem hohen Prozentsatz von Leukosen, unter anderem auch in der Hälfte

aller akuten myeloischen Leukämien exprimiert, und zwar unabhängig von der Subtypisierung der AML (353;393). Diese durch AML-Zellen exprimierten Thrombopoetinrezeptoren sind zumeist funktionell, Thrombopoetin stellt somit einen proliferativen Stimulus für diese Zellen dar (77;252;253). Im Rahmen der Stratifizierung der Leukosen in verschiedene Prognosegruppen konnte gezeigt werden, dass die Höhe der Expression von Thrombopoetin in AML-Zellen mit einer schlechten Prognose korreliert (3;419;439).

Aus unseren eigenen Expressionsdaten geht hervor, dass im Falle der AML03 TPO mit einem Faktor von 45,13 massiv gegenüber dem normalen Knochenmark überexprimiert war, in der AML04 ließ sich dagegen keine relevante Expression von TPO feststellen, ebenso wenig konnte eine vergleichbar hohe Expression von TPO in gesunden Geweben gemessen werden (Abbildung 27).

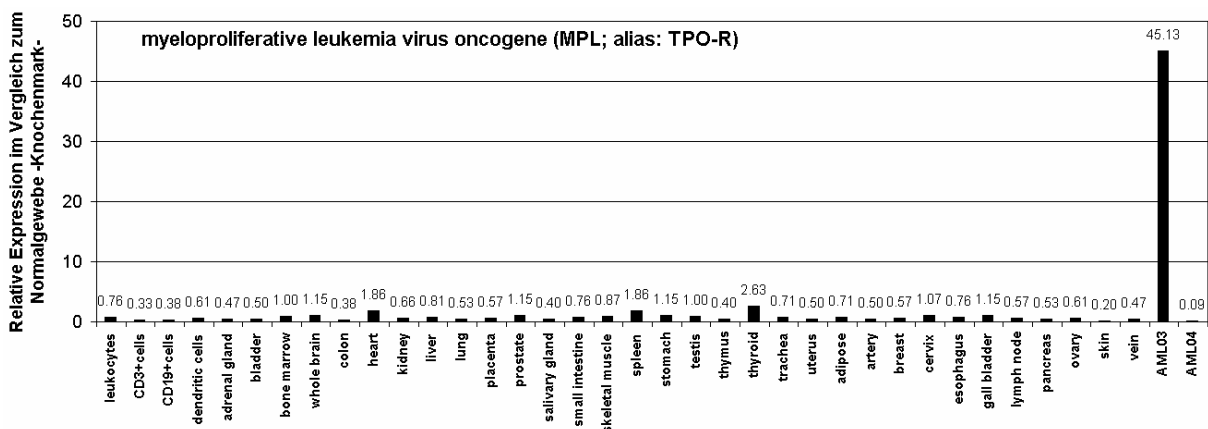


Abbildung 27: Genexpressionsprofil von MPL in gesunden Geweben und den AML-Proben 03 und 04

Erstaunlicherweise fanden sich im Peptidrepertoire der AML-Proben auch solche Liganden, die bereits aus der Analyse der Nierenzellkarzinome bekannt waren und auch schon in diesen Proben als tumorassoziiert vermutet wurden: Das Peptid TMCPHILRY aus dem *eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6* (EIF3S6, Entrez Gene ID: 3646) (Alias: mammary tumor-associated protein INT6) war bereits in der Nierenzellkarzinomzelllinie RCC68CL identifiziert worden, in diesem Zusammenhang wurde es auch schon

ausführlich besprochen (siehe Kapitel 3.3.3.). Auch in den Proben AML03 und AML04 konnte dieses Peptid sequenziert werden. Im Rahmen der Analyse von RCC68CL (HLA-A*02, -A*29, -B*15, -B*45) war das Peptid HLA-B*15 zugeordnet worden. Bemerkenswerterweise zeigen die AML- Proben keine Gemeinsamkeiten hinsichtlich ihrer HLA-Typisierung mit RCC68CL. In den AML-Proben ist das Peptid TMCPHILRY HLA-A*03-gebunden, dies konnte durch seine Identifikation in der HLA-A*03-selektiven Analyse (Antikörper: GAP A3) der Probe AML03 belegt werden. Die Richtigkeit der Sequenz wurde über den Vergleich mit dem Massenspektrum eines synthetischen Peptids gleicher Sequenz verifiziert (siehe Abbildung 28). In den Genexpressionsanalysen war eine Überexpression von EIF3S6 in allen Nierenzellkarzinomen über den Faktor 3 gegenüber dem Normalgewebe Niere gemessen worden, in der AML03 konnte eine relative Überexpression um den Faktor 9,2 in der AML04 um den Faktor 6,4 gegenüber dem Normalgewebe Knochenmark gemessen werden. Damit ergab sich in allen in dieser Arbeit besprochenen Proben eine relevante Überexpression von EIF3S6. Eine hypothetische Tumorassoziation wird durch diese Daten gestützt und gab Anlass zur Durchführung von T-Zellstimulationen mit dem Peptid TMCPHILRY (siehe Kapitel 3.4.).

Ein weiterer Interessanter HLA-Ligand, der in den AML-Proben identifiziert werden konnte, entstammt dem *antigen identified by monoclonal antibody Ki-67* (MKI67; Entrez Gene ID: 4288). Auf der AML04 konnte das HLA-A*B38 präsentierte Peptid VIDEPVRL aus diesem Protein sequenziert werden.

MKI67 ist das Antigen, das durch den Antikörper Ki-67 erkannt wird. Es ist ein nukleäres Protein, das nur in proliferierenden, nicht aber in ruhenden Zellen exprimiert wird (125;126). Entsprechend gilt es auch als Marker zur Bestimmung der proliferativen Aktivität in verschiedenen soliden Neoplasien (80;125), aber auch in der AML (136;177). Die immunhistologische Färbung auf MKI67 ist Bestandteil des Standardrepertoires der diagnostischen Pathologie bei der Identifikation von Neoplasien und Präkanzerosen und wurde für viele Tumoren als prognostischer Faktor evaluiert.

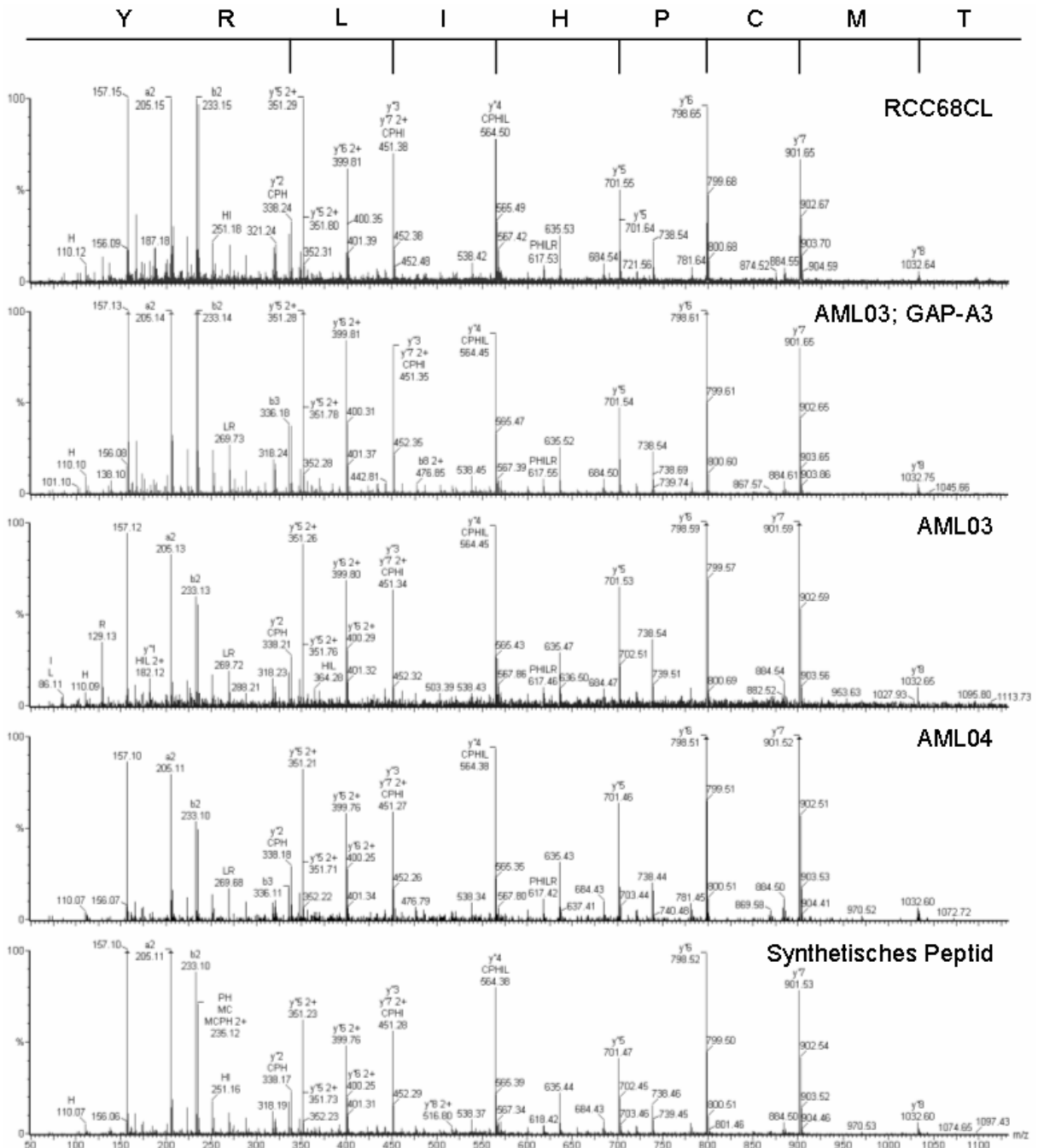


Abbildung 28: Fragmentspektren des Peptids TMCPHILRY aus EIF3S6, das auf den Proben AML03, AML04 und RCC68CL gefunden wurde. Seine Präsentation auf HLA-A*03 konnte über die Peptidpräparation mit dem Antikörper GAP A3 nachgewiesen werden, der Vergleich mit dem Fragmentenspektrum des synthetischen Peptids belegt die Richtigkeit der Sequenz.

In der AML04, in der das Peptid gefunden wurde, wurde in der Genexpressionsanalyse eine 7 fache Überexpression von MKI67 gegenüber dem normalen Knochenmark gemessen, in der AML03 war das MKI67 mit einer

relativen Expression von 2,3 fach ebenfalls mäßig hochreguliert. Eine höhere Expression als im Knochenmark konnte in keinem anderen gesunden Gewebe mit Ausnahme des Ovars (Faktor 2,8) festgestellt werden.

Obwohl MKI67 als Tumorzellmarker diagnostische Verwendung findet, muss seine Bewertung als therapeutische Zielstruktur kritisch betrachtet werden, da MKI67 auch von gesunden proliferierenden Zellen exprimiert wird (349).

Vier weitere Genprodukte, aus denen Peptide gefunden wurden, konnten in den AML-Proben als deutlich überexprimiert gemessen werden (siehe Abbildung 29): Das *CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)* (CHEK1; Entrez Gene ID: 1111), der *eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3 gamma, 52kDa* (EIF2S3; Entrez Gene ID: 1968), die *histidine decarboxylase* (HDC; Entrez Gene ID: 3067) und die *topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa* (TOP2A; Entrez Gene ID: 7153).

Für die beiden erstgenannten, das CHEK1 und den EIF2S3 sind in der aktuellen Literatur keine Hinweise auf eine funktionelle oder überexpressionsbedingte Tumorassoziation zu finden. Beide Genprodukte zeigten sich sowohl in der AML03 als auch in der AML04 relevant über den Faktor 3 gegenüber dem gesunden Gewebe Knochenmark überexprimiert, die jeweils höchsten Expressionen in Normalgeweben fanden sich im Ovar. Aus CHEK1 konnte der HLA-A*03-Ligand KLIDIVSSQK, aus EIF2S3 die HLA-A*03- und HLA-B*14- präsentierte Peptide VVCEYIVKK und DRMVGQVL sequenziert werden.

Durch extrem hohe Überexpressionen in der AML03 fielen die *histidine decarboxylase* (HDC) und die *topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa* (TOP2A) auf. Die HDC katalysiert die Synthese des biogenen Amins Histamin aus Histidin. Damit ist sie in zahlreiche physiologische Prozesse involviert. Es existieren Hinweise, dass die HDC in verschiedenen Tumoren eine hohe Aktivität aufweist (120;261). Auch für die chronisch myeloischen Leukämie (CML) ist bekannt, dass die Aktivität der HDC stark erhöht ist (1). Wir konnten in der AML03 eine relative Überexpression der HDC um den Faktor 208 gegenüber dem Normalgewebe Knochenmark messen.

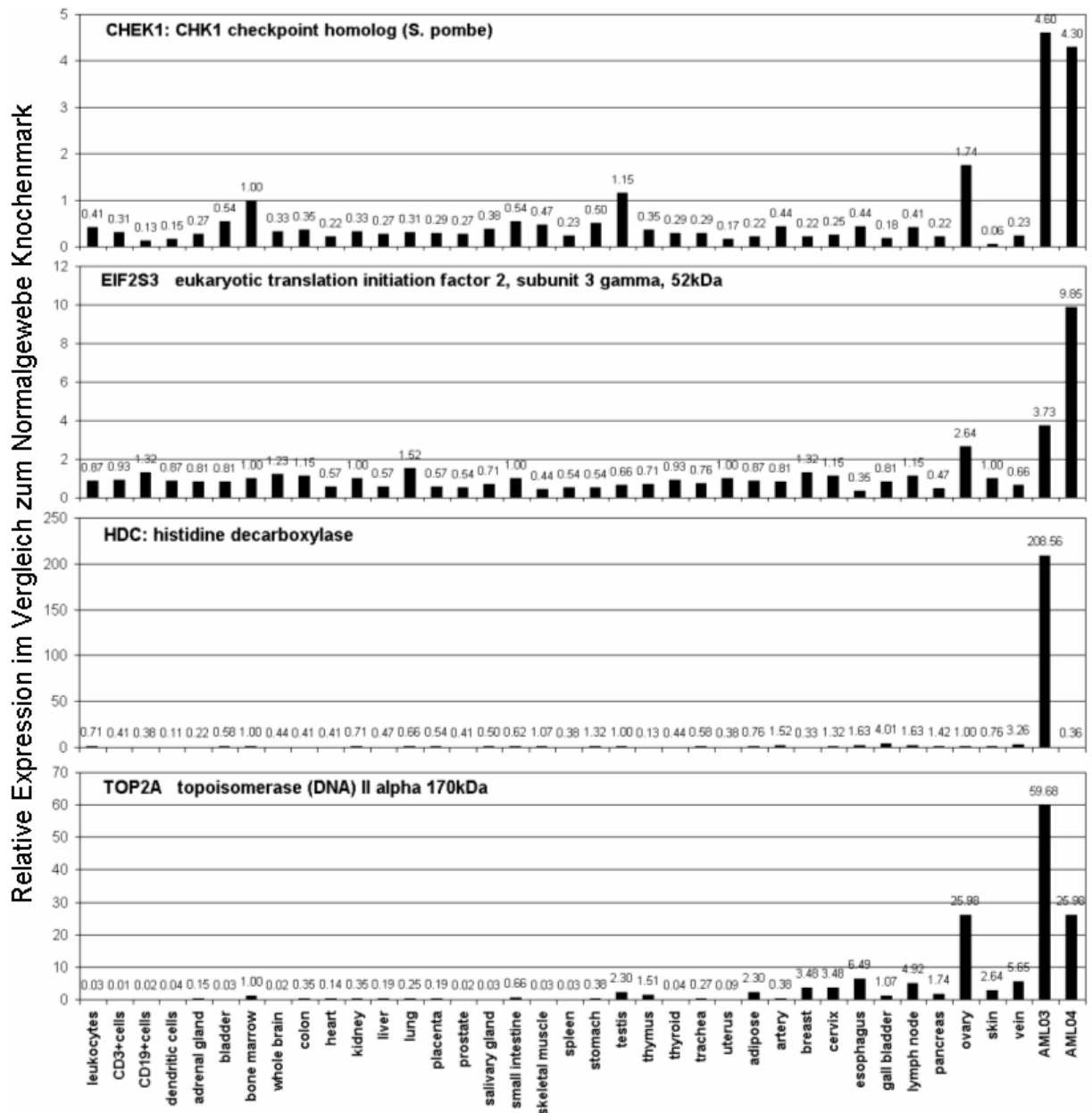


Abbildung 29: Genexpressionsprofile verschiedener Peptid-Quellproteine in gesunden Geweben und den AML-Proben 03 und 04.

In keinem anderen Gewebe, auch nicht in der AML04, wurde eine nennenswerte Expression des Genprodukts festgestellt. Bemerkenswerterweise wurden zwei Peptide aus diesem Protein, KLWVIRSF, RLFLIPATI sowie das Peptidfragment FVIRSF in den Proben AML03 und AML04 gefunden.

Ein ähnlich gutes Expressionsschema zeigte die *topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa* (TOP2A). Diese war in der AML03 um den Faktor 60 überexprimiert, in der AML04 immerhin noch um den Faktor 26. Vergleichbar hohe Expressionen

wurden nur im Ovar gemessen (Abbildung 29). Die TOP2A gehört zu den Gyrasen, Enzymen die die Ver- und Entdrillung der DNA katalysieren. Diese Topoisomerasen sind klassische Ziele zytostatischer Therapien, z.B mit Anthracyclinen (221). Das HLA-A*03-präsentierte Peptid KLCNIFSTKF wurde im Rahmen der Analyse der AML03 identifiziert. Leider kann dieses Peptid nicht ausschließlich der *topoisomerase (DNA) II alpha* zugeordnet werden, die *topoisomerase (DNA) II beta* (TOP2B), deren Expression in den AML-Proben kaum erhöht war, kann als potentiellles Quellprotein des Peptids nicht ausgeschlossen werden.

3.5.5. AML-Peptide aus Quellproteinen, die bereits als immunreaktive Tumorantigene beschrieben sind.

Einige Quellproteine, aus denen Peptidsequenzen in den AML-Proben gewonnen werden konnten, sind bereits in der Literatur als immunreaktive Antigene in Tumorpatienten beschrieben. Teils wurden zelluläre, teils humorale Immunreaktionen gegen diese Proteine gefunden, alle Daten stammen jedoch aus Patienten mit soliden Tumoren, eine Assoziation mit der akuten myeloischen Leukämie ist für keines der gezeigten Proteine beschrieben.

Die in diesem Kapitel besprochenen Peptide sind in Tabelle 28 übersichtlich dargestellt, die Sequenzen aller experimentell gefundenen HLA-Liganden wurden über den massenspektrometrischen Vergleich mit synthetischen Peptiden verifiziert.

Tabelle 28: Massenspektrometrisch identifizierte HLA-Liganden aus Proteinen, die in der Literatur bereits als Quellen immunreaktiver T-Zellepitope oder als Antigene einer humoralen Immunantwort in Tumorpatienten beschrieben sind.

<i>Gen-Name</i>	<i>Entrez Gene ID</i>	<i>Sequenz</i>	<i>HLA Restriktion</i>	<i>Proben</i>
Faktor der Überexpression in AML03 und AML04 relativ zum Normalgewebe Knochenmark				
STAF65(gamma): SPTF-associated factor 65 gamma 2,2 ; 1,4	9913	SFDLLPREF	B*38	AML04
BOP1: block of proliferation 1 2,0 ; 1,2	23246	VIFHPTQPWVF	A*26	AML01
PHF11: PHD finger protein 11 0,4 ; 1,9	51131	ALFDCRLF	A*03	AML04
UTP6 UTP6, small subunit (SSU) processome component, homolog (yeast) 2,6 ; 2,0	55813	AVIGADSVTLK	A*03	AML03

Ein Protein, das bereits als Quelle immunogener Peptide bekannt ist und das damit *per se* als tumorassoziiert gelten sollte, ist der *SPTF-associated factor 65 gamma* (STAF65(gamma); Entrez Gene ID: 9913). Dieses Protein ist identisch mit dem *adenocarcinoma antigen ART1*. Aus der Literatur ist bekannt, dass verschiedene HLA-Liganden aus diesem Protein immunogene Antigene des Adenokarzinoms der Lunge darstellen. Diese Peptide werden als tumorassoziierte Epitope von zytotoxischen T-Zellen erkannt und führen so zur Lyse der Tumorzellen (283). Aus STAF65(gamma) konnte in der Probe AML04 der HLA-B*38-präsentierte Ligand SFDLLPREF sequenziert werden. Die Sequenz des Peptids wurde, wie auch schon bei vorgenannten Peptiden, über den Vergleich mit dem Spektrum eines synthetischen Peptids verifiziert. Dieses Peptid ist bisher noch nicht als reaktives T-Zellepitop beschrieben, es ist aber durchaus nicht unwahrscheinlich, dass auch dieses Peptid wie andere HLA-Liganden aus STAF65(gamma) immunogen ist und die Lyse von Zielzellen durch CD8⁺ T-Lymphozyten vermitteln kann.

Drei weitere Quellproteine für HLA-Liganden wurden im Rahmen der Analyse der akuten myeloischen Leukämien identifiziert, gegen die zwar keine zelluläre, aber eine humorale Immunreaktion in Krebspatienten beschrieben ist: Aus dem Protein *block of proliferation 1* (BOP1; Entrez Gene ID: 23246) konnte das HLA-A*26-präsentierte Peptid VIFHPTQPWVF in der AML01 sequenziert werden, das HLA-A*03-präsentierte Peptid ALFDCRLF aus dem *PHD finger protein 11* (PHF11; Entrez Gene ID: 51131) wurde in der AML04 gefunden und AVIGADSVTLK, ein HLA-A*03-Ligand aus dem *UTP6, small subunit (SSU) processome component, homolog (yeast)* (UTP6; Entrez Gene ID: 55813) entstammt der Probe AML03.

Gegen all diese Antigene konnten mittels des SEREX-Verfahrens (66;67;405) Antikörper in an unterschiedlichen Neoplasien leidenden Patienten identifiziert werden: Reaktive Antikörper gegen BOP1 (KIAA0124; KM-PA-2) wurden im Serum von am Pankreaskarzinom erkrankten Patienten gefunden (277), das PHF11 wurde als humorales Tumorantigen in Nierenzellkarzinompatienten

beschrieben und ist in der entsprechenden Nomenklatur als NY-REN-34 benannt (342) und gegen das UTP6 wurden Antikörper in Patienten mit hepatozellulärem Karzinom detektiert (429).

Eine relevante Überexpression der korrespondierenden Genprodukte auf Transkriptionsebene konnte in unseren Analysen für keines der in diesem Kapitel genannten Proteine gemessen werden, weder in den AML- noch in den RCC-Proben. Ob es sich bei den genannten Quellproteinen bzw. Peptiden tatsächlich um immunreaktive Antigene auch in der AML handelt, kann in dieser Arbeit nicht beantwortet werden. Die in der Literatur beschriebenen humoralen oder zellulären Immunreaktionen rechtfertigen unserer Ansicht nach jedoch die weitere Evaluation der beschriebenen Peptide in T-Zellstimulationsversuchen.

4. Diskussion

4.1. Diskussion ausgewählter, in dieser Arbeit verwendeter Methoden

4.1.1. Diskussion der Methodik: Massenspektrometrische Peptidsequenzierung und *GeneChip*-basierte Expressionsanalyse: Aussagekraft und Anwendbarkeit der verwendeten Strategie zur Identifizierung tumorassoziierter Peptide

Zur Identifizierung potentiell tumorassoziierter HLA-Liganden wurde in dieser Arbeit eine methodische Kombination aus *Liquid Chromatography Tandem-MassSpectrometry* (LC-MS/MS) und *GeneChip*-basierter (Affymetrix) Genexpressionsanalyse verwendet.

Beide Komponenten können für sich als gut etablierte Standardmethoden gelten, in unserer praktischen Arbeit zeichneten sich beide durch eine hohe Zuverlässigkeit aus.

Hinsichtlich der Peptidanalytik konnten aus allen resezierten und aufgearbeiteten Tumoren Peptide isoliert und aufgereinigt werden. In allen Proben, die massenspektrometrisch analysiert wurden, konnte eine große Anzahl von auswertbaren Fragmentspektren gewonnen werden. Da die Auswertung der Fragmentspektren manuell erfolgte, ist die Richtigkeit und Zuverlässigkeit der Peptidsequenzen direkt vom Auswerter abhängig. Die insbesondere im Rahmen der Analyse der AML-Proben durchgeführte Verifikation der Daten durch den Vergleich der aus dem Tumor gewonnenen Fragmentspektren mit solchen synthetischer Peptide attestierte jedoch eine hohe Treffsicherheit dieser sorgfältig durchgeführten manuellen Auswertung mit einem positiven Vorhersagewert, der sicherlich deutlich jenseits der 90% liegt.

Grundsätzlich stellt sich jedoch die Frage, ob die verwendete methodische Kombination tatsächlich in der Lage ist neben der qualitativen Charakterisierung des durch die Zelle präsentierten Ligandoms eine Identifikation tumorassoziierter Peptide zu leisten.

Im Falle der Nierenzellkarzinome konnten aus der umfangreichen Anzahl der etablierten Tumorantigene (Tabelle 16, Kap. 3.1.3) nur aus vier Proteinen, nämlich aus Adipophilin, aus dem MET-Protoonkogen, aus der Carboanhydrase 9 und aus Cyclin D1 in dieser Arbeit Peptide sequenziert werden. Mit Ausnahme von Cyclin D1 waren dies auch die einzigen Genprodukte aus dieser Gruppe der etablierten Antigene, die im Rahmen der Genexpressionsanalyse in den meisten Tumoren als überexprimiert gemessen wurden. Man könnte also argumentieren, dass insbesondere solche Peptide an der Zelloberfläche in hoher Dichte präsentiert werden, die aus auf Translationsebene überexprimierten Genprodukten stammen. Diese Vermutung ist auch in sofern statthaft, als dass nachgewiesen ist, dass Peptide aus im Tumor überexprimierten Genprodukten als tumorassoziierte T-Zellepitope wirken können (68;87;175;187;312;317). Betrachtet man jedoch die Gesamtheit der auf den Nierenzellkarzinomen und den akuten myeloischen Leukämien gefundenen Peptide und die korrespondierenden Genexpressionsanalysen, so zeigt sich, dass die meisten HLA-Liganden aus Proteinen stammen, deren Expression auf Transkriptionsebene nicht alteriert ist. Gerade Proteine, die in dieser Arbeit als dominante Peptidquellen identifiziert wurden, aus denen also wiederholt Peptide identifiziert wurden, zeigten sich in der Genexpressionsanalyse als nicht-überexprimiert. Es stellt sich also generell die Frage, inwieweit die Dichte der HLA-Präsentation eines Peptids von der Höhe der Expression des Quellproteins abhängt. Dieser Frage ging Andreas Weinzierl, ein Mitarbeiter der Arbeitsgruppe durch differentielle Analyse der HLA-Expression und Genexpression der Tumoren RCC099 (HLA-A*02, -A*03, -B*27, -B*57), RCC100 (HLA-A*02, -A*03, -B*07, -B*18) and RCC110 (HLA-A*02, -A*68, -B*18, -B*27) sowie der korrespondierenden autologen gesunden Nierengewebe nach. Die vergleichende semiquantitative Analyse der HLA-präsentierten Peptide wurde mit der Methodik der differentiellen N-terminalen Isotopen-Codierung (dNIC) durchgeführt (226). Die vom Tumor eluierten Peptide wurden mit „schwerer“ Nicotinsäure (Deuterium), die vom Normalgewebe eluierten Peptide mit „leichter“ Nicotinsäure (Wasserstoff) markiert. Damit wurde eine massenspektrometrische Differenzierbarkeit der

Peptide durch die Molekulargewichtsdifferenz von 4 Da erreicht, bei identischen physikalisch-chemischen Eigenschaften. Die relativen Genexpressionswerte wurden gegen die relativen Peptidpräsentationsquotienten aufgetragen. Im Ergebnis betrug der Korrelationskoeffizient für zwischen der relativen Genexpression und der relativen Peptidpräsentation bei Signifikanzbedingungen $R=0.32$. Die hohe Expression eines Genprodukts auf Transkriptionsebene lässt also nicht ohne weiteres auf eine quantitativ höhere Peptidpräsentation an der Zelloberfläche schließen (436). Diese geringe Korrelation erklärt sich aus der unterschiedlichen Transkriptionseffizienz und der unterschiedlichen Halbwertszeit der Proteine in der Zelle sowie aus den verschiedenen Prozessen der Proteindegradation und Antigenprozessierung, die, wie in der Einleitung dieser Arbeit (Kap. 1.1.2.) dargestellt, ebenso qualitative und quantitative Einflüsse auf die Peptidpräsentation nehmen.

Die von Weinzierl *et al.* beschriebene geringe Vorhersagewahrscheinlichkeit der Genexpressionsanalyse hinsichtlich der Peptidpräsentation schränkt zweifelsfrei die Aussagekraft der in dieser Arbeit verwendeten Methodik zur Identifizierung tumorassoziierter Antigene ein. Andererseits ist die Entstehung immunogener T-Zellepitope aus im Tumor überexprimierten Genprodukten, wie zu Beginn dieses Kapitels und in der Einleitung dieser Arbeit dargestellt, gut dokumentiert. Fraglich ist allerdings, ob die tumorselektive T-Zell-Reaktivität gegen diese Antigene aus einer höheren Dichte der Präsentation eines Peptids an der Zelloberfläche resultiert.

Ebenso ungeklärt ist weitestgehend, welche Mechanismen darüber entscheiden, ob Peptide aus einem stark überexprimierten Protein nun an der Zelloberfläche in höherer Dichte präsentiert werden oder eben nicht.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die *GenChip*-basierte Expressionsanalyse die einzige verfügbare und rationell durchführbare Methodik zur umfassenden Diagnostik der zellbiologischen Veränderungen in der Tumorzelle ist und dass ihre Kombination mit der massenspektrometrischen Sequenzierung möglichst vieler HLA-präsentierter Peptide nach wie vor die einzige praktikable experimentelle Möglichkeit darstellt, ein möglichst umfassendes Bild von den tumorimmunologischen Gegebenheiten auf einer

neoplastischen Zelle zu gewinnen. Genprodukte, die als stark überexprimiert gemessen wurden dürfen als potentiell tumorassoziiert gelten, insbesondere vor dem Hintergrund, dass für viele der in dieser Arbeit besprochenen überexprimierten Genprodukte der onkobiologische Mechanismus der Überexpression bekannt ist.

Massenspektrometrisch identifizierte Peptide aus solchen Genprodukten dürfen ebenfalls als potentiell tumorassoziiert gelten, die Tatsache, dass die Immunogenität einer ganzen Reihe von auf diese Weise als tumorassoziiert postulierten Peptiden bereits nachgewiesen ist, unterstreicht dies.

Die endgültige Entscheidung über die Immunogenität eines HLA-Liganden und damit der Nachweis seiner Identität als tumorassoziiertes T-Zellepitop kann jedoch nur durch die Durchführung entsprechender T-Zellstimulationsversuche gefällt werden. Eine Aussage darüber, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein Peptid aus einem stark überexprimierten Genprodukt nun auch tatsächlich als tumorassoziiertes T-Zellepitop wirkt, kann zur Zeit nicht getroffen werden.

4.1.2. Diskussion der Methodik: Etablierung von Zelllinien aus soliden Tumoren

Die erste erfolgreiche Kultivierung humaner Nierenzellkarzinomzellen geht auf das Jahr 1957 zurück (319), es handelte es sich jedoch lediglich um die Kurzzeitkultur dieser neoplastischen Zellen. Seitdem wurde eine Reihe erfolgreicher Versuche unternommen Zelllinien aus soliden Nierentumoren anzulegen (91).

Die Etablierung von Zelllinien aus Nierenzellkarzinomen stellt kein triviales Unterfangen dar: Die auf diesem Gebiet sehr erfahrene Arbeitsgruppe um Bander und Ebert berichten über Erfolgsraten von 12,7%, wobei nach ihrer Erfahrung praktisch nur Zelllinien aus Tumoren mit „klinisch aggressivem“ Wachstumsmuster gewonnen werden konnten (92).

In dieser Arbeit wurde versucht, in der Langzeitkultur stabil wachsende Nierenzellkarzinomzelllinien anzulegen. Die Motivation zur Anlage von Tumorzelllinien aus soliden Nierenzellkarzinomen wurde in Kapitel 3.2. ausführlich erörtert, die angewendete Methodik ist in Kapitel 2.3.5. dargestellt.

Die Isolation von vitalen Zellen aus den soliden Tumoren war praktisch immer erfolgreich, die Aufarbeitung von 13 soliden Tumoren in der in Kapitel 2.3.5. dargestellten Weise erbrachte in allen Fällen adherente Zellen. Allerdings ergaben sich in der weiteren Kultivierung verschiedene Probleme: in einem von 13 Fällen konnte in den ersten zwei Wochen der Kultur kein Wachstum von Zellen festgestellt werden. In 2 von 13 Fällen erreichten die zunächst proliferierenden Zellen keine Konfluenz bzw. konnten nicht erfolgreich passagiert werden. In weiteren zwei Fällen konnten lediglich Zellen in Kultur gebracht werden, die mikroskopisch offensichtlich Fibroblasten entsprachen. Aus 7 Tumoren konnten Zellen über mehrere Passagen kultiviert werden, die morphologisch Tumorzellen entsprachen, allerdings stellten diese im Zeitraum von 3 bis 9 Wochen ihr Wachstum ein, und waren nicht weiter passagierbar. Lediglich eine Zelllinie, RCC116CL konnte über 12 Wochen und 16 Passagen kultiviert werden. Zellen dieser Linie wurden eingefroren und waren auch nach einer Auftauprobe wieder stabil zu kultivieren.

Die Tatsache, dass aus allen aufgearbeiteten Tumoren adherente und in den allermeisten Fällen auch proliferierende Zellen gewonnen werden konnten zeigt, dass das verwendete Protokoll zur Isolation vitaler Zellen im Prinzip funktioniert. Das Trauma der chirurgischen „Explantation“ und damit Devaskularisation und Ischämie im Zellverband teilweise über Zeiträume von mehr als 90 min wurde offensichtlich von den Tumorzellen problemlos toleriert. Ebenso problemlos wurde das Verfahren zur Degradation des Tumorstromas mit mechanischer Zerkleinerung des Tumors und Verdau durch Kollagenase, Hyaluronidase und DNase über mehrere Stunden von den Tumorzellen toleriert.

Zu erwarten war, dass einige der isolierten Zellen in Kultur nicht wachsen würden, bzw. nicht passagierbar sein würden, da die Adaptation an die *in vitro*-Bedingungen wohl von Natur aus nicht von jeder Zelle bewältigt wird. Dies ist damit erklärlich, dass *in vitro* trotz optimierter Kulturmedien und dem Einsatz von Kälberserum und zusätzlichen Wachstumsfaktoren niemals derart optimale Bedingungen geschaffen werden können wie sie *in vivo* vorzufinden sind.

Unerwartet hingegen war die Tatsache, dass der größte Prozentsatz der Zellen nach initial gutem Wachstumsverhalten nach durchschnittlich ca. 10 Passagen ihr Wachstum einstellen, und zwar unabhängig voneinander in verschiedenen Kulturgefäßen und unter Kultivierung in Medium verschiedener Herstellungsserien („Batches“). Man könnte argumentieren, dass man in diesen Fällen keine immortalisierten Tumorzellen sondern z.B. Fibroblasten kultiviert hat, dies erscheint jedoch sehr unwahrscheinlich, da Fibroblasten mikroskopisch relativ eindeutig zu erkennen sind, was auch photographisch dokumentiert wurde (Kap. 3.2.).

Warum nun Tumorzellen in Kultur nach anfänglich gutem Wachstum nach einer gewissen Zeit die Proliferation einstellen bleibt im vorliegenden Falle ungeklärt, Möglichkeiten der Spekulation allerdings gibt es viele. So könnten die Kulturbedingungen nicht optimal gewesen sein oder interzelluläre Effekte, die auf in den Anfangspassagen noch vorhandenen Stromazellen basieren, könnten essentiell für das Tumorzellwachstum gewesen sein. Nicht zuletzt könnten die kultivierten Zellen primär nicht immortalisiert gewesen sein, was auch vor dem Hintergrund der aus der Leukämieforschung bekannten „Krebsstammzellen“ (176) bedacht werden muss. Aller Wahrscheinlichkeit jedoch nach handelt es sich bei diesem Problem um einen systematischen Fehler in den frühen Passagen der Tumorzellkultur, der im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht gelöst werden konnte.

Im Gegensatz zu den hier diskutierten Problemen konnte die Zelllinie RCC116CL über viele Passagen stabil kultiviert und auch durchflusszytometrisch analysiert werden, sie kann einer weiteren Analytik zugeführt werden.

4.1.3. Diskussion der Methodik: T-Zellstimulationsanalysen mit Peptiden der Zelllinie RCC68CL

Der entscheidende Schritt in der Identifikation von tumorassoziierten T-Zellepitopen ist die Analyse von Peptiden hinsichtlich ihrer Immunogenität in T-Zellstimulationsversuchen. Tumorpeptide, gegen die *in vitro* eine T-Zell-Antwort generiert werden kann stellen vielversprechende Kandidaten für die

Immuntherapie dar. Wir versuchten in der vorliegenden Arbeit drei verschiedene Peptide, die während der Analyse der Zelllinie RCC68CL identifiziert wurden, hinsichtlich ihrer Immunogenität zu testen. Im Falle eines positiven Ausgangs dieser Experimente hätten wir in weiteren Versuchen die zytotoxische Aktivität der T-Zellen gegen RCC68CL studieren können. Damit wäre die Durchführbarkeit unseres Ansatzes zur Identifizierung tumorassoziierter HLA-Liganden für die Immuntherapie des Nierenzellkarzinoms und die prinzipielle Wirksamkeit dieser Peptide als Therapeutika zumindest *in vitro* beweisbar gewesen.

Bedauerlicherweise konnten in allen 9 getesteten Spendern keine schlüssigen Ergebnisse generiert werden. Dies gründet sich darauf, dass gegen die als Positivkontrollen verwendeten etablierten T-Zellepitope aus Melan-A und CMV-Proteinen keine T-Zellreaktion beobachtet werden konnte, womit sich eine weitere Interpretation der Ergebnisse verbietet.

Es sind also methodische Probleme als Grund für das Fehlschlagen der Experimente anzunehmen. Wie im Ergebnisteil dieser Arbeit gezeigt wurde, verliefen die Arbeitsschritte der Aufreinigung und Kultivierung CD8⁺ T-Zellen aus Blutprodukten fehlerfrei, in allen analysierten Proben konnten nach der fünfwöchigen Kulturzeit lebende CD8⁺ Zellen nachgewiesen werden. Es ist also wahrscheinlich, dass ein systematischer Fehler in der Stimulation der T-Zellen mit den Peptid:MHC/anti-CD28-Microbeads oder in deren Synthese vorlag. Ebenso als Fehlerquelle nicht auszuschließen ist die analytische Färbung der T-Zellen mit Peptid:MHC-Fluochrom-Tetrameren. Im Falle der Analyse des EGLN3-Peptids konnte die Tetramerfärbung als Fehlerquelle einwandfrei identifiziert werden: die unspezifische Bindung des Tetramers auf CD8⁺ Zellen führte zu falsch positiven Ergebnissen. Diese Tendenz zur unspezifischen Bindung des Tetramers beruht mit großer Wahrscheinlichkeit auf einer fehlerhaften Synthese, Rückfaltung oder Handhabung des entsprechenden EGLN3-Peptid:MHC-Monomers. Derartige Fehler können auch für die anderen verwendeten Peptid:MHC-Monomere nicht ausgeschlossen werden. Da diese Monomere auch zur Synthese der Peptid:MHC/anti-CD28-Microbeads

verwendet wurden, ist davon auszugehen, dass eine suffiziente Stimulation einer T-Zell-Reaktion mit den verwendeten Reagenzien nicht möglich war.

Dementsprechend sind die Ergebnisse dieser Versuchsreihe hinsichtlich der Beantwortung der Frage nach der Immunogenität der getesteten Peptide nicht weiter interpretierbar. Eine ausgedehnte Evaluation der Methodik und die folgende erneute Analyse der Peptide ist also zur Klärung dieser Frage unbedingt von Nöten.

4.2. Zusammenfassende Diskussion der durch Nierenzellkarzinome präsentierten Peptide (solide Tumoren und Zelllinie)

Übergeordnetes Ziel dieser Arbeit war die Identifikation von Peptiden aus tumorassoziierten Antigenen im Nierenzellkarzinom. Eine potentielle Tumorassoziation wurde angenommen, wenn die den Peptiden zugehörigen Genprodukte im Tumormaterial relevant, das heißt um mindestens den Faktor 3 gegenüber dem korrespondierenden Normalgewebe überexprimiert waren und in anderen Normalgeweben keine relevante Expression zu detektieren war. Zu diesem Zweck wurden zahlreiche solide Nierenzellkarzinome sowie eine Nierenzellkarzinomzelllinie analysiert.

In diesem Kapitel sollen nun all jene Peptide diskutiert werden, für die sich der Verdacht einer Tumorassoziation im Nierenzellkarzinom ergab, unabhängig davon, ob sie in soliden Tumoren oder in der Zelllinie gefunden wurden.

Diese potentiell tumorassoziierten Peptide können formal in drei Gruppen eingeteilt werden:

1. Peptide aus konstitutiv in Nierenzellkarzinomen überexprimierten Quellproteinen.
2. Peptide aus Proteinen, die nur in einzelnen, individuellen Nierenzellkarzinomen relevant überexprimiert waren,
3. Peptide aus bereits etablierten Tumorantigenen des Nierenzellkarzinoms.

Alle nachfolgend genannten Peptide sind hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit in der experimentellen Tumormimmuntherapie zu diskutieren. Peptide der Gruppen 1 und 3 sollten in praktisch allen Nierenzellkarzinompatienten mit klarzelliger Histologie und mit passender HLA-Typisierung als Vaccinen eingesetzt werden können. Die Verwendung von Peptiden der Gruppe 2 hingegen bleibt naturgemäß auf solche Patienten beschränkt, in deren Tumor eine Überexpression des korrespondierenden Genproduktes individuell nachgewiesen werden kann.

Vor einem Einsatz als Vaccine sollte für jedes Peptid die Immunogenität in T-Zellstimulationsversuchen nachgewiesen werden. Für manche der gezeigten Peptide wurde dies bereits durch andere Arbeitsgruppen durchgeführt, andere Peptide wurden im Rahmen dieser Arbeit getestet. Für die meisten der, in dieser Arbeit als potentiell tumorassoziiert identifizierten Peptide liegen T-Zell-Daten jedoch noch nicht vor.

Jeder der oben genannten Gruppen ist im Folgenden ein Kapitel gewidmet.

4.2.1. Gruppe 1: Peptide aus dominanten Peptidquellen und konstitutiv in Nierenzellkarzinomen überexprimierten Quellproteinen

Die meisten Peptide, die im Rahmen der Analyse der soliden Nierenzellkarzinome sequenziert wurden, müssen als Selbstpeptide ohne Tumorassoziation und Relevanz für die Tumormimmunologie aufgefasst werden. Diese Selbstpeptide entstammten insbesondere Strukturproteinen wie *Vimentin*, *Actin*, *Spectrin*, *Myosin u.v.a.* und konstitutiv exprimierten Enzymen wie der *Aldolase A*. Aus diesen Proteinen konnten wiederholt auf mehreren Tumoren verschiedene Peptide identifiziert werden, es handelt sich bei diesen Proteinen also um dominante Quellen von Selbstpeptiden. Mit Ausnahme von *Vimentin*, dessen starke Expression in klarzelligen Nierenzellkarzinomen ein bekanntes Phänomen ist, konnte in unseren Genexpressionsanalysen keine relevante Überexpression der genannten Genprodukte detektiert werden. Bemerkenswert in diesem Zusammenhang jedoch ist, dass mit dem SEREX-Verfahren (66;67;405) kürzlich reaktive Antikörper gegen die *Aldolase A* (ALDOA; NY-LU-

1), im Serum von an Bronchialkarzinomen erkrankten Patienten gefunden werden konnten (147).

Im Gegensatz zu den genannten Quellen von Selbstpeptiden erwiesen sich jedoch auch solche Proteine, für die eine Tumorassoziation bekannt oder zumindest wahrscheinlich ist, als dominante Peptidquellen, da aus ihnen wiederholt MHC-Liganden der verschiedensten Restriktionen auf verschiedenen Tumoren identifiziert werden konnten. Insbesondere sind hier die Quellproteine *Adipophilin* (ADFP) und *Apolipoprotein L 1* (APOL1) zu nennen. Sieben Peptide aus ADFP konnten im Rahmen dieser Arbeit identifiziert werden, zwei Peptide konnten aus APOL1 auf 4 Tumoren gefunden werden.

Für eines der *Adipophilin*-Peptide konnte durch eine andere Arbeitsgruppe nachgewiesen werden, dass es als immunogenes T-Zell-Epitop wirkt und die Tumorzelllyse durch T-Zellen vermittelt (351). Die hohe Expression von *Adipophilin* besonders in klarzelligen Nierenzellkarzinomen, das häufige Vorkommen von *Adipophilin*-Peptiden auf Tumorzellen sowie die nachgewiesene Immunogenität eines dieser Peptide lassen *Adipophilin* als ein attraktives Quellprotein von Peptiden für die Tumor-Vaccinierung erscheinen. Als Limitation für den Einsatz in der Immuntherapie erscheint lediglich die relativ hohe Expression von *Adipophilin* in der weiblichen Mamma (158) und in am Lipidmetabolismus beteiligten Geweben (41;118;119;157). Aus unserer Sicht erscheint der Einsatz von *Adipophilin*-Peptiden in der experimentellen Immuntherapie des Nierenzellkarzinoms erstrebenswert, er sollte jedoch aus letztgenannten Gründen zunächst auf männliche Patienten beschränkt bleiben. Ähnliches gilt für das APOL1: Die Identifikation des Proteins als dominante Peptidquelle und die deutliche Überexpression des Genprodukts in der Mehrzahl der getesteten Tumoren lässt die Peptide aus APOL1 als interessante Kandidaten für eine experimentelle Immuntherapie erscheinen. Insbesondere erscheint die Testung der APOL1-Peptide in T-Zellstimulationsversuchen als erstrebenswert, da leider bisher keine Daten zur Immunogenität von APOL1-Peptiden vorliegen. Dem Einsatz von APOL1-Peptiden in der Immuntherapie steht die sehr heterogene Expression des Genprodukts entgegen: Zwar war APOL1 in 10 von 13 Tumoren relevant überexprimiert, 5 Tumoren jedoch fielen

durch eine besonders massive Expression auf. Vor diesem Hintergrund erscheint die Erhebung des individuellen Expressionsstatus von APOL1 in eventuellen Vaccinierungsstudien mit diesem Peptid sinnvoll.

Eine Reihe weiterer Proteine konnte durch ihre konstitutiv hohe Genexpression auf Transkriptionsebene zumindest als sehr wahrscheinlich tumorassoziiert identifiziert werden. Allerdings konnten aus diesen Proteinen nur wenige Peptide sequenziert werden, was die Vermutung zulässt, dass es sich bei ihnen um weniger dominante Peptid-Quellen handelt bzw. dass die Dichte der Präsentation der korrespondierenden Peptide auf der Zelloberfläche relativ geringer zu den Vorgenannten ist.

Dies gilt insbesondere für die Proteine *regulator of G-protein signalling 5* (RGS5) und *insulin-like growth factor binding protein 3* (IGFBP3): Aus beiden Proteinen konnten zwar nur wenige Peptide, zwei im Falle von RGS5, eines im Falle von IGFBP3, sequenziert werden, jedoch zeigen sich beide Genprodukte auf Transkriptionsebene in den allermeisten Tumoren stark überexprimiert, was sich mit bereits veröffentlichten Beobachtungen gut deckt (5;69;166). Damit ist auch für diese Proteine eine Tumorassoziation anzunehmen, die ein weiteres Studium einerseits hinsichtlich der Immunogenität der korrespondierenden Peptide, andererseits hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit in der Immuntherapie rechtfertigt. IGFBP3 wird unter den „Normalgeweben“ lediglich in der Plazenta recht hoch exprimiert, was hinsichtlich der Verwendung seiner Peptide in der Immuntherapie sicherlich als irrelevant gewertet werden kann; RGS5 dagegen zeigte sich in einigen Geweben moderat exprimiert (Kap. 3.1.4.), was den immuntherapeutischen Einsatz seiner Peptide limitieren könnte.

Auch der *eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6* (EIF3S6) wurde in allen analysierten Tumoren relevant überexprimiert gemessen. Das Protein wurde mit der Pathogenese des Mammakarzinoms in der Maus in Verbindung gebracht (53) und zeigte sich in seiner Expression in einer Reihe von Tumorentitäten dysreguliert (50;247;263;432). Zwei Peptide aus diesem Protein konnten auf der Zelllinie RCC68CL gefunden werden, eine Immunogenität dieser Peptide konnte jedoch in durchgeführten T-Zellstimulationsversuchen

aufgrund der unschlüssigen Datenlage und methodischer Probleme nicht nachgewiesen werden.

Neben den Genannten fielen weitere Genprodukte in der systematischen Auswertung der Genexpressionsanalysen dadurch auf, dass sie in den meisten Tumoren relevant, zum Teil extrem überexprimiert waren, Peptide konnten aus ihnen jedoch nicht gewonnen werden. Dies traf insbesondere zu auf das *Ubiquitin D* (UBD, Entrez Gene ID: 10537) und den *regulator of G-protein signalling 1* (RGS1; Entrez Gene ID: 5996). Beide zeigten in gesunden Geweben praktisch keine Expression, waren in den Tumoren jedoch konstitutiv deutlich überexprimiert, RGS1 zweimal sogar um Faktoren jenseits der hundertfachen relativen Expression im Vergleich zur Normalniere. Diese Genprodukte zeigten also im Hinblick auf Tumorassoziation und experimentelle Vaccinierungsstrategien perfekte Expressionsschemata. Aus unserer Sicht empfiehlt sich also die gezielte Suche nach Peptiden aus UBD und RGS1, z.B. mit den bioinformatischen Methoden der Epitopvorhersage und der konsekutiven, gezielten massenspektrometrischen Analyse.

Auch die Tumorantigene *MET-Protoonkogen* (MET) und *Carboanhydrase 9* (CA9) waren in den getesteten Nierenzellkarzinomen konstitutiv überexprimiert. Ihre Diskussion findet jedoch in Kapitel 4.2.3. statt, da es sich um etablierte, klassische Tumorantigene handelt.

Im Zusammenhang mit den in diesem Kapitel diskutierten konstitutiv überexprimierten Genprodukten im Nierenzellkarzinom ist auch der *hypoxia-inducible factor* (HIF) zu nennen. Wie in der Einleitung dieser Arbeit ausführlich dargestellt (Kap. 1.2.3), ist bekannt, dass HIF insbesondere jedoch seine Untereinheit *hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit* (HIF1A) aufgrund der VHL-Mutation in den meisten klarzelligen Nierenzellkarzinomen in sehr hoher Konzentration vorliegt. Ein Peptid aus diesem Protein, MEDIKILIA (HLA-B*45) ist aus der Analyse von RCC68CL und RCC68sT bekannt. Da es sich im Falle dieses Proteins jedoch um eine „Überexpression“ aufgrund dysregulierter Degradation handelt, die unserer Expressionsanalyse auf Transkriptionsebene naturgemäß nicht zugänglich ist, kann hier keine Aussage über den Expressionsstatus von HIF in den analysierten Tumoren gemacht werden.

Nichtsdestotrotz erscheinen HIF-Peptide aufgrund der molekularen Pathophysiologie des Nierenzellkarzinoms als interessante Antigene hinsichtlich einer potentiellen Vaccinierungstherapie. In jedem Falle jedoch ist die detaillierte Analyse der HIF-Expression, der HLA-präsentierten Peptide aus HIF und die Abklärung derselben hinsichtlich ihrer Immunogenität erstrebenswert.

4.2.2. Gruppe 2: Peptide aus Proteinen, für die nur in individuellen Fällen eine Tumorassoziation vermutet werden darf

Mehrfach wurde in dieser Arbeit schon darauf verwiesen, dass Tumoren, auch jene der Niere, intra- wie interindividuell genetisch und auch immunologisch als äußerst heterogen aufzufassen sind. Eine maßgeschneiderte Immuntherapie, die Antigene berücksichtigt, die unter Umständen nur auf einzelnen Tumoren vorhanden sind, erscheint also erstrebenswert. In diesem Zusammenhang gewinnen Proteine an Bedeutung die nur in individuellen Tumoren überexprimiert sind.

Solche Proteine, die nur in individuellen Tumoren, dort aber zum Teil extrem überexprimiert waren, konnten mehrfach identifiziert werden. Allerdings konnten im Rahmen der Analyse der soliden Nierenzellkarzinome nur aus drei dieser Proteine einzelne Peptide sequenziert werden, und zwar aus der *Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4* (ACSL4), aus der *matrix metalloproteinase 7* (MMP7) und aus *cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1* (CYP1B1).

Die ACSL4 gehört zwar zu den relativ dominanten Quellproteinen in der Analyse der Nierenzellkarzinome, es konnten immerhin zwei verschiedene Peptide aus diesem Protein auf drei Tumoren gefunden werden. Jedoch konnte das Genprodukt nur in einem der analysierten Tumoren (RCC75) als deutlich gegenüber allen anderen Geweben überexprimiert gemessen werden. Auch die MMP7 und das CYP1B1 waren in einzelnen Tumoren derart überexprimiert, dass eine Tumorassoziation vermutet werden darf, jeweils ein Peptid wurde aus diesen Proteinen gewonnen. Die Expression aller drei Genprodukte in einzelnen Normalgeweben, CYP1B1 in dendritischen Zellen, MMP7 in der

Blase und ACSL4 in der Lunge limitiert jedoch ihren Einsatz als Zielstrukturen der Immuntherapie.

Das Genprodukt *fatty acid binding protein 7, brain* (FABP7) hingegen zeigte sich in einzelnen Tumoren extrem, über den Faktor 100 hinaus gegenüber der Normalniere überexprimiert ohne dass eine relevante Expression in Normalgeweben zu detektieren gewesen wäre. Im Rahmen der Analyse der soliden Tumoren konnten allerdings keine Peptide aus diesem Protein gewonnen werden; ein FABP7-Peptid ist dennoch bekannt, und zwar aus der Analyse der Zelllinie RCC68CL. Die extrem hohe Expression des Proteins FABP7 in einigen soliden Tumoren macht es zu einem potentiellen Tumorantigen und seine Peptide damit zu potentiellen immuntherapeutischen Zielstrukturen in Patienten, die eine solche Überexpression aufweisen. Die Immunogenität des identifizierten FABP7-Peptids sollte im Hinblick auf seine Tauglichkeit für immuntherapeutische Studien in T-Zellstimulationsversuchen weiter analysiert werden.

Drei weitere Peptide, die in der Zelllinie RCC68CL gefunden wurden, scheinen in individuellen Tumoren besonders hoch exprimiert: Das *kinetochore associated 2 Protein*, das *cell transforming sequence 2 oncogene* sowie das *coiled-coil domain containing 99 Protein* waren zwar jeweils in mehreren Tumoren relevant überexprimiert, die jeweils bei weitem stärksten Expressionswerte unter den soliden Tumoren ergaben sich jedoch für RCC68sT, womit zumindest in dieser Probe eine individuelle Tumorassoziation dieser Proteine postuliert werden darf. Bemerkenswert erschien ebenso die Tatsache, dass alle drei Genprodukte unter den Normalgeweben die bei weitem höchsten Expressionswerte im Hoden zeigten wie dies von den *Cancer-Testis*-Antigenen bekannt ist. Ob es sich bei diesen Proteinen tatsächlich um *Cancer-Testis*-Antigene handelt kann in dieser Arbeit nicht beantwortet werden und sollte Gegenstand weiterer gezielter Untersuchungen sein. T-Zellstimulationsversuche mit dem Peptid aus KNTC2 blieben in dieser Arbeit aufgrund der unschlüssigen Datenlage leider ohne verwertbare Aussage hinsichtlich der Immunogenität dieses HLA-Liganden.

Eine weitere Untersuchung dieser HLA-Liganden hinsichtlich ihrer Immunogenität erscheint in jedem Falle angebracht, auch vor dem Hintergrund, dass bereits durch andere Arbeitsgruppen zumindest das Protein KNTC2 als überexprimierter Marker in mehreren Tumoren vorgeschlagen wurde (129).

Eine Reihe weiterer Genprodukte konnte in einzelnen oder mehreren Nierenzellkarzinomen als stark überexprimiert identifiziert werden, ohne dass aus ihnen Peptide gewonnen werden konnten. Dieses gilt für den *G protein-coupled receptor 109B* (GPR109B), die *procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2* (PLOD2), das *Angiopoietin-like 4* (ANGPTL4), das *hypoxia-inducible protein 2* (HIG2) sowie das *sperm associated antigen 4* (SPAG4). Weitere experimentelle Anstrengungen sind erforderlich um auch aus diesen Proteinen HLA-Liganden zu gewinnen. Die Expressionsdaten dieser Proteine lassen eine Tumorassoziation zumindest in einzelnen Patienten vermuten, so dass die weitere Analyse von Peptiden aus diesen Proteinen hinsichtlich ihrer Immunogenität gerechtfertigt ist.

Die Verwendung von individuell extrem überexprimierten Genprodukten als therapeutische Zielstrukturen erscheint attraktiv, da sie die Biologie des einzelnen Tumors berücksichtigen. Es bietet sich also zumindest theoretisch die Möglichkeit in immuntherapeutischen Studien durch Auswahl von HLA-Liganden aus solchen Proteinen Peptid-Vaccinen zusammenzustellen, die auf die individuellen tumorimmunologischen Gegebenheiten des einzelnen Patienten zugeschnitten sind. Hierzu ist jedoch in jedem Einzelfall eine ausgedehnte Diagnostik der Genexpression und im Idealfall auch der Peptidpräsentation nötig, die mit immensem, auch finanziellem Aufwand verbunden ist. Vor dem Hintergrund der HLA-Diversität in der Bevölkerung und den stark heterogenen Expressionsschemata der gezeigten Proteine ist jedoch eine umfassende Kenntnis zahlreicher Peptide notwendig, die momentan noch nicht vorliegt.

4.2.3. Gruppe 3: Peptide aus klassischen Tumorantigenen

Im Gegensatz zu den dargestellten vielfältigen neu identifizierten Peptiden aus genexpressionsanalytisch tumorassoziierten Antigenen und den vielen Peptiden aus Adipophilin konnten nur wenige Peptide aus anderen, bereits für das Nierenzellkarzinom etablierten Tumorantigenen massenspektrometrisch nachgewiesen werden. In Tabelle 16 (Kap. 3.1.3) waren etablierte Tumorantigene und T-Zellepitope aufgeführt worden. Aus diesen Proteinen waren neben den *Adipophilin*-Peptiden lediglich Peptide aus dem *MET-Protoonkogen*, der *Carboanhydrase 9* (CA9) und dem *Cyclin D1* (CCND1) identifiziert worden.

Hinsichtlich der Genexpression bot das MET-Protoonkogen eine relevante relative Überexpression größer Faktor 3 in 12 von 13 Tumoren, ohne in einem der gemessenen Normalgewebe bedeutsam exprimiert zu sein. Es konnte allerdings nur ein Peptid aus diesem Protein identifiziert werden; die Immunogenität dieses HLA-Liganden konnte durch eine andere Arbeitsgruppe nachgewiesen werden (343).

Die *Carboanhydrase 9*, aus der wir ebenso ein bisher unbekanntes Peptid identifizieren konnten, gilt als das klassische Tumorantigen des Nierenzellkarzinoms schlechthin: Die Höhe der CA9-Expression in Zellen des Nierenzellkarzinoms gilt als prognostischer Marker für die Erkrankung (47), der monoklonale Antikörper gegen die CA9, G250, bindet praktisch selektiv an Tumorzellen (88;287;288) und die CA9 ist als Zielstruktur experimenteller Therapien etabliert (163;183;213). Zusätzlich ist bekannt, dass die CA9 neben dem Nierenzellkarzinom in einigen anderen Tumoren stark exprimiert wird, so z.B. im Mamma-CA (372), im nichtkleinzelligen Lungen-CA (392) und in Plattenepithelkarzinomen des Hals-Nasen-Ohren-Bereichs (174;208). In unseren Genexpressionsanalysen war die CA9 ähnlich wie das *MET-Protoonkogen* in den meisten, in acht von dreizehn Tumoren relevant überexprimiert.

Damit zählen sowohl das *MET-Protoonkogen* als auch die *Carboanhydrase 9* formal zu den konstitutiv überexprimierten Antigenen im Nierenzellkarzinom. Aufgrund dieses Expressionsmusters stellen HLA-Liganden aus diesen

Proteinen Peptide dar, die wie auch die Adipophilin-Peptide in den meisten Patienten zur Vaccinierung eingesetzt werden könnten.

Im Gegensatz zu den vielen HLA-Liganden aus Adipophilin konnten aus dem MET-Protoonkogen und der CA9 jedoch nur einzelne Peptide identifiziert werden, was die Vermutung zulässt, dass diese Peptide auf der Zelloberfläche in vergleichsweise sehr geringer Dichte präsentiert werden bzw. dass die korrespondierenden Proteine wenig dominante Peptidquellen darstellen.

Eine weitere etablierte Quelle immunreaktiver T-Zellepitope, aus der in dieser Arbeit ein Peptid sequenziert werden konnte, ist *Cyclin D1* (337). Dieses Protein ist in der Literatur ebenfalls als im Nierenzellkarzinom überexprimiert beschrieben (155;156). In unseren Genexpressionsanalysen allerdings konnten wir eine Überexpression von *Cyclin D1* nur in einem einzigen Tumor nachweisen, die mediane Expression der Tumoren zeigte mit einem Faktor von 0,9 dagegen keine relative Überexpression gegenüber der Normalniere. Somit kommen *Cyclin D1*-Peptide allenfalls in einzelnen Patienten mit nachgewiesener Überexpression des Proteins im Tumor für die Vaccinierung in Frage.

Während der Analyse der Zelllinie RCC68CL konnte mit dem HLA-A*02-präsentierten Peptid TLYEAVREV ein weiteres in der Literatur beschriebenes T-Zellepitop massenspektrometrisch nachgewiesen werden (204). Das Quellprotein dieses Peptids, das *ribosomal protein 10A* (RPL10A), zeigte sich jedoch in unseren Genexpressionsanalysen ebenso in keiner Probe relevant überexprimiert.

Das gleiche gilt ebenso für die anderen in Tabelle 16 gezeigten etablierten Antigene, aus denen keine Peptide gewonnen werden konnten: Survivin, PRAME, MAGEA3, RAGE, NY-ESO-1, MAGEA1, MUC1 und TERT. Alle diese Genprodukte zeigten sich allenfalls in einzelnen, meist in keinem der analysierten Tumoren überexprimiert, so dass nach unseren Daten eine Tumorassoziation für diese Proteine nicht bestätigt werden kann.

4.3. Einflüsse der spezifischen Onkobiologie klarzelliger Nierenzellkarzinome auf deren HLA-Ligandom

Vor Jahren ging man beim Nierenzellkarzinom noch von einer einheitlichen, solitären Entität aus. Dies ist vor den Erkenntnissen der onkobiologischen Forschung der Vergangenheit heute nicht mehr vertretbar. Bereits in der Einleitung dieser Arbeit waren die verschiedenen histopathologischen Phänotypen des Nierenzellkarzinoms thematisiert worden (Kap. 1.2.3.). Die verschiedenen Subtypen des Nierenzellkarzinoms unterscheiden sich wie bereits besprochen hinsichtlich ihrer feingeweblichen Herkunft, ihrer Onkogenese, ihrer Genetik und ihrer Prognose. Insbesondere im Hinblick auf die Tumorimmunologie muss der Begriff „Nierenzellkarzinom“ also als Überbegriff einer Gruppe maligner neoplastischer Entitäten der Niere aufgefasst werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zum einen eine Gruppe von Genprodukten und korrespondierenden Peptiden identifiziert werden, die praktisch selektiv in allen klarzelligen Nierenzellkarzinomen deutlich überexprimiert sind, zum anderen konnten Peptide aus einer Reihe von Proteinen identifiziert werden, die infolge der VHL-Mutation in klarzelligen Nierenzellkarzinomen hoch exprimiert werden und so zur Quelle nachweislich immunogener T-Zellepitope werden.

Die Identifikation solcher Gruppen von Peptiden würde im Rahmen einer zukünftigen experimentellen Immuntherapie die Auswahl von Peptiden zur Vaccinierung erleichtern, die Indikationsstellung zur Vaccinierung würde vom histologischen Phänotyp bzw. vom Nachweis einer VHL-Mutation abhängig gemacht werden können.

4.3.1. Die Überexpression von verschiedenen tumorassoziierten Genprodukten des Nierenzellkarzinoms scheint mit dem klarzelligen Phänotyp assoziiert zu sein

In der vorliegenden Arbeit wurden lediglich Karzinome des klarzelligen und des papillären Subtyps (RCC044, RCC075) analysiert. Auffallend war, dass einige Genprodukte in praktisch allen klarzelligen Karzinomen relevant überexprimiert waren, in den papillären Karzinomen jedoch keine Überexpression zeigten.

Dieses Phänomen wurde unter anderem für die auch immunologisch bedeutsamen Genprodukte *Vimentin* (VIM), *Adipophilin* (ADFP), *Carboanhydrase 9* (CA9) und *Ubiquitin D* (UBD) beobachtet.

Für Vimentin ist bekannt, dass es in klarzelligem Nierenzellkarzinomen hoch exprimiert wird, es wird als immunhistologischer Marker zur Unterscheidung der einzelnen Phänotypen des Nierenzellkarzinoms herangezogen. Für die anderen genannten Genprodukte ist dies unseres Wissens jedoch nicht bekannt.

Es kann also postuliert werden, dass eine diagnostische Differenzierung zwischen papillärem und klarzelligem Nierenzellkarzinom auf Ebene der Genexpressionsanalyse anhand der Genprodukte Vimentin, Adipophilin, CA9 und UBD möglich ist, da die genannten Genprodukte im klarzelligen Phänotyp praktisch konstitutiv, im papillären Phänotyp jedoch nicht exprimiert sind.

Die Genexpressionsschemata der genannten Proteine sind in den entsprechenden Kapiteln in Abbildungen (Abbildung 8 und Abbildung 9) dargestellt.

Im Hinblick auf eine Vaccinierungstherapie erscheinen somit Peptide aus den Proteinen Adipophilin, CA9 und UBD für alle, an einem klarzelligen Nierenzellkarzinom erkrankten Patienten verwendbar, auch ohne eine individuell durchgeführte Genexpressionsanalyse.

Weitere experimentelle Bemühungen sind notwendig um die hier postulierte Unterscheidbarkeit zwischen dem klarzelligen und dem papillären Nierenzellkarzinom auf Genexpressionsebene experimentell und statistisch weiter zu untermauern und auf die anderen histologischen Subtypen zu übertragen.

4.3.2. Die VHL-Mutation, der Transkriptionsfaktor HIF, und ihr Einfluss auf die Tumorantigene des Nierenzellkarzinoms

Bereits in der Einleitung dieser Arbeit (Kap. 1.2.3.) waren die, für das klarzellige Nierenzellkarzinom typischen Alterationen des von *Hippel-Lindau tumor suppressor Genes* (VHL), sowie ihre Auswirkungen auf den Transkriptionsfaktor *hypoxia-inducible factor* (HIF) kurz besprochen worden. Somatische Mutationen und epigenetische Veränderungen

(Hypermethylierung) des VHL-Genes (130) finden sich in mehr als der Hälfte der klarzelligen Nierenzellkarzinome. Das VHL-Protein ist unverzichtbarer Bestandteil des VEC genannten E3-Ubiquitin-Ligase Komplexes, der die zentrale Rolle in der schnellen Degradation des konstitutiv exprimierten *hypoxia-inducible factor* (HIF), bzw. seiner Untereinheit *hypoxia inducible factor 1 α* (HIF1 α) unter normoxischen Bedingungen spielt. Wird der Transkriptionsfaktor HIF in der gesunden Zelle unter hypoxischen Bedingungen nicht abgebaut so führt er zu einer Reaktion des zellulären Stoffwechsels auf die Hypoxie auf Transkriptionsebene. In Folge des, aufgrund der VHL-Mutation defekten VEC, kommt es zur Erhöhung des HIF Spiegels und zur konsekutiven Dysregulation der Transkription in klarzelligen Nierenzellkarzinomzellen auch unter normoxischen Bedingungen (294;390).

Da die massive Überexpression einzelner Genprodukte einen grundlegenden Mechanismus in der Generierung tumorassoziierter Antigene und infolgedessen immunogener Peptide darstellt, gewinnt die Akkumulation von HIF in der Nierenzellkarzinomzelle neben der tumorbiologischen- auch eine große tumorimmunologische Bedeutung.

Unter den in dieser Arbeit präsentierten klassischen Tumorantigenen des Nierenzellkarzinoms sind sowohl das Adipophilin (336) als auch das MET-Protoonkogen (153;301) und das Cyclin D1 (15;314) sowie die Carboanhydrase 9 (294;455) hypoxieinduzierbar und in ihrer Transkription HIF-sensibel.

Insbesondere für das klassische Tumorantigen des Nierenzellkarzinoms, die CA9 ist eine derart starke HIF-Responsibilität bekannt, dass sie bereits als endogener Marker für Gewebshypoxie evaluiert wurde (392).

Auch die Proteine *procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2* (PLOD2; Entrez Gene ID: 5352) (13;167) *Angiopoietin-like 4* (ANGPTL4; Entrez Gene ID: 51129) (222) und *hypoxia-inducible protein 2* (HIG2; Entrez Gene ID: 29923) (83), aus denen in dieser Arbeit zwar keine Peptide identifiziert werden konnten, die im Rahmen der Genexpressionsanalysen jedoch als Genprodukte auffielen, die in den meisten Tumoren massiv gegenüber allen anderen Normalgeweben überexprimiert waren, sind hypoxieinduzierbar und HIF-responsibel.

Es kann also postuliert werden, dass die Akkumulation von HIF in der Nierenzellkarzinomzelle ganz entscheidend die Generierung tumorassoziierter Antigene und damit die immunologische Oberflächenstruktur der Tumorzelle beeinflusst. Infolgedessen sollte die weitgehende Identifizierung HIF-responsibler Gene angestrebt werden.

Auch aus HIF selbst, genauer aus der Untereinheit HIF1 α konnte im Rahmen dieser Arbeit ein Peptid identifiziert werden: auf dem soliden Tumor RCC68 und auf der Zelllinie RCC68CL wurde das HLA-B*45 präsentierte Peptid, MEDIKILIA sequenziert. In keiner der analysierten Proben konnte eine Veränderung der Genexpression von HIF1 α detektiert werden, was auch nicht weiter verwunderlich ist, da HIF ja, wie bereits in der Einleitung dargestellt, ein konstitutiv exprimiertes Protein ist, dessen intrazelluläre Konzentration über die Degradation (VHL) reguliert wird. Diese Tatsache macht einen der Hauptnachteile der in dieser Arbeit verwendeten methodischen Kombination aus Massenspektrometrie und *GeneChip* basierter Genexpressionsanalyse zur Identifizierung tumorassoziierter Genprodukte und Peptide deutlich: Die Genexpressionsanalyse, die die intrazelluläre Konzentration einzelner mRNA-Spezies misst, erlaubt nur näherungsweise Aussagen über die intrazelluläre Proteinkonzentration. Die Einflüsse des teilweise komplex regulierten Proteinabbaus hingegen werden nicht erfasst. Bei, wie im Falle von HIF, herabregulierter Proteindegradation kommt es durch eine verlängerte Halbwertszeit der Proteine zu Kumulationseffekten, die durch die Genexpressionsanalyse nicht erkannt werden. Eine praktikable Methode, die analog zum *GeneChip* die semiquantitative Konzentrationsbestimmung der zellulären Proteinspezies ermöglicht würde dieses methodische Problem beheben, ist jedoch zurzeit nicht verfügbar.

4.4. Vergleichbarkeit von onkoimmunologischen Daten aus der *in vitro*- und der *ex vivo*-Analyse

Die meisten, in der Literatur beschriebenen Genexpressions- und Peptiddaten wurden aus Zelllinien, also in der *in vitro*-Situation generiert. Die Analyse von

Zelllinien anstelle solider Tumoren bietet zahlreiche Vorteile, so ist die Probengröße beliebig wählbar und Experimente sind beliebig wiederholbar, auch entfallen logistische Probleme in der Beschaffung und Handhabung solider Tumoren. Ebenso sind Kontaminationen mit nicht-neoplastischen Zellen im Resektat in der *in vitro*-Situation kontrolliert. Nachteile der Analyse von Zellkulturen in diesem Zusammenhang sind die Veränderung des zellulären Phänotyps auf DNA-Ebene durch eventuelle Neumutationen in der Kultur und auf Transkriptions- und Translationsebene durch Adaptation des zellulären Metabolismus an die Kulturbedingungen. Auch treten in der Kultur Selektionseffekte auf, die durch die schnellere Adaptation einzelner Zellklone des Tumors an die Kulturbedingungen, und daraus folgenden höheren Proliferationsraten resultieren. Damit sind Daten aus *in vitro*-Experimenten per se nicht ohne weiteres auf die *in vivo*-Situation übertragbar.

Schon 1984 ging N. H. Bander der Frage nach der Vergleichbarkeit der Antigenpräsentation von Nierenzellkarzinomen *in vitro* und *in vivo* nach und untersuchte immunhistologisch die Präsenz von 11 Antigenen auf soliden Tumoren und deren autologen Zelllinien (23). Morschella et al untersuchten die gleiche Fragestellung 2003 unter Verwendung der *GeneChip* Technologie, und kamen zu dem Ergebnis, dass unter Kulturbedingungen die Expression vieler, auch tumorimmunologisch relevanter Antigene deutlich von ihrer Expression *in vivo* differiert (270).

In der vorliegenden Arbeit wurden Genexpressions- und Peptidsequenzdaten aus frisch rezidierten Nierenzellkarzinomen (*ex vivo*), sowie aus einer Tumorzelllinie (RCC68CL) gewonnen.

Um die Unterschiede von *in vitro*- und *ex vivo*-Daten hinsichtlich der Genexpression und Peptidpräsentation zu analysieren, verglichen wir die entsprechenden Daten des soliden Tumors RCC68 mit jenen der autologen Zelllinie RCC68CL systematisch.

Die Zelllinie RCC68CL wurde über 31 Passagen kultiviert, dadurch wurden 81g Zellmaterial gewonnen. Aus diesem Material wurde eine *GeneChip* basierte Genexpressionsanalyse sowie die massenspektrometrische Peptidsequenzierung durchgeführt.

Um die Unterschiede in der Genexpression zu analysieren wurden die relativen Expressionen der einzelnen, vom *GeneChip* Hersteller (Affymetrix) vorgegebenen Probe Sets zwischen solidem Tumor und Zellkultur verglichen. Wie in Abbildung 18 (Kap. 3.3.2.) dargestellt zeigten rund 74% der Probe Sets in der Zelllinie keine relevanten Veränderungen der Genexpression (relative Expressionswerte von 1/3- bis 3 fach). Nur rund 7% der gemessenen Probe Sets waren relevant (mindestens um den Faktor 3) in der Zelllinie gegenüber dem soliden Tumor überexprimiert, wohingegen 19% der Probe Sets in der Zelllinie relevant (mindestens um den Faktor 1/3) geringer exprimiert waren. Werden also Tumorzellen kultiviert, so scheinen sie im Rahmen der Adaptation an die *in vitro*-Situation die Expression von rund einem Viertel ihrer Gene relevant zu ändern, wobei die Expression der Mehrzahl der Genprodukte gedrosselt wird. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit jenen, die in den oben zitierten Arbeiten beschrieben wurden.

Weit weniger vergleichbar als die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen waren die Ergebnisse der Peptidsequenzierung: Aus dem soliden Tumor RCC68sT konnten 101 verschiedene Peptide, aus der Zelllinie 204 verschiedene Peptide sequenziert werden. Nur 20 identische Sequenzen wurden in beiden Proben gefunden. Damit war die Übereinstimmung der gefundenen Peptide zwischen den beiden Proben aus unserer Sicht überraschend gering.

Vielfältige Mechanismen könnten diesem Unterschied in der Peptidpräsentation zugrunde liegen, der naheliegenste scheint die beschriebene Veränderung der Genexpression im Rahmen der Adaptation an die *in vitro*-Bedingungen zu sein. Unter diesen Umständen jedoch müssten die meisten der *in vitro* gefundenen Peptide aus Proteinen stammen, die in der Zelllinie gegenüber dem soliden Tumor überexprimiert sind. Dies ist jedoch nicht der Fall: Unter den Peptiden, die nur in RCC68CL gefunden wurden entstammten nur rund 8% solchen Genprodukten, die in der Zelllinie relevant gegenüber dem soliden Tumor hochreguliert waren. 11% entstammten sogar solchen Genprodukten, die in der Zelllinie relevant niedriger exprimiert waren. Der Rest der Peptide, 81%, konnte

solchen Genprodukten zugeordnet werden, die in der Zelllinie gegenüber dem soliden Tumor regulatorisch nicht relevant verändert waren.

Es müssen also neben der alterierten Genexpression noch andere Mechanismen den Unterschied in der Peptidpräsentation bedingen.

Aus dem Gesagten lässt sich ableiten dass *in vitro* gewonnene tumorbiologische und tumorimmunologische Daten nicht ohne weiteres auf die Situation *in vivo* übertragen werden können. Im Hinblick auf die Gewinnung immuntherapeutisch relevanter Daten ist es aus unserer Sicht also unabdingbar die Peptidpräsentation auf Tumorzellen *in vivo* zu analysieren, was Experimente mit *ex vivo* Material, also in unserem Falle mit Tumorresektaten unumgänglich macht.

4.5. Zusammenfassende Diskussion der, durch Blasten der akuten myeloischen Leukämie präsentierten Peptide

Wie in der Einleitung ausführlich dargestellt gibt es in der experimentellen Therapie der akuten myeloischen Leukämie (AML) zahlreiche immuntherapeutische Ansätze, die eine Vaccinierungsstrategie mit tumorassoziierten Peptiden der AML verfolgen, um nach erreichter Remission residuale Blasten zu zerstören. In einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Dr. Banat der Medizinische Klinik IV der Justus-Liebig-Universität Gießen wurden Peptid- und Genexpressionsdaten aus primären AMLinv(16)-Zelllinien (FAB M4) gewonnen, um potentielle tumorassoziierte HLA-Liganden für derartige immuntherapeutische Studien zu definieren. Zum einen wurden, analog den Analysen der Nierenzellkarzinome, Genexpressions- und Peptiddaten aus zwei, respektive drei AMLs generiert, um das HLA-präsentierte Ligandom der Blasten zu charakterisieren, zum anderen wurde spezifisch nach Peptiden aus dem, für die AMLinv(16) charakteristischen Fusionsprotein CBF β -MYH11 gesucht.

Insgesamt konnten 268 verschiedene Peptide aus 239 Quellproteinen während der Analyse von 3 AMLinv(16)-Proben sequenziert werden. Eine Auffällig hohe

Redundanz in den Gefundenen Peptiden wurde mit 38 identischen Sequenzen für die Proben AML03 und AML04 festgestellt. Worin sich diese Redundanz gründet ist ungeklärt, beide Zelllinien stimmen zwar in zwei ihrer HLA-Allele überein, waren in ihrer HLA-Typisierung sonst jedoch eindeutig zu differenzieren, und auch in den Genexpressionsanalysen zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den beiden Proben. Ob diese hohe Redundanz in der Peptipräsentation als Zeichen einer relativ konstanten interindividuellen Biologie der AMLinv(16) gewertet werden kann, kann in dieser Arbeit nicht beantwortet werden, die AML01, die in keinem ihrer HLA-Allele mit den anderen Proben übereinstimmte, zeigte jedenfalls kaum Redundanzen mit der AML03 und der AML04, weder hinsichtlich der gefundenen Peptide, noch hinsichtlich der identifizierten Quellproteine.

4.5.1. HLA-Liganden aus der CBF β -MYH11-Fusionssequenz

Peptide die die Fusionssequenz des, für die AMLinv(16) typischen Fusionsproteins CBF β -MYH11 umfassen, sollten die Erkennung von leukämischen Zellen durch das Immunsystem, speziell durch das T-zelluläre System ermöglichen. T-Zellepitope aus dem für die chronisch myeloische Leukämie charakteristischen Fusionsprotein BCR-ABL sind bereits bekannt (39;451).

Durch Arbeiten von Banat et al ist bekannt, dass Hybridome aus AMLinv(16)-Blasten und autologen dendritischen Zellen, sowie auch native AMLinv(16)-Blasten in der Lage sind autologe T-Lymphozyten zu stimulieren. Diese stimulierten T-Zellen wiederum sind in der Lage autologe AML-Zellen zu lysieren. Die Tatsache, dass Antikörper gegen HLA-Klasse-I-Moleküle diese Effektorfunktion blockieren können unterstützt die Hypothese, dass AMLinv(16)-Blasten immunogene HLA-Liganden präsentieren (21;22). Die Vermutung, dass ein T-Zellepitop, das diese Cytotoxizität vermitteln könnte, aus dem CBF β -MYH11-Fusionsprotein stammt, liegt nahe.

Wir versuchten ein Peptid aus der Fusionssequenz von CBF β -MYH11 massenspektrometrisch auf den AML-Proben nachzuweisen. Um die Sensitivität der Analytik zu maximieren, wurden mit Hilfe des

Epitopvorhersagealgorithmus SYFPEITHI^a HLA-restringierte Peptide aus der Fusionssequenz des CBF β -MYH11-Proteins vorhergesagt (siehe Kapitel 3.5.2.). Diese vorhergesagten Sequenzen wurden massenspektrometrisch spezifisch gesucht. Zudem wurden die Massenspektren im Rahmen der manuellen Auswertung dahingehend überprüft, ob sie einer der vorhergesagten Sequenzen entsprechen könnten.

Es konnten keine Peptide aus dem CBF β -MYH11 Fusionsprotein identifiziert werden. Der Grund hierfür könnte sein, dass in der Tat keine Peptide aus der Fusionssequenz auf den analysierten HLA-Proteinen (HLA-A*01; HLA-A*03; HLA-A*26; HLA-B*08; HLA-B*14) präsentiert werden. Für einige der HLA-Allele konnten bei der Epitopvorhersage nur solche Peptide vorhergesagt werden, die relativ geringe „Bindungsscores“ aufwiesen. Für andere HLA-Allele war keine suffiziente Vorhersage möglich. Oder aber die HLA-gebundenen Peptide aus CBF β -MYH11 könnten in einer derart niedrigen Dichte auf der Zelloberfläche präsentiert werden, dass sie noch unter der Nachweisgrenze unserer massenspektrometrischen Analytik lagen.

In jedem Falle jedoch sollte die Suche nach Peptiden aus der Fusionssequenz von CBF β -MYH11 fortgesetzt werden, insbesondere auch für andere HLA-Allele, da es sich bei diesem Fusionsprotein und seinen Peptiden theoretisch um AMLinv(16)-spezifische Strukturen handelt, die eine Erkennung durch das Immunsystem ermöglichen sollten.

4.5.2. Dominante Peptidquellen in den AML-Proben: Peptide ribosomalen und hämoglobinen Ursprunges

Über 260 Peptide konnten aus der Analyse der 3 AML-Proben gewonnen werden. Dabei stammten die meisten der gefundenen Sequenzen wie schon bei der Analyse der Nierenzellkarzinome aus konstitutiv exprimierten Strukturproteinen und Enzymen des physiologischen Zellstoffwechsels.

Als besonders dominante Peptidquellen erwiesen sich ribosomale Proteine und Hämoglobine. Zwar sind tumorassoziierte Peptide aus ribosomalen Proteinen bekannt (204) und wurden im Rahmen dieser Arbeit auf der

^a www.syfpeithi.de

Nierenzellkarzinomzelllinie RCC68CL massenspektrometrisch identifiziert, die gefundenen ribosomalen HLA-Liganden aus den AML-Zelllinien sind jedoch sicher als Selbstpeptide zu interpretieren, da sich für eine Tumorassoziation weder Hinweise aus der Literatur noch aus unseren Genexpressionsstudien ergaben. Für alle ribosomalen Proteine ließ sich genexpressionsanalytisch eine kräftige Präsenz nachweisen, die sich durch die hohe metabolische Aktivität der Zellen erklären mag, eine relevante Überexpression im Sinne einer potentiellen Tumorassoziation zeigte sich jedoch für keines der ribosomalen Proteine.

Etwas anders verhält es sich dagegen mit den gefundenen Peptiden aus den Hämoglobinen: In den Proben AML03 und AML04 konnten Peptide aus verschiedenen Hämoglobinen gefunden werden. Schon auf fünf Proben solider Nierenzellkarzinome konnten Peptide aus Hämoglobin β (HBB) und Hämoglobin α (HBA) gefunden werden. Dies wurde in diesen *ex vivo*-Proben als Folge der Kontamination der Probe mit Blut bzw. als Folge der Phagozytose von Hämoglobin durch Tumorzellen oder durch in den Tumor eingewanderte Zellen gewertet. Diese Interpretation wurde gestützt durch die Tatsache, dass auf der Zelllinie RCC68CL keine Peptide aus Hämoglobinen gefunden wurden.

Bei den Proben der AML handelt es sich jedoch um stabil wachsende AML-Blast-Zelllinien, die durch die Arbeitsgruppe um Dr. André Banat (Gießen) sowohl zytogenetisch als auch durchflusszytometrisch eindeutig charakterisiert wurden. Aufgrund der vorliegenden *in vitro*-Situation schließt sich eine Interpretation des Fundes von Hämoglobinpeptiden durch Kontamination praktisch aus. Ebenso lässt sich der Fund von eindeutig aus fetalen Hämoglobinspezies (HBG und HBE) stammenden Peptiden nicht ohne weiteres durch Kontamination der Proben mit Blut oder erythrozytären Vorläuferzellen erklären.

Eine Interpretation dieses Fundes fällt schwer. Zum einen kann man den Fund der Hämoglobinpeptide als Artefakt auffassen, das durch eine Kontamination der Probe entstand. Gegen eine Kontamination der Zellkultur sprechen jedoch die sorgfältig ausgeführten und dokumentierten zellkulturellen Arbeiten der Arbeitsgruppe um Dr. André Banat (Gießen). Gegen eine Kontamination der Proben im Rahmen der Aufarbeitung der Zelllinien und der

massenspektrometrischen Analysen sprechen ebenso mehrere Gründe, nämlich, dass (i) Hämoglobinpeptide in zwei Proben, die zeitlich weit voneinander entfernt aufgearbeitet und gemessen wurden detektierbar waren, dass (ii) die gefundenen Hämoglobinpeptide jeweils relativ eindeutig einzelnen HLA-Allelen zugeordnet werden konnten (Plausibilitätskriterium), sowie dass (iii) die Zelllinie AML03 zeitlich unabhängig von der ersten Messung in unserem Labor nochmals expandiert und mit dem HLA-A*03-spezifischen Antikörper GAP A3 aufgearbeitet und analysiert wurde, mit dem Ergebnis, dass erneut Hämoglobinpeptide gefunden wurden, unter ihnen das eindeutig Hämoglobin γ (fetales Hämoglobin) zuzuordnende Peptid AIMGNPKVK.

Zum anderen ist es natürlich vorstellbar, dass neoplastische Zellen, gerade wenn sie der myeloischen Reihe entstammen, den Globinanteil des Hämoglobins und hier auch fetale Isoproteine exprimieren. Die durchgeführte Genexpressionsanalyse der Proben AML03 und AML04 hilft bei der Beantwortung der Frage nach der Expression von Hämoglobinen in den AML-Zelllinien nur teilweise weiter. Für einige Hämoglobine (Hämoglobin α und Hämoglobin γ_2) existieren keine *ProbeSets* auf den verwendeten *GeneChips*. Für Hämoglobin β (HBB) und Hämoglobin δ (HBD) konnten in AML03 und AML04 keine Expressionen gemessen werden. Interessanterweise konnten jedoch für die Globine Hämoglobin ε (HBE) und Hämoglobin γ (HBG) jeweils starke Expressionen in AML03, nicht jedoch in AML04 oder den gesunden Normalgeweben gemessen werden.

Theoretisch ließe sich also der Fund der Mehrzahl (6 von 8 Peptiden) der Hämoglobinpeptide auf AML03 durch die Expression der fetalen Hämoglobine ε (HBE) und γ_1 (HBG1) erklären, der Fund von Hämoglobin-Peptiden auf AML04 kann durch die Expressionsanalyse nicht plausibel erklärt werden.

In jedem Falle sollte der Fund der Hämoglobinpeptide zumindest auf der Zelllinie AML03 zu weiteren Untersuchungen Anlass geben, da die Präsentation spezifischer Peptide aus fetalen Globinen durchaus die immunologische Identifikation von AML-Zellen ermöglichen würde.

4.5.3 Potentiell tumorassoziierte Peptide der AML

Verschiedene Peptide aus Proteinen, für die aufgrund ihres Expressionsschemas oder aufgrund der Literatur eine Tumorassoziation vermutet werden darf, wurden identifiziert:

Für die Oncogene *myelocytomatosis oncogene* (MYC), *pim-1 oncogene* (PIM1) und *myeloproliferative leukemia virus oncogene* (MPL) ist, wie in Kapitel 3.5.4. beschrieben, eine ursächliche Beteiligung in der Pathogenese der AML beschrieben. Für MYC und MPL wurden zudem relevante Überexpressionen in AML-Zellen nachgewiesen. Aus allen drei Proteinen wurden HLA-präsentierte Peptide identifiziert.

Das *CHK1 checkpoint homolog* (*S. pombe*) (CHEK1), der *eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3 gamma*, 52 kDa (EIF2S3), die *histidine decarboxylase* (HDC) und die *topoisomerase (DNA) II alpha 170 kDa* (TOP2A) wurden in einer oder beiden analysierten Leukämien als relevant überexprimiert gemessen, HDC und TOP2 waren in der AML03 sogar massiv überexprimiert. Aus diesen Proteinen konnten zum Teil sogar mehrere Peptide sequenziert werden.

Das Protein *SPTF-associated factor 65 gamma* (STAF65(gamma)) ist bereits als Quelle tumorassoziiertes T-Zellepitope bekannt, die Proteine *block of proliferation 1* (BOP1), *PHD finger protein 11* (PHF11) und *UTP6, small subunit (SSU) processome component, homolog (yeast)* (UTP6) wurden serologisch als Ziele einer humoralen anti-Tumor-Immunantwort identifiziert (siehe Kapitel 3.5.4.). Auch aus diesen Proteinen konnten Peptide identifiziert werden, eine relevante Überexpression wurde jedoch nicht gemessen.

Für die Peptide aus all diesen Quellproteinen kann eine Tumorassoziation postuliert werden. Die dargestellten Daten sollten Anlass zur weiteren Untersuchung der Peptide hinsichtlich ihrer Immunogenität in entsprechenden *in-vitro*-Versuchen geben. Jene Peptide, die sich in solchen Versuchen als immunogen erweisen, sollten in klinischen Studien *in vivo* als Vaccine gegen die AMLinv(16) eingesetzt werden.

Insbesondere bemerkenswert war der Fund des Peptids TMCPHILRY aus dem *eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6 48 kDa* (EIF3S6) in den Proben AML03 und AML04. Dieses Peptid war bereits aus der Zelllinie RCC68CL bekannt. Dort war es hinsichtlich seiner Präsentation HLA-B*15 zugeordnet worden. Die AML-Proben zeigten jedoch keinerlei Gemeinsamkeiten in ihrer HLA-Expression mit RCC68CL. Durch eine zusätzliche Aufarbeitung der Probe AML03 mit dem HLA-A*03-spezifischen Antikörper GAP A3 und die erneute massenspektrometrische Analyse konnte gezeigt werden, dass das Peptid TMCPHILRY auch auf HLA-A*03 präsentiert wird.

Dieses Phänomen, dass einzelne Peptide auf verschiedenen HLA-Molekülen präsentiert werden können, ist bekannt und wird durch die Existenz von „HLA-Supertypen“ erklärt (361). HLA-Supertypen stellen Gruppen einzelner HLA-Allele dar, die aufgrund von Ähnlichkeiten in ihrer Peptidbindungsgrube und damit aufgrund von Ähnlichkeiten in ihrem Peptidbindungsmotiv identische Peptide binden können. Der sogenannte HLA-A*03-Supertyp ist beschrieben und umfasst Allele der HLA-Antigene HLA-A*03, HLA-A*11, HLA-A*31, HLA-A*33 und HLA-A*68 (364). Die gleichzeitige Präsentation eines Peptids auf HLA-A*03 und HLA-B*15 ist nach unserem Kenntnis bisher jedoch noch nicht beschrieben.

Hinsichtlich zukünftiger Vaccinierungsstrategien sind solche Peptide, die auf mehreren MHC-Molekülen präsentiert werden können, natürlich von Vorteil, da damit der Anteil der Patienten, die mit dem entsprechenden HLA-Liganden vacciniert werden können, steigt.

Das Genprodukt EIF3S6 war in allen Nierenzellkarzinomen gegenüber der Normalniere und in den AML-Proben AML03 und AML04 gegenüber dem gesunden Knochenmark relevant überexprimiert gemessen worden. T-Zellstimulationsversuche mit diesem Peptid, die die Frage nach seiner Immunogenität klären sollten, blieben aufgrund methodischer Probleme leider ohne Ergebnis. Sollte sich das genannte Peptid in weiteren Analysen dennoch als tumorassoziertes T-Zell-Epitop erweisen, so böte sich die Möglichkeit

dieses in Immuntherapiestudien der AML und des Nierenzellkarzinoms in HLA-A*03- oder HLA-B*15-positiven Patienten einzusetzen.

5. Zusammenfassung

Immuntherapeutische Strategien sind vielversprechende Ansätze in der Therapie maligner Erkrankungen. Schlüsselstruktur für die Erkennung maligner Zellen durch die T-Zellen des Immunsystems sind tumorassoziierte, HLA-präsentierte Peptide. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, das HLA-Ligandom neoplastischer Zellen durch massenspektrometrische (LC/MS) Peptidsequenzierung näher zu charakterisieren, sowie mit Hilfe der Microarray-basierten Genexpressionsanalyse solche Gene bzw. Proteine zu identifizieren, die aufgrund ihres Expressionsmusters als tumorassoziiert anzusehen sind. Analysiert wurden solide Nierenzellkarzinome (RCC) sowie Zelllinien der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) und des RCC.

Insgesamt konnten 725 verschiedene Peptidsequenzen aus 11 soliden RCCs und 204 Peptide aus einer RCC-Zelllinie gewonnen werden. Die meisten dieser HLA-Liganden entsprachen sog. „Selbstpeptiden“, für die sich keine Hinweise auf eine Tumorassoziation ergaben. Jedoch konnten sowohl in den soliden Tumoren als auch in der Zelllinie zahlreiche neue Peptide aus bereits etablierten tumorassoziierten Proteinen (MET, ADFP, CA9, CCND1, RPL10A) sowie aus Proteinen, deren korrespondierende Genexpression eine Tumorassoziation nahe legt (MMP7, APOL1, ACSL4, IGFBP3, RGS5, EIF3S6, FABP7, KNTC2, ECT2, CCDC99, EGLN3), identifiziert werden. Weiter konnte gezeigt werden, dass die primäre Zelllinie *in vitro* mit ihrem Ursprungsgewebe, dem soliden Tumor *in vivo* hinsichtlich ihrer Genexpression kaum und hinsichtlich ihrer Peptidpräsentation praktisch nicht korrespondiert. Der endgültige Nachweis der Immunogenität einiger der identifizierten Peptide konnte in durchgeführten T-Zellstimulationsversuchen aufgrund methodischer Probleme leider nicht erbracht werden.

Die Analyse des HLA-Ligandoms dreier AML(inv16)-Proben führte zur Sequenzierung von 268 Peptiden, unter ihnen HLA-Liganden aus potentiell tumorassoziierten Proteinen wie MYC, PIM1, MPL, MKI67, EIF3S6, TOP2A und HDC. Peptide aus dem für die AML(inv16) charakteristischen Fusionsprotein CBF β -MYH11 konnten trotz intensiver Suche nicht nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnten zahlreiche neue HLA-Liganden aus genexpressionsanalytisch tumorassoziierten Proteinen sowie vorbeschriebenen tumorassoziierten Proteinen sequenziert werden, die in Vaccinierungsstudien im metastasierten Nierenzellkarzinom verwendet werden können und zum Teil bereits verwendet werden.

6. Literaturverzeichnis

- (1) Aichberger KJ, Mayerhofer M, Vales A, Krauth MT, Gleixner KV, Bilban M et al. The CML-related oncoprotein BCR/ABL induces expression of histidine decarboxylase (HDC) and the synthesis of histamine in leukemic cells. *Blood* 2006.
- (2) Akhtar M, Chantziantoniou N. Flow cytometric and quantitative image cell analysis of DNA ploidy in renal chromophobe cell carcinoma. *Hum Pathol* 1998; 29(11):1181-1188.
- (3) Albitar M, Manshouri T, Kantarjian H, Keating M, Estrov Z, Faber J et al. Correlation between lower c-mpl protein expression and favorable cytogenetic groups in acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 1999; 23(1):63-69.
- (4) Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI et al. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 1996; 274(5284):94-96.
- (5) Amatschek S, Koenig U, Auer H, Steinlein P, Pacher M, Gruenfelder A et al. Tissue-wide expression profiling using cDNA subtraction and microarrays to identify tumor-specific genes. *Cancer Res* 2004; 64(3):844-856.
- (6) Amin MB, Amin MB, Tamboli P, Javidan J, Stricker H, de Peralta VM et al. Prognostic impact of histologic subtyping of adult renal epithelial neoplasms: an experience of 405 cases. *Am J Surg Pathol* 2002; 26(3):281-291.
- (7) Amson R, Sigaux F, Przedborski S, Flandrin G, Givol D, Telerman A. The human protooncogene product p33pim is expressed during fetal hematopoiesis and in diverse leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(22):8857-8861.
- (8) Anderson JE, Kopecky KJ, Willman CL, Head D, O'Donnell MR, Luthardt FW et al. Outcome after induction chemotherapy for older patients with acute myeloid leukemia is not improved with mitoxantrone and etoposide compared to cytarabine and daunorubicin: a Southwest Oncology Group study. *Blood* 2002; 100(12):3869-3876.
- (9) Apostolopoulos V, Karanikas V, Haurum JS, McKenzie IF. Induction of HLA-A2-restricted CTLs to the mucin 1 human breast cancer antigen. *J Immunol* 1997; 159(11):5211-5218.
- (10) Appelhoff RJ, Tian YM, Raval RR, Turley H, Harris AL, Pugh CW et al. Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem* 2004; 279(37):38458-38465.
- (11) Aprelikova O, Chandramouli GV, Wood M, Vasselli JR, Riss J, Maranchie JK et al. Regulation of HIF prolyl hydroxylases by hypoxia-inducible factors. *J Cell Biochem* 2004; 92(3):491-501.
- (12) Arai J, Yasukawa M, Ohminami H, Kakimoto M, Hasegawa A, Fujita S. Identification of human telomerase reverse transcriptase-derived peptides that induce HLA-A24-restricted antileukemia cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 2001; 97(9):2903-2907.
- (13) Arai T, Yanagihara K, Takigahira M, Takeda M, Koizumi F, Shiratori Y et al. ZD6474 inhibits tumor growth and intraperitoneal dissemination in a highly metastatic orthotopic gastric cancer model. *Int J Cancer* 2005.
- (14) Arlin Z, Case DC, Jr., Moore J, Wiernik P, Feldman E, Saletan S et al. Randomized multicenter trial of cytosine arabinoside with mitoxantrone or daunorubicin in previously

untreated adult patients with acute nonlymphocytic leukemia (ANLL). Lederle Cooperative Group. *Leukemia* 1990; 4(3):177-183.

- (15) Atkins DJ, Gingert C, Justenhoven C, Schmahl GE, Bonato MS, Brauch H et al. Concomitant deregulation of HIF1alpha and cell cycle proteins in VHL-mutated renal cell carcinomas. *Virchows Arch* 2005.
- (16) Atkins MB, Hidalgo M, Stadler WM, Logan TF, Dutcher JP, Hudes GR et al. Randomized phase II study of multiple dose levels of CCI-779, a novel mammalian target of rapamycin kinase inhibitor, in patients with advanced refractory renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2004; 22(5):909-918.
- (17) Avigan D. Dendritic cell-tumor fusion vaccines for renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10(18 Pt 2):6347S-6352S.
- (18) Baer MR, Augustinos P, Kinniburgh AJ. Defective c-myc and c-myb RNA turnover in acute myeloid leukemia cells. *Blood* 1992; 79(5):1319-1326.
- (19) Baer MR, Gao XZ, Sato H, Singh P, Preisler HD. Proto-oncogene expression during early myeloid differentiation of normal peripheral blood progenitor cells. *Leuk Res* 1989; 13(2):165-172.
- (20) Ballard K, Gaskell S. Dehydration of peptide (M+H)⁺ ions in the gas phase. *J Am Soc Mass Spectrom* 1993; 4(477):481.
- (21) Banat GA, Ihlow K, Usluoglu N, Hoppmann S, Hoeck M, Pralle H. Core-binding factor-beta positive acute myeloid leukaemia cells induce T-cell responses. *Br J Haematol* 2003; 123(5):819-829.
- (22) Banat GA, Usluoglu N, Hoeck M, Ihlow K, Hoppmann S, Pralle H. Dendritic cells fused with core binding factor-beta positive acute myeloid leukaemia blast cells induce activation of cytotoxic lymphocytes. *Br J Haematol* 2004; 126(4):593-601.
- (23) Bander NH. Comparison of antigen expression of human renal cancers in vivo and in vitro. *Cancer* 1984; 53(6):1235-1239.
- (24) Barnstable CJ, Bodmer WF, Brown G, Galfre G, Milstein C, Williams AF et al. Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis. *Cell* 1978; 14(1):9-20.
- (25) Baugh LR, Hill AA, Brown EL, Hunter CP. Quantitative analysis of mRNA amplification by in vitro transcription. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(5):E29.
- (26) Belli F, Testori A, Rivoltini L, Maio M, Andreola G, Sertoli MR et al. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous tumor-derived heat shock protein gp96-peptide complexes: clinical and immunologic findings. *J Clin Oncol* 2002; 20(20):4169-4180.
- (27) Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 1976; 33(4):451-458.
- (28) Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR et al. Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 1985; 103(3):460-462.

- (29) Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 1985; 103(4):620-625.
- (30) Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR et al. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). *Br J Haematol* 1991; 78(3):325-329.
- (31) Berger AE, Davis JE, Cresswell P. Monoclonal antibody to HLA-A3. *Hybridoma* 1982; 1(2):87-90.
- (32) Berman E, Heller G, Santorsa J, McKenzie S, Gee T, Kempin S et al. Results of a randomized trial comparing idarubicin and cytosine arabinoside with daunorubicin and cytosine arabinoside in adult patients with newly diagnosed acute myelogenous leukemia. *Blood* 1991; 77(8):1666-1674.
- (33) Bildirici I, Roh CR, Schaiff WT, Lewkowski BM, Nelson DM, Sadovsky Y. The lipid droplet-associated protein adipophilin is expressed in human trophoblasts and is regulated by peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma/retinoid X receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(12):6056-6062.
- (34) Bishop JF. Etoposide in the management of leukemia: a review. *Semin Oncol* 1991; 18(1 Suppl 2):62-69.
- (35) Bishop JF, Matthews JP, Young GA, Szer J, Gillett A, Joshua D et al. A randomized study of high-dose cytarabine in induction in acute myeloid leukemia. *Blood* 1996; 87(5):1710-1717.
- (36) Boguski MS, Lowe TM, Tolstoshev CM. dbEST--database for "expressed sequence tags". *Nat Genet* 1993; 4(4):332-333.
- (37) Boguski MS, Tolstoshev CM, Bassett DE, Jr. Gene discovery in dbEST. *Science* 1994; 265(5181):1993-1994.
- (38) Boni JP, Leister C, Bender G, Fitzpatrick V, Twine N, Stover J et al. Population pharmacokinetics of CCI-779: correlations to safety and pharmacogenomic responses in patients with advanced renal cancer. *Clin Pharmacol Ther* 2005; 77(1):76-89.
- (39) Bosch GJ, Joosten AM, Kessler JH, Melief CJ, Leeksa OC. Recognition of BCR-ABL positive leukemic blasts by human CD4+ T cells elicited by primary in vitro immunization with a BCR-ABL breakpoint peptide. *Blood* 1996; 88(9):3522-3527.
- (40) Bouvier M, Wiley DC. Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of MHC class I molecules. *Science* 1994; 265(5170):398-402.
- (41) Brasaemle DL, Barber T, Wolins NE, Serrero G, Blanchette-Mackie EJ, Londos C. Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *J Lipid Res* 1997; 38(11):2249-2263.
- (42) Brickner AG, Warren EH, Caldwell JA, Akatsuka Y, Golovina TN, Zarling AL et al. The immunogenicity of a new human minor histocompatibility antigen results from differential antigen processing. *J Exp Med* 2001; 193(2):195-206.
- (43) Brossart P, Heinrich KS, Stuhler G, Behnke L, Reichardt VL, Stevanovic S et al. Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies. *Blood* 1999; 93(12):4309-4317.

- (44) Brossart P, Schneider A, Dill P, Schammann T, Grunebach F, Wirths S et al. The epithelial tumor antigen MUC1 is expressed in hematological malignancies and is recognized by MUC1-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Res* 2001; 61(18):6846-6850.
- (45) Buchner T, Urbanitz D, Emmerich B, Fischer JT, Fulle HH, Heinecke A et al. Multicentre study on intensified remission induction therapy for acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 1982; 6(6):827-831.
- (46) Buentig N, Storkel S, Atzpodien J. [Molecular genetic changes in renal cell carcinomas]. *Urologe A* 2002; 41(5):475-481.
- (47) Bui MH, Seligson D, Han KR, Pantuck AJ, Dorey FJ, Huang Y et al. Carbonic anhydrase IX is an independent predictor of survival in advanced renal clear cell carcinoma: implications for prognosis and therapy. *Clin Cancer Res* 2003; 9(2):802-811.
- (48) Bukowski RM. Natural history and therapy of metastatic renal cell carcinoma: the role of interleukin-2. *Cancer* 1997; 80(7):1198-1220.
- (49) Burnett AK, Goldstone AH, Stevens RM, Hann IM, Rees JK, Gray RG et al. Randomised comparison of addition of autologous bone-marrow transplantation to intensive chemotherapy for acute myeloid leukaemia in first remission: results of MRC AML 10 trial. UK Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Lancet* 1998; 351(9104):700-708.
- (50) Buttitta F, Martella C, Barassi F, Felicioni L, Salvatore S, Rosini S et al. Int6 expression can predict survival in early-stage non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2005; 11(9):3198-3204.
- (51) Buzio C, Andrulli S, Santi R, Pavone L, Passalacqua R, Potenzoni D et al. Long-term immunotherapy with low-dose interleukin-2 and interferon-alpha in the treatment of patients with advanced renal cell carcinoma. *Cancer* 2001; 92(9):2286-2296.
- (52) Buzio C, De Palma G, Passalacqua R, Potenzoni D, Ferrozzi F, Cattabiani MA et al. Effectiveness of very low doses of immunotherapy in advanced renal cell cancer. *Br J Cancer* 1997; 76(4):541-544.
- (53) Callahan R. MMTV-induced mutations in mouse mammary tumors: their potential relevance to human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1996; 39(1):33-44.
- (54) Campoli M, Ferrone S, Zea AH, Rodriguez PC, Ochoa AC. Mechanisms of tumor evasion. *Cancer Treat Res* 2005; 123:61-88.
- (55) Cao Y, Dave KB, Doan TP, Prescott SM. Fatty acid CoA ligase 4 is up-regulated in colon adenocarcinoma. *Cancer Res* 2001; 61(23):8429-8434.
- (56) Caron PC, Scheinberg DA. Anti-CD33 monoclonal antibody M195 for the therapy of myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 1993; 11 Suppl 2:1-6.
- (57) Carralot JP, Probst J, Hoerr I, Scheel B, Teufel R, Jung G et al. Polarization of immunity induced by direct injection of naked sequence-stabilized mRNA vaccines. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61(18):2418-2424.
- (58) Carralot JP, Weide B, Schoor O, Probst J, Scheel B, Teufel R et al. Production and characterization of amplified tumor-derived cRNA libraries to be used as vaccines against metastatic melanomas. *Genet Vaccines Ther* 2005; 3:6.

- (59) Cassileth PA, Harrington DP, Appelbaum FR, Lazarus HM, Rowe JM, Paietta E et al. Chemotherapy compared with autologous or allogeneic bone marrow transplantation in the management of acute myeloid leukemia in first remission. *N Engl J Med* 1998; 339(23):1649-1656.
- (60) Caudill MM, Li Z. HSPPC-96: a personalised cancer vaccine. *Expert Opin Biol Ther* 2001; 1(3):539-547.
- (61) Celis E, Tsai V, Crimi C, DeMars R, Wentworth PA, Chesnut RW et al. Induction of anti-tumor cytotoxic T lymphocytes in normal humans using primary cultures and synthetic peptide epitopes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(6):2105-2109.
- (62) Celluzzi CM, Mayordomo JI, Storkus WJ, Lotze MT, Falo LD, Jr. Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity. *J Exp Med* 1996; 183(1):283-287.
- (63) Chang AE, Li Q, Jiang G, Sayre DM, Braun TM, Redman BG. Phase II trial of autologous tumor vaccination, anti-CD3-activated vaccine-primed lymphocytes, and interleukin-2 in stage IV renal cell cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21(5):884-890.
- (64) Chang CD, Meienhofer J. Solid-phase peptide synthesis using mild base cleavage of N alpha-fluorenylmethyloxycarbonylamino acids, exemplified by a synthesis of dihydrosomatostatin. *Int J Pept Protein Res* 1978; 11(3):246-249.
- (65) Chen CH, Shen J, Lee WJ, Chow SN. Overexpression of cyclin D1 and c-Myc gene products in human primary epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2005; 15(5):878-883.
- (66) Chen G, Zhang W, Cao X, Li F, Liu X, Yao L. Serological identification of immunogenic antigens in acute monocytic leukemia. *Leuk Res* 2005; 29(5):503-509.
- (67) Chen YT, Gure AO, Scanlan MJ. Serological analysis of expression cDNA libraries (SEREX): an immunoscreening technique for identifying immunogenic tumor antigens. *Methods Mol Med* 2005; 103:207-216.
- (68) Cheresch DA, Honsik CJ, Staffileno LK, Jung G, Reisfeld RA. Disialoganglioside GD3 on human melanoma serves as a relevant target antigen for monoclonal antibody-mediated tumor cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82(15):5155-5159.
- (69) Cheung CW, Vesey DA, Nicol DL, Johnson DW. The roles of IGF-I and IGFBP-3 in the regulation of proximal tubule, and renal cell carcinoma cell proliferation. *Kidney Int* 2004; 65(4):1272-1279.
- (70) Childs R, Chernoff A, Contentin N, Bahceci E, Schrupp D, Leitman S et al. Regression of metastatic renal-cell carcinoma after nonmyeloablative allogeneic peripheral-blood stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 2000; 343(11):750-758.
- (71) Choudhury BA, Liang JC, Thomas EK, Flores-Romo L, Xie QS, Agusala K et al. Dendritic cells derived in vitro from acute myelogenous leukemia cells stimulate autologous, antileukemic T-cell responses. *Blood* 1999; 93(3):780-786.
- (72) Cignetti A, Bryant E, Allione B, Vitale A, Foa R, Cheever MA. CD34(+) acute myeloid and lymphoid leukemic blasts can be induced to differentiate into dendritic cells. *Blood* 1999; 94(6):2048-2055.

- (73) Clark RE, Dodi IA, Hill SC, Lill JR, Aubert G, Macintyre AR et al. Direct evidence that leukemic cells present HLA-associated immunogenic peptides derived from the BCR-ABL b3a2 fusion protein. *Blood* 2001; 98(10):2887-2893.
- (74) Cohen L, de Moor C, Parker PA, Amato RJ. Quality of life in patients with metastatic renal cell carcinoma participating in a phase I trial of an autologous tumor-derived vaccine. *Urol Oncol* 2002; 7(3):119-124.
- (75) Cole MD. The myc oncogene: its role in transformation and differentiation. *Annu Rev Genet* 1986; 20:361-384.
- (76) Copelan EA, Biggs JC, Thompson JM, Crilley P, Szer J, Klein JP et al. Treatment for acute myelocytic leukemia with allogeneic bone marrow transplantation following preparation with BuCy2. *Blood* 1991; 78(3):838-843.
- (77) Corazza F, Hermans C, D'Hondt S, Ferster A, Kentos A, Benoit Y et al. Circulating thrombopoietin as an in vivo growth factor for blast cells in acute myeloid leukemia. *Blood* 2006; 107(6):2525-2530.
- (78) Dang CV. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol* 1999; 19(1):1-11.
- (79) Davenport MP, Smith KJ, Barouch D, Reid SW, Bodnar WM, Willis AC et al. HLA class I binding motifs derived from random peptide libraries differ at the COOH terminus from those of eluted peptides. *J Exp Med* 1997; 185(2):367-371.
- (80) Deckert M, Reifenberger G, Wechsler W. Determination of the proliferative potential of human brain tumors using the monoclonal antibody Ki-67. *J Cancer Res Clin Oncol* 1989; 115(2):179-188.
- (81) Delaunay J, Vey N, Leblanc T, Fenaux P, Rigal-Huguet F, Witz F et al. Prognosis of inv(16)/t(16;16) acute myeloid leukemia (AML): a survey of 110 cases from the French AML Intergroup. *Blood* 2003; 102(2):462-469.
- (82) Dengler R, Munstermann U, al Batran S, Hausner I, Faderl S, Nerl C et al. Immunocytochemical and flow cytometric detection of proteinase 3 (myeloblastin) in normal and leukaemic myeloid cells. *Br J Haematol* 1995; 89(2):250-257.
- (83) Denko N, Schindler C, Koong A, Laderoute K, Green C, Giaccia A. Epigenetic regulation of gene expression in cervical cancer cells by the tumor microenvironment. *Clin Cancer Res* 2000; 6(2):480-487.
- (84) Dermime S, Bertazzoli C, Marchesi E, Ravagnani F, Blaser K, Corneo GM et al. Lack of T-cell-mediated recognition of the fusion region of the pml/RAR-alpha hybrid protein by lymphocytes of acute promyelocytic leukemia patients. *Clin Cancer Res* 1996; 2(3):593-600.
- (85) Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, Shah R, Varambally S, Kurachi K et al. Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature* 2001; 412(6849):822-826.
- (86) Dinsmore R, Kirkpatrick D, Flomenberg N, Gulati S, Kapoor N, Brochstein J et al. Allogeneic bone marrow transplantation for patients with acute nonlymphocytic leukemia. *Blood* 1984; 63(3):649-656.

- (87) Disis ML, Calenoff E, McLaughlin G, Murphy AE, Chen W, Groner B et al. Existent T-cell and antibody immunity to HER-2/neu protein in patients with breast cancer. *Cancer Res* 1994; 54(1):16-20.
- (88) Divgi CR, Bander NH, Scott AM, O'Donoghue JA, Sgouros G, Welt S et al. Phase I/II radioimmunotherapy trial with iodine-131-labeled monoclonal antibody G250 in metastatic renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 1998; 4(11):2729-2739.
- (89) Dutcher JP, Logan T, Gordon M, Sosman J, Weiss G, Margolin K et al. Phase II trial of interleukin 2, interferon alpha, and 5-fluorouracil in metastatic renal cell cancer: a cytokine working group study. *Clin Cancer Res* 2000; 6(9):3442-3450.
- (90) Eaton JD, Perry MJ, Nicholson S, Guckian M, Russell N, Whelan M et al. Allogeneic whole-cell vaccine: a phase I/II study in men with hormone-refractory prostate cancer. *BJU Int* 2002; 89(1):19-26.
- (91) Ebert T, Bander NH. Kidney-derived cell lines. *Semin Urol* 1989; 7(4):247-251.
- (92) Ebert T, Bander NH, Finstad CL, Ramsawak RD, Old LJ. Establishment and characterization of human renal cancer and normal kidney cell lines. *Cancer Res* 1990; 50(17):5531-5536.
- (93) Eble MJ, Staehler G, Wannemacher M. [The intraoperative radiotherapy (IORT) of locally spread and recurrent renal-cell carcinomas]. *Strahlenther Onkol* 1998; 174(1):30-36.
- (94) Eckstein JW. Drug evaluation: Bay-59-8862. *IDrugs* 2004; 7(6):575-581.
- (95) Elisseeva OA, Oka Y, Tsuboi A, Ogata K, Wu F, Kim EH et al. Humoral immune responses against Wilms tumor gene WT1 product in patients with hematopoietic malignancies. *Blood* 2002; 99(9):3272-3279.
- (96) Elkington R, Walker S, Crough T, Menzies M, Tellam J, Bharadwaj M et al. Ex vivo profiling of CD8+-T-cell responses to human cytomegalovirus reveals broad and multispecific reactivities in healthy virus carriers. *J Virol* 2003; 77(9):5226-5240.
- (97) Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M et al. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007; 356(2):125-134.
- (98) Falk K, Rotzschke O, Stevanovic S, Jung G, Rammensee HG. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 1991; 351(6324):290-296.
- (99) Falk K, Rotzschke O, Takiguchi M, Gnau V, Stevanovic S, Jung G et al. Peptide motifs of HLA-B38 and B39 molecules. *Immunogenetics* 1995; 41(2-3):162-164.
- (100) Felsher DW, Bishop JM. Reversible tumorigenesis by MYC in hematopoietic lineages. *Mol Cell* 1999; 4(2):199-207.
- (101) Fenton RG, Steis RG, Madara K, Zea AH, Ochoa AC, Janik JE et al. A phase I randomized study of subcutaneous adjuvant IL-2 in combination with an autologous tumor vaccine in patients with advanced renal cell carcinoma. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 1996; 19(5):364-374.
- (102) Fergany AF, Hafez KS, Novick AC. Long-term results of nephron sparing surgery for localized renal cell carcinoma: 10-year followup. *J Urol* 2000; 163(2):442-445.

- (103) Ficarra V, Righetti R, Pilloni S, D'amico A, Maffei N, Novella G et al. Prognostic factors in patients with renal cell carcinoma: retrospective analysis of 675 cases. *Eur Urol* 2002; 41(2):190-198.
- (104) Fiedler W, Mesters R, Tinnefeld H, Loges S, Staib P, Duhrsen U et al. A phase 2 clinical study of SU5416 in patients with refractory acute myeloid leukemia. *Blood* 2003; 102(8):2763-2767.
- (105) Figlin RA. Renal cell carcinoma: management of advanced disease. *J Urol* 1999; 161(2):381-386.
- (106) Figlin RA, Thompson JA, Bukowski RM, Vogelzang NJ, Novick AC, Lange P et al. Multicenter, randomized, phase III trial of CD8(+) tumor-infiltrating lymphocytes in combination with recombinant interleukin-2 in metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 1999; 17(8):2521-2529.
- (107) Filipas D, Spix C, Schulz-Lampel D, Michaelis J, Hohenfellner R, Roth S et al. Screening for renal cell carcinoma using ultrasonography: a feasibility study. *BJU Int* 2003; 91(7):595-599.
- (108) Finney R. The value of radiotherapy in the treatment of hypernephroma--a clinical trial. *Br J Urol* 1973; 45(3):258-269.
- (109) Flad T, Spengler B, Kalbacher H, Brossart P, Baier D, Kaufmann R et al. Direct identification of major histocompatibility complex class I-bound tumor-associated peptide antigens of a renal carcinoma cell line by a novel mass spectrometric method. *Cancer Res* 1998; 58(24):5803-5811.
- (110) Fleischhauer K, Tanzarella S, Russo V, Sensi ML, van der BP, Bordignon C et al. Functional heterogeneity of HLA-A*02 subtypes revealed by presentation of a MAGE-3-encoded peptide to cytotoxic T cell clones. *J Immunol* 1997; 159(5):2513-2521.
- (111) Fleming S, Lewi HJ. Collecting duct carcinoma of the kidney. *Histopathology* 1986; 10(11):1131-1141.
- (112) FLOCKS RH, KADESKY MC. Malignant neoplasms of the kidney; an analysis of 353 patients followed five years or more. *J Urol* 1958; 79(2):196-201.
- (113) Fritsch M, Rosenberg SA, Duray PH. Immunohistologic responses within dermal metastatic melanoma lesions of patients treated with a synthetic peptide vaccine. *J Immunother* 2000; 23(5):557-569.
- (114) Furuya M, Nishiyama M, Kimura S, Suyama T, Naya Y, Ito H et al. Expression of regulator of G protein signalling protein 5 (RGS5) in the tumour vasculature of human renal cell carcinoma. *J Pathol* 2004; 203(1):551-558.
- (115) Gaiger A, Reese V, Disis ML, Cheever MA. Immunity to WT1 in the animal model and in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2000; 96(4):1480-1489.
- (116) Galea-Lauri J, Darling D, Mufti G, Harrison P, Farzaneh F. Eliciting cytotoxic T lymphocytes against acute myeloid leukemia-derived antigens: evaluation of dendritic cell-leukemia cell hybrids and other antigen-loading strategies for dendritic cell-based vaccination. *Cancer Immunol Immunother* 2002; 51(6):299-310.
- (117) Gambacorti-Passerini C, Grignani F, Arienti F, Pandolfi PP, Pelicci PG, Parmiani G. Human CD4 lymphocytes specifically recognize a peptide representing the fusion region

of the hybrid protein pml/RAR alpha present in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* 1993; 81(5):1369-1375.

- (118) Gao J, Serrero G. Adipose differentiation related protein (ADRP) expressed in transfected COS-7 cells selectively stimulates long chain fatty acid uptake. *J Biol Chem* 1999; 274(24):16825-16830.
- (119) Gao J, Ye H, Serrero G. Stimulation of adipose differentiation related protein (ADRP) expression in adipocyte precursors by long-chain fatty acids. *J Cell Physiol* 2000; 182(2):297-302.
- (120) Garcia-Caballero M, Neugebauer E, Campos R, Nunez dC, I, Vara-Thorbeck C. Increased histidine decarboxylase (HDC) activity in human colorectal cancer: results of a study on ten patients. *Agents Actions* 1988; 23(3-4):357-360.
- (121) Garni-Wagner BA, Lee ZH, Kim YJ, Wilde C, Kang CY, Kwon BS. 4-1BB is expressed on CD45RAhiROhi transitional T cell in humans. *Cell Immunol* 1996; 169(1):91-98.
- (122) Gaskell S. *Electrospray: Principles and practice* (vol 32, pg 677, 1997). *Journal of Mass Spectrometry* 1997; 32(12):1378.
- (123) Gaugler B, Brouwenstijn N, Vantomme V, Szikora JP, Van der Spek CW, Patard JJ et al. A new gene coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human renal carcinoma. *Immunogenetics* 1996; 44(5):323-330.
- (124) Gebrosky NP, Koukol S, Nseyo UO, Carpenter C, Lamm DL. Treatment of renal cell carcinoma with 5-fluorouracil and alfa-interferon. *Urology* 1997; 50(6):863-867.
- (125) Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984; 133(4):1710-1715.
- (126) Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983; 31(1):13-20.
- (127) Giles FJ, Stopeck AT, Silverman LR, Lancet JE, Cooper MA, Hannah AL et al. SU5416, a small molecule tyrosine kinase receptor inhibitor, has biologic activity in patients with refractory acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes. *Blood* 2003; 102(3):795-801.
- (128) Gjertsen MK, Buanes T, Rosseland AR, Bakka A, Gladhaug I, Soreide O et al. Intradermal ras peptide vaccination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as adjuvant: Clinical and immunological responses in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2001; 92(3):441-450.
- (129) Glinsky GV, Berezovska O, Glinskii AB. Microarray analysis identifies a death-from-cancer signature predicting therapy failure in patients with multiple types of cancer. *J Clin Invest* 2005; 115(6):1503-1521.
- (130) Gnarr JR, Tory K, Weng Y, Schmidt L, Wei MH, Li H et al. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet* 1994; 7(1):85-90.
- (131) Gogas H, Ioannovich J, Dafni U, Stavropoulou-Giokas C, Frangia K, Tsoutsos D et al. Prognostic significance of autoimmunity during treatment of melanoma with interferon. *N Engl J Med* 2006; 354(7):709-718.

- (132) Gong J, Chen D, Kashiwaba M, Kufe D. Induction of antitumor activity by immunization with fusions of dendritic and carcinoma cells. *Nat Med* 1997; 3(5):558-561.
- (133) Gonzalo JA, Delaney T, Corcoran J, Goodearl A, Gutierrez-Ramos JC, Coyle AJ. Cutting edge: the related molecules CD28 and inducible costimulator deliver both unique and complementary signals required for optimal T cell activation. *J Immunol* 2001; 166(1):1-5.
- (134) Gopal V, Kadam P, Preisler H, Hulette B, Li YQ, Steele P et al. Abnormal regulation of the myc gene in myeloid leukemia. *Med Oncol Tumor Pharmacother* 1992; 9(3):139-147.
- (135) Gore SD, Baylin S, Sugar E, Carraway H, Miller CB, Carducci M et al. Combined DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in the treatment of myeloid neoplasms. *Cancer Res* 2006; 66(12):6361-6369.
- (136) Gore SD, Weng LJ, Burke PJ. Validation of flow-cytometric determination of Ki67 expression as a measure of growth factor response in acute myelogenous leukemia. *Exp Hematol* 1993; 21(13):1702-1708.
- (137) Goto Y, Matsuzaki Y, Kurihara S, Shimizu A, Okada T, Yamamoto K et al. A new melanoma antigen fatty acid-binding protein 7, involved in proliferation and invasion, is a potential target for immunotherapy and molecular target therapy. *Cancer Res* 2006; 66(8):4443-4449.
- (138) Gottlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer OH, Schimpf A, Giavara S et al. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J* 2001; 20(24):6969-6978.
- (139) Gowda SD, Koler RD, Bagby GC, Jr. Regulation of C-myc expression during growth and differentiation of normal and leukemic human myeloid progenitor cells. *J Clin Invest* 1986; 77(1):271-278.
- (140) Grabmaier K, Vissers JL, De Weijert MC, Oosterwijk-Wakka JC, Van Bokhoven A, Brakenhoff RH et al. Molecular cloning and immunogenicity of renal cell carcinoma-associated antigen G250. *Int J Cancer* 2000; 85(6):865-870.
- (141) Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM et al. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 1999; 285(5425):221-227.
- (142) Greco C, Alvino S, Buglioni S, Assisi D, Lapenta R, Grassi A et al. Activation of c-MYC and c-MYB proto-oncogenes is associated with decreased apoptosis in tumor colon progression. *Anticancer Res* 2001; 21(5):3185-3192.
- (143) Greenberg PL, Lee SJ, Advani R, Tallman MS, Sikic BI, Letendre L et al. Mitoxantrone, etoposide, and cytarabine with or without valspodar in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome: a phase III trial (E2995). *J Clin Oncol* 2004; 22(6):1078-1086.
- (144) Gruen JR, Weissman SM. Human MHC class III and IV genes and disease associations. *Front Biosci* 2001; 6:D960-D972.
- (145) Grunebach F, Mirakaj V, Mirakaj V, Muller MR, Brummendorf T, Brossart P. BCR-ABL is not an immunodominant antigen in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res* 2006; 66(11):5892-5900.
- (146) Grushko TA, Dignam JJ, Das S, Blackwood AM, Perou CM, Ridderstrale KK et al. MYC is amplified in BRCA1-associated breast cancers. *Clin Cancer Res* 2004; 10(2):499-507.

- (147) Gure AO, Altorki NK, Stockert E, Scanlan MJ, Old LJ, Chen YT. Human lung cancer antigens recognized by autologous antibodies: definition of a novel cDNA derived from the tumor suppressor gene locus on chromosome 3p21.3. *Cancer Res* 1998; 58(5):1034-1041.
- (148) Gurzov EN, Izquierdo M. RNA interference against Hec1 inhibits tumor growth in vivo. *Gene Ther* 2006; 13(1):1-7.
- (149) Habal N, Gupta RK, Bilchik AJ, Yee R, Leopoldo Z, Ye W et al. CancerVax, an allogeneic tumor cell vaccine, induces specific humoral and cellular immune responses in advanced colon cancer. *Ann Surg Oncol* 2001; 8(5):389-401.
- (150) Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 1999; 17(12):3835-3849.
- (151) Harrison BD, Adams JA, Briggs M, Brereton ML, Yin JA. Stimulation of autologous proliferative and cytotoxic T-cell responses by "leukemic dendritic cells" derived from blast cells in acute myeloid leukemia. *Blood* 2001; 97(9):2764-2771.
- (152) Hartmann JT, Bokemeyer C. Chemotherapy for renal cell carcinoma. *Anticancer Res* 1999; 19(2C):1541-1543.
- (153) Hayashi M, Sakata M, Takeda T, Tahara M, Yamamoto T, Okamoto Y et al. Up-regulation of Met expression through HIF-1{alpha} is involved in trophoblast invasion under low-oxygen tension. *Endocrinology* 2005.
- (154) Heath WR, Carbone FR. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:47-64.
- (155) Hedberg Y, Davoodi E, Roos G, Ljungberg B, Landberg G. Cyclin-D1 expression in human renal-cell carcinoma. *Int J Cancer* 1999; 84(3):268-272.
- (156) Hedberg Y, Ljungberg B, Roos G, Landberg G. Expression of cyclin D1, D3, E, and p27 in human renal cell carcinoma analysed by tissue microarray. *Br J Cancer* 2003; 88(9):1417-1423.
- (157) Heid HW, Moll R, Schwetlick I, Rackwitz HR, Keenan TW. Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. *Cell Tissue Res* 1998; 294(2):309-321.
- (158) Heid HW, Schnolzer M, Keenan TW. Adipocyte differentiation-related protein is secreted into milk as a constituent of milk lipid globule membrane. *Biochem J* 1996; 320 (Pt 3):1025-1030.
- (159) Heiser A, Coleman D, Dannull J, Yancey D, Maurice MA, Lallas CD et al. Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. *J Clin Invest* 2002; 109(3):409-417.
- (160) Heiser A, Maurice MA, Yancey DR, Coleman DM, Dahm P, Vieweg J. Human dendritic cells transfected with renal tumor RNA stimulate polyclonal T-cell responses against antigens expressed by primary and metastatic tumors. *Cancer Res* 2001; 61(8):3388-3393.
- (161) Henkart PA. Lymphocyte-mediated cytotoxicity: two pathways and multiple effector molecules. *Immunity* 1994; 1(5):343-346.

- (162) Herman J, van der BP, Luescher IF, Mandruzzato S, Romero P, Thonnard J et al. A peptide encoded by the human MAGE3 gene and presented by HLA-B44 induces cytolytic T lymphocytes that recognize tumor cells expressing MAGE3. *Immunogenetics* 1996; 43(6):377-383.
- (163) Hernandez JM, Bui MH, Han KR, Mukouyama H, Freitas DG, Nguyen D et al. Novel kidney cancer immunotherapy based on the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and carbonic anhydrase IX fusion gene. *Clin Cancer Res* 2003; 9(5):1906-1916.
- (164) Hiddemann W, Kreutzmann H, Straif K, Ludwig WD, Mertelsmann R, Donhuijsen-Ant R et al. High-dose cytosine arabinoside and mitoxantrone: a highly effective regimen in refractory acute myeloid leukemia. *Blood* 1987; 69(3):744-749.
- (165) Hines-Peralta A, Goldberg SN. Review of radiofrequency ablation for renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10(18 Pt 2):6328S-6334S.
- (166) Hintz RL, Bock S, Thorsson AV, Bovens J, Powell DR, Jakse G et al. Expression of the insulin like growth factor-binding protein 3 (IGFBP-3) gene is increased in human renal carcinomas. *J Urol* 1991; 146(4):1160-1163.
- (167) Hofbauer KH, Gess B, Lohaus C, Meyer HE, Katschinski D, Kurtz A. Oxygen tension regulates the expression of a group of procollagen hydroxylases. *Eur J Biochem* 2003; 270(22):4515-4522.
- (168) Hoffman B, Amanullah A, Shafarenko M, Liebermann DA. The proto-oncogene c-myc in hematopoietic development and leukemogenesis. *Oncogene* 2002; 21(21):3414-3421.
- (169) Hofmoeckel G, Tack W, Frohmuller HG. Cyclic interferon alpha treatment in metastatic renal cell carcinoma: results of a phase II study and review of the literature. *Urol Int* 1997; 58(1):8-12.
- (170) Holtl L, Zelle-Rieser C, Gander H, Papesh C, Ramoner R, Bartsch G et al. Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with tumor lysate-pulsed autologous dendritic cells. *Clin Cancer Res* 2002; 8(11):3369-3376.
- (171) Ikeda H, Lethe B, Lehmann F, van Baren N, Baurain JF, De Smet C et al. Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity* 1997; 6(2):199-208.
- (172) Inoue K, Ogawa H, Sonoda Y, Kimura T, Sakabe H, Oka Y et al. Aberrant overexpression of the Wilms tumor gene (WT1) in human leukemia. *Blood* 1997; 89(4):1405-1412.
- (173) Iribarne J, Thomson B. On the evaporation of small ions from charged droplets. *J Chem Phys* 1976; 64:2287-2294.
- (174) Ivanov S, Liao SY, Ivanova A, Danilkovitch-Miagkova A, Tarasova N, Weirich G et al. Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *Am J Pathol* 2001; 158(3):905-919.
- (175) Jager E, Chen YT, Drijfhout JW, Karbach J, Ringhoffer M, Jager D et al. Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *J Exp Med* 1998; 187(2):265-270.
- (176) Jamieson CH, Ailles LE, Dylla SJ, Muijtjens M, Jones C, Zehnder JL et al. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J Med* 2004; 351(7):657-667.

- (177) Jaroslav P, Martina H, Jiri S, Hana K, Petr S, Tomas K et al. Expression of cyclins D1, D2, and D3 and Ki-67 in Leukemia. *Leuk Lymphoma* 2005; 46(11):1605-1612.
- (178) Javidan J, Stricker HJ, Tamboli P, Amin MB, Peabody JO, Deshpande A et al. Prognostic significance of the 1997 TNM classification of renal cell carcinoma. *J Urol* 1999; 162(4):1277-1281.
- (179) Jayson M, Sanders H. Increased incidence of serendipitously discovered renal cell carcinoma. *Urology* 1998; 51(2):203-205.
- (180) Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C et al. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 2006; 56(2):106-130.
- (181) Jermann M, Stahel RA, Salzberg M, Cerny T, Joerger M, Gillessen S et al. A phase II, open-label study of gefitinib (IRESSA) in patients with locally advanced, metastatic, or relapsed renal-cell carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; 57(4):533-539.
- (182) Johnson RS, Martin SA, Biemann K, Stults JT, Watson JT. Novel fragmentation process of peptides by collision-induced decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine. *Anal Chem* 1987; 59(21):2621-2625.
- (183) Jongmans W, van den OK, Tiemessen DM, Molkenboer J, Willemsen R, Mulders PF et al. Targeting of adenovirus to human renal cell carcinoma cells. *Urology* 2003; 62(3):559-565.
- (184) Jung G, Ledbetter JA, Muller-Eberhard HJ. Induction of cytotoxicity in resting human T lymphocytes bound to tumor cells by antibody heteroconjugates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84(13):4611-4615.
- (185) Jurcic JG, Caron PC, Nikula TK, Papadopoulos EB, Finn RD, Gansow OA et al. Radiolabeled anti-CD33 monoclonal antibody M195 for myeloid leukemias. *Cancer Res* 1995; 55(23 Suppl):5908s-5910s.
- (186) Juusela H, Malmio K, Alfthan O, Oravisto KJ. Preoperative irradiation in the treatment of renal adenocarcinoma. *Scand J Urol Nephrol* 1977; 11(3):277-281.
- (187) Karanikas V, Hwang LA, Pearson J, Ong CS, Apostolopoulos V, Vaughan H et al. Antibody and T cell responses of patients with adenocarcinoma immunized with mannan-MUC1 fusion protein. *J Clin Invest* 1997; 100(11):2783-2792.
- (188) Karp JE, Gojo I, Pili R, Gocke CD, Greer J, Guo C et al. Targeting vascular endothelial growth factor for relapsed and refractory adult acute myelogenous leukemias: therapy with sequential 1-beta-d-arabinofuranosylcytosine, mitoxantrone, and bevacizumab. *Clin Cancer Res* 2004; 10(11):3577-3585.
- (189) Karp JE, Lancet JE, Kaufmann SH, End DW, Wright JJ, Bol K et al. Clinical and biologic activity of the farnesyltransferase inhibitor R115777 in adults with refractory and relapsed acute leukemias: a phase 1 clinical-laboratory correlative trial. *Blood* 2001; 97(11):3361-3369.
- (190) Karp JE, Ross DD, Yang W, Tidwell ML, Wei Y, Greer J et al. Timed sequential therapy of acute leukemia with flavopiridol: in vitro model for a phase I clinical trial. *Clin Cancer Res* 2003; 9(1):307-315.
- (191) Kawakami Y, Eliyahu S, Sakaguchi K, Robbins PF, Rivoltini L, Yannelli JR et al. Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen

recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 1994; 180(1):347-352.

- (192) Kawakami Y, Robbins PF, Rosenberg SA. Human melanoma antigens recognized by T lymphocytes. *Keio J Med* 1996; 45(2):100-108.
- (193) Kebarle P. A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 2000; 35(7):804-817.
- (194) Kell WJ, Burnett AK, Chopra R, Yin JA, Clark RE, Rohatiner A et al. A feasibility study of simultaneous administration of gemtuzumab ozogamicin with intensive chemotherapy in induction and consolidation in younger patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2003; 102(13):4277-4283.
- (195) Kelly K, Siebenlist U. The role of c-myc in the proliferation of normal and neoplastic cells. *J Clin Immunol* 1985; 5(2):65-77.
- (196) Kennedy C, Sebire K, de Kretser DM, O'Bryan MK. Human sperm associated antigen 4 (SPAG4) is a potential cancer marker. *Cell Tissue Res* 2004; 315(2):279-283.
- (197) Kessler JH, Beekman NJ, Bres-Vloemans SA, Verdijk P, van Veelen PA, Kloosterman-Joosten AM et al. Efficient identification of novel HLA-A(*)0201-presented cytotoxic T lymphocyte epitopes in the widely expressed tumor antigen PRAME by proteasome-mediated digestion analysis. *J Exp Med* 2001; 193(1):73-88.
- (198) Kim JJ, Yang JS, Dang K, Manson KH, Weiner DB. Engineering enhancement of immune responses to DNA-based vaccines in a prostate cancer model in rhesus macaques through the use of cytokine gene adjuvants. *Clin Cancer Res* 2001; 7(3 Suppl):882s-889s.
- (199) Kim KT, Baird K, Ahn JY, Meltzer P, Lilly M, Levis M et al. Pim-1 is up-regulated by constitutively activated FLT3 and plays a role in FLT3-mediated cell survival. *Blood* 2005; 105(4):1759-1767.
- (200) Kinouchi T, Saiki S, Meguro N, Maeda O, Kuroda M, Usami M et al. Impact of tumor size on the clinical outcomes of patients with Robson State I renal cell carcinoma. *Cancer* 1999; 85(3):689-695.
- (201) Kisselev AF, Akopian TN, Goldberg AL. Range of sizes of peptide products generated during degradation of different proteins by archaeal proteasomes. *J Biol Chem* 1998; 273(4):1982-1989.
- (202) Kjaer M, Frederiksen PL, Engelholm SA. Postoperative radiotherapy in stage II and III renal adenocarcinoma. A randomized trial by the Copenhagen Renal Cancer Study Group. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1987; 13(5):665-672.
- (203) Knights AJ, Weinzierl AO, Flad T, Guinn BA, Mueller L, Mufti GJ et al. A novel MHC-associated proteinase 3 peptide isolated from primary chronic myeloid leukaemia cells further supports the significance of this antigen for the immunotherapy of myeloid leukaemias. *Leukemia* 2006; 20(6):1067-1072.
- (204) Koga M, Shichijo S, Yamada A, Ashihara J, Sawamizu H, Kusukawa J et al. Identification of ribosomal proteins S2 and L10a as tumor antigens recognized by HLA-A26-restricted CTL. *Tissue Antigens* 2003; 61(2):136-145.
- (205) Kondagunta GV, Drucker B, Schwartz L, Bacik J, Marion S, Russo P et al. Phase II trial of bortezomib for patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2004; 22(18):3720-3725.

- (206) Kosari F, Parker AS, Kube DM, Lohse CM, Leibovich BC, Blute ML et al. Clear cell renal cell carcinoma: gene expression analyses identify a potential signature for tumor aggressiveness. *Clin Cancer Res* 2005; 11(14):5128-5139.
- (207) Kosugi H, Towatari M, Hatano S, Kitamura K, Kiyoi H, Kinoshita T et al. Histone deacetylase inhibitors are the potent inducer/enhancer of differentiation in acute myeloid leukemia: a new approach to anti-leukemia therapy. *Leukemia* 1999; 13(9):1316-1324.
- (208) Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Simopoulos K, Pastorek J, Wykoff CC et al. Hypoxia-regulated carbonic anhydrase-9 (CA9) relates to poor vascularization and resistance of squamous cell head and neck cancer to chemoradiotherapy. *Clin Cancer Res* 2001; 7(11):3399-3403.
- (209) Kovacs G. Molecular cytogenetics of renal cell tumors. *Adv Cancer Res* 1993; 62:89-124.
- (210) Kovacs G, Akhtar M, Beckwith BJ, Bugert P, Cooper CS, Delahunt B et al. The Heidelberg classification of renal cell tumours. *J Pathol* 1997; 183(2):131-133.
- (211) Kovacs G, Fuzesi L, Emanuel A, Kung HF. Cytogenetics of papillary renal cell tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 1991; 3(4):249-255.
- (212) Kovacs G, Wilkens L, Papp T, de Riese W. Differentiation between papillary and nonpapillary renal cell carcinomas by DNA analysis. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81(7):527-530.
- (213) Kranenborg MH, Boerman OC, Oosterwijk-Wakka JC, De Weijert MC, Corstens FH, Oosterwijk E. Development and characterization of anti-renal cell carcinoma x antichelate bispecific monoclonal antibodies for two-phase targeting of renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1995; 55(23 Suppl):5864s-5867s.
- (214) Kruger T, Schoor O, Lemmel C, Kraemer B, Reichle C, Dengjel J et al. Lessons to be learned from primary renal cell carcinomas: novel tumor antigens and HLA ligands for immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2005; 54(9):826-836.
- (215) Kubo RT, Sette A, Grey HM, Appella E, Sakaguchi K, Zhu NZ et al. Definition of specific peptide motifs for four major HLA-A alleles. *J Immunol* 1994; 152(8):3913-3924.
- (216) Kuenen BC, Taberner J, Baselga J, Cavalli F, Pfanner E, Conte PF et al. Efficacy and toxicity of the angiogenesis inhibitor SU5416 as a single agent in patients with advanced renal cell carcinoma, melanoma, and soft tissue sarcoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9(5):1648-1655.
- (217) Kwiatkowski J, Schmidt B, Merkle P, Keller K. Perioperative brachytherapy as an additional therapeutic option in patients with renal cell carcinoma (RCC), either inoperable or after completed percutaneous radiotherapy. *Anticancer Res* 1999; 19(2C):1597-1599.
- (218) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259):680-685.
- (219) Lampson LA, Levy R. Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line. *J Immunol* 1980; 125(1):293-299.
- (220) Lara PN, Jr., Quinn DI, Margolin K, Meyers FJ, Longmate J, Frankel P et al. SU5416 plus interferon alpha in advanced renal cell carcinoma: a phase II California Cancer Consortium Study with biological and imaging correlates of angiogenesis inhibition. *Clin Cancer Res* 2003; 9(13):4772-4781.

- (221) Larsen AK, Escargueil AE, Skladanowski A. Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. *Pharmacol Ther* 2003; 99(2):167-181.
- (222) Le Jan S, Amy C, Cazes A, Monnot C, Lamande N, Favier J et al. Angiopoietin-like 4 is a proangiogenic factor produced during ischemia and in conventional renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 2003; 162(5):1521-1528.
- (223) Lee CG, Ren J, Cheong IS, Ban KH, Ooi LL, Yong TS et al. Expression of the FAT10 gene is highly upregulated in hepatocellular carcinoma and other gastrointestinal and gynecological cancers. *Oncogene* 2003; 22(17):2592-2603.
- (224) Lee CP, Patel PM, Selby PJ, Hancock BW, Mak I, Pyle L et al. Randomized phase II study comparing thalidomide with medroxyprogesterone acetate in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 24(6):898-903.
- (225) Lee JJ, Kook H, Park MS, Nam JH, Choi BH, Song WH et al. Immunotherapy using autologous monocyte-derived dendritic cells pulsed with leukemic cell lysates for acute myeloid leukemia relapse after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *J Clin Apher* 2004; 19(2):66-70.
- (226) Lemmel C, Weik S, Eberle U, Dengjel J, Kratt T, Becker HD et al. Differential quantitative analysis of MHC ligands by mass spectrometry using stable isotope labeling. *Nat Biotechnol* 2004; 22(4):450-454.
- (227) Li S, Paulsson KM, Chen S, Sjogren HO, Wang P. Tapasin is required for efficient peptide binding to transporter associated with antigen processing. *J Biol Chem* 2000; 275(3):1581-1586.
- (228) Liang Y, Bollen AW, Aldape KD, Gupta N. Nuclear FABP7 immunoreactivity is preferentially expressed in infiltrative glioma and is associated with poor prognosis in EGFR-overexpressing glioblastoma. *BMC Cancer* 2006; 6(1):97.
- (229) Liang Y, Diehn M, Watson N, Bollen AW, Aldape KD, Nicholas MK et al. Gene expression profiling reveals molecularly and clinically distinct subtypes of glioblastoma multiforme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(16):5814-5819.
- (230) Liao DJ, Dickson RB. c-Myc in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2000; 7(3):143-164.
- (231) Liao JC, Gregor P, Wolchok JD, Orlandi F, Craft D, Leung C et al. Vaccination with human tyrosinase DNA induces antibody responses in dogs with advanced melanoma. *Cancer Immun* 2006; 6:8.
- (232) Licht MR, Novick AC. Nephron sparing surgery for renal cell carcinoma. *J Urol* 1993; 149(1):1-7.
- (233) Liesveld JL, Abboud CN, Lu C, McNair C, Menon A, Smith A et al. Flavonoid effects on normal and leukemic cells. *Leuk Res* 2003; 27(6):517-527.
- (234) Lindsey H. Bevacizumab and erlotinib show promise for kidney cancer. *Lancet Oncol* 2006; 7(1):15.
- (235) List AF, Kopecky KJ, Willman CL, Head DR, Persons DL, Slovak ML et al. Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood* 2001; 98(12):3212-3220.

- (236) Liu P, Seidel N, Bodine D, Speck N, Tarle S, Collins FS. Acute myeloid leukemia with Inv (16) produces a chimeric transcription factor with a myosin heavy chain tail. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1994; 59:547-553.
- (237) Liu P, Tarle SA, Hajra A, Claxton DF, Marlton P, Freedman M et al. Fusion between transcription factor CBF beta/PEBP2 beta and a myosin heavy chain in acute myeloid leukemia. *Science* 1993; 261(5124):1041-1044.
- (238) Look AT. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* 1997; 278(5340):1059-1064.
- (239) Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999; 341(14):1051-1062.
- (240) Lowenberg B, Verdonck LJ, Dekker AW, Willemze R, Zwaan FE, de Planque M et al. Autologous bone marrow transplantation in acute myeloid leukemia in first remission: results of a Dutch prospective study. *J Clin Oncol* 1990; 8(2):287-294.
- (241) Luckey CJ, Marto JA, Partridge M, Hall E, White FM, Lippolis JD et al. Differences in the expression of human class I MHC alleles and their associated peptides in the presence of proteasome inhibitors. *J Immunol* 2001; 167(3):1212-1221.
- (242) Mahotka C, Krieg T, Krieg A, Wenzel M, Suschek CV, Heydthausen M et al. Distinct *in vivo* expression patterns of survivin splice variants in renal cell carcinomas. *Int J Cancer* 2002; 100(1):30-36.
- (243) Mailander V, Scheibenbogen C, Thiel E, Letsch A, Blau IW, Keilholz U. Complete remission in a patient with recurrent acute myeloid leukemia induced by vaccination with WT1 peptide in the absence of hematological or renal toxicity. *Leukemia* 2004; 18(1):165-166.
- (244) Maker AV, Attia P, Rosenberg SA. Analysis of the cellular mechanism of antitumor responses and autoimmunity in patients treated with CTLA-4 blockade. *J Immunol* 2005; 175(11):7746-7754.
- (245) Maraninchi D, Blaise D, Viens P, Brandely M, Olive D, Lopez M et al. High-dose recombinant interleukin-2 and acute myeloid leukemias in relapse. *Blood* 1991; 78(9):2182-2187.
- (246) Maraninchi D, Vey N, Viens P, Stoppa AM, Archimbaud E, Attal M et al. A phase II study of interleukin-2 in 49 patients with relapsed or refractory acute leukemia. *Leuk Lymphoma* 1998; 31(3-4):343-349.
- (247) Marchetti A, Buttitta F, Pellegrini S, Bertacca G, Callahan R. Reduced expression of INT-6/eIF3-p48 in human tumors. *Int J Oncol* 2001; 18(1):175-179.
- (248) Marcucci G, Byrd JC, Dai G, Klisovic MI, Kourlas PJ, Young DC et al. Phase 1 and pharmacodynamic studies of G3139, a Bcl-2 antisense oligonucleotide, in combination with chemotherapy in refractory or relapsed acute leukemia. *Blood* 2003; 101(2):425-432.
- (249) Marcucci G, Mrozek K, Ruppert AS, Maharry K, Kolitz JE, Moore JO et al. Prognostic factors and outcome of core binding factor acute myeloid leukemia patients with t(8;21) differ from those of patients with inv(16): a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 2005; 23(24):5705-5717.
- (250) Marcucci G, Stock W, Dai G, Klisovic MI, Maharry K, Shen T et al. G3139, a BCL-2 antisense oligo-nucleotide, in AML. *Ann Hematol* 2004; 83 Suppl 1:S93-S94.

- (251) Marshall FF. Application of thalidomide/interleukin-2 in immunochemotherapy refractory metastatic renal cell carcinoma. *J Urol* 2006; 175(6):2068.
- (252) Matsumura I, Ikeda H, Kanakura Y. The effects of thrombopoietin on the growth of acute myeloblastic leukemia cells. *Leuk Lymphoma* 1996; 23(5-6):533-538.
- (253) Matsumura I, Kanakura Y, Kato T, Ikeda H, Ishikawa J, Horikawa Y et al. Growth response of acute myeloblastic leukemia cells to recombinant human thrombopoietin. *Blood* 1995; 86(2):703-709.
- (254) Mayer RJ, Davis RB, Schiffer CA, Berg DT, Powell BL, Schulman P et al. Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. Cancer and Leukemia Group B. *N Engl J Med* 1994; 331(14):896-903.
- (255) Mazzaferro V, Coppa J, Carrabba MG, Rivoltini L, Schiavo M, Regalia E et al. Vaccination with autologous tumor-derived heat-shock protein gp96 after liver resection for metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9(9):3235-3245.
- (256) McDermott DF, Regan MM, Clark JI, Flaherty LE, Weiss GR, Logan TF et al. Randomized phase III trial of high-dose interleukin-2 versus subcutaneous interleukin-2 and interferon in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2005; 23(1):133-141.
- (257) McFadyen MC, Breeman S, Payne S, Stirk C, Miller ID, Melvin WT et al. Immunohistochemical localization of cytochrome P450 CYP1B1 in breast cancer with monoclonal antibodies specific for CYP1B1. *J Histochem Cytochem* 1999; 47(11):1457-1464.
- (258) McFadyen MC, Cruickshank ME, Miller ID, McLeod HL, Melvin WT, Haites NE et al. Cytochrome P450 CYP1B1 over-expression in primary and metastatic ovarian cancer. *Br J Cancer* 2001; 85(2):242-246.
- (259) McFadyen MC, McLeod HL, Jackson FC, Melvin WT, Doehmer J, Murray GI. Cytochrome P450 CYP1B1 protein expression: a novel mechanism of anticancer drug resistance. *Biochem Pharmacol* 2001; 62(2):207-212.
- (260) McFadyen MC, Melvin WT, Murray GI. Cytochrome P450 CYP1B1 activity in renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 2004; 91(5):966-971.
- (261) Melgarejo E, Medina MA, Paz JC, Sanchez-Jimenez F, Urdiales JL. Real-time RT-PCR analysis of human histidine decarboxylase, a new marker for several types of leukemia and cancer. *Oncol Rep* 2006; 15(1):193-197.
- (262) Minev BR. Technology evaluation: HSPPC-96, antigenics. *Curr Opin Mol Ther* 2003; 5(6):680-687.
- (263) Miyazaki S, Imatani A, Ballard L, Marchetti A, Buttitta F, Albertsen H et al. The chromosome location of the human homolog of the mouse mammary tumor-associated gene INT6 and its status in human breast carcinomas. *Genomics* 1997; 46(1):155-158.
- (264) Mochizuki T, Kitanaka C, Noguchi K, Muramatsu T, Asai A, Kuchino Y. Physical and functional interactions between Pim-1 kinase and Cdc25A phosphatase. Implications for the Pim-1-mediated activation of the c-Myc signaling pathway. *J Biol Chem* 1999; 274(26):18659-18666.
- (265) Molldrem JJ, Clave E, Jiang YZ, Mavroudis D, Raptis A, Hensel N et al. Cytotoxic T lymphocytes specific for a nonpolymorphic proteinase 3 peptide preferentially inhibit chronic myeloid leukemia colony-forming units. *Blood* 1997; 90(7):2529-2534.

- (266) Molldrem JJ, Lee PP, Wang C, Felio K, Kantarjian HM, Champlin RE et al. Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia. *Nat Med* 2000; 6(9):1018-1023.
- (267) Moore JO, George SL, Dodge RK, Amrein PC, Powell BL, Kolitz JE et al. Sequential multiagent chemotherapy is not superior to high-dose cytarabine alone as postremission intensification therapy for acute myeloid leukemia in adults under 60 years of age: Cancer and Leukemia Group B Study 9222. *Blood* 2005; 105(9):3420-3427.
- (268) Morton DL, Hoon DS, Nizze JA, Foshag LJ, Famatiga E, Wanek LA et al. Polyvalent melanoma vaccine improves survival of patients with metastatic melanoma. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 690:120-134.
- (269) Morton DL, Hsueh EC, Essner R, Foshag LJ, O'Day SJ, Bilchik A et al. Prolonged survival of patients receiving active immunotherapy with Canvaxin therapeutic polyvalent vaccine after complete resection of melanoma metastatic to regional lymph nodes. *Ann Surg* 2002; 236(4):438-448.
- (270) Moschella F, Catanzaro RP, Bisikirska B, Sawczuk IS, Papadopoulos KP, Ferrante AW, Jr. et al. Shifting gene expression profiles during ex vivo culture of renal tumor cells: implications for cancer immunotherapy. *Oncol Res* 2003; 14(3):133-145.
- (271) Mostofi FK DC, Jr. Tumors and tumor-like lesions of the kidney. *Curr Probl Cancer* 1986; 10(2):53-114.
- (272) Mostofi FK. Tumors of the renal parenchyma. *Monogr Pathol* 1979; 20:356-412.
- (273) Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O et al. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007; 356(2):115-124.
- (274) Motzer RJ, Michaelson MD, Redman BG, Hudes GR, Wilding G, Figlin RA et al. Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 24(1):16-24.
- (275) Mrozek K, Heinonen K, de La CA, Bloomfield CD. Clinical significance of cytogenetics in acute myeloid leukemia. *Semin Oncol* 1997; 24(1):17-31.
- (276) Murray GI, Taylor MC, McFadyen MC, McKay JA, Greenlee WF, Burke MD et al. Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer Res* 1997; 57(14):3026-3031.
- (277) Nakatsura T, Senju S, Yamada K, Jotsuka T, Ogawa M, Nishimura Y. Gene cloning of immunogenic antigens overexpressed in pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 281(4):936-944.
- (278) Nathan P, Chao D, Brock C, Savage P, Harries M, Gore M et al. The place of VEGF inhibition in the current management of renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 2006; 94(9):1217-1220.
- (279) Neefjes JJ, Momburg F, Hammerling GJ. Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science* 1993; 261(5122):769-771.
- (280) Negrier S, Escudier B, Lasset C, Douillard JY, Savary J, Chevreau C et al. Recombinant human interleukin-2, recombinant human interferon alfa-2a, or both in metastatic renal-cell carcinoma. *Groupe Francais d'Immunotherapie. N Engl J Med* 1998; 338(18):1272-1278.

- (281) Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R et al. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1998; 4(3):328-332.
- (282) Nieborowska-Skorska M, Hoser G, Kossev P, Wasik MA, Skorski T. Complementary functions of the antiapoptotic protein A1 and serine/threonine kinase pim-1 in the BCR/ABL-mediated leukemogenesis. *Blood* 2002; 99(12):4531-4539.
- (283) Nishizaka S, Gomi S, Harada K, Oizumi K, Itoh K, Shichijo S. A new tumor-rejection antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes infiltrating into a lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 2000; 60(17):4830-4837.
- (284) Oiso M, Eura M, Katsura F, Takiguchi M, Sobao Y, Masuyama K et al. A newly identified MAGE-3-derived epitope recognized by HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Int J Cancer* 1999; 81(3):387-394.
- (285) Oka Y, Tsuboi A, Taguchi T, Osaki T, Kyo T, Nakajima H et al. Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(38):13885-13890.
- (286) Oka Y, Udaka K, Tsuboi A, Elisseeva OA, Ogawa H, Aozasa K et al. Cancer immunotherapy targeting Wilms' tumor gene WT1 product. *J Immunol* 2000; 164(4):1873-1880.
- (287) Oosterwijk E, Bander NH, Divgi CR, Welt S, Wakka JC, Finn RD et al. Antibody localization in human renal cell carcinoma: a phase I study of monoclonal antibody G250. *J Clin Oncol* 1993; 11(4):738-750.
- (288) Oosterwijk E, Debruyne FM. Radiolabeled monoclonal antibody G250 in renal-cell carcinoma. *World J Urol* 1995; 13(3):186-190.
- (289) Oosterwijk E, Debruyne FM, Schalken JA. The use of monoclonal antibody G250 in the therapy of renal-cell carcinoma. *Semin Oncol* 1995; 22(1):34-41.
- (290) Oosterwijk E, Ruiters DJ, Hoedemaeker PJ, Pauwels EK, Jonas U, Zwartendijk J et al. Monoclonal antibody G 250 recognizes a determinant present in renal-cell carcinoma and absent from normal kidney. *Int J Cancer* 1986; 38(4):489-494.
- (291) Oosterwijk-Wakka JC, Tiemessen DM, Bleumer I, De Vries IJ, Jongmans W, Adema GJ et al. Vaccination of patients with metastatic renal cell carcinoma with autologous dendritic cells pulsed with autologous tumor antigens in combination with interleukin-2: a phase 1 study. *J Immunother* 2002; 25(6):500-508.
- (292) Pagel JM, Appelbaum FR, Eary JF, Rajendran J, Fisher DR, Gooley T et al. 131I-anti-CD45 antibody plus busulfan and cyclophosphamide before allogeneic hematopoietic cell transplantation for treatment of acute myeloid leukemia in first remission. *Blood* 2006; 107(5):2184-2191.
- (293) Panelli MC, Wunderlich J, Jeffries J, Wang E, Mixon A, Rosenberg SA et al. Phase 1 study in patients with metastatic melanoma of immunization with dendritic cells presenting epitopes derived from the melanoma-associated antigens MART-1 and gp100. *J Immunother* 2000; 23(4):487-498.
- (294) Pantuck AJ, Zeng G, Belldegrun AS, Figlin RA. Pathobiology, prognosis, and targeted therapy for renal cell carcinoma: exploiting the hypoxia-induced pathway. *Clin Cancer Res* 2003; 9(13):4641-4652.

- (295) Pantuck AJ, Zisman A, Beldegrun AS. The changing natural history of renal cell carcinoma. *J Urol* 2001; 166(5):1611-1623.
- (296) Pappin DRDHHB-JMJWaBA. Chemistry, mass spectrometry and peptide-mass databases: Evolution of methods for the rapid identification and mapping of cellular proteins. *Mass Spectrom Biol Sci* 1996;135-150.
- (297) Parham P, Brodsky FM. Partial purification and some properties of BB7.2. A cytotoxic monoclonal antibody with specificity for HLA-A2 and a variant of HLA-A28. *Hum Immunol* 1981; 3(4):277-299.
- (298) Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55(2):74-108.
- (299) Pascolo S, Schirle M, Guckel B, Dumrese T, Stumm S, Kayser S et al. A MAGE-A1 HLA-A A*0201 epitope identified by mass spectrometry. *Cancer Res* 2001; 61(10):4072-4077.
- (300) Pelengaris S, Khan M, Evan G. c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(10):764-776.
- (301) Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzo M, Mazzone M, Giordano S, Comoglio PM. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell* 2003; 3(4):347-361.
- (302) Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 1999; 20(18):3551-3567.
- (303) Petritsch PH, Gruber H, Colombo T, Rauchenwald M, Breinl E, Ratschek M et al. [Indications and results of ex-vivo surgery of the kidney]. *Wien Klin Wochenschr* 1995; 107(23):731-735.
- (304) Petritsch PH, Sacks SA, Newell ME, Kaufman JJ. Ex vivo renal surgery. Further use of a new perfusate. *Am J Surg* 1974; 128(3):408-414.
- (305) Plasswilm L, Kortmann RD, Hehr T, Bamberg M. Therapieansätze beim Nierenzellkarzinom aus der Sicht der Strahlentherapie. *Onkologie* 2001; 7:759-766.
- (306) Polite BN, Desai AA, Manchen B, Stadler WM. Combination therapy of imatinib mesylate and interferon-alpha demonstrates minimal activity and significant toxicity in metastatic renal cell carcinoma: results of a single- institution phase II trial. *Clin Genitourin Cancer* 2006; 4(4):275-280.
- (307) Powell WC, Knox JD, Navre M, Grogan TM, Kittelson J, Nagle RB et al. Expression of the metalloproteinase matrilysin in DU-145 cells increases their invasive potential in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res* 1993; 53(2):417-422.
- (308) Preisler HD, Guan WD, Khan S, Kinniburgh A. Differing patterns of proto-oncogene expression in immature and mature myeloid cells. *Leuk Res* 1987; 11(10):923-934.
- (309) Proper DJ, McDonald AC, Man A, Thavasu P, Balkwill F, Braybrooke JP et al. Phase I and pharmacokinetic study of PKC412, an inhibitor of protein kinase C. *J Clin Oncol* 2001; 19(5):1485-1492.
- (310) Pusapati RV, Rounbehler RJ, Hong S, Powers JT, Yan M, Kiguchi K et al. ATM promotes apoptosis and suppresses tumorigenesis in response to Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(5):1446-1451.

- (311) Rammensee HG, Falk K, Rotzschke O. MHC molecules as peptide receptors. *Curr Opin Immunol* 1993; 5(1):35-44.
- (312) Rammensee HG, Weinschenk T, Gouttefangeas C, Stevanovic S. Towards patient-specific tumor antigen selection for vaccination. *Immunol Rev* 2002; 188:164-176.
- (313) Ratain MJ, Eisen T, Stadler WM, Flaherty KT, Kaye SB, Rosner GL et al. Phase II placebo-controlled randomized discontinuation trial of sorafenib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 24(16):2505-2512.
- (314) Raval RR, Lau KW, Tran MG, Sowter HM, Mandriota SJ, Li JL et al. Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol Cell Biol* 2005; 25(13):5675-5686.
- (315) Rebai N, Malissen B. Structural and genetic analyses of HLA class I molecules using monoclonal xenoantibodies. *Tissue Antigens* 1983; 22(2):107-117.
- (316) Reddy GK, Bukowski RM. Sorafenib: recent update on activity as a single agent and in combination with interferon-alpha2 in patients with advanced-stage renal cell carcinoma. *Clin Genitourin Cancer* 2006; 4(4):246-248.
- (317) Renkvist N, Castelli C, Robbins PF, Parmiani G. A listing of human tumor antigens recognized by T cells. *Cancer Immunol Immunother* 2001; 50(1):3-15.
- (318) Rezvani K, Brenchley JM, Price DA, Kilical Y, Gostick E, Sewell AK et al. T-cell responses directed against multiple HLA-A*0201-restricted epitopes derived from Wilms' tumor 1 protein in patients with leukemia and healthy donors: identification, quantification, and characterization. *Clin Cancer Res* 2005; 11(24 Pt 1):8799-8807.
- (319) RICHTER KM, AKIN RH. The cultivation of several genitourinary tract tumors. *Trans South Cent Sect Am Urol Assoc* 1957; 52:67-91.
- (320) Rini BI. SU11248 and AG013736: current data and future trials in renal cell carcinoma. *Clin Genitourin Cancer* 2005; 4(3):175-180.
- (321) Rini BI, Zimmerman T, Stadler WM, Gajewski TF, Vogelzang NJ. Allogeneic stem-cell transplantation of renal cell cancer after nonmyeloablative chemotherapy: feasibility, engraftment, and clinical results. *J Clin Oncol* 2002; 20(8):2017-2024.
- (322) Rini BI, Zimmerman TM, Gajewski TF, Stadler WM, Vogelzang NJ. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation for metastatic renal cell carcinoma. *J Urol* 2001; 165(4):1208-1209.
- (323) Rivett AJ. The multicatalytic proteinase complex. *Revis Biol Celular* 1989; 20:113-123.
- (324) Robin M, Schlageter MH, Chomienne C, Padua RA. Targeted immunotherapy in acute myeloblastic leukemia: from animals to humans. *Cancer Immunol Immunother* 2005; 54(10):933-943.
- (325) Robson CJ. Radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *J Urol* 1963; 89:37-42.
- (326) Robson CJ, Churchill BM, Anderson W. The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma. 1969. *J Urol* 2002; 167(2 Pt 2):873-875.
- (327) Roddie H, Klammer M, Thomas C, Thomson R, Atkinson A, Sproul A et al. Phase I/II study of vaccination with dendritic-like leukaemia cells for the immunotherapy of acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2006; 133(2):152-157.

- (328) Roepstorff P, Fohlman J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom* 1984; 11(11):601.
- (329) Roh M, Gary B, Song C, Said-Al-Naief N, Tousson A, Kraft A et al. Overexpression of the oncogenic kinase Pim-1 leads to genomic instability. *Cancer Res* 2003; 63(23):8079-8084.
- (330) Roh M, Song C, Kim J, Abdulkadir SA. Chromosomal instability induced by Pim-1 is passage-dependent and associated with dysregulation of cyclin B1. *J Biol Chem* 2005; 280(49):40568-40577.
- (331) Roigas J, Massenkeil G. Nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation in metastatic renal cell carcinoma: a new therapeutic option or just a clinical experiment? *World J Urol* 2005; 23(3):213-220.
- (332) Ronnen EA, Kondagunta GV, Motzer RJ. Medullary renal cell carcinoma and response to therapy with bortezomib. *J Clin Oncol* 2006; 24(9):e14.
- (333) Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL et al. Impact of cytokine administration on the generation of antitumor reactivity in patients with metastatic melanoma receiving a peptide vaccine. *J Immunol* 1999; 163(3):1690-1695.
- (334) Rubin EH, de Alwis DP, Pouliquen I, Green L, Marder P, Lin Y et al. A phase I trial of a potent P-glycoprotein inhibitor, Zosuquidar.3HCl trihydrochloride (LY335979), administered orally in combination with doxorubicin in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res* 2002; 8(12):3710-3717.
- (335) Rudolph-Owen LA, Chan R, Muller WJ, Matrisian LM. The matrix metalloproteinase matrilysin influences early-stage mammary tumorigenesis. *Cancer Res* 1998; 58(23):5500-5506.
- (336) Saarikoski ST, Rivera SP, Hankinson O. Mitogen-inducible gene 6 (MIG-6), adipophilin and tuftelin are inducible by hypoxia. *FEBS Lett* 2002; 530(1-3):186-190.
- (337) Sadovnikova E, Jopling LA, Soo KS, Stauss HJ. Generation of human tumor-reactive cytotoxic T cells against peptides presented by non-self HLA class I molecules. *Eur J Immunol* 1998; 28(1):193-200.
- (338) Saeterdal I, Bjorheim J, Lislud K, Gjertsen MK, Bukholm IK, Olsen OC et al. Frameshift-mutation-derived peptides as tumor-specific antigens in inherited and spontaneous colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(23):13255-13260.
- (339) Sandler DP. Epidemiology of acute myelogenous leukemia. *Semin Oncol* 1987; 14(4):359-364.
- (340) Sandler DP. Epidemiology and etiology of acute leukemia: an update. *Leukemia* 1992; 6 Suppl 4:3-5.
- (341) Savage P, Costelna D, Moore J, Gore ME. A phase II study of continuous infusional 5-fluorouracil (5-FU) and subcutaneous interleukin-2 (IL-2) in metastatic renal cancer. *Eur J Cancer* 1997; 33(7):1149-1151.
- (342) Scanlan MJ, Gordan JD, Williamson B, Stockert E, Bander NH, Jongeneel V et al. Antigens recognized by autologous antibody in patients with renal-cell carcinoma. *Int J Cancer* 1999; 83(4):456-464.

- (343) Schag K, Schmidt SM, Muller MR, Weinschenk T, Appel S, Weck MM et al. Identification of C-met oncogene as a broadly expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T-lymphocytes. *Clin Cancer Res* 2004; 10(11):3658-3666.
- (344) Scheel B, Braedel S, Probst J, Carralot JP, Wagner H, Schild H et al. Immunostimulating capacities of stabilized RNA molecules. *Eur J Immunol* 2004; 34(2):537-547.
- (345) Scheibenbogen C, Schadendorf D, Bechrakis NE, Nagorsen D, Hofmann U, Servetopoulou F et al. Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and foreign helper protein as immunologic adjuvants on the T-cell response to vaccination with tyrosinase peptides. *Int J Cancer* 2003; 104(2):188-194.
- (346) Scheibenbogen C, Schmittel A, Keilholz U, Allgauer T, Hofmann U, Max R et al. Phase 2 trial of vaccination with tyrosinase peptides and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with metastatic melanoma. *J Immunother* 2000; 23(2):275-281.
- (347) Schiller G, Lee M, Miller T, Lill M, Mittal-Henkle A, Paquette R et al. Transplantation of autologous peripheral blood progenitor cells procured after high-dose cytarabine-based consolidation chemotherapy for adults with acute myelogenous leukemia in first remission. *Leukemia* 1997; 11(9):1533-1539.
- (348) Schiller GJ, Nimer SD, Territo MC, Ho WG, Champlin RE, Gajewski JL. Bone marrow transplantation versus high-dose cytarabine-based consolidation chemotherapy for acute myelogenous leukemia in first remission. *J Clin Oncol* 1992; 10(1):41-46.
- (349) Schluter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD et al. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol* 1993; 123(3):513-522.
- (350) Schmelzeisen-Redecker G, Buetfering L, Roellgen W. Desolvation of ions and molecules in thermospray mass spectrometry. *Int J Mass Spectrom Ion Processes* 1989; 2:139-150.
- (351) Schmidt SM, Schag K, Muller MR, Weinschenk T, Appel S, Schoor O et al. Induction of adipophilin-specific cytotoxic T lymphocytes using a novel HLA-A2-binding peptide that mediates tumor cell lysis. *Cancer Res* 2004; 64(3):1164-1170.
- (352) Schmitz M, Diestelkoetter P, Weigle B, Schmachtenberg F, Stevanovic S, Ockert D et al. Generation of survivin-specific CD8+ T effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides. *Cancer Res* 2000; 60(17):4845-4849.
- (353) Schroder JK, Kolkenbrock S, Tins J, Kasimir-Bauer S, Seeber S, Schutte J. Analysis of thrombopoietin receptor (c-mpl) mRNA expression in de novo acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2000; 24(5):401-409.
- (354) Schui DK, Singh L, Schneider B, Knau A, Hoelzer D, Weidmann E. Inhibiting effects on the induction of cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells pulsed with lysates from acute myeloid leukemia blasts. *Leuk Res* 2002; 26(4):383-389.
- (355) Schuler MM, Donnes P, Nastke MD, Kohlbacher O, Rammensee HG, Stevanovic S. SNEP: SNP-derived epitope prediction program for minor H antigens. *Immunogenetics* 2005; 57(11):816-820.
- (356) Schultz ES, Zhang Y, Knowles R, Tine J, Traversari C, Boon T et al. A MAGE-3 peptide recognized on HLA-B35 and HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes. *Tissue Antigens* 2001; 57(2):103-109.

- (357) Seidler HB, Utsuyama M, Nagaoka S, Takemura T, Kitagawa M, Hirokawa K. Expression level of Wnt signaling components possibly influences the biological behavior of colorectal cancer in different age groups. *Exp Mol Pathol* 2004; 76(3):224-233.
- (358) Seliger B. Strategies of tumor immune evasion. *BioDrugs* 2005; 19(6):347-354.
- (359) Selvakumaran M, Liebermann D, Hoffman-Liebermann B. Myeloblastic leukemia cells conditionally blocked by myc-estrogen receptor chimeric transgenes for terminal differentiation coupled to growth arrest and apoptosis. *Blood* 1993; 81(9):2257-2262.
- (360) Serwold T, Gonzalez F, Kim J, Jacob R, Shastri N. ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* 2002; 419(6906):480-483.
- (361) Sette A, Sidney J. Nine major HLA class I supertypes account for the vast preponderance of HLA-A and -B polymorphism. *Immunogenetics* 1999; 50(3-4):201-212.
- (362) Seynaeve CM, Kazanietz MG, Blumberg PM, Sausville EA, Worland PJ. Differential inhibition of protein kinase C isozymes by UCN-01, a staurosporine analogue. *Mol Pharmacol* 1994; 45(6):1207-1214.
- (363) Shen L, Rock KL. Priming of T cells by exogenous antigen cross-presented on MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol* 2006; 18(1):85-91.
- (364) Sidney J, Grey HM, Southwood S, Celis E, Wentworth PA, del Guercio MF et al. Definition of an HLA-A3-like supermotif demonstrates the overlapping peptide-binding repertoires of common HLA molecules. *Hum Immunol* 1996; 45(2):79-93.
- (365) Siegel S, Steinmann J, Schmitz N, Stuhlmann R, Dreger P, Zeis M. Identification of a survivin-derived peptide that induces HLA-A*0201-restricted antileukemia cytotoxic T lymphocytes. *Leukemia* 2004; 18(12):2046-2047.
- (366) Sievers EL, Larson RA, Stadtmauer EA, Estey E, Lowenberg B, Dombret H et al. Efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first relapse. *J Clin Oncol* 2001; 19(13):3244-3254.
- (367) Simons JW, Mikhak B, Chang JF, DeMarzo AM, Carducci MA, Lim M et al. Induction of immunity to prostate cancer antigens: results of a clinical trial of vaccination with irradiated autologous prostate tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using ex vivo gene transfer. *Cancer Res* 1999; 59(20):5160-5168.
- (368) Skinner DG, Colvin RB, Vermillion CD, Pfister RC, Leadbetter WF. Diagnosis and management of renal cell carcinoma. A clinical and pathologic study of 309 cases. *Cancer* 1971; 28(5):1165-1177.
- (369) Skipper JC, Hendrickson RC, Gulden PH, Brichard V, Van Pel A, Chen Y et al. An HLA-A2-restricted tyrosinase antigen on melanoma cells results from posttranslational modification and suggests a novel pathway for processing of membrane proteins. *J Exp Med* 1996; 183(2):527-534.
- (370) Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, Harrington DH, Theil KS, Mohamed A et al. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood* 2000; 96(13):4075-4083.

- (371) Soignet SL, Frankel SR, Douer D, Tallman MS, Kantarjian H, Calleja E et al. United States multicenter study of arsenic trioxide in relapsed acute promyelocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2001; 19(18):3852-3860.
- (372) Span PN, Bussink J, Manders P, Beex LV, Sweep CG. Carbonic anhydrase-9 expression levels and prognosis in human breast cancer: association with treatment outcome. *Br J Cancer* 2003; 89(2):271-276.
- (373) Speicher MR, Schoell B, du MS, Schrock E, Ried T, Cremer T et al. Specific loss of chromosomes 1, 2, 6, 10, 13, 17, and 21 in chromophobe renal cell carcinomas revealed by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 1994; 145(2):356-364.
- (374) Spiotto MT, Schreiber H. Rapid destruction of the tumor microenvironment by CTLs recognizing cancer-specific antigens cross-presented by stromal cells. *Cancer Immun* 2005; 5:8.
- (375) Spisek R, Chevallier P, Morineau N, Milpied N, Avet-Loiseau H, Harousseau JL et al. Induction of leukemia-specific cytotoxic response by cross-presentation of late-apoptotic leukemic blasts by autologous dendritic cells of nonleukemic origin. *Cancer Res* 2002; 62(10):2861-2868.
- (376) Stan R, Wolchok JD, Cohen AD. DNA vaccines against cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 2006; 20(3):613-636.
- (377) Stein JP EDEJ. The surgical management for renal cell carcinoma: long-term results in a large group of patients. *J Urol*, suppl, 1998;(159: 192 abstract 737.).
- (378) Stein AS, O'Donnell MR, Chai A, Schmidt GM, Nademanee A, Parker PM et al. In vivo purging with high-dose cytarabine followed by high-dose chemoradiotherapy and reinfusion of unpurged bone marrow for adult acute myelogenous leukemia in first complete remission. *J Clin Oncol* 1996; 14(8):2206-2216.
- (379) Stein M, Kuten A, Halpern J, Coachman NM, Cohen Y, Robinson E. The value of postoperative irradiation in renal cell cancer. *Radiother Oncol* 1992; 24(1):41-44.
- (380) Steinbach F, Stockle M, Muller SC, Thuroff JW, Melchior SW, Stein R et al. Conservative surgery of renal cell tumors in 140 patients: 21 years of experience. *J Urol* 1992; 148(1):24-29.
- (381) Stevanovic S, Rammensee HG. Identification of T-cell epitopes using allele-specific ligand motifs. *Behring Inst Mitt* 1994;(95):7-13.
- (382) Stewart JH, Rosenberg SA. Long-term survival of anti-tumor lymphocytes generated by vaccination of patients with melanoma with a peptide vaccine. *J Immunother* 2000; 23(4):401-404.
- (383) Stirewalt DL, Radich JP. The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(9):650-665.
- (384) Stoltze L, Dick TP, Deeg M, Pommerl B, Rammensee HG, Schild H. Generation of the vesicular stomatitis virus nucleoprotein cytotoxic T lymphocyte epitope requires proteasome-dependent and -independent proteolytic activities. *Eur J Immunol* 1998; 28(12):4029-4036.
- (385) Stoltze L, Schirle M, Schwarz G, Schroter C, Thompson MW, Hersh LB et al. Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nat Immunol* 2000; 1(5):413-418.

- (386) Stone RM, DeAngelo DJ, Klimek V, Galinsky I, Estey E, Nimer SD et al. Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412. *Blood* 2005; 105(1):54-60.
- (387) Storkel S, Eble JN, Adlakha K, Amin M, Blute ML, Bostwick DG et al. Classification of renal cell carcinoma: Workgroup No. 1. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer* 1997; 80(5):987-989.
- (388) Strassburg CP, Neubauer V, Poliwoda H, Benter T. Regulation of the proto-oncogenes c-sis, c-fos, c-myc and c-myb in acute myeloid leukemias. *Neoplasma* 1992; 39(6):343-347.
- (389) Su Z, Dannull J, Heiser A, Yancey D, Pruitt S, Madden J et al. Immunological and clinical responses in metastatic renal cancer patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritic cells. *Cancer Res* 2003; 63(9):2127-2133.
- (390) Sufan RI, Jewett MA, Ohh M. The role of von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and hypoxia in renal clear cell carcinoma. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 287(1):F1-F6.
- (391) Sung YK, Hwang SY, Park MK, Bae HI, Kim WH, Kim JC et al. Fatty acid-CoA ligase 4 is overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2003; 94(5):421-424.
- (392) Swinson DE, Jones JL, Richardson D, Wykoff C, Turley H, Pastorek J et al. Carbonic anhydrase IX expression, a novel surrogate marker of tumor hypoxia, is associated with a poor prognosis in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21(3):473-482.
- (393) Takeshita A, Shinjo K, Izumi M, Ling P, Nakamura S, Naito K et al. Quantitative expression of thrombopoietin receptor on leukaemia cells from patients with acute myeloid leukaemia and acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 1998; 100(2):283-290.
- (394) Tanaka F, Fujie T, Tahara K, Mori M, Takesako K, Sette A et al. Induction of antitumor cytotoxic T lymphocytes with a MAGE-3-encoded synthetic peptide presented by human leukocytes antigen-A24. *Cancer Res* 1997; 57(20):4465-4468.
- (395) Tanaka K, Kasahara M. The MHC class I ligand-generating system: roles of immunoproteasomes and the interferon-gamma-inducible proteasome activator PA28. *Immunol Rev* 1998; 163:161-176.
- (396) Tani K, Azuma M, Nakazaki Y, Oyaizu N, Hase H, Ohata J et al. Phase I study of autologous tumor vaccines transduced with the GM-CSF gene in four patients with stage IV renal cell cancer in Japan: clinical and immunological findings. *Mol Ther* 2004; 10(4):799-816.
- (397) Tarpey I, Stacey S, Hickling J, Birley HD, Renton A, McIndoe A et al. Human cytotoxic T lymphocytes stimulated by endogenously processed human papillomavirus type 11 E7 recognize a peptide containing a HLA-A2 (A*0201) motif. *Immunology* 1994; 81(2):222-227.
- (398) Thavasu P, Propper D, McDonald A, Dobbs N, Ganesan T, Talbot D et al. The protein kinase C inhibitor CGP41251 suppresses cytokine release and extracellular signal-regulated kinase 2 expression in cancer patients. *Cancer Res* 1999; 59(16):3980-3984.
- (399) Thoenes W, Storkel S, Rumpelt HJ. Human chromophobe cell renal carcinoma. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1985; 48(3):207-217.
- (400) Thoenes W, Storkel S, Rumpelt HJ, Moll R. Cytomorphological typing of renal cell carcinoma--a new approach. *Eur Urol* 1990; 18 Suppl 2:6-9.

- (401) Traversari C, van der BP, Luescher IF, Lurquin C, Chomez P, Van Pel A et al. 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* 1992; 176(5):1453-1457.
- (402) Tsang KY, Zaremba S, Nieroda CA, Zhu MZ, Hamilton JM, Schlom J. Generation of human cytotoxic T cells specific for human carcinoembryonic antigen epitopes from patients immunized with recombinant vaccinia-CEA vaccine. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87(13):982-990.
- (403) Tsui KH, Shvarts O, Barbaric Z, Figlin R, de Kernion JB, Belldegrun A. Is adrenalectomy a necessary component of radical nephrectomy? UCLA experience with 511 radical nephrectomies. *J Urol* 2000; 163(2):437-441.
- (404) Tsui KH, Shvarts O, Smith RB, Figlin RA, deKernion JB, Belldegrun A. Prognostic indicators for renal cell carcinoma: a multivariate analysis of 643 patients using the revised 1997 TNM staging criteria. *J Urol* 2000; 163(4):1090-1095.
- (405) Tureci O, Sahin U, Pfreundschuh M. Serological analysis of human tumor antigens: molecular definition and implications. *Mol Med Today* 1997; 3(8):342-349.
- (406) Uemura H, Fujimoto K, Tanaka M, Yoshikawa M, Hirao Y, Uejima S et al. A phase I trial of vaccination of CA9-derived peptides for HLA-A24-positive patients with cytokine-refractory metastatic renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006; 12(6):1768-1775.
- (407) Ulmer JB, Deck RR, DeWitt CM, Donnelly JJ, Friedman A, Montgomery DL et al. Induction of immunity by DNA vaccination: application to influenza and tuberculosis. *Behring Inst Mitt* 1997;(98):79-86.
- (408) Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 1993; 259(5102):1745-1749.
- (409) Vafa O, Wade M, Kern S, Beeche M, Pandita TK, Hampton GM et al. c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. *Mol Cell* 2002; 9(5):1031-1044.
- (410) Valet G. Past and present concepts in flow cytometry: a European perspective. *J Biol Regul Homeost Agents* 2003; 17(3):213-222.
- (411) Valmori D, Fonteneau JF, Lizana CM, Gervois N, Lienard D, Rimoldi D et al. Enhanced generation of specific tumor-reactive CTL in vitro by selected Melan-A/MART-1 immunodominant peptide analogues. *J Immunol* 1998; 160(4):1750-1758.
- (412) Valmori D, Gervois N, Rimoldi D, Fonteneau JF, Bonelo A, Lienard D et al. Diversity of the fine specificity displayed by HLA-A*0201-restricted CTL specific for the immunodominant Melan-A/MART-1 antigenic peptide. *J Immunol* 1998; 161(12):6956-6962.
- (413) Van den Eynde BJ, Gaugler B, Probst-Kepper M, Michaux L, Devuyst O, Lorge F et al. A new antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human kidney tumor results from reverse strand transcription. *J Exp Med* 1999; 190(12):1793-1800.
- (414) van der BP, Bastin J, Gajewski T, Coulie PG, Boel P, De Smet C et al. A peptide encoded by human gene MAGE-3 and presented by HLA-A2 induces cytolytic T lymphocytes that recognize tumor cells expressing MAGE-3. *Eur J Immunol* 1994; 24(12):3038-3043.

- (415) van der BP, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den EB et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991; 254(5038):1643-1647.
- (416) Van Gelder RN, von Zastrow ME, Yool A, Dement WC, Barchas JD, Eberwine JH. Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(5):1663-1667.
- (417) van Lohuizen M, Verbeek S, Krimpenfort P, Domen J, Saris C, Radaszkiewicz T et al. Predisposition to lymphomagenesis in pim-1 transgenic mice: cooperation with c-myc and N-myc in murine leukemia virus-induced tumors. *Cell* 1989; 56(4):673-682.
- (418) van DV, V, te Marvelde JG, Hoogeveen PG, Bernstein ID, Houtsmuller AB, Berger MS et al. Targeting of the CD33-calicheamicin immunoconjugate Mylotarg (CMA-676) in acute myeloid leukemia: in vivo and in vitro saturation and internalization by leukemic and normal myeloid cells. *Blood* 2001; 97(10):3197-3204.
- (419) Vigon I, Dreyfus F, Melle J, Viguie F, Ribrag V, Cocault L et al. Expression of the c-mpl proto-oncogene in human hematologic malignancies. *Blood* 1993; 82(3):877-883.
- (420) Vissers JL, De Vries IJ, Schreurs MW, Engelen LP, Oosterwijk E, Figdor CG et al. The renal cell carcinoma-associated antigen G250 encodes a human leukocyte antigen (HLA)-A2.1-restricted epitope recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res* 1999; 59(21):5554-5559.
- (421) Vogler WR, Velez-Garcia E, Weiner RS, Flaum MA, Bartolucci AA, Omura GA et al. A phase III trial comparing idarubicin and daunorubicin in combination with cytarabine in acute myelogenous leukemia: a Southeastern Cancer Study Group Study. *J Clin Oncol* 1992; 10(7):1103-1111.
- (422) Vonderheide RH, Anderson KS, Hahn WC, Butler MO, Schultze JL, Nadler LM. Characterization of HLA-A3-restricted cytotoxic T lymphocytes reactive against the widely expressed tumor antigen telomerase. *Clin Cancer Res* 2001; 7(11):3343-3348.
- (423) Vonderheide RH, Hahn WC, Schultze JL, Nadler LM. The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 1999; 10(6):673-679.
- (424) Vuky J, Isacson C, Fotoohi M, dela CJ, Otero H, Picozzi V et al. Phase II trial of imatinib (Gleevec) in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Invest New Drugs* 2006; 24(1):85-88.
- (425) Walker PR, Saas P, Dietrich PY. Role of Fas ligand (CD95L) in immune escape: the tumor cell strikes back. *J Immunol* 1997; 158(10):4521-4524.
- (426) Walter S, Herrgen L, Schoor O, Jung G, Wernet D, Buhning HJ et al. Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres. *J Immunol* 2003; 171(10):4974-4978.
- (427) Wan Y, Bramson J, Carter R, Graham F, Gauldie J. Dendritic cells transduced with an adenoviral vector encoding a model tumor-associated antigen for tumor vaccination. *Hum Gene Ther* 1997; 8(11):1355-1363.
- (428) Wang F, Bade E, Kuniyoshi C, Spears L, Jeffery G, Marty V et al. Phase I trial of a MART-1 peptide vaccine with incomplete Freund's adjuvant for resected high-risk melanoma. *Clin Cancer Res* 1999; 5(10):2756-2765.

- (429) Wang Y, Han KJ, Pang XW, Vaughan HA, Qu W, Dong XY et al. Large scale identification of human hepatocellular carcinoma-associated antigens by autoantibodies. *J Immunol* 2002; 169(2):1102-1109.
- (430) Wang YH, Liu S, Zhang G, Zhou CQ, Zhu HX, Zhou XB et al. Knockdown of c-Myc expression by RNAi inhibits MCF-7 breast tumor cells growth in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res* 2005; 7(2):R220-R228.
- (431) Wang Z, Bhattacharya N, Weaver M, Petersen K, Meyer M, Gapter L et al. Pim-1: a serine/threonine kinase with a role in cell survival, proliferation, differentiation and tumorigenesis. *J Vet Sci* 2001; 2(3):167-179.
- (432) Watkins SJ, Norbury CJ. Cell cycle-related variation in subcellular localization of eIF3e/INT6 in human fibroblasts. *Cell Prolif* 2004; 37(2):149-160.
- (433) Wechsel HW, Petri E, Bichler KH, Feil G. Marker for renal cell carcinoma (RCC): the dimeric form of pyruvate kinase type M2 (Tu M2-PK). *Anticancer Res* 1999; 19(4A):2583-2590.
- (434) Weick JK, Kopecky KJ, Appelbaum FR, Head DR, Kingsbury LL, Balcerzak SP et al. A randomized investigation of high-dose versus standard-dose cytosine arabinoside with daunorubicin in patients with previously untreated acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood* 1996; 88(8):2841-2851.
- (435) Weinschenk T, Gouttefangeas C, Schirle M, Obermayr F, Walter S, Schoor O et al. Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. *Cancer Res* 2002; 62(20):5818-5827.
- (436) Weinzierl AO, Lemmel C, Schoor O, Muller M, Kruger T, Wernet D et al. Distorted Relation between mRNA Copy Number and Corresponding Major Histocompatibility Complex Ligand Density on the Cell Surface. *Mol Cell Proteomics* 2007; 6(1):102-113.
- (437) Werf-Messing B, van der Heul RO, Ledeboer RC. Renal cell carcinoma trial. *Strahlentherapie [Sonderb]* 1981; 76:169-175.
- (438) Westin EH, Wong-Staal F, Gelmann EP, Dalla-Favera R, Papas TS, Lautenberger JA et al. Expression of cellular homologues of retroviral onc genes in human hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982; 79(8):2490-2494.
- (439) Wetzler M, Baer MR, Bernstein SH, Blumenson L, Stewart C, Barcos M et al. Expression of c-mpl mRNA, the receptor for thrombopoietin, in acute myeloid leukemia blasts identifies a group of patients with poor response to intensive chemotherapy. *J Clin Oncol* 1997; 15(6):2262-2268.
- (440) Wierecky J, Muller MR, Wirths S, Halder-Oehler E, Dorfel D, Schmidt SM et al. Immunologic and clinical responses after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells in metastatic renal cancer patients. *Cancer Res* 2006; 66(11):5910-5918.
- (441) Wiernik PH, Banks PL, Case DC, Jr., Arlin ZA, Periman PO, Todd MB et al. Cytarabine plus idarubicin or daunorubicin as induction and consolidation therapy for previously untreated adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 1992; 79(2):313-319.
- (442) Wills MR, Carmichael AJ, Mynard K, Jin X, Weekes MP, Plachter B et al. The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J Virol* 1996; 70(11):7569-7579.

- (443) Wilm M MM. Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last. *Int J Mass Spec Ion Proc* 1994; 136:167-180.
- (444) Wilson CL, Heppner KJ, Labosky PA, Hogan BL, Matrisian LM. Intestinal tumorigenesis is suppressed in mice lacking the metalloproteinase matrilysin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(4):1402-1407.
- (445) Wolfel T, Hauer M, Schneider J, Serrano M, Wolfel C, Klehmann-Hieb E et al. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 1995; 269(5228):1281-1284.
- (446) Wu SQ, Hafez GR, Xing W, Newton M, Chen XR, Messing E. The correlation between the loss of chromosome 14q with histologic tumor grade, pathologic stage, and outcome of patients with nonpapillary renal cell carcinoma. *Cancer* 1996; 77(6):1154-1160.
- (447) Wunderlich H, Schumann S, Jantitzky V, Moravek P, Podhola M, Kosmehl H et al. Increase of renal cell carcinoma incidence in central Europe. *Eur Urol* 1998; 33(6):538-541.
- (448) Yagoda A, Abi-Rached B, Petrylak D. Chemotherapy for advanced renal-cell carcinoma: 1983-1993. *Semin Oncol* 1995; 22(1):42-60.
- (449) Yanamandra N, Colaco NM, Parquet NA, Buzzeo RW, Boulware D, Wright G et al. Tipifarnib and bortezomib are synergistic and overcome cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma and acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2006; 12(2):591-599.
- (450) Yewdell JW, Anton LC, Bennink JR. Defective ribosomal products (DRiPs): a major source of antigenic peptides for MHC class I molecules? *J Immunol* 1996; 157(5):1823-1826.
- (451) Yotnda P, Firat H, Garcia-Pons F, Garcia Z, Gourru G, Vernant JP et al. Cytotoxic T cell response against the chimeric p210 BCR-ABL protein in patients with chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest* 1998; 101(10):2290-2296.
- (452) Young AN, Amin MB, Moreno CS, Lim SD, Cohen C, Petros JA et al. Expression profiling of renal epithelial neoplasms: a method for tumor classification and discovery of diagnostic molecular markers. *Am J Pathol* 2001; 158(5):1639-1651.
- (453) Yu C, Rahmani M, Conrad D, Subler M, Dent P, Grant S. The proteasome inhibitor bortezomib interacts synergistically with histone deacetylase inhibitors to induce apoptosis in Bcr/Abl+ cells sensitive and resistant to STI571. *Blood* 2003; 102(10):3765-3774.
- (454) Yu C, Rahmani M, Dent P, Grant S. The hierarchical relationship between MAPK signaling and ROS generation in human leukemia cells undergoing apoptosis in response to the proteasome inhibitor Bortezomib. *Exp Cell Res* 2004; 295(2):555-566.
- (455) Zbar B, Kaelin W, Maher E, Richard S. Third International Meeting on von Hippel-Lindau disease. *Cancer Res* 1999; 59(9):2251-2253.
- (456) Zeis M, Siegel S, Wagner A, Schmitz M, Marget M, Kuhl-Burmeister R et al. Generation of cytotoxic responses in mice and human individuals against hematological malignancies using survivin-RNA-transfected dendritic cells. *J Immunol* 2003; 170(11):5391-5397.
- (457) Zittoun RA, Mandelli F, Willemze R, de Witte T, Labar B, Resegotti L et al. Autologous or allogeneic bone marrow transplantation compared with intensive chemotherapy in acute

myelogenous leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) and the Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (GIMEMA) Leukemia Cooperative Groups. N Engl J Med 1995; 332(4):217-223.

7. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stefan Stevanović für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung meiner Arbeit. Ebenso danke ich Ihm für die vielen Hilfen, die großartigen Diskussionen, seine endlose Geduld und sein Interesse an meiner Arbeit, und dafür, dass er mir ermöglicht hat, mit einem Höchstmaß an Selbstständigkeit zu arbeiten.

Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee möchte ich danken, dass er mir die Gelegenheit gab an der Arbeit in seinem Labor teilzunehmen. Die unkomplizierte Art seine Abteilung zu leiten ist beeindruckend und die Gespräche und „Clubs“ ermöglichten es mir, über meinen fachlichen Tellerrand hinauszusehen. Die Zeit in seiner Abteilung war eine unschätzbare Bereicherung für mich.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Stenzl und der gesamten Universitätsklinik für Urologie für die Überlassung der vielen Tumorproben, die die Grundlage meiner Arbeit darstellten, und die jederzeit hervorragende und fruchtbare Zusammenarbeit. In diesem Zusammenhange bin ich insbesondere auch Herrn Jörg Hennenlotter zu ganz außerordentlichem und freundschaftlichem Dank verpflichtet, seine unermüdliche und vorzügliche Vorbereitung des Probenmaterials sowie sein Organisationstalent wären nicht zu ersetzen gewesen und sein unerschütterlicher Optimismus war eine große Hilfe.

Herrn Dr. Andre Banat und seiner gesamten Arbeitsgruppe möchte ich für die sehr gute Kooperation bezüglich des AML-Projekts danken.

Frau Prof. Dr. Wernet und der gesamten Abteilung für Transfusionsmedizin möchte ich für die vielen HLA-Typisierungen danken.

Herrn Dr. Oliver Schoor möchte ich für die Genexpressionsanalysen und vielen großartigen Hilfen danken.

Frau Dr. Cécile Gouttefangeas und Frau Dr. Thea Nastke möchte ich für vielfältige Hilfestellungen in der Kultur von Tumor- und T-Zellen danken.

Allen Mitarbeitern der Abteilung, Florian Altenberend, Jörn Dengjel, Gitsios Gitsioudis, Nina Hillen, Patricia Hrstić, Björn Krämer, Claudia Lemmel, Verena Meyer, Margret Müller, Mathias Schuler, Steffen Walter, Toni Weinschenk, Stefan Welte, Andreas Weinzierl und Birsen Yurbas, möchte ich für die vielen Spektren, Peptide, Monomere (...) und für eine gute Zeit danken.

Valerie Bahr, Claudia Falkenburger, Gerhard Hörr, Franziska Löwenstein und Lynne Yakes danke ich für ihre großartigen und unverzichtbaren Hilfen.

Der DFG möchte ich für die Unterstützung meiner Arbeit und für das großzügige Stipendium im Rahmen des Graduiertenkollegs "Cellular mechanisms of immune-associated processes" (GRK784) danken.

Meiner ganzen Familie möchte ich für die große Unterstützung und den Rückhalt in all den Jahren danken.

8. Lebenslauf und Publikationen

Persönliche Daten:

Name: Tobias Krüger
Geburtstag: 23. August 1979
Geburtsort: Heidelberg
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung:

08/1986 – 07/1990 Grundschule, Gladbeck, NRW
08/1990 – 07/1999 Gymnasium, Gladbeck, NRW
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst:

09/1999 – 08/2000 im Krankenhaus Bergmannsheil Gelsenkirchen-Buer

Universitäre Ausbildung:

09/2000 Studium der Humanmedizin, Eberhard-Karls Universität Tübingen:
09/2002 Ärztliche Vorprüfung
08/2003 Erstes Staatsexamen
03/2006 Zweites Staatsexamen
05/2007 Drittes Staatsexamen

Promotionsarbeit:

Angefertigt im interfakultären Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie
Universität Tübingen. Beginn der Arbeit: 09/2003

Stipendium:

09/2003 - 03/2004 DFG-Stipendium und Graduiertenkolleg
"Cellular mechanisms of immune-associated processes" (GRK784)

Publikationen:

Tobias Krüger, Oliver Schoor, Claudia Lemmel, Bjoern Kraemer, Christian Reichle, Jörn Dengjel, Toni Weinschenk, Margret Müller, Jörg Hennenlotter, Arnulf Stenzl, Hans-Georg Rammensee, Stefan Stevanović

Lessons to be learned from primary renal cell carcinomas: novel tumor antigens and HLA ligands for immunotherapy.

Cancer Immunol Immunother. 2004 Dec 31

Björn F. Krämer, Oliver Schoor, Tobias Krüger, Christian Reichle, Margret Müller, Toni Weinschenk, Jörg Hennenlotter, Arnulf Stenzl, Hans-Georg Rammensee, Stefan Stevanović

*MAGED4 – Expression in renal cell carcinoma and identification of an HLA-A*25-restricted MHC class I ligand from solid tumor tissue.*

Cancer Biology & Therapy, 2005 Sep;4(9):943-8.

Andreas O. Weinzierl, Claudia Lemmel, Oliver Schoor, Margret Müller, Tobias Krüger, Dorothee Wernet, Jörg Hennenlotter, Arnulf Stenzl, Hans-Georg Rammensee and Stefan Stevanović

Distorted relation between mRNA copy number and corresponding HLA ligand density on cell surface.

Mol Cell Proteomics. 2007 Jan;6(1):102-13.