

Aus dem Interfakultären Institut für Zellbiologie der Universität

Tübingen

Abteilung Immunologie

Direktor: Professor Dr. H.-G. Rammensee

**Patientenspezifische Analyse von  
Tumorantigenen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Eberhard Karls Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Christian Johannes Reichle

aus

Stuttgart

2006

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen  
1. Berichterstatter: Professor Dr. H.-G. Rammensee  
2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Pawelec



1. Einleitung.....	8
1.1. Krebs und Krebstherapie .....	8
1.2. Mechanismen des Immunsystems.....	9
1.2.1. Das MHC-Klasse-I-Molekül .....	9
1.2.2. Antigenprozessierung.....	10
1.2.3. Der T-Zell-Rezeptor.....	11
1.2.4. Interaktion zwischen MHC-Molekül und T-Zell-Rezeptor .....	12
1.3. Prinzipien der Immuntherapie .....	13
1.4. Pathologie und Therapie der für diese Arbeit relevanten Tumoren.....	17
1.4.1. Das Nierenzellkarzinom .....	17
1.4.2. Das Kolorektale Karzinom .....	19
1.4.3. Das Glioblastoma multiforme .....	20
1.5. Fragestellung und Ziel der Arbeit.....	21
2. Material und Methoden.....	23
2.1. Material .....	23
2.1.1. Chemikalien .....	23
2.1.2. Puffer, Lösungen und Gele .....	24
2.1.3. Antikörper .....	25
2.1.4. Geräte .....	26
2.2. Methoden.....	27
2.2.1. Auswahl der Patienten .....	27
2.2.2. Asservation des Tumorgewebes .....	27
2.2.3. Herstellung des Tumorlysats.....	28
2.2.4. Zusatz der Antikörperlösung .....	29
2.2.5. Affinitätschromatographie und Säureextraktion.....	29
2.2.6. Konzentrierung und Entsalzung des Zentrifon-Filtrats.....	30
2.2.7. Fraktionierung der Peptide mittels Reversed Phase HPLC.....	31
2.2.8. Quantifizierung der MHC-Ausbeute mittels Western Blot.....	31
2.2.9. Quantifizierung der MHC-Ausbeute durch Sequenzanalyse nach Edman.....	32
2.2.10. Sequenzanalyse der eluierten Peptide mittels Massenspektrometrie .....	34

2.2.11. Erfassung der Expression von Antigenen in Tumor- und Normalgewebe mittels Gen-Chips.....	36
2.2.12. Prozedere der Vakzinierung.....	37
3. Ergebnisse .....	39
3.1. Zum Verständnis.....	39
3.2. Verarbeitete Tumoren .....	40
3.3. MHC-Ausbeute aller verarbeiteten Tumoren .....	41
3.4. Ergebnisse NCh361.....	43
3.4.1. Herstellung des Tumorlysats.....	43
3.4.2. Inkubation mit Antikörpern.....	43
3.4.3. Affinitätschromatographie und Säurebehandlung .....	44
3.4.4. Entsalzung .....	44
3.4.5. HPLC.....	44
3.4.6. Quantifizierung der MHC-Ausbeute mittels Western Blot.....	45
3.4.7. Quantifizierung der MHC-Ausbeute mittels Edman-Abbau .....	49
3.4.8. Identifizierte Liganden aus NCh361 .....	51
3.4.9. Liganden tumorassoziierter Proteine.....	55
3.5. Ergebnisse RCC68 .....	60
3.5.1. Identifizierte Liganden aus RCC68.....	60
3.5.2. Liganden tumorassoziierter Proteine.....	64
3.6. Ergebnisse RCC75 .....	66
3.6.1. Identifizierte Liganden aus RCC75.....	66
3.6.2. Liganden tumorassoziierter Proteine.....	70
4. Diskussion .....	73
4.1. Immuntherapie und Standardtherapie spezieller Tumoren .....	73
4.2. Verarbeitete Tumorproben.....	75
4.2.1. Tumormasse .....	75
4.2.2. Lysatherstellung bei solidem Tumormaterial .....	76
4.2.3. HPLC-Chromatographie.....	77
4.2.4. Interpretation der MHC-Ausbeute.....	77
4.3. Diskussion der Ergebnisse einzelner Tumoren.....	78
4.3.1. NCh361:.....	78

4.3.2. RCC68 .....	81
4.3.3. RCC75: .....	82
4.4. Schlußfolgerung.....	83
5. Zusammenfassung .....	85
6. Literaturverzeichnis .....	87
7. Publikationen.....	100
8. Danksagung .....	101
9. Lebenslauf.....	103

# 1. Einleitung

## ***1.1. Krebs und Krebstherapie***

Die Krankheit Krebs wird in naher Zukunft Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems als Todesursache Nummer 1 in den westlichen Industrienationen ablösen. Obwohl oder gerade weil es für die meisten Patienten mit Tumorleiden eine Fülle möglicher Therapien gibt, die je nach Art des Tumors mehr oder weniger erfolgversprechend sind, wird bei der Behandlung dieser Erkrankungen ein materieller und finanzieller Aufwand betrieben, der andere Bereiche der Medizin bei weitem übertrifft. Trotzdem gibt es immer noch zahlreiche Tumorerkrankungen, die mit heutigen Methoden nicht geheilt werden können. In solchen Fällen versucht man mittels palliativer Therapiemethoden dem Patienten eine möglichst hohe Lebensqualität bei gleichzeitig möglichst langer Überlebenszeit zu bieten. Es gelingt aber nur selten in befriedigendem Ausmaß, und besonders während der Therapiephasen wird das Wohlbefinden der Tumorpatienten durch zum Teil schwere Nebenwirkungen der entsprechenden Therapie (z.B. Chemo- oder Radiotherapie) oft erheblich beeinträchtigt. Dies und die Hoffnung, Menschen mit Tumorerkrankungen dauerhaft heilen zu können, führt die Forschung dazu, ständig nach neuen Methoden und Ansätzen der Therapie zu suchen.

Ein solcher Ansatz ist die Analyse der Tumoren auf Merkmale, die sie von gesundem Gewebe unterscheiden. Schon früh wurden invasives und ungehemmtes Wachstum sowie die Fähigkeit zur Metastasierung als spezifische Merkmale von malignen Tumoren beschrieben. Heute sucht man solche Charakteristika auf zellulärer Ebene. Schließlich machen Mutationen der Erbinformation der Krebszelle auf DNA-Ebene oder deren Auswirkungen auf RNA- oder Proteinebene das eigentliche Krankheitspotential von Tumoren aus. Die Erforschung und Beschreibung solcher Zellmerkmale zeigt mögliche Wege auf, Krebs erfolgreicher zu bekämpfen, als dies bisher geschehen ist.

Zur ständigen Kontrolle der Körperzellen auf deren Gesundheit besitzt das gesunde Immunsystem des Menschen verschiedene Mechanismen. Diese

können auch bei Tumorzellen wirksam werden. Im Rahmen einer sogenannten Immuntherapie von Tumoren macht man sich diese Gegebenheit zunutze. Im folgenden werden die für diese Arbeit zentralen Mechanismen des Immunsystems erläutert.

## **1.2. Mechanismen des Immunsystems**

### **1.2.1. Das MHC-Klasse-I-Molekül**

Der Major Histocompatibility Complex (MHC) des Menschen wurde zunächst anhand von Leukozytenantigenen bezüglich derer sich verschiedene Individuen unterschieden, beschrieben. Daher stammt auch der Name Human Leucocyte Antigen (HLA).

MHC-Klasse-I-Moleküle erfüllen eine zentrale Funktion in der spezifischen Immunantwort, indem sie Abbauprodukte intrazellulärer Proteine auf der Zelloberfläche präsentieren. Diese Peptide haben eine Länge von 8 bis 12 Aminosäuren und binden nichtkovalent an den peptidbindenden Spalt, der von einer  $\beta$ -Faltblatt-Struktur, flankiert von zwei  $\alpha$ -Helices, gebildet wird [30].

MHC-Moleküle der Klasse I kommen auf allen kernhaltigen Zellen des Körpers vor. Im Gegensatz dazu stehen MHC-Klasse-II-Moleküle, die sich nur auf den Oberflächen von antigenpräsentierenden Zellen finden [82]. Unterschiedlich ist allerdings die Dichte der Moleküle auf der Zelloberfläche. Während Nervenzellen fast keine und Hepatozyten relativ wenig MHC-Klasse-I auf ihrer Zellmembran tragen, sind sie auf Epithelzellen, z.B. auf den von Schleimhäuten, in großer Zahl präsent. Durchschnittlich sind etwa  $10^5$  bis  $10^6$  MHC-Klasse-I-Moleküle auf einer Zelle vorhanden.

Das MHC-Klasse-I-Molekül ist ein Glykoprotein und besteht aus zwei Aminosäure-Ketten, der sogenannten  $\alpha$ -Kette (45 kDa) und dem  $\beta$ 2-Mikroglobulin (12 kDa). Beide sind nicht kovalent miteinander verbunden. So besteht das MHC-I aus vier Domänen ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3 und  $\beta$ 2-Mikroglobulin), wobei  $\alpha$ 1 und  $\alpha$ 2 den peptidbindenden Spalt bilden. Nur die  $\alpha$ -Kette durchläuft dabei die Plasmamembran und verankert das Molekül. [54]



Die Genorte des MHC-I liegen beim Menschen auf Chromosom 6, bei Mäusen auf Chromosom 17 und umfassen einen Bereich von ungefähr 4 Zentimorgan, was etwa  $7 \times 10^6$  Basenpaaren entspricht [89]. Es existieren beim Menschen Gene für verschiedene HLA-Typen, die sehr polymorph sind. Die häufigsten Allele des MHC-Klasse-I sind HLA A, B und C, von denen wieder zahlreiche verschiedene Allele bekannt sind. Diese kommen abhängig von geographischen Regionen unterschiedlich gehäuft vor.

Eine besondere Rolle spielen bei dieser Bindung die Bindungstaschen in der Tiefe des peptidbindenden Spaltes, die Wechselwirkungen bevorzugt mit bestimmten Aminosäuren der Peptide eingehen. Sie befinden sich meist in Position 2 und 9 der Peptide und werden Ankeraminosäuren genannt. Der Polymorphismus der MHC-Moleküle betrifft in erster Linie die Bindungstaschen, welche die nichtkovalente Bindung mit den Ankeraminosäuren des Peptids eingehen. Kennt man die bevorzugten Ankeraminosäuren eines HLA-Allels, so läßt sich für dieses ein bestimmtes Bindungsmuster erstellen, welches eine begrenzte Anzahl von Peptiden zeigt, die zur Bindung an ein MHC-Molekül befähigt sind, das Peptidmotiv. Erst durch den Zusammenschluß von MHC-Molekül und passendem Peptid, das heißt einem Peptid, welches die zum HLA-Allel passenden Anker enthält, wird das MHC-Molekül stabil [70]. Das Peptidmotiv eines HLA-Allels läßt sich durch N-terminale Sequenzierung der von MHC-Molekülen präsentierten Peptide erstellen [29]. Werden dabei in bestimmten Positionen der verschiedenen Peptide dieselben Aminosäuren gefunden, spricht dies für eine Ankeraminosäure zum entsprechenden Allel.

Die Funktion der MHC-Moleküle besteht darin, Antigenbruchstücke an der Zelloberfläche zu präsentieren. MHC-Klasse-I treten dabei mit CD8-positiven, MHC-Klasse-II mit CD4-positiven T-Zellen in Kontakt [46].

### **1.2.2. Antigenprozessierung**

Bei den auf MHC-Klasse-I präsentierten Peptiden handelt es sich um Bruchstücke von zytoplasmatischen Proteinen. Sowohl zelleigene Proteine als auch solche von Fremdorganismen, wie Viren, die sich in der Zelle befinden, werden zunächst von Proteasomen abgebaut. Beim Proteasom handelt es sich

um einen zylinderförmigen Proteinkomplex, dessen Hauptteil, das 20 S Proteasom aus 28 Untereinheiten aufgebaut ist, welche 4 Ringe bilden. Das Proteasom hat unterschiedliche proteolytische Funktionen und bildet aus zytoplasmatischen Proteinen Fragmente, deren Länge sich nach einer Normalverteilung richtet und meist 8 bis 11 Aminosäuren beträgt [42].

Die entstehenden Peptidbruchstücke werden über den sog. TAP-Transporter (Transporter associated with Antigen Processing) ins Rauhe Endoplasmatische Retikulum (RER) geschleust [79]. Dieser Transporter selektiert die Peptide nach Länge und anhand ihrer Ankeraminosäuren. Diese Aminosäuren scheinen dieselben zu sein wie die des später zugeordneten MHC-Moleküls [70]. Unter Mitwirkung von Hitzeschock-Proteinen wie Calnexin, Calretikulin und Tapasin, die die Faltung und Peptidbeladung des MHC-Moleküls im RER unterstützen, werden die Komplexe aus MHC und Peptid zur Zelloberfläche befördert.

### **1.2.3. Der T-Zell-Rezeptor**

T-Zellen erkennen auf Zelloberflächen präsentierte Antigene über ein Molekül, das dem  $F_{ab}$ -Teil von Immunglobulinen ähnelt. Dieser sogenannte T-Zell-Rezeptor (TCR) besteht aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette, die beide Transmembrandomänen besitzen und durch eine Disulfidbrücke verbunden sind [33]. Ebenso wie die Immunglobuline besitzt der TCR konstante und variable Regionen, wobei die variablen Regionen die Antigenbindungsstelle enthalten, und wie bei den Immunglobulinen entsteht die große Diversität der variablen Regionen des TCR durch Umordnung der Genloci. Im Gegensatz zur Umordnung der Gene bei Immunglobulinen betrifft die Variabilität beim T-Zell-Rezeptor jedoch nur das Bindungszentrum (J-Segmente), das mit dem ihm präsentierten Peptid interagiert [23]. Der TCR hat hier im Unterschied zum Immunglobulin keine Effektorfunktion, sondern gewährleistet die Zell-Zell-Interaktion. So besteht die variable Region des TCR aus den Segmenten V, D und J, die für  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette jeweils getrennt umgeordnet werden. Kurz nach der Synthese der Ketten werden diese fusioniert. Der entstandene TCR enthält im Bindungszentrum die hochvariablen J-Segmente von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette.

#### **1.2.4. Interaktion zwischen MHC-Molekül und T-Zell-Rezeptor**

Um mit anderen Zellen interagieren zu können, benötigt der TCR noch die Unterstützung eines kostimulatorischen Moleküls, anhand dessen sich T-Zellen unterscheiden lassen. Die Mehrzahl reifer T-Zellen trägt entweder die Kostimulatoren CD4 oder aber CD8. Bei den CD4-positiven Zellen handelt es sich um sogenannte Helferzellen, deren TCR mit MHC II interagiert und auf die daher hier nicht näher eingegangen wird. CD8-positive Zellen werden Zytotoxische T-Zellen oder T-Killer-Zellen genannt. Sie interagieren über ihren TCR und den Kostimulus CD8 mit MHC-Molekülen der Klasse I und sind damit wesentlich an der Abwehr von Virus-Infektionen, aber auch von Pilzen und Tumoren beteiligt [46].

Die Erkennung eines Antigens und die folgende Zellyse erfolgt nur, wenn der TCR gleichzeitig MHC-Molekül mit Kostimulus und präsentiertes Peptid erkennt und gleichzeitig der Rezeptor CD28 der T-Zelle den CD80-Liganden einer kostimulierenden Zelle bindet [76]. Die Interaktion von MHC und TCR wird als MHC-Restriktion bezeichnet und gewährleistet eine hohe Spezifität der Antigenerkennung. Ein Peptid, zu dem spezifische T-Zellen existieren, nennt man T-Zell-Epitop. Passen entweder MHC oder Peptid nicht zum TCR, so kommt es nicht zur Lyse der Zielzelle.

Hierbei gibt es jedoch auch Ausnahmen. So wurde beschrieben, daß CD8-positive T-Zellen in geringer Zahl auch präsentierte Selbst-Antigene erkennen können. Dabei wurden Tumorzellen lysiert, die normale Selbstantigene wie gesunde Zellen exprimierten, als Folge einer Überexpression allerdings in erhöhtem Maße [48]. Dieses Phänomen hat für die vorliegende Arbeit eine wesentliche Bedeutung.

Ungefähr 10 % der T-Zellen erkennen zudem Fremd-MHC, also MHC-Moleküle nicht körpereigener Zellen. Solche Alloreaktivität spielt bei der Abstoßung von körperfremdem Gewebe, z.B. bei Allotransplantation, eine große Rolle. Untersuchungen haben gezeigt, daß dieser Vorgang durch eine Kreuzreaktion des TCR mit Fremd-MHC eines ähnlichen Organismus zustande kommt, weil sich die Peptidmuster der beiden Individuen unterscheiden oder der TCR

bestimmte Bereiche der MHC-Moleküls selbst erkennt. Durch sogenanntes Matching, die Abstimmung der MHC-Typen von Spender und Empfänger, lassen sich Dauer und Ausmaß der Abstoßungsreaktion verringern. [56]

### **1.3. Prinzipien der Immuntherapie**

Schon von Paul Ehrlich wurde die Möglichkeit einer Reaktion des Immunsystems gegen neoplastische Prozesse im menschlichen Körper diskutiert [27]. Später fand diese Überlegung als „Cancer Immunosurveillance Hypothesis“ Eingang in die Literatur [16;17]. Heute gibt es zahlreiche Hinweise auf Interaktionen von Immunsystem und Tumoren auf verschiedenen Ebenen [11;25;65;93], die man sich bei der Bekämpfung von Tumorerkrankungen zunutze zu machen versucht.

Therapeutische Strategien gegen Tumorerkrankungen existieren im Rahmen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems. In erstere Gruppe fallen Ansätze, die hauptsächlich auf der Rolle sogenannter Toll-Like Rezeptoren und von diesen ausgehenden Signalwegen basieren. 11 solcher Rezeptoren auf Antigen präsentierenden Zellen sind für Säugetiere beschrieben [87]. An diese Rezeptoren binden Bestandteile mikrobieller Organismen und lösen eine Signalkette aus [1], an deren Ende die Aktivierung phagozytierender Zellen und die Ausschüttung von Zytokinen erfolgt. Dieser Prozeß, der im allgemeinen durch bakterielle Infektionen in Gang gesetzt wird, wurde, wie wir heute wissen, bereits von William Coley durch die gezielte Infektion von Tumorpatienten mit *Streptococcus Pyogenes* oder dessen Bestandteilen genutzt [20]. Heute sind diese Prinzipien in der, mittlerweile zur Standardtherapie maligner Urotheltumoren gewordenen, BCG-Therapie vertreten. Dabei werden Spezies des *Bacillus Calmette Guerin* in oberflächliche Tumoren der Blasenschleimhaut eingespritzt, was zu einer Aktivierung von Toll-Like Rezeptoren führt [12].

Eine weitere wichtige Komponente des angeborenen Immunsystems stellen bestimmte Cytokine dar, die im Rahmen einer Immuntherapie zum Einsatz kommen können. So weiß man, daß zum Beispiel Typ 1 Interferon Dendritische Zellen zur Differenzierung anregt [77], Natürliche Killerzellen aktiviert [10] und

sogar in Tumorzellen selbst Apoptose induziert [26] sowie deren Blutversorgung durch Angiogenesehemmung beeinflusst [80]. Für Interferon  $\gamma$  wurden ähnliche Effekte beschrieben [4;21;69]. Interleukin 12 kam wegen seiner Wirkung auf Tumorzellen [81] bereits verschiedentlich als adjuvantes Agens bei Vakzinierungen zum klinischen Einsatz [31;51].

Immuntherapeutische Strategien, die sich das Adaptive Immunsystem zunutze machen, setzen sich im wesentlichen aus Immunglobulinapplikationen und Vakzinierungen zusammen. Monoklonale Antikörper kamen zum ersten Mal vor über 20 Jahren zum Einsatz in der Krebstherapie, als man versuchte mit Mausimmunglobulinen einen Antitumoreffekt zu erzielen [58], was aber von wenig Erfolg gekrönt war, da die fremden Antikörper vom Immunsystem des Patienten recht schnell eliminiert wurden. Ebenso wenig waren diese in der Lage, im Menschen einen ausreichenden Effekt zu erzielen. Die daraufhin entwickelten Antikörper, bei denen nur noch der spezifische Teil von der Maus stammte [47], wirken einerseits direkt auf die Tumorzelle, z.B. durch Apoptoseinduktion [93], andererseits auch über eine Aktivierung des Komplementsystems, einem entwicklungsgeschichtlich alten Teil des angeborenen Immunsystems, der zur Stimulation von phagozytierenden Zellen oder direkt zur Lyse der Zielzellen führt [34]. Mittlerweile existieren bereits zahlreiche Immunglobuline auf dem Pharmazeutischen Markt, die im Rahmen von Tumortherapien eingesetzt werden. Die ersten, die sich etablieren konnten waren Rituximab, ein Antikörper gegen CD 20 auf B-Zellen, welcher bei Non-Hodgkin Lymphomen zum Therapie-Standard gehört [55], und Herceptin, gerichtet gegen den Tyrosin Kinase Rezeptor HER2/neu, welcher beim Mammakarzinom eine Rolle spielt [7]. Erhöht werden kann die Effektivität solcher Immunglobuline durch Kopplung von Toxinen oder Radionukliden an deren Fc-Teil [49;96]. Die Generierung sogenannter bispezifischer Antikörper, die zusätzlich zur tumorzellbindenden Region noch eine Bindungsstelle für T-Zell-Merkmale, wie CD 3 oder CD 28 besitzen, erleichtert die Invasion von spezifischen T-Zellen in den Tumor [38].

Die Vakzinierung als Tumortherapie basiert auf der Identifizierung sogenannter Tumorspezifischer oder Tumorassoziierter Antigene.

Man stelle sich eine DNA-Sequenz vor, die in der Tumorzelle vorkommt, in anderen, gesunden Zellen aber nicht, also eine tumorspezifische Mutation. Hat diese Mutation ein morphologisches Korrelat in Form eines Proteins, so ist es theoretisch möglich, Peptide dieses Proteins nach dessen Abbau im Proteasom auf MHC präsentiert an der Zelloberfläche zu finden. Gelingt es, dieses Peptid zu isolieren und es dem Ursprungprotein zuzuordnen, so hätte man ein Tumorantigen identifiziert.

1988 wurden tatsächlich die ersten Tumorantigene im Mausmodell beschrieben [24]. Tumorantigene können verschiedener Herkunft sein. Man unterscheidet Tumorspezifische Antigene, bei denen es sich entweder um Cancer-testis-Antigene, um Antigene viraler Genese oder, wie in unserem Beispiel, um Mutationen handelt. Antigene, die auch in anderen Geweben vorkommen, deren Gene aber im Tumor besonders stark exprimiert werden, nennt man tumorassoziiert. Diese Gruppe stellt zweifellos die Mehrzahl der Tumorantigene. Ideal für eine Therapie im Sinne der Stimulation des Immunsystems und im Sinne des Ausbleibens von Autoimmunreaktionen oder Toleranz sind natürlich Tumorspezifische Antigene [83].

Das erste identifizierte T-Zell-Epitop eines Tumorantigens beim Menschen ist das Cancer-testis-Antigen MAGE [88]. Mit einem Peptid aus diesem Protein wurde vor 12 Jahren der erste Patient mit Malignem Melanom im Rahmen einer Vakzinierung behandelt. Seither wurde eine ganze Reihe von Tumorantigenen beschrieben, die zum Teil schon in Sammlungen veröffentlicht wurden [72]. Die vorliegende Arbeit versteht sich als ein Teil der Suche nach weiteren Tumorantigenen, mit der Hoffnung, dadurch neue Strategien der Tumorthherapie, wie zum Beispiel die schon angesprochene und später näher erläuterte Vakzinierung, zu etablieren.

Heute existieren im wesentlichen zwei Ansätze zur Identifizierung von T-Zell-Epitopen von Tumorantigenen. Einer greift auf eine gesicherte T-Zell-Reaktion gegen Tumorzellen zurück, charakterisiert die T-Zell-Spezifität und damit die Art des Antigens, während der andere bekannte Antigene benutzt und mithilfe von Epitop-Vorhersagen allelspezifischer Peptidmotive der MHC-Moleküle neue Liganden identifiziert. Das erste Epitop, das aus MAGE identifiziert wurde, war

ein HLA\*0101-restringiertes Peptid, welches durch Expression humaner cDNA in COS-Zellen von Thierry Boon et al. gefunden wurde. [88;92]

Die Methode, die auch für die Ergebnisse dieser Arbeit verwendet wurde, basiert auf der Isolierung von MHC-Peptid-Komplexen von Tumorzellen und der anschließenden Isolierung und Identifizierung der Peptide mittels Massenspektrometrie [22;28]. Mithilfe der Entdeckung HLA-Allel-spezifischer Peptid-Motive konnten Datenbanken erstellt werden, die für eine große Anzahl verschiedener HLA-Allele die entsprechende Epitope vorhersagen konnten, was die Identifizierung von T-Zell-Epitopen aus Tumorantigenen wesentlich erleichterte [75;84].

Eine zentrale Stellung in der Immuntherapie nimmt mittlerweile die Vakzinierung ein, bei der entweder Lysate aus Tumorzellen [8;41;63] oder Komplexe aus Hitzeschock-Proteinen und Peptiden aus dem Tumor [53] gewonnen werden. Diese werden dann mit Antigen präsentierenden Zellen [5] (in der Regel Dendritischen Zellen) inkubiert und dem Patienten appliziert [2;68]. Ein individuellerer Ansatz ist die Impfung mit, von MHC-Molekülen der Tumorzellen des Patienten isolierten, Peptiden zusammen mit Dendritischen Zellen. Ähnlich einer Impfung werden die mit den Peptiden inkubierten Dendritischen Zellen dem Patienten intrakutan gespritzt [71]. Bestehende für Tumorantigene spezifische T-Zellen sollen dadurch einen zusätzlichen Stimulus erhalten. Bisherige Vakzinierungs-Versuche waren allerdings meistens nur von geringem Erfolg gekrönt. Obwohl bereits Erfolge erzielt [45] und vereinzelt sogar Komplett-Remissionen [62;73] beobachtet wurden, ist das Gesamtergebnis trotz einer Vielzahl von verschiedenen Ansätzen und Varianten eher bescheiden.

Je mehr Tumorantigene jedoch identifiziert werden und je mehr T-Zell-Epitope dieser Antigene in Form einer Therapie Verwendung finden, umso höher ist die Chance einer erfolgreichen Behandlung der Patienten und der Etablierung neuer, nebenwirkungsarmer Therapien.

## **1.4. Pathologie und Therapie der für diese Arbeit relevanten**

### **Tumoren**

Die Tumoren, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, sind das Nierenzellkarzinom, das Kolorektale Karzinom und das Glioblastoma multiforme. Im folgenden soll kurz auf die wichtigsten Fakten bezüglich dieser Tumoren eingegangen werden.

#### **1.4.1. Das Nierenzellkarzinom**

Das Nierenzellkarzinom gilt als ein maligner Tumor des Epithels des proximalen Tubulus. Es ist somit ein Tumor des Nierengewebes und lässt sich vom Urothelkarzinom abgrenzen, welches von den harnableitenden Organen ausgeht. Immunhistochemischen Untersuchungen zufolge wird an dieser Ätiologie heute aber gezweifelt [44]. Mit einer Inzidenz von 9/100000 gehört das Nierenzellkarzinom zu den weniger häufigen Tumoren. Männer sind doppelt so oft betroffen wie Frauen. Unter Rauchern ist die Inzidenz höher.

Nach der heute gültigen Heidelberg-Klassifikation werden die Nierenzellkarzinome überwiegend nach genetischen Gesichtspunkten eingeteilt. Man unterscheidet das konventionelle Nierenzellkarzinom, bei dem in der Regel eine Deletion auf Chromosom 3p vorkommt (75-80 %), das papilläre Nierenzellkarzinom, bei dem häufig Trisomien beobachtet werden (10 %), Chromophobe Karzinome, bei denen Monosomien auftreten, und die genetisch nicht näher bezeichnaren Nichtklassifizierbaren Karzinome.

Wie bei anderen Tumoren gibt es auch beim Nierenzellkarzinom eine Einteilung nach TNM, die sich auf die Größe des Primärtumors sowie dessen Metastasierung bezieht (siehe *Tab. 1*).

T	T0	Kein Primärtumor vorhanden
	T1	Tumor < 7cm, begrenzt auf die Niere
	T2	Tumor > 7cm, begrenzt auf die Niere
	T3a	Tumor infiltriert größere Venen, Nebenniere oder perirenales Fettgewebe, nicht jedoch die Gerota'sche Faszie



	T3b	Tumor infiltriert makroskopisch Vena renalis oder Vena cava unterhalb des Zwerchfells
	T3c	Tumor infiltriert makroskopisch in Vena cava oberhalb des Zwerchfells
	T4	Tumor infiltriert über die Gerota'sche Faszie hinaus
N	N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
	N1	Metastasen in einem regionären Lymphknoten
	N2	Metastasen in mehr als einem regionären Lymphknoten
	Nx	Keine Information über Lymphknotenmetastasen
M	M0	Keine Fernmetastasen
	M1	Fernmetastasen
	Mx	Keine Information über Fernmetastasen

**Tab. 1:** Einteilung der Tumorstadien des Nierenzellkarzinoms nach UICC.

Die Malignität wird durch die G-Klassifikation (G1: niedrig maligne, gut differenziert - G4: hoch maligne, undifferenziert) bestimmt.

Die Therapie des lokalisierten Nierenzellkarzinoms ist nach wie vor allein die Operation. Das Mittel der Wahl dabei ist in der Regel die Radikale Tumornephrektomie, die eine Entnahme der befallenen Niere, der ipsilateralen Nebenniere, des Kapselfettes, einschließlich der Gerota'schen Faszie, sowie der regionären Lymphknoten beinhaltet. Elektiv können bei kleinem Befund (T1) auch Enukleationen der Tumorareale unter Organerhaltung vorgenommen werden. Ca 30% der Patienten mit Nierenzellkarzinom haben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits Metastasen, wobei weitere 30% innerhalb von 5 Jahren nach radikaler Operation Metastasen entwickeln. Für diese Fälle gibt es bisher so gut wie keine Therapie, da das Nierenzellkarzinom resistent gegen Chemo-, Radio- und Hormontherapie ist. Die Resistenz gegen Medikamente, die sogenannte Multidrug resistance (MDR) begründet sich in der hohen Expression von Genen, die diese Eigenschaft vermitteln und die schon in der gesunden Niere recht stark exprimiert werden [91]. Therapeutische Ansätze existieren beim Nierenzellkarzinom auf den Gebieten der Gen- und Immuntherapie, wobei letztere momentan hauptsächlich auf der Behandlung mit Interferonen und anderen Zytokinen basiert. [44]

### 1.4.2. Das Kolorektale Karzinom

Das Kolonkarzinom ist in den westlichen Industrieländern nach dem Prostata-Karzinom beim Mann und dem Mamma-Karzinom bei der Frau, sowie dem Lungenkrebs der häufigste maligne Tumor. Er ist wie die meisten Tumoren eine Erkrankung des höheren Lebensalters. Die Inzidenz steigt im 6. Lebensdezennium stark an. Ätiologisch lassen sich die meisten Kolonkarzinome auf einen benignen Tumor, einen sogenannten Polypen, zurückführen. Dieser entartet je nach Morphologie und Alter. Die Einteilung erfolgt immer noch nach dem TNM-Schema, welches sich nur in Bezug auf die Tumorgöße (T) von dem des Nierenzellkarzinoms unterscheidet (siehe *Tab. 2*).

T1	Der Tumor ist auf Mukosa und Submukosa beschränkt
T2	Der Tumor infiltrierte die Tunica Muskularis
T3	Der Tumor infiltrierte oder durchbricht die Tunica Serosa
T4	Der Tumor infiltrierte Nachbarorgane

**Tab. 2:** Einteilung der Tumorgöße beim Kolorektalen Karzinom.

Symptomatisch werden Tumoren des Dickdarms in der Regel erst relativ spät durch Blutungen, Verdauungsstörungen oder Schmerzen. Die wichtigste Vorsorgemaßnahme ist die Koloskopie. Therapeutisch steht an erster Stelle die chirurgische Entfernung des betroffenen Darmabschnitts. Dabei wird großzügig operiert, was unter Umständen einen Kontinenzverlust nach sich zieht. Bei metastasierten Tumoren kommen desweiteren adjuvante Chemo- (5-FU) und Radiotherapien zum Einsatz. Diagnostischer Marker im Serum ist das Karzinoembryonale Antigen (CEA). Im Gegensatz zum Nierenzellkarzinom und zum Glioblastom, verbessern die genannten Therapien die Prognose beim Kolorektalen Karzinom aber deutlich. [57]

### 1.4.3. Das Glioblastoma multiforme

Das Glioblastoma multiforme Grad IV-Astrozytom nach WHO-Klassifikation gehört zur Gruppe der neuroepithelialen Tumoren. Die relative Häufigkeit in der Gesamtbevölkerung beträgt 22 %. Unter den 55-65-jährigen ist das Glioblastom sogar der häufigste Gehirntumor [35].

Glioblastome sind meist in der Konvexität von Frontal-, Parietal- und Temporallappen, seltener des Okzipitallappen des Großhirns lokalisiert. Radiologisch und makroskopisch sind dabei die oft mehrere Zentimeter über den sichtbaren Tumorrand hinausreichenden Tumorzellen nicht nachweisbar. Gerade diese sind aber ein wichtiger Faktor der hohen Aggressivität des Glioblastoms [15].

Binnen weniger Wochen bis Monate führt der Tumor zu Symptomen wie Kopfschmerz (20-60 %), Paresen (20-60 %), Persönlichkeitsveränderungen (15-40 %) sowie fokalen oder generalisierten Krampfanfällen (10-40 %). [19;36;94].

Der Tumorprozeß imponiert im CT durch zentral hypodense, im T1 gewichteten MRT durch kontrastmittelaufnehmende ring- oder girlandenförmige Veränderungen, die von einem Ödem umgeben sind.

Die Prognose ist beim Glioblastom schlecht. Nach Operation beträgt die mittlere Überlebenszeit 3-5 Monate, nach Operation und Radiotherapie 9-12 Monate [61]. Eine zusätzliche Chemotherapie bringt nur unwesentliche Verbesserungen. Weitere Faktoren, die die Prognose beeinflussen, sind Dauer der Beschwerden, Alter und Karnofski-Index. Je jünger der Patient und je besser der Allgemeinzustand, desto besser die Prognose. [78]

Die Therapie beim Glioblastom besteht zunächst aus einer chirurgischen Resektion des Tumors, wobei die makroskopische Entfernung im Gesunden nur in risikoarmen Regionen angestrebt wird. Postoperativ werden die Tumorköhle sowie 2 cm des umgebenden Gewebes mit 60 Gy Gesamtdosis bestrahlt. Eine Chemotherapie besteht in der Regel in der Applikation von Nitrosharnstoffderivaten und Vincaalkaloiden. Dabei ist zu erwähnen, daß diese gravierende Nebenwirkungen, wie Myelosuppression,

Lungenfunktionsstörungen, etc. nach sich ziehen können, an denen Patienten auch versterben [74].

Seit einigen Jahren existieren auch Ansätze zur Immuntherapie beim Glioblastom. Darunter finden sich solche, die auf der Applikation von spezifischen Antikörpern basieren [39], andere die die Gabe von Cytokinen und Immunmodulatoren (Apoptose induzierende Liganden) [97] beinhalten. Eine weitere Gruppe bilden die Ansätze zur zellulären Immuntherapie [60] und zur Vakzinierung [40;66], wobei bei letzterer wegen des Mangels an Tumorantigenen für das Glioblastom in der Regel Tumorzelllysate verwendet werden [74].

Manche dieser Therapien werden auch mit einer etablierten Chemotherapie kombiniert. Die bedeutendste ist die Kombination einer herkömmlichen Chemotherapie mit der Gabe von  $TNF\alpha$  oder Interferon  $\gamma$  [50].

Bisher waren die meisten Versuche in der Klinik aber nur wenig oder gar nicht erfolgreich. Gründe hierfür sind Minderperfusion des Tumors durch erhöhten Gewebedruck, die starke Heterogenität des Glioblastoms [9], was besonders bei der Identifizierung von Tumorantigenen Probleme aufwirft, und die Blut-Hirn-Schranke, die, wenn sie noch intakt ist, den Tumor vor schädigenden Einflüssen (diese können Gifte, Abbauprodukte des Stoffwechsels, aber auch Zellen sein) schützt [74]. Häufig besteht im Tumor eine Störung der Blut-Hirn-Schranke.

### ***1.5. Fragestellung und Ziel der Arbeit***

Die Studie, in deren Rahmen diese Arbeit steht, ist eine von zahlreichen Untersuchungen zum Thema Tumor-Antigene und Vakzinierung. Was sie jedoch von vielen anderen Studien unterscheidet ist, daß das Gewebe für das Tumorlysate, aus dem die Antigene isoliert werden, der solide Tumor selbst ist, so wie er dem Patienten chirurgisch entfernt wurde, und nicht in Form von Einzelzellen aus Kultur entsteht. Desweiteren wird versucht, so viele Peptide wie möglich auf einmal in den Vakzinierungscocktail aufzunehmen, um die Wahrscheinlichkeit einer effizienten Immunreaktion zu erhöhen.

Voraussetzung hierfür ist die Identifizierung und Beschreibung von geeigneten Tumorantigenen. Die beiden wesentlichen Merkmale, die ein Tumorantigen besitzen muß, sind die Überexpression des entsprechenden Genabschnittes im Tumor im Vergleich zu normalem Gewebe sowie die Existenz und Kenntnis eines T-Zell-Liganden im Tumorgewebe, der später in Form eines synthetischen Peptids auch therapeutisch eingesetzt werden kann. Hierbei stellen sich folgende Fragen:

1. Können aus einem soliden Tumor zuverlässig Tumorantigene identifiziert werden und dem Tumor zugeordnet werden?
2. Sind diese Antigene geeignet, dem Patienten in Form eines Therapeutikums wieder zugeführt zu werden, ohne den Patienten zu gefährden?
3. Lassen sich Übereinstimmungen zwischen verschiedenen Tumoren in Bezug auf die Expression von Tumorantigenen nachweisen?

Ziel der Arbeit sind demnach:

1. die patientenspezifische Identifizierung von als Tumorantigene in Frage kommenden Zellbestandteilen durch Analyse von RNA-Expressionsdaten und der MHC-gebundener Peptide.
2. die Analyse solcher interessanter Gene im Sinne einer schon beschriebenen Tumorassoziation.
3. die Analyse der identifizierten Antigene auf ihre Eignung als Bestandteil einer Tumorthherapie in Form einer Vakzinierung.

Zudem wird damit gerechnet, daß identifizierte Antigene eines einzelnen Tumors bei Überschneidungen auch anderen Tumorpatienten zugute kommen können.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Chemikalien

Stoff	Firma
Acrylamid 40%	SIGMA
APS (Ammonium Peroxidisulfat)	Merck
Acetonitril	Merck
$\beta$ -Merkaptoethanol 10%	SIGMA
Bromphenolblau 0,2%	SERVA
BSA 3% Albumin Fraction V Protease free	ROTH
CHAPS	Roche
Citric acid	SERVA
Complete Protease Inhibitor cocktail tablets	Roche
ECL-Substrat "Western lightning"	Perkin Elmer life sciences
EDTA	SIGMA
Ethanol	Merck
FCS	PAN Biotech
Glycerol 20%	ROTH
Glycin	ROTH
Methanol	Merck
Natriumborat	SIGMA
Natriumchlorid	Merck
Nonidet P40 0,1%	Fluca
PBS	Bio Whittaker / Dulbecco
Prestained Protein Marker Broad Range	New England Biolabs
Protein A Sepharose	Amersham
SDS (Natriumlaurylsulfat)	ROTH
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	SERVA

TFA (Trifluoressigsäure) 25%	Applied Biosystems
Tris Puffer	SIGMA

**Tab. 3:** Im Rahmen der Arbeit verwendete Chemikalien.

### 2.1.2. Puffer, Lösungen und Gele

Lysispuffer (200ml):	3 Tabletten Complete Protease Inhibitor 0,6 % (1,2 g) CHAPS in PBS
Zitratpuffer (pH 3):	50 nM Citrat 0,02 % Natriumazid in H <sub>2</sub> O
Ladepuffer für Western Blot:	125 mM Tris pH 6,8 3,5 % SDS 20 % Glycerol 10 % β-Mercaptoethanol 0,2 % Bromphenolblau
SDS Laufpuffer für Western Blot:	190 mM Glycin 0,1 % SDS 25 mM Tris pH 8,75
Anodenpuffer für Western Blot:	50 mM Na Borat pH 9 20 % Methanol
Kathodenpuffer für Western Blot:	50 mM Na Borat pH 9 0,05 % SDS
Trenngel für Western Blot:	9,8 ml H <sub>2</sub> O

5 ml 1,5 M Tris pH 8,6  
5 ml Acrylamid 40 %  
0,2 ml 10 % SDS  
0,02 ml TEMED  
0,1 ml APS

Sammelgel für Western Blot: 12,8 ml H<sub>2</sub>O  
5 ml 1 M Tris pH 6,8  
2 ml Acrylamid 40 %  
0,2 ml SDS  
0,02 ml TEMED  
0,1 ml APS

### **2.1.3. Antikörper**

Antikörper für die Immunpräzipitation:

Zur Isolierung der MHC-Komplexe aus dem Tumorslysat wurde der Antikörper W6/32 verwendet [6]. Dieses Immunglobulin (Ig G) wird von Maus-Hybridomzellen gebildet und bindet MHC Klasse I-Moleküle der Typen A, B und C. Die Antikörperaufreinigung fand in der eigenen Arbeitsgruppe statt und wurde im wesentlichen von Claudia Falkenburger durchgeführt.

Um eine Verbesserung der MHC-Ausbeute zu erzielen, wurde desweiteren der Antikörper PA2.1 aufgereinigt [67]. Dieser war jedoch in Bezug auf seine Konzentration und seine Bindungsstärke nicht zufriedenstellend und wurde bei der Tumoraufarbeitung für diese Arbeit nicht verwendet.

Antikörper für Western Blot:

Für die Quantifizierung der MHC-Ausbeute mittels Western Blot wurden als Erstantikörper Kaninchen-Immunglobuline der Firmen Dako und Abcam verwendet, die spezifisch für humanes  $\beta$ 2-Mikroglobulin sind. Beim Antikörper der Firma Abcam (ab6608 Rabbit Anti-Human  $\beta$ 2-microglobulin, Abcam) wurde ein unspezifisches Bindungsverhalten festgestellt, so daß für fast alle



Tumoreluate der Antikörper der Firma Dako (A0072 rabbit anti human  $\beta$ 2-microglobulin, Dako) eingesetzt wurde.

Als Zweitantikörper kamen HRP-gekoppelte Immunglobuline vom Esel zum Einsatz. Diese wurden von der Firma Amersham bezogen und waren spezifisch für Kaninchen-Immunglobuline (NA9340 Donkey Anti-Rabbit HRP-linked, Amersham).

#### 2.1.4. Geräte

Gerät	Firma
Megafuge 1.0 R	Heraeus
L80 Ultracentrifuge Rotor Ti 70	Beckman
Biofuge 13	Heraeus
Smart System (Säule: $\mu$ RPC C2/C18)	Pharmacia
Edman Sequenzer	Applied Biosystems
ESI-Q-TOF-MS	Micromass
Maldi-TOF-MS Reflex III	Bruker
HP Sample Prep Station G1001A	Hewlett Packard
Pipetman P2, P10, P20, P100, P200, P1000	Gilson
Glaspipetten	Hirschmann
Plastikpipetten	Falcon
Magnetrührer	Ika Labortechnik
Dounce Homogenisator L, S	Braun
Falcon Tubes 50 ml	Greiner Biowar
Eppendorf Tubes 0,5; 0,7; 1,5; 2,0 ml	Eppendorf
Thermomixer	Eppendorf
Protein A Säulen	Amersham
Sterilfilter Sartolab P Plus 0,2 $\mu$ m	Sartorius
Centrifuge Tubes 26,3 ml	Beckman
Centricon	Millipore amicon Bioseparations
LKB-Pump P1	Pharmacia

Electrophoresis Power Supply	Pharmacia
Blotter	CTI

**Tab. 4:** Im Rahmen der Arbeit verwendete Geräte.

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Auswahl der Patienten**

In das Materialgut der Arbeit wurden Tumoren von Patienten aufgenommen, die an gastrointestinalen (Magenkarzinom, Kolorektales Karzinom), Nieren- (Nierenzellkarzinom) und ZNS- (Glioblastoma multiforme) Tumoren litten und die bis zu diesem Zeitpunkt noch keinerlei neoadjuvante Therapie, wie z.B. Bestrahlung oder Chemotherapie bekommen hatten, die das Erbgut der Tumorzellen hätten künstlich verändern können.

Die Patienten wurden über Methoden und Ziele der Studie im ärztlichen Gespräch aufgeklärt und willigten im Vollbesitz ihrer geistigen Kräfte ein, daß ihnen im Rahmen der Operation entnommenes Organ- und Tumorgewebe zu wissenschaftlichen Zwecken verwendet werde. Das Projekt wurde von der Ethikkommission der Universität Tübingen unter dem Antrag 272/2000 genehmigt.

### **2.2.2. Asservation des Tumorgewebes**

Die Gewebeproben wurden während der Operation des Patienten nach Entfernen des tumorbefallenen Organteils genommen. In der Regel wurde eine Probe vom Tumorgewebe und, wo möglich, eine Probe von gesundem Organgewebe nach makroskopischen Kriterien entnommen. Bei Nephrektomien wurde das gesunde Gewebe möglichst weit vom Tumor entfernt exzidiert, zumeist vom gegenüberliegenden Pol, bei gastrointestinalen Tumoren wurde isoliert das gesunde Ausgangsgewebe des Tumors, die Mukosa, mit einem großzügigen Sicherheitsabstand zum Tumor selbst abgelöst. Bei Tumoren des Zentralnervensystems (Glioblastoma multiforme) konnte nur Tumorgewebe

entnommen werden. Als Normalgewebe für die Chipanalyse wurde hier eine Probe normalen Hirngewebes eines anderen Patienten verwendet.

Sofort nach Entnahme der Gewebeproben wurden diese in Falcon Tubes in den entsprechenden Portionen zur RNA-Analyse und zur MHC-Liganden-Analyse getrennt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei minus 80° C bis zur Verarbeitung gelagert.

Während der Operation wurde auch die Blutentnahme zur HLA-Typisierung vorgenommen. Der Patient hatte bis zu diesem Zeitpunkt keine Transfusionen bekommen.

Dies wurde vom Autor selbst durchgeführt.

### **2.2.3. Herstellung des Tumorlysats**

Das Tumorgewebe wurde noch in gefrorenem Zustand in ein Volumenäquivalent doppelt konzentrierten Lysispuffers gegeben und mit dem Labormixer 2 min lang zerkleinert. Anschließend wurde ein Volumenäquivalent einfach konzentrierter Lysispuffer zugegeben und weitere 2 Minuten zerkleinert. Zum Auswaschen der nach dem Umschütten in ein anderes Gefäß im Mixer verbliebenen Gewebestückchen wurde erneut ein Volumenäquivalent Lysispuffer in das Tumorlysats gegeben.

Die weitere Zerkleinerung der Gewebestückchen erfolgte mit einem Potter-Homogenisator für ca. 20 min. Im Anschluß wurde das Lysat in einem Erlenmeyer-Kolben 30 Minuten gerührt.

Zur endgültigen Homogenisierung des Lysats und zur Unterstützung des Aufschlusses der Zellmembranen wurde das Lysat mit dem Dounce-Homogenisator bearbeitet, was im Idealfall 5 Stöße bei großem Spalt (50-70 µm) und 20 Stöße bei kleinem Spalt (10-30 µm) beinhaltet. Häufig war das Gewebe aufgrund von Interzellulärschichten jedoch so fest, daß bei schmalen Spalten kein zufriedenstellendes Ergebnis erzielt werden konnte und dies durch entsprechend längeres Homogenisieren bei großem Spalt ausgeglichen wurde.

Nach Homogenisieren wurde das Lysat eine Stunde gerührt, um einen optimalen Aufschluß zu erzielen.

Nun wurden die festen Bestandteile zunächst bei 4000 rpm und 4° C für 20 Minuten (Megafuge 1.0 R; Heraeus) und anschließend erneut bei 40000 rpm und 4° C für 60 Minuten (L80 Ultracentrifuge; Beckman; Rotor Ti70) abzentrifugiert.

Der Überstand wurde bei einer Porengröße von 0,2 µm filtriert und das Filtrat in einem Erlenmeyer-Kolben aufgefangen.

Bei allen Arbeitsschritten wurde die Temperatur von 4° C konstant gehalten.

Dies wurde vom Autor selbst durchgeführt.

#### **2.2.4. Zusatz der Antikörperlösung**

Für die Affinitätschromatographie wurde der Antikörper W6/32 verwendet, der selektiv an MHC der Klasse I A, B und C bindet. Die zugesetzte Antikörpermenge orientierte sich an der Masse des Tumorgewebes. So wurde dem fertig filtrierten Tumorklysat 0,8 bis 1,0 mg Antikörper pro Gramm Ausgangsmasse des Tumors zugegeben.

Die Antikörperlösung wurde, wie oben erläutert, hergestellt und nach photometrischer Konzentrationsbestimmung dem Tumorklysat beigemischt. Um eine optimale Bindung zwischen MHC und Antikörper zu erreichen, wurde das Antikörper-Lysat-Gemisch bei 4° C vorsichtig eine Stunde gerührt.

Dies wurde vom Autor selbst durchgeführt.

#### **2.2.5. Affinitätschromatographie und Säureextraktion**

Das Gemisch aus Tumorklysat und Antikörper wurde nun linear oder zyklisch bei einer Flußrate von 1,0 – 1,5 ml/min über eine zuvor mit 50 ml PBS und 25 ml Lysispuffer äquilibrierte Protein A-Säule gepumpt. Das zyklisch über die Säule geflossene Volumen sollte mindestens das Vierfache des Volumens des Tumorklysats betragen. Anschließend wurde die Säule nacheinander mit 25 ml

Lysispuffer, 70 ml PBS und 70 ml H<sub>2</sub>O bidest. gewaschen. Auf der Säule sollten jetzt nur die Komplexe aus Antikörper und MHC an Protein A gebunden sein.

Diese wurden anschließend mit 3 ml (bei 0,4 g Protein A) bzw. 4 ml (bei 0,6 g Protein A) Zitratpuffer bei pH 3 von der Säule eluiert, wobei 0,5 ml Vorlauf verworfen wurden.

Den 2,5 ml bzw. 3,5 ml Eluat wurden nun 25 µl bzw. 35 µl 25%iges TFA (Tri-Fluor-Acetat) zugegeben und auf dem Vortex gemischt. Nach Abnehmen von Proben für die Quantifizierung der MHC-Menge mittels Edman-Abbau und Western Blot wurde das Eluat auf eine 10 kDa Zentricon Ultrafiltrationseinheit geladen. Diese wurde zuvor zweimal mit einem Gemisch aus Citratpuffer und 0,25% TFA gewaschen, um Verunreinigungen zu entfernen. Das Eluat wurde bei 4000 rpm solange zentrifugiert, bis es vollständig ultrazentrifugiert war. Im Zentricon-Filtrat sollten nun nur Peptide mit einer Masse kleiner 10 kDa sein.

Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde nach erneutem Laden der wieder äquilibrierten Säule und zyklischem Lauf ein zweites Mal eluiert.

Alle Arbeitsschritte fanden bei 4° C statt.

Dies wurde vom Autor selbst durchgeführt.

#### **2.2.6. Konzentrierung und Entsalzung des Zentricon-Filtrats**

Da das Volumen des Zentricon-Filtrats mit insgesamt ca. 5 ml für das HPLC-System zu groß ist, wurde es mit Hilfe einer RP-C<sub>18</sub>-Sequencer-Säule an einer Hewlett Packard Sample Prep Station G1001 A auf 500 µl verringert. Dabei wurde das Filtrat auch entsalzt.

Zunächst wurde die Säule mit 1,0 ml H<sub>2</sub>O bidest. äquilibriert. Anschließend wurde das Zentricon-Filtrat geladen und mit Druckluft bei 20 ψ über die Säule geschickt. Nach Waschen mit 0,5 ml H<sub>2</sub>O wurden die nun an der Säule gebundenen Peptide mit 100 µl 50 %iger Azetonitril-Lösung eluiert und mit H<sub>2</sub>O auf 500 µl aufgefüllt.

Dies wurde vom Autor selbst durchgeführt.

### 2.2.7. Fraktionierung der Peptide mittels Reversed Phase HPLC

Zur Auftrennung und Fraktionierung des entsalzten Peptidgemisches wurde ein Microbore HPLC System (SMART System, Pharmacia) verwendet. Bei diesem wurde das Peptidgemisch in eine 500 µl Probenschleife geladen und über eine µRPC C<sub>2</sub>/C<sub>18</sub>-Säule geschickt, von der die Peptide dann bei steigendem Azetonitrilgradienten und einer Flußrate von 150 µl/min eluiert und fraktioniert wurden. Gleichzeitig wurde über ein Photometer die Peptidkonzentration der einzelnen Fraktionen gemessen. Dadurch war eine erste Einschätzung der Menge der gewonnenen Peptide möglich.

Zeit (min)	Konzentration Acetonitril (%)
0	8
5	8
25	16
45	32
55	48
60	80
65	80

*Tab. 5:* Gradient der Acetonitrilkonzentration bei der Reversed Phase HPLC.

Dies wurde vom Autor selbst durchgeführt.

### 2.2.8. Quantifizierung der MHC-Ausbeute mittels Western Blot

Zur Quantifizierung der MHC-Ausbeute wurde nach den oben erläuterten Arbeitsschritten neben der Proteinsequenzierung nach Edman auch die Methode des Western Blotting eingesetzt. Dabei werden bestimmte Proteine, die zuvor durch Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet wurden, mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers und eines Enzym- oder Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten

Zweitantikörpers detektiert. Die Stärke des Signals korreliert dabei in einem bestimmten Bereich linear mit der Menge an detektiertem Protein.

In diesem Fall wurde eine Probe von 10 µl des Eluats der Protein A-Säule, in dem sich vor Zentrifugation MHC, Peptid und Antikörper befinden sollten, neben einer Eichreihe aus MHC-Monomeren durch Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf Nitrozellulose geblottet. Für die Eichreihe wurden MHC-Mengen zwischen 0,1 und 1,0 µg verwendet, da bei diesen Mengen die Eichkurve linear verlief. Die Monomere wurden von Steffen Walter hergestellt [32]. Es wurden Proben in 10 µl H<sub>2</sub>O bidest. gelöst und mit 10 µl Ladepuffer in die Geltaschen geladen. Die Elektrophorese wurde in einer Doppelkammer bei 110 V im Sammelgel und 140 V im Trenngel mit 100 W durchgeführt. Zum Blotten wurden 4 Filterpapiere und die Nitrozellulosemembran in Anodenpuffer getaucht und turmförmig übereinander gelegt, darauf in gleicher Weise das Gel und 4 Filterpapiere mit Kathodenpuffer getränkt. Der Blot fand über Nacht bei einer Stromstärke von 38 mA statt. Die freien Bindungsstellen der Nitrozellulosemembran wurden 120 min mit TBB geblockt. Anschließend wurde die Membran 90 min. mit einem Antikörper gegen humanes β<sub>2</sub>-Mikroglobulin (Rabbit Anti-Human β<sub>2</sub> Mikroglob. 1:50000) inkubiert. Nach Waschen der Membran mit TWB (3 x 5 min) wurde der HRP-gekoppelte Zweitantikörper (Donkey Anti-Rabbit 1:5000) hinzugegeben und erneut gewaschen (5 min TBS, 3 x 10 min TWB, 2 x 5 min TBS). Die Entwicklung der Membran erfolgte nach 3 minütiger Inkubation mit ECL-Substrat in einer LAS 1000 Photo Station von Fuji, die Auswertung mit dem Programm LAS 1000 Image Reader.

Dies wurde vom Autor selbst durchgeführt.

### **2.2.9. Quantifizierung der MHC-Ausbeute durch Sequenzanalyse nach Edman**

Die N-terminale Sequenzanalyse nach Edman (Edman-Abbau) ist eine gut automatisierbare Methode zur Sequenzierung von Proteinen. Das Prinzip

besteht aus drei Teilschritten (Kupplung, Spaltung, Konvertierung), die zu einer zyklischen Abspaltung und Identifizierung der N-terminalen Aminosäure führen. Im ersten Teilschritt, der Kupplung, wird die N-terminale Aminosäure mit Phenylisothiozyanat (PITC) gekoppelt. Es entsteht das Phenylthiocarbamoylpeptid (PTC-Peptid). Diese Reaktion kann jedoch nur bei unprotonierter Aminogruppe stattfinden, weshalb ein pH von 9 eingehalten werden muß. Bei der Spaltung wird das PTC-Peptid wasserfrei mit Trifluoressigsäure (TFA) behandelt, wobei die Carbonylgruppe der Aminosäure mit dem Schwefel des PITC's einen Ring bildet und vom Restpeptid abgespalten wird. Durch die Konvertierung wird der abgespaltene Ring infolge Säurebehandlung zur chemisch stabileren Phenylthiohydantion-Aminosäure (PTH-Aminosäure) umgewandelt. Vom Restpeptid kann erneut die N-terminale Aminosäure abgespalten werden. Die Identifizierung der abgespaltenen PTH-Aminosäuren erfolgt chromatographisch bei einer Wellenlänge von 269 nm und im Vergleich zu einem Standard aller PTH-Aminosäuren.

Da im Falle der Quantifizierung der MHC-Ausbeute die N-terminale Sequenz des MHC bekannt war, konnte mittels des Konzentrationsanstiegs einer bestimmten Aminosäure im jeweiligen Zyklus die Masse des in der Probe enthaltenen MHC ermittelt werden. Dies geschah in erster Linie über einen Konzentrationsanstieg der Aminosäure Histidin im 3. Zyklus, die sich bei der  $\alpha$ -Kette des MHC-Moleküls in Position 3 befindet. Damit eine zuverlässige Aussage getroffen werden kann, sollte im Idealfall die Konzentration im 4. Zyklus wieder sinken, um sich vom Hintergrund abzuheben.

In gleicher Weise war es auch möglich, die Menge an eluiertem Antikörper zu bestimmen.

Mit dem Sequenziergerät Procise 494A wurde eine C<sub>18</sub>-Säule Spheri-5 PTH 5  $\mu$ m, 220 x 2,1 mm der Firma Perkin Elmer eingesetzt.

Dies wurde vom Autor selbst durchgeführt.



### **2.2.10. Sequenzanalyse der eluierten Peptide mittels Massenspektrometrie**

Die Massenspektrometrie bietet die Möglichkeit, Moleküle anhand ihrer physikalischen Eigenschaften wie Ladung und Masse zu analysieren. Bestandteile eines Massenspektrometers sind im wesentlichen eine Ionisierungsquelle, in der die zu analysierenden Moleküle eine Ladung bekommen, ein Massenanalysator, in dem die Ionen nach ihrer Masse und Ladung aufgetrennt werden, und ein Detektor, mit dem festgestellt wird, welche Ionen in welcher Menge gebildet wurden.

Zur Analyse der durch Affinitätschromatographie und Ultrazentrifugation gewonnenen Peptide wurden zwei massenspektrometrische Methoden eingesetzt, die sich im Wesentlichen in ihrer Ionisierungstechnik unterscheiden.

#### **1. MALDI-TOF-MS**

Beim MALDI (Matrix assisted laser desorption ionisation) handelt es sich um eine Ionisierungsquelle, bei der der Analyt in eine Kristallmatrix eingebracht wird und aus dieser mit einem Laser-Impuls im elektrostatischen Feld herausgelöst wird. Die Matrixkristalle absorbieren dabei die Energie des Lasers bei 337 nm und geben sie gleichmäßig und schonend an den Analyten weiter.

Verwendet wurde bei der Arbeit ein Reflex III der Firma Bruker, welches einen sogenannten TOF-Analysator (Time Of Flight Analysator) besitzt. Dessen Funktion basiert auf der Tatsache, daß Ladung und Masse der Ionen dem Quadrat der Geschwindigkeit proportional sind. Dabei wird die Flugzeit der ionisierten Moleküle im TOF-Analysator ermittelt. Das verwendete Gerät ermöglicht nicht nur eine lineare Flugbahn, sondern bietet auch die Möglichkeit, einen Reflektor, der gleichzeitig ein zusätzlicher Detektor ist, hinzuschalten, wodurch neben großen Molekülmassen (bis 500 000 Da) im Linear-Modus auch kleinere Massen (bis 10 000 Da) im Reflektor-Modus analysiert werden können. Die Auflösung des Geräts liegt bei  $R=8000$  FWHM, die Sensitivität bei 500 attomol. Durch den sogenannten post source decay können auch Fragmentspektren der einzelnen Peptide aufgenommen werden. Dabei werden die Ionen nach dem Verlassen der Quelle und einer langen gleichmäßigen Flugzeit, während der sie spontan zerfallen, erneut beschleunigt. Kleinere Teilchen haben nun zwar dieselbe Geschwindigkeit wie größere, jedoch

aufgrund der geringeren Masse eine niedrigere kinetische Energie, was am Detektor registriert wird.

Bei der Vorbereitung der Proben wurden Matrix und Probe im Verhältnis 1:1 (0,5 µl : 0,5 µl) auf die Trägerplatte aufgebracht, unter Vakuum getrocknet und anschließend analysiert. Dabei wurde die Laserenergie langsam gesteigert, um einen Signalhintergrund durch gelöste Matrixmoleküle niedrig zu halten. Der Beschuß mehrerer Stellen der Probe führte zur Aufaddierung der Signale.

Mit dem MALDI wurden Peptide eher quantitativ bestimmt. Zur genauen Sequenzermittlung wurde das ESI-Q-TOF-Massenspektrometer verwendet.

## 2. ESI-Q-TOF-MS:

Beim ESI (Elektro Spray Ionisation) erfolgt eine Dispersion der in flüchtigem Lösungsmittel gelösten Analyten in kleinste geladene Tröpfchen, welche in einem elektrostatischen Feld (1000-2000 V) desolvatisiert werden. Dabei nimmt die Ladungsdichte kontinuierlich zu. Die ionisierten Teilchen wandern abgeschirmt von gasförmigem Stickstoff in den Analysator. Die Analytlösung wird über kleinste Kapillaren in Nanoflow-Technik mit einer Flußrate von 5-1000 nl in die Ionenquelle eingespritzt, was zu einer hohen Sensitivität der Methode führt. Da bei dieser Ionisierungstechnik auch mehrfach geladene Ionen entstehen und der Analysator die Ionen im Verhältnis  $m/z$  (Masse / Ladung) erfaßt, ist es möglich auch größere Molekülmassen zu analysieren.

Das im Rahmen der Arbeit verwendete Gerät Q-TOF-Massenspektrometer der Firma Micromass funktioniert nach MS-MS-Technik. Das bedeutet, daß im Anschluß an den ersten Analysator, der aus einem Quadrupol besteht und in dem eine Selektion der Ionen nach  $m/z$  erfolgt, eine mit Argon gefüllte Hexapol-Kollisionszelle angeschlossen ist, in der die selektierten Ionen erneut fragmentiert werden, bevor sie in den folgenden TOF-Analysator gelangen und am Detektor registriert werden. Durch einen Punktdetektor (Photomultiplier) können die Ionen auch schon nach dem Quadrupol analysiert werden. Es sind also zwei hintereinander geschaltete Massenspektrometer. Die Messung der Daten erfolgte mittels PC-Software MassLynx NT. Das Massenspektrometer besitzt eine Auflösung von 5000 FWHM. Es können Massen im Bereich

zwischen 2 und 4000 Da gemessen werden, wobei, wie oben erwähnt, die Mehrfachladung der Ionen auch höhere Massen zulässt.

Die massenspektrometrischen Analysen wurden von Claudia Lemmel und Toni Weinschenk durchgeführt.

### **2.2.11. Erfassung der Expression von Antigenen in Tumor- und Normalgewebe mittels Gen-Chips**

Um die gewonnenen Peptide einem Tumorantigen oder einem normalen körpereigenen Protein zuzuordnen, wurde ein Vergleich der Expression von Antigenen auf mRNA-Ebene vorgenommen. Hierbei wurde die RNA-Microarray-Technologie eingesetzt. Diese Methode beruht auf der Hybridisierung von aus Tumor- und Normalgewebe gewonnener biotinylierter und fluoreszenzmarkierter RNA mit auf dem Array angeordneter RNA oder Oligonucleotiden. Beim Kolongewebe wurde wegen der großen Heterogenität mit Lasercapture-Microdissection gearbeitet. Dabei werden die Tumorzellen unter mikroskopischer Kontrolle mit einem Laser aus dem Gewebeverband herausgelöst und in einem Puffer aufgefangen. Die verwendeten Chips HuGe U 133A der Firma Affymetrix enthalten bis zu 22 000 Gene. Dadurch wird die überwiegende Mehrheit von Antigenen in den untersuchten Zellen erfaßt. Durch Vergleich der Expressionsdaten von Tumor und gesunden Organgeweben konnten bestimmte Antigene als tumorassoziiert identifiziert werden. Die überwiegende Mehrheit der Antigene erwies sich wie erwartet als körpereigen. Findet sich ein Protein, aus dem ein Peptid identifiziert wurde, im Tumor überexprimiert und in sonst keinem anderen wesentlichen Gewebe des Körpers, so kommt das entsprechende Peptid für eine Vakzinierung in Frage.

Die Analyse der Antigenexpression auf RNA-Ebene wurde von Oliver Schoor durchgeführt.

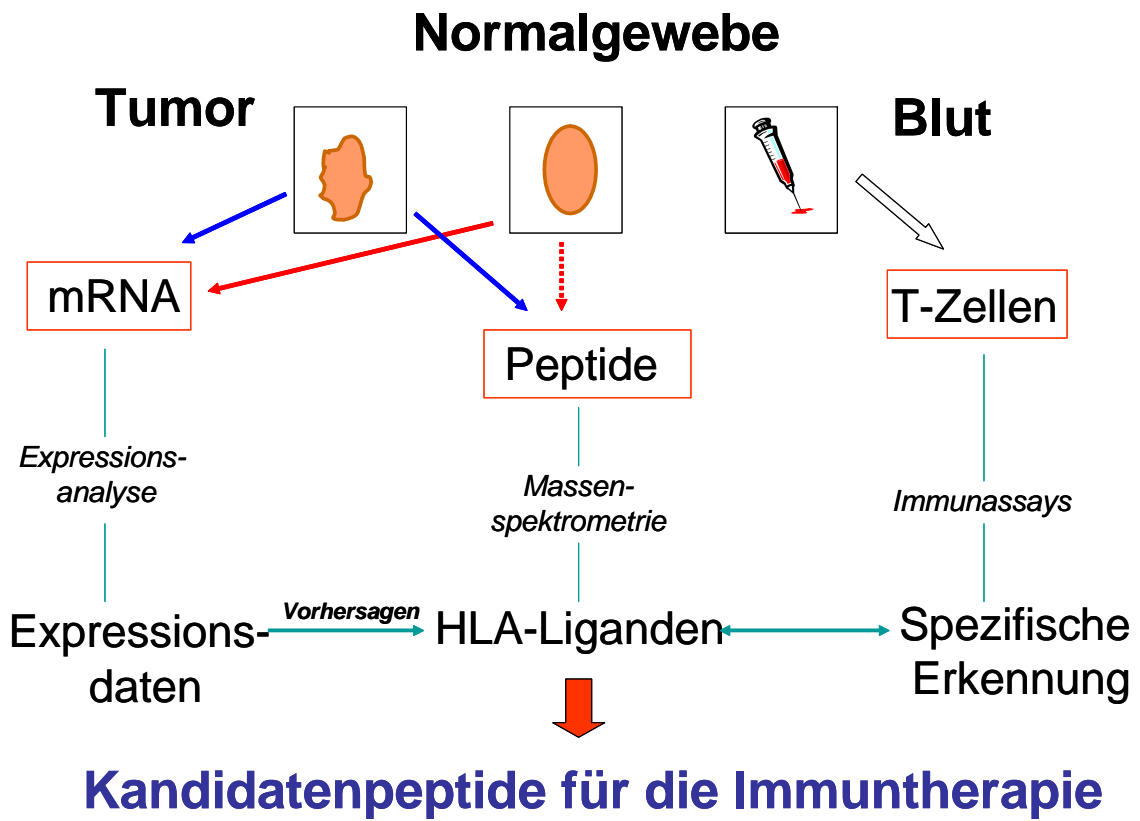
### **2.2.12. Prozedere der Vakzinierung**

Anhand der Expressionsdaten von Tumor und Normalgewebe und einer Expressionsanalyse von Standardgeweben des menschlichen Körpers, werden interessante Kandidaten aus den Peptiden ausgesondert. Diese erfüllen die schon angesprochenen Kriterien einer Tumorassoziation oder gar –spezifität, indem sie im Tumor besonders überexprimiert vorkommen, während sie in anderen Geweben in unauffälliger Menge oder gar nicht exprimiert werden.

Diese interessanten Peptide, welche die Merkmale eines Tumorantigens besitzen, werden nun unter sterilen Bedingungen synthetisiert. Parallel dazu finden Stimulationsassays mit T-Zellen statt. In Abb. 2 ist ein Schema des analytischen Prozederes dargestellt. Kommt der Patient für eine Vakzinierung in Frage, werden ihm periphere Blutmonozyten entnommen, die zu antigenpräsentierenden dendritischen Zellen heranwachsen. Diese werden nun für 48 Stunden mit den identifizierten Peptiden inkubiert, bevor sie dem Patienten verabreicht werden. Die Impfung erfolgt zunächst in 4 Zyklen alle 14 Tage in Form einer subkutanen Injektion. Weitere Impfungen folgen dann im Abstand von 4 Wochen [13].

Die Vakzinierungen wurden von der Arbeitsgruppe Peter Brossart der Medizinischen Klinik Tübingen, Abt. II durchgeführt.

Abb. 2: Analytisches Prozedere der Identifizierung geeigneter Tumorantigene



## **3. Ergebnisse**

### ***3.1. Zum Verständnis***

Da nicht alle verarbeiteten Tumoren auf T-Zell-Liganden hin untersucht wurden und weil die Auflistung aller identifizierter Liganden den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde, sind hier nur die Ergebnisse von NCh361, dem ersten Glioblastom, das auf diese Weise untersucht wurde, und von RCC68 und RCC75, welche beide vakziniert wurden, detailliert aufgeführt.

Zunächst folgt eine Übersicht über die verarbeiteten Tumoren, dann eine Darstellung der MHC-Ausbeute bei diesen Tumoren sowie einigen Normalgeweben. Letztere wurden im Rahmen der Etablierung einer neuen Methode der Quantifizierung von Claudia Lemmel verwendet.

### 3.2. Verarbeitete Tumoren

Tumor	Tumorart	Tumormasse	pTNM-Status	Geschlecht / Alter des Patienten	HLA-Typ	Vakzinierungen
RCC46	Nierenzellkarzinom	9,3 g	?	? / ?	?	Keine
PECa257	Plattenepithelkarzinom	24,5 g	?	? / ?	?	Keine
RCC68	Nierenzellkarzinom	20,0 g	?	M / 70 Jahre	A*02, A*29, B*15, B*45	4
RCC70	Nierenzellkarzinom	8,3 g	pT3, pN2, Mx	M / 71 Jahre	A*01, A*02, B*07, B*08	Keine
RCC58	Nierenzellkarzinom	7,2 g	pT3a, Nx, Mx	W / 52 Jahre	?	Keine
MCa28	Adenokarzinom Magen	43,0 g	pT2b, pN2, pM1	W / 70 Jahre	A*02 hzgt., B*15, B*44	Keine
RCC73	Nierenzellkarzinom	10,0 g	pT3b, pN0	M / 42 Jahre	A*02, A*03, B*07, B*57	4
RCC75	Nierenzellkarzinom	16,0 g	pT4, Nx, M1	M / 36 Jahre	A*03 hzgt., B*07, B*40	4
CCA139	Kolorektales Karzinom	12,0 g	pT3, pN0, Mx	M / 64 Jahre	A*02, A*33, B*50, B*51	Keine
CCA143	Kolorektales Karzinom	14,8 g	pT3, pN0, Mx	M / 73 Jahre	A*03, A*25, B*44, B*57	Keine
RCC81	Nierenzellkarzinom	18,0 g	pT3a, pN0, pMx	W / 50 Jahre	A*01, A*02, B*08, B*13	Keine
NCH361	Glioblastoma multiforme	23,0 g	?	? / ?	A*26 hzgt., B*38 hzgt.	Keine
NCH359	Glioblastoma multiforme	28,0 g	?	? / ?	A*03, A*32, B*07, B*35	Keine
CCA142	Kolorektales Karzinom	7,8 g	pT3, pN1, Mx	M / 61 Jahre	A*02, A*68, B*35, B*44	Keine
CCA135	Kolorektales Karzinom	8,5 g	pT3, pN1, Mx	M / 73 Jahre	A*01, A*02, B*13, B*44	Keine
RCC76	Nierenzellkarzinom	12,8 g	pT3b	M / 60 Jahre	A*01, A*32, B*08, B*44	Keine
RCC90	Nierenzellkarzinom	20,0 g	pT1, Nx, Mx	W / 50 Jahre	?	Keine

**Tab. 6:** Zusammenstellung aller verarbeiteten Tumoren. Nur die Tumoren RCC68, RCC70, RCC73, RCC75, NCh361, NCh359 und MCa28 wurden massenspektrometrisch auf Liganden hin analysiert. Hzgt. bedeutet homozygot.

### 3.3. MHC-Ausbeute aller verarbeiteten Tumoren

Gewebe	Masse	Masse verwendeter Antikörper	MHC-Ausbeute nach Quantifizierung durch Western Blot	MHC-Ausbeute nach Quantifizierung durch Edman Abbau
RCC46Tu	9,3 g	5,0 mg	13,4 nmol	1,5 nmol
RCC46No	7,6 g	5,0 mg	1,5 nmol	0,4 nmol
PECa257Tu	24,5 g	11,3 mg	1,5 nmol	1,0 nmol
RCC68Tu	20,0 g	20,0 mg	14,6 nmol	2,5 nmol
RCC70Tu	8,3 g	10,0 mg	7,8 nmol	3,2 nmol*
RCC58Tu	7,2 g	5,0 mg	4,0 nmol	2,4 nmol
RCC58No	7,6 g	5,0 mg	2,9 nmol	2,0 nmol
MCa28Tu	43,0 g	22,6 mg	19,7 nmol	3,0 nmol
RCC73Tu	10,0 g	11,2 mg	14,2 nmol	1,3 nmol
RCC75Tu	16,0 g	18,7 mg	34,7 nmol	2,2 nmol*
CCA139Tu	12,0 g	8,0 mg	26,1 nmol	2,9 nmol
CCA139No	16,5 g	8,0 mg	12,7 nmol	2,7 nmol
CCA143Tu	14,8 g	15,0 mg	14,0 nmol	2,5 nmol*
CCA143No	18,0 g	15,0 mg	11,8 nmol	2,9 nmol
RCC81Tu	18,0 g	12,0 mg	15,2 nmol	1,8 nmol*
RCC81No	10,0 g	12,0 mg	7,0 nmol	1,4 nmol*
NCh361Tu	23,0 g	9,0 mg	16,3 nmol	3,1 nmol
NCh359Tu	28,0 g	9,3 mg	26,7 nmol	2,9 nmol
CCA142Tu	7,8 g	11,2 mg	4,0 nmol	**



CCA142No	16,5 g	11,2 mg	3,8 nmol	**
CCA135Tu	8,5 g	10,0 mg	Min. 3,2 nmol	**
CCA135No	8,5 g	10,0 mg	Min. 1,4 nmol	**
RCC76Tu	12,8 g	10,0 mg	18,9 nmol	2,6 nmol
RCC76No	6,2 g	10,0 mg	2,7 nmol	1,2 nmol
RCC90Tu	20,0 g	10,0 mg		10,2 nmol
RCC90No	15,0 g	10,0 mg		

**Tab. 7:** MHC-Ausbeute in den verarbeiteten Tumoren nach den Methoden Western Blot und Edman-Sequenzierung im Vergleich zum eingesetzten Antikörper W6/32. RCC steht für Renal Cell Carcinoma (Nierenzellkarzinom), CCA für Colon Carcinoma (Kolonkarzinom), MCA für Magenkarzinom und NCh für Neurochirurgie. Unter letzterem Kürzel sind Glioblastome verzeichnet.

\* Im folgenden Zyklus ging die Menge an detektiertem Histidin nicht zurück sondern blieb gleich oder stieg geringfügig an. Der Unterschied zum Hintergrund war aber dennoch signifikant.

\*\* Wegen eines Gerätedefekts gingen die Proben verloren.

### **3.4. Ergebnisse NCh361**

Exemplarisch für die in Tab. 6 zusammengestellten Tumoren soll hier der Versuchsablauf anhand der Daten vom Glioblastom NCh361 dargestellt werden. Der Tumor wurde dem Patienten entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Auf Trockeneis wurde eine Gewebeprobe von 23,0 g zugesandt. Durch eine zuvor mittels Heparin-Blut vorgenommene HLA-Typisierung, konnte festgestellt werden, daß der Patient sowohl auf A\*26 als auch auf B\*38 homozygot war.

#### **3.4.1. Herstellung des Tumorlysats**

Der Tumor wurde in 25 ml doppelt und in 50 ml einfach konzentriertem Lysispuffer im Mixer homogenisiert. Dies gelang so gut, daß der solide Tumor wie Zellpellets weiterbearbeitet werden konnte. D.h. weitere Aufschlußschritte mittels Potter- und Dounce-Homogenisator konnten genau nach dem bei Zellpellets etablierten Protokoll durchgeführt werden (5 Stöße bei großem Spalt, 20 Stöße bei kleinem Spalt), was wegen Interzellulärsubstanzen bei anderen Tumoren nicht immer möglich war. Nach Zentrifugation und Filtration, bei der 3 Filter benötigt wurden, ergaben sich 70 ml filtriertes Lysat.

Dies wurde vom Autor selbst durchgeführt.

#### **3.4.2. Inkubation mit Antikörpern**

Wie bei allen anderen Tumoren wurde auch hier der Antikörper W6/32 verwendet, der an alle bekannten HLA-Typen bindet. Die eingesetzte Menge betrug 9 ml einer Lösung der Konzentration 0,98 mg/ml. Diese wurde mit dem Tumorlysat 1 Stunde unter vorsichtigem Rühren inkubiert.

Dies wurde vom Autor selbst durchgeführt.

### **3.4.3. Affinitätschromatographie und Säurebehandlung**

Bei NCH 361 wurde eine Säule mit 0,6 mg Protein A-Sepharose verwendet. Das Gemisch aus Tumorlysat und Antikörperlösung wurde auf die Säule geladen und bei einer Flußrate von 1,5 ml/min linear über die Säule gepumpt. Die Elution erfolgte mit 4 ml Zitratpuffer, so daß 3,5 ml Eluat aufgefangen werden konnten. Dem Eluat wurden 35 µl 25 %ige TFA zugesetzt. Anschließend wurde das Lysat erneut über die Säule gepumpt und ein zweites Mal eluiert. Die 7 ml Gesamteluat wurden in 4 Zentrifuge-Einheiten über Nacht filtriert, bis das Eluat den Filter vollständig durchlaufen hatte.

Dies wurde vom Autor selbst durchgeführt.

### **3.4.4. Entsalzung**

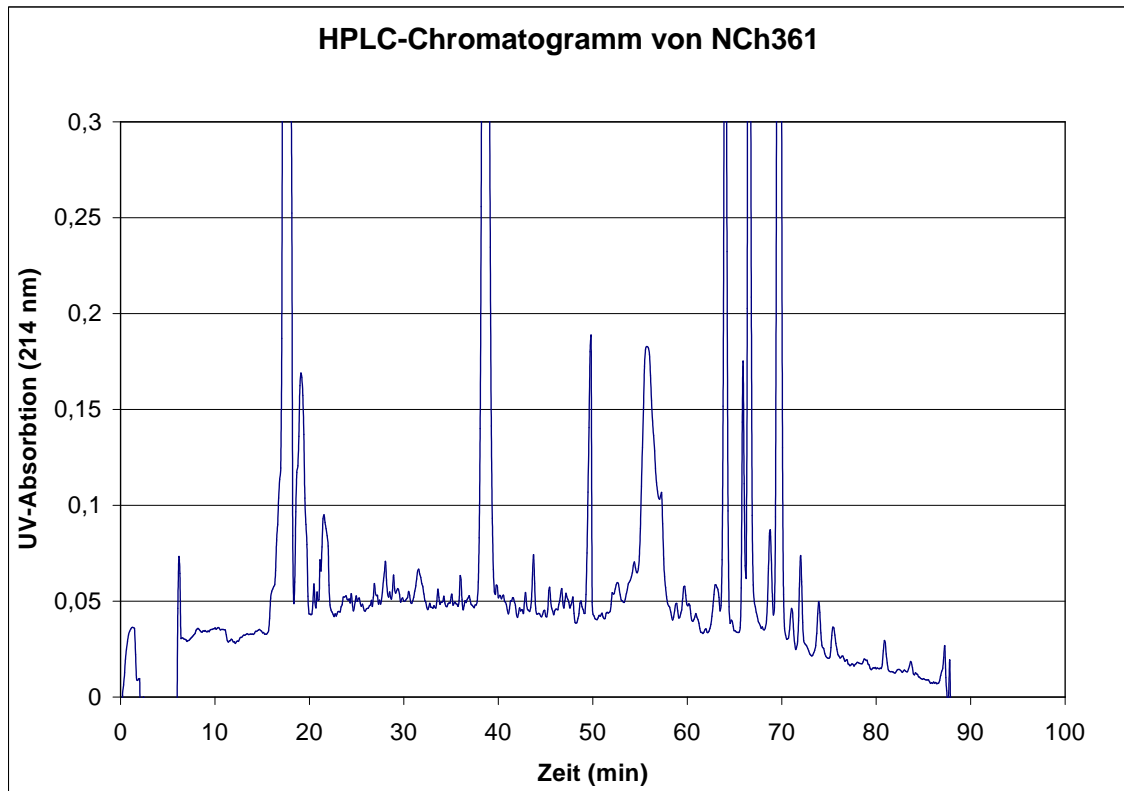
Die Entsalzung erfolgte wie in Kapitel 2.2.6. beschrieben.

Dies wurde vom Autor selbst durchgeführt.

### **3.4.5. HPLC**

100 µl konzentrierte Peptidlösung wurden mit H<sub>2</sub>O auf 500 µl verdünnt und in die Probenschleife des äquilibrierten Smart-Systems gegeben. Bei steigendem Acetonitrilgradienten wurden zahlreiche Peptide in unterschiedlichen Fraktionen aufgefangen. Abb. 3 zeigt das HPLC-Chromatogramm, in dem die fraktionierten Peptide als kleine Zacken mit einer Amplitude von etwa 0,03 nm imponieren.

Dies wurde vom Autor selbst durchgeführt.



**Abb. 3:** HPLC-Chromatogramm von NCh361.

### 3.4.6. Quantifizierung der MHC-Ausbeute mittels Western Blot

Für die Quantifizierung der eluierten MHC-Menge wurden von den beiden Eluaten vor Zentrifiltration 50  $\mu$ l-Proben genommen. Diese Proben wurden mit einer Verdünnungsreihe von MHC-Monomeren auf ein 10 %iges Acrylamidgel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt.

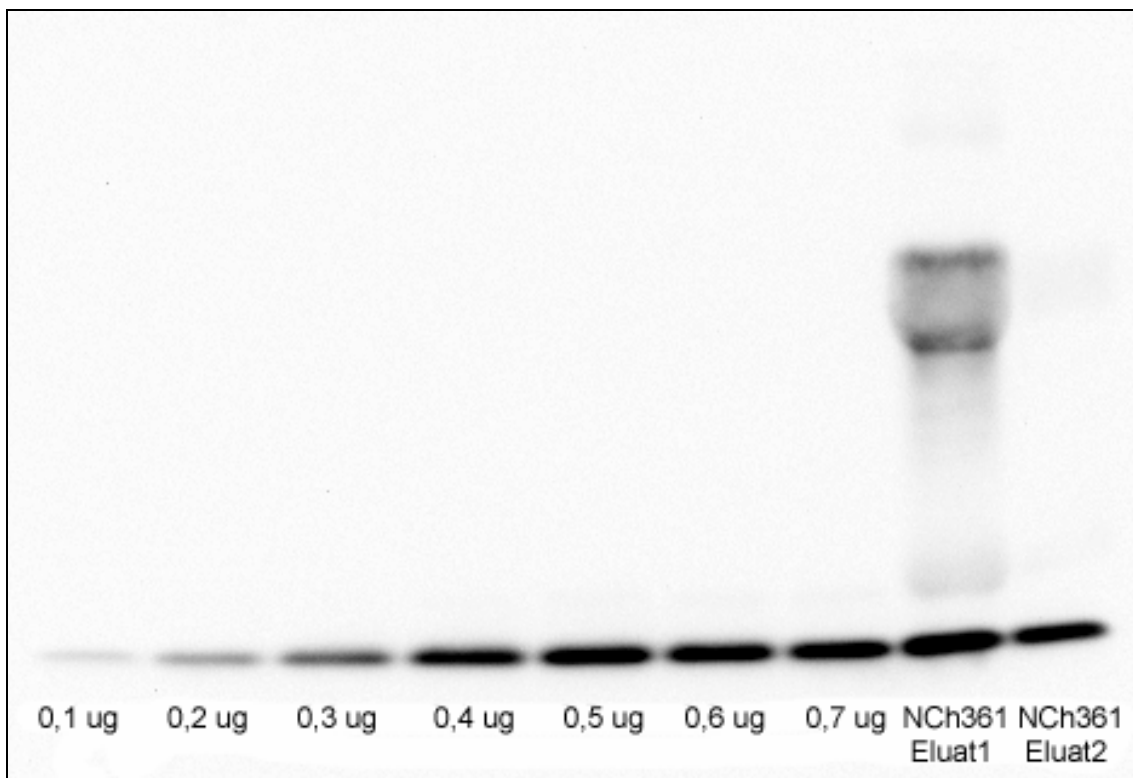
Zur Herstellung der Verdünnungsreihe wurden biotinylierte Monomere des Typs HLA A\*0201 verwendet, die mit dem Peptid ILKEPVHGV aus HIV1 beladen waren. Die Konzentration der Ausgangslösung betrug 2 mg/ml. Zunächst wurde daraus eine Stammlösung der Konzentration 100  $\mu$ g/ml hergestellt. Im Anschluß wurden Mengen von 0,1 bis 0,7  $\mu$ g dieser Stammlösung pipettiert, mit Aqua bidest. auf 10  $\mu$ l aufgefüllt und mit 10  $\mu$ l doppelt konzentriertem Ladepuffer gemischt.

Die Eluatproben wurden in gleicher Weise behandelt. 5  $\mu$ l Eluat wurden mit Aqua bidest. auf 10  $\mu$ l aufgefüllt und mit Ladepuffer gemischt.

Vor dem Beladen des Gels wurden Proben und Verdünnungsreihe 5 min bei 95° C inkubiert. Nach der Elektrophorese unter einer Spannung von 110 Volt im Sammelgel und 140 Volt im Trenngel wurde das Gel auf eine Nitrozellulosemembran gebracht und bei 38 mA über Nacht geblottet.

Als Erstantikörper wurde im Folgenden ein Anti-β2-Mikroglobulin-Immunglobulin vom Kaninchen verwendet, das in einer Konzentration von 1:50000 auf die Membran gegeben wurde. Nach 90 min Inkubation wurde die Membran gewaschen und 60 min mit dem Zweitantikörper, einem HRP-gekoppelten Anti-Kaninchen-Immunglobulin vom Esel, inkubiert.

Nach weiterem Waschen wurde die Folie 3 min mit ECL-Substrat inkubiert und unter der digitalen ECL-Kamera abgelichtet.



**Abb. 4:** Western Blot von NCh361 mit Eichreihe.

Mit Hilfe des Programms Image Reader V.1.1 wurde die Schwärzung der Banden gemessen und der entsprechenden MHC-Menge zugeordnet. Bei der waagrechten Reihe an Banden handelt es sich um eine Größenordnung von 12

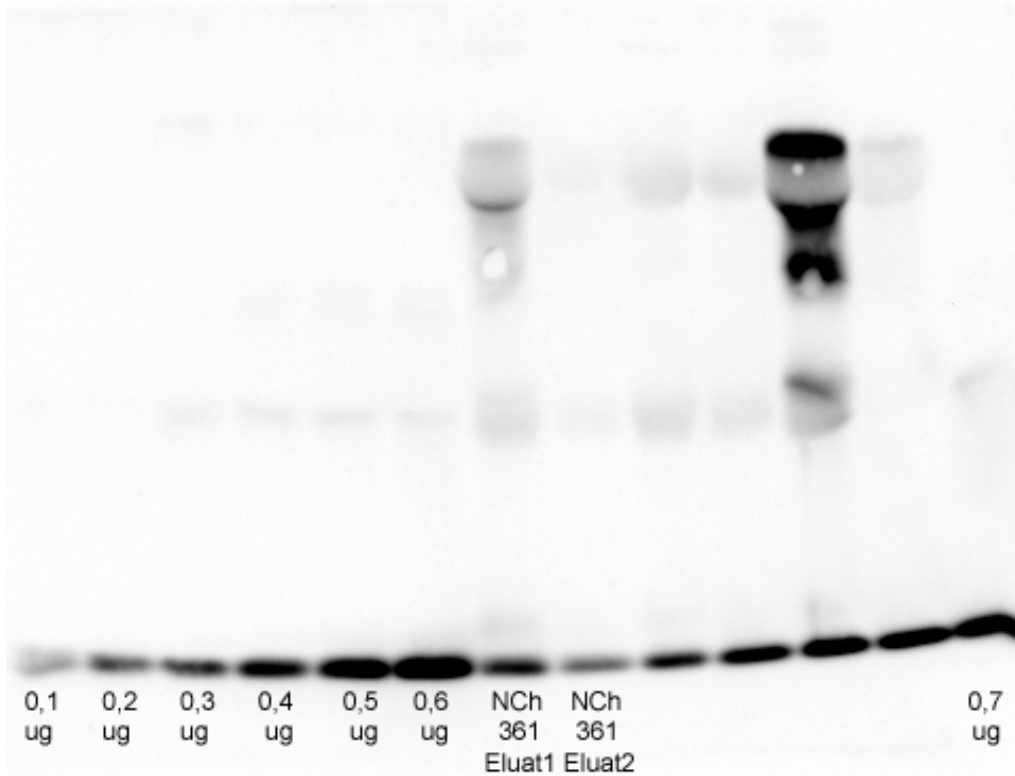
kDa, also diejenige, in der das  $\beta$ 2-Mikroglobulin zu suchen wäre. Nach Erstellen einer Eichgeraden aus der Verdünnungsreihe der MHC-Monomere wurde rechnerisch die Menge an MHC in den beiden Eluatproben bestimmt.

Anhand dieses Western Blots (Abb. 4) konnte die MHC-Menge in 5  $\mu$ l des ersten Eluats mit 0,88  $\mu$ g bestimmt werden, im zweiten mit 0,4  $\mu$ g. Dies entspräche einer Gesamtmenge von 16,3 nmol in beiden Eluaten (7 ml).

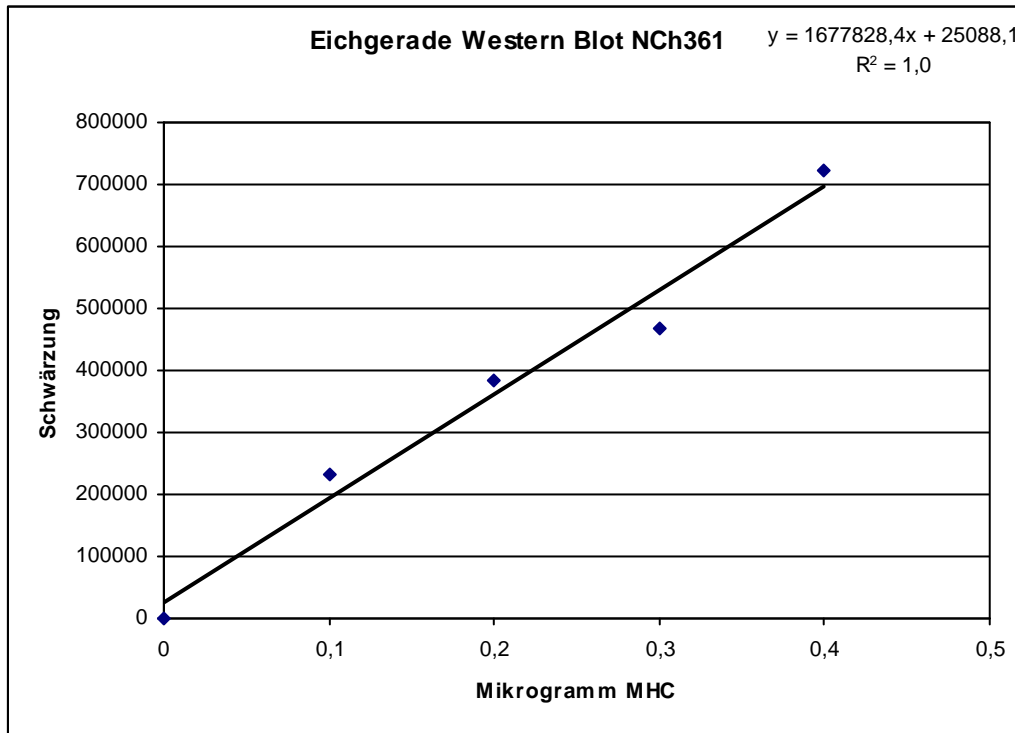
Da die MHC-Menge mit 0,88  $\mu$ g im ersten Eluat aber außerhalb der Werte der Eichgeraden lag, wurde der Blot mit einer geringeren Menge Eluat nach demselben Muster noch einmal wiederholt (Abb. 5). Diesmal wurden nur 2  $\mu$ l Eluat verwendet. Es ist aber zu bedenken, daß es sich um eine Probe aus denselben 50  $\mu$ l, wie oben erwähnt, handelt, die erneut eingefroren worden waren und nun wieder aufgetaut wurden. Mithilfe der Eichgerade (Abb. 6) läßt sich die Menge an eluierem MHC nun berechnen.

In der 2  $\mu$ l-Probe von Eluat 1 wurden diesmal 0,37  $\mu$ g MHC detektiert, in der von Eluat 2 0,21  $\mu$ g. Wenn man diese Ergebnisse wieder auf die ursprüngliche Gesamtmenge an Eluat von 7 ml zurückrechnet, ergibt sich eine MHC-Ausbeute von 18,5 nmol.

Dies wurde vom Autor selbst durchgeführt.



**Abb. 5:** 2. Western Blot von NCh361 mit Eichreihe.



**Abb. 6:** Eichgerade aus der Eichreihe zu Western Blot 2 von NCH361.

### 3.4.7. Quantifizierung der MHC-Ausbeute mittels Edman-Abbau

Eine weitere Möglichkeit zur Quantifizierung der eluierten MHC-Moleküle bietet die Proteinsequenzierung durch Edman-Abbau. Aufgrund der höheren Automatisierbarkeit ist mit dieser Methode und der damit verbundenen Zeitersparnis eine frühere Aussage über die MHC-Menge möglich. So wurden auch beim Glioblastom NCH361 Proben beider Eluate auf den Edman Sequenzer geladen und hinsichtlich der Mengen an wieder eluiertem Antikörper und MHC analysiert. Die Ergebnisse sind in Tab. 8 und Tab. 9 dargestellt.

Besonders gut läßt sich die Konzentration von MHC Klasse I an der  $\alpha$ -Kette erkennen, welche N-terminal die Sequenz GSHSM besitzt. Wie bereits erläutert, ist ein deutlicher Anstieg in der Konzentration einzelner Aminosäuren im der Sequenz entsprechenden Zyklus und ein anschließender Abfall derselben ein Hinweis auf die Menge des gesuchten Proteins in der Probe. Bei der  $\alpha$ -Kette läßt sich dieses Phänomen am besten an der Aminosäure Histidin in Position 3 nachvollziehen. Die Menge an Histidin steigt von 15,70 pmol in Zyklus 2 auf 32,28 pmol in Zyklus 3, um daraufhin wieder auf 26,73 pmol in Zyklus 4 abzufallen. Der kontinuierliche Anstieg der Histidin-Menge mit steigender Zyklus-Nummer ist Artefakt und auf Verunreinigungen zurückzuführen.

Wenn man also den Anstieg der Konzentration an Histidin von Zyklus 2 nach Zyklus 3 mit der Menge an  $\alpha$ -Ketten und damit an MHC I-Molekülen gleichsetzt, so ergibt sich in der eingesetzten Probe aus Eluat 1 von 50  $\mu$ l eine Menge von 17 pmol MHC. Dies entspräche umgerechnet auf das ursprünglich eluierte Volumen von 3,5 ml einer MHC-Menge von 2,4 nmol. Bei Eluat 2 ergäbe sich analog eine Menge von 700 pmol.

Den Antikörper W6/32 erkennt man im Edman Sequenzer am deutlichsten in Form seiner  $\kappa$ -Kette, welche die N-terminale Sequenz NIVMTQ oder SIVMTQ trägt. Unter diesen Aminosäuren läßt sich die Konzentrationsänderung des Methionin in Position 4 am leichtesten verfolgen. Man erkennt hier einen Anstieg der Menge an Methionin von 39,44 pmol in Position 3 auf 901,81 pmol in Position 4. Diese Menge fällt in Position 5 wieder auf 122,74 pmol. Rechnerisch ergibt sich daraus eine Menge von 60 nmol an  $\kappa$ -Ketten im



gesamten Eluat. Da jeder Antikörper 2  $\kappa$ -Ketten besitzt, entspräche dies 30 nmol oder 4,5 mg Antikörper. Es wurden demnach von 9 mg Antikörper, die vor der Säulen-Chromatographie hinzugegeben wurden, schon im ersten Eluat 4,5 mg wieder eluiert. In Eluat 2 befanden sich daher nur noch 5,4 nmol oder 0,8 mg Antikörper.

Dies wurde vom Autor selbst durchgeführt.

	H	N	I	V	M
1	5,54	100,24	39,92	28,44	14,67
2	15,70	54,91	906,11	670,79	25,78
3	32,28	66,04	94,45	854,70	39,44
4	26,73	61,25	82,10	311,93	901,81
5	27,54	73,93	97,15	575,17	122,74
6	29,75	88,16	102,77	376,16	60,86

**Tab. 8:** Edman-Sequenzierungsdaten von NCh361 Eluat 1. Die Mengen der Aminosäuren sind für die Zyklen 1 bis 6 in Pikomol angegeben.

	H	N	I	V	M
1	2,03	60,98	0,00	15,09	11,17
2	6,64	33,13	0,00	81,15	4,00
3	11,18	33,40	23,87	153,65	5,26
4	7,34	26,80	22,97	43,93	159,27
5	5,87	22,47	20,70	60,00	15,55
6	6,12	22,83	20,16	45,41	7,94

**Tab. 9:** Edman-Sequenzierungsdaten von NCh361 Eluat 2. Die Mengen der Aminosäuren sind für die Zyklen 1 bis 6 in Pikomol angegeben.

### 3.4.8. Identifizierte Liganden aus NCh361

Sequenz	HLA	Gen-Name	Gen-Symbol	Locus link	T	N	x-fache ÜE
IHIPINNII	B*38	Sec61 gamma	SEC61G	23480	P	P	14,22
DVFNEKGWNY	A*26	pre-B-cell colony-enhancing factor	PBEF	10135	P	P	9,32
SSVPGVRLL	A*26	vimentin	VIM	7431	P	P	6,41
TTIDIGVKY	A*26	calponin 3, acidic	CNN3	1266	P	P	5,78
SHSDYLLTI	B*38	STAT induced STAT inhibitor-2	SOCS2	8835	P	M	5,70
IHDDFVTTF	B*38	AE binding protein 1	AEBP1	165	P	A	5,28
TAAPPFPHL	A*26	T-box 2	TBX2	6909	A	A	4,86
QHEGTVNIF	B*38	protein tyrosine phosphatase, receptor-type, Z polypeptide 1	PTPRZ1	5803	P	P	4,56
DVISNIETF	A*26	SRY (sex determining region Y)-box 9	SOX9	6662	P	P	3,89
SAVDFIRTL	A*26	serine/threonine kinase 17a (apoptosis-inducing)	STK17A	9263	P	P	3,89
DSFPMEIRQY	A*26	signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	STAT1	6772	P	P	3,56
EVIPYTPAM	A*26	heme oxygenase (decycling) 1	HMOX1	3162	P	A	3,27
THLDSVTKI	B*38	c6.1A	C6.1A	79184	A	A	3,25
DHINDIIKI	B*38	IQ motif containing GTPase activating protein 1	IQGAP1	8826	P	P	2,99
SHIGDAVVI	A*26	proliferating cell nuclear antigen	PCNA	5111	P	P	2,87
RLDDAIHVL	B*38	transcription factor 12 (HTF4, helix-loop-helix transcription factors 4)	TCF12	6938	P	P	2,87
IHLIDPNTL	B*38	CGI-07 protein	CGI07	51068	P	P	2,38
ELVKRILNF	A*26	DEK oncogene (DNA binding)	DEK	7913	P	P	2,35

LVVYPWTQRF	A*26	hemoglobin, beta	HBB	3043	P	P	2,35
VVYPWTQRF	A*26	hemoglobin, beta	HBB	3043	P	P	2,35
KAFQKIVVL	A*26	basic leucine zipper and W2 domains 1	BZW1	9689	P	P	2,33
FGVDRAILY	A*26	integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)	ITGAV	3685	P	P	2,28
QVAEIVSKY	A*26	integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)	ITGAV	3685	P	P	2,28
DHMRFISEL	B*38	cytoplasmic FMR1 interacting protein 1	CYFIP1	23191	P	P	2,20
DHDPVDKIVL	B*38	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	HNRPA2B1	3181	P	P	1,77
EVAAVLLHF	A*26	SEC10-like 1 ( <i>S. cerevisiae</i> )	SEC10L1	10640	P	A	1,69
SVVSVISRF	A*26	defender against cell death 1	DAD1	1603	P	P	1,56
EIAEAYLGY	A*26	heat shock 70kDa protein 1A	HSPA1A	3303	P	P	1,44
AHVDLIEKL	B*38	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide L, 7.6kDa	POLR2L	5441	P	P	1,39
GHDASQITL	B*38	TH1-like ( <i>Drosophila</i> )	TH1L	51497	P	P	1,39
EVIDLMIKEY	A*26	PHD zinc finger protein XAP135	PHF10	55274	P	P	1,32
ETADTLLALRY	A*26	glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 2	GFPT2	9945	P	P	1,30
EHAGVISVL	B*38	hepatitis B virus x interacting protein	HBXIP	10542	P	P	1,28
DHHQEVI GF	B*38	C9orf10 protein	C9orf10	23196	P	P	1,27
SHFVSDVVI	A*26	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1	GNB2L1	10399	P	P	1,20
QTPDFTPTKY	B*38	triple homeobox 1	TIX1	23051	P	P	1,20
DTLDKVFTY	A*26	fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 3	FACL3	2181	P	P	1,17
EIYGGSDSRF	A*26	splicing factor 3b, subunit 1, 155kDa	SF3B1	23451	P	P	1,17
DVIAQGIGKL	A*26	ribosomal protein, large P2	RPLP2	6181	P	P	1,15
ELIAKIPNF	A*26	SET translocation (myeloid leukemia-associated)	SET	6418	P	P	1,12
EAIEQILKY	A*26	hypothetical protein FLJ10539	FLJ10539	55164	P	A	1,11

THSLPVVVI	B*38	signal transducer and activator of transcription 3	STAT3	6774	P	P	1,10
TRDELEWKL	A*26	hypothetical protein MGC3062	VIAF1	79031	P	P	1,04
EVAATEIKM	A*26	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	HNRPM	4670	P	P	1,00
GHYEVAELL	B*38	tankyrase, TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase	TNKS	8658	P	P	1,00
GVIEKLLTSY	A*26	NRAS-related gene	D1S155E	7812	P	P	0,98
EVFPLAMNY	A*26	cyclin D1 (PRAD1: parathyroid adenomatosis 1)	CCND1	595	P	M	0,97
MPVGPDAILRY	A*26	HLA-B associated transcript 3	BAT3	7917	P	P	0,95
DVIERVIQY	A*26	IDN3 protein	IDN3	25836	P	P	0,94
SHSQLMQLI	B*38	adhesion regulating molecule 1	ADRM1	11047	P	P	0,86
AAFPGASLY	A*26	DAZ associated protein 2	DAZAP2	9802	P	P	0,84
EVIPPYYSY	A*26	TRAF and TNF receptor-associated protein	TTRAP	51567	P	P	0,78
EVIPPMKEF	A*26	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 6, 17kDa	NDUFB6	4712	P	P	0,77
IHDLDNISF	B*38	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 2	PSMB2	5690	P	P	0,76
EVVSEPFRSF	A*26	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 2	PSMD2	5780	P	P	0,76
SHLDYDITL	B*38	KIAA0794 protein	KIAA0794	26043	P	P	0,74
AHDDGRWSL	B*38	singed-like (fascin homolog, sea urchin) (Drosophila)	FSCN1	6624	P	P	0,74
DVIRLIMQY	A*26	homolog of C. elegans smu-1	SMU-1	55234	A	A	0,73
DLIEHFSQF	A*26	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	HNRPA0	10949	P	P	0,72
DVAEGDLIEHF	A*26	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	HNRPA0	10949	P	P	0,72
EVIKNFIQY	B*38	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6 interacting protein	EIF3S6IP	51386	P	P	0,71
AHDDGRWSL	A*26	hypothetical protein MGC4655	MGC4655	84752	P	P	0,71
SHSPFGLDSF	B*38	chromosome 5 open reading frame 7	C5orf7	51780	P	P	0,70
GHFEKPLFL	B*38	neuropathy target esterase	NTE	10908	P	P	0,68

EVVAGIKEYF	A*26	mortality factor 4	MORF4	10934	P	P	0,67
DVLQKIKY	A*26	epidermal growth factor receptor pathway substrate 8-related protein 1	EPS81	54869	A	A	0,67
EVTELLARY	A*26	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide E, 25kDa	POLR2E	5434	P	P	0,66
VHILDTETF	B*38	host cell factor homolog	KLHCD2	23588	P	P	0,59
SVIEAVAHF	A*26	KIAA0349 protein	KIAA0349	23304	P	P	0,53
SVVEIINH	A*26	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 1 (p85 alpha)	PIK3R1	5295	P	P	0,52
EHAHLIVVL	B*38	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 9	ABCB9	23457	A	A	0,51
EVVERVLTF	A*26	F-box only protein 22	FBXO22	26263	A	A	0,50
DTISPTLGF	A*26	ADP-ribosylation factor-like 2	ARL2	402	P	P	0,48
DVLESVLL	A*26	adaptor-related protein complex 2, mu 1 subunit	AP2M1	1173	P	P	0,47
EIIGKRGIGY	A*26	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit g	ATP5L	10632	P	P	0,47
FHNELLTQL	B*38	BAI1-associated protein 2	BAIAP2	10458	P	P	0,37
EHSLVIDTL	A*26	prefoldin 2	PFDN2	5202	P	P	0,37
ETFDAGLQAF	B*38	spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (alpha-fodrin)	SPTAN1	6709	P	P	0,37
ETVRELTEF	A*26	peroxisome proliferative activated receptor, delta	PPARD	5467	A	A	0,36
YVDPVITSI	A*26	met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)	MET	4233	A	A	0,33
MHLRQYELL	B*38	GNAS complex locus	GNAS	2778	P	P	0,15
DTGILDSIGRF	A*26	myelin basic protein	MBP	4155	P	P	0,12

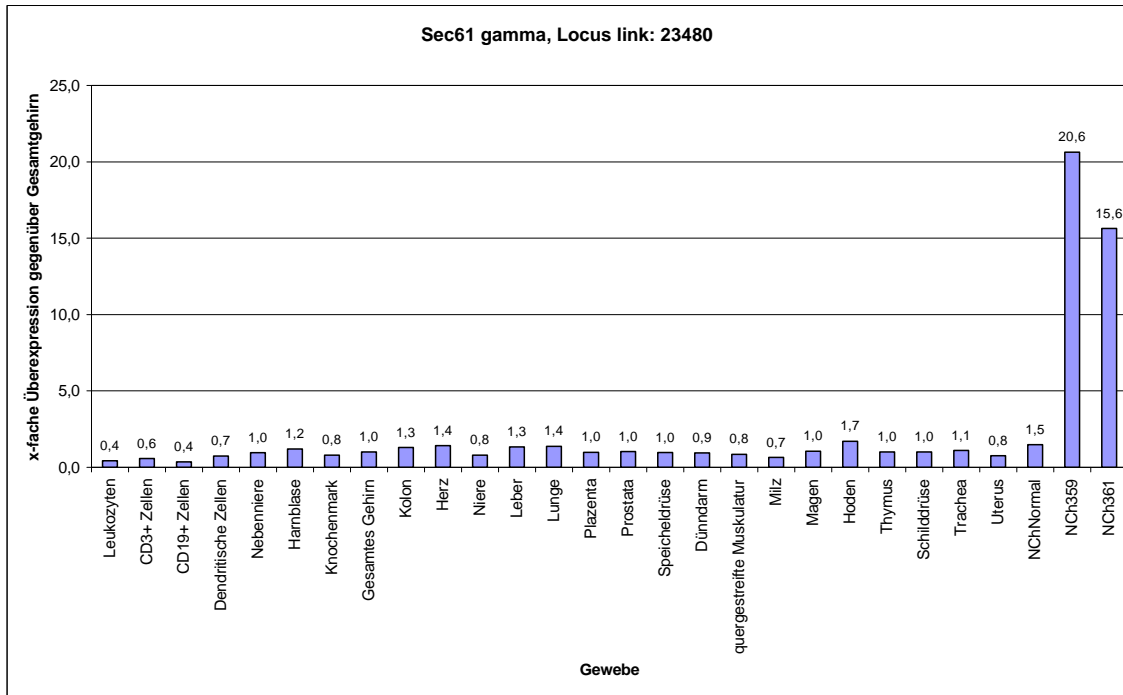
**Tab. 10:** Aus NCh361 identifizierte Liganden mit Angabe der HLA-Restriktion, und des Herkunftsproteins. T: Tumor. N: Normalhirn. P: present. A: absent. ÜE: Überexpression gegenüber Normalhirn. Massenspektrometrie durch Claudia Lemmel.

### 3.4.9. Liganden tumorassoziierter Proteine

Die vorausgehende Tab. 10 zeigt eine Auflistung aller für NCh361 identifizierten HLA-Liganden. Dabei ist auch der Vergleich der Expressionsdaten von Tumor gegenüber normalem Hirngewebe dieser Liganden als x-fache Überexpression berücksichtigt. Es zeigt sich, daß ein Teil der Gene, die den erfaßten Liganden zugrunde liegen, im Vergleich zum Gemisch normaler Hirnzellen deutlich hochreguliert sind, wobei andere eher vermindert transkribiert erscheinen.

Interessante tumorassozierte oder gar tumorspezifische Antigene lassen sich jedoch nicht allein durch den Vergleich von Tumorgewebe und Normalhirn identifizieren. Notwendig ist zusätzlich, daß auch gegenüber allen anderen Körpergeweben das Antigen im Tumor deutlich erhöht exprimiert wird. Dies wird jedoch erst ersichtlich, wenn für jedes Protein, aus dem Liganden im Tumor identifiziert wurden, das Expressionsprofil in verschiedenen Körpergeweben analysiert wird. Dies ist im Folgenden exemplarisch an einigen interessanten Liganden dargestellt.

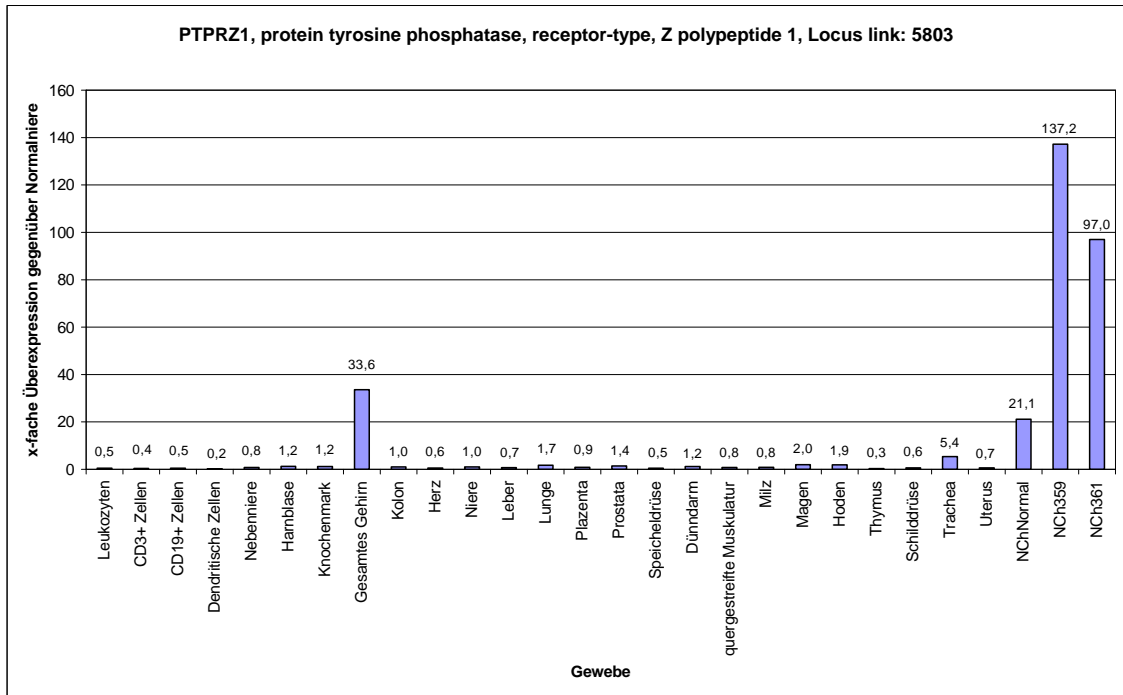
An der Spitze der Liganden aus NCh361 steht das HLA B\*38-restringierte Peptid IHIPINNII aus dem Protein „Sec61 gamma“ (Abb. 7), welches gegenüber Normalhirn im Tumor knapp 15-fach überexprimiert erscheint. Der geringe Unterschied der Daten der Tabelle (14,2) und derer des Diagramms (15,6) ist auf verschiedene Rechnungsarten in Folge der Chipanalyse zurückzuführen. Das „Protein Sec61 gamma“ ist Teil eines membranständigen heterotrimeren Komplexes, der an der Protein-Translokation ins Endoplasmatische Retikulum beteiligt ist [86].



**Abb. 7:** Expressionsprofil von „Sec61 gamma“ in verschiedenen menschlichen Geweben, verglichen mit einem Standard von Normalhirn. NCh359 und NCh361 bezeichnen die Expression in den untersuchten Tumoren. Expressionsprofil erstellt von Oliver Schoor.

In allen untersuchten Geweben und Zellen wird es, im Vergleich zum Normalhirn, eher weniger oder nur gering erhöht exprimiert. Die Expression in Hodengewebe ist mit 1,7-facher Überexpression unter den Normalgeweben am stärksten. Eindrucksvoll zeigt sich hingegen die 15-fache Überexpression im Tumor NCh361.

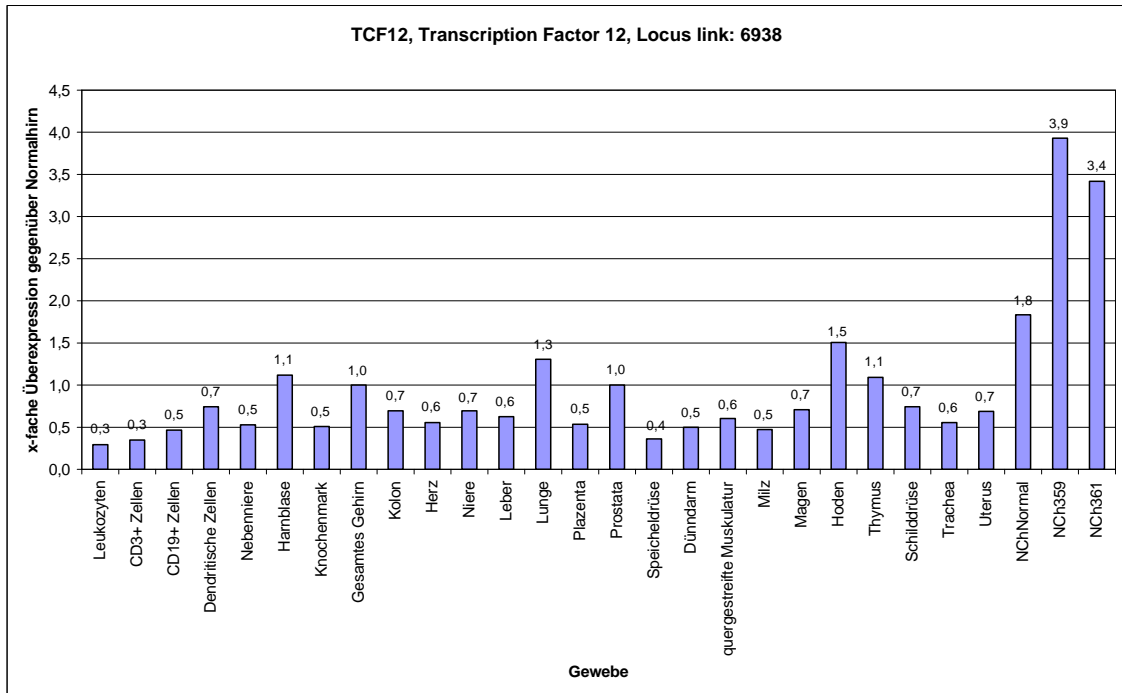
Stark überexprimiert erscheint auch das Protein „Protein Tyrosin Phosphatase, Receptor subtype, Z polypeptide 1“ (PTPRZ1), aus dem der ebenfalls HLA B\*38 restringierte Ligand QHEGTVNIF im Eluat gefunden wurde. Bei diesem Protein handelt es sich um ein Typ I-Membranprotein, das in Zellen des Zentralnervensystems eine entwicklungsregulatorische Enzymfunktion zu erfüllen scheint. Es gilt als spezifisch für Zellen des Gyrus Dentatus, der Purkinje-Zellschicht im Kleinhirn und der Subependymalschicht im Vorderhorn des Seitenventrikels. PTPRZ1 ist im Vergleich zum Normalhirn zwar nur etwas mehr als 4-fach überexprimiert, gegenüber allen anderen Geweben, die nicht dem ZNS entstammen, jedoch beinahe 100-fach (Abb. 8).



**Abb. 8:** Expressionsprofil von PTPRZ1 in verschiedenen menschlichen Geweben, NCh361 und NCh359, verglichen mit Normalniere als Repräsentant für Nicht-ZNS-Gewebe. Expressionsprofil erstellt von Oliver Schoor.

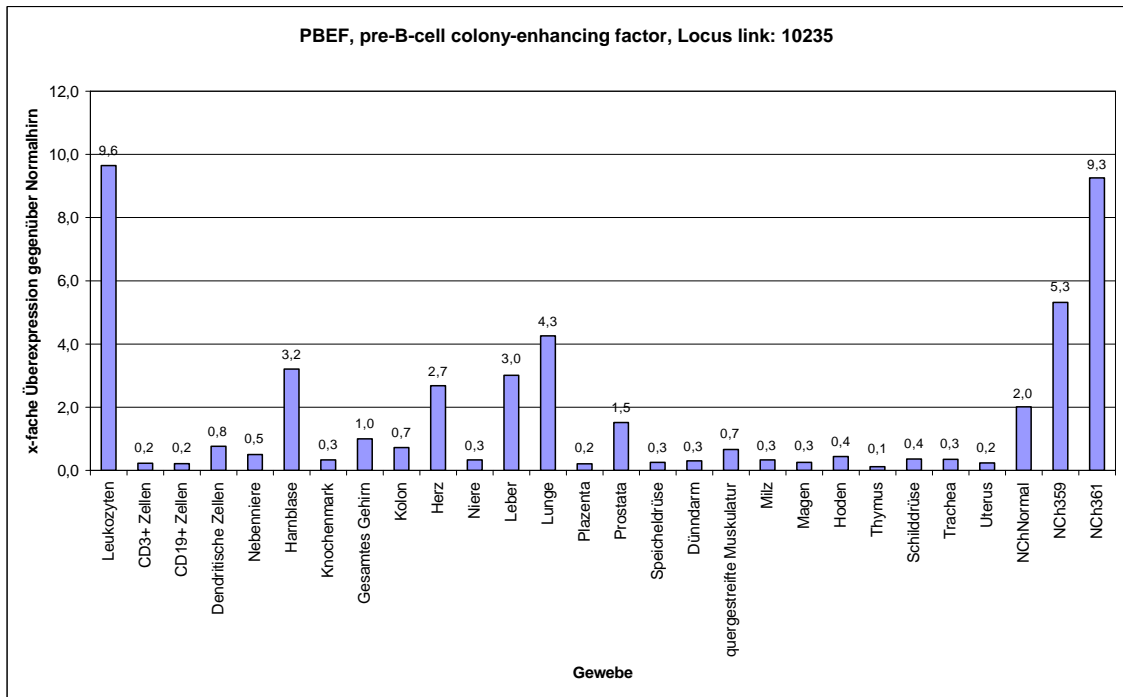
Wie auch schon im Fall von Sec61 gamma ist auch in NCh359, von dem bisher nur wenig Material untersucht wurde, PTPRZ1 deutlich überexprimiert. Für den Genabschnitt, der für den Transkriptionsfaktor 12 (Abb. 9) codiert und zu dem der HLA B\*38 restringierte Ligand RLDDAIHVL identifiziert wurde, findet sich gegenüber Normalhirn immer noch eine 3,4-fache Überexpression in NCh361, während diese sich in anderen Geweben mit maximal 1,5 in Hoden und 1,3 in Lunge in Grenzen hält. Expressionsprofile dieser Art finden sich unter den Liganden sehr viel häufiger als solche mit eindeutiger und alleiniger Überexpression im Tumor.





**Abb. 9:** Expressionsprofil von TCF12 in verschiedenen menschlichen Geweben, NCh361 und NCh359, verglichen mit Normalhirn. Expressionsprofil erstellt von Oliver Schoor.

Als Beispiel für die große Mehrzahl der Proteine, für die Liganden identifiziert werden konnten, sei PBEF (Pre-B-Cell Colony-Enhancing Factor) genannt, ein Protein, das in frühen Stadien der B-Zell-Reifung den Effekt von Interleukin 7 verstärkt [86]. Das Profil (Abb. 10) zeigt eine starke Überexpression des Proteins in NCh361 und NCh359 gegenüber Normalhirn und zahlreichen anderen Geweben. Wie zu erwarten, wird der Faktor aber auch in Leukozyten und einigen anderen Körpergeweben (Lunge, Blase, Leber) stark exprimiert. Zudem ist bekannt, daß er auch im Knochenmark in großer Menge zu finden ist [86], was aus unseren Daten allerdings nicht nachzuvollziehen ist.



**Abb. 10:** Expressionsprofil von PBEF in verschiedenen menschlichen Geweben, NCh361 und NCh359, verglichen mit Normalhirn. Expressionsprofil erstellt von Oliver Schoor.

### 3.5. Ergebnisse RCC68

#### 3.5.1. Identifizierte Liganden aus RCC68

Sequence	HLA	Gen-Symbol	Gen-Name	Locus Link	T	N	x-fache ÜE
ALADGVQKV	A*02	APOL1	apolipoprotein L, 1	8542	P	A	32,45
LLAERDLYL	A*02	TGM2	transglutaminase 2	7052	P	P	7,84
SPVYVGRV	?	TGM2	transglutaminase 2	7052	P	P	7,84
RVYPEVTVY	B*15	HLA-DRB4	major histocompatibility complex, class II, DR beta 4	3126	P	P	5,46
VEHPSLTSP	?	HLA-DRB4	major histocompatibility complex, class II, DR beta 4	3126	P	P	5,46
QEQSFVIRA	?	ITGB2	integrin, beta 2 (antigen CD18 (p95))	3689	P	P	5,43
LLYPTEITV	A*02	ITGA3	integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)	3675	P	A	5,13
QQKLSRLQY	B*15	ITGA3	integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)	3675	P	A	5,13
KYFDEHYEY	B*15	CKS2	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2	1164	P	P	4,06
AQPGFFDRF	B*15	COL6A2	collagen, type VI, alpha 2	1292	P	P	4,03
ALRDVRQQY	B*15	RPLP2	ribosomal protein, large P2	6181	P	P	3,73
EENFAVEA	?	RPLP2	ribosomal protein, large P2	6181	P	P	3,73
MEENFAVEA	?	RPLP2	ribosomal protein, large P2	6181	P	P	3,73
NYIDKVRFL	?	RPLP2	ribosomal protein, large P2	6181	P	P	3,73
GEPRFISVGY	?	HLA-C	major histocompatibility complex, class I, C	3107	P	P	3,20
YAYDGKDYIAL	?	HLA-B	major histocompatibility complex, class I, B	3106	P	P	2,91
NEDLRSWTA	?	HLA-G	HLA-G histocompatibility antigen, class I, G	3135	P	A	2,87
VEPDHFKVA	?	LGALS3	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 (galectin 3)	3958	P	P	2,62

TFMDHVLRV	B*15	ACLY	ATP citrate lyase	47	P	P	2,27
LLDEEISRV	A*02	QKI	homolog of mouse quaking QKI (KH domain RNA binding protein)	9444	P	P	2,14
RNADVFLKY	B*15	TRIO	triple functional domain (PTPRF interacting)	7204	P	P	2,11
ALSDHHIYL	A*02	ALDOA	aldolase A, fructose-bisphosphate	226	P	P	2,00
IAMATVTAL	A*02	ALDOA	aldolase A, fructose-bisphosphate	226	P	P	2,00
SDHHIYL	?	ALDOA	aldolase A, fructose-bisphosphate	226	P	P	2,00
SLFVSNHAY	B*15	ALDOA	aldolase A, fructose-bisphosphate	226	P	P	2,00
TQMPDPKTF	B*15	LOC51123	HSPC038 protein	51123	P	P	1,75
AVLGAVVAV	A*02	HUMMHCV1A	Cw1 antigen	51353	P	P	1,65
VLREIAEEY	B*15	HDLBP	high density lipoprotein binding protein (vigilin)	3069	P	M	1,61
MQKEITAL	?	ACTB	actin, beta	60	P	P	1,58
GLATDVQTV	A*02	PSMB3	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 3	5691	P	P	1,56
SISGVTAAY	B*15	IQGAP1	IQ motif containing GTPase activating protein 1	8826	P	P	1,53
GQEFIRVGY	B*15	ASF1B	anti-silencing function 1B	55723	P	A	1,47
KVADMALHY	B*15	CCT8	chaperonin containing TCP1, subunit 8 (theta)	10694	P	P	1,43
EEMPQVHTP	?	MCM3	MCM3 minichromosome maintenance deficient 3	4172	P	P	1,42
IQKESTLHL	?	UBA52	ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1	7311	P	P	1,42
GYLHDFLKY	?	MORF4L2	mortality factor 4 like 2	9643	P	P	1,39
LLIENVASL	A*02	GPX1	glutathione peroxidase 1	2876	P	P	1,39
RLAAAAAQSVY	?	GPX1	glutathione peroxidase 1	2876	P	P	1,39
GQFPGHNEF	B*15	CDC42EP3	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 3	10602	P	P	1,38
VQGPVGTDF	B*15	ZNF207	zinc finger protein 207	7756	P	P	1,37
QVAEIVSKY	B*15	ITGAV	integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)	3685	P	P	1,36

EENKLIYTP	?	BART1	binder of Arl Two	23568	P	P	1,35
MEDIKILIA	?	HIF1A	hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit	3091	P	P	1,30
LMDHTIPEV	?	SDCBP	syndecan binding protein (syntenin)	6386	P	P	1,25
FAYDYGKDYLT	?	HLA-E	major histocompatibility complex, class I, E	3133	P	P	1,24
HVNDLFLQY	B*15	KIAA1005	KIAA1005 protein	23322	P	P	1,23
HQITVLHVY	B*15	HELO1	homolog of long chain polyunsaturated fatty acid elongation enzyme 2	60481	P	P	1,21
KMKEIAEAY	B*15	HSPA1B	heat shock 70kDa protein 1B	3304	P	P	1,16
FLPHMAYTY	B*15	ZFHX1B	zinc finger homeobox 1b	9839	P	P	1,14
ALAVIITSY	B*15	ATP6IP2	ATPase, H+ transporting, lysosomal interacting protein 2	10159	P	P	1,09
ALATLIHQV	A*02	COPS7A	COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 7A	50813	P	P	1,06
ALQEMVHQV	A*02	HEF1	enhancer of filamentation 1	10543	P	P	1,06
YVYEYPSRY	B*15	HEF1	enhancer of filamentation 1	10543	P	P	1,06
EEHPTLLTEA	?	ACTA2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	59	P	P	1,02
YIFKERESF	B*15	CGI-18	CGI-18 protein	51008	P	P	1,02
ILHDDEVTV	A*02	RPLP1	ribosomal protein, large, P1	6176	P	P	0,99
IGIDLGTTY	?	HSPA1A	heat shock 70kDa protein 1A	3303	P	P	0,97
ALNELLQHV	A*02	TLN1	talin 1	7094	P	P	0,95
SWNNHSYLY	?	GGCX	gamma-glutamyl carboxylase	2677	P	P	0,92
KQMEQVAQF	B*15	TAGLN	transgelin	6876	P	P	0,89
VQRTLMA	?	TAGLN	transgelin	6876	P	P	0,89
KLHGVNINV	A*02	RBM4	RNA binding motif protein 4	5936	P	P	0,88
RQGFVPAAY	B*15	SPTAN1	spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (alpha-fodrin)	6709	P	P	0,87
LQHPDVAAY	B*15	CTNNA1	catenin (cadherin-associated protein), alpha 1, 102kDa	1495	P	P	0,85

AQNAVRLHY	B*15	CTNNB1	catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa	1499	P	P	0,84
YQFTGIKKY	B*15	MGC14697	hypothetical protein MGC14697	84833	P	P	0,84
YYRYPTGESY	?	PFKFB3	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3	5209	P	P	0,82
FAEGFVRAL	?	JUN	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)	3725	P	P	0,78
FFGETSHNY	?	MATR3	matrin 3	9782	P	P	0,76
VMDSKIVQV	?	KPNA6	karyopherin alpha 6 (importin alpha 7)	23633	P	P	0,76
AIVDKVPSV	?	SSBP3	single stranded DNA binding protein 3	23648	P	P	0,75
AVCEVALDY	B*15	SPTBN1	spectrin, beta, non-erythrocytic 1	6711	P	P	0,74
AFFAERLYY	?	ANXA7	annexin A7	310	P	P	0,72
SLLGGDVVSV	A*02	DSIPI	delta sleep inducing peptide, immunoreactor	1831	P	P	0,71
VVAPITTYG	B*15	SIP	Siah-interacting protein	27101	P	A	0,68
REHAPFLVA	?	TTS-2.2	transport-secretion protein 2.2	57104	P	P	0,67
HVIDVKFLY	B*15	DDB1	damage-specific DNA binding protein 1, 127kDa	1642	P	P	0,65
NEIKDSVVA	?	EEF2	eukaryotic translation elongation factor 2	1938	P	P	0,63
RVIEEAKTAF	?	HMOX1	heme oxygenase (decycling) 1	3162	P	P	0,62
AAFPGASLY	?	DAZAP2	DAZ associated protein 2	9802	P	P	0,50
GLNDETYGY	B*15	ATP1B1	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, beta 1 polypeptide	481	P	P	0,45
VFIGTGATGATLY	?	NDUFA4	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 4, 9kDa	4697	P	P	0,41
AELATRALP	?	JUP	junction plakoglobin	3728	P	P	0,23
NVTQVRAFY	B*15	CAT	catalase	847	P	P	0,23

**Tab. 11:** Aus RCC68 identifizierte Liganden mit Angabe der HLA-Restriktion, und des Herkunftsproteins. T: Tumor. Normalniere. P: present. A: absent.

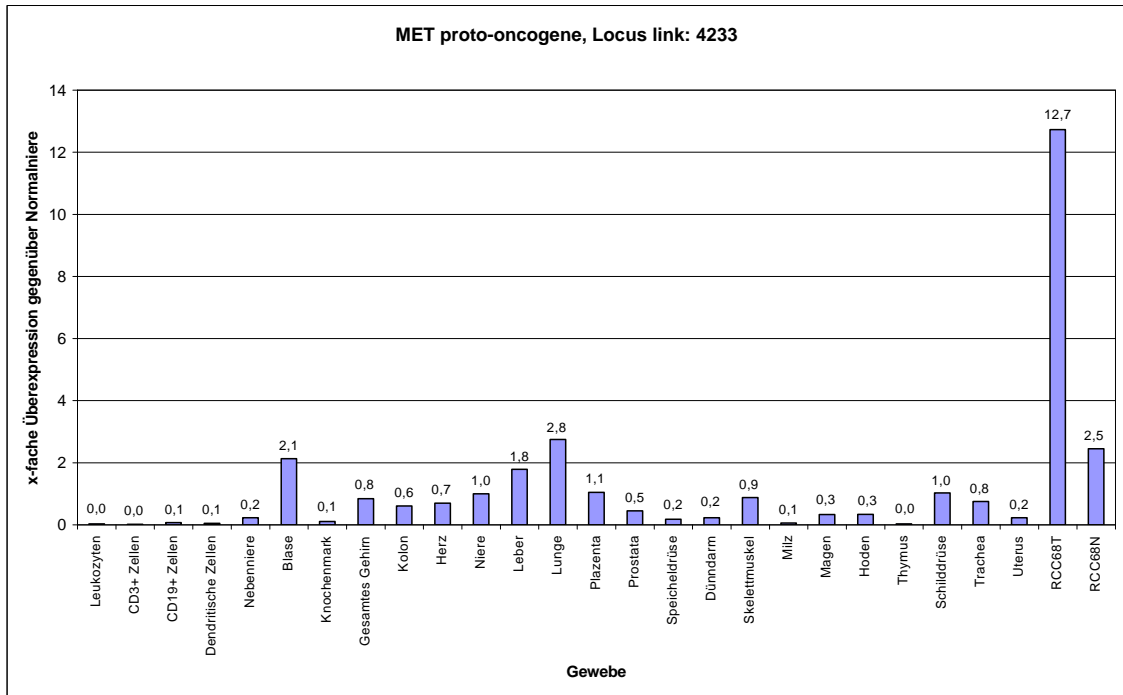
ÜE: Überexpression gegenüber Normalniere. Massenspektrometrie durch Claudia Lemmel.

### **3.5.2. Liganden tumorassoziierter Proteine**

Der Tumor RCC68 wurde kurz nach Asservation verarbeitet. Es wurden drei Eluate gewonnen, von denen die ersten zwei nach Quantifizierung ausreichende Mengen an MHC enthielten und auf Peptide hin analysiert wurden.

Die obige Tabelle enthält eine Auflistung der in RCC68 identifizierten Liganden, sortiert nach x-facher Überexpression gegenüber gesundem Nierengewebe desselben Patienten.

Zwar wurden bei diesem Tumor mehr als 100 Liganden aus den Eluaten identifiziert, es wurden aber keine Liganden gefunden, die als Impfpeptide infrage gekommen wären. Dies soll in Kapitel 4. noch näher erläutert werden. Um dem Patienten trotzdem eine Zusammenstellung an Vakzinierungspeptiden anbieten zu können, wurde auf bereits bekannte überwiegend HLA A\*02-restringierte Liganden zurückgegriffen, deren Herkunftsgene im Patienten hochreguliert waren. Als Vakzinierungspeptide wurden solche aus folgenden Proteinen verwendet: met proto-oncogene (MET), preferentially expressed antigen in melanoma (PRAME), Carbonic anhydrase IX (CA9), mucin 1 (MUC1), adipose differentiation-related protein (ADFP), Cyclin D1 (CCND1), Survivin (BIRC5). Als Beispiel für die Expressionsprofile dieser Gene wird das Profil von MET im Folgenden gezeigt.



**Abb. 11:** Expressionsprofil von MET proto-oncogene in RCC68 und in verschiedenen menschlichen Geweben, verglichen mit einem Standard von Normalniere. RCC68T bezeichnet die Expression im Tumor, RCC68N die im normalen Nierengewebe des Patienten. Expressionsprofil erstellt von Oliver Schoor.

Man erkennt deutlich die 12-fache Überexpression des Gens im Tumor, während es in anderen Geweben im Vergleich zu einer Standardniere nur maximal 3-fach überexprimiert gefunden wird (zum Beispiel in der Lunge).



### 3.6. Ergebnisse RCC75

#### 3.6.1. Identifizierte Liganden aus RCC75

Sequenz	HLA	Gen-Symbol	Gen-Name	Locus Link	T	N	x-fache ÜE
KPNANRIAL	B*07	LGALS3	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 (galectin 3)	3958	P	P	4,5
RPELVRPAL	B*07	AKR1C3	aldo-keto reductase family 1, member C3	8644	P	P	3,8
GTYAPAEVPK	?	AKR1C1	aldo-keto reductase family 1, member C1	1645	P	A	3,2
REKLQEEML	B*40	RPLP2	ribosomal protein, large P2	6181	P	A	3,1
SLYASSPGGVYATR	?	RPLP2	ribosomal protein, large P2	6181	P	A	3,1
KLFDHAVSKF	?	FACL4	fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 4	2182	P	P	2,6
VPNQKRLTLL	B*07	FACL4	fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 4	2182	P	P	2,6
SLWDRLIFH	?	FACL2	fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 2	2180	P	P	2,6
HASDRIIAL	?	TKT	transketolase (Wernicke-Korsakoff syndrome)	7086	P	P	2,4
GEGDFLAEGGGV	?	FGA	fibrinogen, A alpha polypeptide	2243	A	A	2,4
GLMGFIVYK	A*03	C14orf2	chromosome 14 open reading frame 2	9556	P	P	2,3
TEARFGAQL	B*40	KRT19	keratin 19	3880	P	P	2,3
AALVASGVALY	?	P2RY11	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 11	5032	A	A	2,1
LVVYPWTQRF	?	HBB	hemoglobin, beta	3043	P	P	2,1
VVYPWTQRF	?	HBB	hemoglobin, beta	3043	P	P	2,1
KPRDVSSVEL	B*07	SPTBN1	spectrin, beta, non-erythrocytic 1	6711	A	A	1,9
QTYVGITEK	?	U5-200KD	U5 snRNP-specific protein, 200-KD	23020	A	A	1,8
IVAGSLITK	?	FNBP3	formin binding protein 3	55660	P	P	1,8

AMLDTVVFK	?	POH1	26S proteasome-associated pad1 homolog	10213	P	P	1,7
GTLPHPLQR	?	SCNN1A	sodium channel, nonvoltage-gated 1 alpha	6337	P	P	1,7
TLADILLYY	?	EEF1E1	eukaryotic translation elongation factor 1 epsilon 1	9521	P	P	1,6
AVNAHSNILK	A*03	IMMT	inner membrane protein, mitochondrial (mitofilin)	10989	P	P	1,6
GESDDSilRL	B*40	RPS21	ribosomal protein S21	6227	P	P	1,5
SIFDGRVVAK	?	LOC54499	putative membrane protein	54499	P	P	1,4
VPDSSGPERIL	B*07	HNRPK	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	3190	P	P	1,3
KVYENYPTY	?	DEK	DEK oncogene (DNA binding)	7913	P	P	1,3
GEITGEVHM	?	FLNB	filamin B, beta (actin binding protein 278)	2317	P	P	1,3
KLADFGLAR	?	CDK4	cyclin-dependent kinase 4	1019	P	P	1,3
HLEDIVRQK	A*03	TRIP12	thyroid hormone receptor interactor 12	9320	P	P	1,2
SESPVVVL	B*40	SPC18	signal peptidase complex (18kD)	23478	P	P	1,2
KLYEMILKR	?	ARL7	ADP-ribosylation factor-like 7	10123	P	P	1,2
GLASFKSFLK	A*03	RGS5	regulator of G-protein signalling 5	8490	P	P	1,1
KEPEINTTL	B*40	FLJ34588	hypothetical protein FLJ34588	221154	P	P	1,1
GTMTGMLYK	?	TIMM23	translocase of inner mitochondrial membrane 23 homolog (yeast)	10431	P	P	1,1
SEVQDRVML	B*40	CGI-127	yippee protein	51646	P	P	1,1
GVADKILKK	A*03	NMI	N-myc (and STAT) interactor	9111	P	P	1,1
GSYNKVFLAK	?	PSMD8	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 8	5714	P	P	1,0
RILFFNTPK	?	PSMD8	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 8	5714	P	P	1,0
DNFPQSL	?	CACNA1C	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit	775	A	A	1,0
EAFPLRVID	?	MAN2A2	mannosidase, alpha, class 2A, member 2	4122	P	P	1,0
ILENIQRNK	A*03	ERCC2	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency	2068	P	A	1,0

QLYWSHPRK	?	RPS29	ribosomal protein S29	6235	P	P	0,9
APRIITGPAPVL	B*07	QKI	homolog of mouse quaking QKI (KH domain RNA binding protein)	9444	P	P	0,9
VLF GKALNPK	A*03	ABCC3	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3	8714	P	P	0,9
LESLDQLEL	B*40	BAG2	BCL2-associated athanogene 2	9532	P	P	0,9
VVYVGGILTIL	?	UGT8	UDP glycosyltransferase 8	7368	M	A	0,9
GELTGEVRM	?	FLNC	filamin C, gamma (actin binding protein 280)	2318	P	P	0,9
FAEGFVRAL	?	JUN	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)	3725	P	P	0,9
RVFSGLVSTGLK	?	EEF2	eukaryotic translation elongation factor 2	1938	P	P	0,9
SLAEILLKK	A*03	IPO8	importin 8	10526	P	P	0,8
RLFVGSIPK	A*03	HNRPR	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	10236	P	P	0,8
LVFPSEIVGK	A*03	RPS7	ribosomal protein S7	6201	P	P	0,8
IVALILSTK	A*03	ATP6V0C	ATPase, H+ transporting, lysosomal 16kDa, V0 subunit c	527	P	P	0,8
GLFEVGAGWIK	A*03	HSD17B4	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4	3295	P	P	0,8
GLYEFFRAK	A*03	CHERP	calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein	10523	P	P	0,8
RVFPWFVSK	A*03	MLL	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia	4297	P	P	0,8
KTYGEIFEK	?	NDUFC2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, subcomplex unknown	4718	P	P	0,8
HEDKIRVVL	B*40	EHD2	EH-domain containing 2	30846	A	A	0,8
SEDKKNIL	B*40	CFL1	cofilin 1 (non-muscle)	1072	P	P	0,8
SLFSRLFGK	A*03	ARF4	ADP-ribosylation factor 4	378	P	P	0,8
KVYNIQIRY	?	LCP2	lymphocyte cytosolic protein 2	3937	P	P	0,7
NEFPEPIKL	B*40	RAB7	RAB7, member RAS oncogene family	7879	A	A	0,7
GLTDVILYH	?	NSAP1	NS1-associated protein 1	10492	P	P	0,7
IPRAALLPLL	?	PRSS11	protease, serine, 11 (IGF binding)	5654	P	P	0,7

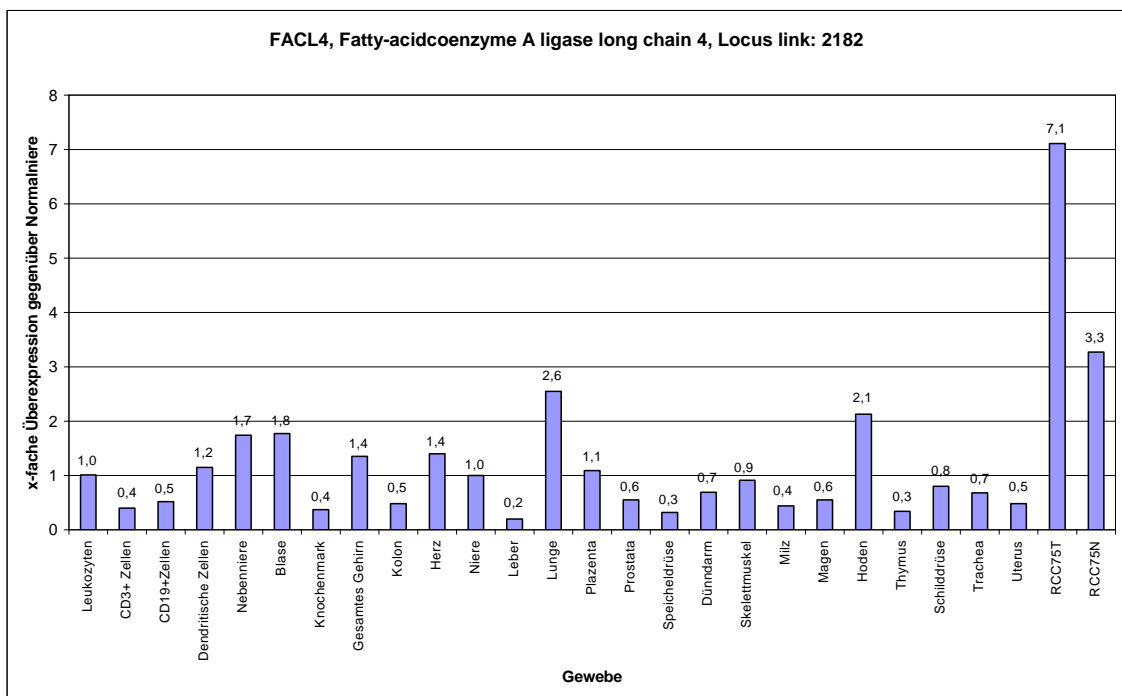
APARLFALL	B*07	SDC4	syndecan 4 (amphiglycan, ryudocan)	6385	P	P	0,7
SIFKQPVTK	?	MBD2	methyl-CpG binding domain protein 2	8932	A	P	0,7
KLFDKLELY	?	API5	apoptosis inhibitor 5	8539	A	A	0,7
TESGLNVTL	B*40	PCBP1	poly(rC) binding protein 1	5093	P	P	0,6
AVFPKPFVEK	A*03	KIAA0377	KIAA0377 gene product	9677	A	A	0,6
KESTLHVL	B*40	UBA52	ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1	7311	P	P	0,6
SLMHSFILK	A*03	DNCL2A	dynein, cytoplasmic, light polypeptide 2A	83658	P	P	0,6
SVYDSVLQK	A*03	SYNE1	spectrin repeat containing, nuclear envelope 1	23345	A	M	0,6
VMAPRTVLL	?	HLA-B	major histocompatibility complex, class I, B	3106	P	P	0,6
APRTVALTAL	B*07	HLA-DPB1	major histocompatibility complex, class II, DP beta 1	3115	P	P	0,5
IEVDGKQVEL	B*40	ARHA	ras homolog gene family, member A	387	P	P	0,5
KIADRFLLY	?	LMO4	LIM domain only 4	8543	A	P	0,4
KLLNYAPLEK	A*03	POLR2L	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide L, 7.6kDa	5441	A	A	0,4
AEIRHVLVTL	B*40	MYL6	myosin, light polypeptide 6, alkali	4637	P	P	0,3
YEELVRMVL	B*40	MYL6	myosin, light polypeptide 6, alkali	4637	P	P	0,3
FPNSPKWTSK	?	MMP7	matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)	4316	P	P	0,3
SLFPNSPKWTSK	?	MMP7	matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)	4316	P	P	0,3
APRPVLLL	B*07	ELN	elastin (supravalvular aortic stenosis, Williams-Beuren syndrome)	2006	A	A	0,1

**Tab. 12:** Aus RCC675 identifizierte Liganden mit Angabe der HLA-Restriktion und des Herkunftsproteins. T: Tumor. N: Normalniere. P: present. A: absent. ÜE: Überexpression gegenüber Normalniere. Massenspektrometrie durch Claudia Lemmel.

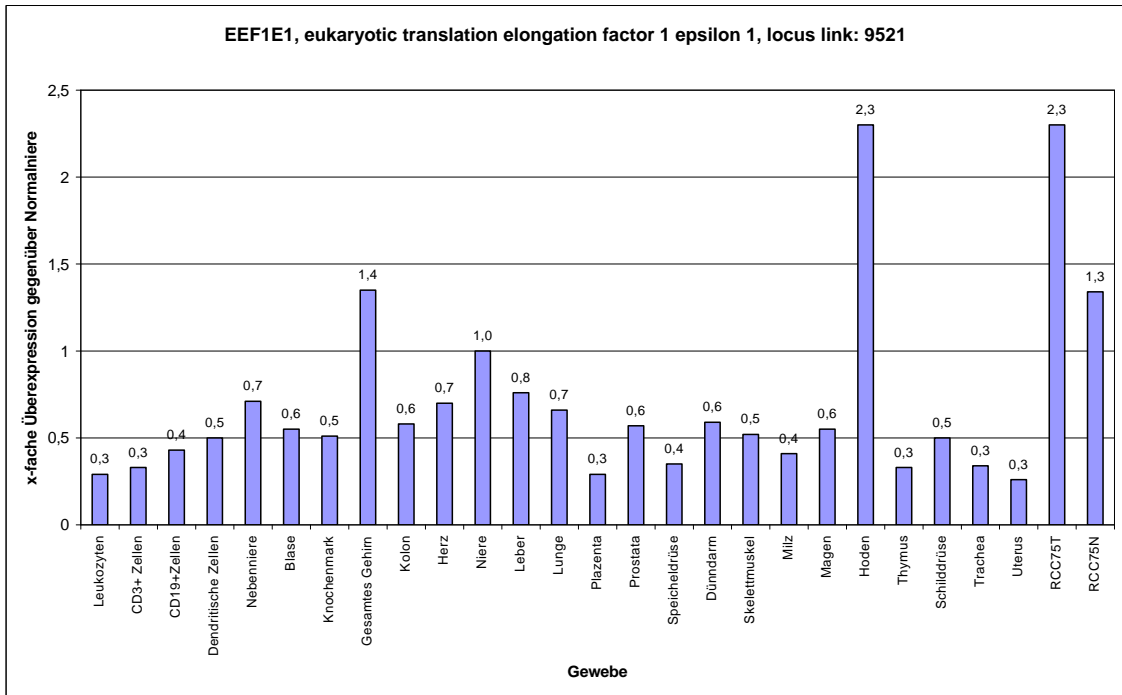
### 3.6.2. Liganden tumorassoziierter Proteine

Die HLA-Typisierung ergab für den Patienten RCC75 die Typen A\*03 homozygot, B\*07, B\*40. Wie schon bei RCC68 konnten bei diesem Tumor erneut zahlreiche Peptide identifiziert werden, von denen sich einige auch als tumorassoziiert herausstellten und in die Zusammenstellung für die Vakzinierung des Patienten aufgenommen wurden. Die vorausgehende Tabelle zeigt eine Auflistung der identifizierten Liganden aus RCC75, sortiert nach x-facher Überexpression gegenüber normalem Nierengewebe des Patienten.

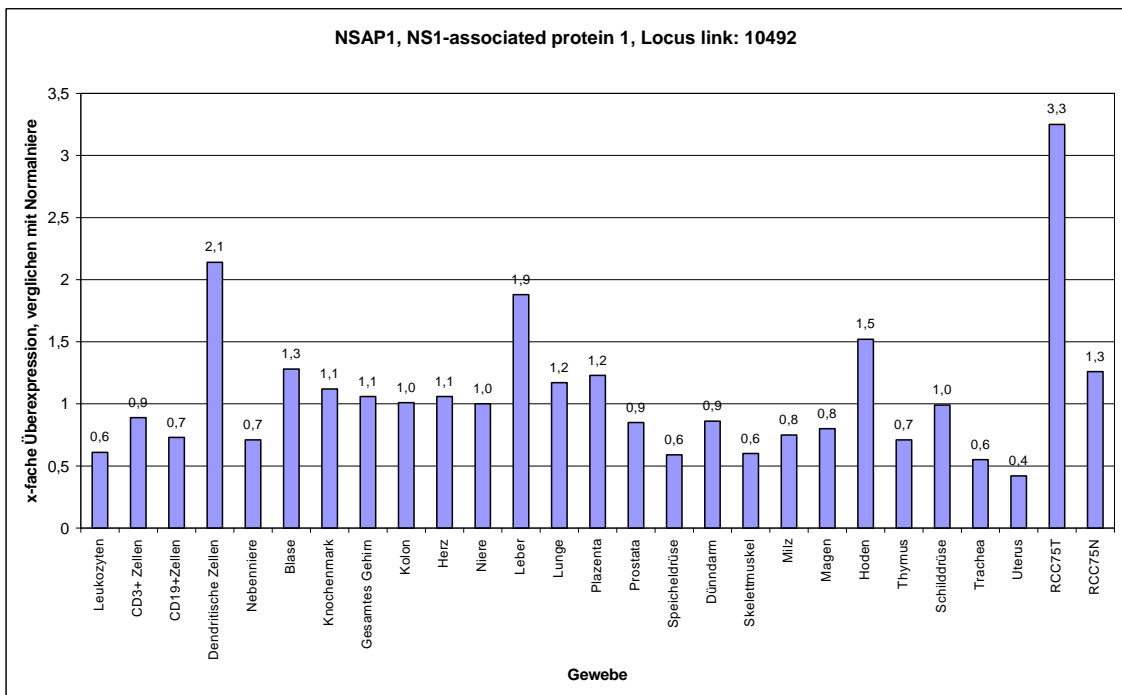
Als besonders überexprimiert fanden sich in diesem Tumor folgende Proteine, zu denen auch Peptide identifiziert wurden: Fatty-acid-coenzyme A ligase long chain 4 (FACL4), eucariotic translation elongation factor 1 epsilon 1 (EEF1E1) und NS1-associated protein (NSAP1). In folgenden Abbildungen sind die Expressionsprofile von FACL4, EEF1E1 und NSAP1 dargestellt.



**Abb. 12:** Expressionsprofil von FACL4 in RCC75 und in verschiedenen menschlichen Geweben, verglichen mit einem Standard von Normalniere. RCC75T bezeichnet die Expression im Tumor, RCC75N die im normalen Nierengewebe des Patienten. Expressionsprofil erstellt von Oliver Schoor.



**Abb. 13:** Expressionsprofil von EEF1E1 in RCC75 und in verschiedenen menschlichen Geweben, verglichen mit einem Standard von Normalniere. RCC75T bezeichnet die Expression im Tumor, RCC75N die im normalen Nierengewebe des Patienten. Expressionsprofil erstellt von Oliver Schoor.



**Abb. 14:** Expressionsprofil von NSAP1 in RCC75 und in verschiedenen menschlichen Geweben, verglichen mit einem Standard von Normalniere. RCC75T bezeichnet die Expression

im Tumor, RCC75N die im normalen Nierengewebe des Patienten. Expressionsprofil erstellt von Oliver Schoor.

## 4. Diskussion

### ***4.1. Immuntherapie und Standardtherapie spezieller Tumoren***

Spätestens seit vor 12 Jahren Boon et al. das erste T-Zell-Epitop eines Tumorantigens entdeckten [88], ist die Immunologie zu einem vielversprechenden, wenn auch noch nicht etablierten Bestandteil der Tumorforschung geworden. So ist seit langem bekannt, daß das Nierenzellkarzinom eine besondere Kompetenz zur Immunstimulation besitzt. Demzufolge ist bei diesem Tumor, der sich gegenüber gängigen Therapieformen wie Chemotherapie und Radiatio als unempfindlich erwiesen hat, die Immuntherapie am weitesten erforscht. Es existieren bereits zahlreiche Studien (in vitro und in vivo) über den Einfluß immunologischer Reaktionen auf Entstehung und Wachstum des Nierenzellkarzinoms. In vitro wird vor allem mit Zelllinien gearbeitet, die aus dem Tumor des Patienten gezogen wurden. Erste in vivo-Studien erfolgten am Mausmodell. Die meisten Studien zur Vakzinierung von Tumorpatienten erfolgten mit Tumorzellysaten oder durch Bestrahlung modifizierten Tumorzellen, die dem Patienten in Kombination mit Antigenpräsentierenden Zellen (in der Regel Dendritische Zellen) verabreicht wurden [64]. Zuvor wurde schon mit Immunstimulantien experimentiert [59]. Bei all diesen Arbeiten bleibt aber die Art oder gar der Aufbau des Antigens unbekannt. Im Unterschied dazu wird durch die massenspektrometrische Analyse der aus dem soliden Tumor isolierten Peptide eine genaue Identifizierung und damit auch eine synthetische Herstellung der Vakzinierungscocktails gewährleistet.

Zudem wurde bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patientenproben nicht nur ein Peptid, sondern eine individuelle Zusammenstellung an Peptiden erzielt. Diese richtet sich nach dem individuellen Expressionsmuster des Tumors im jeweiligen Patienten.

Das Glioblastoma multiforme ist ebenfalls ein Tumor mit schmalen Therapiespektrum. Die Bestrahlung bringt nur wenig Prognoseverbesserung und selbst mit dieser Therapie beträgt die Überlebenszeit nach



Diagnosestellung kaum mehr als ein Jahr [52;61]. Trotzdem existieren bisher deutlich weniger Arbeiten, die sich mit der Immuntherapie oder der Beschreibung von Tumorantigenen beim Glioblastom befassen. Eine Veröffentlichung zu Tumorantigenen aus nativem Tumorgewebe gab es bislang nicht. Welche Möglichkeiten in solchen Analysen stecken, zeigt eine Studie der University of California, welche den Effekt von Vakzinierungen mit Peptiden aus Zelllinien, die aus den Tumoren der Patienten gezogen wurden, untersuchte [98]. Bei dieser Studie konnte eine Verlängerung des Überlebens um durchschnittlich 198 Tage erzielt werden, was beinahe einer Verdopplung der Überlebenszeit entspricht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sollen hauptsächlich der besseren immunologischen Charakterisierung von malignen Tumoren des Menschen dienen. Dies bedeutet in erster Linie die Identifizierung und Beschreibung von Tumorantigenen oder tumorassoziierten Antigenen. Da dies, wie schon gezeigt, nicht nur auf Expressionsebene durchgeführt wurde sondern auch auf Peptidebene, eignet sich diese Methode auch hervorragend zur therapeutischen Anwendung. Nach patientenindividueller Diagnostik und Zusammenstellung passender Antigene, können die identifizierten Peptide synthetisch hergestellt und dem Patienten zur Vakzinierung verabreicht werden. Je mehr Antigene bei individuellen Analysen entdeckt und je mehr Liganden gleichzeitig identifiziert werden, desto mehr Überschneidungen ergeben sich in den Expressionsmustern der verschiedenen Patienten. Das bedeutet, daß sich der Aufwand mit steigender Fallzahl reduziert. Im Gegensatz zu den meisten vorangegangenen Arbeiten zur Beschreibung von Tumorantigenen wurden bei dieser Arbeit keine Zellkulturen verwendet, um aus deren Lysat die Antigene zu gewinnen [41;98], sondern solide Tumoren, die als Ganzes lysiert wurden. Nachteil der Methode ist die Heterogenität des Tumorgewebes. Das heißt, es läßt sich nicht ausschließen, daß Artefakte durch Nicht-Tumorgewebe, wie Endothelien, Inflammatorische Zellen und Bindegewebe zu falschen Ergebnissen führen. Dies fällt aber in der Regel durch die Art der Antigene auf. Sie müßten in den entsprechenden Kontrollgeweben ebenfalls überexprimiert sein. Zudem wurden bei der Erstellung der Expressionsprofile von stark

heterogenen Geweben wie Kolonschleimhaut mittels Laser Capture Micro Dissection kleinere Stücke reineren Gewebes gewonnen.

Diese Methode wurde von Oliver Schoor durchgeführt, spielt aber für die Daten, die in dieser Arbeit aufgeführt werden, keine Rolle.

## **4.2. Verarbeitete Tumorproben**

Zu Beginn von Kapitel 3 wird eine Tabelle gezeigt, die eine Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verarbeiteten Tumoren enthält. Erwartungsgemäß befindet sich die Mehrzahl der Patienten, von denen das Gewebe gewonnen wurde, schon im fortgeschrittenen Lebensalter. Die Tumoren sind Nierenzellkarzinome, die sich zumeist im Stadium T3 befinden, Kolorektale Tumoren und Glioblastome. Im Rahmen einer Kooperation wurde auch ein Plattenepithelkarzinom des Mundes bearbeitet, was aber zu keinen nennenswerten Ergebnissen führte.

### **4.2.1. Tumormasse**

In Kapitel 3.3. befindet sich eine Zusammenstellung der MHC-Ausbeute aus den verarbeiteten Geweben. Es sind auch einige Normalgewebe unter den aufgereinigten Proben zu finden. Diese wurden im Rahmen einer neuen Quantifizierungsmethode verarbeitet, die von Claudia Lemmel entwickelt wurde. Sie spielt für die Ergebnisse an Tumorantigenen dieser Arbeit aber keine Rolle. Das Limit der Tumormasse für diese Art der MHC-Peptid-Aufreinigung aus soliden Tumoren wurde bei 5 g nativem Tumorgewebe festgesetzt. Die meisten der verarbeiteten Tumorproben liegen aber deutlich über diesem Wert, da erfahrungsgemäß die MHC-Ausbeute mit steigender Masse des Tumors wächst. Ebenso maßgeblich für die MHC-Ausbeute ist die zugesetzte Antikörpermenge, die die MHC-Peptid-Komplexe aus dem Lysat an die Protein A-Säule binden soll. Die jeweils zugesetzte Antikörpermenge wurde ebenfalls in Tab. 7 angegeben. Dabei darf aber nicht vergessen werden, daß auch die Bindungseigenschaften des Antikörpers eine wesentliche Rolle bei dessen Funktionalität spielen. Diese variierten zum Teil erheblich und wurden durch

FACS-Analyse bestimmt. Dadurch wurde eine weitgehend gleichbleibende Qualität der Antikörper gewährleistet.

Die FACS-Analyse wurde von Claudia Falkenburger durchgeführt.

Es fällt auf, daß bei den verschiedenen hier verwendeten Methoden der Quantifizierung, der Sequenzierung nach Edman und dem Western Blot, erhebliche Unterschiede bezüglich der Größenordnung der Ergebnisse auftraten, obwohl dasselbe Probenmaterial verwendet wurde, was sich zum Teil auf die Sensitivität der Methoden zurückführen läßt. Letztendlich konnte aber keine Erklärung für dieses Phänomen gefunden werden. Man stellt jedoch fest, daß die Quantifizierung bei beiden Methoden ganz wesentlich von der Masse des Ausgangsgewebes abhängt. Konstantere Ergebnisse bringt, bei sicherem Umgang mit der Methode, die Quantifizierung mittels Western Blot. Diese ist zwar wesentlich zeitaufwendiger, aber nicht so anfällig für Störungen, welche bei der komplizierten Aparatur des Edman Sequenzers häufig auftraten.

#### **4.2.2. Lysatherstellung bei solidem Tumormaterial**

Zur Vorgehensweise bei der Herstellung des Tumorlysats, wie in Kapitel 2. und 3.4. dargestellt, läßt sich noch folgendes anmerken: Die Methode zur Gewinnung von MHC-Peptid-Komplexen wurde eigentlich für Zellpellets entwickelt. Um sie für die Aufreinigung von zusammenhängenden Zellverbänden mit entsprechenden Interzellulärsubstanzen, wie sie in menschlichen Geweben vorkommen, anwendbar zu machen, mußten einige Modifizierungen vorgenommen werden, die jedoch nicht alle Probleme beseitigen konnten. So war es trotz der Homogenisierung im Mixer nach wie vor schwierig, das Lysat mit dem Dounce-Homogenisator zu bearbeiten, da sich ständig Gewebeteile im Spalt verklebten. Dies führte dazu, die Dounce-Homogenisierung nicht durch die Anzahl der Stöße, sondern durch die Bearbeitungszeit des Gewebes zu determinieren. Daneben mußte die verwendete Filterzahl mit zunehmender Menge an vernetzenden Strukturen im Lysat erhöht werden, was zugleich einen Verlust an MHC bedeutete, da mit jedem neuen Filter eine Proteinabsorbierende Struktur entstand.

Ein Nachteil der Methode ergibt sich aus der nicht einwandfreien Homogenität des Gewebes. Es ist nicht auszuschließen, daß durch die Homogenisierung eines ganzen Tumors auch Bestandteile von Zellen identifiziert werden, welche keine maligne Entartung zeigen. Dies sind beispielsweise Endothelien, Fibroblasten und zahlreiche Inflammatorische Zellen. In der Tat ist hier eine Schwachstelle, die aber ohne großen Aufwand nicht zu beseitigen ist. Anzumerken wäre aber hierbei, daß im Fall der Isolierung eines Liganden aus Endothelzellen das entsprechende Gen auch im Referenzgewebe überexprimiert erscheinen müßte. Demnach würde es nicht als tumorspezifisch gewertet und käme bei einer Vakzinierung nicht zum Einsatz.

#### **4.2.3. HPLC-Chromatographie**

In Kapitel 3.4.5. ist das Chromatogramm eines HPLC-Laufs dargestellt. Nennenswerte Peptidmengen im Eluat stellen sich darin bei 240 nm als kleine sägezahnartige Strukturen in der Größenordnung von etwa 0,03 nm dar. Große Peaks im Chromatogramm, die teilweise über das Bildfenster hinausgehen, sind auf Artefakte und Verunreinigungen, z.B. durch das Detergenz CHAPS, zurückzuführen. Die meisten Peptide werden erfahrungsgemäß, wie auch in diesem Fall, nach Retentionszeiten zwischen 20 und 45 min von der Säule eluiert.

#### **4.2.4. Interpretation der MHC-Ausbeute**

Die Quantifizierung von MHC im Eluat mittels Western Blot ist eine einfache und mit relativ einfachen Mitteln durchführbare Methode der Quantifizierung, die gute Ergebnisse liefert, allerdings den Nachteil hat, daß sie sehr zeitaufwendig ist. Schwierig ist auch die Wahl der Konzentrationen der Eichreihe. Nur in einem schmalen Bereich zwischen 0 und 1 µg MHC-Monomer verläuft die Eichkurve linear. Das Eluat muß entsprechend seiner MHC-Menge verdünnt werden. Da aber eben diese MHC-Menge unbekannt ist und durch die Methode des Blottings ermittelt werden soll, muß man oft mehrere Blots durchführen, bis man die optimale Verdünnung der Probe erreicht hat. Einen Anhalt für die

MHC-Menge kann das Ergebnis der Sequenzierung nach Edman liefern. Zeigt sich hier ein sich vom Hintergrund deutlich abhebender Peak für Histidin (siehe Abschnitt 3.4.7.), kann von einer relativ hohen MHC-Menge im Eluat ausgegangen werden. Die Sequenzierung nach Edman ist, wie bereits erläutert, automatisiert und daher wenig zeitaufwendig. Da bei dem in Abschnitt 3.4.6. dargestellten Versuchsablauf eben dieser Fall eintrat, daß die detektierte MHC-Menge außerhalb des Eichbereichs lag und damit der Verdacht auf eine ungenaue Messung bestand, wurde der Versuch nochmals mit doppelter Verdünnung des Eluats wiederholt. Es ergab sich eine andere Konzentration an MHC im Gesamteluat als beim ersten Versuch. Das Ergebnis läßt sich damit erklären, daß sich die MHC-Menge der Proben diesmal im Bereich der Eichgeraden befand und damit genauer bestimmt werden konnte. Ein Verlust an MHC durch das mehrmalige Auftauen und Wiedereinfrieren läßt sich aber nicht nachweisen.

Die Ergebnisse der Proteinsequenzierung nach Edman waren gelegentlich vom Hintergrundsignal überlagert, weswegen sie nicht immer aussagekräftig waren. Gerätedefekte, die die Proben zerstörten, kamen ebenfalls vor.

Ziel der Arbeit ist jedoch nicht die Quantifizierung der MHC-Ausbeute sondern die Identifizierung und Beschreibung von Tumorantigenen in den Patientenproben. Im Folgenden sollen nun die in den Tumoren NCh361, RCC68 und RCC75 identifizierten Antigene näher bearbeitet werden.

### ***4.3. Diskussion der Ergebnisse einzelner Tumoren***

#### **4.3.1. NCh361:**

Wie schon in Kapitel 3.4.9. erläutert, ist Sec61 gamma Teil eines membranständigen Zellproteins, welches an der Protein-Translokation ins Endoplasmatische Retikulum beteiligt ist. Interessanterweise scheint es auch am Abbau defekter MHC Klasse I-Ketten beteiligt zu sein. Hierbei sorgt es für deren Ausschleusung aus dem Endoplasmatischen Retikulum ins Zytosol, wo sie von Proteasomen abgebaut werden [3]. Das Peptid weist sich durch das

Histidin in Position 2 als Ligand von HLA B\*38 aus. Hinweise auf eine Tumorassoziation ergeben sich daraus aber nicht.

Die in Kapitel 3.4.9. dargestellten Daten zum Peptid IHIPINNII aus dem Protein Sec61 gamma zeigen aber deutlich die Überexpression des entsprechenden Genabschnitts, der für das Protein codiert, im Tumor im Vergleich zum Normalhirn. Beinahe 15-fach ist die Expression in der Tumorzelle verstärkt, während sie in allen gesunden Körpergeweben nahezu unverändert gegenüber Normalhirn vorliegt. Männlicher Hoden ist mit knapp 1,7-facher Überexpression nach dem Tumor das Gewebe mit der 2.-stärksten Überexpression. Allein aus diesen Daten zeigt sich, daß Sec61 gamma ein überaus vielversprechender Kandidat für ein tumorassoziiertes Antigen ist. Interessant ist in dieser Hinsicht, daß auch im zweiten im Rahmen dieser Arbeit analysierten Glioblastom (NCh359) eine deutliche Überexpression von Sec61 gamma zu finden ist. Daß zum entsprechenden Gen, das nach den Expressionsdaten ja durchaus als tumorassoziiert bezeichnet werden kann, auch ein auf MHC Klasse I präsentiertes Peptid aus dem Protein Sec61 gamma im Tumor vorhanden war und massenspektrometrisch identifiziert werden konnte, zeigt, daß das Gen nicht nur auf DNA- und RNA-Ebene sondern auch auf Proteinebene in der Zelle präsent ist. Als Bestandteil eines Impfcocktails für eine Immuntherapie des Patienten wäre das identifizierte Peptid also vielversprechend im Sinne der Induktion einer Immunantwort.

Sec61 wird bereits 2001 im Zusammenhang mit Prostatakarzinom als tumorassoziiert genannt [14]. Das Tumormaterial wurde aus Prostataresektaten, welche im Rahmen einer Radikalen Prostatektomie oder einer Transurethralen Prostataresektion stattfanden, gewonnen. Weitere Publikationen zu einer Tumorassoziation dieses Proteins sind nicht bekannt.

Das zweite in Kapitel 3.4.9. genannte Protein ist PTPRZ1. Dieses Protein ist eindeutig assoziiert mit Zellen des Zentralnervensystems. Ist es doch im Tumor gegenüber allen Geweben außer Normalhirn mit dem Faktor 100 deutlich überexprimiert. Gegenüber normalem Gehirn zeigt sich immer noch eine vierfache Überexpression, die aber verglichen mit der anderen Geweben nicht erwähnenswert erscheint. Trotzdem könnte es sich bei dem identifizierten

Peptid um ein interessantes Impfpeptid handeln, da bekanntermaßen das Gehirn durch die Blut-Hirn-Schranke als immunprivilegiert gilt. Gesundes Nervengewebe sollte also durch eventuell stimulierte Zellen des Immunsystems nicht angegriffen werden, während dem Tumor, in dem die Blut-Hirn-Schranke ja defekt ist, diesen Schutz fehlt. Publikationen zu PTPRZ1 im Sinne einer Tumorassoziation liegen zu diesem Zeitpunkt noch nicht vor.

Weniger dramatisch, aber immer noch signifikant, zeigt sich die Überexpression des Genabschnitts, welcher für den Transkriptionsfaktor 12 codiert und zu dem der HLA B\*38 restringierte Ligand RLDDAIHVL identifiziert wurde. Diese Konstellation, bei der sich im Tumorgewebe nur eine leichte Überexpression im Vergleich zu normalen Körpergeweben zeigt, findet man deutlich häufiger als solche, wie sie oben dargestellt wurden. TCF12 scheint unter anderem an der Entwicklung des Zentralen Nervensystems beteiligt zu sein, was seine verstärkte Expression in einem Tumor dieses Organs erklären könnte [86]. Andere Publikationen bezüglich einer Tumorassoziation sind ebenfalls nicht bekannt.

Das identifizierte Peptid aus PBEF ist nach unseren Daten ein Beispiel für ein im Sinne der Vakzinierung völlig ungeeignetes Peptid. Das Protein PBEF erscheint zwar im Tumor gegenüber Normalhirn deutlich überexprimiert. Es kommt aber auch in Zellen des lymphatischen Systems und des Knochenmarks, sowie in Leber und Lunge in großer Menge vor. Dies würde bei einer Vakzinierung entweder zu einer massiven Autoimmunreaktion führen, oder, was wahrscheinlicher ist, das Peptid würde aufgrund einer Toleranzreaktion des Immunsystems überhaupt keinen Effekt haben.

PBEF wurde bereits 1999 als mit Kolorektalem Karzinom assoziiert genannt [43]. Der Nachweis wurde mittels Northern Blot geführt. Allerdings beschreibt Hufton nicht das Problem der Expression in anderen Geweben. Auch van Beijnum beschreibt die Assoziation mit Kolorektalem Karzinom [90]. Es handelt sich hierbei jedoch um eine Publikation desselben Institutes.

Für das Glioblastoma multiforme wurden bisher nur wenige Tumorantigene beschrieben, für solide Tumoren bisher gar nicht. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen aber, daß darin durchaus Potential für Immuntherapeutische Ansätze

liegt. Da für das Glioblastoma multiforme außer der Operation kaum eine zufriedenstellende Therapie existiert, die den Patienten eine echte, lohnende Lebensverlängerung bietet, könnte dies umso mehr Anreiz zu weiteren Untersuchungen sein.

#### **4.3.2. RCC68**

Bei Patient RCC68 handelt es sich um den ersten Patienten, der im Rahmen der Studie, an der diese Arbeit teilhat, für eine Vakzinierung in Frage kam. Aufgrund der Größe des Tumors und schon deutlicher Metastasierung bei gleichzeitig noch gutem Allgemeinzustand waren die wesentlichen Kriterien für einen Impfzyklus erfüllt. Wie schon in Kapitel 3.5.2. erläutert, wurden bei diesem Tumor zwar zahlreiche Liganden identifiziert, interessant im Sinne einer Tumorassoziation oder gar –spezifität war jedoch keiner. Sämtliche im Tumor überexprimierte Gene, zu denen Liganden gefunden wurden, waren auch in anderen Geweben in nicht zu vernachlässigender Menge exprimiert. Damit war eine weitgehende Tumorspezifität nicht gegeben. Der Patient erhielt also einen Cocktail aus bekannten Tumorantigenen, die bei ihm überexprimiert waren, zu denen aber in diesem Tumor kein Ligand identifiziert wurde. Trotzdem soll hier kurz auf diese Tumorantigene eingegangen werden.

Zu ihnen gehört Met Protooncogene (MET), welches bereits in zahlreichen Publikationen als tumorassoziiert beschrieben wurde. Unter anderem wurde es in anderen Nierenzellkarzinomen als tumorassoziiert identifiziert [95]. Bei diesem Protein handelt es sich also um ein durchaus etabliertes Tumorantigen. Auch PRAME ist seit Jahren bekannt. In letzter Zeit erschienen vermehrt Publikationen zu seiner Rolle als Tumorantigen bei Leukämischen Erkrankungen [37].

Liganden von Adipophilin (ADFP) wurden ebenfalls von Weinschenk et al. in mehreren Nierenzellkarzinomen identifiziert. Dieses erwies sich im Vergleich zu anderen Geweben als deutlich überexprimiert im Tumor. Man kann deshalb davon ausgehen, daß dieses Protein auch mit anderen Tumoren assoziiert ist [95].



Der Patient RCC68 unterzog sich mehreren Zyklen einer Vakzinierung mit Dendritischen Zellen, die mit bekannten Peptiden aus den in Kapitel 3.5.2. genannten Proteinen beladen wurden. Aufgrund der fortschreitenden Verschlechterung seines Allgemeinzustandes mußte er die Therapie jedoch vorzeitig abbrechen. In vitro-Daten zur Stimulation von T-Zellen liegen noch nicht vor. Es stellt sich hier die Frage, ob Patienten im fortgeschrittenen Stadium der Tumorerkrankung die richtige Zielgruppe einer Immuntherapie darstellen. Tatsache ist, daß nur bei metastasiertem Primärtumor, welcher ja nach OP entfernt sein sollte, eine Kontrolle der Therapie möglich ist. Diese kann zum Beispiel durch in vitro-Versuche mit T-Zellen des Patienten vor und nach Therapiebeginn oder durch bildgebende Verfahren aus der Radiologie zur Darstellung der Metastasengröße erfolgen.

#### **4.3.3. RCC75:**

Wie schon in 3.6.2 dargestellt, besaß der Patient die HLA-Allele A\*03, B\*07 und B\*40. Da bei dieser Konstellation nicht auf bereits bekannte Liganden zurückgegriffen werden konnte, hing eine eventuelle Vakzinierung allein von den neu identifizierten Liganden ab. Unter den zahlreichen identifizierten Liganden des Tumors befanden sich dann auch, anders als bei RCC68, einige Peptide aus Proteinen, die man den gewonnenen Daten zufolge auch durchaus als tumorassoziiert bezeichnen kann.

Fatty-acid-coenzyme A ligase long chain 4 (FACL4) ist ein Enzym des Fettstoffwechsels und aktiviert langkettige Fettsäuren im Rahmen der Lipidsynthese und der  $\beta$ -Oxidation. Lokalisiert ist dieses Protein in der äußeren Mitochondrialmembran und in Peroxisomen. Defekte dieses Enzyms führen zu Störungen der geistigen Entwicklung im Kindesalter mit mentaler Retardierung sowie zu Dysformitäten des Gesichts [86]. In der Literatur ist FACL4 als Apoptose-Inhibitor beschrieben. Jüngere Untersuchungen zeigten, daß es sowohl in Zellen von Kolorektalen Karzinomen als auch in solchen von Hepatozellulären Karzinomen, verglichen mit normalem Gewebe der entsprechenden Organe, deutlich überexprimiert war. Sung wies dies 2003 für

das Hepatozelluläre Karzinom mittels immunhistochemischen Färbungen nach [85].

Cao zeigte bereits 2001 mittels RT-PCR, daß dies auch für das Adenokarzinom des Dickdarms zutrifft [18]. Beide postulieren für FACL4 eine entscheidende Rolle in der Karzinogenese der entsprechenden Tumoren sowie eine Möglichkeit zur Therapie an dieser Stelle.

In den Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit zeigte sich eine mäßige, aber signifikante Überexpression von FACL4 im Tumor RCC75 im Vergleich zu anderen Geweben des Patienten. Da allerdings nicht sichergestellt werden kann, daß Defekte von FACL4 nur in der Entwicklungsphase des ZNS zu Schäden führen, sollte die Indikation zum Einsatz des identifizierten Peptids aus FACL4 bei einer Vakzinierung nicht leichtfertig gestellt werden.

EEF1E1 ist ein Baustein der Protein-Synthese der Eukaryonten. Bisherige Publikationen im Zusammenhang mit Tumorgenese wurden nicht gefunden. Die Daten dieser Arbeit zeigen eine Überexpression des Proteins im Tumor, ebenso eine starke Expression im Hoden und Gehirn. Da beide Organe als immunprivilegiert zu betrachten sind, käme das Peptid aus diesem Protein für eine Vakzinierung in Betracht.

NSAP1 ist ein in verschiedensten Geweben vorkommendes Ribonukleoprotein, das eine Rolle bei der Prozessierung von m-RNA spielt. Eine Verbindung zu Tumorerkrankungen wurde bisher offenbar nicht entdeckt. Im Untersuchungsgut dieser Arbeit war NSAP1 im Tumor grenzwertig überexprimiert. Auch in Dendritischen Zellen und in der Leber war die Expression des Proteins stark. Zur Vakzinierung sind Peptide dieses Proteins demnach nur bedingt geeignet.

#### **4.4. *Schlußfolgerung***

Die Ergebnisse zu den in Kapitel 3 aufgeführten Tumoren zeigen, daß alle identifizierten Peptiden aus normalen gesunden Proteinen der Zelle stammen. Dies heißt jedoch nicht, daß sie aus therapeutischer Sicht uninteressant wären. Erst nach genauer Betrachtung des Expressionsmusters der entsprechenden

DNA-Sequenz in der Zelle zeigt sich eine eventuelle Tumorassoziation oder – spezifität. Hierbei läßt sich erkennen, daß nur wenige Peptide die Kriterien erfüllen, die eine Vakzinierung erfordert. Die meisten Peptide stammen entweder gar nicht aus überexprimierten Proteinen oder finden sich auch in anderen Geweben in nicht zu vernachlässigender Menge. Von einer Tumorassoziation kann in diesen Fällen nicht gesprochen werden. Es konnten aber bei der angewandten Methodik selbst aus virusinfizierten Zellen nur wenige virusspezifische Peptide identifiziert werden.

Trotzdem fanden sich bei drei von vier Patienten, die für eine Vakzinierung vorgesehen waren, tumorassoziierte Peptide, die die Voraussetzungen für eine Therapie erfüllten.

## 5. Zusammenfassung

Die große Anzahl an identifizierten Oberflächenantigenen zeigt, daß mit der angewandten Methodik durchaus eine verwertbare Menge an Peptiden aus soliden Tumoren gewonnen werden konnte. Die Tatsache, daß die Mehrzahl der Peptide aus normalen, nicht überexprimierten Genen der Zelle stammt, spiegelt, wie oben angesprochen, das natürliche Mengenverhältnis zwischen normalen Genen und tumorassoziierten oder tumorspezifischen Mutationen wieder, welches selbst in virusinfizierten Zellen ähnlich wäre. Durch den Vergleich der identifizierten Liganden mit der Expression ihrer Ursprungsgene auf RNA-Ebene konnten zuverlässige Aussagen über die Tumorspezifität der Proteine gemacht werden. Die dargestellten Schaubilder zur Expression der tumorassoziierten Proteine sollen das verdeutlichen. Auch die schon existierenden Arbeiten zu einer Tumorassoziation von hier identifizierten Antigenen stützten dies.

Aus drei bearbeiteten Tumoren wurden die interessanten Liganden, bzw. überexprimierten Gene diskutiert. Dabei wurde dargestellt, welche Merkmale Anhalt für eine Tumorassoziation geben, und, was Ausschlußkriterien für eine solche sind. So fanden sich für das Glioblastom NCh361 Liganden aus den Proteinen Sec61 gamma, PTPRZ1 und TCF12. Für RCC75, welches nicht HLA A\*02-positiv war, wurden Liganden aus FACL4, EEF1E1 und NSAP1 identifiziert. Im Tumor RCC68 wurden keine Peptide aus, im Sinne einer Tumorassoziation interessanten, Proteinen gefunden. Es wurden daher die bekannten überexprimierten Tumorantigene besprochen, für die schon früher Liganden identifiziert wurden. Diese waren MET, PRAME, CA9, MUC1, ADFP und CCND1. Alle diese Gene waren im Tumor, verglichen mit anderen Normalgeweben des Körpers, überexprimiert und wurden demnach für eine Vakzinierung vorgeschlagen.

Hier stellt sich die Frage, ob der Aufwand für eine, gemessen an der Fülle identifizierter Liganden, doch eher bescheidene Ausbeute an interessanten Peptiden nicht zu groß ist. Dieser Einwand hat sicher seine Berechtigung. Jedoch sollte bei ständiger Optimierung der Methoden und entsprechender

technischer Innovation, welche sich zum jetzigen Zeitpunkt schon absehen läßt, der Aufwand immer weiter reduziert werden. Zudem kann jeder Patient durchaus von der Analyse bei früheren Tumorpatienten profitieren. Zwar ist der Ansatz der patientenspezifischen Analyse und Therapie des individuellen Tumors ein zentrales Merkmal der Methodik dieser Arbeit, es zeigen sich aber zunehmend Übereinstimmungen unter den verschiedenen Tumoren (z.B. beim Adipophilin). Es ist anzunehmen, daß sich mit zunehmender Fallzahl die identifizierten Liganden mehr und mehr wiederholen. Ein bekannter T-Zell-Ligand erfordert dann nicht mehr eine komplette Peptid-Diagnostik, welche ja den Hauptaufwand darstellt. Hier reicht bereits eine Überexpression des entsprechenden Gens für eine Eignung als Impfpeptid.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Akira S und Takeda K (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **4**:499-511.
2. Albert ML, Sauter B und Bhardwaj N (1998) Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* **392**:86-89.
3. Albring J, Koopmann JO, Hammerling GJ und Momburg F (2004) Retrotranslocation of MHC class I heavy chain from the endoplasmic reticulum to the cytosol is dependent on ATP supply to the ER lumen. *Mol Immunol* **40**:733-741.
4. Angiolillo AL, Sgadari C, Taub DD, Liao F, Farber JM, Maheshwari S, Kleinman HK, Reaman GH und Tosato G (1995) Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J Exp Med* **182**:155-162.
5. Banchereau J und Steinman RM (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**:245-252.
6. Barnstable CJ, Bodmer WF, Brown G, Galfre G, Milstein C, Williams AF und Ziegler A (1978) Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis. *Cell* **14**:9-20.
7. Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim YM und Mendelsohn J (1998) Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res* **58**:2825-2831.

8. Berard F, Blanco P, Davoust J, Neidhart-Berard EM, Nouri-Shirazi M, Taquet N, Rimoldi D, Cerottini JC, Banchereau J und Palucka AK (2000) Cross-priming of naive CD8 T cells against melanoma antigens using dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells. *J Exp Med* **192**:1535-1544.
9. Bigner DD, Schold C, Bigner SH, Bullard DE und Wikstrand C (1981) How heterogeneous are gliomas? *Cancer Treat Rep* **65 Suppl 2**:45-49.
10. Biron CA, Sonnenfeld G und Welsh RM (1984) Interferon induces natural killer cell blastogenesis in vivo. *J Leukoc Biol* **35**:31-37.
11. Blattman JN und Greenberg PD (2004) Cancer immunotherapy: a treatment for the masses. *Science* **305**:200-205.
12. Bohle A und Brandau S (2003) Immune mechanisms in bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for superficial bladder cancer. *J Urol* **170**:964-969.
13. Brossart P, Wirths S, Stuhler G, Reichardt VL, Kanz L und Brugger W (2000) Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood* **96**:3102-3108.
14. Bull JH, Ellison G, Patel A, Muir G, Walker M, Underwood M, Khan F und Paskins L (2001) Identification of potential diagnostic markers of prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia using cDNA microarray. *Br J Cancer* **84**:1512-1519.
15. Burger PC (1983) Pathologic anatomy and CT correlations in the glioblastoma multiforme. *Appl Neurophysiol* **46**:180-187.
16. Burnet FM (1970) The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* **13**:1-27.

17. BURNET M (1957) Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications. *Br Med J* 841-847.
18. Cao Y, Dave KB, Doan TP und Prescott SM (2001) Fatty acid CoA ligase 4 is up-regulated in colon adenocarcinoma. *Cancer Res* **61**:8429-8434.
19. Chang CH, Horton J, Schoenfeld D, Salazer O, Perez-Tamayo R, Kramer S, Weinstein A, Nelson JS und Tsukada Y (1983) Comparison of postoperative radiotherapy and combined postoperative radiotherapy and chemotherapy in the multidisciplinary management of malignant gliomas. A joint Radiation Therapy Oncology Group and Eastern Cooperative Oncology Group study. *Cancer* **52**:997-1007.
20. Coley WB (1991) The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin Orthop Relat Res* 3-11.
21. Coughlin CM, Salhany KE, Gee MS, LaTemple DC, Kotenko S, Ma X, Gri G, Wysocka M, Kim JE, Liu L, Liao F, Farber JM, Pestka S, Trinchieri G und Lee WM (1998) Tumor cell responses to IFN $\gamma$  affect tumorigenicity and response to IL-12 therapy and antiangiogenesis. *Immunity* **9**:25-34.
22. Cox AL, Skipper J, Chen Y, Henderson RA, Darrow TL, Shabanowitz J, Engelhard VH, Hunt DF und Slingluff CL, Jr. (1994) Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science* **264**:716-719.
23. Davis MM und Bjorkman PJ (1988) T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* **334**:395-402.
24. De Plaen E, Lurquin C, Van Pel A, Mariame B, Szikora JP, Wolfel T, Sibille C, Chomez P und Boon T (1988) Immunogenic (tum-) variants of mouse



- tumor P815: cloning of the gene of tum- antigen P91A and identification of the tum- mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:2274-2278.
25. Dunn GP, Old LJ und Schreiber RD (2004) The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* **21**:137-148.
26. Egle A, Villunger A, Kos M, Bock G, Gruber J, Auer B und Greil R (1996) Modulation of Apo-1/Fas (CD95)-induced programmed cell death in myeloma cells by interferon-alpha 2. *Eur J Immunol* **26**:3119-3126.
27. Ehrlich P (1909) Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneesk* **5**:273-290.
28. Falk K, Rotzschke O, Deres K, Metzger J, Jung G und Rammensee HG (1991) Identification of naturally processed viral nonapeptides allows their quantification in infected cells and suggests an allele-specific T cell epitope forecast. *J Exp Med* **174**:425-434.
29. Falk K, Rotzschke O, Stevanovic S, Jung G und Rammensee HG (1991) Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* **351**:290-296.
30. Fremont DH, Matsumura M, Stura EA, Peterson PA und Wilson IA (1992) Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2Kb. *Science* **257**:919-927.
31. Gajewski TF, Fallarino F, Ashikari A und Sherman M (2001) Immunization of HLA-A2+ melanoma patients with MAGE-3 or MelanA peptide-pulsed autologous peripheral blood mononuclear cells plus recombinant human interleukin 12. *Clin Cancer Res* **7**:895s-901s.
32. Garboczi DN, Hung DT und Wiley DC (1992) HLA-A2-peptide complexes: refolding and crystallization of molecules expressed in *Escherichia coli*

and complexed with single antigenic peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:3429-3433.

33. Garcia KC, Degano M, Stanfield RL, Brunmark A, Jackson MR, Peterson PA, Teyton L und Wilson IA (1996) An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 A and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science* **274**:209-219.
34. Gelderman KA, Tomlinson S, Ross GD und Gorter A (2004) Complement function in mAb-mediated cancer immunotherapy. *Trends Immunol* **25**:158-164.
35. Gilles FH, Sobel EL, Tavare CJ, Leviton A und Hedley-Whyte ET (1995) Age-related changes in diagnoses, histological features, and survival in children with brain tumors: 1930-1979. The Childhood Brain Tumor Consortium. *Neurosurgery* **37**:1056-1068.
36. Green SB, Byar DP, Walker MD, Pistenmaa DA, Alexander E Jr, Batzdorf U, Brooks WH, Hunt WE, Mealey J, Jr., Odom GL, Paoletti P, Ransohoff J, Robertson JT, Selker RG, Shapiro WR, Smith KR, Jr., Wilson CB und Strike TA (1983) Comparisons of carmustine, procarbazine, and high-dose methylprednisolone as additions to surgery and radiotherapy for the treatment of malignant glioma. *Cancer Treat Rep* **67**:121-132.
37. Greiner J, Ringhoffer M, Taniguchi M, Li L, Schmitt A, Shiku H, Dohner H und Schmitt M (2004) mRNA expression of leukemia-associated antigens in patients with acute myeloid leukemia for the development of specific immunotherapies. *Int J Cancer* **108**:704-711.
38. Grosse-Hovest L, Muller S, Minoia R, Wolf E, Zakhartchenko V, Wenigerkind H, Lassnig C, Besenfelder U, Muller M, Lytton SD, Jung G und Brem G (2004) Cloned transgenic farm animals produce a bispecific

- antibody for T cell-mediated tumor cell killing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:6858-6863.
39. Hall WA und Fodstad O (1992) Immunotoxins and central nervous system neoplasia. *J Neurosurg* **76**:1-12.
40. Hock H, Dorsch M, Kunzendorf U, Uberla K, Qin Z, Diamantstein T und Blankenstein T (1993) Vaccinations with tumor cells genetically engineered to produce different cytokines: effectivity not superior to a classical adjuvant. *Cancer Res* **53**:714-716.
41. Holtl L, Zelle-Rieser C, Gander H, Papesh C, Ramoner R, Bartsch G, Rogatsch H, Barsoum AL, Coggin JH, Jr. und Thurnher M (2002) Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with tumor lysate-pulsed autologous dendritic cells. *Clin Cancer Res* **8**:3369-3376.
42. Howard JC (1995) Supply and transport of peptides presented by class I MHC molecules. *Curr Opin Immunol* **7**:69-76.
43. Hufton SE, Moerkerk PT, Brandwijk R, de Bruine AP, Arends JW und Hoogenboom HR (1999) A profile of differentially expressed genes in primary colorectal cancer using suppression subtractive hybridization. *FEBS Lett* **463**:77-82.
44. Huland H und Heinzer H (2001) *Urologie*, pp 184-198, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
45. Jager E, Jager D und Knuth A (2002) Clinical cancer vaccine trials. *Curr Opin Immunol* **14**:178-182.
46. Janeway CA, Jr. (1992) The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu Rev Immunol* **10**:645-674.

47. Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS und Winter G (1986) Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* **321**:522-525.
48. Kawakami Y, Robbins PF und Rosenberg SA (1996) Human melanoma antigens recognized by T lymphocytes. *Keio J Med* **45**:100-108.
49. Kreitman RJ, Wilson WH, White JD, Stetler-Stevenson M, Jaffe ES, Giardina S, Waldmann TA und Pastan I (2000) Phase I trial of recombinant immunotoxin anti-Tac(Fv)-PE38 (LMB-2) in patients with hematologic malignancies. *J Clin Oncol* **18**:1622-1636.
50. Krosnick JA, Mule JJ, McIntosh JK und Rosenberg SA (1989) Augmentation of antitumor efficacy by the combination of recombinant tumor necrosis factor and chemotherapeutic agents in vivo. *Cancer Res* **49**:3729-3733.
51. Lee P, Wang F, Kuniyoshi J, Rubio V, Stuges T, Groshen S, Gee C, Lau R, Jeffery G, Margolin K, Marty V und Weber J (2001) Effects of interleukin-12 on the immune response to a multipeptide vaccine for resected metastatic melanoma. *J Clin Oncol* **19**:3836-3847.
52. Levin VA, Silver P, Hannigan J, Wara WM, Gutin PH, Davis RL und Wilson CB (1990) Superiority of post-radiotherapy adjuvant chemotherapy with CCNU, procarbazine, and vincristine (PCV) over BCNU for anaplastic gliomas: NCOG 6G61 final report. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **18**:321-324.
53. Lewis JJ (2004) Therapeutic cancer vaccines: using unique antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101 Suppl 2**:14653-14656.
54. Madden DR (1995) The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu Rev Immunol* **13**:587-622.

55. Maloney DG, Liles TM, Czerwinski DK, Waldichuk C, Rosenberg J, Grillo-Lopez A und Levy R (1994) Phase I clinical trial using escalating single-dose infusion of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8) in patients with recurrent B-cell lymphoma. *Blood* **84**:2457-2466.
56. Martin S und Dyer PA (1993) The case for matching MHC genes in human organ transplantation. *Nat Genet* **5**:210-213.
57. Mayer RJ (2001) *Harrison's 15'th edition, Principles of internal medicine*, pp 578-588, McGraw-Hill Medical Publishing division,
58. Miller RA, Maloney DG, Warnke R und Levy R (1982) Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody. *N Engl J Med* **306**:517-522.
59. Montie JE, Bukowski RM, Deodhar SH, Hewlett JS, Stewart BH und Straffon RA (1977) Immunotherapy of disseminated renal cell carcinoma with transfer factor. *J Urol* **117**:553-556.
60. Myers RL, Whisler RL, Stephens RE, Sponseller CA, Livingston K, Spring PM und Yates AJ (1992) Sensitivity of human glioma and brain cells to natural killer cell lysis. Effects of serum concentration, epidermal growth factor, and time in culture. *J Neurosurg* **76**:986-990.
61. Nelson DF, Nelson JS, Davis DR, Chang CH, Griffin TW und Pajak TF (1985) Survival and prognosis of patients with astrocytoma with atypical or anaplastic features. *J Neurooncol* **3**:99-103.
62. Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G und Schadendorf D (1998) Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* **4**:328-332.

63. O'Rourke MG, Johnson M, Lanagan C, See J, Yang J, Bell JR, Slater GJ, Kerr BM, Crowe B, Purdie DM, Elliott SL, Ellem KA und Schmidt CW (2003) Durable complete clinical responses in a phase I/II trial using an autologous melanoma cell/dendritic cell vaccine. *Cancer Immunol Immunother* **52**:387-395.
64. Oosterwijk-Wakka JC, Tiemessen DM, Bleumer I, de Vries IJ, Jongmans W, Adema GJ, Debruyne FM, de Mulder PH, Oosterwijk E und Mulders PF (2002) 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* **25**:500-508.
65. Pardoll D (2003) Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol* **21**:807-839.
66. Pardoll DM (1993) Cancer vaccines. *Immunol Today* **14**:310-316.
67. Parham P und Bodmer WF (1978) Monoclonal antibody to a human histocompatibility alloantigen, HLA-A2. *Nature* **276**:397-399.
68. Parkhurst MR, DePan C, Riley JP, Rosenberg SA und Shu S (2003) Hybrids of dendritic cells and tumor cells generated by electrofusion simultaneously present immunodominant epitopes from multiple human tumor-associated antigens in the context of MHC class I and class II molecules. *J Immunol* **170**:5317-5325.
69. Qin Z, Schwartzkopff J, Pradera F, Kammertoens T, Seliger B, Pircher H und Blankenstein T (2003) A critical requirement of interferon gamma-mediated angiostasis for tumor rejection by CD8+ T cells. *Cancer Res* **63**:4095-4100.

70. Rammensee HG (1995) Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Curr Opin Immunol* **7**:85-96.
71. Rammensee HG, Weinschenk T, Gouttefangeas C und Stevanovic S (2002) Towards patient-specific tumor antigen selection for vaccination. *Immunol Rev* **188**:164-176.
72. Renkvist N, Castelli C, Robbins PF und Parmiani G (2001) A listing of human tumor antigens recognized by T cells. *Cancer Immunol Immunother* **50**:3-15.
73. Rosenberg SA (1998) New opportunities for the development of cancer immunotherapies. *Cancer J Sci Am* **4 Suppl 1**:S1-S4.
74. Roth W und Weller M (1999) Chemotherapy and immunotherapy of malignant glioma: molecular mechanisms and clinical perspectives. *Cell Mol Life Sci* **56**:481-506.
75. Rotzschke O, Falk K, Stevanovic S, Jung G, Walden P und Rammensee HG (1991) Exact prediction of a natural T cell epitope. *Eur J Immunol* **21**:2891-2894.
76. Samelson LE, Patel MD, Weissman AM, Harford JB und Klausner RD (1986) Antigen activation of murine T cells induces tyrosine phosphorylation of a polypeptide associated with the T cell antigen receptor. *Cell* **46**:1083-1090.
77. Santini SM, Lapenta C, Logozzi M, Parlato S, Spada M, Di Pucchio T und Belardelli F (2000) Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice. *J Exp Med* **191**:1777-1788.

78. Shapiro WR, Green SB, Burger PC, Mahaley MS, Jr., Selker RG, VanGilder JC, Robertson JT, Ransohoff J, Mealey J, Jr., Strike TA und . (1989) Randomized trial of three chemotherapy regimens and two radiotherapy regimens and two radiotherapy regimens in postoperative treatment of malignant glioma. Brain Tumor Cooperative Group Trial 8001. *J Neurosurg* **71**:1-9.
79. Shepherd JC, Schumacher TN, Ashton-Rickardt PG, Imaeda S, Ploegh HL, Janeway CA, Jr. und Tonegawa S (1993) TAP1-dependent peptide translocation in vitro is ATP dependent and peptide selective. *Cell* **74**:577-584.
80. Sidky YA und Borden EC (1987) Inhibition of angiogenesis by interferons: effects on tumor- and lymphocyte-induced vascular responses. *Cancer Res* **47**:5155-5161.
81. Smyth MJ, Taniguchi M und Street SE (2000) The anti-tumor activity of IL-12: mechanisms of innate immunity that are model and dose dependent. *J Immunol* **165**:2665-2670.
82. Steimle V, Siegrist CA, Mottet A, Lisowska-Grosj Pierre B und Mach B (1994) Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* **265**:106-109.
83. Stevanovic S (2002) Identification of tumour-associated T-cell epitopes for vaccine development. *Nat Rev Cancer* **2**:514-520.
84. Stevanovic S und Rammensee HG (1994) Identification of T-cell epitopes using allele-specific ligand motifs. *Behring Inst Mitt* 7-13.
85. Sung YK, Hwang SY, Park MK, Bae HI, Kim WH, Kim JC und Kim M (2003) Fatty acid-CoA ligase 4 is overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* **94**:421-424.



86. Swiss institute of bioinformatics. Swissprot. 2004.
87. Takeda K und Akira S (2005) Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* **17**:1-14.
88. Traversari C, van der Bruggen P, Luescher IF, Lurquin C, Chomez P, Van Pel A, De Plaen E, Amar-Costesec A und Boon T (1992) A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E. *J Exp Med* **176**:1453-1457.
89. Trowsdale J (1995) "Both man & bird & beast": comparative organization of MHC genes. *Immunogenetics* **41**:1-17.
90. Van Beijnum JR, Moerkerk PT, Gerbers AJ, de Bruine AP, Arends JW, Hoogenboom HR und Hufton SE (2002) Target validation for genomics using peptide-specific phage antibodies: a study of five gene products overexpressed in colorectal cancer. *Int J Cancer* **101**:118-127.
91. van Brussel JP und Mickisch GH (1998) Circumvention of multidrug resistance in genitourinary tumors. *Int J Urol* **5**:1-15.
92. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A und Boon T (1991) A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* **254**:1643-1647.
93. Waldmann TA (2003) Immunotherapy: past, present and future. *Nat Med* **9**:269-277.
94. Walker MD, Alexander E Jr, Hunt WE, MacCarty CS, Mahaley MS, Jr., Mealey J, Jr., Norrell HA, Owens G, Ransohoff J, Wilson CB, Gehan EA und Strike TA (1978) Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the

treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. *J Neurosurg* **49**:333-343.

95. Weinschenk T, Gouttefangeas C, Schirle M, Obermayr F, Walter S, Schoor O, Kurek R, Loeser W, Bichler KH, Wernet D, Stevanovic S und Rammensee HG (2002) Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. *Cancer Res* **62**:5818-5827.
96. Witzig TE, Gordon LI, Cabanillas F, Czuczman MS, Emmanouilides C, Joyce R, Pohlman BL, Bartlett NL, Wiseman GA, Padre N, Grillo-Lopez AJ, Multani P und White CA (2002) Randomized controlled trial of yttrium-90-labeled ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy versus rituximab immunotherapy for patients with relapsed or refractory low-grade, follicular, or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* **20**:2453-2463.
97. Yamasaki T, Kikuchi H, Yamashita J, Handa H, Kuwata S, Taguchi M, Namba Y und Hanaoka M (1988) Immunoregulatory effects of interleukin 2 and interferon on syngeneic murine malignant glioma-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Res* **48**:2981-2987.
98. Yu JS, Wheeler CJ, Zeltzer PM, Ying H, Finger DN, Lee PK, Yong WH, Incardona F, Thompson RC, Riedinger MS, Zhang W, Prins RM und Black KL (2001) Vaccination of malignant glioma patients with peptide-pulsed dendritic cells elicits systemic cytotoxicity and intracranial T-cell infiltration. *Cancer Res* **61**:842-847.

## 7. Publikationen

Krüger T, Schoor O, Lemmel C, Kraemer B, Reichle C, Dengjel J, Weinschenk T, Müller M, Hennenlotter J, Stenzl A, Rammensee HG und Stevanovic S (2005) Lessons to be learned from primary renal cell carcinomas: novel tumor antigens and HLA ligands for immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* **54**:826-836.

## 8. Danksagung

Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee gilt mein besonderer Dank für die Möglichkeit, an seinem Institut zu promovieren. In einer sehr angenehmen Arbeitsatmosphäre verstand er es stets, mich mit seiner großen fachlichen und menschlichen Kompetenz zu unterstützen.

PD Dr. Stefan Stevanovic danke ich für die hervorragende, lückenlose Betreuung, sowohl während meiner praktischen Tätigkeit in seinem Labor als auch danach. Er hatte immer ein offenes Ohr für alltägliche wie außergewöhnliche Probleme.

Bei Claudia Lemmel möchte ich mich für die massenspektrometrische Analyse der Tumoreluate bedanken, ebenso wie für die ständige Unterstützung während der gesamten Phase meiner praktischen Arbeit.

Oliver Schoor verdanke ich nicht nur hervorragende Daten zu Expressionsprofilen von Tumor- und Normalgeweben sondern auch die Hilfe bei zahlreichen Problemen des Laboralltags.

Toni Weinschenk und Jörn Dengjel danke ich für die Beantwortung vieler Fragen zu Themen der Immunologie und biochemischen Analytik.

Sylvia Herter danke ich für ihr immer offenes Ohr für Fragen zum Western Blot.

Steffen Walter danke ich vor allem für die freundliche Bereitstellung von MHC-Monomeren.

Bei Stefan Welte möchte ich mich für die Unterstützung bei Software-Problemen bedanken.

Patricia Hristic danke ich für ihre Hilfsbereitschaft im Labor und ihre immer gute Laune.

Claudia Falkenburger, Beate Pömmel und Franziska Löwenstein gebührt mein Dank für viele Tätigkeiten, die meine Arbeit im Labor erst ermöglichten.

Bei Lynne Yakes und Gerhard Hörr möchte ich mich vor allem für die Unterstützung in verwaltungstechnischen Dingen bedanken.

Valerie Bahr und dem Graduiertenkolleg „Zellbiologische Mechanismen Immunassoziierter Prozesse“ danke ich für interessante Veranstaltungen und Weiterbildungsmöglichkeiten sowie für die fachliche und finanzielle Unterstützung.

Für die Bereitstellung von Gewebeproben danke ich Prof. Dr. Arnulf Stenzl, Dr. Stefan Corvin und Jörg Hennenlotter (Universitätsklinik für Urologie, Tübingen), Prof. Dr. Horst Dieter Becker und Dr. Thomas Kratt (Universitätsklinik für Allgemeine Chirurgie, Tübingen) und Dr. Christel Herold-Mende (Universitätsklinik für Neurochirurgie, Heidelberg).

Dr. Viktor Maier danke ich für seine freundliche und spontane Hilfe bei der Gewinnung der Tumorproben.

Gisela Reiser, Timm Lichte und Alexander Stehle danke ich für konstruktive Kritik während der Entstehung dieser Arbeit.

Besonders möchte ich mich auch bei meinen Eltern Johannes Reichle und Gerda Reichle-Eiseler bedanken, die mir mein Studium erst ermöglichten.

## 9. Lebenslauf

Christian Johannes Reichle

02. März 1979

geboren in Stuttgart als erstes von drei Kindern

### **Schulischer Werdegang:**

September 1985 – Juli 1989

Grundschule Winkelwiese-Waldhäuser Ost in Tübingen

September 1989 – Juni 1998

Uhland-Gymnasium in Tübingen

September 1995 – Dezember 1995

Okanagan-Mission-Secondary School in Kelowna, BC, Kanada

Juni 1998

Abitur

### **Zivildienst:**

August 1998 – August 1999

Ausbildung zum Rettungssanitäter und Zivildienst beim Kreisverband Tübingen des Deutschen Roten Kreuzes im Bereich Rettungsdienst und Krankentransport

### **Universitärer Werdegang:**

Oktober 1999

Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen

04. September 2001

Ärztliche Vorprüfung

29. August 2002	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Seit Oktober 2002	Promotion am Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie bei Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee
29. März 2005	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
23. Mai 2006	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung