

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

**T-Zell-Antwort bei Nierenkrebspatienten
nach Peptid-basierter Immuntherapie**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Annemarie Dröge

aus

Stuttgart

2011

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. H.-G. Rammensee
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. F. Grünebach

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Immunologische Grundlagen	1
1.1.1 Angeborenes und adaptives Immunsystem	1
1.1.2 Lymphozyten	2
1.1.3 Entstehung und Selektion der T-Zellen	3
1.1.4 Antigenerkennung durch T-Zellen	4
1.1.5 CD4-T-Zellen	9
1.1.6 CD8-T-Zellen	12
1.2 Das Nierenzellkarzinom	14
1.2.1 Allgemeines	14
1.2.2 Klassische Therapieformen und neue Ansätze	17
1.3 Immuntherapie	18
1.3.1 Immuntherapie mit IL-2 und IFN-alpha	18
1.3.2 Adoptiver T-Zell-Transfer und Vakzinierung mit autologen Tumorzellen	19
1.3.3 Vakzinierung mit Peptiden	20
1.4 Fragestellung der Arbeit	24
2 Material und Methodik	25
2.1 Die UroRCC-Studie in Tübingen	25
2.1.1 Studiendesign	25
2.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien	25
2.1.3 Studienaufbau und Patientenzahl	26
2.1.4 Verwendete Peptide	28
2.1.5 Verwendete Adjuvantien	31
2.2 Laborgeräte	32
2.3 PBMC-Isolierung	33
2.3.1 Prinzip der PBMC-Isolierung	33
2.3.2 Materialien für die PBMC-Isolierung	34
2.3.3 Durchführung der PBMC-Isolierung	34
2.4 Präsensitivierung	35
2.4.1 Materialien für die Präsensitivierung	35

2.4.2	Ablauf der Präsensitivierung	36
2.5	Elispot	37
2.5.1	Das Prinzip des Elispot	37
2.5.2	Materialien für den Elispot	38
2.5.3	Beladen des Elispot	39
2.5.4	Entwickeln des Elispot	41
2.5.5	Protokollvergleich	42
2.5.6	Ex-vivo-Elispot	43
2.6	Durchflusszytometrie	43
2.6.1	Materialien für Tetramer- und intrazelluläre Färbungen	43
2.6.2	Vorarbeiten zur Herunterregulierung des T-Zellrezeptors.....	44
2.6.3	Prinzip der Tetramer-Färbung.....	45
2.6.4	Herstellung der Tetramere	46
2.6.5	Tetramer-Färbung.....	46
2.6.6	Intrazelluläre Zytokinfärbung.....	47
2.6.7	HLA-Expression der Tumorzellen	49
2.6.8	Versuche mit MZ1257	50
2.7	Statistik	50
3	Ergebnisse	51
3.1	Voruntersuchungen.....	51
3.1.1	Protokollvergleich	51
3.1.2	Receptor downregulation	52
3.2	RCC150	54
3.3	RCC197	59
3.4	RCC199	63
3.5	RCC218	68
3.6	RCC258	70
3.7	RCC285	76
3.8	RCC314	78
3.9	RCC340	81
3.10	RCC364	82
3.11	RCC369	86

3.12	Versuche mit der Tumorzelllinie MZ1257	88
3.12.1	Einführung	88
3.12.2	Charakterisierung der Tumorzelllinien (HLA und TAAs)	88
3.12.3	MZ1257 als Target für die CD4+ T-Zellen	89
3.13	Zusammenfassung der Ergebnisse	90
4	Diskussion	100
4.1	Fragestellung	100
4.2	Methodik	100
4.2.1	T-Zellmonitoring	100
4.2.2	PBMC-Isolierung, Einfrieren und Auftauen	101
4.2.3	Präsensitivierung	102
4.2.4	Elispot	103
4.2.5	Tetramer-Färbung	104
4.2.6	Intrazelluläre Färbung	106
4.3	Ergebnisse	106
4.3.1	Durch das Vakzinierungspeptid CCND1 induzierte HLA-Klasse-I- Antworten bei fünf Patienten	106
4.3.2	Weitere HLA-Klasse-I-Antworten	107
4.3.3	Keine T-Zellantworten nach Stimulation mit den übrigen HLA- A*02-Peptiden MUC1, ADFP1, APOL1, APOL2, KIAA0367 und ITGA3	107
4.3.4	Ergebnisse der mit vorhergesagten T-Zellepitopen vakzinieren HLA-A*02-negativen Patienten	108
4.3.5	Alle Patienten verfügen über CD8+ T-Zellen, die spezifisch für das Influenzapeptid sind und die in der Regel im Verlauf der Vakzinierungen ansteigen	109
4.3.6	Ergebnisse der Peptidvakzinierung bei Melanompatienten	109
4.3.7	Zahlreiche HLA-Klasse-II-Antworten auf CCND1, G250 und IBP3 nach Vakzinierung	111
4.3.8	Eine starke HLA-Klasse-II-Antwort auf das Peptid CCND1 lässt sich auch ex-vivo im Elispot nachweisen	112

4.3.9	Die CD4+ T-Zellen der Patienten sind in der Lage, Zellen der Tumorzelllinie MZ1257, die CCND1 exprimiert, zu erkennen und mit einer IFN γ -Produktion zu reagieren.....	112
4.3.10	Kein Patient zeigte eine Induktion MMP7 spezifischer CD4+ T-Zellen	113
4.3.11	Keine Reaktion auf mögliche in den HLA-Klasse-II-Peptiden eingebettete HLA-Klasse-I-Epitope	113
4.3.12	Peptide von G250 wurden schon mehrfach in Vakzinierungsstudien verwendet.....	114
4.3.13	Bedeutung der CD4+ T-Zellen in der Immuntherapie	116
4.3.14	Stärke und Verlauf der T-Zellantworten, weitere Zytokine (IL-5 und IL-10)	116
4.3.15	Adjuvantien	118
4.3.16	T-Zellantworten und klinischer Verlauf.....	119
4.3.17	Tumor-Escape-Mechanismen.....	119
4.3.18	Neue Ansätze in der Tumorstimmung: Kombination von Peptiden mit Chemotherapie, CpG, anti-CTLA-4-Antikörper oder TKI	123
4.3.19	Schlussfolgerung	125
5	Zusammenfassung	127
6	Abbildungsverzeichnis.....	128
7	Tabellenverzeichnis.....	130
8	Abkürzungsverzeichnis.....	131
9	Literaturverzeichnis.....	133
10	Danksagung	152
11	Lebenslauf	153

1 Einleitung

1.1 Immunologische Grundlagen

1.1.1 Angeborenes und adaptives Immunsystem

Der Mensch wird zu jedem Zeitpunkt seines Lebens mit einer Vielzahl von Pathogenen konfrontiert, die mit Hilfe des Immunsystems erkannt und unschädlich gemacht werden können. Im Verlauf der Evolution hat sich zu diesem Zweck ein vielgestaltiges, komplexes Immunsystem entwickelt, das sich zunächst in zwei große Einheiten unterteilen lässt: das angeborene und das adaptive Immunsystem. Diese funktionieren nach unterschiedlichen Prinzipien, weisen aber dennoch viele Überschneidungen auf und sind in der Regel beide an einer effektiven Immunantwort beteiligt. Eine weitere übliche Unterteilung spricht von einer humoralen und einer zellulären Immunantwort.

Das angeborene Immunsystem wird nach Eintritt eines Mikroorganismus in den Körper als erstes aktiv. Zu diesem evolutionär älteren Teil des Immunsystems gehören Makrophagen, Granulozyten, Dendritische Zellen (DCs), Mastzellen und Natürliche Killerzellen. Neben der ersten Bekämpfung von Mikroorganismen wirkt es gleichzeitig an der Initiierung der durch Lymphozyten vermittelten, adaptiven Immunantwort mit, die erst zeitlich verzögert nach einigen Tagen einsetzt. Sobald die Pathogene im Verlauf der weiteren Immunantwort erfolgreich unschädlich gemacht wurden, werden sie von Zellen des angeborenen Immunsystems beseitigt [1, 2].

Gelingt es einem Mikroorganismus, die epitheliale Barriere des Körpers zu durchdringen, wird er von Makrophagen aufgrund bestimmter Oberflächenstrukturen als fremd erkannt und phagozytiert. In diesem Prozess spielen die vor einigen Jahren in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckten Toll-like-Rezeptoren eine entscheidende Rolle [3, 4]. Der aktivierte Makrophage schüttet verschiedene Zytokine und Chemokine aus, die eine lokale Entzündungsreaktion auslösen und eine große Anzahl von Granulozyten und Monozyten anlocken [1].

Am Anfang der Immunreaktion kann aber auch die Aktivierung des Komplementsystems stehen, bei der eine Kaskade proteolytischer Reaktionen abläuft. Fragmente der beteiligten Plasmaproteine bedecken am Ende die Oberfläche von z.B. einem Bakterium und ermöglichen so die Erkennung und Phagozytose durch Makrophagen (Opsonisierung) [5, 6].

Für die Aktivierung der Lymphozyten sind Dendritische Zellen (DCs) verantwortlich, eine spezialisierte Population von Phagozyten, die in den meisten Geweben vorkommt. Die zunächst unreifen DCs nehmen die Pathogene auf und wandern in nun aktiviertem Zustand über Lymphgefäße in den nächstgelegenen lokalen Lymphknoten [7, 8]. In ihrer Funktion als Antigen-präsentierende Zellen aktivieren sie dort naive Lymphozyten. In der Folge proliferieren nur die für das jeweilige Antigen spezifischen B- und T-Zellen. Dieser Vorgang, an dessen Ende die Differenzierung in Effektorzellen steht, wird klonale Expansion genannt. Aus den B-Lymphoblasten entstehen Antikörper-produzierende Plasmazellen, aus den T-Lymphoblasten verschiedene Populationen, darunter vor allem zytotoxische CD8-T-Zellen und CD4-T-Helferzellen. Dieser Prozess der klonalen Expansion und Differenzierung dauert 4-5 Tage und erklärt, warum die adaptive Immunantwort erst zeitlich verzögert einsetzen kann. Die Lebensdauer der Effektorzellen ist begrenzt, da die meisten von ihnen nach Beseitigung der Pathogene in Apoptose gehen. Einige bleiben jedoch bestehen und bilden als „memory cells“ die Basis des immunologischen Gedächtnisses. Bei erneutem Kontakt mit dem Pathogen ermöglicht es eine schnellere und stärkere Abwehrreaktion und bietet dadurch einen gewissen Schutz vor Reinfektionen. Die von Edward Jenner vor mehr als 200 Jahren eingeführte Immunisierung mit dem Erreger der Kuhpocken und die nachfolgend entwickelten Vakzinierungen (aus dem Lateinischen, vacca=die Kuh) beruhen auf diesem Prinzip des immunologischen Gedächtnisses [9].

1.1.2 Lymphozyten

Bei den Lymphozyten werden B- und T-Zellen unterschieden. Auf die B-Zellen in ihrer Funktion als Antikörper-bildende Zellen und die dadurch vermittelte humorale Immunantwort soll hier nicht genauer eingegangen werden.

Die T-Zellpopulation setzt sich aus verschiedenen Untergruppen zusammen, die sich durch ihre Oberflächenrezeptoren (CD4 oder CD8), die produzierten Zytokine und vor allem ihre Funktion unterscheiden. Ihnen allen ist gemeinsam, dass sie Peptidfragmente, die ihnen von anderen Zellen präsentiert werden, erkennen und nur auf die zu ihrem T-Zellrezeptor passende Peptidsequenz (Epitop genannt) reagieren [8]. Für die Signalübertragung ist der assoziierte CD3-Komplex, der aus verschiedenen invariablen Ketten besteht, erforderlich. Darüber hinaus trägt ein Teil der T-Zellen NK1.1-Rezeptoren und wird als NK-T-Zellen bezeichnet. Sie differenzieren sich aus Vorläuferzellen im Thymus und können sowohl durch Glykosphingolipide von Säugetieren als auch durch Alpha-Glycuronylceramid aus der Zellwand gramnegativer Bakterien aktiviert werden. Sie reagieren mit einer massiven Ausschüttung von T_H1 - und T_H2 -Zytokinen und einer Induktion von CD40L. Synthetische NKT-Liganden kommen als Adjuvantien für Vakzinierungen in Betracht [10].

1.1.3 Entstehung und Selektion der T-Zellen

Die Vorläuferzellen der T-Zellen entstehen im Knochenmark und wandern in das Thymusgewebe ein, wo sie in eine Phase der intensiven Proliferation eintreten. Pro Tag entstehen etwa 5×10^7 neue Zellen, von denen allerdings nur zwischen 10^6 und 2×10^6 den Thymus als reife T-Zellen verlassen, während die restlichen 98% in Apoptose gehen [11-13].

In der frühen Phase ihrer Entwicklung im Thymus exprimieren die Thymozyten weder CD4 noch CD8 auf ihrer Oberfläche und werden deswegen als „Doppelnegative Thymozyten“ bezeichnet. Es fehlen auch noch der T-Zellrezeptor und CD3. Im nächsten Schritt entstehen „Doppelt-positive Thymozyten“, die CD3, CD4, CD8 und die α - und β -Ketten des T-Zellrezeptors auf ihrer Oberfläche tragen [14]. In dieser Phase findet die Somatische Rekombination statt:

Da jede T-Zelle nur ein Epitop spezifisch erkennt, ist eine große Anzahl an unterschiedlichen T-Zellen erforderlich, um ein möglichst breites Spektrum von Antigenen abzudecken. Diese Vielfalt entsteht nach einem ähnlichen Prinzip wie die Antikörperdiversität der B-Zellen. Der T-Zellrezeptor ist aus einer α - und einer β -Kette zusammengesetzt (bzw. einer γ - und einer δ -Kette), die ähnlich

wie Antikörper eine konstante und eine variable Region aufweisen. Auf genetischer Ebene hat man wie bei den B-Zellen V-, J- und D-Gensegmente identifiziert, die während der T-Zellentwicklung rearrangiert werden. Diese Segmente sind von so genannten „Recombination signal sequences“ (RSSs) flankiert, die so zusammen gebracht werden, dass der DNA-Strang einen Kreis bildet (looping-out). Nach erfolgreichem Rearrangement (auch produktives Rearrangement genannt) entstehen V-Gen-Exone, die die variable Region des T-Zellrezeptors kodieren. Die Sequenzen können die gleiche oder eine entgegengesetzte Transkriptionsrichtung in der DNA aufweisen und abhängig davon nach einem etwas unterschiedlichen Prinzip rekombiniert werden [10, 11].

Somatische Hypermutation, wie sie in B-Zellen vorkommt, findet in T-Zellen nicht statt [15].

Alle T-Zellen durchlaufen im Thymus einen Prozess der Selektion und erst wenn ihre Funktionalität überprüft und eine Eigenreaktivität ausgeschlossen ist, werden sie in die Peripherie entlassen. Ihr T-Zellrezeptor muss die vom Thymusepithel präsentierten Peptide erkennen, um Signale zu erhalten, die sie überleben lassen (positive Selektion). Die Bindung an diese präsentierten Peptide darf aber nicht zu stark sein, da die T-Zellen, wenn sie sehr stark aktiviert werden, Signale bekommen, die zur Apoptose führen (negative Selektion). Dadurch werden stark eigenreaktive T-Zellen noch vor ihrer Reifung aus dem Repertoire entfernt und eine immunologische Selbsttoleranz erzeugt [16].

Die nach der Selektion noch verbleibenden Thymozyten entwickeln sich zu reifen T-Zellen weiter. Sie verlieren dabei entweder den CD4- oder CD8-Rezeptor und werden so zu einfach-positiven CD4- oder CD8-T-Zellen [14].

1.1.4 Antigenerkennung durch T-Zellen

Zunächst sollen die zwei wichtigsten an der Antigenerkennung beteiligten Moleküle erklärt werden: der T-Zellrezeptor (TCR) auf der Oberfläche der T-Zellen und die von ihm erkannten MHC-Moleküle, die auf fast allen Körperzellen vorkommen. MHC-Moleküle sind polymorphe Membranglykoproteine, die in einem Cluster von Genen, der Major histocompatibility complex (MHC) genannt wird, kodiert sind. Sie wurden zuerst in Mäusen entdeckt [17]. Die beim Menschen

vorkommende Form wird Human leukocyte antigens (HLA) genannt. Ihnen kommt auch eine entscheidende Rolle bei der Organ- und Stammzelltransplantation zu.

Es gibt zwei verschiedene Typen von HLA-Molekülen. Die HLA-Moleküle der Klasse I binden im Endoplasmatischen Retikulum (ER) Peptidfragmente, die meistens von im Zytosol synthetisierten Proteinen durch Proteasen abgespalten werden und über ATP-abhängige TAP-Transporter ins ER und von dort weiter auf die Zelloberfläche gelangen. Dieser Vorgang wird Antigenprozessierung genannt. Die HLA-Klasse-I-Moleküle präsentieren sowohl zelleigene Peptide als auch von Viren stammende Antigene und sind in unterschiedlicher Dichte auf fast allen Körperzellen mit Ausnahme der Erythrozyten vorhanden.

HLA-Moleküle der Klasse II sind dagegen vor allem auf Antigen-präsentierenden Zellen wie Makrophagen und Dendritischen Zellen sowie auf B-Lymphozyten vorhanden, nicht aber auf sonstigen Gewebezellen [8]. Die Expression von HLA-Klasse I und II wird durch Zytokine wie z.B. $\text{IFN}\gamma$ verstärkt und kann in Zellen, die normalerweise kein HLA exprimieren, induziert werden [18, 19].

Das HLA-Klasse-I-Molekül setzt sich aus zwei Polypeptidketten zusammen. Die längere α -Kette ist im MHC-Genlocus kodiert, während die Gene für die kürzere, β_2 -Mikroglobulin genannte Kette auf einem anderen Chromosom liegen [8]. Es wurden drei verschiedene Gene für die humanen α -Ketten identifiziert und dementsprechend als HLA-A, -B und -C bezeichnet. Da sie in der Regel kodominant sind und jeder Mensch zwei Allele exprimiert, findet man normalerweise in jedem Individuum 6 verschiedene HLA-Klasse-I-Moleküle.

Die aus drei Domänen bestehende α -Kette verläuft durch die Membran, während β_2 -Mikroglobulin nicht-kovalent assoziiert ist, wie im linken Teil von Abbildung 1 gezeigt. Die beiden im oberen Teil des Moleküls gelegenen Domänen α_1 und α_2 bilden zusammen eine Furche, in die eine kurze Peptidsequenz eingebunden ist (Englisch: peptide-binding cleft). Das Peptid ist dabei ein integraler Bestandteil des Moleküls, welches ohne dieses gebundene Peptid instabil wäre.

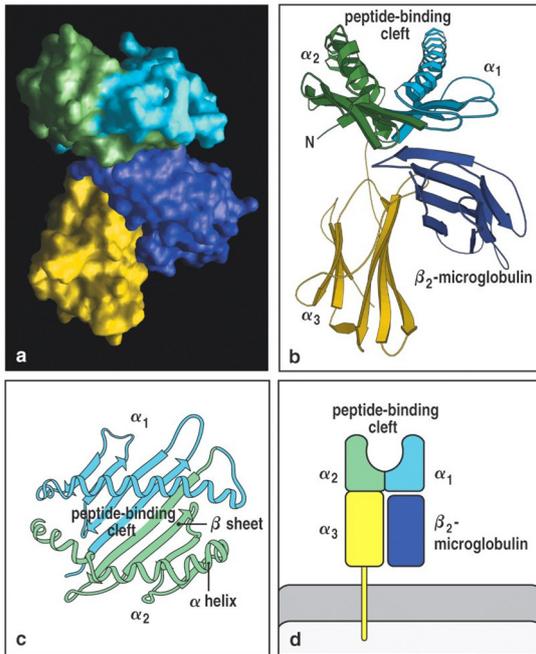


Figure 3-20 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

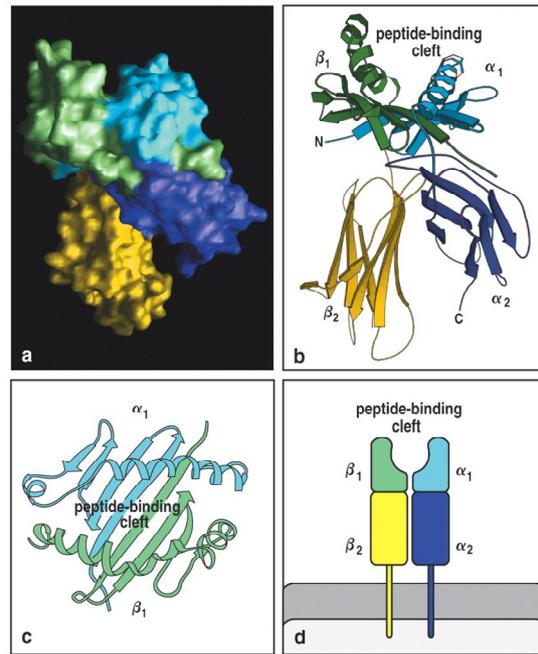


Figure 3-21 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Abbildung 1: Struktur der HLA-Moleküle (links HLA-Klasse I und rechts HLA-Klasse II), aufgeklärt durch Röntgenkristallographie, a) Moleküloberfläche mit den 4 farblich unterschiedenen Domänen, b) Ribbon diagram c) Ribbon diagram von oben betrachtet, d) schematische Darstellung. © 2005 Immunobiology 6E by Janeway et al. Reproduced by permission of Garland Science/Taylor and Francis LLC. [13]

An HLA-Klasse I werden Peptidsequenzen mit einer Länge von 8-10 Aminosäuren gebunden. Die Bindung erfolgt hauptsächlich über die freien Amino- und Carboxylgruppen an den beiden Enden des Peptids. Dieser nicht allelspezifische Anteil der Bindung wird durch Aminosäure-Seitenketten („Anker“, die in polymorphen Bindungstaschen des HLA-Moleküls befestigt sind, ergänzt. Die Hauptanker befinden sich meistens in Position P2 und P9 der Peptidsequenz [20-25].

Durch Edman-Degradation des Peptid-Pools einer bestimmten allelischen Variante und massenspektrometrische Sequenzanalysen eluierter Peptide können Sequenzübereinstimmungen in bestimmten Positionen der Peptide bestimmt werden. Konservierte Aminosäurepositionen im Peptid werden als Anker bzw. als Hilfsanker definiert. Nur Peptide mit bestimmten Aminosäuren in den Ankerpositionen sind in der Lage, an das HLA-Molekül zu binden. Für jedes HLA-Allel können so Peptidmotive beschrieben werden. Diese Motive stellen die Summe aller allel-spezifischen Anforderungen für die Peptid:MHC-Bindung dar, bestehend aus Anzahl, Abstand und Spezifität der Anker sowie bestimmter Präferenzen.

zen für Aminosäuren an den übrigen Positionen. Die Datenbank www.syfpeithi.de ermöglicht Vorhersagen dieser Peptidmotive, basierend auf Sequenzanalysen eluierter HLA-Liganden [20, 25-27].

Auch das HLA-Klasse-II-Molekül weist diese Peptidbindungsfurche auf, hat aber einen etwas anderen Aufbau. Diese im rechten Teil von Abbildung 1 dargestellte Struktur besteht aus den Ketten α und β , die nicht-kovalent verbunden sind und beide die Membran durchspannen [8, 28]. Man unterscheidet aufgrund verschiedener α - und β -Ketten HLA-DR, HLA-DP und HLA-DQ. Im Gegensatz zur HLA-Klasse I können längere Peptide gebunden werden, die bei den natürlichen Liganden in der Regel aus 13-25 Aminosäuren bestehen [29, 30]. Die Peptid-Enden dienen nicht der Befestigung, sondern ragen aus der Bindungsfurche heraus. Stattdessen ist das Peptid in der Mitte über seine Peptid-Seitenketten in Bindungstaschen des HLA-Klasse-II-Moleküls befestigt. Zudem interagiert die Hauptkette des Peptids mit einer Reihe von konservierten Aminosäuren entlang der Bindungsfurche.

Es wurde beobachtet, dass einzelne Peptide die Fähigkeit haben, an verschiedene HLA-DR-Moleküle zu binden, was als Promiskuität bezeichnet wird [31, 32]. In den Peptidmotiven für HLA-Klasse II findet man sowohl diese promiskuen als auch Allel-spezifische Anker. Trotz der begrenzten Anzahl an HLA-Allelen in jedem Individuum kann so eine Vielzahl von Peptiden spezifisch gebunden und präsentiert werden [33]. Bei der Entwicklung von Peptidvakzinierungen versucht man folglich Sequenzen zu verwenden, die nicht nur an ein bestimmtes HLA-Allel sondern aufgrund ihrer Promiskuität an möglichst viele HLA-Moleküle stabil binden, um bei allen Individuen eine Immunantwort auszulösen [32].

Die Peptide stammen von Proteinen, die meistens aus dem Extrazellulärraum über Endozytose aufgenommen und in den Endosomen/ Lysosomen durch saure Proteasen gespalten worden sind. Ein Teil der präsentierten Peptide stammt von HLA-Klasse-I-Molekülen. In der Literatur sind darüber hinaus auch endogene, zytosolische oder nukleäre Proteine als Quelle der an das HLA-Klasse-II-Molekül gebundenen Peptide beschrieben [34, 35].

Der T-Zellrezeptor der α : β -T-Zellen setzt sich aus den extrazellulären variablen und konstanten Regionen der beiden Ketten α und β zusammen, die durch eine

Disulfidbrücke verbunden sind (vgl. Abbildung 2). Ein lipophiler Anteil der beiden Ketten bildet die Transmembrandomäne, an der noch ein kleiner zytoplasmatischer Rest hängt.

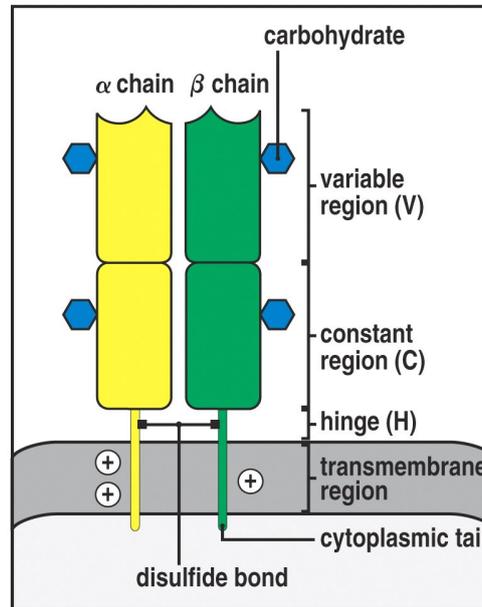


Figure 3-12 Immunobiology, 6/e. © Garland Science 2005)

Abbildung 2: Aufbau des α : β -T-Zellrezeptors ©2005 Immunobiology 6E by Janeway et al. Reproduced by permission of Garland Science/Taylor and Francis LLC. [13]

Der Komplex aus HLA-Klasse I und gebundener Peptidsequenz wird nur von T-Zellen erkannt, die neben dem T-Zellrezeptor CD8 als Korezeptor auf ihrer Oberfläche tragen. Für eine effiziente T-Zellantwort müssen sowohl der T-Zellrezeptor als auch der CD8-Rezeptor Kontakt zum HLA:Peptidkomplex haben. Analog den CD8-Zellen, die HLA-Klasse I binden können, werden die Klasse-II-Moleküle nur von T-Zellen erkannt, die den Korezeptor CD4 aufweisen. Die beiden Korezeptoren unterscheiden sich: Während CD8 ein Heterodimer aus einer α - und β -Kette (oder ein Homodimer aus zwei α -Ketten) ist, setzt sich CD4 aus den vier Domänen D1-D4 zusammen. Je zwei CD4-Moleküle können über ihre D4-Domäne Dimere bilden.

CD4 bindet an einen invariablen Anteil des HLA-Klasse-II-Moleküls, der äquivalent zu einem Anteil des Klasse-I-Moleküls ist, an den CD8 bindet.

Beide Rezeptoren interagieren mit der zytoplasmatischen Tyrosinkinase Lck und bewirken über sie eine ca. 100-fache Erhöhung der Sensitivität der T-Zellen für ein präsentiertes Antigen [36-39].

Damit eine T-Zelle aktiviert wird, ist es unbedingt erforderlich, dass sowohl der HLA-Typ als auch die Peptidsequenz passen. Diese Bedingung ist wichtig für das Verständnis der Antigenerkennung durch T-Zellen und wird als MHC-Restriktion bezeichnet [13].

1.1.5 CD4-T-Zellen

Die CD4-T-Zellen können nach Erkennung ihres spezifischen Antigens andere Immunzellen aktivieren, weswegen sie als „T-Helferzellen“ bezeichnet wurden. Naive CD4-Zellen können sich zu verschiedenen Effektorzellen entwickeln. Im Jahr 1986 wurden die zwei Untergruppen T_H1 und T_H2 identifiziert [40].

Die Entscheidung, in welche Untergruppe sich eine naive T-Zelle differenziert, hängt von den Signalen ab, die sie beim Erstkontakt mit ihrem Antigen in der Peripherie erhält [41]. Zwei Forschergruppen zeigten im Jahr 1990, dass IL-4 eine Differenzierung der naiven T-Zellen zu T_H2 -Zellen bewirkt [42, 43]. Da T_H2 -Zellen selbst IL-4 sezernieren, entsteht so ein positiver Feedback-Mechanismus. Das zweite wichtige Zytokin in der T_H2 -Entwicklung ist IL-2 (wie in Abbildung 3 gezeigt).

In der Folge hat man zahlreiche weitere Mediatoren gefunden. So ist für die Differenzierung zu T_H1 -Zellen unter anderem das Zusammenwirken von IL-12 und $IFN\gamma$ erforderlich. IL-12 induziert über den Transkriptionsfaktor T-bet die Sekretion von $IFN\gamma$, das wiederum selbst zu einer weiteren $IFN\gamma$ -Produktion führt, sodass auch hier von einem positiven Feedback auszugehen ist. Neben $IFN\gamma$ sezernieren T_H1 -Zellen Lymphotoxin α und IL-2 (vgl. Abbildung 3) [41, 44]. Die Untergruppe der T_H1 -Zellen ist hauptsächlich an der zellvermittelten Immunreaktion gegen intrazelluläre Erreger beteiligt und aktiviert zu diesem Zweck Makrophagen. Ein klassisches Beispiel ist die Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis*, aber auch mit den Protozoen *Leishmania* oder *Toxoplasma gondii* [44].

Die T_H2 -Zellen aktivieren B-Zellen, die daraufhin Antikörper produzieren. Dieser Mechanismus dient vor allem der Immunität gegen extrazelluläre Pathogene einschließlich der intestinalen Helminthen. Die von ihnen produzierten Zytokine sind IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-25 und Amphiregulin. IL-4 bewirkt dabei den

IgE-Switch der Antikörperklasse in B-Zellen. IL-5 wirkt an der Rekrutierung Eosinophiler Granulozyten mit. Das inhibitorische Zytokin IL-10 unterdrückt die Proliferation von T_H1 -Zellen sowie die Funktion Dendritischer Zellen [41]

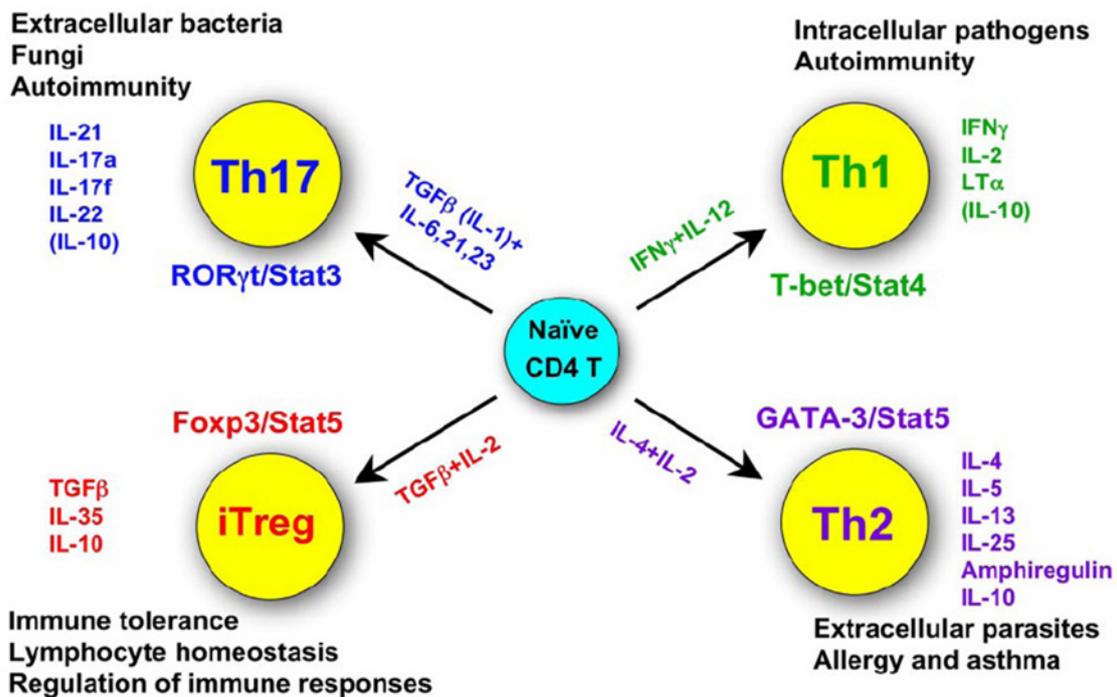


Abbildung 3: Übersicht über die verschiedenen Untergruppen der CD4-T-Zellen, mit den für ihre Differenzierung verantwortlichen Zytokinen, den charakteristischen Transkriptionsfaktoren, den von ihnen produzierten Zytokinen und einigen ihrer Funktionen (Quelle: Zhu 2008 [41])

Sowohl T_H1 - als auch T_H2 -Zellen können selbst Krankheiten auslösen, u.a. Autoimmunkrankheiten, Graft-versus-host-disease, Allergien etc.

Über fast drei Jahrzehnte galt das Paradigma, dass die CD4-Immunantwort entweder über die T_H1 - oder die T_H2 -Achse abläuft [45]. Vor nicht allzu langer Zeit wurde jedoch eine neue Untergruppe der T-Helferzellen entdeckt, die aufgrund ihrer Fähigkeit IL-17 zu sezernieren als T_H17 -Zellen bezeichnet wurde. Welche Faktoren bei ihrer Entwicklung eine Rolle spielen, ist noch nicht abschließend geklärt. Für ihre Differenzierung sind zunächst TGFβ und IL-6 erforderlich, während für das Stadium der Amplifikation und das der Stabilisierung eher IL-21 bzw. IL-23 von Bedeutung sind. Über IL-17 können sie inflammatorische Zytokine wie IL-6 und IL-8 induzieren und Neutrophile Granulozyten anlocken und aktivieren. Ihnen werden auch die Zytokine IL-21 und IL-22 zuge-

schrieben. T_H17 -Zellen sollen vor allem extrazelluläre Pathogene (Bakterien und Pilze) bekämpfen [41].

Eine bedeutende Rolle haben in den letzten Jahren die regulatorischen T-Zellen (Tregs) erlangt. Man unterscheidet induzierbare iTregs von der schon im Thymus entstandenen Population der natürlichen nTregs. Sie unterdrücken die T-Zellaktivität, limitieren somit die Immunantwort und verhindern überschießende Autoimmunreaktionen [46]. Im Jahr 1995 wurde gezeigt, dass Tregs CD25 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Nach dem Transfer von CD4-Zellen, bei denen die CD25+ Zellen entfernt worden waren, entwickelten von Geburt an athymische Mäuse Autoimmunkrankheiten im Gegensatz zu Mäusen, die intakte T-Zellpopulationen transferiert bekamen [47].

2001 wurde in Scurfy-Mäusen mit letalem Autoimmunsyndrom eine FoxP3-Mutation nachgewiesen [48]. Zwei Jahre später konnte gezeigt werden, dass es sich bei Foxp3 um einen Haupt-Transkriptionsfaktor für nTregs handelt [49]. Im selben Jahr wurde berichtet, dass TGF β naive CD4-T-Zellen in Foxp3-positive iTregs verwandeln kann [50]. Es ist nun bekannt, dass aktivierte naive CD4-T-Zellen in Abwesenheit von proinflammatorischen Zytokinen durch TGF β zu iTregs werden.

Tregs üben ihre immunsuppressive Wirkung nicht nur über die Zytokine TGF β , IL-10 und IL-35, sondern teilweise auch über direkte Zell-Zellkontakte aus. Die Mehrheit der Tregs exprimiert CD25 (IL-2R α). Auch aktivierte CD4-Zellen tragen CD25 auf ihrer Oberfläche, wenn auch nur transient und in nicht so starkem Ausmaß wie die Tregs. Ein Versuch Tregs zu identifizieren ist mit starker CD25-Expression bei gleichzeitiger Abwesenheit von CD127 (IL-7R α) beschrieben. Bei einer Untergruppe der Tregs wurde darüber hinaus CD103 (Alpha E Integrin) nachgewiesen. Die meisten in-vitro induzierten Tregs exprimieren CD103 [41, 51, 52].

Nicht nur T_H2 -Zellen und Tregs sind in der Lage, IL-10 zu produzieren, sondern unter bestimmten Umständen auch T_H1 - und T_H17 -Zellen. In ihrem Fall scheint IL-10 dazu zu dienen, ihre eigene Effektorfunktion zu limitieren [53, 54].

Ein wichtiges Merkmal der CD4-T-Zellen ist die in der Literatur als „cross-regulation“ bezeichnete gegenseitige Suppression von IL-4 und IFN γ bei der

Differenzierung zu T_H1 - und T_H2 -Zellen. Entsprechend unterdrücken IL-4 und $IFN\gamma$ die Entwicklung zu T_H17 -Zellen und TGF β die Differenzierung in T_H1 - und T_H2 -Zellen [41].

1.1.6 CD8-T-Zellen

Diese auch als zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) bezeichneten Lymphozyten tragen einen Rezeptor auf ihrer Oberfläche, der als CD8-Rezeptor bezeichnet wird.

Die naiven CD8⁺ T-Zellen verlassen den Thymus und zirkulieren in der Blutbahn und den Lymphorganen. In der Regel treffen naive T-Zellen in den Lymphorganen auf ihr spezifisches Antigen, welches ihnen dort von Dendritischen Zellen (DCs) präsentiert wird. Nach Kontakt mit ihrem passenden Antigen und gleichzeitiger CD28-Kostimulation beginnen sie zu proliferieren. Die Präsentation durch unreife DCs führt zu einer Toleranzentwicklung, wohingegen aktivierte DCs die Bildung von Effektor- und Gedächtniszellen bewirken [55]. Für die Differenzierung in Effektor- und Gedächtniszellen ist ein drittes Signal erforderlich, welches entweder durch IL-12 oder Typ-I-Interferone ($IFN\alpha$ oder $IFN\beta$) vermittelt werden kann [56]. Der Kontakt mit dem Antigen bei gleichzeitiger Einwirkung der Zytokine muss dabei eine gewisse Zeit andauern und darf nicht zu kurz sein. In Abwesenheit dieser Zytokine entwickeln sich die T-Zellen nicht zu Effektorzellen weiter und werden tolerant [57].

DCs bilden die erforderlichen Zytokine IL-12 oder IFN , wenn Produkte von Pathogenen (einschließlich Viren) an ihre Toll-like-Rezeptoren binden. Auch CD4⁺ T-Zellen können über Interaktion von CD40 und CD40-Ligand die Aktivierung von DCs und deren Produktion von IL-12 und Typ-I-Interferon hervorrufen [58]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch das von aktivierten CD4⁺ T-Zellen gebildete IL-21 die Differenzierung von naiven T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen bewirkt. Diese scheinen einen einzigartigen Phänotyp mit hocheffektiver zytolytischer Aktivität bei fehlender $IFN\gamma$ -Produktion aufzuweisen [59].

Selbst nachdem sich eine Population zytotoxischer T-Zellen herausgebildet hat, kann sich diese nicht weiter vermehren, wenn nicht zusätzlich IL-2 auf sie einwirkt. Ist IL-2 nicht vorhanden, verfallen die CTL in einen Status der Anergie.

Wenn sie aber die drei erforderlichen Signale (passendes Antigen, Kostimulation und IL-12/Typ-I-Interferon/IL-21) erhalten haben, beginnen sie autokrin IL-2 zu sezernieren und durchlaufen drei Tage lang täglich 7-8 Zellteilungen [57].

Wenn das Pathogen erfolgreich eliminiert werden konnte, nimmt die Anzahl der Effektorzellen ab. An der Entwicklung zu Gedächtnis-T-Zellen sind T_H1 -Zellen direkt oder indirekt beteiligt. Ihre Hilfe scheint jedoch nicht unbedingt erforderlich zu sein, da auch alternative Wege (abhängig von der Art des Stimulus) beschrieben wurden. Das immunologische Gedächtnis wird durch Persistenz und langsame Proliferation der Gedächtniszellen unter der Einwirkung von endogenem IL-7 und IL-15 aufrecht erhalten.

Anders als die naiven T-Zellen benötigen Gedächtniszellen keinen dritten Stimulus, um ihre Effektorfunktion zu entwickeln. Diese Tatsache erklärt zum Teil, warum sie bei einem erneuten Kontakt mit dem Antigen sofort reagieren können, ohne dass die im Rahmen der Entzündungsreaktion gebildeten Zytokine schon vorhanden sein müssen [57].

Im Verlauf ihrer Differenzierung verändern sich die Rezeptoren auf der Oberfläche der $CD8^+$ T-Zellen. Der Chemokinrezeptor CCR7 ist für die Rekrutierung von Lymphozyten und DCs von Bedeutung. Bei CD45RA handelt es sich um eine Isoform der Tyrosinphosphatase CD45, die die Signalübertragung über den Antigenrezeptor der T-Zellen verstärkt. Naive T-Zellen sind typischerweise $CCR7^+CD45RA^+$. Sie hatten noch keinen Kontakt zu ihrem Antigen und benötigen ein Priming durch Dendritische Zellen um überhaupt aktiviert zu werden. Die so genannten „Central memory T cells“ zeigen dagegen die Konstellation $CCR7^+CD45RA^-$ und können nach erneutem Kontakt mit ihrem Antigen direkt in das Entzündungsgebiet einwandern und dort proliferieren. Ihnen fehlt jedoch eine unmittelbare Effektorfunktion, wie sie die „peripheral memory T cells“ haben. Diese $CCR7^-CD45RA^-$ T-Zellen können sofort mit einer $IFN\gamma$ - oder IL-4-Sekretion reagieren. Eine vierte Untergruppe bilden die „terminally differentiated lytic effector T cells“. Sie sind $CCR7^-CD45RA^+$ und können ihre Zielzellen sehr effektiv lysieren, ohne dass ein weiterer Stimulus erforderlich wäre [60, 61].

Die zytotoxischen T-Zellen sind in der Lage, von einem Virus befallene Zellen zu zerstören. Von den Viren stammende und auf der Oberfläche der infizierten

Zellen präsentierte Antigene werden als fremd erkannt. In der Folge schütten sie verschiedene Zytokine, wie z.B. $\text{INF}\gamma$, aus und aktivieren dadurch weitere Immunzellen. Sie können ihre Zielzellen lysieren, indem sie Zytotoxine ausschütten, die in intrazellulären Granula gespeichert vorliegen. Die freigesetzten Proteine Perforin, Granzym und Granulysin führen zum Zelltod der Zielzellen.

Wahrscheinlich werden auch neu entstandene Tumorzellen von den CTLs bekämpft und so eine Tumorerkrankung bzw. deren Ausbreitung im Körper verhindert. Diese gegen einen Tumor gerichtete spontane T-Zellantwort konnte in Studien nachgewiesen werden.

In gemischten Lymphozyten/Tumorzell-Kulturen lysierten T-Zellen von Melanompatienten autologe Tumorzellen. Bei den sechs untersuchten Patienten lagen die Frequenzen der Antitumor-T-Zellen im Bereich von 3×10^{-5} bis 10^{-3} der CD8^+ T-Zellen [62].

In einer weiteren Studie wurden die Frequenzen von Antitumor-T-Zellen im Blut mit 2×10^{-3} bis 10^{-4} angegeben [63]. Neuere Arbeiten bestätigten diese Zahlen [64, 65]. Auf die einzelnen Antigene, gegen die sich die spontanen T-Zellantworten richten, wird im Kapitel 1.3.3 eingegangen.

1.2 Das Nierenzellkarzinom

1.2.1 Allgemeines

Das Nierenzellkarzinom (RCC) ist eine vergleichsweise seltene Krebserkrankung. Sein Anteil an der Gesamtzahl der Krebserkrankungen wird mit 2-3% angegeben [66]. Neuere Zahlen der Internationalen Agentur für Krebsforschung (IARC) bestätigen diesen Wert (3,4% bei Männern und 2,5% bei Frauen). Die im Saarland 1994-1997 erhobenen Daten ergaben eine Inzidenz von 11,4/100.000 bei Männern 6,2/100.000 bei Frauen (World age-standardized incidence rate) [67].

Eine besonders hohe Inzidenz findet man in Zentraleuropa und in der afroamerikanischen Bevölkerung der USA, während die Inzidenz in Asien und Afrika niedrig ist. Die Inzidenz und Mortalität sind im Verlauf der letzten 50 Jahre angestiegen [68]. Ein besonders starker Anstieg der Neuerkrankungsrate wurde in

Tschechien und in der afroamerikanischen Bevölkerung der USA verzeichnet. Dieser Trend ist wahrscheinlich nicht nur auf eine erhöhte Detektionsrate durch verbesserte Bildgebungsmethoden zurück zu führen, sondern stellt eine echte Zunahme der Diagnose neuer Fälle in allen Tumorstadien dar [69, 70].

Daten aus der National Cancer Database zeigen, dass 2003 in den USA 49% der RCCs im Tumorstadium 1, 10% im Stadium 2, 13% im Stadium 3 und 18% im Stadium 4 diagnostiziert wurden [71].

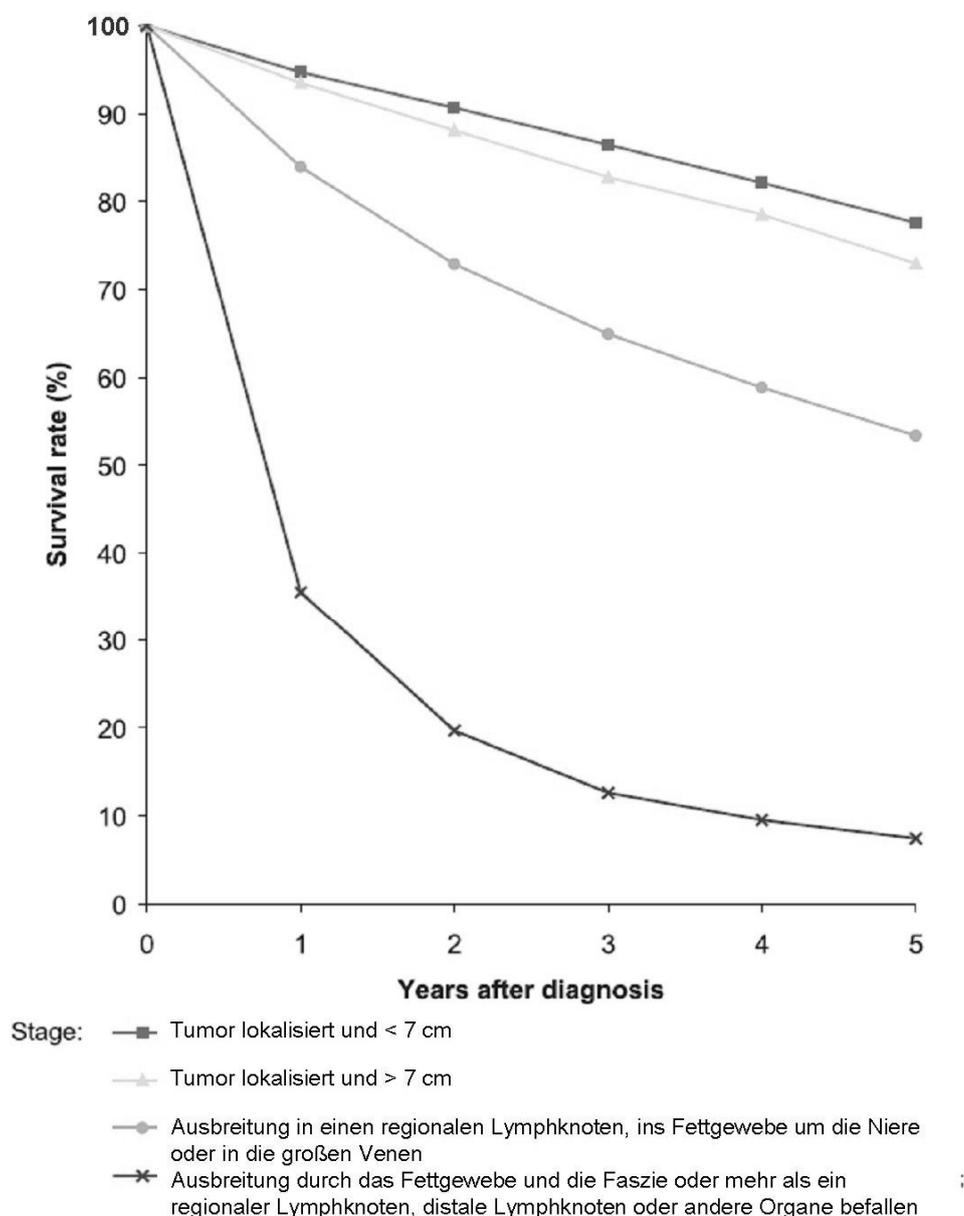


Abbildung 4: 5-Jahresüberleben von Patienten mit Nierenkrebs, diagnostiziert zwischen 1990 und 1994, Quelle: Eurocare-3-Studie [71, 72]

In der Eurocare-Studie wurden 47.000 Nierenkrebs-Patienten im Zeitraum 1990-1994 untersucht. Das bei diesen Patienten erreichte 5-Jahres-Überleben ist in Abbildung 4 gezeigt. Unabhängig vom Tumorstadium lag das Gesamtüberleben für Frauen bei 58% und für Männer bei 56%. In der Altersgruppe über 75 Jahren war das Überleben deutlich schlechter als in der Altersgruppe 15-44 (71% versus 45 %) [72].

Bekannte Risikofaktoren für die Entwicklung eines Nierenzellkarzinoms sind: Rauchen, Adipositas, Hypertonie und wahrscheinlich Diabetes Mellitus Typ 2 [73-76]. Die Auswirkungen von Ernährung und beruflicher Exposition mit polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen und organischen Lösungsmitteln werden noch diskutiert.

In Hinsicht auf die genetischen Ursachen wurden mehrere Gene identifiziert, die in der Karzinogenese eine Rolle spielen. Hervorzuheben ist das Von-Hippel-Lindau-Tumorsupressor-Gen, welches im Fall einer angeborenen Mutation Haemangioblastome der Retina und des ZNS, Phäochromozytome, Neuroendokrine Pankreas-Tumore, Endolymph-Sack-Tumore und Nierenzellkarzinome hervorruft. Auch die meisten sporadischen RCCs weisen eine Inaktivierung dieses Gens auf [77].

Für das Staging des Nierenzellkarzinoms wird in den USA am häufigsten die Klassifikation nach Robson und international die TNM-Klassifikation (Tumor, Node, Metastasis) eingesetzt. Generell gilt, dass ein höheres Tumorstadium, Lymphknotenbefall und Fernmetastasen mit einer schlechteren Prognose verbunden sind [78].

Eine histopathologische Subtypisierung anhand morphologischer und genetischer Kriterien wurde 1996 in Heidelberg festgelegt. Diese Heidelberger Klassifikation unterscheidet das konventionelle/klarzellige ($\approx 75\%$), papilläre ($\approx 10\%$), chromophobe ($\approx 5\%$), Sammelrohr- ($\approx 1\%$) sowie das unklassifizierte Nierenzellkarzinom (bis 5%). Jeder Subtyp stammt aus einer unterschiedlichen Region des Nierenepithels [79].

1.2.2 Klassische Therapieformen und neue Ansätze

Die Standardtherapie des lokal begrenzten Nierenzellkarzinoms ist eine partielle Nephrektomie oder, wenn diese nicht ausreicht, eine Nephrektomie der betroffenen Niere. Zusätzlich werden manchmal auch das umgebende Fettgewebe, die Nebenniere und die lokalen Lymphknoten entnommen. Eine adjuvante Behandlung wird bei diesen Patienten in der Regel nicht empfohlen.

Für die Behandlung des metastasierten RCC ist nach der chirurgischen Entfernung des Tumors (und eventuell der Metastasen) eine adjuvante Therapie notwendig. Bis 2006 wurde hierfür vor allem eine Immuntherapie mit IL-2 und IFN α angewendet (siehe Kapitel 1.3.1).

Das Nierenzellkarzinom ist in hohem Maß resistent gegen die verfügbaren Chemotherapeutika [80]. Bei Behandlung mit Fluorouracil (5-FU) zeigten z.B. nur 5-8% der Patienten eine partielle Antwort [81]. Bei Kombination von Capecitabin mit Gemcitabin wurde in einer anderen Studie bei 8 von 55 Patienten (15%) ein Ansprechen beobachtet. Die Nebenwirkungen waren dabei erheblich (Grad 3/4 Toxizität) [82].

In Nierenzellkarzinomen ist der Vascular endothelial growth factor (VEGF) überexprimiert. Da VEGF das für das Tumorwachstum notwendige Gefäßwachstum reguliert, wurden Studien mit dem VEGF-Antikörper Bevacizumab (Avastin) durchgeführt [83]. In einer klinischen Studie an 116 RCC-Patienten zeigte die Gruppe, die Bevacizumab in hoher Dosierung erhalten hatte, eine verlängerte Dauer bis zur Progression der Erkrankung verglichen mit einer Placebo-Gruppe. Eine objektive partielle Antwort wurde jedoch nur bei 4 von 39 mit Bevacizumab behandelten Patienten beobachtet [84].

Sehr vielversprechend erscheinen die Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) [83]. In einer multizentrischen Phase-III-Studie (TARGET-Studie) an insgesamt 905 RCC-Patienten war das progressionsfreie Überleben im Vergleich zu Placebo signifikant besser [85]. Auch Sunitinib verlängerte das progressionsfreie Überleben der Patienten signifikant. Aufgrund dieser Studienergebnisse wurden Sunitinib und Sorafenib 2005 in den USA und 2006 in Europa zur Behandlung des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms zugelassen. Die TKI werden in Kapitel 4.3.18 nochmal angesprochen.

1.3 Immuntherapie

1.3.1 Immuntherapie mit IL-2 und IFN-alpha

Da mit Chemotherapie keine überzeugenden Therapieerfolge erzielt wurden, begann man, nach neuen Behandlungsmöglichkeiten zu suchen. Genau wie das Melanom wird das Nierenzellkarzinom als immunogener Tumor angesehen. Die Bedeutung des Immunsystems wird unter anderem in Studien an nieren-transplantierten, immunsupprimierten Patienten deutlich, die vermehrt an einem RCC erkranken [86]. Zudem gab es Berichte über seltene Fälle von spontaner Metastasenregression. Die erste Sammlung von Fallberichten stammt von Everson und Cole aus dem Jahr 1966. In ihrer Monographie listeten sie 176 Fälle von spontaner Regression auf, von denen sich 31 auf RCC-Patienten bezogen, die somit die größte Gruppe der bis dahin bekannten Fälle spontaner Regression darstellten. Lokich fasste in seinem 1997 veröffentlichten Review 33 Publikationen zu diesem Thema, die seit 1969 veröffentlicht worden waren, zusammen. Die meisten von ihnen waren Fallberichte über spontane Rückbildung von Lungenmetastasen, aber auch von Leber-, Knochen- und Hirnmetastasen. Dabei trat die Regression oft nach Nephrektomie, zum Teil aber auch nach Bestrahlung, Embolisation oder Immuntherapie mit IL-2 auf, sodass kein Zusammenhang zur Vorbehandlung hergestellt werden konnte. Die Regression war nicht selten vollständig und dauerhaft. Eine genaue Inzidenz ist nicht bekannt, scheint aber in einem sehr niedrigen Bereich zu liegen. Die in der Literatur angegebenen Zahlen schwanken zwischen <1% und 7% [87].

Rosenberg et al. zeigten in 1985 und 1987 veröffentlichten Studien, dass nach Gabe von rekombinantem IL-2 die Tumoren von RCC-Patienten schrumpften [88, 89]. Noch bevor Ergebnisse aus randomisierten Studien vorlagen, wurde die Behandlung mit IL-2 und IFN α im Jahr 1990 in den meisten westlichen Ländern als Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms zugelassen [90].

Die Behandlung mit IL-2 allein hatte eine Ansprechrate (komplette und partielle Antworten) von ungefähr 15% [91] und nur mit IFN α von 6-10% [92, 93]. Die Kombination beider Zytokine scheint einen synergistischen Effekt zu haben. Dies geht unter anderem aus einer randomisierten, multizentrischen Studie an

425 Patienten hervor, in der die Ansprechraten in den drei Studienarmen rund 7%, 8% und 19% waren entsprechend der Behandlung mit IL-2, IFN α und der Kombination aus beiden. In Hinsicht auf das Gesamtüberleben fanden sich in dieser Studie jedoch keine signifikanten Unterschiede [90].

Im Jahr 1992 veröffentlichten Fossa et al. die Ergebnisse einer multizentrischen Phase III-Studie, in der zusätzlich zur Immuntherapie mit IFN α das Chemotherapeutikum Vinblastin eingesetzt wurde. Die Ansprechraten waren doppelt so hoch wie bei alleiniger Vinblastingabe [94]. Als Zweitlinientherapie führte diese Kombination jedoch bei nur 2 von 35 Patienten zu einer objektiven Antwort und bei 14 Patienten zur Tumorstabilisierung. Ein prognostischer Faktor war das Ansprechen auf eine Immuntherapie in der ersten Behandlung [95]. Eine bessere Ansprechraten mit 31% in einer großen dreiarmligen Studie an insgesamt 341 Patienten erreichten Atzpodien et al. [96]. Bis zur Zulassung der Tyrosinkinase-Inhibitoren war die Immuntherapie mit IL-2 und IFN α die Erstlinientherapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms.

1.3.2 Adoptiver T-Zell-Transfer und Vakzinierung mit autologen Tumorzellen

Die Beobachtung, dass bei Melanompatienten spontane T-Zellantworten gegen Tumor-assoziierte Antigene auftraten [97, 98] und diese mit einer besseren Prognose einher gingen [99, 100], führte zu einem neuen immuntherapeutischen Ansatz in der Krebstherapie. Es wird versucht, das körpereigene Immunsystem gezielt so zu beeinflussen, dass es sich wieder gegen die Tumorzellen richtet.

In zahlreichen Studien an Melanompatienten konnten Tumor-spezifische Vorläufer-T-Zellen nachgewiesen werden [63, 101, 102]. Tumor-spezifische zytotoxische T-Zellen waren nicht nur im peripheren Blut nachweisbar, sondern auch im Tumor und in Metastasen [103, 104].

Rosenberg et al. isolierten diese tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten (TILs), vermehrten sie in-vitro mit IL-2 und transfundierten sie wieder den Patienten. Bei einigen Patienten wurden damit objektive partielle Antworten erzielt [105]. In

in-vitro-Experimenten waren die vermehrten TILs in der Lage, frische Tumorzellpräparate zu lysieren [106].

In mehreren klinischen Studien wurde der Ansatz einer Vakzinierung mit bestrahlten Tumorzellen, Tumorzelllysaten oder aus Tumorzellen stammender kompletter RNA verfolgt. In einer multizentrischen Phase-III-Studie an 55 deutschen Kliniken erhielten zum Beispiel 276 Patienten eine Vakzinierung mit autologen Tumorzellen, verglichen mit einer Kontrollgruppe, die nach Nephrektomie nicht adjuvant behandelt wurde. Das 5-Jahresüberleben der vakzinierten Patientengruppe war mit 77% etwas besser als in der Kontrollgruppe mit 68% [107]. Wenn sich auch die unerwünschten Wirkungen bei Vakzinierung mit autologen Tumorzellen in Grenzen halten, war der therapeutische Nutzen bisher zu gering, als dass von einem Durchbruch in der Behandlung des RCC gesprochen werden könnte. Darüber hinaus ist das T-Zellmonitoring wegen der Vielzahl der möglichen Epitope erschwert. Auch kann man nicht sicher ausschließen, dass eine verstärkte T-Zelltoleranz erzeugt werden könnte [108].

1.3.3 Vakzinierung mit Peptiden

Im Gegensatz zur Vakzinierung mit autologen Tumorzellen ist mit Peptiden eine gezielte Induktion einer T-Zellantwort gegen ausgewählte Antigene möglich. Als Voraussetzung für diesen Ansatz mussten zunächst tumorassoziierte Antigene (TAA) identifiziert werden. Erstmals gelang dies von der Bruggen et al. im Jahr 1991 mit der Entdeckung des tumorassoziierten Antigens MAGE-A1, das in Melanomzellen exprimiert und durch CD8-T-Zellen erkannt wird [109].

Die TAAs entstehen durch verschiedene genetische Mechanismen: Eine Möglichkeit sind Punktmutationen in Tumorzellen, die zu völlig neuen Epitopen führen oder die MHC-Bindung eines Peptids erst ermöglichen. Manche TAAs beruhen aber auch auf Überexpression oder ausschließlicher Expression eines im Normalgewebe kaum bzw. nicht exprimierten Gens [110].

Viele bekannte TAAs stammen von Melanomen, da zu dieser Tumorart die ersten und umfangreichsten Studien durchgeführt wurden. Ein durch Punktmutation entstandenes TAA wurde z.B. in der Cyclin-abhängigen Kinase (CDK4) gefunden [111]. Die durch Mutation entstandenen Antigene wurden oft aber nur

in einzelnen Tumoren gefunden, was ihre Eignung als universelle Impfpeptide einschränkt.

Bei Melanomen wurden häufig Cancer/Testis-Antigene gefunden, die sonst nur in der männlichen Keimbahn exprimiert sind und deren Prototyp die Familie der MAGE-Gene ist. Ihre Expression wird durch Demethylierung ihres Promotors ausgelöst [110].

Die T-Zellen von Melanompatienten waren unerwartet in der Lage, Antigene, die von normalen melanozytären Differenzierungsgenen kodiert werden, zu erkennen. Dazu gehören: Tyrosinase, Melan-A/Mart-1, gp100/pMel17, TRP-1 und TRP-2 [110].

Ca. 20% der TAAs entstehen durch Veränderungen in der Proteinsynthese. Eine Möglichkeit ist die Translation unvollständig gespliceter Sequenzen, die zu Antigenen führt, welche Exon- und Intronregionen enthalten. Andere TAAs beruhen auf der Translation von alternativen offenen Leserastern oder posttranslationalen Modifikationen [110]. In den letzten Jahren wurden darüber hinaus atypische Antigene entdeckt, welche aus Sequenzen zusammen gesetzt sind, die im Quellprotein nicht aufeinander folgen [112].

Um eine stärkere Bindung an HLA-Moleküle zu erreichen, können in Vakzinierungen auch modifizierte Peptide eingesetzt werden. So wurde durch den Austausch einer Aminosäure in den Peptiden gp100 und Melan-A.A2 eine verbesserte Immunogenität erzielt. Nach Vakzinierung mit einem modifizierten Peptid erkannten einige T-Zellen sowohl das natürliche als auch das modifizierte Peptid, andere jedoch nur das modifizierte Peptid [113-115].

Nachdem im Blut von Tumorpatienten Antitumor-T-Zellen nachgewiesen worden waren (vgl. Kapitel 1.1.6), wollte man wissen, gegen welche Antigene diese gerichtet sind. Es zeigte sich, dass die Antigene aus den bereits erwähnten Gruppen von Cancer/Testis-Antigenen, Differenzierungsantigenen und durch Mutation entstandenen Antigenen stammen.

Unter den Cancer/Testis-Antigenen scheint NY-ESO-1 besonders immunogen zu sein. Bei 10 von 27 Patienten mit Tumoren, die NY-ESO-1 exprimierten, wurde eine spontane CTL-Antwort gegen NY-ESO-1 nachgewiesen (nicht aber im Fall von NY-ESO-1-negativen Tumoren). Gleichzeitig traten Antikörper ge-

gen dieses Antigen auf [116]. Auch in Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TILs) waren anti-NY-ESO-1-CTLs enthalten [117].

In Hinsicht auf die Melanozyten-Differenzierungsantigene ist das Peptid von Melan-A/Mart-1 besonders hervorzuheben. Im Blut der meisten Melanompatienten wurden vergleichsweise hohe Frequenzen ($\approx 0,1\%$) von anti-Melan-A.A2 CD8+ T-Zellen gefunden. Noch höher war ihre Frequenz in Lymphknoten und kutanen Metastasen [104]. Auch bei gesunden Individuen wurden anti-Melan-A.A2 Zellen nachgewiesen. Ihre Frequenz war mit 5×10^{-5} jedoch wesentlich niedriger als bei Melanompatienten. Vor allem im fortgeschrittenen Krankheitsstadium zeigten viele anti-Melan-A T-Zellen mit CCR7+CD45RO+ einen Gedächtnis-Effektor-Phänotyp, während sie bei Gesunden alle einen naiven Phänotyp aufwiesen [118]. Gegen andere Differenzierungsantigene traten spontane T-Zellantworten bei Melanompatienten weniger häufig auf. Ein Tyrosinase-Peptid wurde in einer Studie bei 2 von 11 und in einer weiteren Studie bei 2 von 6 Patienten durch die T-Zellen erkannt (Frequenz 0,2-2%) [102, 119].

Der Identifizierung von neuen tumorassoziierten Antigenen dient die so genannte „Reverse Immunology“. Man untersucht Proteine, die in Tumorzellen exprimiert bzw. überexprimiert werden, auf potentielle HLA-bindende Sequenzen. Dabei helfen Computerprogramme, die mögliche Peptidsequenzen voraussagen können (z.B. www.syfpeithi.de). Um zu überprüfen, ob T-Zellen den Komplex aus HLA und diesem Peptid überhaupt erkennen, werden in einem zweiten Schritt die Peptide synthetisiert und in T-Zell-Assays darauf untersucht, ob sie in der Lage sind T-Zellen zu aktivieren.

Ein TAA ist also nur dann ein guter Kandidat für eine Vakzinierung, wenn es sowohl HLA-Ligand als auch T-Zellepitop ist und in den Tumoren, nicht aber im Normalgewebe exprimiert wird.

In der Abteilung Immunologie der Universität Tübingen wurde ein integrierter Ansatz zur Identifizierung geeigneter Peptide entwickelt, bei dem drei verschiedene Techniken kombiniert werden: Zunächst wird eine Genexpressionsanalyse von Normal- und Tumorgeweben durchgeführt. In der Folge werden aus Tumoren isolierte HLA-Liganden mit dem Massenspektrometer analysiert und sequenziert. Schließlich wird die Reaktivität peripherer CD8-T-Zellen gegen

einzelne aus den vorherigen Versuchsergebnissen ausgewählte Peptide in T-Zell-Assays (z.B. qPCR-basiert oder Tetramer-Färbungen) überprüft. Mit diesem Ansatz wurden HLA-Liganden von im Tumor überexprimierten Proteinen identifiziert, die in einer Vakzinierung eingesetzt werden könnten, wie z.B. KIAA0367, Adipophilin (ADFP) und Met-Protoonkogen [120, 121].

Für eine breit angelegte Vakzinierungsstudie eignen sich eher Antigene, die in den meisten Tumoren überexprimiert sind. Antigene, die nur gelegentlich beim RCC gefunden werden und zum Beispiel durch Mutation neu entstanden sind, wären für diesen Zweck zwar auch interessant und eventuell sogar mit einer höheren Immunogenität verbunden, erfordern aber ein Vorab-Screening und eine individuelle Therapie für jeden Patienten [108].

Die ersten Peptidvakzinierungen wurden an Patienten mit fortgeschrittenen Melanomen durchgeführt. In einer der ersten Studien von Hu et al. wurden Antigen-präsentierende Zellen (APC) mit einem MAGE-1-Peptid beladen. Die Antigen-präsentierende Zelllinie stammte aus den PBMCs eines Studienpatienten und wies Merkmale lymphoblastoider B-Zellen auf. Die HLA-A*01-positiven Patienten erhielten vier Zyklen dieser Vakzine mit ansteigenden Zahlen der Peptid-beladenen APCs. Es konnte gezeigt werden, dass die Frequenz der Melanom-reaktiven Vorläuferzellen im peripheren Blut nach Vakzinierung zunahm und sich diese in-vitro nach Stimulation mit den MAGE-1-beladenen APCs expandieren ließen [122].

In einer Studie von Jäger et al. an sechs Melanompatienten wurden verschiedene Peptide von Melan-A/MART-1, gp100, Tyrosinase und Influenza als Kontrolle vier Mal innerhalb eines Monats intradermal injiziert. Nach Vakzinierung zeigten 4/6 Patienten eine CTL-Antwort auf Melan-A/MART, die bei drei Patienten neu aufgetreten und bei einem Patienten schon vor Vakzinierung vorhanden war. Das Tyrosinasepeptid führte bei 2/6 Patienten zu einer messbaren CTL-Antwort nach Vakzinierung. Für das Peptid von gp100 konnte keine CTL-Induktion nachgewiesen werden. In Hinsicht auf die klinischen Effekte wurde bei keinem der sechs Patienten eine Tumorregression beobachtet [123].

Ein besseres klinisches Ergebnis erzielten Rosenberg et al. in einer Studie mit einem modifizierten Peptid von gp100 und der Gabe von IL-2. In ihren Untersu-

chungen fanden sie bei 91% der Patienten eine erfolgreiche Immunisierung und bei immerhin 42% (13/31 Patienten) auch ein objektives klinisches Ansprechen auf die Vakzinierung [124].

Von gp100 stammten auch zwei Peptide, die in der Studie von Salgaller et al. zusammen mit inkomplettem Freund's Adjuvans verabreicht wurden. Während zunächst bei 3/7 und 4/6 Patienten Antigen-spezifische T-Zellen nachweisbar waren, stiegen diese Zahlen auf 7/7 und 5/6 nach Vakzinierung [125].

Insgesamt sind in den vergangenen Jahren zahlreiche Studien zur Peptidvakzinierung bei Tumoren veröffentlicht worden, die sich meistens auf Melanome bezogen. Es liegen jedoch auch Ergebnisse aus einigen Studien an RCC-Patienten vor [126-128], auf die in Kapitel 4 eingegangen wird.

1.4 Fragestellung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob nach Peptidvakzinierung im Rahmen einer laufenden Immuntherapiestudie an Patienten mit fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom ein immunologisches Ansprechen mit verschiedenen Methoden in-vitro nachweisbar ist. Die Fragen sind:

- a) Lässt sich im Verlauf der Vakzinierungen eine Induktion zytotoxischer CD8+ T-Zellen nachweisen, die einzelne HLA-Klasse-I-restringierte Impfpeptide spezifisch erkennen?
- b) Gab es auch eine CD4-T-Zellinduktion durch die in der Vakzinierung enthaltenen HLA-Klasse-II-Peptide?
- c) Welche Interleukine werden von diesen CD4-T-Zellen nach Stimulation mit ihrem spezifischen Antigen gebildet?
- d) Sind diese T-Zellen in der Lage, natürlich prozessierte Antigene zu erkennen, wenn diese z.B. von einer Tumorzelllinie exprimiert wird?

2 Material und Methodik

2.1 Die UroRCC-Studie in Tübingen

2.1.1 Studiendesign

Die Uro-RCC-Studie ist eine monozentrische, prospektiv randomisierte Phase I/II-Studie zur adjuvanten Behandlung des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms ohne Metastasen. Das primäre Ziel der Studie ist die Überprüfung der Durchführbarkeit und Verträglichkeit einer Immunisierung mit synthetischen Peptiden in Kombination mit Adjuvantien. Die Untersuchung klinisch-therapeutischer Effekte und immunologischer Reaktionen (Induktion tumorspezifischer T-Zellen) sind weitere, sekundäre Ziele. Es handelt sich um eine Kooperation der Klinik für Urologie der Universität Tübingen mit dem Interfakultären Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie Tübingen unter Leitung von Prof. Dr. M. Kuczyk, Prof. Dr. A. Stenzl und Prof. Dr. H.-G. Rammensee. Die Rekrutierung erfolgt in der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen unter der Verantwortung von Dr. S. Feyerabend.

2.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien:

- Tumorstadium T3 oder T4, M0 oder M1 falls alle Metastasen reseziert werden konnten
- ECOG-Performance Status 0 oder 1
- Alter > 18 Jahre
- mindestens 4 Wochen nach letzter Chemo- oder Strahlentherapie
- laborchemisch weitgehend unauffällige Leber- und Nierenfunktion (Bilirubin < 2 mg/dl, Kreatinin < 2 mg/dl)

Ausschlusskriterien:

- in der Bildgebung sichtbare Fernmetastasen
- einwilligungsunfähige Patienten
- pathologischer kardiopulmonaler Befund (NYHA 3/4)
- Vorliegen einer Zweittumorerkrankung

- Medikamenteneinnahme, die die Funktion des Immunsystems behindert (letzte Gabe eines Chemotherapeutikums oder von Glukokortikoiden in den letzten 4 Wochen)
- Zerebrales Krampfleiden
- Schwangerschaft
- gleichzeitige Teilnahme an einer anderen aktiven oder passiven immuntherapeutischen Behandlung

Die Patienten werden mündlich und schriftlich im Sinne des Informed Consent über ihre Erkrankung, die vorgesehene Immuntherapie und mögliche Therapiealternativen aufgeklärt. Bevor sie in die Studie aufgenommen werden, müssen sie ihr Einverständnis zur Teilnahme schriftlich niederlegen.

Die Studie wurde durch die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät und des Universitätsklinikums Tübingen genehmigt (Projekt-Nr.: 231/2004).

2.1.3 Studienaufbau und Patientenzahl

Wenn sie die oben genannten Kriterien erfüllen, werden die Patienten aufgrund ihres HLA-Typs in zwei Gruppen eingeteilt: HLA-A*02-positiv sowie HLA-A*02-negativ. Innerhalb dieser Gruppen werden sie randomisiert einem der beiden Studienarme zugeordnet und erhalten entweder GM-CSF oder Montanide als Adjuvans in allen Vakzinierungen (zu den Adjuvantien siehe auch Kapitel 2.1.5). Für jeden Studienarm werden 10 Patienten rekrutiert, sodass am Ende mit zwei Patientengruppen und zwei Studienarmen eine Gesamtzahl von 40 Patienten erreicht werden soll.

Nach Nephrektomie und Entfernung eventuell vorhandener Metastasen erhalten die Patienten 18 Vakzinierungen bestehend aus einem zu ihrem HLA-Typ passenden Peptidcocktail. Die Vakzinierung wird im einen Studienarm mit GM-CSF intradermal appliziert und im anderen Studienarm in einer Emulsion mit Montanide subkutan verabreicht.

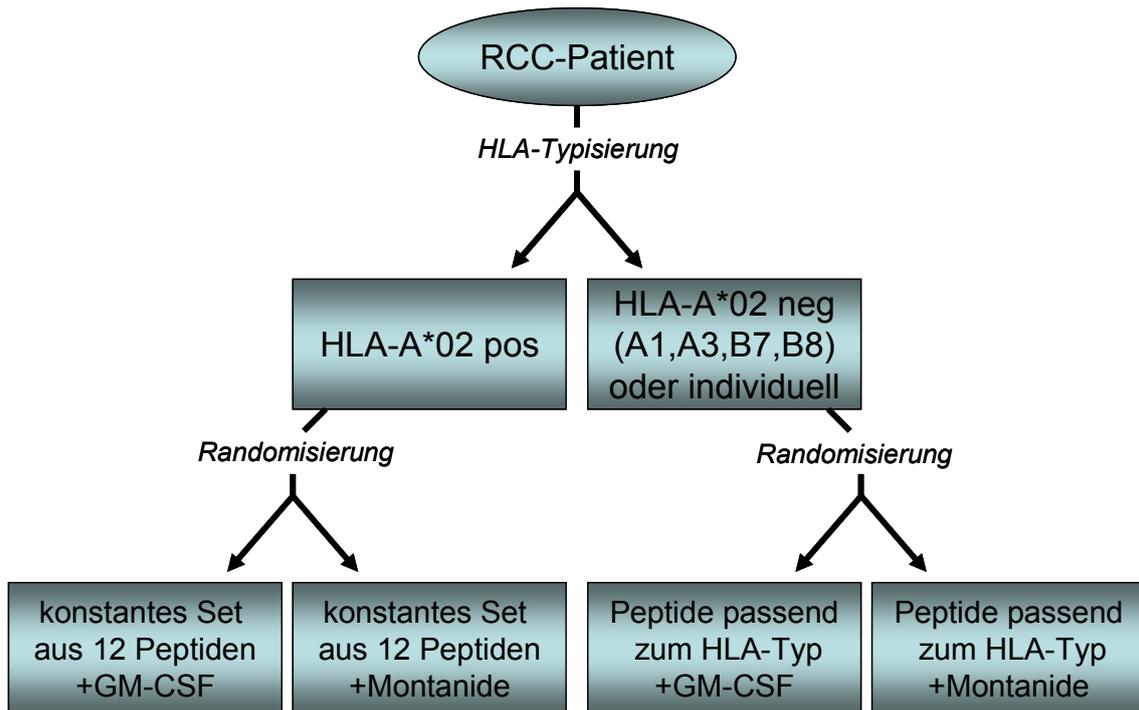


Abbildung 5: Studienaufbau der Uro-RCC-Studie

Die Vakzinierungen werden abgebrochen, wenn das Restaging mittels CT, Sonographie und Röntgen-Thorax eine Progression der Erkrankung zeigt. Als Progression wird das Neuauftreten einer Tumormanifestation gewertet. Wenn sich keine Metastasen gebildet haben, erhalten die Patienten ab Tag 91 alle 4 Wochen eine Vakzinierung und alle 3 Monate ein weiteres Restaging (CT). Die Vakzinierungen werden höchstens für die Dauer eines Jahres ab Therapiebeginn fortgeführt.

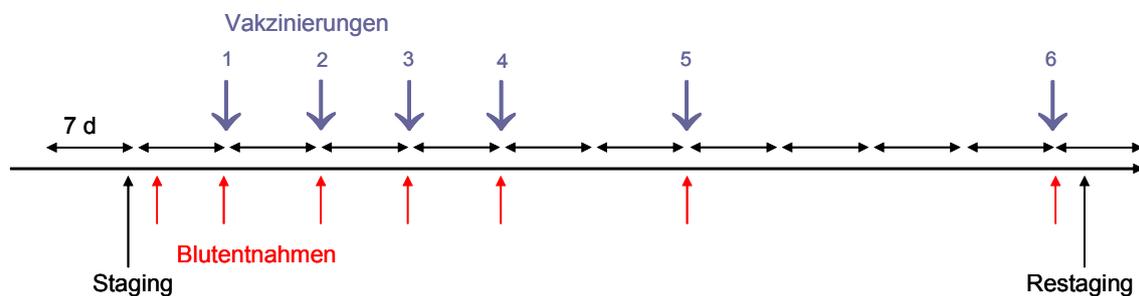


Abbildung 6: Ablauf der Uro-RCC Studie, 6 Vakzinierungen und Blutabnahmen, nach 70 Tagen Restaging, das alle 3 Monate wiederholt wird, dann Vakzinierung und Blutabnahme nur noch alle 4 Wochen bis 18 Vakzinierungen erreicht werden.

2.1.4 Verwendete Peptide

Die für die Studie verwendeten Peptide wurden im Labor von Prof. Dr. Stefan Stevanović in der Abteilung von Prof. Dr. H.-G. Rammensee ausgewählt. Diese Peptide werden HPLC-gereinigt und massenspektrometrisch analysiert. Die Reinheit der Peptide kann weiterhin durch HPLC, Massenspektrometrie sowie Edman-Sequenzierung überprüft werden, wodurch eine Reinheit von bis zu 98% sichergestellt wird. Die synthetisierten Peptide werden in DMSO (CryoSure, WAK Chemie Medical GmbH) gelöst, in Ampuwa (Fresenius Kabi) verdünnt und steril aliquotiert. Die sowohl bei der intradermalen als auch der subkutanen Applikation verwendete Dosis ist 300 µg pro Peptid.

Im Vorfeld der Studie wurde die Mehrheit der verwendeten Peptide als HLA-Liganden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. S. Stevanović in der Abteilung Immunologie Tübingen unter Leitung von Prof. Dr. H.-G. Rammensee identifiziert. In der Gruppe der HLA-A*0201-restringierten Peptide trifft dies auf ADFP1, MET1, RGS2, APOL2, KIAA0367, GUCY1A3-1 und ITGA3-1 zu (vgl. Tabelle 1). Für einen Teil dieser Peptide konnte bereits gezeigt werden, dass sie auch T-Zellepitope sind, d.h. dass sie von T-Zellen erkannt werden.

Für manche HLA-Restriktionen lagen noch keine geeigneten Liganden vor, sodass über die Datenbank SYFPEITHI vorhergesagte Sequenzen ausgewählt wurden (in der Tabelle bezeichnet mit P für Prediction).

Der Score der Datenbank SYFPEITHI wird über einen Algorithmus berechnet, in dem jeder Aminosäure in einer bestimmten Position ein Wert zugeordnet wird: 1 wenn die Aminosäure in dieser Position nur leicht bevorzugt gebunden wird bis zu einem maximalen Wert von 15 bei optimalen Ankern. Der höchste Wert für HLA-A*0201 ist 36. Die HLA-A*02-Impfpeptide bewegen sich im Rahmen von 19 (RGS2) bis 33 (APOL2), während z.B. das HLA-A*03-Peptid ADFP4 einen Wert von 14 aufweist [27].

Tabelle 1: Übersicht über die Impfpeptide: Quellprotein; HLA-Restriktion; Name des Peptids; Aminosäuresequenz; Position im Quellprotein; Score der Datenbank SYFPEITHI; HLA-Ligand entweder mit Referenz oder, wenn es noch nicht als Ligand nachgewiesen wurde, mit einem P für Prediction; T-Zellepitop mit einer Referenz, wenn bereits gezeigt worden ist, dass T-Zellen das Peptid spezifisch erkennen

Quellprotein	HLA	Name	Sequenz	Position	Score	HLA-Ligand	T-Zell-Epitope
Met proto-oncogene	A1	MET2	KSEMNVNMKY	961-971	28	P	-
Met proto-oncogene	A1	MET3	MLDGILSKY	798-806	27	P	-
Regulator of G protein signaling 5	A1	RGS3	SLDKLLQNNY	64-73	28	P	-
Regulator of G protein signaling 5	A1	RGS5	MAEKAKQIY	109-117	23	P	-
Mucin	A2	MUC1	STAPPVHNV	950-958	26	-	[129]
Adipose differentiation-related protein	A2	ADFP1	SVASTITGV	129-137	23	[120]	[130]
Met proto-oncogene	A2	MET1	YVDPVITSI	654-662	22	[120]	[131]
Regulator of G protein signaling 5	A2	RGS2	LAALPHSCL	5-13	19	[121]	[132]
Apolipoprotein L	A2	APOL1	FLGENISNFL	242-251	24	[133]	-
Apolipoprotein L	A2	APOL2	ALADGVQKV	176-184	33	[120]	-
KIAA0367	A2	KIAA0367	ALFDGDPHL	1-9	27	[120]	-
Guanylate cyclase 1	A2	GUCY	SVFAGVVG	581-589	26	[120]	-
Integrin alpha-3	A2	ITGA3	LLYPTTEITV	798-806	27	[121]	-
Cyclin D1	A2	CCND1	LLGATCMFV	101-109	22	[134]	[135]
HBV core antigen	A2	HBV1	FLPSDFFPV	18-27	24	-	[136]
Influenza A MP	A2	IMP1	GILGFVFTL	58-66	30	[137]	[137]
Regulator of G protein signaling 5	A3	RGS1	GLASFKSFLK	74-83	21	[121]	[132]

Quellprotein	HLA	Name	Sequenz	Position	Score	HLA-Ligand	T-Zell-Epitope
Adipose differentiation-related protein	A3	ADFP2	SLLTSSKGQLQK	369-380	-	[121]	-
Adipose differentiation-related protein	A3	ADFP3	TSALPIIQK	63-71	15	[121]	-
Matrix metalloproteinase 7	A3	MMP7	SLFPNSPKWTSK	79-90	-	[121]	[138]
Regulator of G protein signaling 5	B8	RGS6	EIKIKLGIL	18-26	36	P	-
met proto-oncogene	B8	MET4	AVKLIKIDL	697-704	31	P	-
met proto-oncogene	B8	MET5	WLKKRKQI	930-937	30	P	-
Cyclin D1	DRB 1*0401	CCND1	NPPSMVAAGSV-VAAV	198-212	-	[139]	[139]
Insulin-like growth factor binding protein 3	DRB 1*11	IBP3	HSKIIIIKKG-HAKDSQ	142-157	-	[140]	[140]
Matrix metalloproteinase 7	DRB 1*11	MMP7	SQDDIK-GIQKLYGKRS	153-168	-	[140]	[140]
Carbonic anhydrase 9	DR ?	G250	EIHVVHLSTA-FARVDEALGR	212-231	-	[141]	[141]

Tabelle 2: Expressionsprofil der in der Impfung verwendeten Peptide im Normalgewebe und beispielhaft in drei RCC-Proben; alle Werte in Relation zur durchschnittlichen Expression im gesunden Nierengewebe (=1); als überexprimiert wurden mindestens dreifach erhöhte Werte angesehen (Quelle: S. Stevanović, O. Schoor; Abteilung für Immunologie Tübingen)

	MUC1	ADFP1	MET1	RGS2	APOL1	KIAA	GUCY	ITGA3	CCND1
Leukozyten	2,8	0,1	0	0,4	1,9	0,2	0,4	0	0
DC	0,7	0,2	0	0,1	0,3	0,2	0,2	0	0,1
Nebenniere	2,1	0,6	0,2	3	0,4	0,5	0,5	0,7	0,9
Blase	1,4	0,9	2,1	5,3	2,5	2,3	0,7	0,7	0,6
Knochenmark	3,7	0,3	0,1	0,3	0,3	0,6	0,8	0,1	0,3
Gehirn	1	0,1	0,9	3	0,2	5,3	1,3	0,3	0,5
Kolon	0,6	0,2	0,6	2,1	1	1,3	0,7	0,6	0,4
Herz	0,6	1,1	0,7	4,9	0,4	0,2	1,2	0,4	0,5
Niere	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Leber	3	1,9	1,7	0,7	5,3	0,4	0,7	0	1,9

	MUC1	ADFP1	MET1	RGS2	APOL1	KIAA	GUCY	ITGA3	CCND1
Lunge	0,9	0,8	2,8	3,5	4,9	0,3	1,2	1,1	0,9
Placenta	2,8	1,9	1,1	0,3	3,7	0,4	0,6	1,2	0,9
Prostata	0,5	0,1	0,5	1,5	1,7	1,5	1,7	0,3	0,8
Speicheldrüse	1,3	0,3	0,2	0,4	0,2	0,7	0,3	0,4	0,7
Dünndarm	0,9	1,2	0,2	2,5	0,3	0,9	0,8	0,8	1
Skelettmuskel	0,9	0,4	0,9	2,8	0,7	0,4	0,8	0,1	0,1
Milz	1,1	0,2	0,1	0,5	2,6	0,3	0,8	0,3	0,7
Magen	1,7	0,3	0,3	2	3,7	0,9	1,1	0,7	1,1
Hoden	1,2	0,3	0,4	2,6	0,4	0,5	0,8	0,2	0,4
Thymus	0,6	0,2	0	0,4	1	0,2	0,4	0,3	0,2
Schilddrüse	1,9	0,2	1	3,2	0,3	0,3	0,7	0,9	0,8
Trachea	0,9	0,3	0,8	1,1	1,6	0,6	0,8	0,4	0,7
Uterus	2,5	0,2	0,2	0,8	1,5	0,9	0,6	0,5	0,5
Fettgewebe	0,5	0,7	1,5	4	1,2	0,5	1,6	0,4	1,3
Arterie	0,6	0,4	0,9	22,6	1,1	2,8	2,8	0,9	0,9
Mamma	0,5	1,9	1,3	2,6	1	0,2	1,2	0,8	1,3
Zervix	0,5	0,4	1,1	9,2	2	2,6	2,1	0,8	0,5
Ösophagus	0,6	0,2	0,8	7,5	0,8	3	1,7	0,7	1,6
Gallenblase	0,6	0,4	2	7,5	4,6	1,9	1,9	1,5	1,5
Lymphknoten	0,3	0,3	0,6	2,3	1,1	0,2	1	0,6	0,2
Pankreas	0,4	0,1	0,5	0,7	0,7	0,1	1,2	0,5	0,8
Ovar	0,5	0,9	6,5	2,8	2,1	0,5	0,9	1,1	0,7
Haut	0,4	2,8	1,9	1,4	0,7	0,6	0,6	0,7	1,7
Vene	0,5	0,6	0,9	4	0,8	0,6	1,6	0,4	0,3
RCC0100T	1,2	3	5,3	29,9	1,2	4,6	3,5	2,1	8
RCC108T	5,3	0,7	6,5	3	11,3	0,2	2	2,8	1,3
RCC180T	0,6	6,5	18,4	22,6	3,5	7	2,3	3	10,6

2.1.5 Verwendete Adjuvantien

Die Peptide werden entweder mit GM-CSF oder Montanide als Adjuvans kombiniert. Der Wachstumsfaktor GM-CSF (Leukine®, Sargramostim) soll unter anderem über seine Wirkung auf Dendritische Zellen dabei helfen, eine Immunantwort gegen die Impfpeptide auszulösen und zu verstärken. Er wird in einer niedrigen Dosierung von 100 µl (entsprechend 75 µg) eingesetzt und intrader-

mal appliziert. Nach 15 Minuten erfolgt die Peptidvakzinierung intradermal in unmittelbarer Nähe der GM-CSF-Injektion.

Die Peptide werden im zweiten Studienarm in Montanide ISA-51, einer für den Menschen geeigneten Formulierung des klassischen Inkompletten Freund-schen Adjuvans, emulgiert. In der RCC-Studie werden 500 µl Peptidlösung in 500 µl Montanide aufgenommen und subkutan gespritzt. Diese Form der Verabreichung bewirkt durch eine langsame Freisetzung der Peptide einen Depot-effekt.

Beide Adjuvantien wurden bereits in zahlreichen Vakzinierungsstudien eingesetzt [142-146].

2.2 Laborgeräte

Dampfsterilisator	Sauter, Mühldorf a. Inn, 11-6-9 HS1-FD
Lichtmikroskop	Leica DM IL, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
37°C-Inkubator	Labotect 3250 mit 5% CO ₂ -Begasung, Göttingen
Durchflußzytometer	FACSCalibur™, BD Biosciences, San Jose, USA Software: Cell Quest Pro
Kühlschrank (-20°C)	ES, Profi line, Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen
Kühlschrank (-4°C)	ECC, Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen
Sterilbank	Technoflow, Integra Biosciences GmbH, Ruhberg
Labofuge 400	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Megafuge 2.0 R	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Milli-Q	Milli-Q, UF Plus, CPMQ004RE, Billerica, USA
Zentrifuge Sorvall	RC 50 Plus, Thermo Fisher Scientific, USA
Tischzentrifuge	Biofuge fresco, Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Vortexer	MS 1, IKA-Werke GmbH, Staufen
Wasserbad	Thermomix BM-S, Braun Biotech, Melsungen
Elispotreader	C.T.L., Shaker Heights, USA, ImmunoSpot Series 3B Analyzer

Software

C.T.L., Shaker Heights, USA, Image Acquisition 4.5

C.T.L., Shaker Heights, USA, ImmunoSpot 3.2

Satellite

2.3 PBMC-Isolierung

2.3.1 Prinzip der PBMC-Isolierung

Um aus peripherem Blut PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) zu isolieren, wird eine Dichtezentrifugation auf einer Schicht „Lymphocyte separation medium“ (LSM) durchgeführt. Das aus synthetischen Kohlenhydratpolymeren hergestellte LSM ist auf eine Dichte von 1,077 g/ml eingestellt die so gewählt ist, dass die einzelnen Blutzellpopulationen nach Zentrifugation in verschiedenen Schichten liegen. Die Erythrozyten und Granulozyten sinken durch das LSM nach unten ab (vgl. Abbildung 7). Die Lymphozyten und Monozyten bilden eine weißliche Zwischenphase auf dem LSM und können mit einer Pipette abgenommen werden.

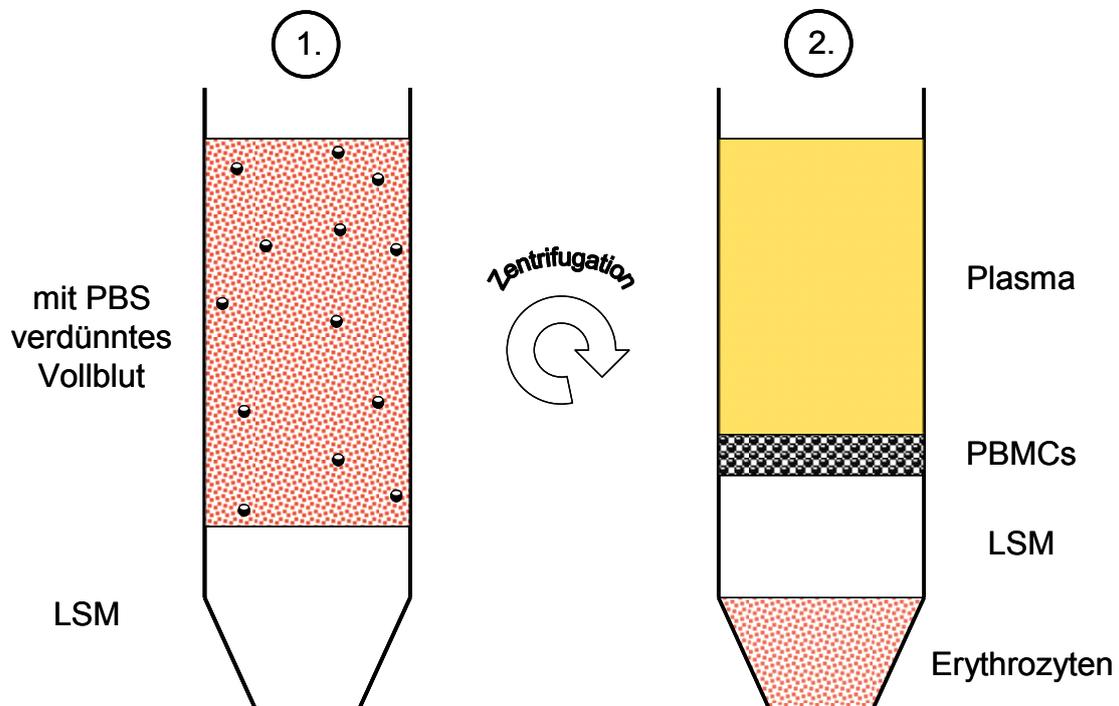


Abbildung 7: Prinzip der PBMC-Isolierung mit LSM

2.3.2 Materialien für die PBMC-Isolierung

DMSO	Merck, Darmstadt, 1.02952.1000
FCS	PAA Laboratories, Pasching, Österreich, A15-101
LSM 1077	PAA Laboratories, Pasching, Österreich, J15-004
PBS	1x Dulbecco's, Claudia Falkenburger (Abteilung für Immunologie, Universität Tübingen)
Trypan Blau	Merck KGaA, 1.11732, Darmstadt, Deutschland

2.3.3 Durchführung der PBMC-Isolierung

Bei jeder Vakzinierung wurden den Patienten 10 Heparin-Röhrchen Blut abgenommen und daraus die mononukleären Zellen unter sterilen Bedingungen isoliert. Das im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnte Blut wurde auf 50 ml-Falcons verteilt und mit 10 ml LSM-Lösung unterschichtet. Die Proben wurden nun 20 Minuten bei 2000 U/min ohne Bremse zentrifugiert. Aufgrund ihrer höheren Dichte lagerten sich Erythrozyten auf dem Boden des Gefäßes ab, während die mononukleären Zellen als weißliche Interphase zwischen LSM und Plasma lagen. Diese Zwischenschicht wurde abpipettiert und in ein weiteres 50 ml-Falcon transferiert, welches dann mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und 6 Minuten bei 1400 U/min zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet resuspendiert und die Zellen erneut mit 40 ml PBS gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation (1300 U/min, 8 Minuten) wurden alle mononukleären Zellen eines Patienten gepoolt und in 50 ml PBS resuspendiert. Aus dieser Zellsuspension wurden 30 µl mit einer Pipette entnommen, mit 30 µl Trypanblau vermischt und in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Blau gefärbte Zellen galten als tot und wurden nicht mitgezählt. Es ist jedoch zu beachten, dass beginnend apoptotische Zellen durch diese Methode nicht erkannt werden. Die Proben wurden dann 8 Minuten bei 1300 U/min und 4°C zentrifugiert, resuspendiert und langsam so viel kaltes Einfriermedium (FCS mit 10% DMSO) zugegeben, dass am Ende pro Vial 5-8 Mio Zellen in 1 ml eingefroren waren. Diese Vials wurden zunächst in einer Cryobox bei -80°C eingefroren und dann im Stickstofftank bei -196°C aufbewahrt.

2.4 Präsensitivierung

2.4.1 Materialien für die Präsensitivierung

DNase I	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA, DN25, 1 mg/ml
Human Serum AB	c.c.pro, Oberdorla, heat inactivated, S41M
IMDM-Medium	BioWhittaker, Verviers, Belgien, BE12-722F
rHu IL-2	R&D Systems, Minneapolis, USA, 202-IL-050, 2 µg/ml
rHu IL-4	R&D Systems, Minneapolis, USA, 204-IL-010, 10 µg/ml
rHu IL-7	PromoCell, Heidelberg, C-61712, C-61712, 10 µg/ml
PBS	1x Dulbecco's, Claudia Falkenburger (Abteilung für Immunologie, Universität Tübingen)
PenStrep	BioWhittaker, Verviers, Belgien, DE17-602E
Trypan Blau	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
β-Mercaptoethanol (=β-ME)	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz, 100 mM in PBS, 2000x, steril filtriert (0.2 µm-Filter)

Tabelle 3: Zusammensetzung der für die Zellkultur verwendeten Medien

	Medium	Serum	PenStrep	β-ME	DNase
Auftaumedium	IMDM	2,5% HS	1%	50 µM	3 µg/ml
Waschmedium	IMDM	-	1%	50 µM	-
Kultiviermedium	IMDM	10% HS	1%	50 µM	-

Tabelle 4: Als Positivkontrolle verwendete Peptide

Positivkontrollen:	Abkürzung	HLA	Position	Sequenz
CMVpp65	CMV	A*01	363-373	YSEHPTFTSEY
Influenza NP	Inf	A*01	44-52	CTELKLSDY
CMVpp65	CMV	A*02	495-503	NLVPMVATV
IE63-EBV	EBV	A*02	259-267	GLCTLVAML
Influenza-Matrix	Inf	A*02	58-66	GILGFVFTL
EBNA-3	EBV	A*03	471-479	RLRAEAQVK
Influenza NP	Inf	A*03	265-274	ILRGSAVHK
EBNA3-EBV	EBV	B*08	193-201	FLRGRAYGL

Tabelle 5: Als Negativkontrolle verwendete Peptide

Negativkontrollen:	Abkürzung	HLA	Position	Sequenz
HIV-1 gag p17	HIV	A*01	70-78	GSEELRSLY
HIV-1 RT	HIV	A*02	476-484	ILKEPVHGV
HIV-1 gag p17	HIV	A*03	20-28	RLRPGGKKK

2.4.2 Ablauf der Präsensitivierung

Die Cryovials mit den PBMCs wurden in einem auf 37°C geheizten Wasserbad aufgetaut und in 5 ml Auftau-Medium überführt. Dieser Auftauprozess sollte schnell erfolgen, da DMSO auf die Zellen toxisch wirkt. Nach Zentrifugation (1300 U/min, 6 Minuten) wurde das Pellet in 5 ml IMDM-Medium ohne Humanserum resuspendiert und 30 µl der Zellsuspension mit 30 µl Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Ab diesem Punkt war das Protokoll unterschiedlich, abhängig davon ob eine Stimulation mit HLA-Klasse-I- oder -Klasse-II-Peptiden erfolgen sollte. Einen Überblick über den in diesem Absatz beschriebenen Ablauf gibt das Schema in Abbildung 8.

Für eine HLA-Klasse-I-Stimulation wurden 4-6 x 10⁶ PBMCs in 500 µl Kultiviermedium mit IL-4 und IL-7 [5 ng/ml] aufgenommen und in einer 24-Well-Platte in den Inkubator gestellt. Am folgenden Tag wurden 500 µl Kultiviermedium mit IL-4 und IL-7 sowie die für die Stimulation ausgewählten Peptide in einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugegeben. Es wurde dabei nicht mit jedem Peptid einzeln, sondern stets im Pool stimuliert. An den Tagen 3 und 5 wurden weitere 500 µl Kultiviermedium mit IL-2 [2 ng/ml] in jedes Well pipettiert. Abhängig davon, ob das Medium bereits eine gelbe Farbe angenommen hatte, wurde an den Tagen 7 und 9 je 0,5-1 ml Kultiviermedium ausgetauscht und dabei IL-2 in einer Endkonzentration von 2 ng/ml zugegeben (bis zur Protokolländerung am 20.07.2007 IL-2-Zugabe nur an Tag 3 und 5). Gelegentlich war ein weiterer Mediumwechsel vor dem Elispot an Tag 12 notwendig. Der Elispot wurde am Tag 12 nach Auftauen der PBMCs durchgeführt.

Bei HLA-Klasse-II-Stimulation war das Protokoll ähnlich wie bei Klasse I, mit dem Unterschied, dass kein IL-4 und IL-7 eingesetzt und die Peptide an Tag 1 in einer Endkonzentration von 5 µg/ml zugegeben wurden. Bei niedriger Zell-

zahl pro Well wurden 48-Well-Platten verwendet, um einen für die Peptidpräsentation ausreichenden Zellkontakt sicher zu stellen.

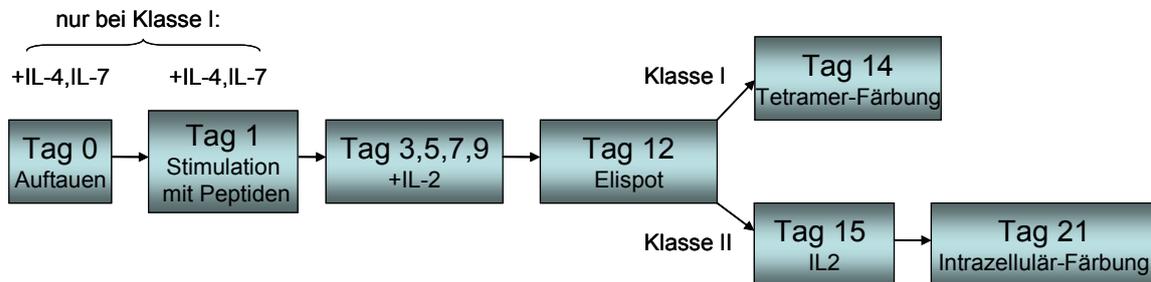


Abbildung 8: Schema zum zeitlichen Ablauf der Experimente

2.5 Elispot

2.5.1 Das Prinzip des Elispot

Mit einem Elispot (enzyme-linked immunosorbent spot assay) ist es möglich, die Zytokinsekretion einzelner Immunzellen nach Kontakt mit einem definierten Antigen zu detektieren. Diese im Jahr 1988 entwickelte Methode ist eine Modifikation des ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) und hat sich als eine der Standardmethoden für das T-Zell-Monitoring in immuntherapeutischen Studien etabliert [147-149]. In der Regel wird die $\text{IFN}\gamma$ -Sekretion untersucht, da diese sehr gut mit der spezifischen Zytotoxizität der T-Zellen korreliert, wie im Vergleich mit Chromium Release Assays gezeigt wurde [149].

Der Boden einer Elispotplatte, bestehend aus einer inerten Mischung aus Nitratzellulose und Acetatzellulose, wird mit Antikörpern gegen humanes $\text{IFN}\gamma$ beschichtet ① (vgl. Abbildung 9). Im nächsten Schritt werden Effektorzellen mit dem zu testenden Antigen zugegeben. Durch Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen werden T-Zellen aktiviert und sezernieren $\text{IFN}\gamma$, das von den immobilisierten Erstantikörpern gebunden wird ②. Nach einer definierten Inkubationszeit bei 37°C werden die Effektorzellen entfernt und ein zweiter $\text{IFN}\gamma$ -Antikörper zugegeben, an dessen Ende ein Enzym gekoppelt ist ③. Dieses Enzym spaltet ein im letzten Schritt zugegebenes Substrat ④ und bewirkt die Färbung des Areal um die Stelle, an der zuvor eine $\text{IFN}\gamma$ -sezernierende T-Zelle lag („Spot“). Die Auszählung erfolgt heute nicht mehr unter dem Mikroskop sondern mit Hilfe

eines automatisierten Lesegerätes. Aus der Spotanzahl kann auf die Frequenz spezifischer, $IFN\gamma$ -produzierender T-Zellen rückgeschlossen werden, da die eingesetzte Gesamtzellzahl von PBMCs bekannt ist.

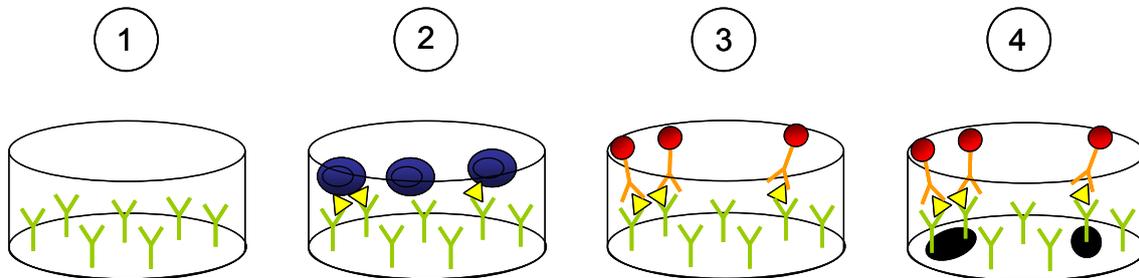


Abbildung 9: Prinzip des Elispot (grün: Erstantikörper, blau: Effektorzellen, gelb: $IFN\gamma$, orange: Zweitantikörper, an diesen gekoppelt in rot: Enzym, das ein im letzten Schritt zugegebenes Substrat spaltet und so die $IFN\gamma$ -Sekretion in Form von Spots sichtbar macht)

2.5.2 Materialien für den Elispot

mAb1-D1K	Mabtech, Nacka Strand, Schweden, 3420-3-1000, 1 mg/ml
mAb7-B6-1biotinyl.	Mabtech, Nacka Strand, Schweden, 3420-6-1000, 1 mg/ml
BCIP/NBT	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA, B5655
BSA	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA, A4628
Elispotplatte	MultiScreen _{HTS} 96-well Filtration System, Millipore, Billerica, USA, MSHAN4B50
ExtrAvidin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA, E2636
Human Serum AB	c.c.pro, Oberdorla, S-41-M
IMDM-Medium	BioWhittaker, Verviers, Belgium, BE12-722F
PBS	Claudia Falkenburger (Abteilung für Immunologie, Universität Tübingen)
PenStrep	BioWhittaker, Verviers, Belgium, DE17-602E
PHA-L	Roche, Basel, Schweiz, 11249738001, 5 mg (1 mg/ml stock)
RPMI-Medium	BioWhittaker, Verviers, Belgium, BE12-115F
SEB	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA, S4881 (1 mg/ml stock)
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe, 9127.2 (0,05% in PBS)

β -Mercaptoethanol Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz, 100 mM in PBS, 2000x, steril filtriert (0.2 μ m-Filter)

2.5.3 Beladen des Elispot

An Tag 11 wurde eine Elispot-Platte unter der Sterilbank mit anti-IFN γ -Antikörpern als Erstantikörper beschichtet. Dabei wurde der Antikörper mAb1-D1K in PBS so verdünnt, dass in jedes Well 100 μ l mit einer Antikörperkonzentration von 5 μ g/ml gegeben werden konnte. Die auf diese Weise beschichtete Platte blieb über Nacht bei 4°C im Kühlschrank, damit der Antikörper an die Membran binden konnte.

An Tag 12 wurde der Inhalt der Wells ins Waschbecken gestürzt („geflickt“) und die Platte anschließend zwei Mal mit 150 μ l IMDM-Medium pro Well gewaschen, um die nicht gebundenen Erstantikörper zu entfernen. Die anschließende Zugabe von 50 μ l Kultiviermedium mit Humanserum in jedes Well sollte dazu dienen, die unspezifischen Bindungsstellen zu sättigen. Die Platte musste mindestens eine Stunde bei 37°C inkubiert werden, bis das Kultiviermedium durch Flicken entfernt wurde und der Elispot mit Zellen und Peptiden beladen werden konnte. In der Zwischenzeit wurden die PBMCs aus den 24-Well-Platten in 15 ml-Falcons transferiert, die Wells nochmal mit ca. 1 ml IMDM-Medium gewaschen und die Falcons 6 Minuten bei 1300 U/min zentrifugiert. Die in 3-5 ml Kultiviermedium resuspendierten PBMCs wurden wie schon beschrieben gezählt und die Zellen in der gewünschten Verdünnung vorbereitet (z.B. 3×10^6 Zellen/ml sodass in jedes Well 100 μ l der Zellsuspension entsprechend 3×10^5 Zellen gegeben werden konnte). Die Anzahl der Zellen pro Well war nicht konstant, da oft nicht genügend Zellen zur Verfügung standen und deswegen eine niedrige Zellzahl angesetzt werden musste.

Damit die T-Zellen die zugegebenen Peptide überhaupt erkennen können, müssen ihnen diese auf HLA-Molekülen präsentiert werden (vgl. Kapitel 1.1.4). Die PBMCs können sich die Peptide zwar gegenseitig präsentieren, sind darin aber nicht besonders effektiv. Deswegen wurde der Elispot für HLA-A*02-positive Patienten mit K562-A2 als antigenpräsentierende Zellen durchgeführt. Die Zelllinie K562 geht auf Tumorzellen einer Chronisch myeloischen Leukämie

zurück. Da sie ursprünglich keine HLA-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimier- te, wurde sie mit HLA-A*02 transfiziert [148]. Die nicht adhärent wachsenden Tumorzellen wurden in RPMI mit 10% FCS kultiviert. Das bei der Transfektion eingebrachte Plasmid kodiert nicht nur für HLA-A*02, sondern enthält auch ein Resistenzgen. Durch Zugabe eines Aminoglykosidantibiotikums (G418) werden die Zellen selektioniert, die das Plasmid enthalten. Alle 4 Wochen wurden die K562 deswegen mit G418 behandelt, gefolgt von einer FACS-Färbung zur Kon- trolle der HLA-A*02-Expression. Zusätzlich wurden regelmäßig Mycoplasma- PCR-Tests durchgeführt, um eine Kontamination der K562-A2 mit diesem Bak- terium auszuschließen.

Für den Elispot wurde ein Teil der K562-A2 aus der Kulturflasche entnommen und zwei Mal mit ca. 10 ml IMDM-Medium gewaschen. Die Tumorzellen wurden stets 5 Minuten lang bei 1500 U/min zentrifugiert. Auch diese Zellen wurden mit Trypan-Blau, wie oben beschrieben, gezählt und mit Kultiviermedium auf eine Zellzahl von 2×10^6 /ml eingestellt, sodass in jedes Well der Elispot-Platte 50.000 Zellen in 25 µl Medium pipettiert werden konnten.

Die Vorbereitung der Peptide erfolgte am Schluss, um ihre Degradation durch Kontakt mit Humanserum und die darin enthaltenen Proteasen möglichst gering zu halten. Die Peptide waren in 10% DMSO gelöst und bei -80°C aufbewahrt. Die einzelnen Aliquots wurden maximal zwei Mal aufgetaut und verwendet. Regelmäßig durchgeführte Kontrollen (Massenspektrometrie) bestätigten, dass die Peptide in reiner, unzerstörter Form vorlagen.

Die 10 HLA-A*02-Peptide wurden zunächst in zwei Pools aus je 5 Peptiden getestet: Pool 1 beinhaltete APOL1, APOL2, KIAA0367, GUCY und ITGA3 und Pool 2 die verbleibenden Peptide MUC1, ADFP1, MET1, RGS2 und CCND1.

Die Peptide lagen in einer Konzentration von 1 mg/ml (Stock) vor und mussten auf 1 µg/ml Endkonzentration im Elispot für HLA-Klasse I und auf 2,5 µg/ml für Klasse II verdünnt werden. PBMCs von Patienten, die nicht HLA-A2 positiv waren, wurden für den Klasse-I-Elispot mit 5 µg/ml Peptid stimuliert, da die K562-A2 nicht verwendet werden konnten.

Als Positivkontrolle diente PHA in HLA-Klasse-I-Elispots [10 µg/ml] und SEB [1 µg/ml] für Klasse II. PHA ist die Abkürzung für das Mitogen Phytohämagglutinin,

durch das Lymphozyten unspezifisch aktiviert werden [150]. Staphylococcus Enterotoxin B ist ein bakterielles Superantigen. Die Konzentrationen beziehen sich jeweils auf die Endkonzentration im Elispot. In der Regel reichte es aus, nur die Hälfte der PBMCs in die Wells der Positivkontrolle zu geben, da die Antwort trotzdem noch ausreichend stark war. Als Negativkontrolle wurden HIV-Peptide eingesetzt, wobei zunächst für Klasse II kein HIV-Peptid zur Verfügung stand und 10%-DMSO-Lösung als Ersatz verwendet wurde.

Nach Abschluss aller Vorbereitungen wurden die Zellen und Peptide unverzüglich nach folgendem Schema in die Elispotplatte pipettiert:

- | | |
|-----------------|--------------------------------------|
| HLA-A2: | a) 25 µl Peptidlösung [1 µg/ml] |
| | b) 25 µl K562-A2 50.000/well |
| | c) 100 µl PBMCs 250.000-400.000/well |
| HLA-A2-negativ: | a) 50 µl Peptidlösung [5 µg/ml] |
| (ohne K562-A2) | b) 100 µl PBMCs 250.000-400.000/well |
| Klasse II: | a) 50 µl Peptidlösung [2,5 µg/ml] |
| | b) 100 µl PBMCs 150.000-300.000/well |

Die beladene Elispot-Platte wurde waagrecht und möglichst erschütterungsfrei in den Inkubator (37°C) gestellt.

2.5.4 Entwickeln des Elispot

Nach 26 Stunden Inkubation erfolgte die Entwicklung der Elispot-Platte (Tag 13). Da die Patientenzellen nur in begrenzter Anzahl zur Verfügung standen, wurden die Zellen nach dem Elispot nicht entsorgt, sondern mit einer Multichannel-Pipette aus der Elispot-Platte entnommen und in einer 96-Well-Platte weiterkultiviert.

Ab diesem Zeitpunkt musste die Elispotplatte nicht mehr unter sterilen Bedingungen behandelt werden. In jedes Well wurde 200 µl PBS-Tween 0,05% gegeben, die Platte nach einer Minute geflickt und kurz auf Zellstoff gedrückt. Im nächsten Schritt gab man jeweils 200 µl destilliertes Wasser (Milli-Q) in die

Wells, um noch nicht entfernte Zellen zu zerstören. Nachdem die Platte noch 5x mit PBS-Tween, wie im ersten Schritt beschrieben, gewaschen worden war, wurde der biotinylierte anti-IFN γ -Antikörper 7-B6-1 MabTech zugegeben. In jedes Well wurden 100 μ l PBS 0,5% BSA mit dem Antikörper in einer Konzentration von 0,3 μ g/ml zugegeben und die Platte zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Platte wieder 5x mit PBS-Tween gewaschen, die ExtrAvidin Alkalinphosphatase 1:1000 in PBS 0,5% BSA verdünnt und 100 μ l dieser Lösung in jedes Well gegeben. Am Ende der Inkubationszeit von einer Stunde war das Substrat vorzubereiten (eine Tablette NCIP/NBT in 10 ml destilliertem Wasser gelöst). Zuletzt wurde die Platte noch 3x mit PBS-Tween und 3x mit PBS gewaschen und dann 100 μ l der Substratlösung zugegeben. Die Reaktion wurde spätestens nach 10 Minuten unter fließendem Wasser gestoppt, der Plastik-Rücken der Platte entfernt und die Platte mehrmals auf Zellstofftücher gedrückt. Nach dem Trocknen wurden die Spots mit dem Elispotreader ImmunoSpot Series 3B Analyzer ausgezählt.

2.5.5 Protokollvergleich

Das oben beschriebene Protokoll wurde vor Beginn der Experimente mit zwei anderen Protokollen (hier B und C genannt) verglichen. Die wesentlichen Unterschiede lagen in der Behandlung der Zellen nach dem Auftauen, der Zellzahl pro Well und der Interleukin-Zugabe.

Tabelle 6: Unterschiede zwischen den drei verwendeten Protokollen

	Eigenes Protokoll	Protokoll B	Protokoll C
Auftauen	Abends auftauen und über Nacht ruhen lassen	Auftauen und sofort stimulieren	Auftauen und sofort stimulieren
Peptide	1 μ g/ml Peptide ins Well mit Medium+HS	10 μ g/ml Peptide in Medium ohne HS, 2 Stunden im Inkubator, dann 2 Waschschrirte	20 μ g/ml Peptide in Medium ohne HS, 2 Stunden im Inkubator, dann 2 Waschschrirte
Zellzahl pro Well	5 x 10 ⁶	5 x 10 ⁶	15 x 10 ⁶ gesplittet an Tag 6 und event. 10
Interleukine	IL-4 und IL-7 an Tag 0 und 1 IL-2 an Tag 3 und 5	kein IL-4 und IL-7, IL-2 an Tag 4,6,8,10	kein IL-4 und IL-7, IL-2 an Tag 6 und 10

Zusätzlich wurde untersucht, ob das Splitten der Zellen an Tag 7 einen Vorteil bringt. In mehreren Experimenten wurden die aufgetauten PBMCs HLA-A2-positiver, gesunder Spender aus einem Buffy Coat entsprechend der verschiedenen Protokolle behandelt und die Ergebnisse in Hinblick auf Zellausbeute (Zellzahl nach Kultur bezogen auf die Zellzahl vor Kultur), Hintergrund und Stärke der Antwort gegen HLA-A2-restringierte Epitope von CMV-, EBV- und Influenza ausgewertet (Kapitel 3.1.1).

2.5.6 Ex-vivo-Elispot

Bei dieser Art des Elispots wurden die PBMCs abends aufgetaut und ohne Zugabe von Interleukinen über Nacht in den Inkubator gestellt. Am darauf folgenden Morgen wurde der Elispot wie sonst auch nach dem oben beschriebenen Protokoll durchgeführt.

2.6 Durchflusszytometrie

2.6.1 Materialien für Tetramer- und intrazelluläre Färbungen

BSA	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA, A4628
EDTA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, 0,5 M stock
FCS	PAA Laboratories, Pasching, Österreich, A15-101
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA, 47608
Glycerol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
GolgiStop	BD Biosciences, Franklin Lake, New Jersey, USA, 554724
IMDM-Medium	BioWhittaker, Verviers, Belgium, BE12-722F
Ionomycin	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA, I0634 (1 mM stock)
Natriumazid	Merck, Darmstadt, Deutschland, 1% Stock
PBS	Claudia Falkenburger (Abteilung für Immunologie, Universität Tübingen)
PMA	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA, P8139, 1 mg (10 µg/ml stock)
Protease-Inhibitor	Complete inhibitor tablet, Roche, Mannheim, 11697498001 (gelöst in 2 ml 20 mM Tris pH8, 25x stock solution)

Saponin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA, S7900-25g
Cytofix/Cytoperm	BD Biosciences, Franklin Lake, New Jersey, USA, 554722
Streptavidin-PE	Invitrogen, Eugene, OR, USA
Streptavidin-APC	Invitrogen, Eugene, OR, USA
Tris	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Antikörper	siehe Versuchsdurchführung!

Fix Solution: Tetramer-Puffer, 1% Formaldehyd

Permwash-Puffer: 500 ml PBS, 0,02% NaAzid, 0,5% BSA, 0,1% Saponin

Tetramer-Puffer: 500 ml PBS, 0,01% NaAzid, 2 mM EDTA, 2% FCS

Tetramer Solution: 20 ml PBS, 0,01% NaAzid, 2 mM EDTA, 50% FCS

2.6.2 Vorarbeiten zur Herunterregulierung des T-Zellrezeptors

Nach dem Elispot wurden die Zellen in einer 96-Well-Platte weiter kultiviert und nicht sofort mit Tetrameren gefärbt, da der T-Zellrezeptor direkt nach Peptidstimulation herunter reguliert wird [151, 152]. In einer Reihe von Experimenten wurde untersucht, ab welchem Tag nach Peptidstimulation der T-Zellrezeptor wieder mit dem entsprechenden Tetramer anfärbbar ist. Dafür wurden einige Vials mit PBMCs von gesunden HLA-A*02-positiven Spendern aufgetaut und am folgenden Tag mit einem CMV- und einem Influenza-Peptid in einer Endkonzentration von 1µg/ml stimuliert. Als Negativkontrolle diente das HIV-Peptid. Vor Stimulation und an den darauffolgenden Tagen wurde jeweils ein Teil der Zellen mit CMV- und Influenza-Tetramer sowie CD4- und CD8-Antikörper gefärbt, solange bis der Anteil der Tetramer-bindenden Zellen wieder das ursprüngliche Niveau erreicht hatte (Protokoll siehe Kapitel 2.6.3).

Für das Monitoring der UroRCC-Studie wurde den Zellen deswegen eine Ruhephase von 9 Tagen gegeben und nach Zugabe von IL-2 (an Tag 15) erst an Tag 21 gefärbt. Nur wenn im Elispot K562-A2-Zellen verwendet worden waren, mussten die PBMCs innerhalb von wenigen Tagen gefärbt werden, da sonst die sich stark vermehrenden Tumorzellen die Lymphozyten verdrängt hätten. Aus diesem Grund wurde die Tetramer-Färbung zwei Tage nach dem Elispot an Tag 14 durchgeführt und „überkreuz“ gefärbt. Z.B. wurden die Zellen, die im

Elispot mit CCND1-Peptid stimuliert worden waren, mit einem MET-Tetramer gefärbt und umgekehrt.

2.6.3 Prinzip der Tetramer-Färbung

Über lange Zeit war es nicht möglich, Antigen-spezifische T-Zellen so anzufärben, dass sie im Durchflusszytometer gemessen werden konnten. Die Anfärbung war schwierig, weil die T-Zellen Peptide nur in Verbindung mit einem MHC-Komplex erkennen und diese Bindung nicht sehr stabil ist. Der Durchbruch gelang mit der Bildung von Multimeren aus den MHC:Peptid-Komplexen [153]. In Abbildung 10 sind Aufbau und Funktionsweise der Tetramere schematisch dargestellt.

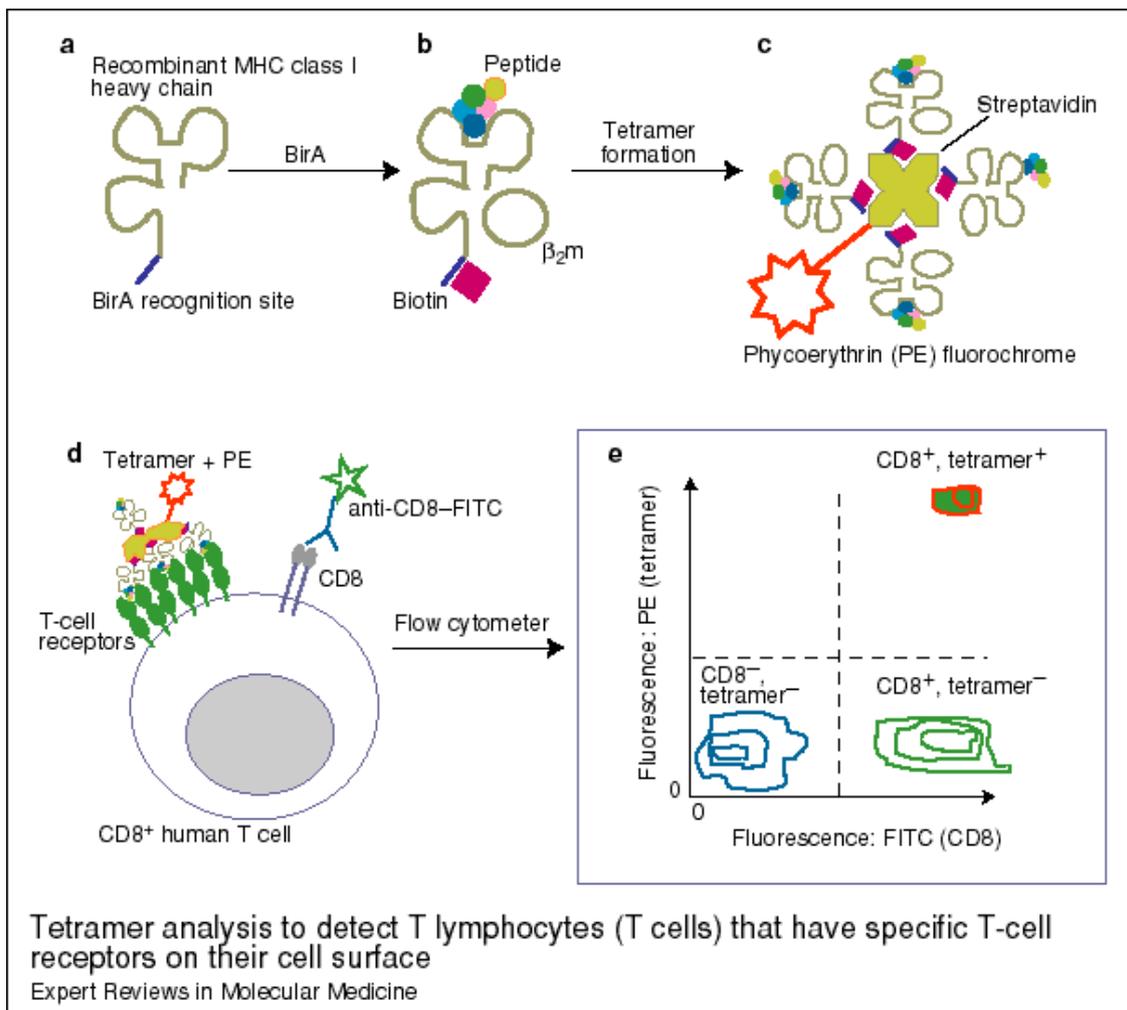


Abbildung 10: Schema zu Aufbau und Funktionsweise der Tetramere; Autor: Julian Hickling [154]; a) Die schwere Kette des MHC-Klasse-I-Moleküls wird rekombinant in *E.coli* synthetisiert. b) Die schwere Kette wird an ihrem Carboxylende mit Hilfe des Enzyms BirA biotinyliert und in

Anwesenheit von β_2 -Mikroglobulin (β_2m) und Peptiden, deren Erkennung durch T-Zellen untersucht werden soll, rückgefaltet. c) Jeweils vier der so entstandenen Monomere binden an ein zentrales Streptavidinmolekül, das vier Bindungsstellen für Biotin besitzt, sowie mit einem Fluorochrom markiert ist (PE steht für Phycoerythrin, alternativ kann Allophycocyanin (APC) verwendet werden). d) Die Tetramere binden nur an T-Zellen, die den für das Peptid spezifischen T-Zellrezeptor auf ihrer Oberfläche tragen. Außerdem sind die Zellen mit einem FITC-markierten anti-CD8-Antikörper gefärbt. e) Analyse mittels Durchflusszytometrie, in der die beiden Kanäle in einem Plot gegeneinander aufgetragen sind. Die CD8+ T-Zellen, die das Tetramer gebunden haben, liegen im rechten oberen Quadranten.

2.6.4 Herstellung der Tetramere

Die für die Tetramerherstellung verwendeten Monomere wurden in der Abteilung für Immunologie Tübingen hergestellt und bei -80°C aufbewahrt.

Zu 50 μg des Monomers wurden insgesamt 78,5 μl Streptavidin-PE oder 42,5 μl Streptavidin-APC (je nach gewünschtem Fluorochrom) in 10 Schritten zugegeben. Nach jeder Zugabe wurde der Ansatz 30 Minuten bei 4°C auf einem Drehrad gemischt. Der nicht benötigte Anteil der fertigen Tetramere wurde in einer Lösung aus Tris 20 mM mit 0,5% Bovine Serum Albumin, 0,02% Natriumazid, 16% Glycerol und Protease-Inhibitor bei -80°C eingefroren.

Nach dem Auftauen wurden die Tetramere im Kühlschrank aufbewahrt und höchstens für einen Zeitraum von 4 Wochen verwendet.

2.6.5 Tetramer-Färbung

Die PBMCs aus den Triplikaten, die sich seit dem Elispot in einer 96-Well-Platte befanden, wurden in Eppendorf-Röhrchen gepoolt und die Wells mit 100 μl Tetramer-Puffer gewaschen. Nach Zentrifugation (2000 U/min, 3 Minuten) und Abnahme des Überstands wurden die Zellen in Tetramer-Puffer resuspendiert, in eine 96-Well-Platte transferiert und zentrifugiert. Dieser und alle weiteren Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4°C , 1500 U/min, 5 Minuten. Um den Überstand zu entfernen wurde die Platte ins Waschbecken geflickt und kurz auf Zellstofftücher gedrückt. Nun wurden die PBMCs mit einem FITC-konjugierten anti-CD4-Antikörper und einem PeCy7-konjugierten anti-CD8-Antikörper gefärbt. In jedes Well wurden dabei 50 μl des Ansatzes mit den beiden Antikörpern gegeben und mit einer Pipette gut vermischt.

CD4-FITC 1:100 eigene Herstellung (Hybridome: HP2/6)

CD8-PeCy7 1:120 BeckmanCoulter, 737661

Nach 20 Minuten Inkubation bei 4°C im Dunkeln wurden die Zellen mit 150 µl Tetramer-Puffer pro Well gewaschen und zentrifugiert, um überschüssige, ungebundene Antikörper zu entfernen. Im nächsten Schritt folgte die Färbung mit Tetrameren, die in Tetramer Solution aufgenommen und zur Abtrennung von Aggregaten 5 Minuten bei 13.000 U/min und 4°C zentrifugiert worden waren. Die eingesetzte Konzentration von Tetrameren variierte je nach Tetramer zwischen 2,5 und 5 µg/ml, wobei für die als Kontrolle verwendeten Influenza-, CMV- und EBV-Tetramere eine Konzentration von 3 µg/ml ausreichte. In jedes Well wurden 50 µl des Tetramer-Ansatzes gegeben und die Platte in den Kühlschrank gestellt. Nach 30 Minuten Inkubation wurden die Zellen nochmals mit 150 µl Tetramer-Puffer gewaschen und in 150 µl Fix Solution (Tetramer Puffer mit 1% Formaldehyd) fixiert. Bis zur Messung im Durchflusszytometer wurden sie bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

2.6.6 Intrazelluläre Zytokinfärbung

Wie in der Tetramer-Färbung wurden für die intrazelluläre Färbung Zellen aus dem Elispot verwendet, die nach Zugabe von IL-2 (an Tag 15) an Tag 21 getestet wurden. Der Versuch bestand aus einer Peptidstimulation und einer Zytokinfärbung nach 6 Stunden Inkubation.

Die Triplikate aus dem Elispot wurden in Eppendorf-Röhrchen gepoolt, zentrifugiert (2000 U/min, 3 Minuten) und nach Entfernung des Überstands in so viel Kultiviermedium aufgenommen, dass je Test 100 µl der Zellsuspension in eine 96-Well-Platte gegeben werden konnte. Um zu verhindern, dass die T-Zellen bei Aktivierung ihr IFN γ abgeben, wurde GolgiStop-Solution verwendet. Sie blockiert den intrazellulären Proteintransport, sodass die Zytokine im Golgi-Apparat akkumulieren. Dadurch lassen sich aktivierte Zytokin-produzierende Zellen im Durchflusszytometer besser detektieren. Der Ansatz aus GolgiStop und Kultiviermedium in einer 1:1500-Verdünnung wurde auf mehrere Eppendorf-Röhrchen verteilt und die für die Stimulation benötigten Peptide zugegeben. Pro Ansatz sollte eine Endkonzentration von 5 µg/ml erreicht werden. Bei Zugabe von 50 µl musste im Ansatz also die 3-fache Peptidkonzentration enthalten sein, da das Endvolumen im Well 150 µl war.

Zusätzlich zu den Impfpeptiden gab es immer eine Negativkontrolle (HIV für HLA-Klasse I und II) und eine Positivkontrolle (PMA 50 ng/ml und Ionomycin 1 µM Endkonzentration). Nach Zugabe von Golgi-Stop und Peptiden wurden die Zellen 3 Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert, damit sie dicht beieinander lagen und für 6 Stunden in den Inkubator gestellt.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit anti-CD4- und anti-CD8-Antikörpern gefärbt, permeabilisiert und im letzten Schritt mit Antikörpern gegen verschiedene Zytokine gefärbt.

In jedes Well wurde 50 µl Tetramer-Puffer gegeben und die Zellen für 5 Minuten bei 1500 U/min und 4°C zentrifugiert. Die Platte wurde dann kräftig in einem Ruck gestürzt und auf Zellstofftücher gedrückt. Es folgte noch ein weiterer Waschschrift mit 150 µl Tetramer-Puffer, bevor in jedes Well 50 µl des Ansatzes der gegen extrazelluläre Strukturen gerichteten Antikörper gegeben wurde. Die FACS-Antikörper wurden in folgender Verdünnung verwendet:

CD4-FITC	1:100	eigene Herstellung
CD4-PE	1:75	BeckmanCoulter, A07751
CD4-APC	1:70	BeckmanCoulter, IM2468
CD8-PeCy7	1:120	BeckmanCoulter, 737661

Nach 20 Minuten Inkubation im Kühlschrank wurde jedes Well mit 150 µl Tetramer-Puffer wie oben beschrieben gewaschen und dann die Zellen mit 100 µl/ Well einer Cytofix/Cytoperm Solution für 20 Minuten permeabilisiert. Ab dem nun folgenden Waschschrift wurde nur noch Permwash-Puffer (100 µl/ Well) verwendet, der im Gegensatz zum Tetramer-Puffer Saponin und Bovine Serum Albumin enthält. Die Zentrifugationsgeschwindigkeit wurde auf 1700 U/min erhöht (5 Minuten, 4°C). Zum Schluss wurden Antikörper gegen IFN γ in einer Verdünnung mit Permwash Puffer zugegeben. Um weitere Informationen über die aktivierten T-Zellen zu erhalten, wurden in den meisten Färbungen zusätzlich unterschiedliche Kombinationen von IL-2-, IL-5- oder IL-10-Antikörpern eingesetzt.

IFN γ -FITC	1:200	BD Biosciences, 554700
IL2-PE	1:120	BD Biosciences, 554566
IL5-APC	5 μ l/ test	BD Biosciences, 554396
IL10-PE	1:120	BD Biosciences, 554706
IL10-APC	1:50	BD Biosciences, 554707

Nach 30 Minuten Inkubation wurden die Wells ein letztes Mal mit 150 μ l Perm-wash Puffer gewaschen, in 150 μ l Fix Solution (Tetramer-Puffer mit 1% Formaldehyd) fixiert und am selben Abend oder nächsten Morgen im Durchflusszytometer gemessen.

2.6.7 HLA-Expression der Tumorzellen

Um die Expression der verschiedenen HLA-Moleküle auf Tumorzelllinien zu messen, wurden FACS-Färbungen durchgeführt. Die zu untersuchenden Zellen wurden jeweils mit einem der folgenden Antikörper gefärbt:

- 1) W 6/32 (HLA-A,B,C) 1:100
BB 7.2 (HLA-A2) 1:500
GAP-A3 (HLA-A3) 1:200
Tü 39 (HLA-DR, -DP, -DQ) 1:100
Probe ohne Erstantikörper als Negativkontrolle
- 2) Goat-anti-Mouse-FITC 1:100
(Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA, 115096062)

Die Antikörper wurden wie angegeben in FACS-Puffer verdünnt und je 100 μ l in ein FACS-Tube mit ca. 500.000 Zellen gegeben. Nach 30 Minuten Inkubation bei 4°C wurden 2 ml FACS-Puffer zugegeben und die Zellen bei 1700 U/min 3 Minuten zentrifugiert und der Überstand entfernt. In alle Ansätze wurden nun 100 μ l des IgG-Antikörpers Goat-anti-Mouse-FITC in einer 1:100- Verdünnung pipettiert und die Zellen wie im ersten Schritt inkubiert und zentrifugiert. Die Fixation erfolgte durch Resuspension der Zellen in 250 μ l 1%-Formaldehyd-Lösung.

2.6.8 Versuche mit MZ1257

Um zu untersuchen, ob die induzierten CD4+ T-Zellen ihr spezifisches Antigen auch erkennen, wenn es auf einer RCC-Tumorzelllinie exprimiert ist, wurde folgender Versuch durchgeführt: PBMCs von Patienten, die in zuvor durchgeführten HLA-Klasse-II-Elispots stark auf CCND1 reagiert hatten, wurden nach dem oben beschriebenen Protokoll aufgetaut, stimuliert und 12 Tage in Kultur vermehrt. Aus verschiedenen Tumorzelllinien wurde die RCC-Zelllinie MZ1257 für den Versuch ausgesucht (siehe Kapitel 3.12.3). Die Tumorzellen wurden 48 h vor der Färbung auf vier Kulturflaschen gesplittet, von denen zwei IFN γ in einer Konzentration von 400 units/ml enthielten. Am Morgen der Färbung wurden die Tumorzellen abgelöst und mehrfach gewaschen, bevor sie mit 20 μ g/ml HIV bzw. CCND1 in 2ml Medium ohne Serum beladen wurden. Nach 1,5 h im Inkubator erfolgten zwei weitere Waschschriffe. Nun wurden jeweils 1 Million PBMCs und 1 Million Tumorzellen zusammen 6 Stunden inkubiert und dann mit CD4-, CD8- und IFN γ -Antikörpern gefärbt (Protokoll wie in Kapitel 2.6.6).

2.7 Statistik

Die Elispots wurden stets in Triplikaten durchgeführt, sodass ein Mittelwert und die Standardabweichung berechnet werden konnte (Programm: Microsoft Office Excel 2002). Die Kriterien für eine positive Antwort auf ein Impfpeptid waren:

- a) Mittlere Spotanzahl mindestens doppelt so hoch wie in der Negativkontrolle
- b) t-Test für zwei unabhängige Stichproben (Spotanzahl in Negativkontrolle und im Ansatz mit Impfpeptid) mit ungleicher Varianz ergibt, dass die Mittelwerte der zugehörigen Verteilungen auf einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ unterschiedlich sind
- c) Minimale spezifische Spotanzahl: ≥ 10 Spots pro Well

Zusätzlich wurden die Ergebnisse mit einer zweiten Methode (Tetramer-Färbung für HLA-Klasse I und intrazelluläre Zytokinfärbung für HLA-Klasse II) überprüft.

3 Ergebnisse

3.1 Voruntersuchungen

3.1.1 Protokollvergleich

Zu Beginn dieser Arbeit lag ein Protokoll für die Präsensitivierung von CD8+ T-Zellen vor, das schon seit längerer Zeit in der Arbeitsgruppe verwendet wurde. Vor Beginn der eigentlichen Experimente wurde dieses Protokoll mit zwei anderen Protokollen B und C (siehe Kapitel 2.5.5) verglichen. Zur Stimulation der T-Zellen wurden virale Antigene der HLA-Klasse I verwendet (Peptidsequenzen in Kapitel 2.4.1).

Die Experimente ergaben für das Protokoll B die beste Zellausbeute mit $\approx 79\%$ (Anzahl der Experimente $n=4$), für das bisher verwendete Protokoll $\approx 67\%$ ($n=6$) und für das Protokoll C nur $\approx 33\%$ ($n=5$). Das Splitten der Zellen an Tag 7 führte zu keiner Verbesserung der Ergebnisse. Obwohl das Protokoll C eine hohe Spotanzahl pro eingesetzter Zellzahl zeigte, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt, da gleichzeitig der Hintergrund deutlich erhöht und die Ausbeute nach Kultur sehr niedrig war. Das Protokoll B zeichnete sich durch eine gute Ausbeute bei starken Elispot-Antworten aus. Nach einigen ergänzenden Versuchen, die vor allem den Einfluss der IL-2-Zugabe überprüften, wurde unser Protokoll ab dem 20.07.2007 geändert und zusätzlich zu Tag 3 und 5 auch an den Tagen 7 und 9 der Kultur IL-2 in einer Endkonzentration von 2 ng/ml zugegeben. Eines dieser Experimente ist beispielhaft in Abbildung 11 gezeigt.

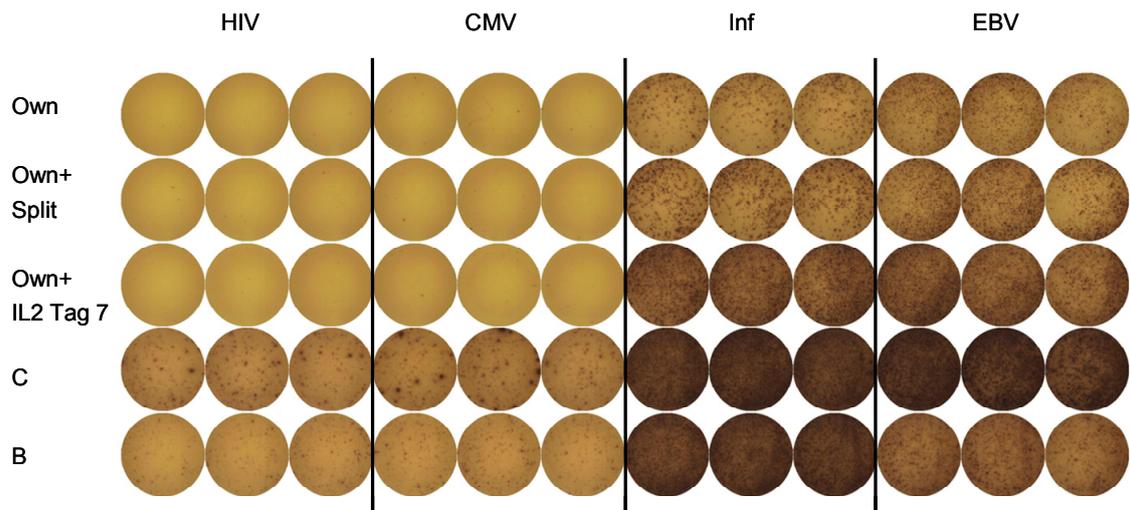


Abbildung 11: Vergleich verschiedener Protokolle der Präsensitivierung; HLA-Klasse-I-Elispot; eingesetzt wurden 200.000 PBMCs in drei Ansätzen für jedes Peptid (Triplikate)

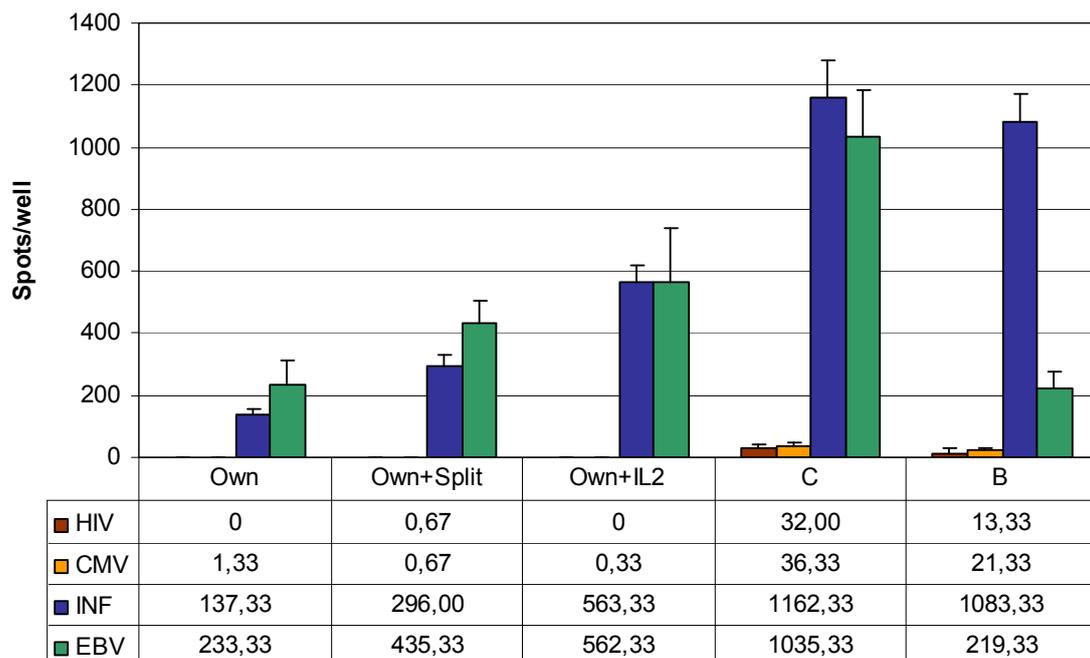


Abbildung 12: Vergleich verschiedener Protokolle der Präsensitivierung; Balkendiagramm zum oben gezeigten Elispot mit Standardabweichung; in der Tabelle ist der Mittelwert aus der Spotanzahl in den drei Ansätzen pro Peptid angegeben; mit 200.000 PBMCs in jedem Ansatz

3.1.2 Receptor downregulation

Zytotoxische T-Zellen regulieren nach Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen den TCR-Rezeptor herunter (siehe Kapitel 2.6.2). Für die Tetramer-Färbungen

war es nun wichtig zu wissen, in welchem Zeitfenster dieser Rezeptor nach Aktivierung nicht mehr auf der Zelloberfläche exprimiert ist und seine Anfärbung somit nicht möglich wäre. Auch hier wurden virale Antigene der HLA-Klasse I zur Stimulation der T-Zellen eingesetzt (Peptidsequenzen in Kapitel 2.4.1).

Die Ergebnisse der drei durchgeführten Versuche sind in Tabelle 7 aufgelistet. Der T-Zellrezeptor war an Tag 1 nach Stimulation deutlich herunter reguliert (auf 0-0,03% der CD8+ Zellen). Der Anteil CMV-Tetramer-bindender Zellen stieg dann langsam wieder an, erreichte aber im ersten Versuch nicht den ursprünglichen Wert bis Tag 5. Im nächsten Versuch wurde deswegen über einen längeren Zeitraum gefärbt, mit dem Ergebnis, dass an Tag 7 nach Stimulation der Anteil Tetramer-bindender Zellen über den der unstimulierten Negativkontrolle anstieg. Die Anzahl Influenza-positiver CD8+ Zellen stieg in diesem Versuch ebenfalls an, ohne jedoch das Ausgangsniveau von 0,34% zu erreichen. Im letzten der drei Versuche wurde überprüft, ob eine IL-2-Zugabe an Tag 3 diesen Prozess beschleunigt. Tatsächlich war in diesem Fall die Anfärbung mit CMV-Tetrameren schon ab Tag 5 und mit Influenza-Tetrameren ab Tag 6 möglich. Der Anteil CMV-spezifischer T-Zellen stieg nach der IL-2-Zugabe von 0,28% auf 16% der CD8+ Zellen an Tag 6 nach Stimulation. Die Zunahme der Influenza-spezifischen Zellen von 0,1% auf 2,68% im selben Zeitraum fiel in diesem Experiment schwächer aus.

Tabelle 7: Versuche zur Anfärbbarkeit des TCR nach Stimulation mit Peptiden; drei unabhängige Experimente mit PBMCs von drei gesunden Spendern; Stimulation mit Peptiden von CMV und Influenza (Inf) an Tag 0; Konzentration: 1 µg/ml in 150 µl Kultiviermedium; für die Negativkontrolle wurde an Tag 0 statt CMV/Inf nur HIV-Peptid zugegeben (angegeben ist das Ergebnis der Färbung von Tag 1, dieser Anteil blieb an allen folgenden Tagen konstant); Färbung dieser Zellen mit den CMV- und Inf-Tetramer an den folgenden Tagen; angegeben ist jeweils der Anteil Tetramer-positiver Zellen unter den CD4-neg.-CD8+ Zellen

	HIV	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9
1.)										
CMV	0,27%	0,09%	0,02%	0,11%	0,16%	0,11%	-	-	-	-
Inf	0,11%	0,03%	0,11%	0,04%	0,05%	0,04%	-	-	-	-
2.)										
CMV	1,85%	0,03%	0,02%	0,02%	0,02%	0,3%	0,21%	3,62%	5,03%	5,88%
Inf	0,34%	0,01%	0,03%	0,00%	0,02%	0,03%	0,02%	0,12%	0,09%	0,2%

3.)										
CMV	0,28%	0,01%	-	-	-	0,35%	16%	15,7%	-	-
Inf	0,1%	0,00%	-	-	-	0,02%	2,68%	3,16%	-	-

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die PBMCs nach dem Elispot nicht sofort gefärbt, sondern 7 Tage unter Zugabe von IL-2 an Tag 3 weiter kultiviert und dann erst mit Tetrameren gefärbt. Dies galt nicht im Fall von HLA-A*02, da diese zusammen mit K562-A2 im Elispot waren und aufgrund des schnellen Wachstums der Tumorzellen möglichst frühzeitig gefärbt werden mussten (vgl. Kapitel 2.6.2).

Im Folgenden werden die Ergebnisse des T-Zell-Monitorings von 10 Patienten aus der Uro-RCC-Studie präsentiert. Die Versuche wurden im Zeitraum von April 2007 bis Januar 2008 im Interfakultären Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie der Universität Tübingen durchgeführt. Die Darstellung der Ergebnisse aus Elispot und Durchflusszytometrie erfolgt getrennt nach Patient sowie nach HLA-Klasse I und II. Für RCC285 liegt ein ex-vivo-Elispot mit positiver Klasse-II-Antwort vor. Darüber hinaus wird ein Versuch zur Erkennung physiologischer Peptidkonzentrationen auf der Tumorzelllinie MZ1257 durch CD4-T-Zellen angesprochen. Das Kapitel schließt mit einer Zusammenfassung der Ergebnisse.

3.2 RCC150

3.2.1 Allgemeine Informationen

Geschlecht:	männlich
Alter:	74 Jahre
Tumorstadium:	pT3 NX M0, G2 (IIIB nach Flocks)
HLA-Typ:	A1 <u>A</u> 2B8
Adjuvans:	GM-CSF
Studienverlauf:	18 Vakzinierungen (vollständig), lokales Erythem ab der 1. bis zur 9. Vakzinierung
Klinischer Verlauf:	kein Rezidiv innerhalb des Studienzeitraumes

3.2.2 HLA-Klasse I

Dieser Patient erhielt alle 18 Vakzinierungen mit dem Standard-Peptidcocktail für HLA-A*02 (vgl. Kapitel 2.1.4). In der Folge sind bei der Angabe der HLA-Typen bei jedem Patienten nur diejenigen unterstrichen, von denen Peptide im Impfcocktail enthalten waren. Bei RCC150 war erst spät im Verlauf der Vakzinierungen eine leichte Zunahme der IFN γ -Produktion im Elispot zu beobachten. Während an Tag 0 und den folgenden Zeitpunkten keine T-Zellinduktion nachweisbar war (zuvor durchgeführte Experimente, Daten nicht gezeigt), ist die Anzahl der Spots für drei Peptide (CCND1, GUCY und RGS2) bei der 17. Vakz. im Vergleich zur HIV-Kontrolle erhöht, ohne dabei aber das Signifikanzniveau zu erreichen (vgl. Abbildung 13). Auch ein zweites Experiment zeigte eine ähnlich schwache Antwort auf diese Peptide zum Zeitpunkt der 18. Vakzinierung.

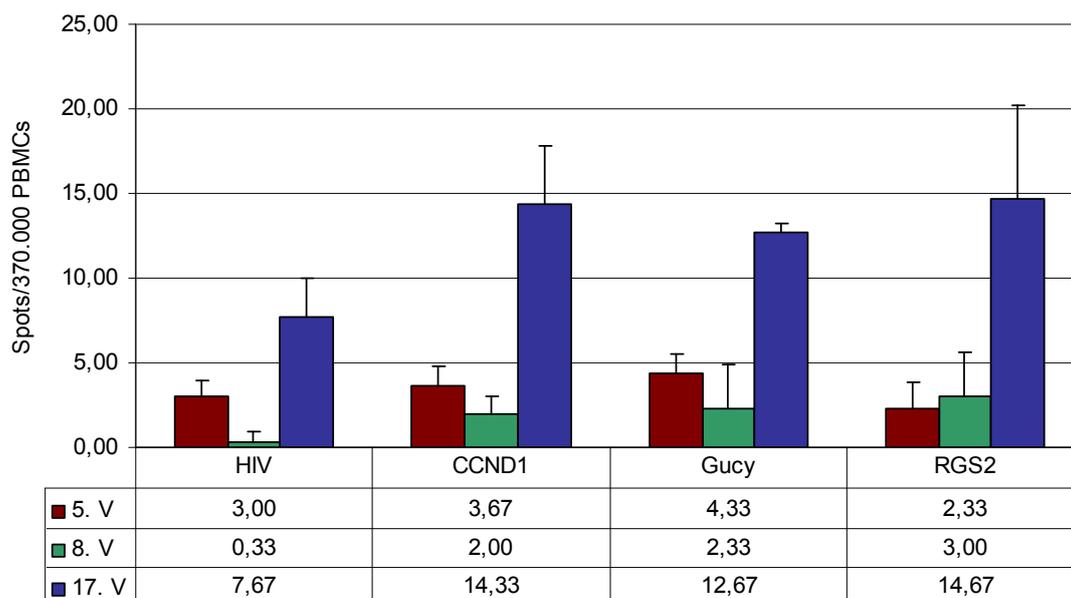


Abbildung 13: HLA-Klasse-I-Elispot von RCC150; Test der Einzelpeptide; Balkendiagramm mit Standardabweichung; in der Tabelle ist der Mittelwert aus der Spotanzahl in den drei Ansätzen pro Peptid angegeben; mit 370.000 PBMCs in jedem Ansatz

Bei Stimulation mit PHA reagierten die PBMCs mit einer so starken IFN γ -Sekretion, dass die einzelnen Spots nicht abgrenzbar waren und vom Elispot-reader nicht ausgezählt werden konnten. Da die Positivkontrolle mit PHA in

fluenza-Tetramer, alle drei Plots dieser Spalte sind vom Zeitpunkt der 5. Vakz.; 2. Spalte: CCND1-Tetramer unter R1+R2; 3. Spalte: beide Tetramere zum Ausschluss doppelt positiver Zellen (TLR-unspezifische Bindung) unter R1+R3

3.2.3 HLA-Klasse II

Die Zellen dieses Patienten zeigten im Elispot (Abbildung 15) eine deutliche Antwort auf die Peptide der Klasse II von CCND1 und G250. Die Stärke der Antwort fiel zur Mitte der Vakzinierungen hin ab und stieg dann wieder an. Dies muss nicht die Situation in vivo widerspiegeln, sondern kann auch darauf zurückgeführt werden, dass die Zellen nach Isolation, Einfrieren, Auftauen und Zellkultur in unterschiedlichem Zustand waren. Bei Stimulation mit MMP7 und IBP3 trat keine IFN γ -Produktion auf.

Die Positivkontrollen mit SEB führten in allen HLA-Klasse-II-Elispots zu einer starken IFN γ -Antwort und werden in den nachfolgend gezeigten Experimenten nicht mehr erwähnt.

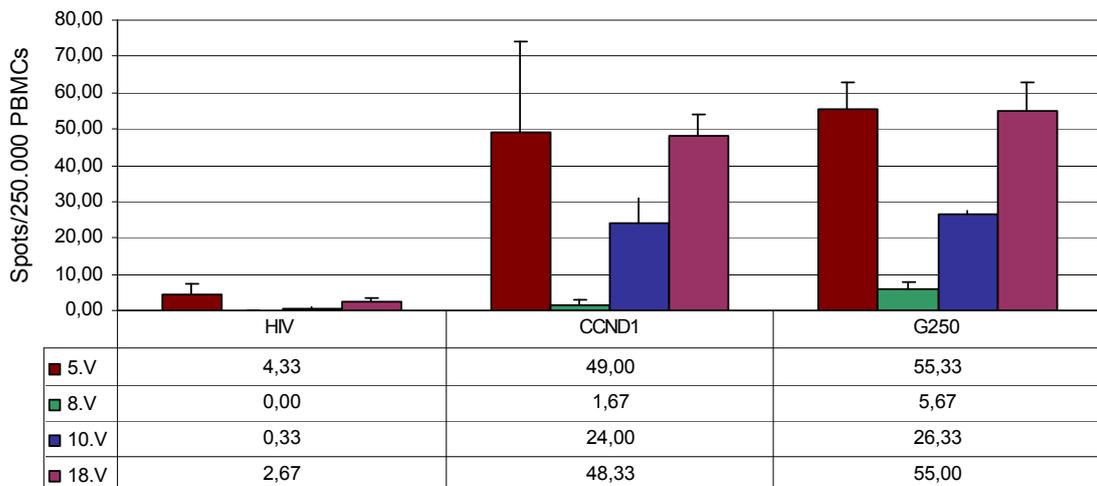


Abbildung 15: HLA-Klasse-II-Elispot von RCC150; in der Tabelle ist der Mittelwert aus der Spotanzahl in den drei Ansätzen pro Peptid angegeben; mit 250.000 PBMCs in jedem Ansatz

Diese Ergebnisse konnten auch in einer intrazellulären Färbung bestätigt werden, wie sich der Abbildung 16 entnehmen lässt.

Um einen Hinweis darauf zu erhalten, welche T-Zell-Subpopulationen an dieser Antwort gegen CCND1 und G250 beteiligt waren, wurde zusätzlich mit FACS-Antikörpern gegen IL-5 und IL-10 gefärbt. Beide Antikörper hatten eine leichte

Hintergrundfärbung, die sich nicht durch Veränderung der eingesetzten Konzentrationen vermeiden ließ.

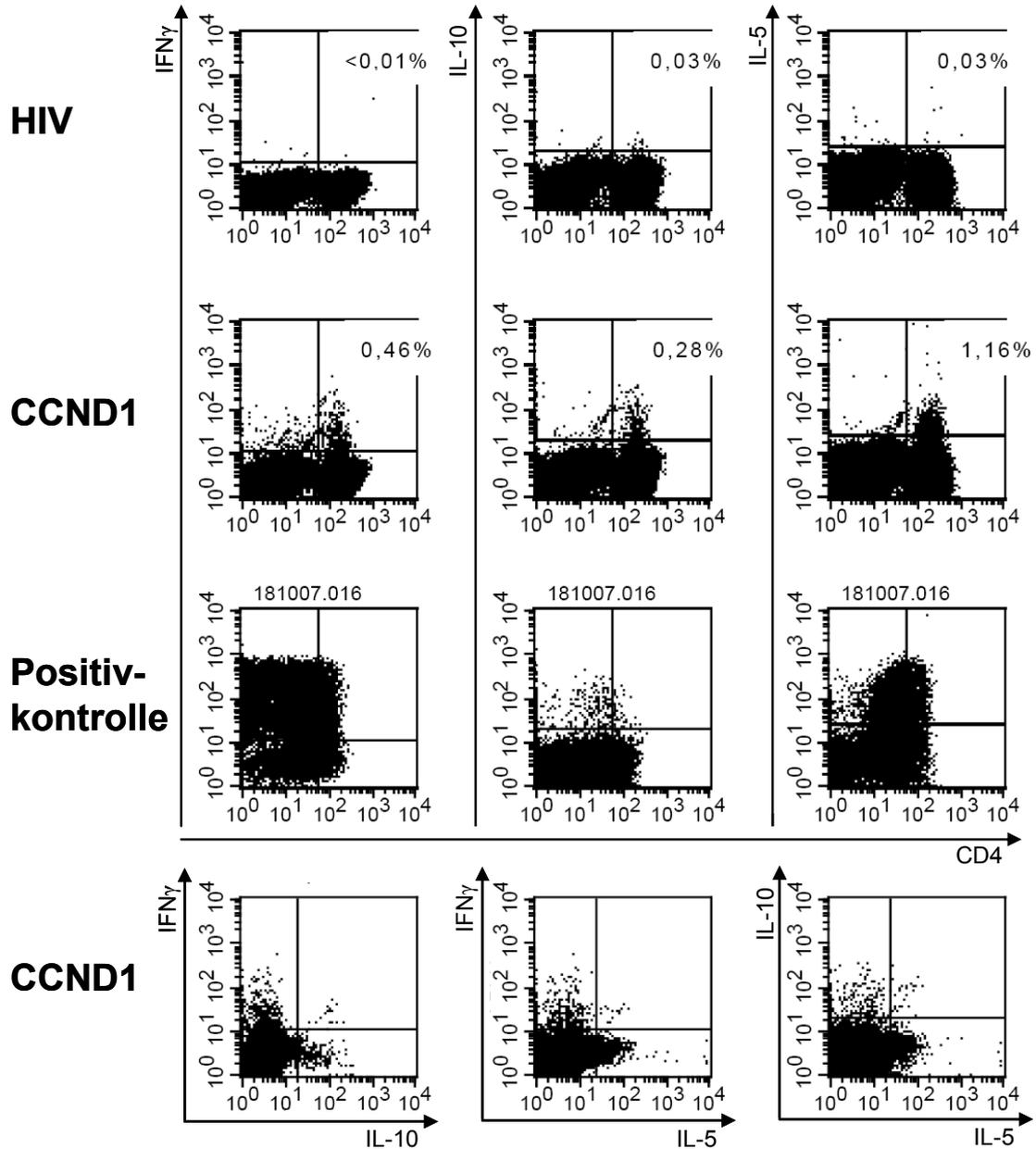


Abbildung 16: Intrazelluläre Färbung HLA-Klasse II von RCC150; Kanäle: IFN γ /IL-10/CD4/IL-5; R1: Gate auf Lymphozyten, R2: Gate auf CD4⁺-Zellen; PBMCs der 18. Vakz.; in den ersten zwei Reihen ist die Zytokinproduktion nach Stimulation mit dem links genannten Peptid gezeigt, die Prozentangaben beziehen sich dabei auf die CD4⁺-Zellen; Positivkontrolle: stimuliert mit PMA-Ionomycin; in der letzten Reihe sind unter den Gates R1+R2 die Zytokine gegeneinander aufgetragen um eventuell vorhandene doppelt positive Zellen sichtbar zu machen

Es ist deutlich zu erkennen, dass bei der 18. Vakz. nicht nur die IFN γ -Produktion der CD4+-T-Zellen erhöht ist, sondern auch die von IL-5 und IL-10. Bei diesem Patienten fiel die IL-5-Antwort sogar stärker aus als die IFN γ -Antwort. In diesem Zusammenhang ist die Frage von Bedeutung, ob Zytokine jeweils von denselben Zellen produziert wurden und somit im Durchflusszytometer als doppelt positive Zellen registriert worden wären. Dies war aber nicht der Fall: Ließ man sich die zwei Kanäle mit den Interleukinen in einem Plot anzeigen, gab es im rechten oberen Quadranten kaum doppelt positive Zellen (wie in der letzten Reihe von Abbildung 16). Somit handelte es sich um verschiedene Zellpopulationen, die auf die Peptidstimulation mit einer Zytokinproduktion reagierten.

3.3 RCC197

3.3.1 Allgemeine Informationen

Geschlecht:	männlich
Alter:	49 Jahre
Tumorstadium:	pT3 NX MX, G2
HLA-Typ:	<u>A2A3B35B45</u>
Adjuvans:	GM-CSF
Studienverlauf:	18 Vakzinierungen (vollständig), lokales Erythem nach der ersten Vakzinierung und auch danach
Klinischer Verlauf:	kein Rezidiv innerhalb des Studienzeitraumes

3.3.2 HLA-Klasse I

Im ersten Elispot zeichnete sich eine schwache IFN γ -Antwort nach Stimulation mit Pool 2 bei der 7. und 10. Vakz. ab, während sich die Anzahl der Spots bei der 1., 13., 15. und 18. Vakzinierung kaum von der HIV-Negativkontrolle unterschied. In der Folge wurden die Peptide aus Pool 2 (MUC1, ADFP1, MET1, RGS2 und CCND1) einzeln getestet. Da der Elispot nur in Duplikaten durchgeführt wurde, war die statistische Auswertung (Standardabweichung und t-Test) nicht möglich. Gegen MUC1, ADFP1, MET1 und RGS5 waren in diesem Elispot

keine Antworten nachweisbar, während sich eine schwache Reaktion gegen CCND1 bei der 10. und 15. Vakz. andeutete.

Bei Wiederholung dieses Versuches wurden die PBMCs in Triplikaten und mit 400.000 statt 300.000 Zellen pro Well getestet. Die Ergebnisse dieses Elispots können anhand von Abbildung 17 nachvollzogen werden.

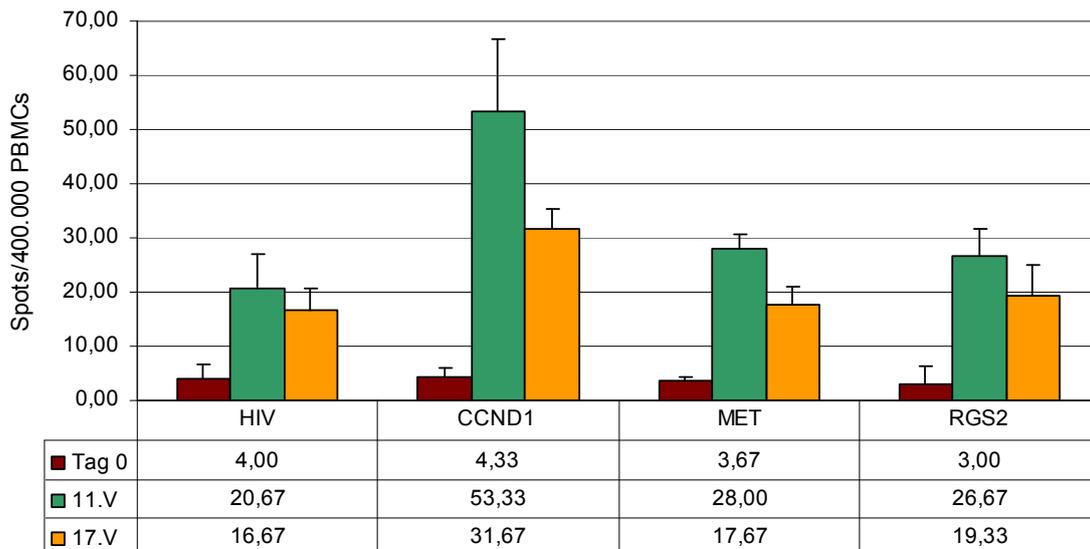


Abbildung 17: HLA-Klasse-I-Elispot von RCC197; in der Tabelle ist der Mittelwert aus der Spotanzahl in den drei Ansätzen pro Peptid angegeben; mit 400.000 PBMCs in jedem Ansatz

Bei der 11. Vakz. wurden im Ansatz mit CCND1 im Durchschnitt 53 Spots gezählt. Der Hintergrund in der HIV-Negativkontrolle war mit 21 Spots vergleichsweise hoch. Dieses Phänomen einer Antwort gegen Impfpeptide bei zugleich erhöhtem Hintergrund ist auch schon bei anderen Patienten aufgetreten. Die bei der 11. Vakzinierung aufgetretene Antwort auf CCND1 ist bei diesem Patienten statistisch signifikant (doppelte Spotanzahl im Vergleich zur Negativkontrolle und t-Test). Bei der 17. Vakzinierung ergab der t-Test einen signifikanten Unterschied, die notwendige Spotanzahl in der Probe wurde jedoch knapp verfehlt.

Die Zunahme der Spots in den Ansätzen mit MET und RGS2 ist so gering, dass man nicht von einer spezifischen T-Zell-Antwort sprechen kann. Ob in diesem Fall eine kleine Population spezifischer T-Zellen vorliegt, die sich während der Präsensitivierungsphase nicht vermehrt hat oder ob die Spotanzahl in diesen

Wells zufällig erhöht war, lässt sich nicht mit Sicherheit sagen. Insgesamt scheint die Antwort bei der 17. Vakz. schwächer auszufallen, was die Ergebnisse der zuvor durchgeführten Testung der Peptide im Pool bestätigt.

Diese leichte Abnahme CCND1-spezifischer T-Zellen bei der 17. Vakzinierung wird auch in der Tetramer-Färbung deutlich (vgl. Abbildung 18). Während vor Vakzinierung und beim letzten Zeitpunkt fast keine Zellen das Tetramer gebunden haben, gab es zum Zeitpunkt der 11. Vakz. eine deutlich positive Population. MET und RGS2 waren in dieser Färbung negativ.

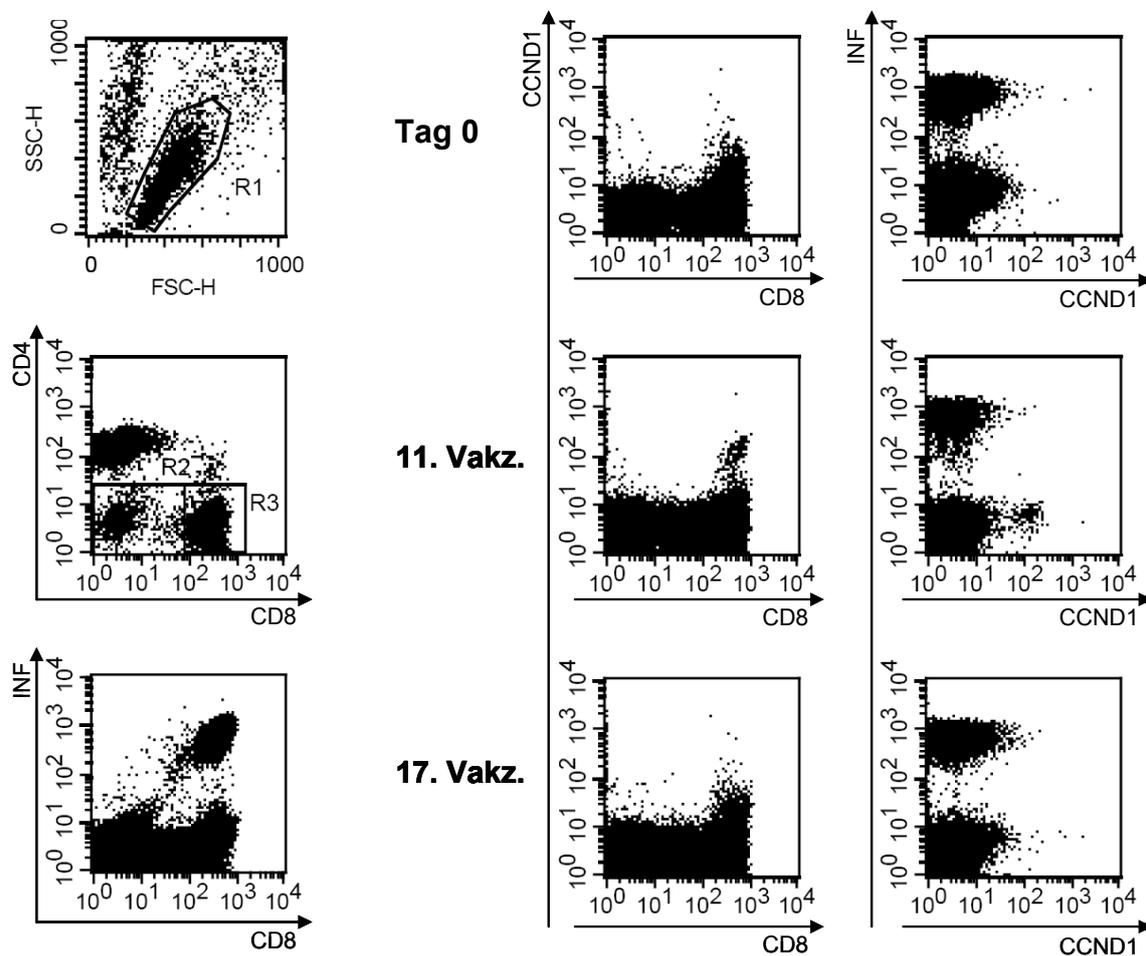


Abbildung 18: Tetramer-Färbung HLA-Klasse I von RCC197; Kanäle: CD4/Inf/CD8/CCND1; R1: Gate auf Lymphozyten (1% der Zellen angezeigt); R2: Gate auf CD4-neg. Zellen (5% der Zellen angezeigt); R3: Gate auf CD8+ Zellen; Positivkontrolle: Influenza-Tetramer an Tag 0; 2. Spalte: CCND1-Tetramer unter R1+R2; 3. Spalte: beide Tetramere zum Ausschluss von doppelt positiven Zellen (unspezifische Bindung) unter R1+R3

3.3.3 HLA-Klasse II

Bei niedrigem Hintergrund reagierten die PBMCs dieses Patienten stark auf die HLA-Klasse-II-Peptide von CCND1 und G250 (vgl. Abbildung 19). Die Stärke der Antwort nahm dabei im Verlauf der Vakzinierungen zu und erreichte den höchsten Wert bei der 17. Vakz. für G250 (≈ 200 Spots pro 100.000 Zellen).

Möglicherweise gab es bei diesem Patienten schon vor Vakzinierung CCND1-spezifische T-Zellen, da die Spot-Anzahl im Vergleich zur Negativkontrolle schon an Tag 0 leicht erhöht war.

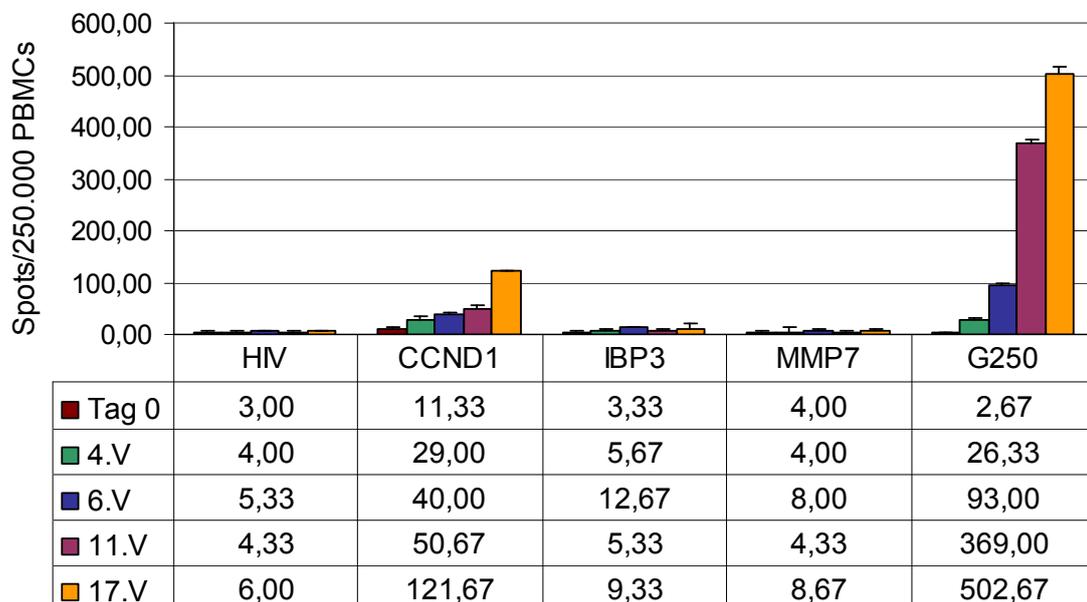


Abbildung 19: HLA-Klasse-II-Elispot von RCC197; in der Tabelle ist der Mittelwert aus der Spotanzahl in den drei Ansätzen pro Peptid angegeben; mit 250.000 PBMCs in jedem Ansatz

Da vom Zeitpunkt der 17. Vakz. noch 4 Millionen Zellen übrig waren, konnten zusätzlich zu $IFN\gamma$ die Interleukine IL-5 und IL-10 im Elispot getestet werden. Dieser Elispot funktionierte nach demselben Prinzip wie der $IFN\gamma$ -Elispot, mit dem Unterschied, dass die Elispot-Platte am Vortag mit IL-5- oder IL-10-Antikörpern beschichtet und entwickelt wurde.

Als Positivkontrolle wurde SEB verwendet. Die Negativkontrolle fehlt, da hierfür nicht genügend Zellen vorhanden waren. Einen Anhaltspunkt erhält man aber bei Betrachtung der Wells von MMP7, da dieses Peptid in allen Versuchen

(auch den FACS-Färbungen) ohne Ausnahme negativ war. Dieser Elispot zeigt wie die intrazellulären Färbungen anderer Patientenproben eine erhöhte IL-5-Produktion nach Stimulation mit CCND1 und G250. Gleiches gilt für IL-10, wobei die Spots hier weniger zahlreich und feiner waren (vgl. Abbildung 20).

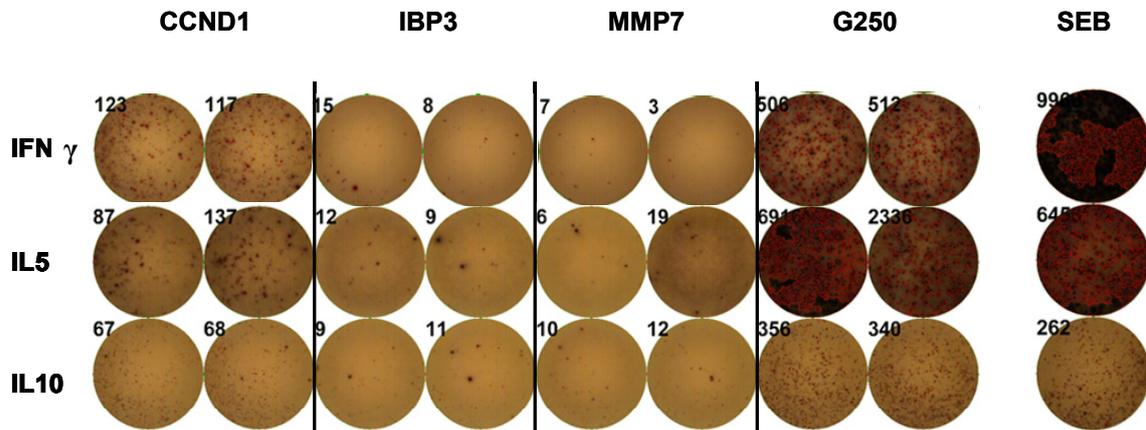


Abbildung 20: HLA-Klasse-II-Elispot von RCC197; in jedem Ansatz 250.000 PBMCs vom Zeitpunkt der 17. Vakz.; je eine Reihe mit IFN γ -, IL-5- und IL-10-Antikörpern beschichtet und entwickelt

3.4 RCC199

3.4.1 Allgemeine Informationen

Geschlecht:	männlich
Alter:	50 Jahre
Tumorstadium:	pT3A, G2
HLA-Typ:	<u>A2A3B7B27</u>
Adjuvans:	Montanide
Studienverlauf:	Nach der 4. Vakzinierung lokale Entzündungsreaktion; die Granulome waren 8 x 4 cm und 2 x 3 cm groß und zeigten histologisch eine fibrosierende Pannikulitis mit Fettgewebnekrosen, danach nur noch Blutprobenentnahme, keine weiteren Vakzinierungen
Klinischer Verlauf:	nicht bekannt

3.4.2 HLA-Klasse I

Im ersten Versuch trat mit 9 Spots pro 100.000 Zellen eine sehr schwache Antwort gegen Pool 2 auf (Pool 2 ist in Kapitel 2.5.3 definiert). In der Wiederholung des Versuchs fiel die Antwort mit 203 Spots und derselben Anzahl PBMCs deutlicher aus.

In der Einzeltestung der Peptide erwies es sich als schwierig, das Peptid zu identifizieren welches diese Antwort verursacht hatte (vgl. Abbildung 21). Es zeichnete sich eine leichte Antwort gegen RGS2, CCND1 und ADFP1 ab. Den t-Test bestanden jedoch nur die Antworten auf RGS2 beim 2. Zeitpunkt und auf ADFP1 beim letzten Zeitpunkt. Die zwei weiteren statistischen Kriterien (doppelte Spotanzahl, mindestens 10 spezifische Spots) waren aber auch bei diesen Zeitpunkten nicht erfüllt.

Deutlich zu sehen ist eine Zunahme IMP-spezifischer Zellen im Vergleich zu Tag 0.

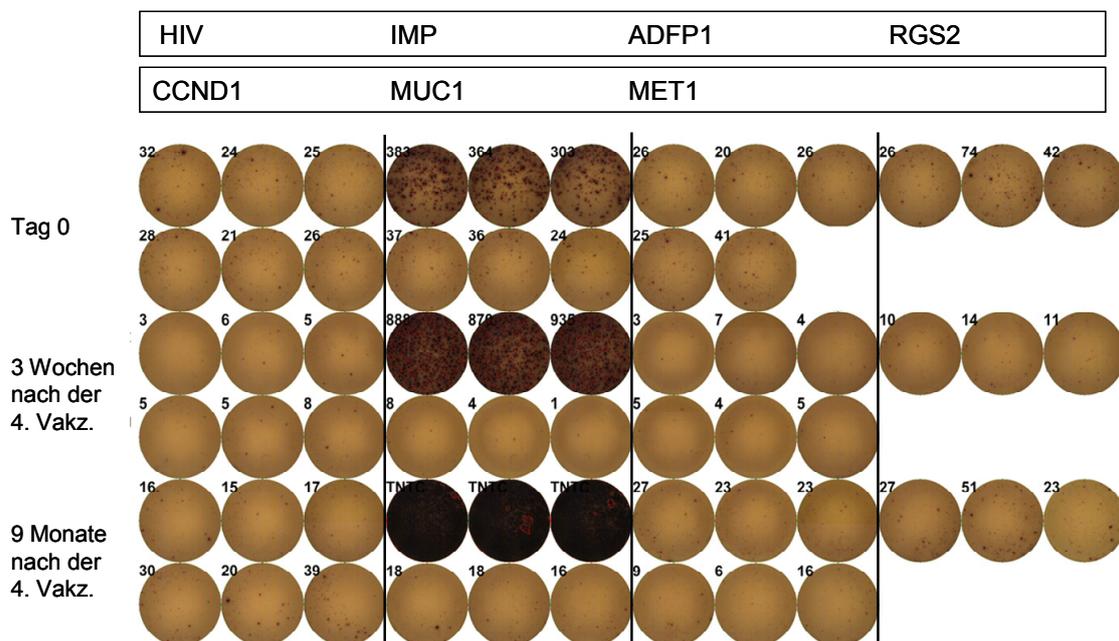


Abbildung 21: HLA-Klasse-I-Elispot von RCC 199; je zwei Reihen entsprechen einem Zeitpunkt; die Peptide sind innerhalb dieser beiden Reihen jeweils so angeordnet wie über dem Bild angegeben (in Triplikaten); 300.000 PBMCs in jedem Ansatz; wegen eines Granuloms nach der 4. Vakz. noch Blutentnahmen aber keine weiteren Vakzinierungen

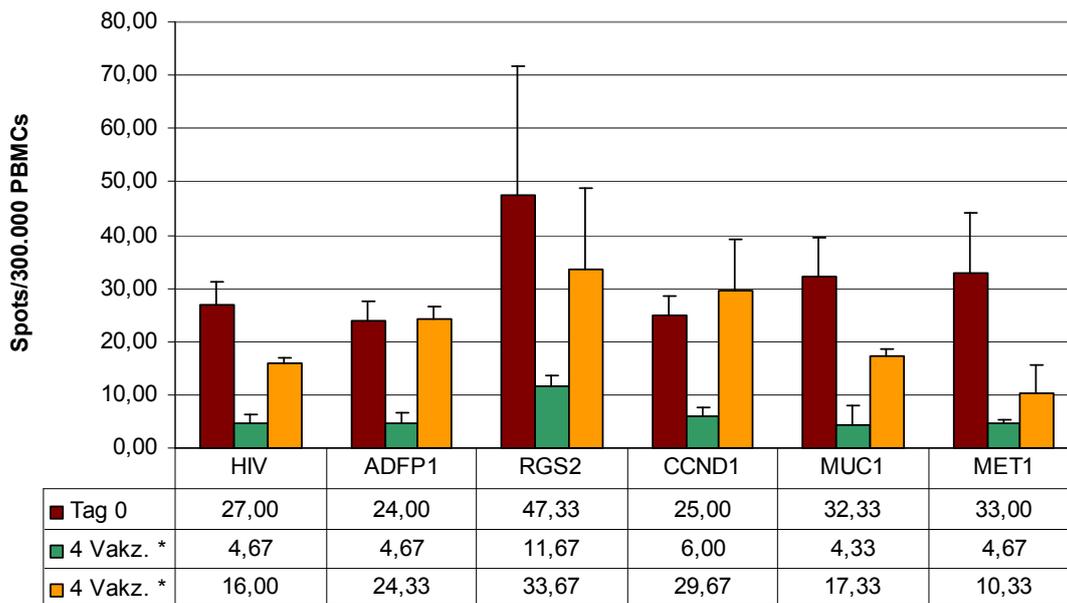


Abbildung 22: HLA-Klasse-I-Elispot von RCC199; Test der Einzelpeptide; Balkendiagramm mit Standardabweichung; in der Tabelle ist der Mittelwert aus der Spotanzahl in den drei Ansätzen pro Peptid angegeben; mit 300.000 PBMCs in jedem Ansatz; * die getesteten Zellen sind von Zeitpunkten 3 Wochen und 9 Monate nach der 4. Vakz.

In einem weiteren Versuch wurde ein verändertes Protokoll der Präsensitivierung verwendet. Anstatt bei der Stimulation an Tag 1 alle Peptide gepoolt zuzugeben, erfolgte die Stimulation einzeln mit den zu testenden Peptiden. Damit sollte ausgeschlossen werden, dass die Peptide aufgrund ihrer unterschiedlich hohen Affinität um die MHC-Bindungsstellen konkurrieren. Auch der so durchgeführte Elispot und die Tetramer-Färbungen ergaben keine eindeutig positive Antwort für RGS2 und CCND1. Deswegen ist der Patient als negativ für Klasse I zu betrachten, obwohl es in den Experimenten Hinweise auf eine leichte T-Zellinduktion gab.

3.4.3 HLA-Klasse II

Während bei diesem Patienten keine eindeutige HLA-Klasse-I-Antwort nachweisbar war, zeigt der Klasse-II-Elispot in Abbildung 23 eine T-Zellinduktion für CCND1 und G250.

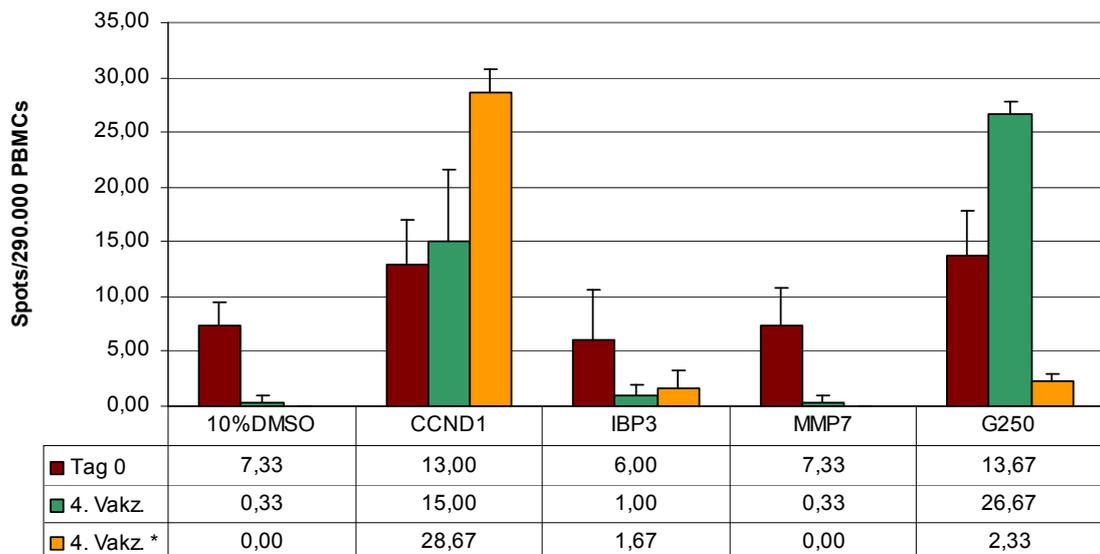


Abbildung 23: HLA-Klasse-II-Elispot von RCC199; in der Tabelle ist der Mittelwert aus der Spotanzahl in den drei Ansätzen pro Peptid angegeben; mit 290.000 PBMCs in jedem Ansatz, * Zeitpunkt 2 Wochen nach der 4. Vakz.

Wie im Elispot reagierten die PBMCs bei den späteren Zeitpunkten auf CCND1 und G250 mit einer $IFN\gamma$ -Produktion in der intrazellulären Färbung. Nach Stimulation mit G250 (vgl. Abbildung 24) sind nicht nur beim 2. Zeitpunkt vermehrt $IFN\gamma+CD4+$ -Zellen, sondern auch ungefähr genauso viele $IL-10+CD4+$ -Zellen nachweisbar. Die detektierten Zellen waren dabei nicht $IFN\gamma+IL10+$, sondern gehörten unterschiedlichen Zellpopulationen an. Beim darauf folgenden Zeitpunkt stieg der Anteil der $IFN\gamma$ -produzierenden $CD4+$ -Zellen, während der Anteil der $IL10+CD4+$ -Zellen nahezu konstant blieb.

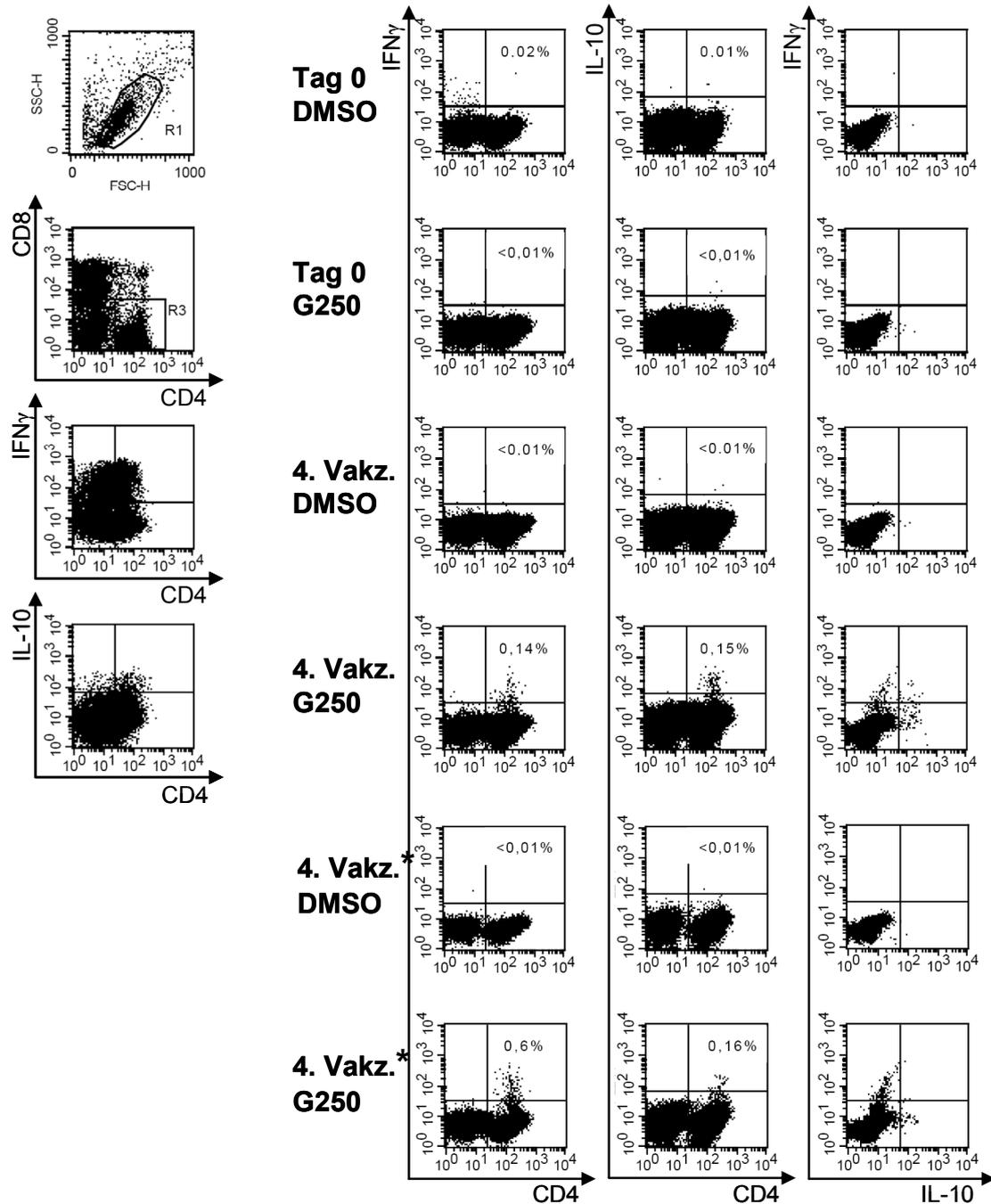


Abbildung 24: Intrazelluläre Färbung HLA-Klasse II von RCC199; Kanäle: IFN γ /IL-10/CD8/CD4; 1. Spalte: R1: Gate auf Lymphozyten (1% der Zellen angezeigt); R2: Gate auf CD8-negative Zellen und R3: Gate auf CD4+-Zellen (25% der Zellen angezeigt); in den Plots darunter zwei Positivkontrollen für IFN γ und IL-10 stimuliert mit PMA-Ionomycin; 2. und 3. Spalte: unter den Gates R1+R2 werden die Zytokin-produzierenden CD4+-Zellen angezeigt, die Prozentangaben beziehen sich auf die CD4+-Zellen; * Zeitpunkt 2 Wochen nach der 4. Vakz.; 4. Spalte: die Zytokine unter den Gates R1+R3

Da CD8 in diesem Experiment mit angefärbt wurde, war es möglich zu überprüfen, ob es sich um eine reine CD4+-Antwort handelte oder ob auch zytotoxische

T-Zellen auf G250 reagiert haben. Für eine solche Reaktion müsste innerhalb der HLA-Klasse II-Peptidsequenz ein auf HLA-Klasse I präsentiertes und von CD8+ Zellen erkanntes Antigen liegen. Im Fall des in der Studie verwendeten HLA-Klasse-II-Peptids von G250 ist ein solches HLA-A*02-restringiertes Epitop bekannt (vgl. Kapitel Diskussion). In Abbildung 25 ist jedoch zu erkennen, dass die IFN γ -Produktion ausschließlich von den CD4+ T-Zellen ausging.

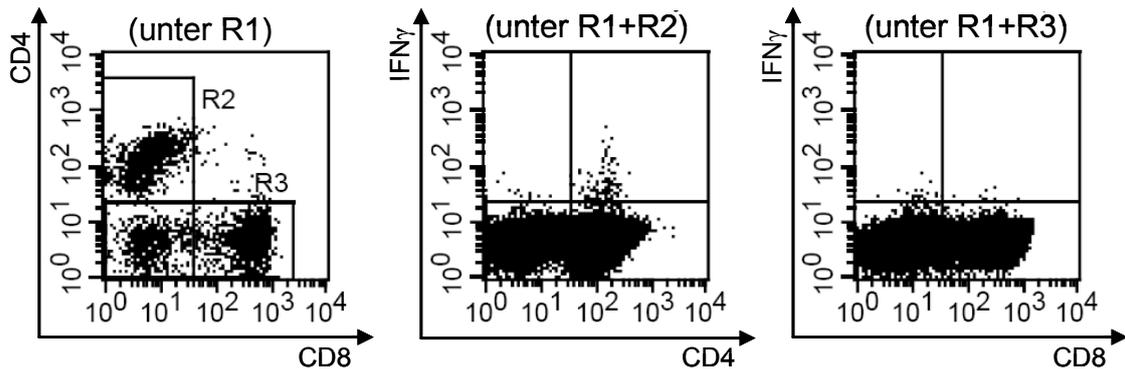


Abbildung 25: Intrazelluläre Färbung HLA-Klasse II von RCC199; Kanäle: IFN γ /IL-10/CD8/CD4; es handelt sich um die Messung der 4. Vakz. nach Stimulation mit G250; 1. Plot: R2: CD8-negative Zellen, R3: CD4-negative Zellen (5% der Zellen angezeigt; 2. und 3. Plot: je 100% der Zellen angezeigt

3.5 RCC218

3.5.1 Allgemeine Informationen

Geschlecht: männlich
 Alter: 57 Jahre
 Tumorstadium: pT3 N1 MX, G2 (IIIB nach Flocks)
 HLA-Typ: A2A32B40B44
 Adjuvans: Montanide
 Studienverlauf: nach der 8. Vakzinierung gestoppt
 Klinischer Verlauf: Auftreten von Metastasen, OP von Leber, Knochen, Gehirn

3.5.2 HLA-Klasse I

Im ersten Elispot wurde zunächst nur die Probe der 6. Vakzinierung untersucht. Diese zeigte eine deutlich positive Reaktion auf die Peptide ADFP, RGS2 und CCND1, die in Abbildung 26 gezeigt ist.

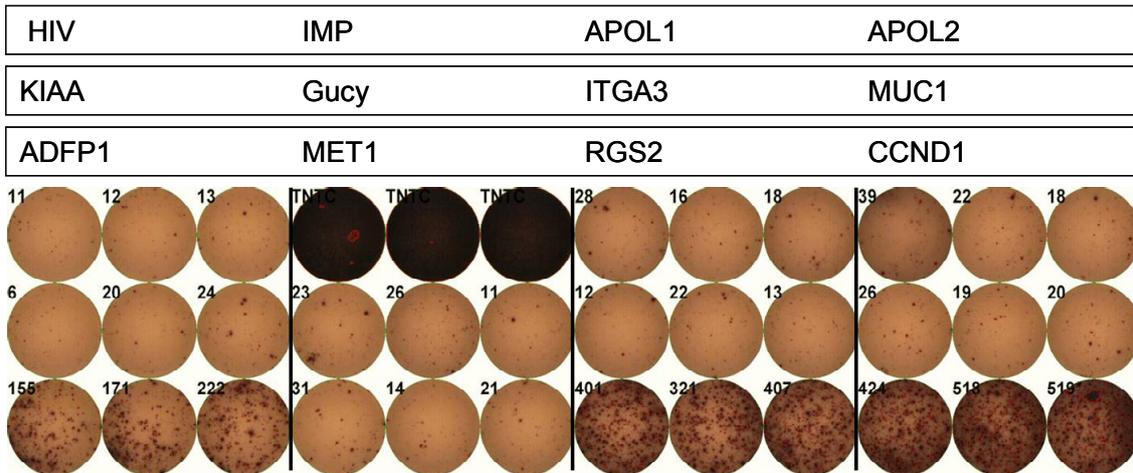


Abbildung 26: HLA-Klasse-I-Elispot von RCC218; 6. Vakzinerung; Anordnung in Triplikaten entsprechend der Beschriftung; 150.000 PBMCs in jedem Ansatz

Ein zweiter Elispot bestätigte die Ergebnisse für CCND1 und RGS2, nicht aber für ADFP. Zu Beginn der Vakzinierungen war noch keine T-Zellantwort nachweisbar. Insgesamt waren die Antworten sehr schwach, aber dennoch statistisch signifikant. Da von diesen Zeitpunkten alle eingefrorenen Zellen verbraucht waren, konnte dieser Patient nicht weiter untersucht werden.

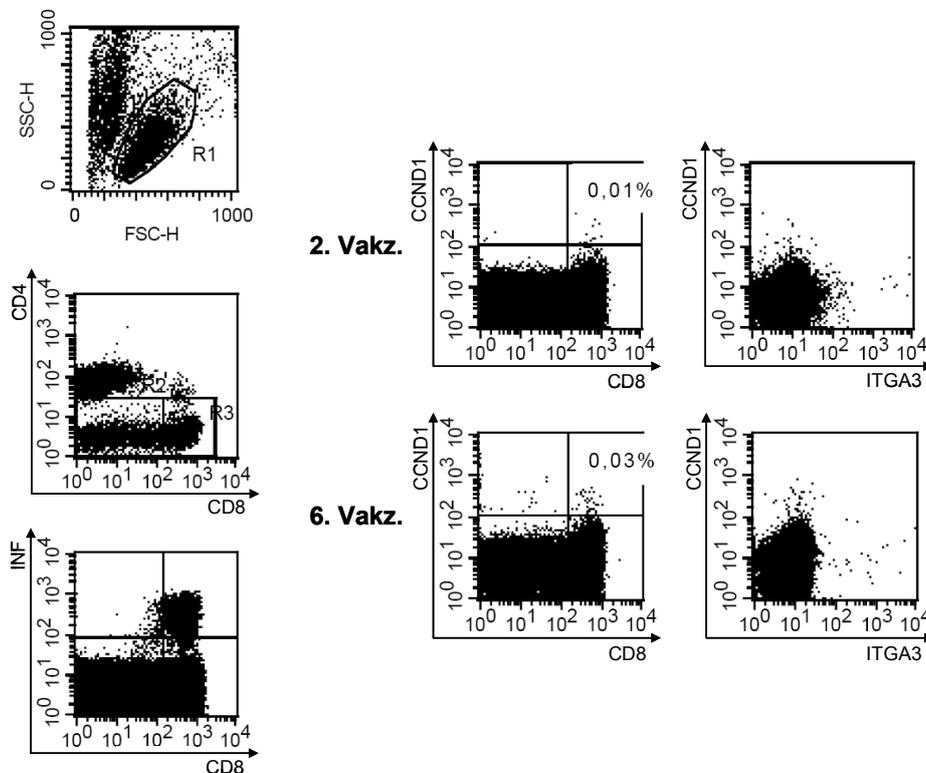


Abbildung 27: Tetramer-Färbung HLA-Klasse I von RCC218; Kanäle: CD4/ITGA3/CD8/CCND1; R1: Gate auf Lymphozyten (1% der Zellen angezeigt); R2: Gate auf CD4-neg. Zellen (5% der

Zellen angezeigt); R3: Gate auf CD8+ Zellen; Positivkontrolle: Influenza-Tetramer; 2. Spalte: CCND1-Tetramer unter R1+R2; 3. Spalte: beide Tetramere zum Ausschluss von doppelt positiven Zellen (unspezifische Bindung) unter R1+R3

Die in Abbildung 27 dargestellte Tetramer-Färbung wurde nach dem zweiten Elispot durchgeführt und zeigte eine leichte Zunahme der CCND1-Tetramer-bindenden CD8+ T-Zellen.

3.5.3 HLA-Klasse II

In diesem Klasse-II-Elispot war wie in den zuvor getesteten Proben anderer Patienten eine T-Zellinduktion CCND1- und G250-spezifischer Zellen nachweisbar (vgl. Abbildung 28).

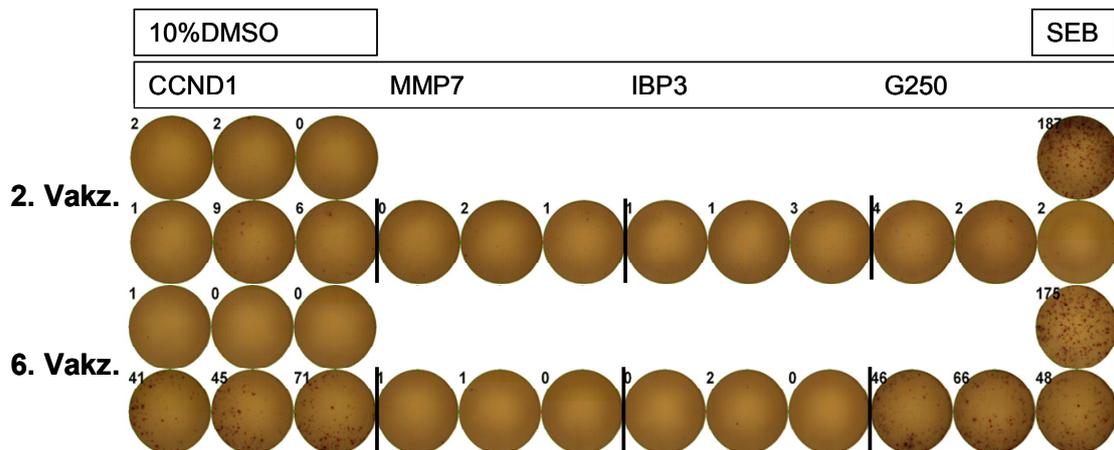


Abbildung 28: HLA-Klasse-II- Elispot von RCC218; 100.000 PBMCs in jedem Ansatz

3.6 RCC258

3.6.1 Allgemeine Informationen

Geschlecht: männlich
 Alter: 80 Jahre
 Tumorstadium: pT3, G2 (IIIB nach Flocks)
 HLA-Typ: A2A23B15B44
 Adjuvans: GM-CSF
 Studienverlauf: Patient erhielt nur 15 der 18 Vakzinierungen, lokales Erythem nach der 3. Vakzinierung

Klinischer Verlauf: kein Rezidiv innerhalb des Studienzeitraumes

3.6.2 HLA-Klasse I

Im ersten Test war der Elispot bei der 1., 4., und 7. Vakzinierung negativ und erst ab der 9. für beide Pools positiv. Im nächsten Elispot wurde untersucht, welche der Peptide aus Pool 1 und 2 die Antwort ausgelöst hatten. In dem zunächst nur mit Zellen der 10. Vakz. durchgeführten Elispot konnte aus Pool 1 GUCY und aus Pool 2 CCND1 als Auslöser einer T-Zellantwort identifiziert werden. In der Wiederholung wurden mehrere Zeitpunkte getestet um auch den zeitlichen Verlauf der T-Zellantwort darstellen zu können.

Die Ergebnisse dieses Elispots sind in Abbildung 29 als Diagramm dargestellt. Da von den ersten Zeitpunkten kaum noch Zellen im Stickstoff vorhanden waren und diese bei der Pool-Testung keine positiven Antworten ergeben hatten, wurden Proben der 7. bis 15. Vakz. verwendet.

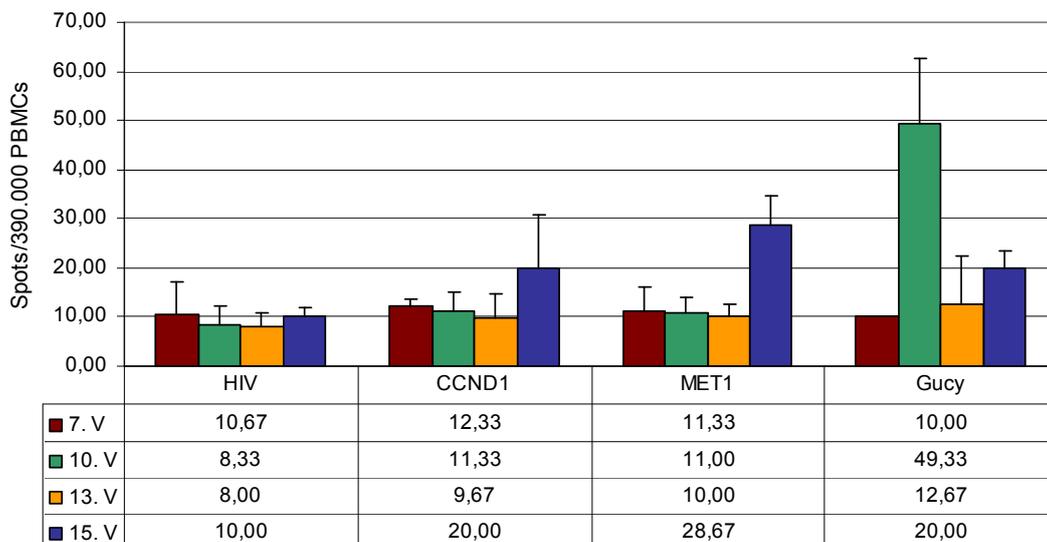


Abbildung 29: HLA-Klasse-I-Elispot von RCC258; in der Tabelle ist der Mittelwert aus der Spotanzahl in den drei Ansätzen pro Peptid angegeben; mit 390.000 PBMCs in jedem Ansatz

Bei der 7. Vakz. ist noch keine Reaktion gegen die Impfpeptide zu erkennen. Wie schon im vorigen Elispot reagierten die Zellen bei der 10. Vakz. deutlich auf das Peptid GUCY. Signifikant ist die Erhöhung der Spotanzahl im Vergleich zur HIV-Kontrolle bei der 10. und 15. Vakzinierung. Bei der 15. Vakz. trat eine Ant-

wort auf MET1 auf, die ebenfalls statistisch signifikant war. Die Erhöhung der Spotanzahl für CCND1 in diesem Elispot ist aufgrund des t-Tests als nicht signifikant zu bewerten.

In der Tetramer-Färbung ist unter den CD8+ Zellen eine Population CCND1-spezifischer T-Zellen zu erkennen (vgl. Abbildung 30). Im Gegensatz zum Elispot war diese schon bei der 7. Vakz. mit dem Tetramer anfärbbar, was möglicherweise mit einer fehlenden oder verminderten IFN γ -Produktion dieser CCND1-spezifischen Zellen zusammenhängt (siehe Kapitel 4). Das GUCY-Tetramer scheint nicht zu funktionieren, da es eine ausgeprägte, unspezifische Bindung an CD8 zeigte und weder bei der 10. Vakz. noch zu sonst einem Zeitpunkt eine Population abgrenzbar war (Daten nicht gezeigt).

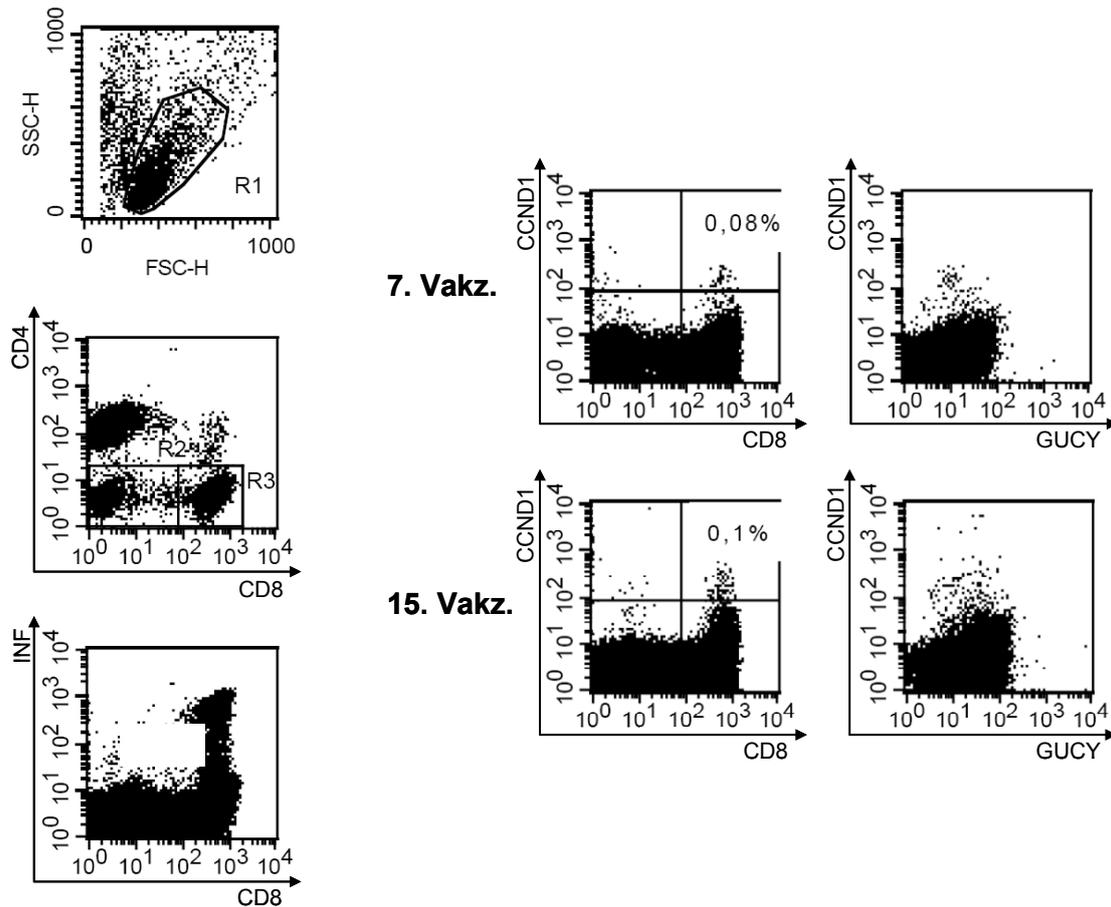


Abbildung 30: Tetramer-Färbung HLA-Klasse I von RCC258; Kanäle: CD4/GUCY/CD8/CCND1; R1: Gate auf Lymphozyten (1% der Zellen angezeigt); R2: Gate auf CD4-neg. Zellen (5% der Zellen angezeigt); R3: Gate auf CD8+ Zellen; Positivkontrolle im untersten Plot: Influenza-Tetramer; 2. Spalte: CCND1-Tetramer unter R1+R2; 3. Spalte: beide Tetramere zum Abschluss von doppelt positiven Zellen (unspezifische Bindung) unter R1+R3

Das in der ersten Färbung verwendete MET-Tetramer verursachte einen hohen Hintergrund. Deswegen wurde die Färbung eine Woche später mit einem neu hergestellten MET-Tetramer wiederholt. Zu beachten ist, dass die Zellen einmal mehr stimuliert und erst an Tag 21 gefärbt wurden. Wie auch im Fall von CCND1 war schon bei der 7. Vakz. und somit früher als im Elispot eine MET-positive Population vorhanden.

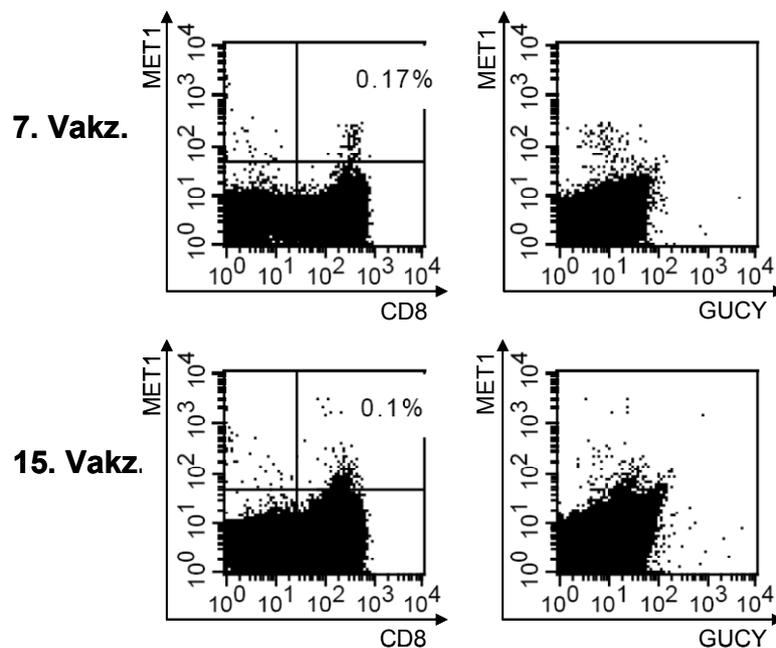


Abbildung 31: Zusätzliche Tetramer-Färbung an Tag 21 von RCC258; mit Zellen die im Elispot nicht benötigt wurden; restimuliert an Tag 12; Kanäle: CD4/GUCY/CD8/MET1; Gates siehe vorherige Abbildung; 1. Spalte: MET1-Tetramer unter R1+R2; 2. Spalte: beide Tetramere zum Ausschluss von doppelt positiven Zellen (unspezifische Bindung) unter R1+R3

3.6.3 HLA-Klasse II

Im Gegensatz zu den zuvor getesteten Patientenproben war die HLA-Klasse-II-Antwort bei diesem Patienten eher schwach ausgeprägt. Nur das G250-Peptid führte zu einer mit den Vakzinierungen ansteigenden $IFN\gamma$ -Antwort, während die Peptide CCND1, IBP3 und MMP7 im Elispot keine vermehrte $IFN\gamma$ -Produktion bewirkten.

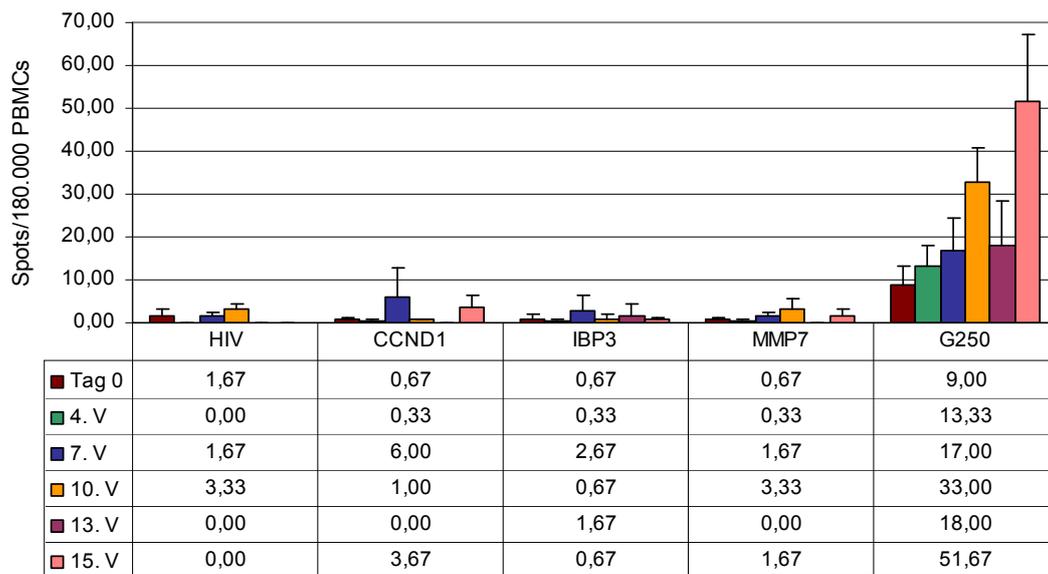


Abbildung 32: HLA-Klasse-II-Elispot von RCC258; in der Tabelle ist der Mittelwert aus der Spotanzahl in den drei Ansätzen pro Peptid angegeben; mit 180.000 PBMCs in jedem Ansatz

In der eine Woche später durchgeführten intrazellulären Färbung wurde die IFN γ -Antwort nach Stimulation mit G250 bei der 4. Vakz. bestätigt. Bei allen folgenden Zeitpunkten war fast keine IFN γ -Produktion mehr nachweisbar. Insgesamt dominierten während aller Zeitpunkte nach der 1. Vakz. eher die IL-5- und IL-10-Antworten gegen die Peptide G250 und CCND1. In Abbildung 33 ist dies für G250 gezeigt.

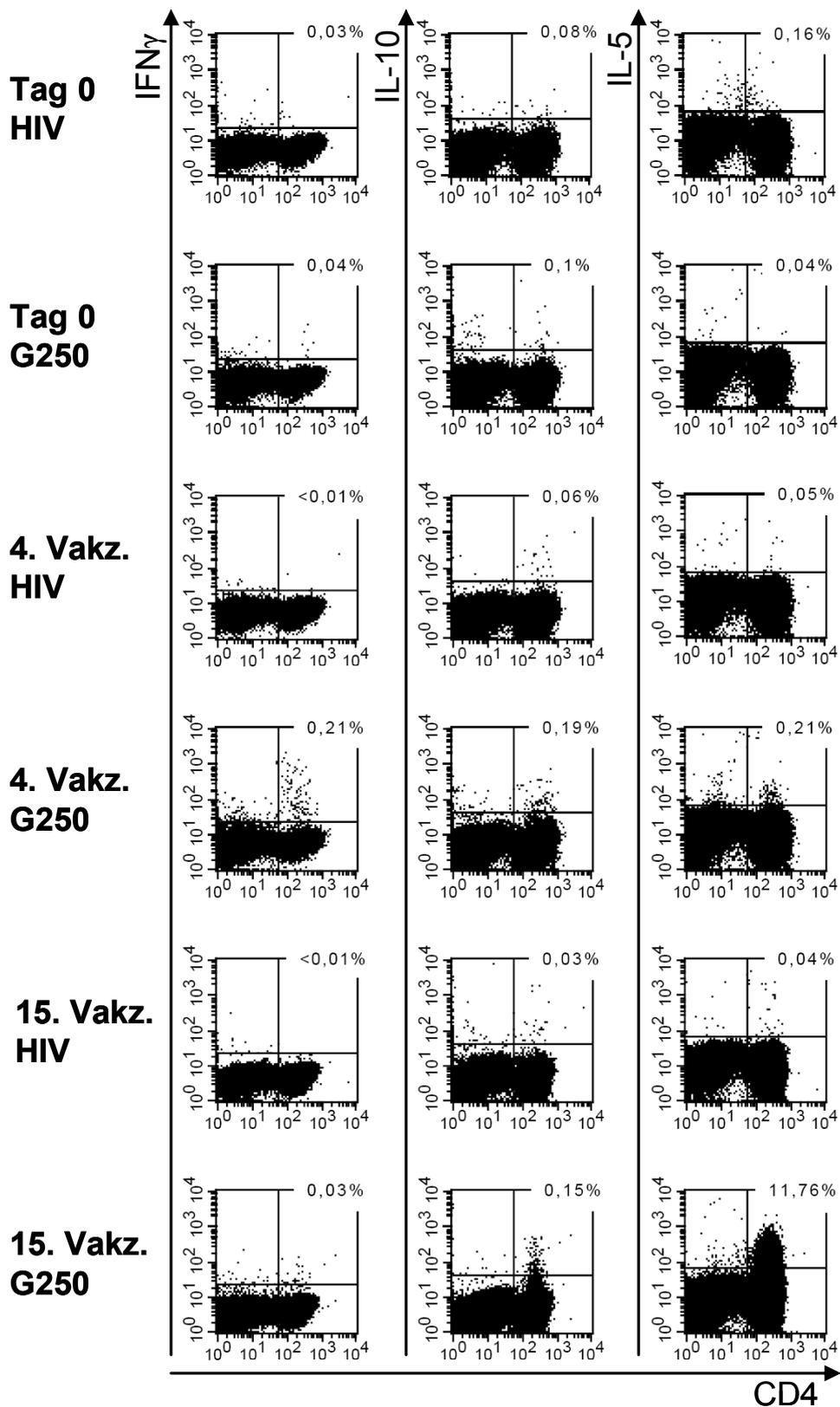


Abbildung 33: Intrazelluläre Färbung HLA-Klasse II von RCC258; Kanäle: IFN γ /IL-10/CD4/IL-5; R1: Gate auf Lymphozyten; alle Plots unter diesem Gate angezeigt, die Prozentangaben beziehen sich auf die CD4 $^{+}$ -Zellen

3.7 RCC285

3.7.1 Allgemeine Informationen

Geschlecht:	männlich
Alter:	57 Jahre
Tumorstadium:	pT3, M1 (Lunge), G2 (IVB nach Flocks)
HLA-Typ:	<u>A1 B8</u>
Adjuvans:	GM-CSF
Studienverlauf:	18 Vakzinierungen (vollständig), lokales Erythem nach der 2.-4. Vakzinierung, erhielt während der Studie Kortison wegen einer seit 1972 bekannten Sarkoidose
Klinischer Verlauf:	Progress der Lungenmetastase, Rezidiv in der kontralateralen Niere, OP

3.7.2 HLA-Klasse I

Diesem HLA-A2-negativen Patienten war in den Vakzinierungen eine Mischung aus A1- und B8-Peptiden verabreicht worden (vgl. Kapitel 2.1.4). Weder im Elispot, der zwei Mal wiederholt wurde, noch in einer intrazellulären Färbung war eine Antwort gegen diese Peptide zu detektieren.

3.7.3 HLA-Klasse II

Der Patient war mit HLA-Klasse-II-Peptiden von CCND1, IBP3 und MMP7 vakzinisiert worden. Der Elispot ergab, abgesehen vom Influenza-Kontrollpeptid, die bisher stärkste Antwort auf ein Impfpeptid unter den Patientenproben.

Die Stimulation mit CCND1 bewirkte eine so ausgeprägte IFN γ -Sekretion, dass die einzelnen Spots mit dem Lesegerät nicht ausgezählt werden konnten, da sie zu dicht nebeneinander lagen. Aufgrund der starken HLA-Klasse-II-Antwort wurde bei diesem Patienten ein ex-vivo-Elispot unter der Fragestellung, ob diese Antwort auch ohne Präsensitivierung zu detektieren wäre, durchgeführt.

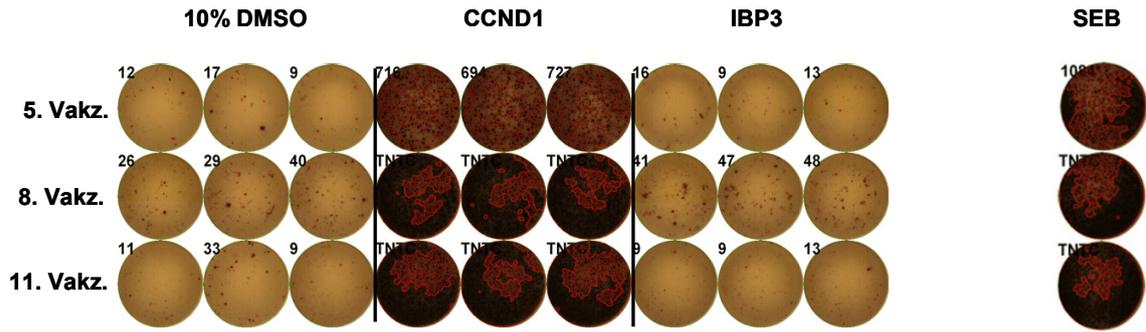


Abbildung 34: HLA-Klasse-II-Elispot von RCC285; 325.000 PBMCs in jedem Ansatz, TNTC= Too numerous to count, d.h. die Spots lagen so dicht beieinander, dass sie vom Elispotreader nicht ausgezählt werden konnten

Wie man in Abbildung 36 sieht, ist auch ohne Präsensitivierung und die damit verbundene Vermehrung der spezifischen T-Zellen eine Antwort gegen CCND1 nachweisbar. Diese fällt allerdings wesentlich schwächer aus als in dem Elispot nach Präsensitivierung.

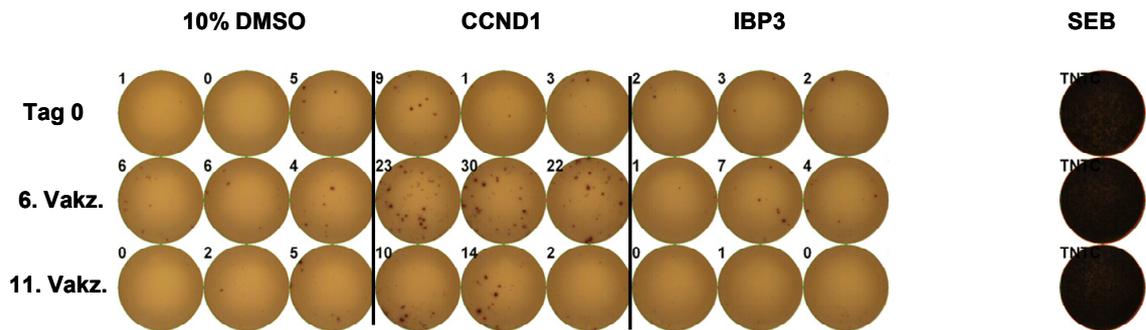


Abbildung 35: Ex-vivo-Elispot HLA-Klasse-II von RCC285; 325.000 PBMCs in jedem Ansatz

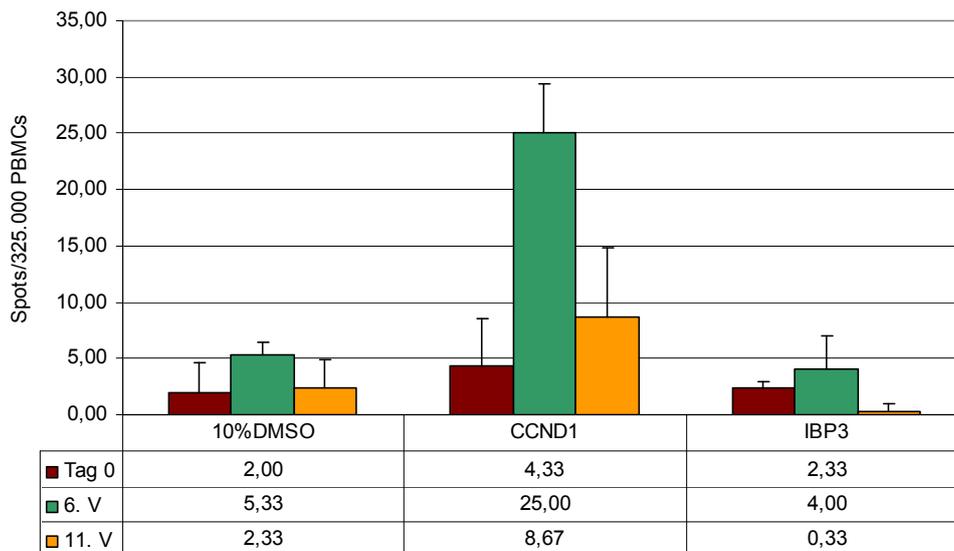


Abbildung 36: Ex-vivo-Elispot HLA-Klasse-II von RCC285; in der Tabelle ist der Mittelwert aus der Spotanzahl in den drei Ansätzen pro Peptid angegeben; 325.000 PBMCs in jedem Ansatz

Die Zellen aus dem ex-vivo Elispot wurden weiter kultiviert und an Tag 10 stimuliert und gefärbt. In der intrazellulären Färbung war im Ansatz mit dem Klasse-II-Peptid von CCND1 bei allen drei getesteten Zeitpunkten eine $IFN\gamma$ -Produktion zu sehen. Der in der Färbung zusätzlich verwendete IL-2-Antikörper zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen der Negativkontrolle und den Ansätzen mit Impfpeptiden: In allen Ansätzen waren einige $CD4+IL2+$ -Zellen vorhanden (ca. 0,01% der $CD4+$ -Zellen); es gab jedoch keinen Unterschied zwischen der Negativkontrolle, CCND1, IBP3 und MMP7. Zudem produzierten immer einige $CD4$ -negative Zellen IL-2 (Daten nicht gezeigt).

Die PBMCs dieses Patienten wurden auch in Versuchen mit der Tumorzelllinie MZ1257 verwendet, deren Auswertung in Kapitel 3.12.3 zu finden ist.

3.8 RCC314

3.8.1 Allgemeine Informationen

Geschlecht: weiblich
 Alter: 69 Jahre
 Tumorstadium: pT3 N2, G2 (IIIB nach Flocks), Rekrutierungsfehler (befallene Lymphknoten schon zu Studienbeginn)

Papilläres Nierenzellkarzinom

HLA-Typ: A2

Adjuvans: Montanide

Studienverlauf: 6 Vakzinierungen, gestoppt nach Progress, lokales Granulom ab der 2. Vakzinierung

Klinischer Verlauf: im CT: Lymphknotenbefall, Ovarialmetastase

3.8.2 HLA-Klasse I

Der erste Elispot ergab eine positive Antwort auf CCND1 und GUCY. Ein zweiter Elispot und die dazu gehörige Tetramer-Färbung konnten aber nur die T-Zellinduktion für CCND1 bestätigen. In Abbildung 37 ist zu erkennen, dass zum Zeitpunkt der 2. Vakzinierung noch keine IFN γ -Sekretion nach Stimulation mit CCND1 auftrat. Bei der 4. Vakzinierung hatte sich eine IFN γ -Antwort entwickelt, die bis zur nächsten Vakzinierung sogar noch zunahm.

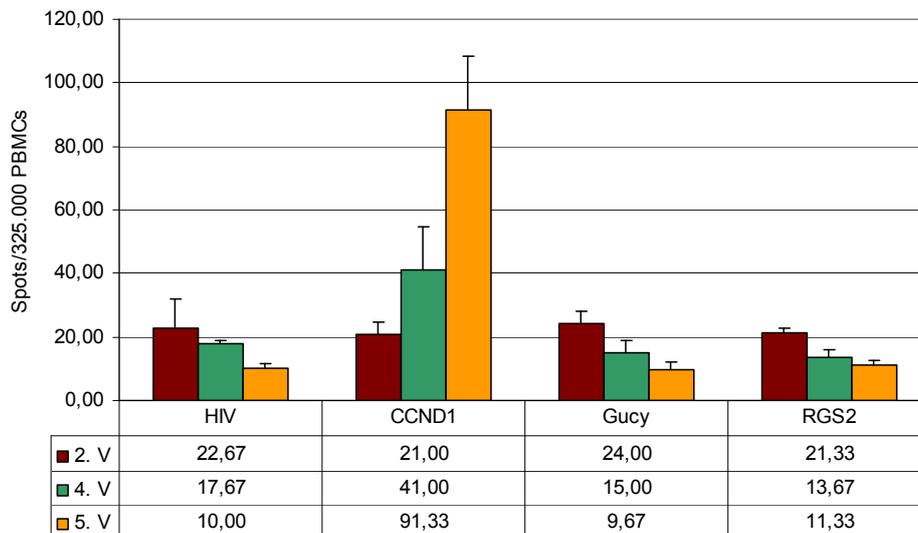


Abbildung 37: HLA-Klasse-I-Elispot von RCC314; in der Tabelle ist der Mittelwert aus der Spotanzahl in den drei Ansätzen pro Peptid angegeben; mit 325.000 PBMCs in jedem Ansatz

3.8.3 HLA-Klasse II

Wie schon bei den meisten zuvor getesteten Patienten waren auch hier CCND1 und G250 bei der 4. Vakz. deutlich positiv (CCND1: 68 Spots pro 100.000 Zellen und G250: 236 Spots pro 100.000 Zellen). Da nicht mehr viele Zellen im

Stickstoff übrig waren, wurde der Elispot nur in Duplikaten statt in Triplikaten durchgeführt (Daten nicht gezeigt).

Die in Abbildung 38 dargestellte, intrazelluläre Färbung bestätigt die $\text{IFN}\gamma$ -Antwort auf CCND1 und G250. Bei der 4. Vakz. reagierten nach Stimulation mit G250 sogar 2,57% der CD4^+ -Zellen mit einer $\text{IFN}\gamma$ -Produktion.

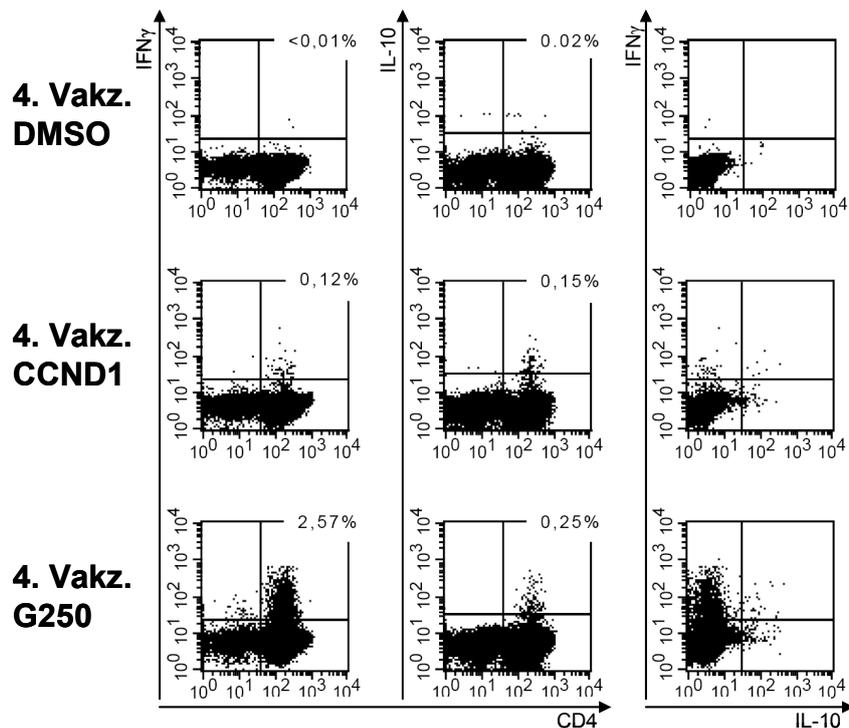


Abbildung 38: Intrazelluläre Färbung HLA-Klasse II von RCC314; Kanäle: $\text{IFN}\gamma$ /IL-10/CD8/CD4, R1: Gate auf Lymphozyten, R2: Gate auf CD8^- Zellen und R3: Gate auf CD4^+ -Zellen, die Prozentangaben beziehen sich auf die CD4^+ -Zellen, 3. Spalte: unter dem Gate R1+R3 sind die Zytokine gegeneinander aufgetragen

Es ist zu beachten, dass dies nicht den Verhältnissen in vivo entsprechen muss, da sich die Zusammensetzung und Anzahl der T-Zellen nach 21 Tagen in Kultur und zwei Stimulationen verändern kann. Gleiches gilt für die Analyse der IL-10-produzierenden Zellen. Unter den CD4^+ -Zellen gab es einige, die nach Stimulation mit CCND1 oder G250 IL-10 produzierten. Im Fall von G250 war bei der 2. Vakzinierung die IL-10-Produktion im Vergleich zur Negativkontrolle nicht erhöht und stieg dann von 0,25% der CD4^+ -Zellen bei der 4. auf 0,4% nach der 5. Vakzinierung. Anders reagierten die Zellen nach Stimulation mit CCND1: Der Anteil $\text{IFN}\gamma$ - und IL-10-positiver Zellen war ungefähr gleich

groß und bewegte sich konstant in einem Rahmen zwischen 0,12 und 0,15% der CD4+-Zellen.

3.9 RCC340

3.9.1 Allgemeine Informationen

Geschlecht: männlich

Alter: 65 Jahre

Tumorstadium: pT3, M1 (Lunge), G2 (IVB nach Flocks)

Die Lungenmetastase war retrospektiv schon in einem CT vor Beginn der Vakzinierungen sichtbar und der Patient erfüllte somit nicht die Einschlusskriterien der Studie (vgl. Kapitel 2.1.2)

HLA-Typ: A3A23B27B35

Adjuvans: GM-CSF

Studienverlauf: 9 Vakzinierungen, dann wegen neu aufgetretener Metastase gestoppt

Klinischer Verlauf: 1. OP 1998, vor Studienbeginn OP und Radiatio wegen Lungenmetastase 2005, nach 8 Vakzinierungen OP wegen Nebennierenmetastase 2006

3.9.2 HLA-Klasse I

Dieser Patient war mit vorhergesagten HLA-A*03-Peptiden vakziniert worden. In dem hier gezeigten Elispot war bis zur letzten Vakzinierung keine Antwort gegen die vier HLA-A*03-Peptide zu detektieren, was in einem zweiten Elispot bestätigt wurde. Die für diesen Patienten hergestellten HLA-A*03-Tetramere zeigten eine stark ausgeprägte unspezifische Bindung an CD8. Eine Tetramer-bindende Population war nicht abgrenzbar.

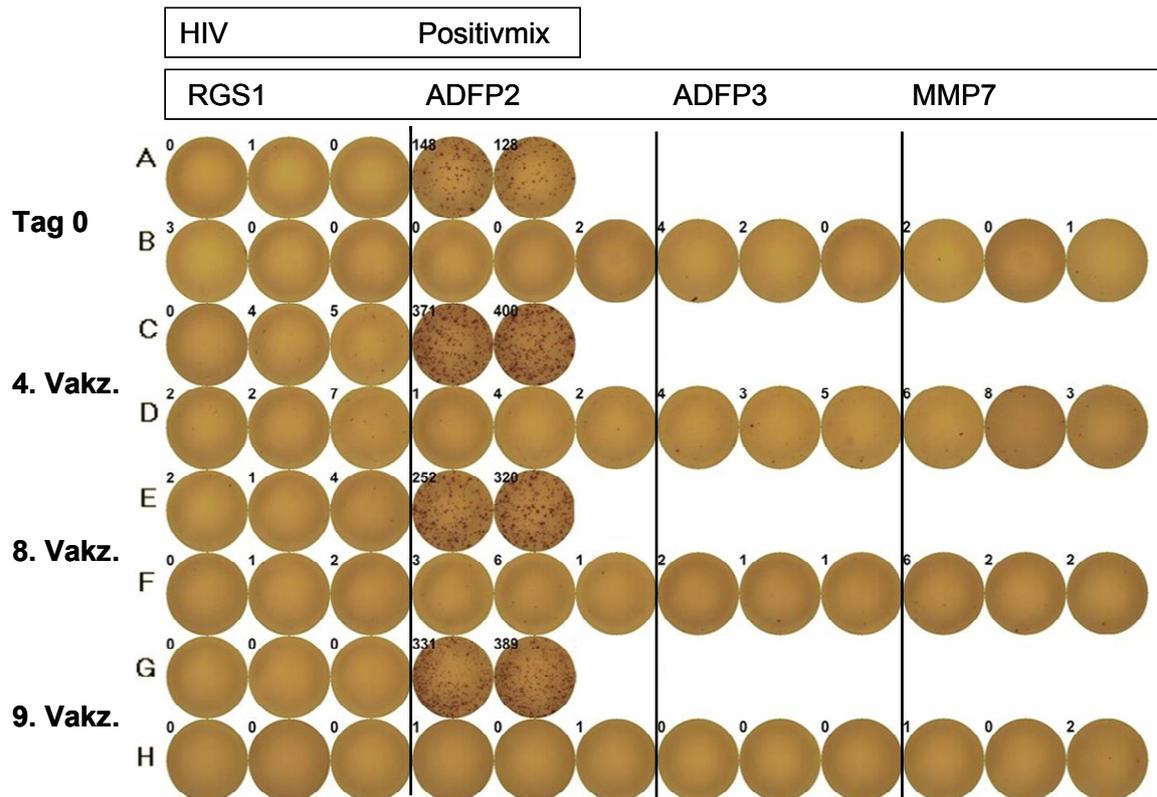


Abbildung 39: HLA-Klasse-I-Elispot von RCC340; 280.000 PBMCs in jedem Ansatz; jeweils zwei Reihen entsprechen einem Zeitpunkt; davon 1. Reihe: HIV und Positivmix bestehend aus einem HLA-A3-EBV- und Influenza-Peptid; 2.Reihe: HLA-A3-Vakzinierungspeptide

3.9.3 HLA-Klasse II

Dies war der erste Patient bei dem weder im Elispot noch in einer intrazellulären Färbung eine deutliche Antwort gegen eines der Klasse-II-Peptide zu finden war. Möglicherweise gab es eine minimale Antwort gegen CCND1, die aber statistisch nicht signifikant war, so dass dieser Patient als negativ für Klasse I und II zu betrachten ist.

3.10 RCC364

3.10.1 Allgemeine Informationen

Geschlecht: weiblich
 Alter: 64 Jahre
 Tumorstadium: pT3 N1 MX R1V1L1, G3 (IIIB nach Flocks)
 HLA-Typ: A2B14B51

Adjuvans: Montanide
 Studienverlauf: lokales Erythem und Granulom ab der 2. Vakzinierung, wegen Metastasen nach der 7. Vakzinierung gestoppt
 Klinischer Verlauf: axilläre Lymphknoten-Metastasen

3.10.2 HLA-Klasse I

Nachdem in drei HLA-Klasse-I-Elispots keine IFN γ -Sekretion bei Kontakt mit den Impfpeptiden aufgetreten war, wurde wie bei RCC199 ein verändertes Protokoll für die Präsensitivierung eingesetzt. Dabei wurden die Zellen nach dem Auftauen getrennt in der Kulturplatte mit den einzelnen Peptiden stimuliert, anstatt die Peptide im Pool auf alle Zellen zu geben. Auch mit diesem veränderten Protokoll war weder im Elispot noch in der Tetramer-Färbung eine spezifische Antwort auf die Impfpeptide nachweisbar.

Zu erwähnen ist noch, dass bei diesem Patienten im Elispot auch das HBV-Peptid aus dem Impfcocktail getestet wurde. Dieses Peptid wurde zur Kontrolle mitgeimpft um zu überprüfen, ob die Vakzinierung eine T-Zellinduktion auslöst. In diesem Fall nahm die Anzahl IFN γ -sezernierender Zellen im Vergleich zu Tag 0 deutlich zu. Bei der 1. Vakz. reagierten die Zellen noch nicht auf das HBV-Peptid, aber schon bei der 3. Vakzinierung kam es zu einer vermehrten IFN γ -Sekretion, wie in Abbildung 40 zu sehen ist.

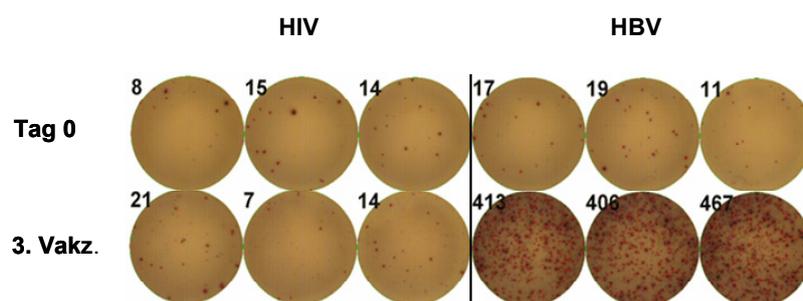


Abbildung 40: HLA-Klasse-I-Elispot von RCC364; 300.000 PBMCs in jedem Ansatz

3.10.3 HLA-Klasse II

Der HLA-Klasse-II-Elispot dieses Patienten ist in Abbildung 41 und das dazugehörige Diagramm in Abbildung 42 gezeigt. Schon bei der 2. Vakz. sind im

Ansatz mit CCND1 keine Spots zu erkennen. Nach 7 Vakzinierungen ist die IFN γ -Sekretion für CCND1, IBP3 und G250 deutlich angestiegen.

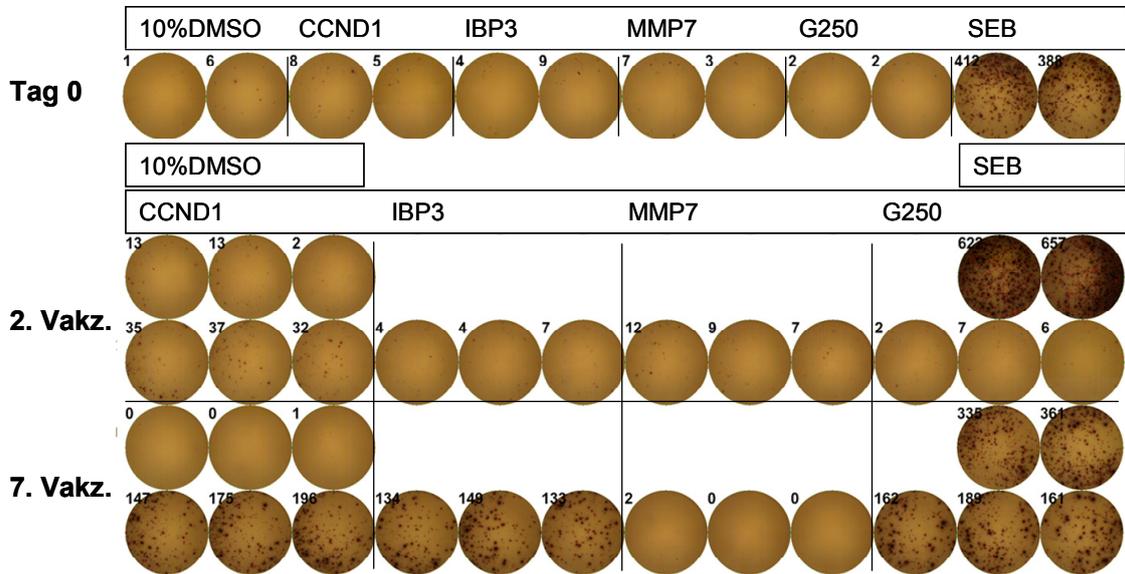


Abbildung 41: HLA-Klasse-II-Elispot von RCC364; 1.Vakz. nur in Duplikaten; 190.000 PBMCs in jedem Ansatz

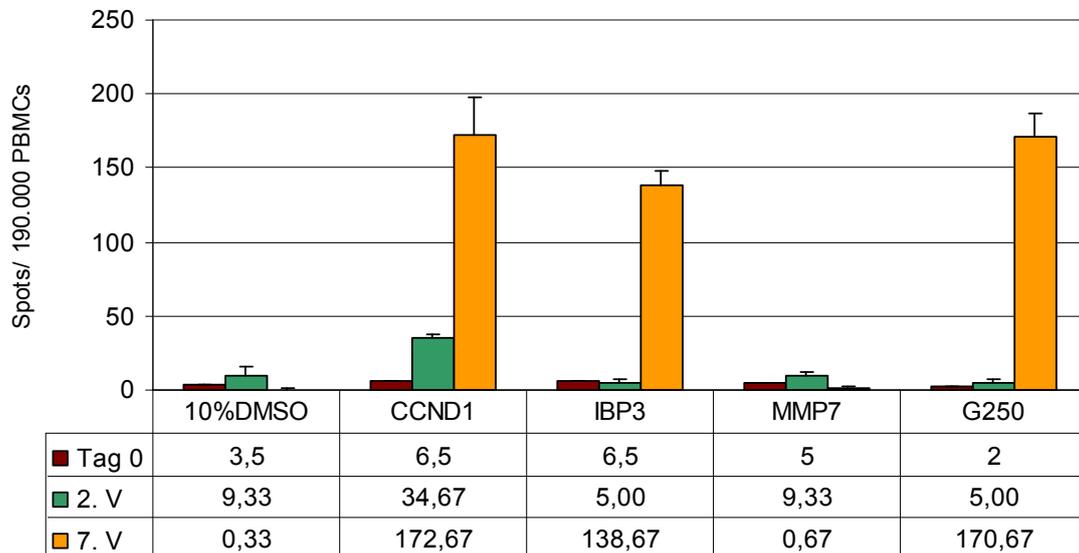


Abbildung 42: RCC 364 HLA-Klasse-II-Elispot, Diagramm zum oben gezeigten Elispot; in der Tabelle ist der Mittelwert aus der Spotanzahl in den drei Ansätzen pro Peptid angegeben; Standardabweichung nur bei der 2. und 7. Vakz. (da an Tag 0 nur 2 Ansätze pro Peptid möglich waren); mit 190.000 PBMCs in jedem Ansatz

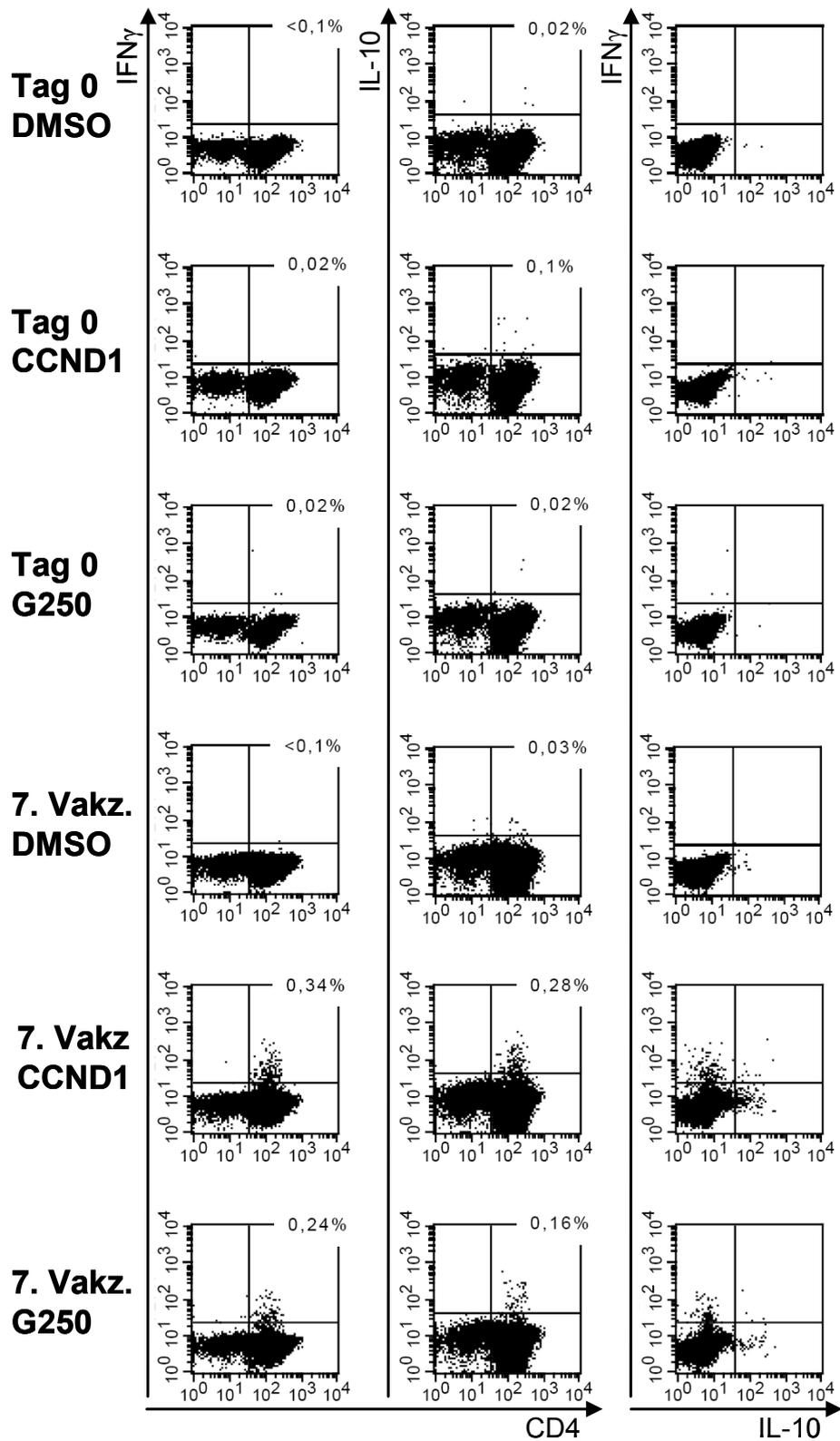


Abbildung 43: Intrazelluläre Färbung HLA-Klasse II von RCC364; Kanäle: IFN γ /IL-10/CD8/CD4, R1: Gate auf Lymphozyten, R2: Gate auf CD8-negative Zellen und R3: Gate auf CD4+-Zellen, die Prozentangaben beziehen sich auf die CD4+-Zellen, 3. Spalte: unter den Gates R1+R3 sind die Zytokine gegeneinander aufgetragen

Die Ergebnisse der intrazellulären Färbung stimmten mit denen des Elispots überein. Wie in Abbildung 43 zu erkennen, war wieder nicht nur die IFN γ -Produktion, sondern auch die Anzahl der IL-10-positiven CD4+-Zellen erhöht. Die IL-10-Antwort war nur wenig schwächer ausgeprägt als die IFN γ -Antwort.

3.11 RCC369

3.11.1 Allgemeine Informationen

Geschlecht: weiblich
Alter: 51 Jahre
Tumorstadium: pT1, M1 (Knochenmetastasen zum Zeitpunkt der Diagnose)
HLA-Typ: A2B18B38
Adjuvans: Montanide
Studienverlauf: Leichtes lokales Erythem nach der 4. und Granulom ab der 11. Vakzinierung, nach der 13. Vakzinierung wegen neu aufgetretener Metastase gestoppt und außerhalb der Studie bis zur 18. Vakzinierung weiter geimpft
Klinischer Verlauf: Schilddrüsenmetastase nach der 13. Vakzinierung, OP

3.11.2 HLA-Klasse I

Nachdem zwei Elispots mit den Peptiden im Pool negativ waren, wurden keine weiteren HLA-Klasse-I-Tests durchgeführt.

3.11.3 HLA-Klasse II

Dieser Patient zeigte eine starke Antwort auf die HLA-Klasse-II-Peptide von CCND1 und G250 und eine schwache Antwort auf IBP3. Die im Verlauf der Vakzinierungen scheinbar abnehmende Antwort lässt sich vermutlich damit begründen, dass bei den letzten beiden Zeitpunkten entweder weniger Zellen in jedem Well oder diese in einem schlechteren Zustand waren als beim 2. Zeitpunkt. Darauf deutet auch die geringere Spotanzahl in der SEB-Kontrolle der 9. und 12. Vakzinierung hin.

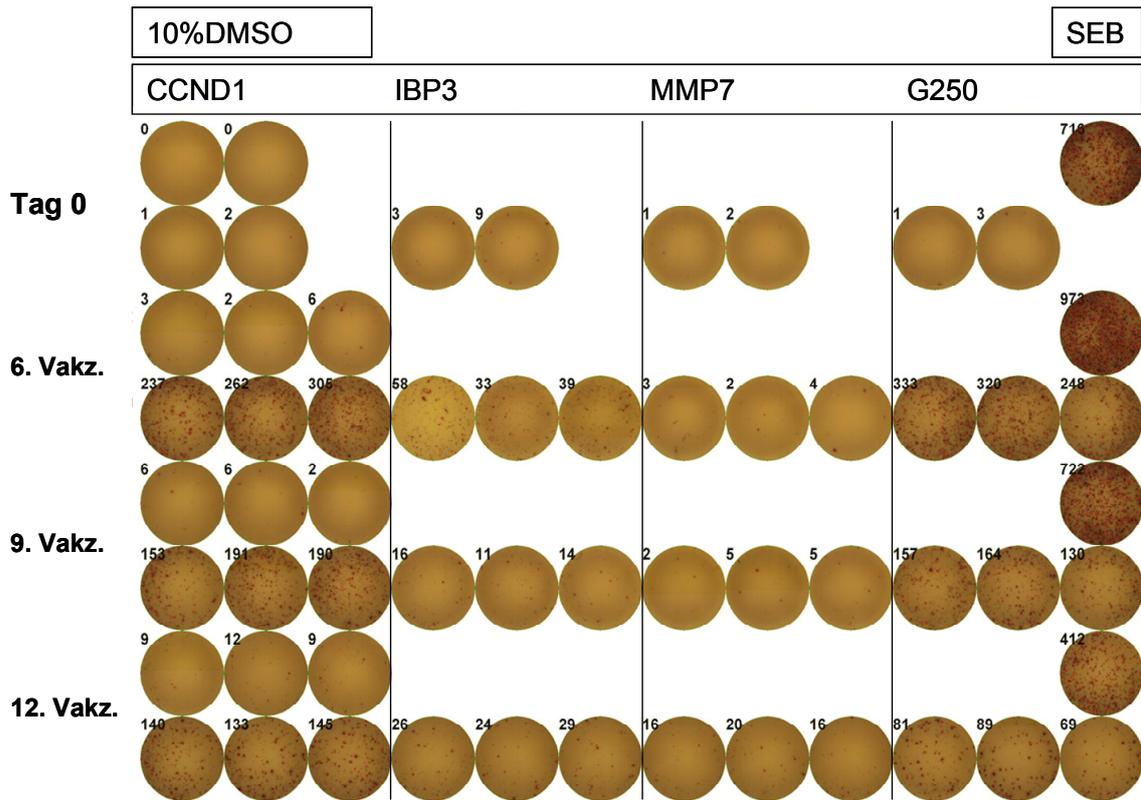


Abbildung 44: HLA-Klasse-II-Elispot von RCC369; 1. Zeitpunkt nur in Duplikaten; 140.000 PBMCs in jedem Ansatz

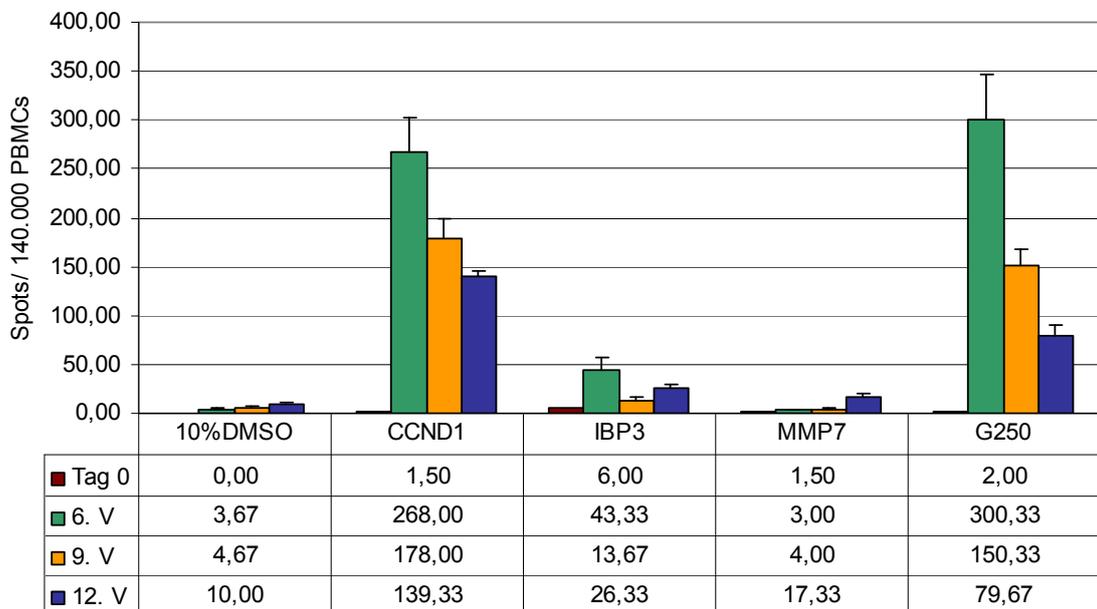


Abbildung 45: RCC 369 HLA-Klasse-II-Elispot, Diagramm zum oben gezeigten Elispot; in der Tabelle ist der Mittelwert aus der Spotanzahl in den drei Ansätzen pro Peptid angegeben (außer Tag 0: nur 2 Ansätze pro Peptid, hier auch keine Standardabweichung); mit 140.000 PBMCs in jedem Ansatz

3.12 Versuche mit der Tumorzelllinie MZ1257

3.12.1 Einführung

In den bisher gezeigten Versuchen wurden die CD4⁺-Zellen vor der intrazellulären Färbung mit Peptiden in einer Konzentration von 10 µg/ml stimuliert. Es sollte nun gezeigt werden, dass sie auch in der Lage sind, das natürlich prozessierte Peptid zu erkennen. Für diesen Zweck wurde eine Tumorzelllinie ausgesucht, die das jeweilige Peptid und Klasse II exprimiert sowie ein Patient mit einer bekannten starken IFN γ -Antwort auf dieses Peptid.

3.12.2 Charakterisierung der Tumorzelllinien (HLA und TAAs)

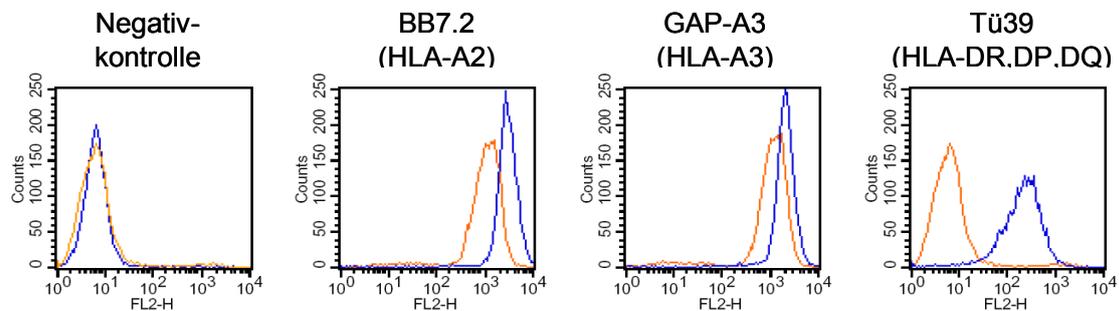


Abbildung 46: FACS-Färbung von MZ1257 mit Antikörpern gegen HLA-A2 und -A3 und Klasse II sowie dem Zweitantikörper GAM-PE, Negativkontrolle ist der Zweitantikörper allein. Tumorzellen ohne Vorbehandlung mit IFN γ (orange) und mit IFN γ , das 48 h vorher zugegeben wurde (blau)

Verschiedene Tumorzelllinien wurden auf eine Expression von HLA-Klasse II auf ihrer Oberfläche untersucht: A498, Lobe und MZ1257 (RCC-Zelllinien) sowie HCT116 und HT29 (Kolonkarzinom-Zelllinien). Zunächst ließ sich auf keiner der Zelllinien HLA-Klasse II nachweisen. Deswegen wurde in einem weiteren Versuch die Hälfte der Tumorzellen 48 Stunden vor der Färbung mit IFN γ behandelt und diese dann zusätzlich zu den unbehandelten Tumorzellen gefärbt. Die zwei Zelllinien HT29 und MZ1257 waren nach dieser IFN γ -Behandlung deutlich positiv für HLA-Klasse II (vgl. Abbildung 46). Da HT29 von einem Kolonkarzinom abstammt, kam diese Zelllinie dann doch nicht zur Anwendung, sondern die RCC-Zelllinie MZ1257.

Die von Dr. Cécile Gouttefangeas durchgeführten Genexpressionsanalysen mittels quantitativer Realtime-PCR hatten gezeigt, dass diese Zelllinie unter anderem ADFP, APOL1, MET, ITGA3 und CCND1 exprimiert. Für das im folgenden Experiment verwendete CCND1 war die Kopienanzahl >25.000x erhöht verglichen mit der Kopienanzahl, die ohne Reverse Transkriptase gemessen wurde.

3.12.3 MZ1257 als Target für die CD4+ T-Zellen

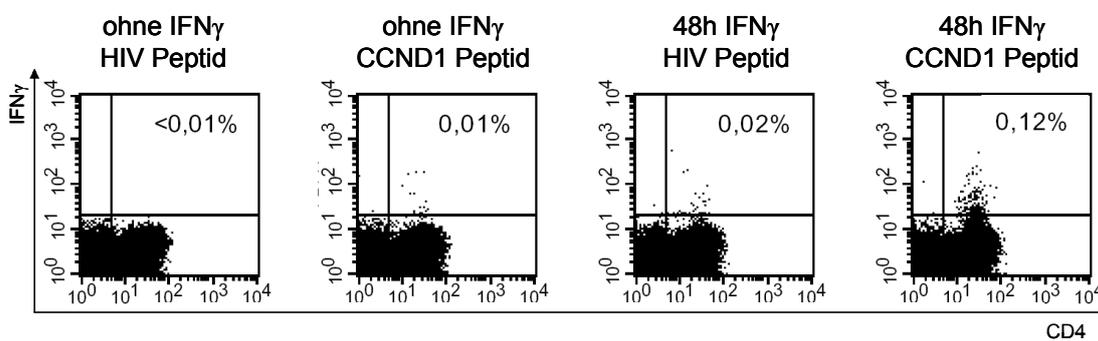


Abbildung 47: intrazelluläre Färbung der IFN γ -Produktion (Angabe in Prozent der CD4+ T-Zellen), jeweils ohne und mit IFN γ -Vorbehandlung und beladen mit HIV- oder CCND1-Peptid

Als Effektorzellen wurden die präsensitvierten PBMCs von RCC285 verwendet, da er eine sehr starke Antwort gegen das Klasse-II-Peptid CCND1 entwickelt hatte. Die HLA-Klasse-II-Typisierung war für die Zelllinie und den Patienten identisch (DRB1*11, DRB1*15, DRB3, DRB5).

Wie erwartet gab es keine IFN γ -Produktion nach Kontakt mit den unbehandelten, mit HIV-Peptid beladenen Tumorzellen. Am stärksten reagierten die PBMCs auf die mit IFN γ behandelten und mit CCND1 beladenen MZ-Zellen. Auch im zweiten Plot waren einige IFN γ -positive CD4-Zellen vorhanden, was entweder daran lag, dass die unbehandelten Tumorzellen doch eine geringe Menge Klasse II exprimierten oder dass das CCND1-Peptid nicht vollständig weg gewaschen werden konnte. Interessant ist der dritte Plot, in dem den PBMCs kein zusätzliches CCND1-Peptid angeboten wurde, sondern nur die in den MZ1257-Zellen exprimierten und prozessierten Peptide. Die IFN γ -Produktion in diesem Ansatz ist ein Hinweis darauf, dass die CD4+-T-Zellen der Patienten nach Vakzinierung in der Lage sind, physiologische Mengen der

Impfpeptide zu erkennen und mit einer Zytokinproduktion zu reagieren. Vergleichbare Ergebnisse ließen sich in einem Experiment mit den PBMCs von RCC369 beobachten. Da die Antworten alle im niedrigen Bereich unter 1% lagen, ist es erforderlich, sie in weiteren Experimenten zu bestätigen. Dafür wäre z.B. das Klonen von Effektorzellen sinnvoll, da mit diesen dann deutlichere Ergebnisse zu erwarten wären.

3.13 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen der Uro-RCC-Studie wurden die aus Blutproben isolierten PBMCs von zehn Patienten auf eine mögliche durch die Vakzinierung ausgelöste T-Zell-Induktion untersucht. Zum Zeitpunkt der Untersuchung waren erst bei 10 von 40 im Studienplan vorgesehenen Patienten die Vakzinierungen beendet. Die von diesen Patienten isolierten und eingefrorenen PBMCs wurden mit den Methoden Elispot, Tetramer- und Intrazelluläre Färbung untersucht. Zunächst wurde nur mit HLA-Klasse-I-Peptiden gearbeitet, die später um die ebenfalls im Vakzinierungscocktail enthaltenen HLA-Klasse-II-Peptide ergänzt wurden.

*Tabelle 8: Zusammenfassung statistisch signifikanter T-Zellantworten im Elispot für HLA-A*02*

Peptid	Protein	Patient	positive (getestete) Zeitpunkte
MET1	Met proto-oncogene	RCC258	15 (1,7,10,12,13,15)
GUCY	Guanylate cyclase 1	RCC258	10,15 (1,7,10,12,13,15)
RGS2	Regulator of G protein signaling 5	RCC218	6 (2,4,6)
CCND1	Cyclin D1	RCC197	11 (1,11,17)
		RCC218	6 (2,4,6)
		RCC258	10,12 (1,7,10,12,13,15)
		RCC314	4,5 (2,4,5)

Von den im HLA-A*02-Impfcocktail enthaltenen Peptiden scheint vor allem das Peptid von Cyclin D1 eine spezifische CD8-Antwort auszulösen bzw. zu verstärken. Nach Vakzinierung hatten 50% der Patienten (vier von acht) eine Antwort auf dieses Peptid im Elispot entwickelt. Des Weiteren zeigte ein Patient eine späte Antwort auf GUCY ab der 10. und auf MET1 bei der 15. Vakzinie-

zung. Häufig war die Spotanzahl in den Elispots für verschiedene Impfpeptide im Vergleich zur HIV-Kontrolle erhöht (z.B. RGS2, MET1, GUCY), wobei jedoch die statistischen Kriterien für eine positive Antwort nicht erfüllt waren (vgl. Kapitel 2.7).

In Tabelle 9 ist der Fokus auf die Frage, wie immunogen die Peptide sind, gerichtet. Für jedes HLA-A*02-Peptid ist angegeben, ob seine Eigenschaft als HLA-Ligand bzw. T-Zellepitop bewiesen ist und welchen SYFPEITHI-Score es hat. Daneben sind die Ergebnisse der Elispot-Assays und Tetramer-Färbungen aufgelistet.

*Tabelle 9: Zusammenfassung der Elispot- und FACS-Ergebnisse für die HLA-A*02-Impfpeptide; Score der Datenbank SYFPEITHI; HLA-Ligand/T-Zellepitop + = in der Literatur beschrieben bzw. ? = nicht bekannt; Angabe der Patienten mit statistisch signifikanter IFN γ -Antwort im Elispot sowie deren Bestätigung in der Tetramer-Färbung*

Peptid	Score	HLA-Ligand	T-Zell-epitop	Elispot	Tetramer-Färbung
MUC1	26	+	+	-	-
ADFP1	23	+	+	-	-
MET1	22	+	+	RCC258	RCC258
RGS2	19	+	+	RCC218	-
APOL1	24	+	?	-	-
APOL2	33	+	?	-	-
KIAA0367	27	+	?	-	-
GUCY	26	+	?	RCC258	-
ITGA3	27	+	?	-	-
CCND1	22	+	+	RCC197,218,258,314	RCC150,197,218,258,314
IMP1	30	+	+	bei allen Patienten	bei allen Patienten
HBV1	24	+	+	RCC199,RCC364 (zwei Patienten nicht getestet und vier zeigten keine Antwort)	kein Tetramer

Für das Influenzapeptid ließen sich bei allen Patienten sowohl im Elispot als auch in der Tetramer-Färbung spezifische T-Zellen nachweisen. Diese waren bereits an Tag 0 vorhanden und nahmen in der Regel im Verlauf der Vakzinierungen zu. Das HBV1-Peptid führte nur bei zwei von sechs getesteten Patienten zu einer IFN γ -Antwort, die durch die Vakzinierung verstärkt wurde.

Unter den restlichen Peptiden sticht besonders CCND1 hervor, das im Elispot bei vier Patienten und in der Tetramer-Färbung bei fünf Patienten positiv getes-

tet wurde. Die Peptide MET1, RGS2 und GUCY waren je einmal positiv, während für alle anderen Impfpeptide keine sichere T-Zellantwort nachweisbar war. Betrachtet man den von der Datenbank SYFPEITHI berechneten Score wird deutlich, dass nicht die Peptide mit dem höchsten Score eine T-Zellinduktion bewirkt haben, sondern die mit einem Wert von 19, 22 und 26.

Unterscheidet man zwischen Peptiden, die als T-Zellepitope bekannt sind und jenen, auf die das nicht zutrifft, wird deutlich, dass in der ersten Gruppe drei von fünf Peptiden immunogen wirkten (CCND1, RGS2 und MET1). Für die zweite Gruppe von Peptiden, von denen nur ihre Eigenschaft als HLA-Liganden bekannt war, konnte nur bei einem von fünf Peptiden eine T-Zellantwort (GUCY bei RCC258) gezeigt werden.

Die im Elispot aufgetretenen T-Zellantworten auf CCND1 und MET1 konnten in der Durchflusszytometrie jeweils bestätigt werden. Die Tetramere für RGS2 und GUCY zeigten eine ausgeprägte unspezifische Bindung an CD8 und es ließ sich keine Population abgrenzen.

Von den zwei HLA-A*02-negativen Patienten war einer mit HLA-A*01- und B*08-restringierten und ein weiterer Patient mit HLA-A*03-restringierten Peptiden vakziniert worden.

In der Testung des Patienten RCC285 trat im Elispot keine Antwort auf die HLA-A*01-Peptide MET2, MET3, RGS3, RGS5 und die HLA-B*08-Peptide RGS6, MET4 und MET5 auf. Gleiches gilt für die HLA-A*03-Peptide RGS1, ADFP2, ADFP3 und MMP7 bei RCC340. Mit Ausnahme von RGS1 und MMP7 ist keines dieser Peptide in der Literatur als T-Zellepitop beschrieben. Die HLA-A*03-Peptide sind nachgewiesene HLA-Liganden, während die HLA-A*01- und HLA-B*08-Peptide bisher nur Vorhersagen sind.

Tabelle 10: Zusammenfassung statistisch signifikanter T-Zellantworten im HLA-Klasse-II-Elispot

Peptid	Protein	Patient	positive (getestete) Zeitpunkte
CCND1	Cyclin D1	RCC150	10,18 (5,8,10,18)
		RCC197	1,4,6,11,17 (1,4,6,11,17)
		RCC199	4* (1,4,4*)
		RCC218	6 (2,4,6)
		RCC285	5,8,11 (5,8,11)
		RCC314	4,5 (2,4,5) nur Duplikate
		RCC364	2,7 (1,2,7)
		RCC369	6,9,12 (1,6,9,12)
IBP3	Insulin-like growth factor binding protein 3	RCC364	7 (1,2,7)
		RCC369	6,9,12 (1,6,9,12)
MMP7	Matrix metallo-proteinase 7	-	-
G250	Carbonic anhydrase 9	RCC150	5,8,10,18 (5,8,10,18)
		RCC197	4,6,11,17 (4,6,11,17)
		RCC199	4,4* (1,4,4*)
		RCC218	6 (2,4,6)
		RCC258	4,10,15 (1,4,7,10,13,15)
		RCC314	2,4,5 (2,4,5) nur Duplikate
		RCC364	7 (1,2,7)
		RCC369	6,9,12 (1,6,9,12)

Im Gegensatz zu HLA-Klasse I ergaben die HLA-Klasse-II-Versuche zahlreiche starke Antworten auf die Peptide CCND1, IBP3 und G250. Diese verteilten sich wie folgt: 8/10 Patienten entsprechend 80% für CCND1, 2/10 Patienten entsprechend 20% für IBP3 und 8/8 Patienten für G250. Die zwei HLA-A*02-negativen Patienten waren nicht mit dem HLA-Klasse-II-Peptid von G250 vakzinieren worden, so dass tatsächlich bei 100% der Patienten, die dieses Peptid erhalten hatten, eine Antwort auf G250 gezeigt werden konnte. Das ebenfalls im Vakzinierungs-Cocktail enthaltene MMP7 war in allen Tests negativ. Möglicherweise waren bei einigen Patienten schon schwache CCND1-Antworten vor Vakzinierung vorhanden, wie z.B. bei RCC197, die durch den Kontakt mit den Impfpeptiden verstärkt wurden. Auch bei RCC199 war die Spotanzahl im Ansatz mit CCND1 an Tag 0 im Vergleich zur Negativkontrolle erhöht (nicht signifikant). Die nach dem Elispot durchgeführte intrazelluläre Färbung zeigte auch eine schwache IFN γ -Antwort vor Vakzinierung (0,06% der CD4+-Zellen).

Insgesamt traten die HLA-Klasse-II-Antworten sehr früh auf (nach der 2.- 4. Vakz.) und blieben dann bei allen weiteren Zeitpunkten erhalten. Abgesehen von einem Patient war die Zunahme der IFN γ -Produktion nicht kontinuierlich, sondern eher von Schwankungen zwischen den einzelnen Zeitpunkten geprägt. Nur ein Patient, RCC340, zeigte keine sichere Reaktion auf die HLA-Klasse-II-Peptide, während bei allen anderen mindestens eines und meistens sogar zwei oder drei Peptide positiv getestet wurden.

Alle Patienten mit einer positiven Antwort auf CCND1 oder G250 im Elispot zeigten auch in der intrazellulären Färbung eine IFN γ -Produktion nach Stimulation mit diesen Peptiden.

*Tabelle 11: Zusammenfassung der Ergebnisse von Elispot und Durchflusszytometrie in Bezug auf die Klinik; getrennt nach Studienarm; M0=keine Metastasen vor Studienbeginn nachweisbar; M1=Metastasen vor Studienbeginn nachgewiesen aber vollständig entfernt; alle Patienten waren HLA-A*02-positiv mit Ausnahme der letzten beiden Patienten, die mit Peptiden entsprechend ihres HLA-Typs vakziniert wurden; Allerg.=Allergische Reaktion; Progr.=Progression der Erkrankung*

Monta- nide		HLA-Klasse I- Elispot	Tetramer- Färbung	HLA-Klasse II- Elispot	Intrazelluläre Färbung	Studien- verlauf
RCC199	M0	-	-	CCND1,G250	CCND1,G250	Allerg. 6/stop
RCC218	M0	CCND1,RGS2	CCND1	CCND1,G250	CCND1,IPB3, G250	Progr. 8/stop
RCC314	M1	CCND1	CCND1	CCND1,G250	CCND1,G250	Progr. 6/stop
RCC364	M0	-	-	CCND1,IBP3, G250	CCND1,IBP3, G250	Progr. 7/stop
RCC369	M1	-	-	CCND1,IPB3, G250	CCND1,G250	Progr. 13/stop
GM-CSF		HLA-Klasse I- Elispot	Tetramer- Färbung	HLA-Klasse II- Elispot	Intrazelluläre Färbung	Studien- verlauf
RCC150	M0	-	CCND1	CCND1,G250	CCND1,G250	stabil 18/18
RCC197	M0	CCND1	CCND1	CCND1,G250	CCND1,G250	stabil 18/18
RCC258	M0	CCND1, GU- CY,MET1	CCND1,MET1	G250	G250	stabil 18/18
RCC285 HLA-A1B8	M1	-	-	CCND1	CCND1	stabil 18/18
RCC340 HLA-A3	M1	-	-	-	-	Progr. 8/stop

In Tabelle 11 sind die Ergebnisse getrennt nach Patienten und verabreichtem Adjuvans gezeigt. Zusätzlich ist angegeben, ob bei den Patienten schon Metastasen aufgetreten waren (die aber entsprechend der Einschlusskriterien vor Studienbeginn entfernt sein mussten) und wie der klinische Verlauf im einjährigen Studienzeitraum war.

Sowohl im Montanide- als auch im GM-CSF-Studienarm waren zwei Patienten mit Metastasen vor Studienbeginn eingeschlossen. Aus diesem kleinen Patientenkollektiv ist noch nicht abzuleiten, ob sich vorbestehende Metastasen negativ auf den klinischen Verlauf auswirken und genauso wenig, ob sich in dieser Hinsicht Unterschiede zwischen den Studienarmen abzeichnen. Möglicherweise ergibt sich nach Auswertung aller 40 Patienten der Studie ein klareres Bild. Bei alleiniger Betrachtung dieser kleinen Gruppe scheint GM-CSF als Adjuvans bessere klinische Ergebnisse zu erzielen (vgl. Abbildung 48).

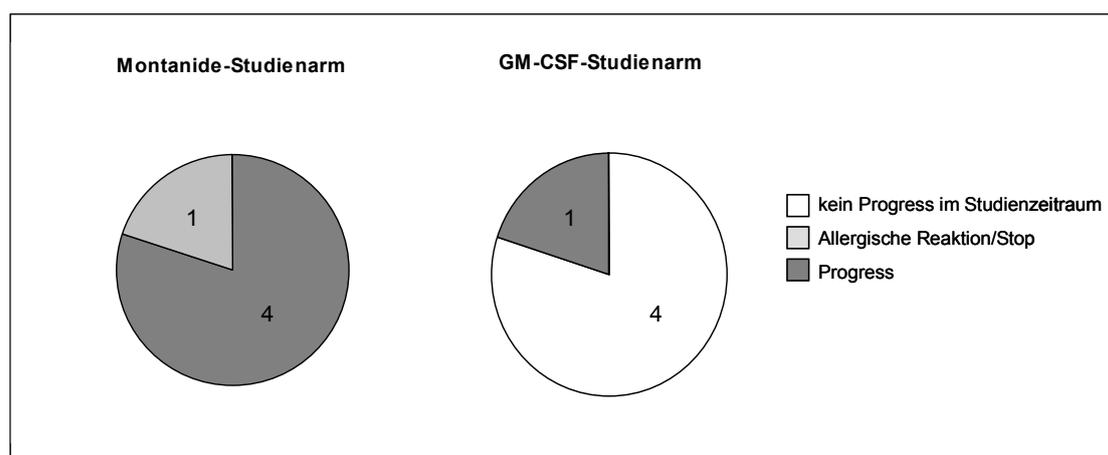


Abbildung 48: Vergleich klinischer Verlauf zwischen den beiden Studienarmen mit Montanide und GM-CSF als Adjuvans; angegeben ist jeweils die Anzahl der Patienten

In der Zwischenzeit sind jedoch im weiteren Studienverlauf drei neue Patienten der GM-CSF-Gruppe progredient geworden, wohingegen sechs Montanide-Patienten das Studienprotokoll ohne Rezidiv durchlaufen haben (bei zwei weiteren wurde im vorletzten CT eine Progredienz des Tumors festgestellt). Es ist also zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht möglich, die beiden Adjuvantien abschließend zu vergleichen und zu beurteilen. Es lassen sich lediglich Tendenzen zeigen, die nur als vorläufige Zwischenergebnisse zu betrachten sind.

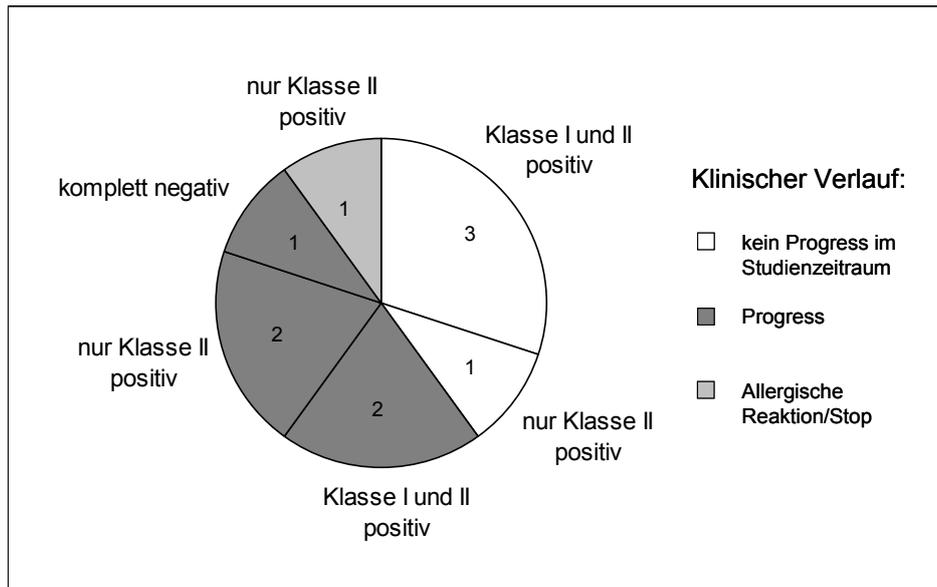


Abbildung 49: Anzahl der Patienten mit positiven HLA-Klasse-I- und/oder HLA-Klasse-II-Antworten in Bezug auf ihren klinischen Verlauf als Kreisdiagramm

Dieses Kreisdiagramm soll zeigen, ob es möglicherweise eine Korrelation zwischen in-vitro nachgewiesener T-Zellantwort und klinischem Verlauf gibt. Von den vier klinisch stabilen Patienten zeigten drei eine Antwort auf HLA-Klasse-I- und Klasse-II-Peptide aus der Vakzine. Bei einem Patienten waren nur HLA-Klasse-II-Antworten nachweisbar. Interessant ist, dass die Kombination „komplett negativ“ und „klinisch stabil“ nicht auftrat.

Trotz positiver T-Zellantworten entwickelten vier Patienten ein Rezidiv. Bei ihnen konnten die vorhandenen spezifischen T-Zellen ein Fortschreiten der Erkrankung nicht verhindern, worauf in der Diskussion genauer eingegangen wird. Bei einem Patienten mussten die Vakzinierungen aufgrund einer allergischen Reaktion beendet werden. Bis zur 4. Vakzinierung hatte sich bei ihm nur eine HLA-Klasse-II-Antwort entwickelt.

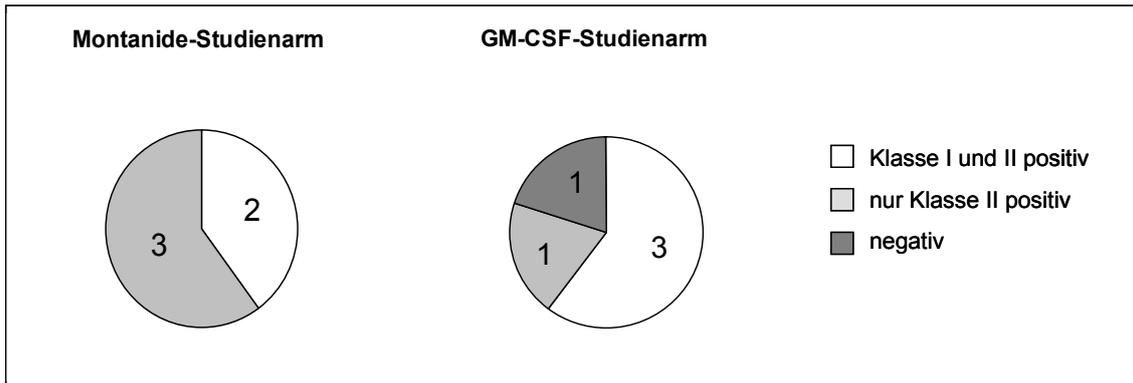


Abbildung 50: Zusammenfassung der Ergebnisse getrennt nach den beiden Adjuvantien Montanide und GM-CSF; in den Kreisdiagrammen ist die Anzahl der Patienten angegeben

Die Testung der fünf Patienten, die Montanide als Adjuvans erhalten hatten, ergab bei zwei Patienten eine Antwort auf das HLA-Klasse-I-Peptid von Cyclin D1. Die Klasse-II-Antworten fielen stärker aus und waren immer gegen 2-3 verschiedene Peptide aus dem Impfcocktail gerichtet. Bei den mit GM-CSF vakzinierten Patienten ist zu beachten, dass zwei der Patienten HLA-A2-negativ waren und deswegen nicht mit den Standardpeptiden sondern mit vorhergesagten Peptidsequenzen vakziniert wurden. In den Experimenten konnte keine T-Zellinduktion für diese Peptide nachgewiesen werden. Die drei HLA-A*02-Patienten dieser Gruppe haben alle eine Antwort gegen das HLA-Klasse-I-Peptid CCND1 entwickelt. Einer von ihnen zeigte zusätzlich eine T-Zellinduktion für GUCY und MET1.

Die ersten Elispots und intrazellulären Färbungen hatten gezeigt, dass sich im Verlauf der Vakzinierungen eine klare $IFN\gamma$ -Antwort auf die in der Vakzine enthaltenen HLA-Klasse-II-Peptide entwickelt hat. Das $IFN\gamma$ wurde dabei fast ausschließlich von $CD4^+$ -T-Zellen gebildet. Um diese Zellen genauer zu charakterisieren, wurden in den folgenden FACS-Färbungen die Interleukine IL-10 und teilweise IL-5 mit angefärbt.

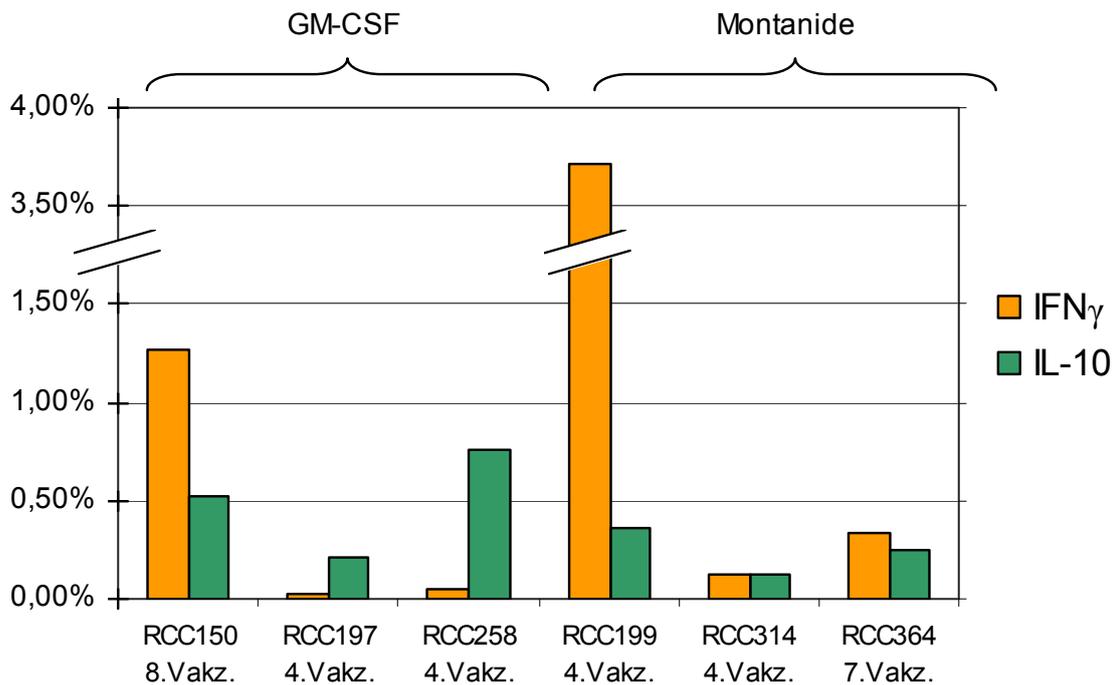


Abbildung 51: Ergebnisse der intrazellulären Färbungen; Anteil IFN γ - und IL-10-positiver Zellen unter den CD4+-Zellen in Prozent nach Stimulation mit dem HLA-Klasse-II-Peptid CCND1 an Tag 0, 12 und an Tag 21 vor der intrazellulären Färbung (Hintergrund der HIV-Kontrolle abgezogen)

Diese Experimente ergaben überraschend starke IL-10-Antworten, die in der Regel zeitgleich mit der IFN γ -Antwort auftraten, mit dieser anstiegen, sie in ihrer Stärke beinahe erreichten und in zwei Fällen sogar übertrafen. Wie dem Diagramm in Abbildung 51 zu entnehmen ist, war die IL-10-Antwort bei RCC197 und RCC258 stärker und die im Elispot beobachtete IFN γ -Produktion in der FACS-Färbung acht Tage später fast nicht mehr nachweisbar. Bei allen sechs getesteten Patienten trat eine erhöhte IL-10-Produktion auf. Auch die IL-5-Produktion war bei 2 von 3 mit IL-5-Antikörpern gefärbten Proben erhöht. Bei der Auswertung wurde darauf geachtet, ob die Zytokinproduktion von denselben Zellen ausging. In den Plots waren jedoch keine doppelt positiven Zellen im rechten oberen Quadranten zu sehen, wenn man sich je zwei Zytokine gegeneinander anzeigen ließ. Die Ergebnisse für das Peptid G250 entsprachen weitgehend denen für CCND1.

Es ist nicht auszuschließen, dass sich während der 21 Tage in Kultur das Verhältnis der verschiedenen T-Zellpopulationen verschiebt und sich in vivo keine

so ausgeprägten IL-10- und IL-5-Antworten finden würden. Es hat sich jedoch aufgrund der niedrigen Frequenzen als schwierig erwiesen, Antworten spezifischer T-Zellen ex-vivo zu detektieren. Bei einem Patienten (RCC285) wurde ein ex-vivo Elispot durchgeführt. Dabei sank die Zahl der IFN γ -sezernierenden Zellen auf 25 Spots/325.000, verglichen mit mehr als 1000 Spots/325.000 Zellen nach Präsensitivierung.

In den Versuchen mit der Tumorzelllinie MZ1257 konnte gezeigt werden, dass die PBMCs der Patienten nach einigen Vakzinierungen auf den Kontakt mit der CCND1-exprimierenden Zelllinie mit einer leichten IFN γ -Produktion reagieren. Diese war zwar wesentlich schwächer ausgeprägt als bei Stimulation mit dem gelösten Peptid, aber doch stärker als in der Negativkontrolle. Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass die induzierten T-Zellen in der Lage sind, physiologische Mengen des Peptids zu erkennen.

4 Diskussion

4.1 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurden T-Zellen von Patienten untersucht, die an einem fortgeschrittenen Nierenzellkarzinom erkrankt waren und im Rahmen einer noch andauernden Immuntherapie-Studie Peptidvakzinierungen erhalten haben. Dabei sollte die Frage beantwortet werden, ob durch die Vakzinierungen eine T-Zellreaktion gegen die Impfpeptide induziert bzw. verstärkt werden konnte. Da unter den Impfpeptiden sowohl HLA-Klasse-I- als auch HLA-Klasse-II-restringierte Peptide waren, wurden sowohl CD8+ als auch CD4+ T-Zellen mit verschiedenen in-vitro-Methoden vor und nach den Vakzinierungen getestet. Als Kriterium für eine Immunogenität der Peptide wurde eine vermehrte IFN γ -Sekretion nach Kontakt mit dem jeweiligen Antigen im Elispot gewertet. Als zweite Methode wurden für die CD8+ T-Zellen Tetramer-Färbungen und für die CD4+ T-Zellen intrazelluläre Zytokin-Färbungen durchgeführt. Die Verwendung des Durchflusszytometers erlaubte die gleichzeitige Färbung verschiedener Zytokine, wodurch die CD4+ T-Zellen genauer charakterisiert werden sollten. Desweiteren war von Interesse, ob diese CD4+ T-Zellen nicht nur synthetisierte Peptide, sondern auch Tumorzellen, die dieses Antigen exprimieren, erkennen.

4.2 Methodik

4.2.1 T-Zellmonitoring

Die für das T-Zellmonitoring verwendeten Methoden sind alle bereits etabliert und werden regelmäßig in Immuntherapiestudien verwendet. In den vergangenen zwei Jahrzehnten wurden mehr als 200 klinische Studien zu Antitumorvakzinierungen veröffentlicht [155].

Die für das Immunmonitoring verwendeten Methoden und Protokolle variierten dabei erheblich und erschweren die Interpretation und Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Mit dem Ziel, diese Protokolle zu optimieren und in Übereinstimmung zu bringen, wurde das „CIMT Monitoring Panel“ ins Leben gerufen, das zur „Association for Immunotherapy of Cancer“ gehört. In einer Kooperation

von 13 Laboratorien in 6 Ländern wurden Protokolle verglichen und basierend auf den Ergebnissen einer ersten Phase so verändert, dass die Tests möglichst sensitiv, im großen klinischen Maßstab anwendbar und dabei nicht zu teuer sind. Ein weiteres Kriterium war, dass sie reproduzierbare Ergebnisse liefern [156].

Eine andere Initiative, die vom Cancer Vaccine Consortium (CVC) ausging, evaluierte Elispot-Assays von 36 Laboratorien in 9 Ländern [157].

4.2.2 PBMC-Isolierung, Einfrieren und Auftauen

Der Studienplan der UroRCC-Studie sieht vor, dass im Rahmen des T-Zellmonitoring bei jedem Patienten die PBMCs in-vitro mit IFN γ -Elispots untersucht werden. Neben dieser durchgängig eingesetzten Methode können optional weitere Verfahren wie z.B. die Durchflusszytometrie angewandt werden.

Den Patienten wurde vor der ersten Vakzinierung und bei jeder weiteren der bis zu 18 Vakzinierungen Blut in Heparinröhrchen abgenommen und daraus die PBMCs mittels einer Dichtezentrifugation isoliert. Die Dauer vom Zeitpunkt der Entnahme bis zum Einfrieren der PBMCs sollte möglichst kurz sein. In einer Veröffentlichung von 2007 wurden die Auswirkungen der Kryokonservierung auf PBMCs systematisch analysiert. Die Autoren kommen darin zu dem Schluss, dass die Dauer vom Zeitpunkt der Venenpunktion bis zur Kryokonservierung den größten Einfluss auf die Funktionsfähigkeit der T-Zellen in immunologischen Tests hat. In ihrer Studie nahmen die Zahl der isolierten Zellen sowie der Anteil vitaler Zellen bei Verarbeitung nach 24 h im Vergleich zu 8 h ab. Die eingefrorenen PBMCs wurden innerhalb eines Monats aufgetaut und die Anzahl IFN γ -sezernierender Zellen im Elispot nach Stimulation mit CMV-Peptid überprüft. Dieser ergab wesentlich mehr Spots pro 10⁶ PBMCs für die nach 8 h verarbeiteten Proben im Vergleich zu den erst nach 24 h eingefrorenen Proben. Die Abnahme der IFN γ -sezernierenden Zellen kam besonders bei schwach ausgeprägten IFN γ -Antworten zum Tragen [158].

Für die UroRCC-Studie wurden die Zellen entweder direkt nach Abnahme oder innerhalb weniger Stunden in der Klinik für Urologie Tübingen abgeholt, sofort bearbeitet und eingefroren. Zum Einfrieren wurden die Zellen in FCS mit 10%

DMSO, welches das Auskristallisieren von Wasser verhindert, aufgenommen. Da DMSO auf Zellen toxisch wirkt, muss es nach dem Auftauen möglichst schnell und vollständig entfernt werden. Durch die Prozedur des Einfrierens und Auftauens gehen dennoch immer einige Zellen verloren; sie war aber unumgänglich da von einem Patienten mehrere Zeitpunkte im Vergleich getestet werden sollten. Beim Auftauen wurde DNase in das Auftaumedium gegeben, um die DNA abgestorbener Zellen zu entfernen und eine Verklumpung der vitalen Zellen zu verhindern. Nach mehreren Waschschritten wurden die Zellen in Trypanblau-Lösung gezählt, die eine Unterscheidung von vitalen und toten Zellen erlaubt. Durchschnittlich waren noch $\approx 70\%$ der vor dem Einfrieren gezählten Zellen vorhanden und vital.

In einer Studie von Kreher et al. wurde überprüft, ob sich die Frequenz und das Zytokinprofil der T-Zellen durch Kryokonservierung verändern. Die Elispots mit eingefrorenen/aufgetauten und frisch isolierten Zellen zeigten in Hinsicht auf $\text{IFN}\gamma$, IL-2, IL-4 und IL-5 keine Unterschiede [159].

Möglicherweise gehen einzelne T-Zellen auch durch eine verstärkte Apoptose neigung verloren. Die PBMCs von Patienten mit fortgeschrittenen Melanomen wiesen ex-vivo eine erhöhte spontane Apoptoserate auf, nicht aber die PBMCs von gesunden Spendern. Von der Apoptose betroffen waren verschiedene Zelltypen, darunter insbesondere die CD8^+ T-Zellen [160].

4.2.3 Präsensitivierung

Bevor die eigentlichen T-Zell-Assays begonnen werden konnten, musste eine Präsensitivierung durchgeführt werden. Es wäre zwar wünschenswert, die T-Zellen unmittelbar ex-vivo zu untersuchen, um mögliche Einflüsse durch die Zellkultur auszuschließen. Die Sensitivität der verfügbaren Assays reicht jedoch nicht aus, Frequenzen in der Größenordnung, wie sie bei vielen tumorspezifischen T-Zellen zu finden sind, aufzuspüren. Deswegen wurden die PBMCs nach dem Auftauen mit den Impfpeptiden stimuliert und 12 Tage unter IL-2-Zugabe expandiert. Das hierfür verwendete Protokoll war zuvor mit viralen Antigenen optimiert worden (siehe Kapitel 3.1.1).

Entgegen der hiermit angestrebten Amplifikation der spezifischen T-Zellen kann ihre Anzahl während der Phase der Präsensitivierung jedoch sogar abnehmen. Dies wurde für die PBMCs von Melanompatienten beschrieben, bei denen zwar die Anzahl CMV- und EBV-spezifischer T-Zellen zwei Wochen nach einer ersten Stimulation zugenommen hatte, für Melanom-Antigene aber ein gegensätzlicher Effekt beobachtet wurde: Im ersten Elispot vor Präsensitivierung traten Antworten auf tumorassoziierte Antigene auf, die zum Teil nach der zweiwöchigen Präsensitivierung im Elispot nicht mehr nachweisbar waren [161]. Ein in der vorliegenden Arbeit durchgeführter ex-vivo-Elispot zeigte jedoch eine sehr schwache IFN γ -Antwort auf das HLA-Klasse-II-Peptid von CCND1. Viel stärker fiel diese Antwort nach Präsensitivierung aus, was für eine Expansion der spezifischen T-Zellen spricht (vgl. Kapitel 3.7.3 und 4.3.8).

4.2.4 Elispot

Mit dem Elispot verfügt man über einen funktionellen Test, der T-Zellaktivierung auf der Basis einzelner Zellen sensitiv misst. Er hat seit seiner ersten Beschreibung 1988 weite Verbreitung gefunden und es wurde insgesamt viel Erfahrung mit dieser Methode gesammelt [147, 148, 162-164].

Die in der vorliegenden Arbeit detektierten Impfpeptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen zeigten Frequenzen von $\approx 1/12.250$, $1/9500$, $1/4000$, $1/14.000$ und $1/21.000$ der PBMCs nach Präsensitivierung. Die Grenze der Detektion wird in einer Veröffentlichung von 2004 mit 0,01% entsprechend $1/10.000$ angegeben [165]. Im CIMT Monitoring Panel lag die mittlere Detektionsrate bei $1/2859$ mit zum Teil erheblichen Unterschieden zwischen den einzelnen Gruppen. Manche konnten eine untere Detektionsgrenze von $1/40.000$ PBMCs im Elispot vorweisen [156]. Das Cancer Vaccine Consortium bezifferte die untere Detektionsrate auf $\approx 1/14.300$ [166]. Diese Zahlen verdeutlichen, dass sich die Frequenzen Impfpeptid-spezifischer T-Zellen in der vorliegenden Arbeit an der unteren Nachweisgrenze bewegten.

Die 11 teilnehmenden Labore des CIMT Monitoring Panel detektierten in ihren Elislots 50% aller möglichen T-Zellantworten. Dabei ist zu beachten, dass die Elislots ex-vivo, d.h. ohne Präsensitivierung durchgeführt wurden. Die folgen-

den Faktoren wurden als nachteilig für eine hohe Sensitivität identifiziert: eine fehlende Ruhephase nach dem Auftauen der Zellen, der Einsatz von weniger als 4×10^5 Zellen pro Well und die Verwendung von allogenen Antigen-präsentierenden Zellen. Aufgrund der möglichen Variabilität der Replikate sollten mindestens Triplikate, d.h. drei Ansätze für jedes Peptid eingeplant werden [156].

Die Analyse des Cancer Vaccine Consortium (CVC) kam zu ähnlichen Ergebnissen wie das CIMT Monitoring Panel. Auch hier wirkten sich Protokollunterschiede vor allem insofern aus, als dass T-Zellen mit niedriger Frequenz nicht von allen teilnehmenden Gruppen detektiert werden konnten. Wie das CIMT Monitoring Panel kamen sie zu dem Schluss, dass es von Vorteil ist, die PBMCs nach dem Auftauen über Nacht ruhen zu lassen. Desweiteren empfehlen sie eine Zählmethode für apoptotische Zellen, um korrekte Zellverdünnungen im Elispot zu garantieren [157].

In den für diese Arbeit durchgeführten Elispots wurden meistens weniger als 4×10^5 Zellen pro Well ($1,5 - 4 \times 10^5$ Zellen) eingesetzt, da bei der zur Verfügung stehenden Anzahl von PBMCs nur auf diese Weise eine Untersuchung mehrerer Peptide in Triplikaten möglich war. Sehr schwache T-Zellantworten wurden deswegen möglicherweise übersehen. Dazu passt, dass die Spotanzahl für die Impfpeptide häufig leicht erhöht war, ohne dabei das Signifikanzniveau zu erreichen.

Im $\text{IFN}\gamma$ -Elispot wird nur die T-Zellaktivierung gemessen, nicht aber ihre zytolytische Effektorfunktion (Ausschüttung von Granzym und Perforin). Um eine Aussage über die zytolytische Funktion der CD8+ T-Zellen zu treffen, können z.B. Chromium-Release-Assays oder Granzyme B-Elispots durchgeführt werden [167].

4.2.5 Tetramer-Färbung

Als zweite Methode zur Analyse der spezifischen CD8+ T-Zellen wurden die PBMCs nach dem Elispot mit Tetrameren und anti-CD8-Antikörpern gefärbt.

Das CIMT Monitoring Panel kam in seinem Resumée 2007 zu dem Schluss, dass vor allem die Anzahl der gemessenen T-Zellen die Sensitivität der Tetra-

mer-Färbung beeinflusst. Dieser Effekt spielte besonders dann eine Rolle, wenn die Frequenz der spezifischen T-Zellen niedrig war. Lag die Anzahl der gemessenen CD8+ T-Zellen unter 30.000, konnten nur 56% der tatsächlich vorhandenen Influenza-Tetramer bindenden Populationen detektiert werden. Bei Messung von mehr als 30.000 CD8+ T-Zellen stieg die Detektionsrate auf 84%. Diese Ergebnisse führten zu der Empfehlung, mindestens 1×10^6 Zellen zu färben und alle vorhandenen Zellen im Ansatz zu messen [156].

Die als Cluster abgrenzbare Tetramer-bindende Population sollte sich deutlich von den CD8+ Tetramer-negativen Zellen abheben. Dies setzt jedoch eine hohe Avidität der spezifischen T-Zellen für das Antigen voraus, was auf zahlreiche Tumorassoziierte Antigene nicht zutrifft. Folglich kann es schwierig sein, nieder-affine TAA-spezifische T-Zellen vom Hintergrund zu unterscheiden [168].

Die Bindung an Tetramere ist von weiteren Faktoren abhängig. So scheint eine Färbung bei 4°C, wie sie in unserem Labor durchgeführt wird, die Bindung an nieder-affine T-Zellen zu ermöglichen (verbunden mit einer erhöhten Kreuzreaktivität). Bei einer Temperatur von 37°C werden bevorzugt hochaffine T-Zellen gebunden. Auch die Konzentration der verwendeten Tetramere und anti-CD8-Antikörper haben einen Einfluss auf die Tetramer-Färbung [168].

In einer Studie an Melanompatienten, die vier Vakzinierungen mit einem Melan-A-Peptid in inkomplettem Freund's Adjuvans erhielten, wurden wie in der Uro-RCC-Studie IFN γ -Elispots und Tetramer-Färbungen für das T-Zellmonitoring verwendet (allerdings ex-vivo ohne Präsensitivierung). Nach den Vakzinierungen lag der durchschnittliche Anteil Melan-A-Tetramer-bindender Zellen unter den CD8+ T-Zellen bei 0,11% (Standardabweichung $\pm 0,14$). Die untere Detektionsgrenze wurde mit 0,01% angegeben. Sie wurde vor allem durch gerätbedingtes elektronisches Rauschen sowie die Gesamtzahl der zu messenden Ereignisse beschränkt. Als Kriterium für eine spezifische T-Zellpopulation mussten die Punkte in den Plots darüber hinaus in einem typischen Cluster zusammen liegen. In dieser Studie korrelierte die im IFN γ -Elispot ermittelte Frequenz spezifischer T-Zellen mit den Ergebnissen der Tetramer-Färbung, wobei sie in Letzterer in der Regel höher lag [165].

Wie schon in anderen Studien gezeigt, gab es offensichtlich Tetramer-bindende T-Zellen, die im Elispot nicht in Erscheinung traten, da sie kein IFN γ sezernierten. Es kann sich dabei um naive, anergische oder hyporesponsive CD8⁺ T-Zellen handeln, die alle in der Tetramer-Färbung erfasst werden, oder um T-Zellen mit einem Zytokinprofil ohne IFN γ [165, 169].

4.2.6 Intrazelluläre Färbung

Sowohl der Elispot als auch die intrazelluläre Färbung beruhen beide auf einer Messung der IFN γ -Produktion aktivierter T-Zellen. In den bisherigen Studien wurden für beide Methoden niedrige Detektionsgrenzen angegeben, wobei die für den Elispot noch etwas niedriger zu liegen scheint. Der Vorteil der intrazellulären Färbung ist, dass sie gleichzeitig eine quantitative und qualitative Analyse der Zellen erlaubt [168].

An HIV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen wurden die beiden Methoden im Vergleich getestet, mit dem Ergebnis, dass sich die in Elispot und intrazellulärer Färbung gemessenen Frequenzen nicht unterschieden [169].

Ein konstant niedriger Hintergrund ist für die Detektion niedriger Frequenzen unbedingt erforderlich. In den für diese Arbeit durchgeführten intrazellulären Färbungen lag die spontane IFN γ -Produktion in der HIV-Negativkontrolle in fast allen Ansätzen unter 0,01% der CD8⁺ T-Zellen.

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Durch das Vakzinierungspeptid CCND1 induzierte HLA-Klasse-I-Antworten bei fünf Patienten

Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Patienten nach Vakzinierung eine in-vitro-Immunantwort auf einzelne in der Impfung enthaltene Peptide entwickelten. Unter den HLA-Klasse-I-Antworten waren die gegen CCND1 gerichteten besonders häufig in den Elispots und Tetramer-Färbungen zu finden. Bei fünf von acht getesteten HLA-A*02-positiven Patienten konnten CCND1-spezifische T-Zellen detektiert werden. Der Nachweis gelang bei allen fünf anhand einer deutlich abgrenzbaren Population in der Tetramerfärbung und

bei vier Patienten im IFN γ -Elispot (die Spotanzahl beim fünften Patienten war zwar erhöht aber nicht statistisch signifikant). Das Quellprotein Cyclin D1/CCND1 dient als Zellzyklusregulator und ist am Übergang der G1- in die S-Phase beteiligt. Es ist ein bekanntes Protoonkogen, das in vielen Nierenzellkarzinomen überexprimiert ist [170].

4.3.2 Weitere HLA-Klasse-I-Antworten

Bei einem Patienten war die Spotanzahl im Elispot bei der 10. Vakzinierung für das Peptid GUCY erhöht, fiel dann aber wieder ab und lag zum Zeitpunkt der 13. und 15. Vakzinierung unter dem Signifikanzniveau. Derselbe Patient zeigte eine späte IFN γ -Antwort auf das Impfpeptid MET1 bei der 15. Vakzinierung. Ein weiterer Patient zeigte bei der 6. Vakzinierung eine schwache T-Zellinduktion RGS2-spezifischer Zellen.

4.3.3 Keine T-Zellantworten nach Stimulation mit den übrigen HLA-A*02-Peptiden MUC1, ADFP1, APOL1, APOL2, KIAA0367 und ITGA3

Für die übrigen sechs Vakzinierungspeptide aus dem HLA-A*02-Cocktail wurden keine T-Zellantworten beobachtet. Auffällig ist dabei, dass von den fünf als T-Zellepitop bekannten HLA-A*02-Impfpeptiden (MUC1, ADFP1, MET1, RGS2, CCND1) drei T-Zellantworten induzieren konnten (MET1, RGS2, CCND1), während für die anderen fünf Peptide (APOL1, APOL2, KIAA0367, GUCY, ITGA3) nur in einem einzigen Fall (GUCY bei RCC258) eine Antwort der CD8+ T-Zellen nachweisbar war. Möglicherweise sind die Peptide aus der zweiten Gruppe nur wenig immunogen oder dienen zum Teil nicht als T-Zellepitope.

Für KIAA0367 sind z.B. noch keine CTL-Antworten beschrieben. Die bei Patienten mit Magenkrebs nachgewiesenen Antikörper deuten jedoch auf eine Aktivierung von CD4+ T-Zellen hin, die auch mit einer CD8+ T-Zellantwort einhergehen könnte [120]. So wurden für das tumorassoziierte Antigen NY-ESO-1 bei Melanompatienten, auf deren Tumor dieses Antigen exprimiert war, CTL-Antworten beschrieben, die von einer Antikörper-Antwort begleitet wurden [117].

Auch im Fall von Adipophilin/ADFP wurde durch die Vakzinierung keine messbare CTL-Antwort induziert. Adipophilin bleibt dennoch ein vielversprechender Kandidat für Peptidvakzinierungen, da es im Normalgewebe kaum vorhanden ist (geringe Expression in Adipozyten, Sertoli- und Leydigzellen und der Nebennierenrinde), während es in RCCs selektiv überexprimiert wird (sogar um den Faktor 29,1 bei einer mit Microarray untersuchten RCC-Probe in der Arbeit von Weinschenk et al. [120]). Seine Eigenschaft als T-Zellepitop wurde bereits gezeigt [130].

Das von MUC1 stammende Peptid ist als HLA-A*02-T-Zellepitop bekannt und wurde bereits in einer Vakzinierungsstudie mit Dendritischen Zellen an 20 RCC-Patienten erprobt. Bei 11 von 20 Patienten konnten nach 3-4 Vakzinierungen MUC1-spezifische zytotoxische T-Zellen im ^{51}Cr release assay festgestellt werden. Diese waren nach Restimulation in der Lage, mit MUC1-Peptid beladene Zielzellen sowie die MUC1-positive Zelllinie A498 zu lysieren. Die beobachteten klinischen Antworten (eine komplette, zwei partielle, zwei gemischte Antworten und vier stabile Verläufe) korrelierten signifikant mit den durch die Vakzinierung induzierten Immunantworten [126]. Im Gegensatz dazu konnte in der UroRCC-Studie bei keinem der 8 HLA-A*02- Patienten MUC1-spezifische CD8+ T-Zellen nachgewiesen werden. Das von Wiernecky et al. verwendete Impfschema aus DCs und dem PAN-DR-bindenden Peptid PADRE als Adjuvans scheint in diesem Fall auf die MUC1-spezifischen Vorläuferzellen immunogener gewirkt zu haben.

Als Voraussetzung für eine erfolgreiche Vakzinierung müssen Impfpeptid-spezifische Vorläuferzellen vorhanden sein. Bei Melanomen wurde deren Frequenz analysiert und mit ungefähr 5×10^{-7} angegeben [110, 171, 172].

4.3.4 Ergebnisse der mit vorhergesagten T-Zellepitopen vakzinierten HLA-A*02-negativen Patienten

Die zwei HLA-A*02-negativen Patienten wurden mit vorhergesagten Peptidsequenzen vakziniert. Der eine erhielt vier HLA-A*03-restringierte Peptide, der andere vier HLA-A*01 und drei HLA-B*08-Peptide. Für keines dieser Peptide konnte eine T-Zellinduktion gezeigt werden. Auch wenn man noch eine größere

Anzahl von Patienten in diesem Studienarm abwarten muss, stellt sich doch die Frage, ob in Zukunft allein aufgrund von Vorhersagen vakziniert werden sollte. Wie bereits erwähnt führten von den fünf bekannten T-Zellepitopen, die in dieser Studie verwendet wurden, immerhin drei zu einer T-Zellinduktion. Einschränkung muss jedoch beachtet werden, dass auch mit diesen bekannten Epitopen, abgesehen von CCND1, häufig keine Antworten gesehen wurden (bei 7 von 8 HLA-A*02-positiven Patienten für MET1 und RGS2 und bei 8 von 8 Patienten für ADFP1 und MUC1). Zudem wurden in der Zwischenzeit zwei der vier HLA-A*03-Peptide als T-Zellepitope bestätigt (RGS1 und MMP7) [132, 138]. Die Tatsache, dass nach Vakzinierung dennoch keine T-Zellantwort nachweisbar war, ist möglicherweise auf die unterschiedliche Methodik zurück zu führen (Induktion der spezifischen CD8+ T-Zellen durch beladene Dendritische Zellen in-vitro vs. Peptidvakzinierung mit Adjuvantien in-vivo gefolgt von einer in-vitro-Untersuchung).

4.3.5 Alle Patienten verfügen über CD8+ T-Zellen, die spezifisch für das Influenzapeptid sind und die in der Regel im Verlauf der Vakzinierungen ansteigen

Für das in der Vakzinierung enthaltene Influenzapeptid ließen sich bei allen Patienten sowohl im Elispot als auch in der Tetramer-Färbung spezifische T-Zellen nachweisen. Diese waren bereits an Tag 0 vorhanden und nahmen in der Regel im Verlauf der Vakzinierungen zu. Eine andere Beobachtung machten Pittet et al. in ihrer Studie an Melanopatienten, die neben Melan-A das auch in der UroRCC-Studie verwendete Influenza-Peptid erhalten hatten. Während die Zahl Melan-A-spezifischer CD8+ T-Zellen stark anstieg, blieb die Frequenz Influenza-spezifischer T-Zellen während der sechs Vakzinierungen konstant bei 0,03% [173].

4.3.6 Ergebnisse der Peptidvakzinierung bei Melanopatienten

Betrachtet man die Ergebnisse anderer Vakzinierungsstudien, die bisher zum größten Teil an Melanopatienten durchgeführt wurden, ergibt sich ein eher uneinheitliches Bild:

In einer Studie von Bettinotti et al. erhielten neun Melanompatienten vier Zyklen einer Vakzine aus MAGE-A12-Peptid in inkomplettem Freund's Adjuvans. Bei keinem der Patienten konnte eine verstärkte CTL-Antwort nachgewiesen werden, obwohl die Immunogenität dieses HLA-Cw*0701-Peptids in früheren Studien gezeigt worden war [174].

Im Gegensatz dazu konnten Cormier et al. durch Vakzinierung mit einem MART-1/Melan A-Peptid gelöst in inkomplettem Freund's Adjuvans eine Induktion MART-1-spezifischer CTLs auslösen. Die Vakzinierung erfolgte nach einem ähnlichen Schema wie in der zuvor beschriebenen Studie. Der einzige Unterschied, abgesehen vom Peptid, lag in der Verabreichungsform (subkutan statt intradermal). Nach zwei in-vitro-Stimulationen war die IFN γ -Produktion der PBMCs bei einem dritten Kontakt mit dem Impfpeptid deutlich höher als vor Vakzinierung. Trotz der erfolgreichen Induktion MART-1-spezifischer Zellen zeigte in dieser Studie keiner der Patienten ein klinisches Ansprechen [175].

Umgekehrt wurden z.B. von Marchand et al. Patienten beschrieben, bei denen nach Vakzinierung mit MAGE-3.A1 klinisch eine Tumorregression auftrat, ohne dass in ihrem Blut Impfpeptid-spezifische CTLs nachweisbar waren. Die Autoren gehen dennoch davon aus, dass die bei 7 von 34 Patienten aufgetretene Tumorregression in Verbindung zur Behandlung steht, da die spontane Regressionsrate von metastasierten Melanomen in der Regel niedriger liegt (hier angegeben mit 0,4%). Ein Grund für den fehlenden Nachweis von MAGE-3.A1-spezifischen CD8⁺ T-Zellen ist möglicherweise die zu niedrige Frequenz nach nur drei Vakzinierungen [176].

Diese niedrige Frequenz könnte auch der Grund dafür sein, warum in der vorliegenden Arbeit eher wenige CD8⁺ T-Zellantworten gefunden wurden. Eine genaue Angabe der Frequenz ist nicht möglich, da hierfür eine ex-vivo Analyse der PBMCs durchgeführt werden müsste. Nach 12 Tagen Präsensitivierung sind dagegen einzelne T-Zellklone amplifiziert und ergeben eine höhere als die tatsächlich im Körper vorliegende Frequenz, während bei anderen, die nicht proliferieren konnten, die Frequenz unterschätzt wird. In den bisher beschriebenen Fällen einer erfolgreichen T-Zellinduktion nach Vakzinierung mit einem TAA lag die Frequenz zwischen 10^{-2} und 10^{-6} der CD8⁺ T-Zellen [177].

In einer neueren Arbeit gelang es Powell und Rosenberg nach Vakzinierung mit dem bereits erwähnten modifizierten gp100-Peptid in inkomplettem Freund's Adjuvans, bei allen fünf vakzinierten Patienten gp100-spezifische T-Zellen ex-vivo nachzuweisen [178]. Diese erreichten Frequenzen zwischen 4,8% und 38,1% der zirkulierenden CD8+ T-Zellen. Ähnlich wie in der UroRCC-Studie wurden drei der Patienten über ein Jahr insgesamt 16 Mal immunisiert (allerdings im Abstand von drei Wochen). Im Elispot war nach vier Vakzinierungen bei einem Patienten noch keine IFN γ -Antwort auf gp100 nachweisbar und bei einem weiteren Patienten die Antwort mit 17 Spots pro 100.000 PBMCs noch sehr niedrig. Ein großer Sprung in der Frequenz IFN γ -sezernierender Zellen trat bis zum nächsten getesteten Zeitpunkt nach der 8. Vakzinierung auf. Dies entspricht unserer Beobachtung, dass sich die CD8+ T-Zellantwort zwischen der 6. und 10. Vakzinierung entwickelt bzw. sie dann erst nachweisbar wird. Noch höher waren die erreichten T-Zellfrequenzen bei zwei Patienten, die vier Zyklen bestehend aus je 10 wöchentlichen Injektionen gefolgt von drei Wochen Pause erhielten. Mit dieser hohen Anzahl von Vakzinierungen wurden im ex-vivo-Elispot mehr als 1000 Spots pro 100.000 PBMCs erreicht. Dazu passend ist die Beobachtung von Monsurro et al., die feststellten, dass die Frequenz Impfpeptid-spezifischer Zellen mit der Zahl der Vakzinierungen ansteigt [179].

4.3.7 Zahlreiche HLA-Klasse-II-Antworten auf CCND1, G250 und IBP3 nach Vakzinierung

Die in der Vakzine enthaltenen HLA-Klasse-II-Peptide erwiesen sich als sehr immunogen: Neun von zehn Patienten zeigten eine IFN γ -Antwort auf mindestens eines der vier Impfpeptide. Diese waren wie folgt verteilt: Zwei Patienten zeigten Antworten auf CCND1, G250 sowie IBP3, fünf weitere Patienten auf CCND1 sowie G250 und die verbleibenden zwei Patienten nur auf CCND1 bzw. G250. Die HLA-Klasse-II-Antworten traten sehr früh im Verlauf der Vakzinierungen auf, in der Regel zwischen der 2. und 6. Vakzinierung. Nur ein einziger Patient (RCC340) zeigte überhaupt keine Reaktion auf die HLA-Klasse-II-Peptide.

4.3.8 Eine starke HLA-Klasse-II-Antwort auf das Peptid CCND1 lässt sich auch ex-vivo im Elispot nachweisen

In der Arbeit konnte eine HLA-Klasse-II-Antwort auf das Peptid CCND1 ex-vivo nachgewiesen werden (RCC285). Nach Präsensitivierung war die Spotanzahl so hoch, dass die Spots nicht einzeln abgegrenzt und ausgezählt werden konnten. Im ex-vivo-Elispot sank sie auf 8 Spots/100.000 PBMCs und lag damit im Bereich der unteren Detektionsgrenze des Elispots (vgl. Kapitel 4.2.4). Da für diesen Versuch ein Patient mit einer besonders starken IFN γ -Sekretion im Elispot ausgewählt worden war, ist davon auszugehen, dass die ansonsten schwächer ausgeprägten T-Zellantworten ex-vivo überhaupt nicht nachweisbar wären. Dies unterstreicht die Notwendigkeit einer Amplifikation, um auch niederfrequente T-Zellen detektieren zu können.

4.3.9 Die CD4+ T-Zellen der Patienten sind möglicherweise in der Lage, Zellen der Tumorzelllinie MZ1257, die CCND1 exprimiert, zu erkennen und mit einer IFN γ -Produktion zu reagieren

Gegen dieses CCND1-Peptid gerichtete CD4+ T-Zellen wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, nicht nur das synthetisierte, sondern auch das natürlich prozessierte Peptid, wie es auf Tumorzellen exprimiert wird, zu erkennen. In Experimenten mit der Tumorzelllinie MZ1257 reagierten die PBMCs von zwei Patienten bei Kontakt mit CCND1-Peptid-beladenen Zellen und - wenn auch deutlich weniger - auf mit irrelevantem HIV-Peptid beladene MZ1257-Zellen. Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass die RCC-Tumorzelllinie, deren CCND1-Expression nachgewiesen ist, von CD4+ T-Zellen spezifisch erkannt wird.

Die mit der Tumorzelllinie MZ1257 gewonnenen Ergebnisse müssen in weiteren Experimenten bestätigt werden, da keine eindeutige Negativkontrolle zur Verfügung stand. Die Tumorzellen wurden in der verwendeten Versuchsanordnung mit IFN γ behandelt um eine HLA-Klasse-II-Expression auszulösen. Durch diese IFN γ -Behandlung könnten jedoch noch andere Veränderungen (z.B. Wechsel von Standardproteasom zu Immunproteasom) eintreten, die zu einer Aktivierung der PBMCs führen. Wichtig wäre auch, das Verhalten der PBMCs von einem Zeitpunkt vor Vakzinierung im Vergleich zu testen. Man könnte auch die

CCND1-spezifischen T-Zellen selektionieren und klonieren mit dem Ziel, stärkere und eindeutig zuordenbare Antworten zu erhalten.

4.3.10 Kein Patient zeigte eine Induktion MMP7 spezifischer CD4+ T-Zellen

Für das HLA-Klasse-II-Peptid MMP7 fielen alle Tests negativ aus. Das HLA-Klasse-II-Peptid von MMP7 ist jedoch als T-Zellepitop beschrieben. In der Arbeit von Dengjel et al. wurden bei 3 von 4 Patienten nach vier Stimulationen MMP7-spezifische CD4+ T-Zellen in der intrazellulären Färbung nachgewiesen. Im peripheren Blut von RCC-Patienten konnte allerdings nur bei einem von zehn Patienten eine spontane HLA-Klasse-II-Antwort auf MMP7 in-vitro nachgewiesen werden [140]. Da das Peptid eine niedrige Immunogenität aufweist und MMP7 darüber hinaus nur in einzelnen RCCs überexprimiert wird (4 von 11 RCC-Tumorproben in der Studie von Krüger et al. [121]), ist seine weitere Verwendung in Vakzinierungen für RCC-Patienten eher nicht empfehlenswert.

Eine ex-vivo nachweisbare CD4-T-Zellinduktion wurde zum ersten Mal 2002 im Rahmen einer Vakzinierungsstudie von Schuler-Thurner et al. mit MAGE-3 beladenen DCs beschrieben [180].

Marchand et al. veröffentlichten ein Jahr später eine Studie mit einem rekombinanten MAGE-A3-Protein in Kombination mit AS02B. Nach Vakzinierung wurde bei 23 von 24 Melanompatienten eine IgG-Antwort als Hinweis auf eine CD4+-T-Zellaktivierung beobachtet. Ohne Adjuvans entwickelte nur einer von 24 Patienten eine anti-MAGE-A3-IgG-Antwort. Diese Ergebnisse bestätigen die wichtige Rolle der Adjuvantien für eine in-vivo-Stimulation der CD4+ T-Zellen [181, 182].

4.3.11 Keine Reaktion auf mögliche in den HLA-Klasse-II-Peptiden eingebettete HLA-Klasse-I-Epitope

In einigen intrazellulären Färbungen wurden die PBMCs nach Stimulation mit den HLA-Klasse-II-Peptiden nicht nur mit anti-CD4- sondern auch mit anti-CD8-Antikörpern gefärbt (RCC199, RCC314, RCC364). Auf diese Weise war es möglich, die IFN γ -Sekretion eindeutig den CD4+ T-Zellen zuzuordnen und eine

Reaktion auf möglicherweise in der Peptidsequenz enthaltene HLA-Klasse-I-Epitope auszuschließen. Für das in der Studie verwendete HLA-Klasse-II-Peptid G250 ist dieser Fall beschrieben: Innerhalb der über HLA-DR erkannten Sequenz 249-268 ist ein HLA-A2-restringiertes Epitop von 254-262 eingebettet [141]. Bei keinem der drei Patienten wurde jedoch eine Aktivierung der CD8+ T-Zellen nach Stimulation mit den HLA-Klasse-II-Peptiden von CCND1 und G250 gesehen. Die IFN γ -Sekretion ging ausschließlich von den CD4+ T-Zellen aus. Ein Grund hierfür könnte sein, dass eventuell vorhandene Vorläuferzellen während der Negativselektion im Thymus aussortiert wurden, da G250 auch im Normalgewebe exprimiert wird. Die Carboanhydrase 9 (G250) war in der Studie von Krüger et al. nicht nur in 7 von 11 RCC-Proben überexprimiert, sondern auch in Magen, Dünndarm und Blase [121]. Das HLA-Klasse-II-Peptid ist jedoch auf keinen Fall von einer Negativselektion betroffen, da bei allen acht mit diesem Peptid vakzinieren Patienten eine CD4+ T-Zellantwort nachgewiesen wurde.

Angenommen der Patient verfügte doch über spezifische T-Zellen für das HLA-A*02-Epitop, so ist eine mögliche Erklärung, dass die langen HLA-Klasse-II-Sequenzen nicht an den erforderlichen Stellen gespalten wurden und sie demzufolge nicht an den HLA-Klasse-I-Rezeptor binden konnten. Denkbar wäre aber auch eine sehr schwache T-Zellinduktion, ähnlich wie bei den anderen in der Vakzinierung verwendeten HLA-Klasse-I-Peptiden, die unter der Nachweisgrenze blieb. Interessant wäre es in diesem Zusammenhang, die PBMCs der Patienten mit einer positiven HLA-Klasse-II-Antwort auf G250 in der intrazellulären Färbung mit dem beschriebenen HLA-Klasse-I-Epitop direkt zu testen.

4.3.12 Peptide von G250 wurden schon mehrfach in Vakzinierungsstudien verwendet

Das Peptid G250 stammt von einem Quellprotein aus der Familie der Carboanhydrasen, die die Konversion von Kohlenstoffdioxid und Wasser zu Kohlensäure katalysieren. Es scheint als Quelle für Impfpeptide besonders geeignet, da es von den meisten Nierenzellkarzinomen exprimiert wird. Die Carboanhydrase 9 (CA9) wird laut Uemura et al. von 90% aller RCCs und 99% aller klarzelligen

RCCs exprimiert [127]. Seine Expression korrelierte in einer Studie von Bui et al. sowohl in frühen als auch in metastasierten Stadien mit einem längeren Überleben von RCC-Patienten [183]. Insgesamt ist der Zusammenhang von CA9-Expression und klinischem Verlauf noch unklar. In einer Studie zu Magenkrebs von Chen et al. war die CA9-Expression mit einem schlechteren postoperativen Überleben und einer vermehrten Invasivität der Tumoren verbunden [184]. Möglicherweise ist dieser Widerspruch auf gewebsspezifische Unterschiede zurückzuführen. Bei Blasen-, Cervix-, Brust- und Lungenkarzinomen war die CA9-Expression durch Hypoxie in-vitro induzierbar. Durch immunhistochemische Färbungen wurde CA9 vor allem im perinekrotischen Gewebe lokalisiert. Die klarzelligen RCC-Tumoren zeigten dagegen eine einheitliche Anfärbung unabhängig von hypoxischen und nekrotischen Arealen, was die Autoren auf den in diesen Tumoren konstitutiv hochregulierten „hypoxia inducible factor“ (HIF) zurück führen [185].

Das HLA-Klasse-II-Peptid von G250 könnte in Kombination mit dem bekannten HLA-A*02-Epitop eine sinnvolle Kombination in einer Vakzinierungsstudie darstellen. Genau diesen Ansatz verfolgten Bleumer et al., indem sie 6 RCC-Patienten mit einem HLA-A*02-Peptid (HLSTAVARV) und einem HLA-DR-restringiertem Peptid (IHVVHLSTAVARVDEALGR) beladene Dendritische Zellen verabreichten. Das Studienprotokoll sah 5 intradermale Vakzinierungen in den Wochen 1, 2, 3, 6, und 12 vor. Das Immunmonitoring zeigte trotz Präsensitivierung keine CA-9-spezifische T-Zellantwort nach Vakzinierung. In Anbetracht dieser Ergebnisse und der Tatsache, dass bei keinem der Patienten ein klinisches Ansprechen beobachtet wurde (im CT zeigten alle 6 Patienten vier Wochen nach der letzten Vakzinierung einen progredienten Verlauf), vermuten die Autoren, dass die Peptide in-vivo wenig immunogen wirken [128]. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass zumindest mit dem HLA-Klasse-II-Peptid von G250 sehr wohl IFN γ -Antworten induziert werden können. Der Grund für diesen Unterschied liegt möglicherweise in der Art des T-Zellmonitorings (sensitivere Methoden) oder im Aufbau der Studie (Adjuvantien statt DCs und 18 statt nur 5 Vakzinierungen). Die Anzahl der Vakzinierungen

allein dürfte als Erklärung jedoch nicht ausreichen, da die CD4+ T-Zellen in der Regel schon zum Zeitpunkt der 4. Vakzinierung auf G250 reagierten.

Von G250 stammten auch die Peptide in einer Studie von Uemura et al., in der 23 RCC-Patienten HLA-A*24-restringierte Peptide erhielten. Wie in der Uro-RCC-Studie wurden die Peptide in Montanide emulgiert und subkutan injiziert (allerdings in zweiwöchigen Abständen). Bei 16 von 23 Patienten wurde eine T-Zellinduktion festgestellt, wobei die durch ELISA gemessene IFN γ -Sekretion bei den meisten Patienten mit der Anzahl der Vakzinierungen kontinuierlich anstieg. Zudem konnten bei allen Patienten Antikörper detektiert werden, die aber zum Teil schon vor Vakzinierung vorhanden waren. In Hinsicht auf den klinischen Verlauf zeigten drei Patienten eine partielle Antwort, sechs einen stabilisierten Krankheitsverlauf mit einer mittleren Dauer von 12,2 Monaten und die verbleibenden 14 kein klinisches Ansprechen [127].

4.3.13 Bedeutung der CD4+ T-Zellen in der Immuntherapie

Lag der Schwerpunkt in der frühen Krebs-Immuntherapie noch hauptsächlich auf der Induktion tumorspezifischer zytotoxischer CD8+ T-Zellen, so wurde in den letzten Jahren die Bedeutung der CD4+ T-Zellen für eine effiziente und langandauernde Immunantwort erkannt [186]. Ihre Aufgabe scheint sich dabei nicht darauf zu beschränken, die CD8+ T-Zellen zu unterstützen. Einige Studien zeigten vielmehr CTL-unabhängige Antitumoreffekte, die über Zytokine, vor allem IFN γ , vermittelt wurden [187-189]. Die CD4+ T-Zellen können selbst zytotoxische Aktivität entwickeln [190, 191] und darüber hinaus einer Tumorprogression durch Inhibition der Tumorangio-genese [192] oder durch Induktion einer Antikörperantwort entgegenwirken [139, 193].

4.3.14 Stärke und Verlauf der T-Zellantworten, weitere Zytokine (IL-5 und IL-10)

Über den zeitlichen Verlauf der induzierten CD8+ T-Zellantworten kann nach den bisher durchgeführten Tests noch keine sichere Aussage getroffen werden, da die Antworten selbst nach 12 Tagen Präsensitivierung so schwach waren, dass sie gerade über dem Signifikanzniveau lagen und teilweise bei der nächs-

ten Vakzinierung schon wieder darunter gefallen waren. Die HLA-Klasse-I-Antworten waren in der Regel später als die Klasse-II-Antworten nachweisbar (ab der 4., 6., 10. und bei einem Patienten erst ab der 15. Vakzinierung).

Es gibt jedoch erste Hinweise, dass für eine erfolgreiche Immunisierung nicht nur die absolute Zahl der erzeugten Effektorzellen, sondern vielmehr deren Funktionsfähigkeit und damit verbunden ihr Zytokinprofil von Bedeutung ist. Darauf deuten Studien wie die von Darrah et al. hin, in welcher der Impfschutz gegen *Leishmania major* mit der Frequenz der CD4⁺ T-Zellen, die gleichzeitig IFN γ , IL-2 und TNF bildeten, im Mausmodell korrelierte [194]. Es bleibt abzuwarten, ob sich diese Ergebnisse in Zukunft bestätigen und ob sie auch auf CD8⁺ T-Zellen und Tumorkonzeptionen übertragbar sind. Für das Monitoring der UroRCC-Studie wurde in erster Linie die IFN γ -Produktion untersucht: Bei fünf Patienten wurde eine CCND1-Tetramer-bindende Population gefunden und vier davon zeigten auch eine signifikante IFN γ -Sekretion nach Stimulation mit CCND1 im Elispot. Auch die HLA-Klasse-II-Peptide konnten bei fast allen Patienten IFN γ -Antworten auslösen. Die Zellen waren demnach in der Lage, dieses für eine effiziente CTL-Antwort wichtige proinflammatorische Zytokin abzugeben.

Insgesamt traten die HLA-Klasse-II-Antworten sehr früh auf (nach der 2.-4. Vakz.) und blieben dann bei allen weiteren Zeitpunkten erhalten. Abgesehen von einem Patient war die Zunahme der IFN γ -Produktion nicht kontinuierlich, sondern eher von Schwankungen zwischen den einzelnen Zeitpunkten geprägt. Die CCND1- und G250-spezifischen CD4⁺ T-Zellen zeigten nach der 12-tägigen Präsensitivierung nicht nur eine verstärkte IFN γ -Sekretion, sondern auch eine Zunahme der IL-10- und der IL-5-positiven Zellen. Diese trat in der Regel ungefähr zeitgleich mit der IFN γ -Antwort auf und stieg mit ihr an. Bei zwei Patienten (RCC197, RCC258) war die IL-10-Antwort sogar stärker und die im Elispot beobachtete IFN γ -Produktion in der FACS-Färbung acht Tage später fast nicht mehr nachweisbar. Bei allen sechs getesteten Patienten trat eine erhöhte IL-10-Produktion auf. Da es kaum doppelt positive Zellen gab, muss man davon ausgehen, dass es sich um mindestens zwei verschiedene T-Zellpopulationen handelte, die auf Stimulation mit CCND1 reagierten. Auch die

IL-5-Produktion war bei 2 von 3 mit IL-5-Antikörpern gefärbten Proben erhöht. Erwartungsgemäß gab es keine IFN γ +IL-5+ Zellen, aber auch keine IL-5+IL-10+ Zellen. Es ist noch unklar, welche Bedeutung diese vermehrte IL-10- und IL-5-Produktion hat. Ob es sich um T_H2-Zellen, Tregs, eine andere Untergruppe der T-Zellen oder nur ein Kulturartefakt handelt, bleibt in zukünftigen Untersuchungen herauszufinden.

Es ist nicht auszuschließen, dass sich während der 21 Tage in Kultur das Verhältnis der verschiedenen T-Zellpopulationen verschiebt und sich in vivo keine so ausgeprägten IL-10- und IL-5-Antworten finden würden. Es hat sich jedoch aufgrund der niedrigen Frequenzen als schwierig erwiesen, Antworten spezifischer T-Zellen ex-vivo zu detektieren.

Man könnte in zukünftigen Experimenten die Zytokinzusammensetzung der Patienten mit positiver IFN γ -Antwort auf einzelne Impfpeptide genauer charakterisieren und so herausfinden, ob es sich um multifunktionale Effektorzellen handelt. Die Multiparameter-Durchflusszytometrie wird in diesem Zusammenhang immer mehr an Bedeutung gewinnen, da sie eine Zuordnung verschiedener Zytokine und Oberflächenmarker zu einzelnen Immunzellen erlaubt.

4.3.15 Adjuvantien

Im Vergleich der beiden Adjuvantien Montanide und GM-CSF zeigten sich bisher weder in den induzierten T-Zellantworten noch im klinischen Verlauf deutliche Unterschiede. In beiden Studienarmen wurden T-Zellantworten induziert, die bei den HLA-Klasse-II-Peptide wesentlich stärker und zahlreicher ausfielen als bei den HLA-Klasse-I-Peptiden. Zum Zeitpunkt der Versuche war die Vakzination von je 5 Patienten aus beiden Studienarmen abgeschlossen bzw. aufgrund einer Progredienz der Tumorerkrankung beendet. Damals schien GM-CSF zu besseren klinischen Ergebnissen zu führen (4/5 stabile Verläufe im Vergleich zu 0-1/5 mit Montanide). In der Zwischenzeit sind jedoch einige stabile Verläufe im Montanide-Arm hinzugekommen, während die Erkrankung bei einigen mit GM-CSF vakzinierten Patienten fortschritt. Die mit Montanide behandelten Patienten zeigten eine etwas stärkere IL-10-Antwort, die eventuell für den in der intrazellulären Färbung beobachteten Rückgang der IFN γ -Antwort,

welche eine Woche zuvor im Elispot nachgewiesen wurde, verantwortlich war. Insgesamt scheint GM-CSF in Hinsicht auf T-Zellinduktion und klinischen Verlauf etwas bessere Ergebnisse zu erzielen als Montanide, obwohl beide Adjuvantien nicht zu den erhofften zahlreichen HLA-Klasse-I-Antworten gegen tumorassoziierte Antigene führten.

4.3.16 T-Zellantworten und klinischer Verlauf

Ob es in der vorliegenden Studie eine Korrelation zwischen einer erfolgreichen T-Zellinduktion und dem klinischen Verlauf gibt, kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht beantwortet werden. Von den fünf Patienten, die im Studienzeitraum einen stabilen klinischen Verlauf zeigten, hatten drei eine Antwort auf HLA-Klasse-I- und HLA-Klasse-II-Peptide aus der Vakzine entwickelt. Bei den zwei anderen waren nur HLA-Klasse-II-Antworten nachweisbar. Interessant ist, dass es die Kombination aus keiner T-Zellantwort im Immunmonitoring und klinisch stabilem Verlauf nicht gab.

Trotz positiver T-Zellantworten entwickelten drei Patienten im Studienzeitraum ein Rezidiv. Bei zwei dieser Patienten waren spezifische T-Zellen gegen das HLA-Klasse-I- und das HLA-Klasse-II-Peptid von Cyclin D1 nachweisbar. Beide hatten auch G250-spezifische CD4+ T-Zellen entwickelt. Der dritte Patient verfügte immerhin über spezifische T-Zellen gegen die drei HLA-Klasse-II-Peptide CCND1, G250 und IBP3.

4.3.17 Tumor-Escape-Mechanismen

Im Folgenden werden einige mögliche Erklärungsansätze für ein Fortschreiten der Erkrankung trotz vorhandener Impfpeptid-spezifischer T-Zellen dargestellt: Ein Mechanismus mit dem sich Tumorzellen der Immunantwort entziehen besteht darin, dass sie das Zielantigen der Effektor-T-Zellen nicht mehr auf ihrer Oberfläche präsentieren. Dem kann ein Defekt im HLA-Molekül zugrunde liegen wie z.B. eine Mutation im β_2 -Mikroglobulin oder eine komplett fehlende Expression eines HLA-Haplotyps oder HLA-Allels [195, 196]. Ein Verlust von HLA-Molekülen scheint jedoch beim RCC eher selten aufzutreten. In einer Studie

hatten nur 3 von 45 analysierten Tumoren ihre HLA-Heterozygotie verloren [197].

Der Verlust des Zielantigens kann aber auch durch eine Mutation in dem für das Zielantigen kodierenden Gen selbst bedingt sein. Dieser Vorgang ist in Mausmodellen gut dokumentiert, wurde aber beim Menschen bisher weniger oft beobachtet. Wenn eine solche Mutation dennoch auftritt, wird sich diese Tumorzellvariante schnell im Sinne einer Immunselektion vermehren [110].

Zudem besteht die Möglichkeit, dass der Tumor das Antigen von Anfang an nicht exprimiert hat und die erzeugte T-Zellantwort somit ins Leere läuft. Bei der Genexpressionsanalyse zeigen sich in der Regel deutliche Unterschiede innerhalb einer Tumorentität. Optimal wäre deswegen eine Analyse jedes Tumors vor Studienbeginn und eine auf deren Ergebnissen basierende individuelle Zusammenstellung der Vakzine. Da dieser Ansatz sehr aufwändig ist, wurde er in der UroRCC-Studie nicht verfolgt, sondern stattdessen eine Zusammenstellung verschiedener Impfpptide verwendet, um möglichst viele Antigene abzudecken. Die Erwartung war, dass ein Tumor zwar nicht alle, aber doch einen Teil dieser Antigene auf seiner Oberfläche präsentiert. Für den Fall, dass ein Antigen im Tumor durch Mutation oder abgeschaltete Expression verloren ginge, stünden so weiterhin andere Antigene als Ziel der T-Zellantwort zur Verfügung. Die Vakzinierung mit mehreren Peptiden könnte sich jedoch auch nachteilig auswirken: Die verschiedenen Peptide könnten auch um die Bindungsstellen an Dendritischen Zellen konkurrieren und abhängig von ihrer Bindungsaffinität unterschiedlich gut gebunden werden [198].

Ein häufig genannter Grund für das Versagen von sowohl spontanen als auch Vakzinierungs-induzierten Antitumor-T-Zellantworten ist die Anergie dieser T-Zellen. Eine in diesem Zusammenhang wichtige Fragestellung ist, ob es sich um eine systemische Anergie handelt oder ob sich das Phänomen auf die unmittelbare Umgebung des Tumors beschränkt. Die bisher veröffentlichten Arbeiten deuten darauf hin, dass sowohl lokale als auch systemische Effekte eine Rolle spielen:

Durch Untersuchung Tumor-infiltrierender Lymphozyten (TILs) wurde vielfach gezeigt, dass diese in ihrer Funktionalität stark eingeschränkt sind [110, 199,

200]. Die TILs können direkt durch die Tumorzellen, durch das umgebende Stroma oder auch indirekt durch die Wirkung von regulatorischen T-Zellen (Tregs) in einen Zustand der Anergie versetzt werden. Aus TILs wurde ein gegen das Antigen LAGE1 gerichteter T-Zellklon isoliert, der einen Treg-Phänotyp aufwies und die Proliferation und Zytokinsekretion anderer CD4+ T-Zellen nach deren Stimulation mit anti-CD3-Antikörpern unterdrückte [201]. Cesana et al. untersuchten periphere Tregs von 12 RCC-Patienten, die sie über einen CD4+CD25^{high}-Phänotyp und ihre Suppressionsfunktion identifizierten. Mit 7,2% war deren Frequenz im peripheren Blut deutlich höher als in der gesunden Vergleichsgruppe, die nur 2,2% Tregs aufwies. Nach einer Immuntherapie-Behandlung mit IL-2 fiel die Zahl der Tregs bei Patienten mit einer objektiven klinischen Antwort ab, während sie bei denen mit progredienter Erkrankung anstieg [202].

Ein systemisch wirkender Mechanismus könnte die bei Nierenzellkarzinom-Patienten gefundene leichte Erhöhung des Arginase-Spiegels im Blut sein. Diese Arginase wird von einer Untergruppe der polymorphkernigen Granulozyten gebildet und unterdrückt T-Zellfunktionen [203].

Die Tatsache, dass viele Tumoren Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) exprimieren, hat zu der Annahme geführt, dass die T-Zellfunktion durch die IDO-vermittelte Tryptophandegradation beeinträchtigt wird [204].

Das in Tumoren freigesetzte IL-10 kann die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IFN γ und IL-2 unterdrücken [205]. Immunsuppressive Effekte werden auch den nicht-klassischen HLA-G-Molekülen [206] sowie den B7-H1-Molekülen [207], die beide auf Nierenzellkarzinomen exprimiert werden, zugeschrieben.

Eine weitere mögliche Veränderung der Immunantwort von Tumorpatienten ist ein vermehrter T_H2-Shift. Die Balance zwischen den T-Zellsubpopulationen wird durch das Mikromilieu des Tumors in Richtung T_H2-Antwort verschoben [168]. Es gibt Hinweise darauf, dass im peripheren Blut von Tumorpatienten T_H2-Antworten vorherrschen. In einer Studie an Patienten mit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen zeigten diese eine insgesamt geringere Anzahl an Lymphozy-

ten, eine defiziente T_H1 -Antwort und eine erhöhte IL-4-Produktion durch die PBMCs [208].

Bezogen auf das Nierenzellkarzinom (RCC) wurde gezeigt, dass frisch isolierte tumorinfiltrierende Lymphozyten eine erhöhte IL-4- und IL-10-mRNA-Expression aufweisen [209].

In einer Studie zu Pankreas-Tumoren zeigten die PBMCs der Patienten ein T_H2 -ähnliches Zytokin-Expressionsprofil. Die Autoren führen dies auf die von ihnen beobachtete Produktion von TGF β und IL-10 in Pankreas-Tumoren zurück [210].

Diese Ergebnisse konnten später auch für Nierenzellkarzinome bestätigt werden: Wenn man Lymphozyten dem Überstand einer RCC-Kultur aussetzte, nahm der Anteil an T_H1 -Zellen ab, so dass unter den verbleibenden Zellen die T_H2 -Antworten dominierten [211].

In diesem Zusammenhang wäre es interessant, das von den UroRCC-Studienpatienten vorhandene, eingefrorene Serum auf diese inhibitorischen Zytokine zu untersuchen. Dadurch könnte man herausfinden, ob z.B. IL-10 und TGF β bei diesen Patienten generell erhöht sind und ob sich durch die Vakzinierungen Änderungen ergeben.

Bei Betrachtung der vielfältigen Mechanismen, mit denen sich die Tumoren einer Immunantwort entziehen, wird deutlich, dass eine de novo-Induktion von T-Zellantworten allein nicht ausreicht, da auch diese der Immunsuppression durch den Tumor ausgesetzt werden. Die genannten immunsuppressiven Effekte gilt es zu überwinden, um eine effiziente und dauerhafte Elimination der Tumorzellen zu erreichen. Die Komplexität der bisher gefundenen immunsuppressiven Signalwege stellt hohe Anforderungen an zukünftige Immuntherapien, da es erforderlich sein könnte, an mehreren Stellen gleichzeitig anzusetzen, diese Kombinationstherapien auf die jeweilige Tumorentität und eventuell zusätzlich auf den individuellen Patienten abzustimmen.

Die Tatsache, dass häufig keine T-Zellinduktionen für die einzelnen Impfpeptide gefunden wurden, bedeutet nicht zwangsläufig, dass diese nicht doch in-vivo vorhanden waren. Mögliche Erklärungen wären, dass die Sensitivität der angewendeten Methoden nicht ausreichte oder dass die Zellen nicht in der Lage

waren, nach der ersten Stimulation in-vitro zu proliferieren. Es gibt Hinweise darauf, dass schon die Induktion einiger weniger Tumor-spezifischer T-Zellen, die den Tumor effizient attackieren, ausreicht, um gegen andere TAAs gerichtete T-Zellen zu rekrutieren. Dieses als „epitope spreading“ bezeichnete Phänomen wurde in einigen Vakzinierungsstudien beobachtet [177]. Ob damit die bereits erwähnten immunsuppressiven Mechanismen vollständig überwunden werden können, müssen zukünftige Studien zeigen.

4.3.18 Neue Ansätze in der Tumorstimmung: Kombination von Peptiden mit Chemotherapie, CpG, anti-CTLA-4-Antikörper oder TKI

Um die Immunogenität von Peptidvakzinierungen zu steigern, verwendeten Speiser et al. als Adjuvans nicht nur inkomplettes Freund's Adjuvans sondern zusätzlich CpG ODNs (Deoxycytidyl-deoxyguanosin oligodeoxynucleotides). Diese lösen über den Toll-like Rezeptor 9 eine Reifung Dendritischer Zellen aus. Die Kombination von Melan-A-Peptid, inkomplettem Freund's Adjuvans und CpG 7909 führte bei allen acht Patienten zu einer schnellen und starken T-Zellinduktion. Nach vier im Abstand von einem Monat verabreichten subkutanen Vakzinierungen lag die durchschnittliche Frequenz Melan-A-spezifischer CD8+ T-Zellen bei 1,15%, während sie in der Kontrollgruppe, die nur Melan-A und inkomplettes Freund's Adjuvans erhielt, mit 0,13% signifikant niedriger war. In der Kontrollgruppe entwickelten nur vier von acht Patienten eine messbare T-Zellantwort. Die Frequenz Melan-A-spezifischer CD8+ T-Zellen stieg nach Vakzinierung in Kombination mit CpG um das 43-fache an, wie anhand von Tetramer-Färbungen ex-vivo festgestellt wurde. In dieser Phase I-Studie bezog sich die Fragestellung nicht auf den klinischen Verlauf, der deswegen nur erfasst aber nicht bewertet wurde. Von den acht mit CpG vakzinieren Patienten hatten zwei einen stabilen Verlauf, drei entwickelten ein lokales Rezidiv und bei den verbleibenden drei Patienten schritt die Tumorerkrankung fort [212].

Eine weitere neue Variante der Antitumorstimmung kombiniert Peptide mit Antikörpern gegen Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4. Diese anti-CTLA-4-Antikörper wurden zusätzlich zu den in Montanide ISA 51 emulgierten Peptiden von gp100, MART-1 und Tyrosinase verabreicht. In der Studie wurden dosisab-

hängige Autoimmunreaktionen festgestellt, die sich vor allem an der Haut und im Gastrointestinaltrakt manifestierten [213].

Auf der Suche nach neuen Strategien in der Immuntherapie wurden verschiedene Kombinationsbehandlungen eingesetzt. Dabei ist besonders der Ansatz von Rosenberg et al. hervorzuheben, der Melanompatienten zunächst mit einer konditionierenden Chemotherapie behandelte, gefolgt von einem adoptiven T-Zelltransfer und IL-2-Gaben. Bei 18 von 35 Patienten wurde ein klinisches Ansprechen beobachtet, was eines der bisher besten durch Immuntherapie erzielten Studienergebnisse darstellt [214].

In den letzten Jahren wurde zunehmend die Bedeutung regulatorischer T-Zellen für die Immunsuppression, durch die Tumorstadium und -ausbreitung erst möglich werden, erkannt. Nachdem in Tiermodellen die Depletion von Tregs durch anti-CD25-Antikörper zu verstärkten Antitumor-Immunantworten geführt hatte, wurde dieser Ansatz im Jahr 2005 von Dannull et al. zum ersten Mal am Menschen erprobt. Dabei erhielten 10 Patienten mit metastasiertem RCC das „recombinant IL-2 diphtheria toxin conjugate DAB₃₈₉IL-2“. Durch Bindung an den hochaffinen IL-2-Rezeptor wird das Toxin in die Zellen aufgenommen, inhibiert dort die Proteinsynthese und führt zum Zelltod. Auf diese Weise werden bevorzugt Tregs, die einen CD4+CD25^{high} Phänotyp aufweisen, dosisabhängig eliminiert (CD25 ist allerdings nicht spezifisch für Tregs, da es auch in aktivierten CD4+ T-Zellen hochreguliert wird). Die Depletion der Tregs gefolgt von einer Vakzinierung mit tumor-RNA-transfizierten DCs führte bei den Patienten zu einer besseren Stimulation tumorspezifischer T-Zellen im Vergleich zur Vakzinierung allein. Durchflusszytometrische Analysen belegen, dass die DAB₃₈₉IL-2-Infusion zu einer signifikanten Reduktion der CD4+CD25^{high} Tregs führte, während die CD25^{neg} und die CD25^{intermediate} CD4+ T-Zellen geschont wurden. Während der gesamten Behandlungsphase blieb die Funktionsfähigkeit der CD4+CD25^{intermediate} T-Zellen erhalten, wie IFN γ -Elispots und Proliferationsassays nach Stimulation mit CMV, Influenzamatric-Protein, Tetanustoxoid und renalen Tumorantigenen zeigten. Bemerkenswert ist auch, dass die Elimination von Tregs transient war, da deren Anzahl im peripheren Blut nach zwei Monaten zu 75% wieder hergestellt war. Zu beachten ist, dass eine Verstärkung der

T-Zellantwort nur erreicht wurde, wenn DAB₃₈₉IL-2 vor der Vakzinierung verabreicht wurde. Bei gleichzeitiger Gabe wird möglicherweise die DC-vermittelte T-Zellaktivierung beeinträchtigt [215].

Im Jahr 2005 wurden die Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) Sorafenib und Sunitinib von der FDA zur Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms zugelassen. Vorausgegangen waren Studien, die gezeigt hatten, dass die TKI das progressionsfreie Überleben der Patienten signifikant verlängern. Beide blockieren den VEGF-Rezeptor-2, den PDGF-Rezeptor β , c-Kit und den Flt3-Rezeptor. Sorafenib hat eine zusätzliche Wirkung auf die Raf/MEK/ERK-Signalkaskade [216]. Im Vergleich der beiden Substanzen zeigte sich in-vitro ein Unterschied in der Wirkung auf Dendritische Zellen: Während Sorafenib die Funktion Dendritischer Zellen beeinträchtigte, hatte Sunitinib keinen Einfluss auf die DC-Reifung und -Migration. Auch im Mausmodell wurde nach Vakzinierung mit OVA₂₅₇₋₂₆₄ eine geringere Induktion OVA-spezifischer CTLs beobachtet, wohingegen Sunitinib zu gleich starken CTL-Antworten führte wie die nicht vorbehandelte Kontrollgruppe. Interessanterweise sank der Anteil an Tregs bei den Mäusen, die Sunitinib erhalten hatten [217].

Die Behandlung von RCC-Patienten mit Sunitinib führte zu einer verbesserten IFN γ -Antwort der T-Zellen in-vitro bei gleichzeitiger Reduktion der IL-4-produzierenden Zellen. Erste Hinweise deuten außerdem darauf hin, dass die Behandlung mit Sunitinib auch beim Menschen zu einer Reduktion der Tregs führt [218]. Wenn sich diese immunmodulatorischen Effekte bestätigen, wäre die Kombination von Peptidvakzinierungen mit Sunitinib ein sinnvoller Ansatz für zukünftige Immuntherapiestudien. Wenn es durch Sunitinib gelänge, der bei den meisten RCC-Patienten durch Tregs, T_H2-Shift und andere Mechanismen bewirkten Immunsuppression entgegen zu wirken, könnten die Tumorvakzinierungen ihre volle Wirkung entfalten.

4.3.19 Schlussfolgerung

Durch die Vakzinierungen wurden bei den zehn bisher untersuchten Patienten T-Zellantworten induziert, die zum Zeitpunkt vor Vakzinierung nicht nachweisbar gewesen waren. Angesichts der hohen Zahl von HLA-Klasse-I-Peptiden (10

für HLA-A*02) und Vakzinierungen (18 wenn kein Rezidiv im Studienverlauf auftrat) wären jedoch mehr T-Zellantworten zu erwarten gewesen.

Die Vakzinierung scheint besonders CD4+ T-Zellantworten zu begünstigen, die stärker und häufiger auftraten als die der CD8+ T-Zellen.

Die beobachtete IL-10- und IL-5-Sekretion der CD4+ T-Zellen sollte weiter untersucht werden, um auszuschließen, dass durch die Vakzinierung ungewollt Tregs, T_H2-Zellen oder andere für die Antitumor-Immunantwort nachteilige Zellpopulationen vermehrt werden.

Wie schon in früheren Immuntherapie-Studien zeichnet sich auch hier ein gewisses immunologisches Ansprechen der Patienten ab, welches aber ein Fortschreiten der Tumorerkrankung nicht vollständig verhindern kann.

Es gilt, in zukünftigen Studien die Tumor-Escape-Mechanismen zu überwinden und starke, langdauernde Immunantworten gegen den Tumor zu erzeugen. Von den in dieser Arbeit untersuchten Peptiden wäre insbesondere CCND1 ein geeigneter Kandidat für weitere Vakzinierungen, da es unter den HLA-Klasse-I-Peptiden die meisten CD8+ T-Zell-Antworten auslöste. In Frage kämen auch GUCY, RGS2 und MET1 sowie die drei HLA-Klasse-II-Peptide CCND1, IBP3 und G250. Die beiden Adjuvantien GM-CSF und Montanide scheinen zumindest bei alleiniger Gabe nicht ausreichend zu sein, sodass die Kombination mit weiteren Substanzen (Chemotherapeutika, DAB₃₈₉IL-2, TKI etc.) zu erwägen ist.

5 Zusammenfassung

Die im Rahmen dieser Studie verabreichten Peptidvakzinierungen induzierten einzelne HLA-Klasse-I-Antworten, von denen sich die meisten gegen das Impfpeptid CCND1 richteten. Die Antworten traten zwischen der 6. und 10. Vakzinierung auf und waren insgesamt sehr schwach ausgeprägt.

Wesentlich stärkere Antworten wurden mit den HLA-Klasse-II-Peptiden erzielt. Die beiden Peptide CCND1 und G250 wurden bei fast allen Patienten im Elispot und in der intrazellulären Färbung ab der 2.-4. Vakzinierung positiv getestet. Für das Peptid MMP7 wurde bei keinem Patienten eine T-Zellinduktion gesehen.

Die CCND1-spezifischen CD4⁺ T-Zellen konnten bei einem Patienten mit einer sehr starken IFN γ -Sekretion nach Präsensitivierung auch im ex-vivo-Elispot nachgewiesen werden.

Die CD4⁺ T-Zellen produzierten nach Stimulation mit CCND1 und G250 nicht nur vermehrt IFN γ , sondern auch IL-5 und IL-10. Um welche Zellpopulationen es sich dabei handelte und welche Bedeutung sie für den klinischen Verlauf haben, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch unklar.

Ob die Patienten auch klinisch von den Vakzinierungen profitieren, kann erst nach Auswertung aller 40 im Studienprotokoll vorgesehenen Patienten abschließend bewertet werden.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur der HLA-Moleküle	6
Abbildung 2: Aufbau des α : β -T-Zellrezeptors	8
Abbildung 3: Übersicht über die verschiedenen Untergruppen der CD4-T-Zellen.....	10
Abbildung 4: 5-Jahresüberleben von Patienten mit Nierenkrebs.....	15
Abbildung 5: Studienaufbau der Uro-RCC-Studie	27
Abbildung 6: Ablauf der Uro-RCC Studie.	27
Abbildung 7: Prinzip der PBMC-Isolierung mit LSM	33
Abbildung 8: Schema zum zeitlichen Ablauf einer Präsensitivierung	37
Abbildung 9: Prinzip des Elispot	38
Abbildung 10: Schema zu Aufbau und Funktionsweise der Tetramere	45
Abbildung 11: Vergleich verschiedener Protokolle der Präsensitivierung.....	52
Abbildung 12: Balkendiagramm zum oben gezeigten Elispot.....	52
Abbildung 13: HLA-Klasse-I-Elispot von RCC150	55
Abbildung 14: Tetramer-Färbung HLA-Klasse I von RCC150	56
Abbildung 15: HLA-Klasse-II-Elispot von RCC150	57
Abbildung 16: Intrazelluläre Färbung HLA-Klasse II von RCC150	58
Abbildung 17: HLA-Klasse-I-Elispot von RCC197	60
Abbildung 18: Tetramer-Färbung HLA-Klasse I von RCC197	61
Abbildung 19: HLA-Klasse-II-Elispot von RCC197	62
Abbildung 20: IFN γ -, IL-5- und IL-10-Elispot von RCC197	63
Abbildung 21: HLA-Klasse-I-Elispot von RCC 199	64
Abbildung 22: HLA-Klasse-I-Elispot von RCC199; Test der Einzelpeptide	65
Abbildung 23: HLA-Klasse-II-Elispot von RCC199	66
Abbildung 24: Intrazelluläre Färbung HLA-Klasse II von RCC199	67
Abbildung 25: Intrazelluläre Färbung HLA-Klasse II von RCC199; CD4 vs. CD8.....	68
Abbildung 26: HLA-Klasse-I-Elispot von RCC218	69
Abbildung 27: Tetramer-Färbung HLA-Klasse I von RCC218	69
Abbildung 28: HLA-Klasse-II- Elispot von RCC218	70
Abbildung 29: HLA-Klasse-I-Elispot von RCC258.....	71
Abbildung 30: Tetramer-Färbung HLA-Klasse I von RCC258	72
Abbildung 31: Zusätzliche Tetramer-Färbung an Tag 21 von RCC258.....	73

Abbildung 32: HLA-Klasse-II-Elispot von RCC258	74
Abbildung 33: Intrazelluläre Färbung HLA-Klasse II von RCC258	75
Abbildung 34: HLA-Klasse-II-Elispot von RCC285	77
Abbildung 35: Ex-vivo-Elispot HLA-Klasse-II von RCC285	77
Abbildung 36: Ex-vivo-Elispot HLA-Klasse-II von RCC285	78
Abbildung 37: HLA-Klasse-I-Elispot von RCC314	79
Abbildung 38: Intrazelluläre Färbung HLA-Klasse II von RCC314	80
Abbildung 39: HLA-Klasse-I-Elispot von RCC340	82
Abbildung 40: HLA-Klasse-I-Elispot von RCC364	83
Abbildung 41: HLA-Klasse-II-Elispot von RCC364	84
Abbildung 42: RCC 364 HLA-Klasse-II-Elispot, Diagramm	84
Abbildung 43: Intrazelluläre Färbung HLA-Klasse II von RCC364	85
Abbildung 44: HLA-Klasse-II-Elispot von RCC369	87
Abbildung 45: RCC 369 HLA-Klasse-II-Elispot, Diagramm	87
Abbildung 46: FACS-Färbung von MZ1257	88
Abbildung 47: MZ1257; intrazelluläre Färbung der IFN γ -Produktion	89
Abbildung 48: Vergleich klinischer Verlauf zwischen den beiden Studienarmen mit Montanide und GM-CSF als Adjuvans	95
Abbildung 49: Anzahl der Patienten mit positiven HLA-Klasse-I- und/oder HLA- Klasse-II-Antworten in Bezug auf ihren klinischen Verlauf als Kreisdiagramm.....	96
Abbildung 50: Zusammenfassung der Ergebnisse getrennt nach den beiden Adjuvantien Montanide und GM-CSF	97
Abbildung 51: Ergebnisse der intrazellulären Färbungen mit IFN γ und IL-10.....	98

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die Impfpeptide	29
Tabelle 2: Expressionsprofil der in der Impfung verwendeten Peptide	30
Tabelle 3: Zusammensetzung der für die Zellkultur verwendeten Medien	35
Tabelle 4: Als Positivkontrolle verwendete Peptide	35
Tabelle 5: Als Negativkontrolle verwendete Peptide	36
Tabelle 6: Unterschiede zwischen den drei verwendeten Protokollen.....	42
Tabelle 7: Versuche zur TCR-Downregulation	53
Tabelle 8: Zusammenfassung statistisch signifikanter T-Zellantworten im Elispot für HLA-A*02	90
Tabelle 9: Zusammenfassung der Elispot- und FACS-Ergebnisse für die HLA- A*02-Impfpeptide.....	91
Tabelle 10: Zusammenfassung statistisch signifikanter T-Zellantworten im HLA- Klasse-II-Elispot	93
Tabelle 11: Zusammenfassung der Ergebnisse von Elispot und Durchflusszytometrie in Bezug auf die Klinik; getrennt nach Studienarm.....	94

8 Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat-Toluidin
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	Cluster of Differentiation
CMV	Zytomegalievirus
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Elispot	Enzyme-linked immunosorbent spot assay
et al.	et alii
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FDA	Food and Drug Administration (USA)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward Scatter
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Human Leukocyte Antigen
HS	Humanserum
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
LSM	Lymphocyte Separation Medium
MHC	Major Histocompatibility Complex
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PE	Phycoerythrin
PenStrep	Penicillin-Streptomycin
PHA	Phytohemagglutinin
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
RCC	Renal Cell Carcinoma
RPMI	Roosevelt Park Memorial Institute
RT-PCR	Realtime-Polymerase Chain Reaction
SEB	Staphylococcus aureus Enterotoxin B
SSC	Side Scatter
TAA	Tumor-assoziertes Antigen

TAP	Transporters associated with antigen processing
TCR	T cell receptor
TKI	Tyrosine kinase inhibitor
TNM	Tumor, node, metastasis (Classification of Malignant Tumours)
TRP	Tyrosinase-related protein
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

9 Literaturverzeichnis

1. Janeway, C.A., Jr. and Medzhitov, R., Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 2002. 20: p. 197-216.
2. Kadowaki, N., Antonenko, S., Lau, J.Y. and Liu, Y.J., Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med*, 2000. 192(2): p. 219-26.
3. Anderson, K.V., and Nuesslein-Volhard, C., Dorsal-group genes of *Drosophila*. In *Gametogenesis and the Early Embryo*, J. Gall, ed. (New York: Alan R. Liss), 1986: p. pp. 177-194.
4. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. and Janeway, C.A., Jr., A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 1997. 388(6640): p. 394-7.
5. Tomlinson, S., Complement defense mechanisms. *Curr Opin Immunol*, 1993. 5(1): p. 83-9.
6. Frank, M.M. and Fries, L.F., The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol Today*, 1991. 12(9): p. 322-6.
7. Kupiec-Weglinski, J.W., Austyn, J.M. and Morris, P.J., Migration patterns of dendritic cells in the mouse. Traffic from the blood, and T cell-dependent and -independent entry to lymphoid tissues. *J Exp Med*, 1988. 167(2): p. 632-45.
8. Germain, R.N., MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell*, 1994. 76(2): p. 287-99.
9. Ricciardi, W., The old Edward Jenner and the new public health: the future of vaccines in Europe. *Eur J Public Health*, 2008. 18(4): p. 353.
10. Bendelac, A., Savage, P.B. and Teyton, L., The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol*, 2007. 25: p. 297-336.
11. Shortman, K., Egerton, M., Spangrude, G.J. and Scollay, R., The generation and fate of thymocytes. *Semin Immunol*, 1990. 2(1): p. 3-12.
12. Surh, C.D. and Sprent, J., T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature*, 1994. 372(6501): p. 100-3.
13. Janeway, C.A., Jr., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M., *Immunobiology*. Garland Science Publishing, 2005.
14. Borowski, C., Martin, C., Gounari, F., Haughn, L., Aifantis, I., Grassi, F. and von Boehmer, H., On the brink of becoming a T cell. *Curr Opin Immunol*, 2002. 14(2): p. 200-6.
15. Zheng, B., Xue, W. and Kelsoe, G., Locus-specific somatic hypermutation in germinal centre T cells. *Nature*, 1994. 372(6506): p. 556-9.
16. Schwartz, R.H., Acquisition of immunologic self-tolerance. *Cell*, 1989. 57(7): p. 1073-81.
17. Zinkernagel, R.M. and Doherty, P.C., Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature*, 1974. 248(450): p. 701-2.
18. Wedgwood, J.F., Hatam, L. and Bonagura, V.R., Effect of interferon-gamma and tumor necrosis factor on the expression of class I and class

- II major histocompatibility molecules by cultured human umbilical vein endothelial cells. *Cell Immunol*, 1988. 111(1): p. 1-9.
19. Steimle, V., Siegrist, C.A., Mottet, A., Lisowska-Groszpiere, B. and Mach, B., Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science*, 1994. 265(5168): p. 106-9.
 20. Falk, K., Rotzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G. and Rammensee, H.G., Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*, 1991. 351(6324): p. 290-6.
 21. Rammensee, H.G., Falk, K. and Rotzschke, O., MHC molecules as peptide receptors. *Curr Opin Immunol*, 1993. 5(1): p. 35-44.
 22. Bouvier, M. and Wiley, D.C., Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of MHC class I molecules. *Science*, 1994. 265(5170): p. 398-402.
 23. Madden, D.R., Gorga, J.C., Strominger, J.L. and Wiley, D.C., The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC. *Cell*, 1992. 70(6): p. 1035-48.
 24. Matsumura, M., Fremont, D.H., Peterson, P.A. and Wilson, I.A., Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. *Science*, 1992. 257(5072): p. 927-34.
 25. Rammensee, H.G., Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Curr Opin Immunol*, 1995. 7(1): p. 85-96.
 26. Stevanovic, S. and Jung, G., Multiple sequence analysis: pool sequencing of synthetic and natural peptide libraries. *Anal Biochem*, 1993. 212(1): p. 212-20.
 27. Rammensee, H., Bachmann, J., Emmerich, N.P., Bachor, O.A. and Stevanovic, S., SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics*, 1999. 50(3-4): p. 213-9.
 28. Brown, J.H., Jardetzky, T.S., Gorga, J.C., Stern, L.J., Urban, R.G., Strominger, J.L. and Wiley, D.C., Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature*, 1993. 364(6432): p. 33-9.
 29. Srinivasan, M., Domanico, S.Z., Kaumaya, P.T. and Pierce, S.K., Peptides of 23 residues or greater are required to stimulate a high affinity class II-restricted T cell response. *Eur J Immunol*, 1993. 23(5): p. 1011-6.
 30. Chicz, R.M., Urban, R.G., Lane, W.S., Gorga, J.C., Stern, L.J., Vignali, D.A. and Strominger, J.L., Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. *Nature*, 1992. 358(6389): p. 764-8.
 31. Chicz, R.M., Urban, R.G., Gorga, J.C., Vignali, D.A., Lane, W.S. and Strominger, J.L., Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J Exp Med*, 1993. 178(1): p. 27-47.
 32. Sinigaglia, F., Guttinger, M., Kilgus, J., Doran, D.M., Matile, H., Etlinger, H., Trzeciak, A., Gillissen, D. and Pink, J.R., A malaria T-cell epitope recognized in association with most mouse and human MHC class II molecules. *Nature*, 1988. 336(6201): p. 778-80.

33. Hammer, J., Valsasini, P., Tolba, K., Bolin, D., Higelin, J., Takacs, B. and Sinigaglia, F., Promiscuous and allele-specific anchors in HLA-DR-binding peptides. *Cell*, 1993. 74(1): p. 197-203.
34. Jaraquemada, D., Marti, M. and Long, E.O., An endogenous processing pathway in vaccinia virus-infected cells for presentation of cytoplasmic antigens to class II-restricted T cells. *J Exp Med*, 1990. 172(3): p. 947-54.
35. Malnati, M.S., Marti, M., LaVaute, T., Jaraquemada, D., Biddison, W., DeMars, R. and Long, E.O., Processing pathways for presentation of cytosolic antigen to MHC class II-restricted T cells. *Nature*, 1992. 357(6380): p. 702-4.
36. Gay, D., Maddon, P., Sekaly, R., Talle, M.A., Godfrey, M., Long, E., Goldstein, G., Chess, L., Axel, R., Kappler, J. and et al., Functional interaction between human T-cell protein CD4 and the major histocompatibility complex HLA-DR antigen. *Nature*, 1987. 328(6131): p. 626-9.
37. Moldovan, M.C., Yachou, A., Levesque, K., Wu, H., Hendrickson, W.A., Cohen, E.A. and Sekaly, R.P., CD4 dimers constitute the functional component required for T cell activation. *J Immunol*, 2002. 169(11): p. 6261-8.
38. Wang, J.H. and Reinherz, E.L., Structural basis of T cell recognition of peptides bound to MHC molecules. *Mol Immunol*, 2002. 38(14): p. 1039-49.
39. Kim, P.W., Sun, Z.Y., Blacklow, S.C., Wagner, G. and Eck, M.J., A zinc clasp structure tethers Lck to T cell coreceptors CD4 and CD8. *Science*, 2003. 301(5640): p. 1725-8.
40. Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A. and Coffman, R.L., Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, 1986. 136(7): p. 2348-57.
41. Zhu, J. and Paul, W.E., CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*, 2008. 112(5): p. 1557-69.
42. Le Gros, G., Ben-Sasson, S.Z., Seder, R., Finkelman, F.D. and Paul, W.E., Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J Exp Med*, 1990. 172(3): p. 921-9.
43. Swain, S.L., Weinberg, A.D., English, M. and Huston, G., IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol*, 1990. 145(11): p. 3796-806.
44. Murphy, K.M. and Reiner, S.L., The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol*, 2002. 2(12): p. 933-44.
45. Mosmann, T.R. and Coffman, R.L., TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*, 1989. 7: p. 145-73.
46. Sakaguchi, S., Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell*, 2000. 101(5): p. 455-8.
47. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. and Toda, M., Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing

- IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*, 1995. 155(3): p. 1151-64.
48. Patel, D.D., Escape from tolerance in the human X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome and the Scurfy mouse. *J Clin Invest*, 2001. 107(2): p. 155-7.
 49. Fontenot, J.D., Gavin, M.A. and Rudensky, A.Y., Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*, 2003. 4(4): p. 330-6.
 50. Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G. and Wahl, S.M., Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*, 2003. 198(12): p. 1875-86.
 51. Sakaguchi, S., Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 2004. 22: p. 531-62.
 52. Liu, W., Putnam, A.L., Xu-Yu, Z., Szot, G.L., Lee, M.R., Zhu, S., Gottlieb, P.A., Kapranov, P., Gingeras, T.R., Fazekas de St Groth, B., Clayberger, C., Soper, D.M., Ziegler, S.F. and Bluestone, J.A., CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med*, 2006. 203(7): p. 1701-11.
 53. Jankovic, D., Kullberg, M.C., Feng, C.G., Goldszmid, R.S., Collazo, C.M., Wilson, M., Wynn, T.A., Kamanaka, M., Flavell, R.A. and Sher, A., Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *J Exp Med*, 2007. 204(2): p. 273-83.
 54. McGeachy, M.J., Bak-Jensen, K.S., Chen, Y., Tato, C.M., Blumenschein, W., McClanahan, T. and Cua, D.J., TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol*, 2007. 8(12): p. 1390-7.
 55. Moser, M., Dendritic cells in immunity and tolerance-do they display opposite functions? *Immunity*, 2003. 19(1): p. 5-8.
 56. Curtsinger, J.M., Valenzuela, J.O., Agarwal, P., Lins, D. and Mescher, M.F., Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation. *J Immunol*, 2005. 174(8): p. 4465-9.
 57. Mescher, M.F., Curtsinger, J.M., Agarwal, P., Casey, K.A., Gerner, M., Hammerbeck, C.D., Popescu, F. and Xiao, Z., Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. *Immunol Rev*, 2006. 211: p. 81-92.
 58. Schoenberger, S.P., Toes, R.E., van der Voort, E.I., Offringa, R. and Melief, C.J., T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature*, 1998. 393(6684): p. 480-3.
 59. Casey, K.A. and Mescher, M.F., IL-21 promotes differentiation of naive CD8 T cells to a unique effector phenotype. *J Immunol*, 2007. 178(12): p. 7640-8.
 60. Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M. and Lanzavecchia, A., Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 1999. 401(6754): p. 708-12.

61. Valmori, D., Scheibenbogen, C., Dutoit, V., Nagorsen, D., Asemissen, A.M., Rubio-Godoy, V., Rimoldi, D., Guillaume, P., Romero, P., Schadendorf, D., Lipp, M., Dietrich, P.Y., Thiel, E., Cerottini, J.C., Lienard, D. and Keilholz, U., Circulating Tumor-reactive CD8(+) T cells in melanoma patients contain a CD45RA(+)CCR7(-) effector subset exerting ex vivo tumor-specific cytolytic activity. *Cancer Res*, 2002. 62(6): p. 1743-50.
62. Coulie, P.G., Somville, M., Lehmann, F., Hainaut, P., Brasseur, F., Devos, R. and Boon, T., Precursor frequency analysis of human cytolytic T lymphocytes directed against autologous melanoma cells. *Int J Cancer*, 1992. 50(2): p. 289-97.
63. Mazzocchi, A., Belli, F., Mascheroni, L., Vegetti, C., Parmiani, G. and Anichini, A., Frequency of cytotoxic T lymphocyte precursors (CTLp) interacting with autologous tumor via the T-cell receptor: limiting dilution analysis of specific CTLp in peripheral blood and tumor-invaded lymph nodes of melanoma patients. *Int J Cancer*, 1994. 58(3): p. 330-9.
64. Letsch, A., Keilholz, U., Schadendorf, D., Nagorsen, D., Schmittel, A., Thiel, E. and Scheibenbogen, C., High frequencies of circulating melanoma-reactive CD8+ T cells in patients with advanced melanoma. *Int J Cancer*, 2000. 87(5): p. 659-64.
65. Germeau, C., Ma, W., Schiavetti, F., Lurquin, C., Henry, E., Vigneron, N., Brasseur, F., Lethe, B., De Plaen, E., Velu, T., Boon, T. and Coulie, P.G., High frequency of antitumor T cells in the blood of melanoma patients before and after vaccination with tumor antigens. *J Exp Med*, 2005. 201(2): p. 241-8.
66. Ljungberg, B., Hanbury, D.C., Kuczyk, M.A., Merseburger, A.S., Mulders, P.F., Patard, J.J. and Sinescu, I.C., Renal cell carcinoma guideline. *Eur Urol*, 2007. 51(6): p. 1502-10.
67. Parkin, D.M., Whelan, S.L., Ferlay, J., Teppo, L., Thomas, D.B., Cancer Incidence in Five Continents 2003, International Agency for Research on Cancer.
68. Pantuck, A.J., Zisman, A. and Belldegrun, A.S., The changing natural history of renal cell carcinoma. *J Urol*, 2001. 166(5): p. 1611-23.
69. Chow, W.H., Devesa, S.S., Warren, J.L. and Fraumeni, J.F., Jr., Rising incidence of renal cell cancer in the United States. *JAMA*, 1999. 281(17): p. 1628-31.
70. Hock, L.M., Lynch, J. and Balaji, K.C., Increasing incidence of all stages of kidney cancer in the last 2 decades in the United States: an analysis of surveillance, epidemiology and end results program data. *J Urol*, 2002. 167(1): p. 57-60.
71. Boyle, P., Levin, B., World Cancer Report 2008, International Agency for Research on Cancer.
72. Roazzi, P., Capocaccia, R., Santaquilani, M. and Carrani, E., Electronic availability of EURO CARE-3 data: a tool for further analysis. *Ann Oncol*, 2003. 14 Suppl 5: p. v150-5.
73. Hunt, J.D., van der Hel, O.L., McMillan, G.P., Boffetta, P. and Brennan, P., Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies. *Int J Cancer*, 2005. 114(1): p. 101-8.

74. Bergstrom, A., Pisani, P., Tenet, V., Wolk, A. and Adami, H.O., Overweight as an avoidable cause of cancer in Europe. *Int J Cancer*, 2001. 91(3): p. 421-30.
75. Chow, W.H., Gridley, G., Fraumeni, J.F., Jr. and Jarvholm, B., Obesity, hypertension, and the risk of kidney cancer in men. *N Engl J Med*, 2000. 343(18): p. 1305-11.
76. Lindblad, P., Chow, W.H., Chan, J., Bergstrom, A., Wolk, A., Gridley, G., McLaughlin, J.K., Nyren, O. and Adami, H.O., The role of diabetes mellitus in the aetiology of renal cell cancer. *Diabetologia*, 1999. 42(1): p. 107-12.
77. Richard, S., Graff, J., Lindau, J. and Resche, F., Von Hippel-Lindau disease. *Lancet*, 2004. 363(9416): p. 1231-4.
78. Furniss, D., Harnden, P., Ali, N., Royston, P., Eisen, T., Oliver, R.T. and Hancock, B.W., Prognostic factors for renal cell carcinoma. *Cancer Treat Rev*, 2008. 34(5): p. 407-26.
79. Kovacs, G., Akhtar, M., Beckwith, B.J., Bugert, P., Cooper, C.S., Delahunt, B., Eble, J.N., Fleming, S., Ljungberg, B., Medeiros, L.J., Moch, H., Reuter, V.E., Ritz, E., Roos, G., Schmidt, D., Srigley, J.R., Storkel, S., van den Berg, E. and Zbar, B., The Heidelberg classification of renal cell tumours. *J Pathol*, 1997. 183(2): p. 131-3.
80. Amato, R.J., Chemotherapy for renal cell carcinoma. *Semin Oncol*, 2000. 27(2): p. 177-86.
81. Hartmann, J.T. and Bokemeyer, C., Chemotherapy for renal cell carcinoma. *Anticancer Res*, 1999. 19(2C): p. 1541-3.
82. Stadler, W.M., Halabi, S., Rini, B., Ernstoff, M.S., Davila, E., Picus, J., Barrier, R. and Small, E.J., A phase II study of gemcitabine and capecitabine in metastatic renal cancer: a report of Cancer and Leukemia Group B protocol 90008. *Cancer*, 2006. 107(6): p. 1273-9.
83. Rini, B.I. and Small, E.J., Biology and clinical development of vascular endothelial growth factor-targeted therapy in renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*, 2005. 23(5): p. 1028-43.
84. Yang, J.C., Haworth, L., Sherry, R.M., Hwu, P., Schwartzentruber, D.J., Topalian, S.L., Steinberg, S.M., Chen, H.X. and Rosenberg, S.A., A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med*, 2003. 349(5): p. 427-34.
85. Escudier, B., Eisen, T., Stadler, W.M., Szczylik, C., Oudard, S., Siebels, M., Negrier, S., Chevreau, C., Solska, E., Desai, A.A., Rolland, F., Demkow, T., Hutson, T.E., Gore, M., Freeman, S., Schwartz, B., Shan, M., Simantov, R. and Bukowski, R.M., Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*, 2007. 356(2): p. 125-34.
86. Penn, I., Primary kidney tumors before and after renal transplantation. *Transplantation*, 1995. 59(4): p. 480-5.
87. Lokich, J., Spontaneous regression of metastatic renal cancer. Case report and literature review. *Am J Clin Oncol*, 1997. 20(4): p. 416-8.
88. Rosenberg, S.A., Lotze, M.T., Muul, L.M., Leitman, S., Chang, A.E., Ettinghausen, S.E., Matory, Y.L., Skibber, J.M., Shiloni, E., Vetto, J.T. and et al., Observations on the systemic administration of autologous

- lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med*, 1985. 313(23): p. 1485-92.
89. Rosenberg, S.A., Lotze, M.T., Muul, L.M., Chang, A.E., Avis, F.P., Leitman, S., Linehan, W.M., Robertson, C.N., Lee, R.E., Rubin, J.T. and et al., A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N Engl J Med*, 1987. 316(15): p. 889-97.
 90. Negrier, S., Escudier, B., Lasset, C., Douillard, J.Y., Savary, J., Chevreau, C., Ravaud, A., Mercatello, A., Peny, J., Mousseau, M., Philip, T. and Tursz, T., Recombinant human interleukin-2, recombinant human interferon alfa-2a, or both in metastatic renal-cell carcinoma. *Groupe Francais d'Immunotherapie. N Engl J Med*, 1998. 338(18): p. 1272-8.
 91. Bukowski, R.M., Natural history and therapy of metastatic renal cell carcinoma: the role of interleukin-2. *Cancer*, 1997. 80(7): p. 1198-220.
 92. Minasian, L.M., Motzer, R.J., Gluck, L., Mazumdar, M., Vlamis, V. and Krown, S.E., Interferon alfa-2a in advanced renal cell carcinoma: treatment results and survival in 159 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol*, 1993. 11(7): p. 1368-75.
 93. Motzer, R.J., Murphy, B.A., Bacik, J., Schwartz, L.H., Nanus, D.M., Mariani, T., Loehrer, P., Wilding, G., Fairclough, D.L., Cella, D. and Mazumdar, M., Phase III trial of interferon alfa-2a with or without 13-cis-retinoic acid for patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*, 2000. 18(16): p. 2972-80.
 94. Fossa, S.D., Martinelli, G., Otto, U., Schneider, G., Wander, H., Oberling, F., Bauer, H.W., Achtnicht, U. and Holdener, E.E., Recombinant interferon alfa-2a with or without vinblastine in metastatic renal cell carcinoma: results of a European multi-center phase III study. *Ann Oncol*, 1992. 3(4): p. 301-5.
 95. Ravaud, A., Trufflandier, N., Ferriere, J.M., Debled, M., Palussiere, J., Cany, L., Gaston, R., Mathoulin-Pelissier, S. and Bui, B.N., Subcutaneous interleukin-2, interferon alpha-2b and 5-fluorouracil in metastatic renal cell carcinoma as second-line treatment after failure of previous immunotherapy: a phase II trial. *Br J Cancer*, 2003. 89(12): p. 2213-8.
 96. Atzpodien, J., Kirchner, H., Jonas, U., Bergmann, L., Schott, H., Heynemann, H., Fornara, P., Loening, S.A., Roigas, J., Muller, S.C., Bodenstein, H., Pomer, S., Metzner, B., Rebmann, U., Oberneder, R., Siebels, M., Wandert, T., Puchberger, T. and Reitz, M., Interleukin-2- and interferon alfa-2a-based immunochemotherapy in advanced renal cell carcinoma: a Prospectively Randomized Trial of the German Cooperative Renal Carcinoma Chemoimmunotherapy Group (DGCIN). *J Clin Oncol*, 2004. 22(7): p. 1188-94.
 97. Mackensen, A., Ferradini, L., Carcelain, G., Triebel, F., Faure, F., Viel, S. and Hercend, T., Evidence for in situ amplification of cytotoxic T-lymphocytes with antitumor activity in a human regressive melanoma. *Cancer Res*, 1993. 53(15): p. 3569-73.
 98. Zorn, E. and Hercend, T., A natural cytotoxic T cell response in a spontaneously regressing human melanoma targets a neoantigen

- resulting from a somatic point mutation. *Eur J Immunol*, 1999. 29(2): p. 592-601.
99. Clemente, C.G., Mihm, M.C., Jr., Bufalino, R., Zurrida, S., Collini, P. and Cascinelli, N., Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer*, 1996. 77(7): p. 1303-10.
 100. Mihm, M.C., Jr., Clemente, C.G. and Cascinelli, N., Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response. *Lab Invest*, 1996. 74(1): p. 43-7.
 101. Coulie, P.G., Somville, M., Lehmann, F., Hainaut, P., Brasseur, F., Devos, R. and Boon, T., Precursor frequency analysis of human cytolytic T lymphocytes directed against autologous melanoma cells. *Int J Cancer*, 1992. 50(2): p. 289-97.
 102. Lee, P.P., Yee, C., Savage, P.A., Fong, L., Brockstedt, D., Weber, J.S., Johnson, D., Swetter, S., Thompson, J., Greenberg, P.D., Roederer, M. and Davis, M.M., Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nat Med*, 1999. 5(6): p. 677-85.
 103. Lurquin, C., Lethe, B., De Plaen, E., Corbiere, V., Theate, I., van Baren, N., Coulie, P.G. and Boon, T., Contrasting frequencies of antitumor and anti-vaccine T cells in metastases of a melanoma patient vaccinated with a MAGE tumor antigen. *J Exp Med*, 2005. 201(2): p. 249-57.
 104. Romero, P., Valmori, D., Pittet, M.J., Zippelius, A., Rimoldi, D., Levy, F., Dutoit, V., Ayyoub, M., Rubio-Godoy, V., Michielin, O., Guillaume, P., Batard, P., Luescher, I.F., Lejeune, F., Lienard, D., Rufer, N., Dietrich, P.Y., Speiser, D.E. and Cerottini, J.C., Antigenicity and immunogenicity of Melan-A/MART-1 derived peptides as targets for tumor reactive CTL in human melanoma. *Immunol Rev*, 2002. 188: p. 81-96.
 105. Rosenberg, S.A., Packard, B.S., Aebersold, P.M., Solomon, D., Topalian, S.L., Toy, S.T., Simon, P., Lotze, M.T., Yang, J.C., Seipp, C.A. and et al., Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N Engl J Med*, 1988. 319(25): p. 1676-80.
 106. Yannelli, J.R., Hyatt, C., McConnell, S., Hines, K., Jacknin, L., Parker, L., Sanders, M. and Rosenberg, S.A., Growth of tumor-infiltrating lymphocytes from human solid cancers: summary of a 5-year experience. *Int J Cancer*, 1996. 65(4): p. 413-21.
 107. Jocham, D., Richter, A., Hoffmann, L., Iwig, K., Fahlenkamp, D., Zakrzewski, G., Schmitt, E., Dannenberg, T., Lehmacher, W., von Wietersheim, J. and Doehn, C., Adjuvant autologous renal tumour cell vaccine and risk of tumour progression in patients with renal-cell carcinoma after radical nephrectomy: phase III, randomised controlled trial. *Lancet*, 2004. 363(9409): p. 594-9.
 108. Gouttefangeas, C., Stenzl, A., Stevanovic, S. and Rammensee, H.G., Immunotherapy of renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*, 2007. 56(1): p. 117-28.

109. van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A. and Boon, T., A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, 1991. 254(5038): p. 1643-7.
110. Boon, T., Coulie, P.G., Van den Eynde, B.J. and van der Bruggen, P., Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol*, 2006. 24: p. 175-208.
111. Wolfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M., Wolfel, C., Klehmann-Hieb, E., De Plaen, E., Hankeln, T., Meyer zum Buschenfelde, K.H. and Beach, D., A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science*, 1995. 269(5228): p. 1281-4.
112. Hanada, K., Yewdell, J.W. and Yang, J.C., Immune recognition of a human renal cancer antigen through post-translational protein splicing. *Nature*, 2004. 427(6971): p. 252-6.
113. Parkhurst, M.R., Salgaller, M.L., Southwood, S., Robbins, P.F., Sette, A., Rosenberg, S.A. and Kawakami, Y., Improved induction of melanoma-reactive CTL with peptides from the melanoma antigen gp100 modified at HLA-A*0201-binding residues. *J Immunol*, 1996. 157(6): p. 2539-48.
114. Valmori, D., Fonteneau, J.F., Lizana, C.M., Gervois, N., Lienard, D., Rimoldi, D., Jongeneel, V., Jotereau, F., Cerottini, J.C. and Romero, P., Enhanced generation of specific tumor-reactive CTL in vitro by selected Melan-A/MART-1 immunodominant peptide analogues. *J Immunol*, 1998. 160(4): p. 1750-8.
115. Pass, H.A., Schwarz, S.L., Wunderlich, J.R. and Rosenberg, S.A., Immunization of patients with melanoma peptide vaccines: immunologic assessment using the ELISPOT assay. *Cancer J Sci Am*, 1998. 4(5): p. 316-23.
116. Jager, E., Nagata, Y., Gnjatic, S., Wada, H., Stockert, E., Karbach, J., Dunbar, P.R., Lee, S.Y., Jungbluth, A., Jager, D., Arand, M., Ritter, G., Cerundolo, V., Dupont, B., Chen, Y.T., Old, L.J. and Knuth, A., Monitoring CD8 T cell responses to NY-ESO-1: correlation of humoral and cellular immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(9): p. 4760-5.
117. Valmori, D., Dutoit, V., Lienard, D., Rimoldi, D., Pittet, M.J., Champagne, P., Ellefsen, K., Sahin, U., Speiser, D., Lejeune, F., Cerottini, J.C. and Romero, P., Naturally occurring human lymphocyte antigen-A2 restricted CD8+ T-cell response to the cancer testis antigen NY-ESO-1 in melanoma patients. *Cancer Res*, 2000. 60(16): p. 4499-506.
118. Dunbar, P.R., Smith, C.L., Chao, D., Salio, M., Shepherd, D., Mirza, F., Lipp, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., Evans, A., Russell-Jones, R., Harris, A.L. and Cerundolo, V., A shift in the phenotype of melan-A-specific CTL identifies melanoma patients with an active tumor-specific immune response. *J Immunol*, 2000. 165(11): p. 6644-52.
119. Palermo, B., Campanelli, R., Mantovani, S., Lantelme, E., Manganoni, A.M., Carella, G., Da Prada, G., della Cuna, G.R., Romagne, F., Gauthier, L., Necker, A. and Giachino, C., Diverse expansion potential and heterogeneous avidity in tumor-associated antigen-specific T

- lymphocytes from primary melanoma patients. *Eur J Immunol*, 2001. 31(2): p. 412-20.
120. Weinschenk, T., Gouttefangeas, C., Schirle, M., Obermayr, F., Walter, S., Schoor, O., Kurek, R., Loeser, W., Bichler, K.H., Wernet, D., Stevanovic, S. and Rammensee, H.G., Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. *Cancer Res*, 2002. 62(20): p. 5818-27.
 121. Kruger, T., Schoor, O., Lemmel, C., Kraemer, B., Reichle, C., Dengjel, J., Weinschenk, T., Muller, M., Hennenlotter, J., Stenzl, A., Rammensee, H.G. and Stevanovic, S., Lessons to be learned from primary renal cell carcinomas: novel tumor antigens and HLA ligands for immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*, 2005. 54(9): p. 826-36.
 122. Hu, X., Chakraborty, N.G., Sporn, J.R., Kurtzman, S.H., Ergin, M.T. and Mukherji, B., Enhancement of cytolytic T lymphocyte precursor frequency in melanoma patients following immunization with the MAGE-1 peptide loaded antigen presenting cell-based vaccine. *Cancer Res*, 1996. 56(11): p. 2479-83.
 123. Jaeger, E., Bernhard, H., Romero, P., Ringhoffer, M., Arand, M., Karbach, J., Ilsemann, C., Hagedorn, M. and Knuth, A., Generation of cytotoxic T-cell responses with synthetic melanoma-associated peptides in vivo: implications for tumor vaccines with melanoma-associated antigens. *Int J Cancer*, 1996. 66(2): p. 162-9.
 124. Rosenberg, S.A., Yang, J.C., Schwartzentruber, D.J., Hwu, P., Marincola, F.M., Topalian, S.L., Restifo, N.P., Dudley, M.E., Schwarz, S.L., Spiess, P.J., Wunderlich, J.R., Parkhurst, M.R., Kawakami, Y., Seipp, C.A., Einhorn, J.H. and White, D.E., Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med*, 1998. 4(3): p. 321-7.
 125. Salgaller, M.L., Marincola, F.M., Cormier, J.N. and Rosenberg, S.A., Immunization against epitopes in the human melanoma antigen gp100 following patient immunization with synthetic peptides. *Cancer Res*, 1996. 56(20): p. 4749-57.
 126. Wiernecky, J., Muller, M.R., Wirths, S., Halder-Oehler, E., Dorfel, D., Schmidt, S.M., Hantschel, M., Brugger, W., Schroder, S., Horger, M.S., Kanz, L. and Brossart, P., Immunologic and clinical responses after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells in metastatic renal cancer patients. *Cancer Res*, 2006. 66(11): p. 5910-8.
 127. Uemura, H., Fujimoto, K., Tanaka, M., Yoshikawa, M., Hirao, Y., Uejima, S., Yoshikawa, K. and Itoh, K., A phase I trial of vaccination of CA9-derived peptides for HLA-A24-positive patients with cytokine-refractory metastatic renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2006. 12(6): p. 1768-75.
 128. Bleumer, I., Tiemessen, D.M., Oosterwijk-Wakka, J.C., Voller, M.C., De Weijer, K., Mulders, P.F. and Oosterwijk, E., Preliminary analysis of patients with progressive renal cell carcinoma vaccinated with CA9-peptide-pulsed mature dendritic cells. *J Immunother*, 2007. 30(1): p. 116-22.

129. Brossart, P., Heinrich, K.S., Stuhler, G., Behnke, L., Reichardt, V.L., Stevanovic, S., Muhm, A., Rammensee, H.G., Kanz, L. and Brugger, W., Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies. *Blood*, 1999. 93(12): p. 4309-17.
130. Schmidt, S.M., Schag, K., Muller, M.R., Weinschenk, T., Appel, S., Schoor, O., Weck, M.M., Grunebach, F., Kanz, L., Stevanovic, S., Rammensee, H.G. and Brossart, P., Induction of adipophilin-specific cytotoxic T lymphocytes using a novel HLA-A2-binding peptide that mediates tumor cell lysis. *Cancer Res*, 2004. 64(3): p. 1164-70.
131. Schag, K., Schmidt, S.M., Muller, M.R., Weinschenk, T., Appel, S., Weck, M.M., Grunebach, F., Stevanovic, S., Rammensee, H.G. and Brossart, P., Identification of C-met oncogene as a broadly expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T-lymphocytes. *Clin Cancer Res*, 2004. 10(11): p. 3658-66.
132. Boss, C.N., Grunebach, F., Brauer, K., Hantschel, M., Mirakaj, V., Weinschenk, T., Stevanovic, S., Rammensee, H.G. and Brossart, P., Identification and characterization of T-cell epitopes deduced from RGS5, a novel broadly expressed tumor antigen. *Clin Cancer Res*, 2007. 13(11): p. 3347-55.
133. Boraschi, D., Cifone, M.G., Falk, W., Flad, H.D., Tagliabue, A. and Martin, M.U., Cytokines in inflammation. Joint Workshop of the Deutsche Gesellschaft fur Immunologie (DGfI) and the Gruppo di Cooperazione in Immunologia (GCI) Assergi (L'Aquila, Italy), February 8-11, 1998. *Eur Cytokine Netw*, 1998. 9(2): p. 205-12.
134. Kondo, E., Maecker, B., Weihrauch, M.R., Wickenhauser, C., Zeng, W., Nadler, L.M., Schultze, J.L. and von Bergwelt-Baildon, M.S., Cyclin D1-specific cytotoxic T lymphocytes are present in the repertoire of cancer patients: implications for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res*, 2008. 14(20): p. 6574-9.
135. Sadovnikova, E., Jopling, L.A., Soo, K.S. and Stauss, H.J., Generation of human tumor-reactive cytotoxic T cells against peptides presented by non-self HLA class I molecules. *Eur J Immunol*, 1998. 28(1): p. 193-200.
136. Bertoletti, A., Chisari, F.V., Penna, A., Guilhot, S., Galati, L., Missale, G., Fowler, P., Schlicht, H.J., Vitiello, A., Chesnut, R.C. and et al., Definition of a minimal optimal cytotoxic T-cell epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid protein. *J Virol*, 1993. 67(4): p. 2376-80.
137. Gotch, F., McMichael, A. and Rothbard, J., Recognition of influenza A matrix protein by HLA-A2-restricted cytotoxic T lymphocytes. Use of analogues to orientate the matrix peptide in the HLA-A2 binding site. *J Exp Med*, 1988. 168(6): p. 2045-57.
138. Yokoyama, Y., Grunebach, F., Schmidt, S.M., Heine, A., Hantschel, M., Stevanovic, S., Rammensee, H.G. and Brossart, P., Matrilysin (MMP-7) is a novel broadly expressed tumor antigen recognized by antigen-specific T cells. *Clin Cancer Res*, 2008. 14(17): p. 5503-11.
139. Dengjel, J., Decker, P., Schoor, O., Altenberend, F., Weinschenk, T., Rammensee, H.G. and Stevanovic, S., Identification of a naturally processed cyclin D1 T-helper epitope by a novel combination of HLA

- class II targeting and differential mass spectrometry. *Eur J Immunol*, 2004. 34(12): p. 3644-51.
140. Dengjel, J., Nastke, M.D., Gouttefangeas, C., Gitsioudis, G., Schoor, O., Altenberend, F., Muller, M., Kramer, B., Missiou, A., Sauter, M., Hennenlotter, J., Wernet, D., Stenzl, A., Rammensee, H.G., Klingel, K. and Stevanovic, S., Unexpected abundance of HLA class II presented peptides in primary renal cell carcinomas. *Clin Cancer Res*, 2006. 12(14 Pt 1): p. 4163-70.
 141. Vissers, J.L., De Vries, I.J., Engelen, L.P., Scharenborg, N.M., Molkenboer, J., Figdor, C.G., Oosterwijk, E. and Adema, G.J., Renal cell carcinoma-associated antigen G250 encodes a naturally processed epitope presented by human leukocyte antigen-DR molecules to CD4(+) T lymphocytes. *Int J Cancer*, 2002. 100(4): p. 441-4.
 142. Barve, M., Bender, J., Senzer, N., Cunningham, C., Greco, F.A., McCune, D., Steis, R., Khong, H., Richards, D., Stephenson, J., Ganesa, P., Nemunaitis, J., Ishioka, G., Pappen, B., Nemunaitis, M., Morse, M., Mills, B., Maples, P.B., Sherman, J. and Nemunaitis, J.J., Induction of immune responses and clinical efficacy in a phase II trial of IDM-2101, a 10-epitope cytotoxic T-lymphocyte vaccine, in metastatic non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 2008. 26(27): p. 4418-25.
 143. Markovic, S.N., Suman, V.J., Ingle, J.N., Kaur, J.S., Pitot, H.C., Loprinzi, C.L., Rao, R.D., Creagan, E.T., Pittelkow, M.R., Allred, J.B., Nevala, W.K. and Celis, E., Peptide vaccination of patients with metastatic melanoma: improved clinical outcome in patients demonstrating effective immunization. *Am J Clin Oncol*, 2006. 29(4): p. 352-60.
 144. Chianese-Bullock, K.A., Pressley, J., Garbee, C., Hibbitts, S., Murphy, C., Yamshchikov, G., Petroni, G.R., Bissonette, E.A., Neese, P.Y., Grosh, W.W., Merrill, P., Fink, R., Woodson, E.M., Wiernasz, C.J., Patterson, J.W. and Slingsluff, C.L., Jr., MAGE-A1-, MAGE-A10-, and gp100-derived peptides are immunogenic when combined with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and montanide ISA-51 adjuvant and administered as part of a multipeptide vaccine for melanoma. *J Immunol*, 2005. 174(5): p. 3080-6.
 145. Wang, F., Bade, E., Kuniyoshi, C., Spears, L., Jeffery, G., Marty, V., Groshen, S. and Weber, J., Phase I trial of a MART-1 peptide vaccine with incomplete Freund's adjuvant for resected high-risk melanoma. *Clin Cancer Res*, 1999. 5(10): p. 2756-65.
 146. Jager, E., Ringhoffer, M., Dienes, H.P., Arand, M., Karbach, J., Jager, D., Ilsemann, C., Hagedorn, M., Oesch, F. and Knuth, A., Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor enhances immune responses to melanoma-associated peptides in vivo. *Int J Cancer*, 1996. 67(1): p. 54-62.
 147. Czerkinsky, C., Moldoveanu, Z., Mestecky, J., Nilsson, L.A. and Ouchterlony, O., A novel two colour ELISPOT assay. I. Simultaneous detection of distinct types of antibody-secreting cells. *J Immunol Methods*, 1988. 115(1): p. 31-7.
 148. Britten, C.M., Meyer, R.G., Kreer, T., Drexler, I., Wolfel, T. and Herr, W., The use of HLA-A*0201-transfected K562 as standard antigen-

- presenting cells for CD8(+) T lymphocytes in IFN-gamma ELISPOT assays. *J Immunol Methods*, 2002. 259(1-2): p. 95-110.
149. Scheibenbogen, C., Lee, K.H., Mayer, S., Stevanovic, S., Moebius, U., Herr, W., Rammensee, H.G. and Keilholz, U., A sensitive ELISPOT assay for detection of CD8+ T lymphocytes specific for HLA class I-binding peptide epitopes derived from influenza proteins in the blood of healthy donors and melanoma patients. *Clin Cancer Res*, 1997. 3(2): p. 221-6.
 150. Henkart, P.A. and Fisher, R.I., Characterization of the lymphocyte surface receptors for Con A and PHA. *J Immunol*, 1975. 114(2 Pt 1): p. 710-4.
 151. Krangel, M.S., Endocytosis and recycling of the T3-T cell receptor complex. The role of T3 phosphorylation. *J Exp Med*, 1987. 165(4): p. 1141-59.
 152. Valitutti, S., Muller, S., Salio, M. and Lanzavecchia, A., Degradation of T cell receptor (TCR)-CD3-zeta complexes after antigenic stimulation. *J Exp Med*, 1997. 185(10): p. 1859-64.
 153. Altman, J.D., Moss, P.A., Goulder, P.J., Barouch, D.H., McHeyzer-Williams, M.G., Bell, J.I., McMichael, A.J. and Davis, M.M., Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science*, 1996. 274(5284): p. 94-6.
 154. Hickling, J., Tetramer analysis to detect T lymphocytes (T cells) that have specific T-cell receptors on their cell surface, in *Expert Reviews in Molecular Medicine* © Cambridge University Press. 1998.
 155. Mocellin, S., Lise, M. and Nitti, D., Targeted therapy for colorectal cancer: mapping the way. *Trends Mol Med*, 2005. 11(7): p. 327-35.
 156. Britten, C.M., Gouttefangeas, C., Welters, M.J., Pawelec, G., Koch, S., Ottensmeier, C., Mander, A., Walter, S., Paschen, A., Muller-Berghaus, J., Haas, I., Mackensen, A., Kollgaard, T., thor Straten, P., Schmitt, M., Giannopoulos, K., Maier, R., Veelken, H., Bertinetti, C., Konur, A., Huber, C., Stevanovic, S., Wolfel, T. and van der Burg, S.H., The CIMT-monitoring panel: a two-step approach to harmonize the enumeration of antigen-specific CD8+ T lymphocytes by structural and functional assays. *Cancer Immunol Immunother*, 2008. 57(3): p. 289-302.
 157. Janetzki, S., Panageas, K.S., Ben-Porat, L., Boyer, J., Britten, C.M., Clay, T.M., Kalos, M., Maecker, H.T., Romero, P., Yuan, J., Kast, W.M. and Hoos, A., Results and harmonization guidelines from two large-scale international Elispot proficiency panels conducted by the Cancer Vaccine Consortium (CVC/SVI). *Cancer Immunol Immunother*, 2008. 57(3): p. 303-15.
 158. Bull, M., Lee, D., Stucky, J., Chiu, Y.L., Rubin, A., Horton, H. and McElrath, M.J., Defining blood processing parameters for optimal detection of cryopreserved antigen-specific responses for HIV vaccine trials. *J Immunol Methods*, 2007. 322(1-2): p. 57-69.
 159. Kreher, C.R., Dittrich, M.T., Guerkov, R., Boehm, B.O. and Tary-Lehmann, M., CD4+ and CD8+ cells in cryopreserved human PBMC maintain full functionality in cytokine ELISPOT assays. *J Immunol Methods*, 2003. 278(1-2): p. 79-93.

160. Saito, T., Dworacki, G., Gooding, W., Lotze, M.T. and Whiteside, T.L., Spontaneous apoptosis of CD8+ T lymphocytes in peripheral blood of patients with advanced melanoma. *Clin Cancer Res*, 2000. 6(4): p. 1351-64.
161. Griffioen, M., Borghi, M., Schrier, P.I. and Osanto, S., Detection and quantification of CD8(+) T cells specific for HLA-A*0201-binding melanoma and viral peptides by the IFN-gamma-ELISPOT assay. *Int J Cancer*, 2001. 93(4): p. 549-55.
162. Scheibenbogen, C., Lee, K.H., Stevanovic, S., Witzens, M., Willhauck, M., Waldmann, V., Naeher, H., Rammensee, H.G. and Keilholz, U., Analysis of the T cell response to tumor and viral peptide antigens by an IFN-gamma-ELISPOT assay. *Int J Cancer*, 1997. 71(6): p. 932-6.
163. Hudgens, M.G., Self, S.G., Chiu, Y.L., Russell, N.D., Horton, H. and McElrath, M.J., Statistical considerations for the design and analysis of the ELISpot assay in HIV-1 vaccine trials. *J Immunol Methods*, 2004. 288(1-2): p. 19-34.
164. McCutcheon, M., Wehner, N., Wensky, A., Kushner, M., Doan, S., Hsiao, L., Calabresi, P., Ha, T., Tran, T.V., Tate, K.M., Winkelhake, J. and Spack, E.G., A sensitive ELISPOT assay to detect low-frequency human T lymphocytes. *J Immunol Methods*, 1997. 210(2): p. 149-66.
165. Speiser, D.E., Pittet, M.J., Guillaume, P., Lubenow, N., Hoffman, E., Cerottini, J.C. and Romero, P., Ex vivo analysis of human antigen-specific CD8+ T-cell responses: quality assessment of fluorescent HLA-A2 multimer and interferon-gamma ELISPOT assays for patient immune monitoring. *J Immunother*, 2004. 27(4): p. 298-308.
166. Comin-Anduix, B., Gualberto, A., Glaspy, J.A., Seja, E., Ontiveros, M., Reardon, D.L., Renteria, R., Englahner, B., Economou, J.S., Gomez-Navarro, J. and Ribas, A., Definition of an immunologic response using the major histocompatibility complex tetramer and enzyme-linked immunospot assays. *Clin Cancer Res*, 2006. 12(1): p. 107-16.
167. Malyguine, A., Strobl, S., Zaritskaya, L., Baseler, M. and Shafer-Weaver, K., New approaches for monitoring CTL activity in clinical trials. *Adv Exp Med Biol*, 2007. 601: p. 273-84.
168. Keilholz, U., Weber, J., Finke, J.H., Gabrilovich, D.I., Kast, W.M., Disis, M.L., Kirkwood, J.M., Scheibenbogen, C., Schlom, J., Maino, V.C., Lyerly, H.K., Lee, P.P., Storkus, W., Marincola, F., Worobec, A. and Atkins, M.B., Immunologic monitoring of cancer vaccine therapy: results of a workshop sponsored by the Society for Biological Therapy. *J Immunother*, 2002. 25(2): p. 97-138.
169. Sun, Y., Iglesias, E., Samri, A., Kamkamidze, G., Decoville, T., Carcelain, G. and Autran, B., A systematic comparison of methods to measure HIV-1 specific CD8 T cells. *J Immunol Methods*, 2003. 272(1-2): p. 23-34.
170. Hedberg, Y., Davoodi, E., Roos, G., Ljungberg, B. and Landberg, G., Cyclin-D1 expression in human renal-cell carcinoma. *Int J Cancer*, 1999. 84(3): p. 268-72.

171. Ottaviani, S., Zhang, Y., Boon, T. and van der Bruggen, P., A MAGE-1 antigenic peptide recognized by human cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 tumor cells. *Cancer Immunol Immunother*, 2005. 54(12): p. 1214-20.
172. Chaux, P., Vantomme, V., Coulie, P., Boon, T. and van der Bruggen, P., Estimation of the frequencies of anti-MAGE-3 cytolytic T-lymphocyte precursors in blood from individuals without cancer. *Int J Cancer*, 1998. 77(4): p. 538-42.
173. Pittet, M.J., Speiser, D.E., Lienard, D., Valmori, D., Guillaume, P., Dutoit, V., Rimoldi, D., Lejeune, F., Cerottini, J.C. and Romero, P., Expansion and functional maturation of human tumor antigen-specific CD8+ T cells after vaccination with antigenic peptide. *Clin Cancer Res*, 2001. 7(3 Suppl): p. 796s-803s.
174. Bettinotti, M.P., Panelli, M.C., Ruppe, E., Mocellin, S., Phan, G.Q., White, D.E. and Marincola, F.M., Clinical and immunological evaluation of patients with metastatic melanoma undergoing immunization with the HLA-Cw*0702-associated epitope MAGE-A12:170-178. *Int J Cancer*, 2003. 105(2): p. 210-6.
175. Cormier, J.N., Salgaller, M.L., Prevet, T., Barracchini, K.C., Rivoltini, L., Restifo, N.P., Rosenberg, S.A. and Marincola, F.M., Enhancement of cellular immunity in melanoma patients immunized with a peptide from MART-1/Melan A. *Cancer J Sci Am*, 1997. 3(1): p. 37-44.
176. Marchand, M., van Baren, N., Weynants, P., Brichard, V., Dreno, B., Tessier, M.H., Rankin, E., Parmiani, G., Arienti, F., Humblet, Y., Bourlond, A., Vanwijck, R., Lienard, D., Beauduin, M., Dietrich, P.Y., Russo, V., Kerger, J., Masucci, G., Jager, E., De Greve, J., Atzpodien, J., Basseur, F., Coulie, P.G., van der Bruggen, P. and Boon, T., Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int J Cancer*, 1999. 80(2): p. 219-30.
177. Coulie, P.G. and Connerotte, T., Human tumor-specific T lymphocytes: does function matter more than number? *Curr Opin Immunol*, 2005. 17(3): p. 320-5.
178. Powell, D.J., Jr. and Rosenberg, S.A., Phenotypic and functional maturation of tumor antigen-reactive CD8+ T lymphocytes in patients undergoing multiple course peptide vaccination. *J Immunother*, 2004. 27(1): p. 36-47.
179. Monsurro, V., Nielsen, M.B., Perez-Diez, A., Dudley, M.E., Wang, E., Rosenberg, S.A. and Marincola, F.M., Kinetics of TCR use in response to repeated epitope-specific immunization. *J Immunol*, 2001. 166(9): p. 5817-25.
180. Schuler-Thurner, B., Schultz, E.S., Berger, T.G., Weinlich, G., Ebner, S., Woerl, P., Bender, A., Feuerstein, B., Fritsch, P.O., Romani, N. and Schuler, G., Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells. *J Exp Med*, 2002. 195(10): p. 1279-88.
181. Marchand, M., Punt, C.J., Aamdal, S., Escudier, B., Kruit, W.H., Keilholz, U., Hakansson, L., van Baren, N., Humblet, Y., Mulders, P., Avril, M.F.,

- Eggermont, A.M., Scheibenbogen, C., Uiters, J., Wanders, J., Delire, M., Boon, T. and Stoter, G., Immunisation of metastatic cancer patients with MAGE-3 protein combined with adjuvant SBAS-2: a clinical report. *Eur J Cancer*, 2003. 39(1): p. 70-7.
182. Kruit, W.H., van Ojik, H.H., Brichard, V.G., Escudier, B., Dorval, T., Dreno, B., Patel, P., van Baren, N., Avril, M.F., Piperno, S., Khammari, A., Stas, M., Ritter, G., Lethe, B., Godelaine, D., Brasseur, F., Zhang, Y., van der Bruggen, P., Boon, T., Eggermont, A.M. and Marchand, M., Phase 1/2 study of subcutaneous and intradermal immunization with a recombinant MAGE-3 protein in patients with detectable metastatic melanoma. *Int J Cancer*, 2005. 117(4): p. 596-604.
 183. Bui, M.H., Seligson, D., Han, K.R., Pantuck, A.J., Dorey, F.J., Huang, Y., Horvath, S., Leibovich, B.C., Chopra, S., Liao, S.Y., Stanbridge, E., Lerman, M.I., Palotie, A., Figlin, R.A. and Belldegrun, A.S., Carbonic anhydrase IX is an independent predictor of survival in advanced renal clear cell carcinoma: implications for prognosis and therapy. *Clin Cancer Res*, 2003. 9(2): p. 802-11.
 184. Chen, J., Rocken, C., Hoffmann, J., Kruger, S., Lendeckel, U., Rocco, A., Pastorekova, S., Malfertheiner, P. and Ebert, M.P., Expression of carbonic anhydrase 9 at the invasion front of gastric cancers. *Gut*, 2005. 54(7): p. 920-7.
 185. Potter, C.P. and Harris, A.L., Diagnostic, prognostic and therapeutic implications of carbonic anhydrases in cancer. *Br J Cancer*, 2003. 89(1): p. 2-7.
 186. Pardoll, D.M. and Topalian, S.L., The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. *Curr Opin Immunol*, 1998. 10(5): p. 588-94.
 187. Mumberg, D., Monach, P.A., Wanderling, S., Philip, M., Toledano, A.Y., Schreiber, R.D. and Schreiber, H., CD4(+) T cells eliminate MHC class II-negative cancer cells in vivo by indirect effects of IFN-gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(15): p. 8633-8.
 188. Egilmez, N.K., Hess, S.D., Chen, F.A., Takita, H., Conway, T.F. and Bankert, R.B., Human CD4+ effector T cells mediate indirect interleukin-12- and interferon-gamma-dependent suppression of autologous HLA-negative lung tumor xenografts in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res*, 2002. 62(9): p. 2611-7.
 189. Hess, S.D., Egilmez, N.K., Bailey, N., Anderson, T.M., Mathiowitz, E., Bernstein, S.H. and Bankert, R.B., Human CD4+ T cells present within the microenvironment of human lung tumors are mobilized by the local and sustained release of IL-12 to kill tumors in situ by indirect effects of IFN-gamma. *J Immunol*, 2003. 170(1): p. 400-12.
 190. Manici, S., Sturniolo, T., Imro, M.A., Hammer, J., Sinigaglia, F., Noppen, C., Spagnoli, G., Mazzi, B., Bellone, M., Dellabona, P. and Protti, M.P., Melanoma cells present a MAGE-3 epitope to CD4(+) cytotoxic T cells in association with histocompatibility leukocyte antigen DR11. *J Exp Med*, 1999. 189(5): p. 871-6.
 191. Novellino, L., Renkvist, N., Rini, F., Mazzocchi, A., Rivoltini, L., Greco, A., Deho, P., Squarcina, P., Robbins, P.F., Parmiani, G. and Castelli, C., Identification of a mutated receptor-like protein tyrosine phosphatase

- kappa as a novel, class II HLA-restricted melanoma antigen. *J Immunol*, 2003. 170(12): p. 6363-70.
192. Qin, Z. and Blankenstein, T., CD4+ T cell--mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells. *Immunity*, 2000. 12(6): p. 677-86.
 193. Kennedy, R.C., Shearer, M.H., Watts, A.M. and Bright, R.K., CD4+ T lymphocytes play a critical role in antibody production and tumor immunity against simian virus 40 large tumor antigen. *Cancer Res*, 2003. 63(5): p. 1040-5.
 194. Darrach, P.A., Patel, D.T., De Luca, P.M., Lindsay, R.W., Davey, D.F., Flynn, B.J., Hoff, S.T., Andersen, P., Reed, S.G., Morris, S.L., Roederer, M. and Seder, R.A., Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nat Med*, 2007. 13(7): p. 843-50.
 195. Marincola, F.M., Jaffee, E.M., Hicklin, D.J. and Ferrone, S., Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol*, 2000. 74: p. 181-273.
 196. Garcia-Lora, A., Algarra, I. and Garrido, F., MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *J Cell Physiol*, 2003. 195(3): p. 346-55.
 197. Maleno, I., Lopez Nevot, M.A., Seliger, B. and Garrido, F., Low frequency of HLA haplotype loss associated with loss of heterozygosity in chromosome region 6p21 in clear renal cell carcinomas. *Int J Cancer*, 2004. 109(4): p. 636-8.
 198. Chianese-Bullock, K.A., Lewis, S.T., Sherman, N.E., Shannon, J.D. and Slingluff, C.L., Jr., Multi-peptide vaccines vialed as peptide mixtures can be stable reagents for use in peptide-based immune therapies. *Vaccine*, 2009. 27(11): p. 1764-70.
 199. Zippelius, A., Batard, P., Rubio-Godoy, V., Bioley, G., Lienard, D., Lejeune, F., Rimoldi, D., Guillaume, P., Meidenbauer, N., Mackensen, A., Rufer, N., Lubenow, N., Speiser, D., Cerottini, J.C., Romero, P. and Pittet, M.J., Effector function of human tumor-specific CD8 T cells in melanoma lesions: a state of local functional tolerance. *Cancer Res*, 2004. 64(8): p. 2865-73.
 200. Bronte, V., Kasic, T., Gri, G., Gallana, K., Borsellino, G., Marigo, I., Battistini, L., Iafrate, M., Prayer-Galetti, T., Pagano, F. and Viola, A., Boosting antitumor responses of T lymphocytes infiltrating human prostate cancers. *J Exp Med*, 2005. 201(8): p. 1257-68.
 201. Wang, H.Y., Lee, D.A., Peng, G., Guo, Z., Li, Y., Kiniwa, Y., Shevach, E.M. and Wang, R.F., Tumor-specific human CD4+ regulatory T cells and their ligands: implications for immunotherapy. *Immunity*, 2004. 20(1): p. 107-18.
 202. Cesana, G.C., DeRaffele, G., Cohen, S., Moroziewicz, D., Mitcham, J., Stoutenburg, J., Cheung, K., Hesdorffer, C., Kim-Schulze, S. and Kaufman, H.L., Characterization of CD4+CD25+ regulatory T cells in patients treated with high-dose interleukin-2 for metastatic melanoma or renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*, 2006. 24(7): p. 1169-77.

203. Zea, A.H., Rodriguez, P.C., Atkins, M.B., Hernandez, C., Signoretti, S., Zabaleta, J., McDermott, D., Quiceno, D., Youmans, A., O'Neill, A., Mier, J. and Ochoa, A.C., Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res*, 2005. 65(8): p. 3044-8.
204. Uyttenhove, C., Pilotte, L., Theate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., Boon, T. and Van den Eynde, B.J., Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med*, 2003. 9(10): p. 1269-74.
205. Chen, Q., Daniel, V., Maher, D.W. and Hersey, P., Production of IL-10 by melanoma cells: examination of its role in immunosuppression mediated by melanoma. *Int J Cancer*, 1994. 56(5): p. 755-60.
206. Ibrahim, E.C., Allory, Y., Commo, F., Gattegno, B., Callard, P. and Paul, P., Altered pattern of major histocompatibility complex expression in renal carcinoma: tumor-specific expression of the nonclassical human leukocyte antigen-G molecule is restricted to clear cell carcinoma while up-regulation of other major histocompatibility complex antigens is primarily distributed in all subtypes of renal carcinoma. *Am J Pathol*, 2003. 162(2): p. 501-8.
207. Frankenberger, B., Noessner, E. and Schendel, D.J., Immune suppression in renal cell carcinoma. *Semin Cancer Biol*, 2007. 17(4): p. 330-43.
208. Goto, S., Sato, M., Kaneko, R., Itoh, M., Sato, S. and Takeuchi, S., Analysis of Th1 and Th2 cytokine production by peripheral blood mononuclear cells as a parameter of immunological dysfunction in advanced cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*, 1999. 48(8): p. 435-42.
209. Maeurer, M.J., Martin, D.M., Castelli, C., Elder, E., Leder, G., Storkus, W.J. and Lotze, M.T., Host immune response in renal cell cancer: interleukin-4 (IL-4) and IL-10 mRNA are frequently detected in freshly collected tumor-infiltrating lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother*, 1995. 41(2): p. 111-21.
210. Bellone, G., Turletti, A., Artusio, E., Mareschi, K., Carbone, A., Tibaudi, D., Robecchi, A., Emanuelli, G. and Rodeck, U., Tumor-associated transforming growth factor-beta and interleukin-10 contribute to a systemic Th2 immune phenotype in pancreatic carcinoma patients. *Am J Pathol*, 1999. 155(2): p. 537-47.
211. Rayman, P., Wesa, A.K., Richmond, A.L., Das, T., Biswas, K., Raval, G., Storkus, W.J., Tannenbaum, C., Novick, A., Bukowski, R. and Finke, J., Effect of renal cell carcinomas on the development of type 1 T-cell responses. *Clin Cancer Res*, 2004. 10(18 Pt 2): p. 6360S-6S.
212. Speiser, D.E., Lienard, D., Rufer, N., Rubio-Godoy, V., Rimoldi, D., Lejeune, F., Krieg, A.M., Cerottini, J.C. and Romero, P., Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909. *J Clin Invest*, 2005. 115(3): p. 739-46.
213. Sanderson, K., Scotland, R., Lee, P., Liu, D., Groshen, S., Snively, J., Sian, S., Nichol, G., Davis, T., Keler, T., Yellin, M. and Weber, J.,

- Autoimmunity in a phase I trial of a fully human anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 monoclonal antibody with multiple melanoma peptides and Montanide ISA 51 for patients with resected stages III and IV melanoma. *J Clin Oncol*, 2005. 23(4): p. 741-50.
214. Rosenberg, S.A. and Dudley, M.E., Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101 Suppl 2: p. 14639-45.
 215. Dannull, J., Su, Z., Rizzieri, D., Yang, B.K., Coleman, D., Yancey, D., Zhang, A., Dahm, P., Chao, N., Gilboa, E. and Vieweg, J., Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J Clin Invest*, 2005. 115(12): p. 3623-33.
 216. Asemussen, A.M. and Brossart, P., Vaccination strategies in patients with renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*, 2009. 58(7): p. 1169-74.
 217. Hipp, M.M., Hilf, N., Walter, S., Werth, D., Brauer, K.M., Radsak, M.P., Weinschenk, T., Singh-Jasuja, H. and Brossart, P., Sorafenib, but not sunitinib, affects function of dendritic cells and induction of primary immune responses. *Blood*, 2008. 111(12): p. 5610-20.
 218. Finke, J.H., Rini, B., Ireland, J., Rayman, P., Richmond, A., Golshayan, A., Wood, L., Elson, P., Garcia, J., Dreicer, R. and Bukowski, R., Sunitinib reverses type-1 immune suppression and decreases T-regulatory cells in renal cell carcinoma patients. *Clin Cancer Res*, 2008. 14(20): p. 6674-82.

10 Danksagung

An allererster Stelle möchte ich Herrn Prof. H.-G. Rammensee für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und der erforderlichen Ressourcen danken. Während der Erstellung meiner Dissertation habe ich ihn nicht nur als herausragenden Wissenschaftler, sondern auch als überaus freundlichen Menschen zu schätzen gelernt.

Bei Dr. C. Gouttefangeas bedanke ich mich herzlich für ihre kompetente und engagierte Betreuung. Sie hat mich in die Labormethoden und das wissenschaftliche Arbeiten eingeführt und war zu jedem Zeitpunkt bereit, mir bei Fragen und Problemen weiterzuhelfen.

Während der Zeit im Labor konnte ich mich stets auf die Unterstützung von Dr. S. Attig und M. Widenmeyer aus meiner Arbeitsgruppe verlassen.

Für die Herstellung der Peptide, die in den Vakzinierungen und Versuchen verwendet wurden, danke ich Prof. S. Stevanović und P. Hrstic.

Mein Dank richtet sich auch an Prof. A. Stenzl, Dr. S. Feyerabend und J. Hennenlotter von der Klinik für Urologie der Universität Tübingen. Danke für die Durchführung der Vakzinierungen und Blutentnahmen und die gute Zusammenarbeit!

Mein Dank gilt auch den Mitarbeiter/innen und Stipendiaten/innen des Graduiertenkollegs 794, durch das ich viele wertvolle Impulse erhalten habe und mein Wissen auf dem Gebiet der Immunologie erweitern konnte.

Nicht genug danken kann ich meinen Eltern und Großeltern, denen ich große Teile dessen, was mich heute auszeichnet, verdanke. Sie haben mich während meiner langjährigen Ausbildung in jeder Hinsicht unterstützt.

Ganz besonderen Dank möchte ich Volkmar Frick aussprechen, der an meiner Seite alle Höhen und Tiefen der Dissertation miterlebt hat und immer für mich da war.

11 Lebenslauf

Name: Annemarie Dröge

Geburtsdatum: 05.06.1984

Geburtsort: Stuttgart

SCHULBILDUNG:

1990-1994 Grundschule Murr a. d. Murr

1994-1999 St.Agnes-Gymnasium, Stuttgart

1999-2003 Friedrich-Schiller-Gymnasium, Marbach

STUDIUM:

Seit 2003 Studium der Humanmedizin an der Universität Tübingen

08/2005 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Seit 2005 Stipendiatin der Heinrich Böll Stiftung

03/2006 Famulatur in der Gastroenterologie der Helios-Klinik Titisee-Neustadt

09/2006 Famulatur in der Nephrologie des Beaumont Hospital Dublin

03/2007 Famulatur in der Gynäkologie des Klinikums Ludwigsburg

2007-2010 Doktorarbeit am Interfakultären Institut für Zellbiologie der Universität Tübingen, Abteilung Immunologie

04-09/2007 Stipendiatin im Graduiertenkolleg 794 „Zellbiologische Mechanismen immunassoziierter Prozesse“ der Universität Tübingen

01-06/2008 Auslandssemester in Santiago de Compostela

08/2008 Famulatur in der Neurologie des Bürgerhospitals Stuttgart

03/2009 Famulatur in der Notfallaufnahme der BG Unfallklinik Tübingen

08-12/2009 PJ-Tertial Chirurgie an der Universidad de Chile

12/2009- PJ-Tertial Innere Medizin am Marienhospital Stuttgart

04/2010

04-07/2010 PJ-Tertial HNO am Marienhospital Stuttgart

23.11.2010 Ärztliche Prüfung (2. Abschnitt)