

**Identifizierung neuer T-Zellepitope als
Grundlage einer Peptid-basierten
Immuntherapie für
Ovarialkarzinom-Patientinnen**

der Fakultät für Biologie

der EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

von

Helen Hörzer

aus Filderstadt

vorgelegte

Dissertation

2010

Tag der mündlichen Prüfung: 05.03.2010

Dekan: Prof. Dr. H. Mallot

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.-G. Rammensee

2. Berichterstatter: PD Dr. B. Gückel

Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung	1
A.1	Epidemiologie und Therapie des OvCas	1
A.1.1	Risiko	1
A.1.2	Diagnose.....	1
A.1.3	Prognose	2
A.1.4	Therapie.....	4
A.1.5	Operative Therapie	4
A.1.6	Primäre Chemotherapie.....	4
A.1.7	Therapie des OvCa-Rezidivs	5
A.1.8	Neue Therapieansätze	6
A.2	Das Immunsystem	7
A.2.1	Aufbau des Immunsystems	7
A.2.2	T-Zellen.....	8
A.2.3	MHC-Moleküle	8
A.2.4	Der T-Zellrezeptor.....	10
A.2.5	Korezeptoren	11
A.2.6	Entwicklung und Selektion der T-Zellen	11
A.2.7	Aktivierung der T-Zellen.....	12
A.3	Krebs im Kontext des Immunsystems.....	13
A.3.1	Die Andersartigkeit der Tumorzellen	13
A.3.2	Erkennung durch das Immunsystem	14
A.3.3	Tumorescape.....	15
A.3.4	Immuntherapien bei Krebs.....	17
A.3.5	Immuntherapie bei OvCa.....	20
A.3.6	Peptid-basierte Vakzinierung - Identifizierung von T-Zellepitopen	21
A.3.7	TAAAs im OvCa	23
A.4	Zielsetzung.....	25

Verzeichnisse

B	Material und Methoden	27
B.1	Material	27
B.1.1	Ethikanträge für die Arbeit mit Patientenproben	27
B.1.2	Geräte	27
B.1.3	Chemikalien für proteinbiochemische Methoden	28
B.1.4	Chemikalien für zellbiologische Methoden	29
B.1.5	Medien und Puffer für zellbiologische Methoden	30
B.1.6	Zytokine und Wachstumsfaktoren für die Zellkultur	30
B.1.7	Zelllinien	31
B.1.8	Gesunde Blutspender	33
B.1.9	Patientenmaterial	35
B.1.10	Peptide	36
B.2	Molekularbiologische Methoden	38
B.2.1	Isolierung der RNA aus Tumorzellen	38
B.2.2	cDNA-Synthese	39
B.2.3	Qualitative RT-PCR	40
B.2.4	Quantitative RT-PCR	41
B.3	Proteinbiochemische Methoden	45
B.3.1	Herstellung von Zelllysaten aus Tumorzellen	45
B.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mit der Bradford-Methode	45
B.3.3	SDS-Gelelektrophorese	46
B.3.4	Westernblot	48
B.3.5	Rückfaltung von MHC Klasse I-Monomeren	50
B.3.6	Multimerisierung von MHC Klasse I-Monomeren mittels Streptavidin	53
B.3.7	Kryokonservierung von HLA Klasse I-Tetrameren	53
B.3.8	Aufreinigung von MHC-Liganden durch Immunpräzipitation	54
B.3.8.1	Herstellung der Säule	54
B.3.8.2	Herstellung des Zelllysats	55
B.3.8.3	Affinitätschromatographie und Elution	56

Verzeichnisse

B.3.9	Modifizierung von Peptiden	56
B.4	Zellbiologische Methoden	59
B.4.1	Zellkultur von Adhärenten und Suspensionszellen	59
B.4.2	Bestimmung der Lebendzellichte	59
B.4.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	60
B.4.4	Kultivierung der murinen Zelllinie t-CD40L-NIH-3T3	60
B.4.5	<i>buffy coat</i> Präparation	62
B.4.6	Isolation von PBMCs aus <i>buffy coat</i>	63
B.4.7	Kokultivierung der B-Zellen	64
B.4.8	Trennung von Monozyten und peripheren Lymphozyten aus PBMCs	65
B.4.9	Differenzierung und Reifung Dendritischer Zellen	66
B.4.10	Isolierung von T-Zellen aus PBLs mit der magnetischen Zellsortierung (MACS)	67
B.4.11	<i>In vitro priming</i> von T Zellen mit peptidbeladenen, antigen-präsentierenden Zellen	69
B.4.12	Peptid-Prästimulation von PBMCs	70
B.5	Analytische Methoden	72
B.5.1	Durchflusszytometrie	72
B.5.2	Charakterisierung der Tumorzellen mittels Durchflusszytometrie	74
B.5.3	Peptidbindungs-Kompetitions-Test	75
B.5.4	Tetramer-Färbung	76
B.5.5	Intrazelluläre IFN γ Färbung	78
B.5.6	Kombinierte Tetramer- und intrazelluläre Zytokin-Färbung	80
B.5.7	Zytotoxizitätsmessung	81
B.5.8	Sequenzanalyse und Quantifizierung von Peptiden durch Edman-Abbau	83
B.5.9	Massenspektrometrische Analyse	85
B.5.9.1	Allgemeine Einführung	85
B.5.9.2	Elektrospray-Ionisation	86
B.5.9.3	Q-TOF-Massenspektrometer	86

Verzeichnisse

B.5.9.4	Liquid Chromatography Mass Spectrometry-Kopplung	89
B.5.9.5	Interpretation der ESI-MS/MS-Spektren von Peptiden	89
B.5.9.6	Die <i>predict-calibrate-detect</i> -Methode	92
C	Ergebnisse und Diskussion zur Charakterisierung von Tumorzellen	93
C.1	Hintergrund und Fragestellung	93
C.1.1	L1CAM	95
C.1.2	VEGF	96
C.1.3	Testisin	97
C.1.4	Neuromedin U	97
C.1.5	Jagged2	98
C.1.6	CA125	99
C.1.7	Mesothelin	99
C.1.8	SPAG9	100
C.1.9	SIX1	101
C.1.10	Osteopontin	101
C.2	Material und Methoden zur Charakterisierung von Tumorzellen	102
C.2.1	Zelllinien	102
C.2.2	OvCa-Primärgewebe	103
C.2.3	Verwendete Untersuchungsmethoden	105
C.3	Ergebnisse zur Charakterisierung von Tumorzellen	105
C.3.1	Nachweis OvCa-assoziierter Antigene mittels qualitativer RT-PCR	105
C.3.2	Nachweis OvCa-assoziierter Antigene mittels quantitativer RT-PCR	107
C.3.3	Nachweis OvCa-assoziierter Antigene mittels Westernblot	108
C.3.4	Nachweis OvCa-assoziierter Antigene mittels durchflusszyto-metrischer Analyse	110
C.4	Zusammenfassung und Diskussion zur Charakterisierung von Tumorzellen	112
C.4.1	Bewertung und Vergleich der verwendeten Methoden zur TAA-Analyse auf Tumorzellen	112
C.4.2	Zusammenfassung der Ergebnisse zur TAA-Analyse auf Tumorzellen	113

Verzeichnisse

C.4.3 Vergleich der gemessenen Expressionshäufigkeiten der TAAs mit den Literaturangaben.....	115
D Ergebnisse und Diskussion zum <i>in silico</i> -Ansatz zur Definition neuer T-Zellepitope	118
D.1 Hintergrund und Fragestellung zum <i>in silico</i> -Ansatz.....	118
D.2 Material und Methoden zum <i>in silico</i> -Ansatz	119
D.2.1 Epitopvorhersage.....	119
D.2.2 In vitro priming von T-Zellen	120
D.2.3 Peptid-Validierung	121
D.2.4 Peptid-Prästimulation von PBMCs von OvCa-Patientinnen	121
D.3 Ergebnisse zum <i>in silico</i> -Ansatz	122
D.3.1 L1CAM.....	122
D.3.1.1 Charakteristika verwendeter L1CAM-abgeleiteter Peptide	122
D.3.1.2 Zwei von sieben L1CAM-Peptiden induzieren eine spezifische IFN γ -Antwort in T-Zellen	123
D.3.1.3 L1CAM Peptide LLANAYIYVV und LLLRWQPPL stimulieren T-Zellen mit entsprechend spezifischem TCR	124
D.3.1.4 L1CAM-spezifische T-Zellpopulationen sind polyfunktional.....	126
D.3.1.5 L1CAM-stimulierte T-Zelllinien sind peptispezifisch, aber nur bedingt tumorzellreaktiv.....	128
D.3.1.6 In OvCa-Patientinnen lassen sich LLANAYIYVV/LLLRWQPPL-spezifische Gedächtnis-T-Zellen nachweisen.	130
D.3.2 VEGF	140
D.3.2.1 Charakterisierung ausgewählter VEGF-abgeleiteter Peptide	140
D.3.2.2 Zwei von vier VEGF-Peptiden induzieren eine spezifische in IFN γ Antwort in T-Zellen.....	141
D.3.2.3 VEGF Peptide LLSWVHWSL und FLLSWVHWSL stimulieren T-Zellen mit entsprechend spezifischem TCR	143
D.3.2.4 VEGF-stimulierte T-Zelllinien sind peptispezifisch und die LLSWVHWSL T-Zelllinie auch tumorzellreaktiv	144

Verzeichnisse

D.3.3	Weitere untersuchte Tumorantigene	146
D.3.3.1	Sechs von neun Jagged2-Peptiden induzieren eine spezifische IFN γ -Antwort in T-Zellen	146
D.4.1.1	Zwei von 14 SPAG9-Peptiden induzieren eine spezifische IFN γ -Antwort in T-Zellen	148
D.4.1.2	Vier von 23 CA125-Peptiden induzieren eine spezifische IFN γ -Antwort in T-Zellen	152
D.4	Zusammenfassung und Diskussion zum in silico-Ansatz zur Definition neuer T-Zellepitope	156
D.4.1	Bewertung und Diskussion der Ergebnisse zu L1CAM-abgeleiteten Peptiden	158
D.4.2	Bewertung und Diskussion der Ergebnisse zu VEGF-abgeleiteten Peptiden	159
D.4.3	Bewertung und Diskussion der Ergebnisse zu Jagged2-abgeleiteten Peptiden ..	159
D.4.4	Bewertung und Diskussion der Ergebnisse zu SPAG9-abgeleiteten Peptiden	160
D.4.5	Bewertung und Diskussion der Ergebnisse zu CA125-abgeleiteten Peptiden	160
E	Ergebnisse und Diskussion zur MHC-Liganden-Analyse.....	161
E.1	MHC-Liganden-Analyse von OvCa-Tumoren	161
E.1.1	Hintergrund	161
E.1.2	Eingesetzte Primärgewebe und Ausbeuten der Ligandenaufreinigung.....	162
E.1.3	Ergebnisse der Analyse des Tumors HBL.....	165
E.1.3.1	Quellproteine mit Verbindung zur Tumorgenese.....	167
E.1.3.2	Etablierte Tumorantigene und klinische Zielmoleküle	169
E.1.4	Ergebnisse der Analyse des Tumors ASZ.....	172
E.1.5	Zusammenfassung und Diskussion	174
E.2	Gezielte Suche nach L1CAM- und VEGF-abgeleiteten HLA-Liganden	175
E.2.1	Kalibrierung mit den modifizierten synthetischen Peptiden	175
E.2.2	Suche in der Tumorprobe ASZ	177
E.2.3	Zusammenfassung und Diskussion	180

Verzeichnisse

F	Ausblick.....	182
G	Zusammenfassung.....	185
H	Abkürzungsverzeichnis	187
I	Literaturverzeichnis.....	191
Anhang		
	Ethikanträge.....	221
	Publikationen und Kongressbeiträge.....	224
	Danksagungen.....	225
	Lebenslauf.....	227

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Häufigkeit und Sterblichkeit von OvCa in der deutschen Bevölkerung.	3
Abbildung 2: Intratumorale T-Zellen spielen die zentrale Rolle bei der Überlebensrate von OvCa-Patientinnen (Zhang et al. 2003).....	25
Abbildung 3: Strategie und Verknüpfung der verwendeten Methoden.....	26
Abbildung 4: a) Modifizierung von Lysin mit O-Methyl-Isoharnstoff. b) Strukturformel von (d)NIC. Abbildung nach (Weinzierl 2004).....	58
Abbildung 5: grafischer Ablauf der Isolation von T-Zellen, B-Zellen und DCs aus Vollblut.	62
Abbildung 6: T-Zellstimulation und anschließende funktionelle T-Zell Analysen.	68
Abbildung 7: Zeittafel der T-Zellexperimente	69
Abbildung 8: Reaktionsschema der Edman-Sequenzierung.....	84
Abbildung 9: Schematischer Aufbau des verwendeten Massenspektrometers.	88
Abbildung 10: Nomenklatur von Peptidfragment-Ionen nach Roepstorff und Fohlman und nach Biemann	90
Abbildung 11: Proteolytische Schnittstellen in L1CAM (Fogel et al. 2004)	95
Abbildung 12: Qualitative RT-PCR zur Darstellung der Expression von L1CAM auf OvCa-Zelllinien und OvCa-Primärgeweben.....	106
Abbildung 13: Quantitative RT-PCR zur Darstellung der mRNA-Expression von L1CAM auf OvCa-Zelllinien.....	108
Abbildung 14: Westernblot zur Darstellung der Protein-Expression von L1CAM auf OvCa-Primärgewebe	109
Abbildung 15: Durchflusszytometrische Analyse zur Darstellung der Protein-Expression von HLA-A*02 und L1CAM auf sechs OvCa-Zelllinien.	111
Abbildung 16: Peptidmotiv für HLA-A*02 (Rammensee et al. 1999).....	119
Abbildung 17: Strategie zur Identifizierung neuer T-Zellepitope nach <i>in silico</i> Peptid-Vorhersage.....	120
Abbildung 18: Intrazelluläre IFN γ -Färbung der mit L1CAM Peptiden LLANAYIYVV und LLLRWQPPL stimulierten T-Zellen.	124
Abbildung 19: Tetramer Färbung der mit L1CAM Peptiden LLANAYIYVV und LLLRWQPPL stimulierten T-Zellen.....	125
Abbildung 20: Zytokin-Färbung der mit den L1CAM Peptiden LLANAYIYVV und LLLRWQPPL stimulierten T-Zellen	127
Abbildung 21: Zytotoxizitätstest mit L1CAM spezifischen T-Zellen.....	129
Abbildung 22: Prästimulation führt nicht zu <i>in vitro</i> Aktivierung CMV- oder L1CAM-spezifischer T-Zellen.	132

Verzeichnisse

Abbildung 23: PBMCs von OvCa-Patientinnen können L1CAM-spezifische Gedächtnis-T-Zellen enthalten.....	136
Abbildung 24: Prästimulierte PBMCs der OvCa-Patientin KBR zeigen eine TCR-Deregulation, aber keine Peptid-induzierte Zytokinproduktion.....	139
Abbildung 25: Intrazelluläre IFN γ -Färbung der mit VEGF Peptiden LLSWVHWSL und FLLSWVHWSL stimulierten T-Zellen.....	142
Abbildung 26: Tetramer-Färbung der mit dem VEGF-Peptid FLLSWVHWSL-stimulierten T-Zellen.....	143
Abbildung 27: Zytotoxizitätstest mit VEGF-spezifischen zytotoxischen T-Zellen.....	145
Abbildung 28: Intrazelluläre IFN γ -Färbung der mit Jagged2-abgeleiteten Peptiden stimulierten T-Zellen.....	148
Abbildung 29: Intrazelluläre IFN γ -Färbung der mit SPAG9 abgeleiteten Peptiden stimulierten T-Zellen.....	150
Abbildung 30: Zytotoxizitätstest mit SPAG9-spezifischen zytotoxischen T-Zellen.....	151
Abbildung 31: Intrazelluläre IFN γ -Färbungen der mit CA125-abgeleiteten Peptiden stimulierten T-Zellen.....	154
Abbildung 32: Zytotoxizitätstest mit CA125 spezifischen zytotoxischen T-Zellen.....	155
Abbildung 33: Übersicht über die Menge an Proben und die erzielten Ergebnisse.....	161
Abbildung 34: Prozentuale Verteilung der Quellproteine.....	174
Abbildung 35: Massenspuren der Peptide nach angepasster Konzentration.....	176
Abbildung 36: Unterschiedliche Modifizierung von Peptiden mit Nic und dNic.....	177
Abbildung 37: Spektren des gemischten LC-MS Laufes.....	179

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Häufigkeit und 5-Jahres-Überlebensrate in Bezug auf das Stadium bei Erstdiagnose	4
Tabelle 2: Polymorphismus der humanen MHC-Gene.....	9
Tabelle 3: Einteilung der TAAs mit Beispielen	13
Tabelle 4: Vakzinierungsstrategien	19
Tabelle 5: OvCa-assoziierte Antigene. Blau unterlegt Antigene, die in dieser Arbeit näher untersucht wurden.....	24
Tabelle 6: Andere Zelllinien.....	31
Tabelle 7: OvCa-Zelllinien	32
Tabelle 8: gesunde Blutspender.....	33
Tabelle 9: primäres Ovarialtumorgewebe	35
Tabelle 10: PBMCs von OvCa-Patientinnen	36
Tabelle 11: Peptide	37
Tabelle 12: spezifische Primer (MWG-Biotech)	40
Tabelle 13: spezifische Primer und Sonden (MWG-Biotech).....	42
Tabelle 14: SDS-Gellösungen.....	47
Tabelle 15: Erst-Antikörper (anti-human)	48
Tabelle 16: Zweit-Antikörper, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase.....	48
Tabelle 17: Zur Kopplung verwendete Antikörper	54
Tabelle 18: Zeitlicher Ablauf der B-Zell-Kokultivierung in der Übersicht.	65
Tabelle 19:..Erst-Antikörper.....	74
Tabelle 20: .Zweit- Antikörper	74
Tabelle 21: FITC-Reporterpeptid, positiv- und Negativkontrolle und Testpeptide.....	75
Tabelle 22:..Antikörper für IFN γ Färbung	78
Tabelle 23: Monoklonale Antikörper zur funktionellen Charakterisierung:	80
Tabelle 24: Verwendete Tetramere.....	80
Tabelle 25: Massen der proteinogenen Aminosäuren sowie deren Immonium-Ionen.	91
Tabelle 26: OvCa-Zelllinien	103
Tabelle 27: OvCa-Primärgewebe	104
Tabelle 28: Zusammenfassung der verschiedenen Testmethoden und Darstellung aller getesteten Expressionsprofile der OvCa-Zelllinien und OvCa-Primärgewebe.....	114
Tabelle 29: Expressionshäufigkeiten.....	116
Tabelle 30: PBMCs von OvCa-Patientinnen	122

Verzeichnisse

Tabelle 31: Auflistung der von L1CAM abgeleiteten Peptide mit SYFPHEITI-Score und Bindungsaffinität.....	123
Tabelle 32: Auflistung der von VEGF abgeleiteten Peptide mit SYFPHEITI-Score und Bindungsaffinität.....	140
Tabelle 33: Auflistung der von Jagged2-abgeleiteten Peptide mit SYFPHEITI-Score.....	147
Tabelle 34: Auflistung der von SPAG9-abgeleiteten Peptide mit SYFPHEITI-Score.....	149
Tabelle 35: Auflistung der von CA125-abgeleiteten Peptide mit SYFPHEITI-Score.....	153
Tabelle 36: Übersicht über alle Peptide, die eine IFN γ T-Zellantwort induzieren konnten und ihre weitere Validierung.....	157
Tabelle 37: Zur MHC-Ligandenaufreinigung verwendete Tumore.....	163
Tabelle 38: Durch Edman-Abbau ermittelte Ausbeuten der MHC-Moleküle nach MHC-Ligandenaufreinigung.....	164
Tabelle 39: Identifizierte HLA-Liganden aus der HBL-Tumorprobe.....	166
Tabelle 40: Identifizierte HLA-Sequenzen aus der ASZ-Tumorprobe.....	172
Tabelle 41: Retentionszeiten und Intensitäten der mit dNIC modifizierten Peptide.....	175

A Einleitung

Die folgende Einleitung soll systematisch und umfassend in das Thema der Arbeit – Identifizierung neuer T-Zellepitope als Grundlage für eine Peptid-basierte Immuntherapie für Ovarialkarzinom (OvCa)-Patientinnen einführen. Im ersten Teil wird eine allgemeine Einführung in die Epidemiologie und Therapie des OvCas gegeben. Daran schließt sich ein Kapitel an, in dem die zum Verständnis dieser Arbeit notwendigen Grundlagen des Immunsystems vermittelt werden. Zum Schluss werden die ersten beiden Teile in Kontext zueinander gesetzt und allgemeine und OvCa-spezifische Informationen zur Immuntherapie gegeben.

A.1 Epidemiologie und Therapie des OvCas

A.1.1 Risiko

Das Risiko, an epithelalem OvCa zu erkranken, scheint mit langjährigen hormonellen Einflüssen in Zusammenhang zu stehen. Eine frühe erste Regelblutung und ein spätes Einsetzen der Wechseljahre, Kinderlosigkeit oder fehlende Stillzeiten wirken sich ungünstig aus. Hormonelle Ovulationshemmer (Pille) schützen vor OvCa (Beral et al. 2008), Kombinationspräparate mit Östrogenen und Gestagenen steigern allerdings geringfügig das Brustkrebsrisiko. In verschiedenen Studien konnten genetische Prädispositionen nachgewiesen werden, die in erster Linie Gene des Hormonstoffwechsels, DNA-Reparaturmechanismen oder aber Zellzykluskontrollgene betreffen (Pearce et al. 2009). Ein erhöhtes Risiko für OvCa tragen Frauen, deren Verwandte ersten Grades an Brust- oder OvCa erkrankt sind, sowie Frauen, die selbst bereits an Brust-, Gebärmutterkörper- oder Darmkrebs erkrankt sind.

A.1.2 Diagnose

Da die Erkrankung lange Zeit keine Symptomatik zeigt, erfolgt eine Diagnose meist erst in einem fortgeschrittenen Stadium. Für eine verlässliche Diagnosestellung in einem frühen oder gar prämaligen Stadium gibt es derzeit noch keine Standardverfahren (Rosenthal and Jacobs 1998). Somit befinden sich über 70 % der Patientinnen bei Diagnosestellung bereits in einem fortgeschrittenen Stadium (Stadium II-IV, siehe Tab. 1). Da die Diagnose in einem fortgeschrittenen Stadium maßgeblich für die hohe Letalitätsrate verantwortlich ist, wird intensiv nach Methoden für eine Früherkennung gesucht. Der Nachweis des Markers CA125

A Einleitung

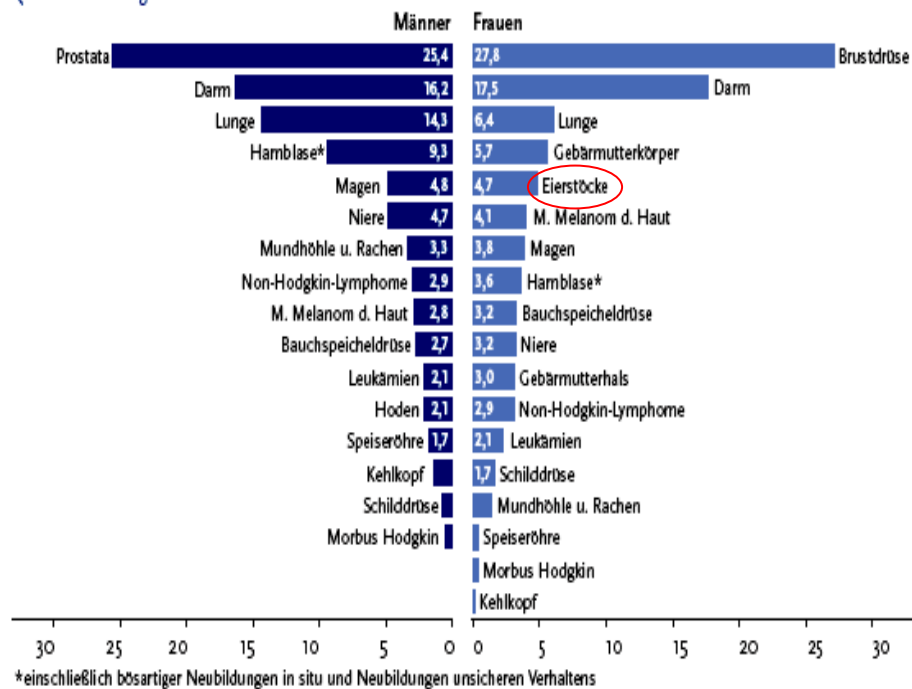
wird seit einiger Zeit zusammen mit Bildgebungsverfahren, wie dem Ultraschall zur Früherkennung, diskutiert (Jacobs et al. 1999). CA125 alleine bietet jedoch nicht genug Spezifität und Sensitivität, da der Marker zwar in über 80 % der Fälle mit Stadium II-IV, aber nur in 50 % der Fälle mit Stadium I und sogar bei 4 % gesunder Frauen erhöht ist (van Haaften-Day et al. 2001). Die Kombination beider Maßnahmen ist für die Früherkennung zwar geeigneter, jedoch nicht ideal. Somit wird intensiv nach weiteren Tumormarkern gesucht. Als hoffnungsvolle Kandidaten werden derzeit die Tumor-assoziierten Antigene (TAAs) SPAG9 (Garg et al. 2007) und Mesothelin (Hassan and Ho 2008) diskutiert.

A.1.3 Prognose

Laut Schätzungen des Robert Koch-Institutes wird jährlich bei etwa 10.000 Frauen in Deutschland ein OvCa diagnostiziert (RKI 2008). Der Anteil an allen Tumorneubildungen bei Frauen ist zwar mit 4,7 % gering im Vergleich zum Mammakarzinom mit 27,8 %, jedoch ist der Anteil der Sterblichkeit mit 5,6% aller Krebssterbefälle von Frauen pro Jahr vergleichsweise hoch (Abb. 1 a) und b)).

a) Häufigkeit

Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen ohne nicht-melanotischen Hautkrebs in Deutschland 2004
Quelle: Schätzung der Dachdokumentation Krebs im Robert Koch-Institut



b) Sterblichkeit

Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2004
 Quelle: Amtliche Todesursachenstatistik, Statistisches Bundesamt, Wiesbaden

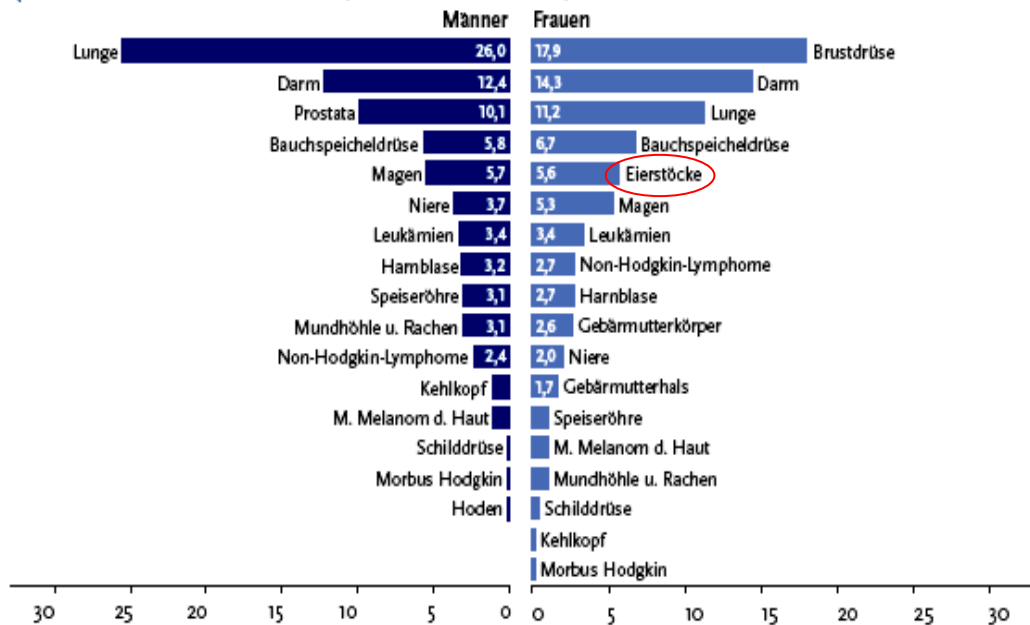


Abbildung 1: Häufigkeit und Sterblichkeit von OvCa in der deutschen Bevölkerung.

a) Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen ohne nicht-melanotischen Hautkrebs in Deutschland 2004; b) Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2004; Quelle: RKI & Statistisches Bundesamt, Wiesbaden.

Das durchschnittliche Alter bei Ersterkrankung liegt zwischen 67 und 68 Jahren, jedoch treten 10 % der Erkrankungen auch vor einem Alter von 45 Jahren auf. Tumorzellen können sich aus dem Oberflächenepithel des Ovars, aus dem Gonadenstroma oder aus den Keimzellen bilden (Friedlander 1998). Etwa 90 % der OvCa stammen von Oberflächenepithelien ab, weshalb auch die meisten in dieser Arbeit untersuchten primären Tumorproben diesen pathologischen Befund tragen. Heilungschancen für Patientinnen mit OvCa im Frühstadium (Stadium I), das sich nur auf die Eierstöcke beschränkt, sind relativ groß. So überleben ca. 80 % der Patientinnen durch operatives Entfernen der Eierstöcke 5 Jahre nach Diagnosestellung. Die Prognose für das fortgeschrittene OvCa ist jedoch schlecht, mit 5-Jahres-Überlebensraten, die schnell sinken, wenn das Karzinom in die Peritonealhöhle (Stadium III) und darüber hinaus (Stadium IV) gestreut hat. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die Häufigkeit und die 5-Jahres-Überlebensraten in Bezug auf das Stadium bei Erstdiagnose (Schmidt-Matthiesen 2000).

A Einleitung

Tabelle 1: Häufigkeit und 5-Jahres-Überlebensrate in Bezug auf das Stadium bei Erstdiagnose

Stadium	Ausbreitung	5-Jahres-Überlebensrate	Häufigkeit bei Erstdiagnose
I	Ovar	79 %	27,7 %
II	Ausbreitung im kleinen Becken	61 %	11,0 %
III	Ausbreitung über Beckengrenzen hinaus	23 %	44,7 %
IV	Fernmetastasen	14 %	16,6 %

A.1.4 Therapie

Die Standardtherapie des OvCas setzt sich aus zwei Säulen - der radikalen Operation mit optimalem Tumordebulking und einer sich anschließenden platinhaltigen Chemotherapie – zusammen (Bristow et al. 2002; Lichtenegger et al. 1998). Oftmals bilden die Tumore jedoch Resistenzen, so dass Tumorstadium und Metastasierung voranschreiten (Markman et al. 2004). Bei der Rezidivbehandlung sind die Möglichkeiten begrenzt und die Erfolgsaussichten sehr gering.

A.1.5 Operative Therapie

Die Prognose der Patientinnen wird maßgeblich durch den postoperativ verbleibenden Tumorrest bestimmt. Ziel der Operation soll es deshalb sein, eine maximale Zytoreduktion ohne makroskopisch erkennbaren Resttumor zu erreichen, da dies mit dem längsten rezidivfreien- und Gesamtüberleben assoziiert ist (Bristow et al. 2002). Das primär operative Vorgehen beim OvCa ist auch in diagnostischer Hinsicht, im Sinne einer „Staging-OP“, bedeutend.

Lediglich Low Risk Patientinnen mit einem Tumorstadium FIGO Ia, Grading 1 profitieren, auf Grund ihres geringen Rezidivrisikos (5-Jahres-Überlebensrate > 90%), nicht von einer derartigen Therapie (Thigpen 1999). Es kann hier ein fertilitätserhaltendes operatives Vorgehen erwogen und auf eine adjuvante Chemotherapie verzichtet werden. Nach abgeschlossener Familienplanung sollte die Operation jedoch komplettiert werden.

A.1.6 Primäre Chemotherapie

Eine adjuvante Chemotherapie nach sorgfältigem operativen Staging ist therapeutischer Standard. Schon Patientinnen im Frühstadium FIGO I-II, unter Berücksichtigung der oben genannten Ausnahme, profitieren von einer platinhaltigen adjuvanten Chemotherapie (Colombo et al. 2003; Trimbos et al. 2003).

So wird nach den Leitlinien der deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe 2007 für die Stadien I-II, außer Stadium IA, Grading 1 eine platinhaltige Chemotherapie mit 3-6 Zyklen empfohlen. Diese verlängert sowohl das rezidivfreie Intervall, als auch die Gesamtüberlebenszeit (Trimbos et al. 2003).

Beim fortgeschrittenen OvCa Stadium IIb-IV hat sich die postoperative systemische platinhaltige Chemotherapie in Kombination mit einem Taxan etabliert. Derzeitiger Goldstandard ist die Gabe von sechs Zyklen Carboplatin (AUC 5) und Paclitaxel (175 mg/m² über 3h i.v.) im Abstand von jeweils drei Wochen, da diverse Studien gezeigt haben, dass dies die effektivste Therapie mit dem geringsten Nebenwirkungsprofil ist (du Bois A. et al. 2003; Ozols et al. 2003). Versuche eine wirksamere Tripelchemotherapie zu etablieren schlugen bisher fehl (du Bois A. et al. 2006; Kristensen et al. 2003; Pfisterer et al. 2006).

Ein anderer, vielfach untersuchter Ansatz ist die neoadjuvante, platinhaltige Chemotherapie mit nachfolgendem Tumorebulking. Die Datenlage ist bisher jedoch widersprüchlich (Bristow and Chi 2006; Bristow et al. 2007; Kuhn et al. 2001; Schwartz 2009), so dass diese Therapieoption noch nicht als Standardregime empfohlen werden kann. Weitere Untersuchungen im Rahmen von klinischen Studien sind nötig (Park and Kuhn 2004), um die Patientinnengruppe zu ermitteln, die von einer derartigen Therapie profitiert.

A.1.7 Therapie des OvCa-Rezidivs

operative Therapie

Die Durchführung einer Rezidivoperation ist nach wie vor ein kontrovers diskutiertes Thema. In retrospektiv durchgeführten Studien zeichnet sich jedoch ein Überlebensvorteil für ein selektiertes Patientenkollektiv ab (Deutsche Gesellschaft f. G&G). Patientinnen bei denen eine makroskopische Tumorfreiheit erreicht werden kann, profitieren am meisten bezüglich des Gesamtüberlebens (Tebes et al. 2007). Aus diesem Grund müssen in Zukunft prädiktive Faktoren evaluiert werden, um die Patientinnen, bei denen eine optimale Zytoreduktion möglich ist, der entsprechenden Therapie zuzuführen und die Anzahl der ineffektiven Operationen zu minimieren (Gungor et al. 2005).

Es müssen in Zukunft prospektive Studien durchgeführt werden, um all dies zu bestätigen und die Frage zu beantworten, ob die Rezidivoperation wirklich einen höheren Überlebensvorteil bietet als eine erneute, nicht-invasive Chemotherapie (Munkarah and Coleman 2004).

Chemotherapie

Das OvCa ist einer der chemosensibelsten soliden Tumoren. Dennoch wird ein Großteil der Patientinnen mit fortgeschrittenem OvCa ein Rezidiv erleiden (Markman and Bookman 2000). Um die geeignete second-line-Therapie auszuwählen, müssen Art und Erfolg der primären Chemotherapie berücksichtigt werden. Man unterscheidet hierbei das platinsensible OvCa, bei dem das rezidivfreie Intervall mindestens 6 Monate beträgt, vom platinrefraktären OvCa, bei dem es entsprechend schon nach weniger als 6 Monaten nach Therapieende zum Progress kommt.

Patientinnen mit chemosensiblen OvCa werden zu einem großen Prozentsatz wieder auf eine platinhaltige Therapie ansprechen. Je länger das progressfreie Intervall, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit der erneuten Remissionsinduktion (Markman et al. 1991). Die platinhaltige Kombinationstherapie hat sich gegenüber der platinhaltigen Monotherapie als effektiver erwiesen. So wird in diesem Fall ein Therapieregime mit Carboplatin/Paclitaxel oder Carboplatin/Gemcitabine empfohlen. Bei Platinallergie kann pegyliertes, liposomales Doxorubicin eingesetzt werden, gegebenenfalls in Kombination mit Trabectedin (Leitlinie maligne Ovarialtumore Deutsche Gesellschaft f. G&G).

20% der Tumore sind primär platinresistent, häufiger handelt es sich jedoch um erworbene Resistenzen (Markman and Bookman 2000). Patientinnen mit einem platinrefraktärem OvCa profitieren nicht von einer erneuten platinhaltigen Therapie. In randomisierten Studien wurde die höchste Effektivität für eine Monotherapie mit Topotecan, pegyliertem, liposomalem Doxorubicin, Gemcitabine und Paclitaxel bei nicht mit einem Taxan vorbehandelten Patientinnen nachgewiesen. Eine Kombinationstherapie bietet bisher keinen Vorteil gegenüber einer Monotherapie (Leitlinie maligne Ovarialtumore Deutsche Gesellschaft f. G&G). Ziel der sekundären Chemotherapie soll die Optimierung der Lebensqualität sein.

A.1.8 Neue Therapieansätze

Aufgrund der hohen Rezidivraten von 70-80% und der häufigen Entwicklung einer Platinresistenz beim OvCa, wird massiv nach alternativen Therapiemöglichkeiten geforscht. Besondere Aufmerksamkeit kommt dabei den „targeted therapies“ zu, Wirkstoffen, die spezifisch in das Tumorstadium eingreifen und so die Effektivität und das Nebenwirkungsprofil der Behandlung verbessern sollen. In Studien werden zurzeit v.a. die drei folgenden Wirkstoffgruppen untersucht:

- Angiogeneseinhibitoren
- EGFR-Inhibitoren
- Multikinase-Inhibitoren

Sie werden innerhalb von Studien sowohl in der Primär-, als auch in der Rezidivtherapie getestet, als Monotherapeutika und auch in Kombination mit verschiedenen etablierten Chemotherapeutika. Bisher konnte jedoch nur selten ein klinisches Ansprechen beobachtet werden (Han et al. 2009). Am erfolgversprechendsten in der Therapie des OvCa scheint Bevacizumab, ein monoklonaler Antikörper gegen VEGF-A. Dieser verhindert die Neoangiogenese, die entscheidend zum Tumorwachstum beiträgt. Als Monotherapeutikum beim Ovarialkarzinomrezidiv konnte bei 42% der mit Bevacizumab behandelten Patientinnen ein progressionsfreies Intervall von mindestens 6 Monaten verzeichnet werden. Es laufen aktuell mehrere Phase-III-Studien, die den Nutzen von Bevacizumab auch in der adjuvanten Therapie, in Kombination mit verschiedenen Chemotherapeutika untersuchen soll (Han et al. 2009; Martin and Schilder 2007).

A.2 Das Immunsystem

A.2.1 Aufbau des Immunsystems

Durch den ständigen Kontakt und stofflichen Austausch mit seiner Umwelt muss sich der menschliche Organismus vor schädlichen Stoffen und Krankheitserregern schützen. Diese Aufgabe übernimmt das Immunsystem, in dem zelluläre und humorale Anteile zusammenwirken, um „Eigen“ und „Fremd“ zu unterscheiden und das als „Fremd“ erkannte abzuwehren.

Außerdem lässt sich das Immunsystem in einen angeborenen und einen adaptiven (= erworbenen) Teil unterteilen, wobei sich beide aus zellulären und humoralen Bestandteilen zusammensetzen. Das angeborene Immunsystem ist die Grundausstattung, die dem menschlichen Körper von Geburt an mitgegeben ist. Es erkennt schnell allgemeine pathogene Strukturen, meist ganze Gruppen von Antigenen, wirkt also eher Muster-spezifisch, und es kommt zu keiner Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses. Zu diesem Teil des Immunsystems gehören unter anderem phagozytische Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sowie Teile des Komplementsystems.

Das erworbene oder auch adaptive Immunsystem besitzt eine hohe Spezifität und kann ein sogenanntes "immunologisches Gedächtnis" ausbilden. Die Vielfalt der adaptiven Immunantwort und ihre selektive Wirkung gehen auf das Prinzip der klonalen Selektion zurück. Diesem Teil des Immunsystems ist es möglich, sich an verschiedene Antigene anzupassen. Dies geschieht durch spezifische Rezeptoren, die Reifung der Zellen und die Rekombination von antigenerkennenden Oberflächenmolekülen, wie z.B. des T-Zellrezeptors. Im Falle eines wiederholten Kontaktes mit demselben Antigen ermöglicht dies dem Organismus eine schnellere Reaktion und so einen verbesserten Schutz. Das adaptive

Immunsystem lässt sich weiter in die Teile der humoralen und der zellulären Immunantwort untergliedern. Die Hauptakteure des humoralen Immunsystems sind die B-Lymphozyten, die Antikörper sezernieren, welche über das Serum weitergegeben werden können.

A.2.2 T-Zellen

Zu den Hauptvertretern des zellulären adaptiven Immunsystems zählen einige antigenpräsentierende Zellen (APC) wie Makrophagen, Dendritische Zellen (DCs) und die T-Lymphozyten. T-Zellen werden weiter unterteilt in T-Helferzellen (T_H1 , T_H2 und T_H17) und zytotoxische Killerzellen (*cytotoxic T lymphocytes*, CTLs). Die T-Helferzellen haben eine Vermittlerrolle im Immunsystem und erkennen neben extrazellulären auch vaskuläre und intrazelluläre Antigene. Durch diese Erkennung von Antigenen auf APC werden sie dazu angeregt, wiederum andere Zellen zu aktivieren, indem sie beispielsweise entsprechende Zytokine ausschütten. Die T_H1 -Zellen aktivieren vor allem Makrophagen, CTLs, B-Zellen und andere zelluläre Teile des Immunsystems. T_H2 -Zellen aktivieren vor allem B-Zellen und stellen so eine Verbindung zur humoralen Immunantwort des adaptiven Immunsystems dar. CTLs dagegen sind in der Lage, Antigene zu erkennen, die zytosolischen bzw. intrazellulären Ursprungs sind. Daher ist es diesen T-Zellen möglich, körperfremde Proteine wie virale und Tumorantigene aus dem Zytosol aufzuspüren und die Zielzelle dann zu lysieren. Durch das Phänomen der *Cross Presentation*, (auf welches hier nicht eingegangen werden soll) können den CTLs auch extrazelluläre Antigene präsentiert werden. Diese Zellen sind weiter in der Lage, Zytokine zu sekretieren, die sich auf andere Komponenten des Immunsystems auswirken.

A.2.3 MHC-Moleküle

Die Erkennung von zytosolischen bzw. intrazellulären Antigenen durch CTLs basiert auf der Präsentation von Peptiden auf der Zelloberfläche der APCs und deren Erkennung durch den hochvariablen T-Zellrezeptor auf der Zelloberfläche der T-Zellen (Davis et al. 1998). Die präsentierten Peptide sind durch komplexe Vorgänge der Antigenprozessierung aus Proteinen entstanden. Die Moleküle, auf denen diese Peptide präsentiert werden, sind im MHC (*Major Histocompatibility Complex*) Gencluster kodiert. Der polygene und extrem polymorphe MHC liegt beim Menschen auf Chromosom 6 (bei der Maus auf Chromosom 17). In der Bevölkerung gibt es viele verschiedene Allele für die meisten der einzelnen Genloki, wie Tabelle 2 zeigt. Der Polymorphismus des MHC ist der am stärksten ausgeprägte des menschlichen Genoms überhaupt. Dies führt dazu, dass sich die MHC-Allele zwischen einzelnen Individuen unterscheiden und somit als körpereigene Antigene

A Einleitung

bezeichnet werden können. Da diese Eigenschaft zunächst bei humanen Leukozyten entdeckt wurde, werden die MHC-Moleküle auch als HLA-Moleküle bezeichnet (*Human leukocyte antigen*). Der MHC spielt auch eine zentrale Rolle bei der Transplantatabstoßung, weshalb man auf ihn aufmerksam wurde (Davis et al. 1998; SNELL 1964).

Tabelle 2: Polymorphismus der humanen MHC-Gene.

Locus	MHC Klasse I			MHC Klasse II					
	A	B	C	DP α	DP β	DQ α	DQ β	DR α	DR β
Anzahl der Allele	965	1,543	626	28	138	35	107	3	855

Tabelle nach (Holdsworth et al. 2009)

Die MHC-Moleküle werden in zwei Klassen unterteilt: MHC-(Klasse)-I-Moleküle und MHC-(Klasse)-II-Moleküle. Die Unterteilung beruht auf strukturellen Unterschieden sowie der unterschiedlichen Herkunft der Peptide auf den Zelltypen, von denen sie erkannt und exprimiert werden. So werden MHC-I-Moleküle von CTLs und MHC-II-Moleküle von T_H-Zellen erkannt.

Die Expression von MHC-II-Molekülen ist auf die APCs beschränkt. Peptide, die auf MHC-II-Molekülen binden, sind in ihrer Länge sehr variabel, jedoch mindestens 13 Aminosäuren lang und stammen von Proteinen, die von den APCs durch Endozytose aufgenommen wurden. In dieser Arbeit wird vorrangig von MHC-I-Molekülen die Rede sein, weshalb auf die weitere Struktur und Funktion von MHC-II-Molekülen nicht weiter eingegangen wird.

MHC-I-Moleküle werden von nahezu allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert. Peptide, die auf MHC-I-Molekülen binden, stammen von endogenen Proteinen ab. Das MHC-I-Molekül gibt somit Auskunft über den aktuellen Proteinbestand einer Zelle. Endogene Proteine werden im Proteasom in Fragmente von 5-20 Aminosäuren zerlegt. Einige dieser Peptide gelangen in das endoplasmatische Retikulum (ER) und werden dort mit Hilfe der TAP-Transporter (TAP, *transporter associated with antigen processing*) auf das MHC-I-Molekül geladen und an die Zelloberfläche gebracht (Williams et al. 2002). Auch virale Proteine und Tumor-assoziierte Proteine werden so über das MHC-I-Molekül an CTLs präsentiert.

Hierbei haben die verschiedenen MHC-Moleküle bevorzugte Peptidmotive (Falk et al. 1991; Rammensee et al. 1993), die sich aus der speziellen Struktur der MHC-Moleküle ergeben. MHC-Moleküle sind Heterodimere, die sich aus einer schweren (Domänen $\alpha 1$ - $\alpha 3$) und einer leichten Kette ($\beta 2m$) zusammensetzen. Die schwere Kette bildet mit zwei ihrer drei Domänen ($\alpha 1$ und $\alpha 2$) eine Furche, in der die Peptide meist in gestreckter Konformation (Madden et al. 1993) liegen. C- und N-Terminus des Peptids werden über invariante

Positionen der Bindungsfurche gehalten (Bouvier and Wiley 1994), die Seitenketten dagegen interagieren mit Bindungstaschen innerhalb der Furche. Diese hochpolymorphen Taschen, die durch mehrere spezifische Aminosäuren gebildet werden (Falk et al. 1991; Saper et al. 1991), binden die sogenannten "Ankerreste" der Peptide. Als Ankerreste werden kleine Gruppen von nahe verwandten Aminosäuren bezeichnet, die an der gleichen Position im Peptidliganden eines MHC-Allels auftreten. Sie bilden die Grundlage für die große Variabilität der verschiedenen MHC-I-Allele und der dazu passenden Peptidliganden (Rammensee et al. 1993). So ergibt sich aus den Taschen jedes Allels und den Ankerresten seiner Liganden ein spezifisches Peptidmotiv, aufgrund dessen eine Vorhersage von MHC-I-Liganden möglich wird (Parker et al. 1994). Die Vorhersage von Peptidmotiven kann mit Hilfe eines Programms wie z.B. SYFPEITHI erfolgen, welches einen Liganden anhand seiner wahrscheinlichen Bindungseigenschaften auf ein bestimmtes MHC-Klasse-I-Molekül bewertet (Rammensee et al. 1999).

A.2.4 Der T-Zellrezeptor

Wie bereits erwähnt, benötigt das adaptive Immunsystem zur Erkennung von Antigenen nicht nur auf MHC-Molekülen präsentierte Peptide sondern auch den T-Zellrezeptor (*TCR*, *T cell receptor*). Die Gruppe der T-Lymphozyten lässt sich anhand ihres TCRs in zwei Untergruppen gliedern, die $\alpha\beta$ und die $\gamma\delta$ T-Zellen. Letztere stellen die kleinere Untergruppe dar, die Antigene direkt und nicht über Peptide auf MHC-Molekülen erkennen. In dieser Arbeit soll aber der Schwerpunkt auf $\alpha\beta$ T-Zellen und der MHC-Peptid-TCR-Interaktion liegen. Wenn also im weiteren Verlauf die Rede von T-Zellen ist, sind immer $\alpha\beta$ T-Zellen gemeint. Der $\alpha\beta$ TCR ist wie das MHC-Molekül ein heterodimeres Glykoprotein, das strukturelle Ähnlichkeit zu membranständigen Fab-Fragmenten eines Antikörpers besitzt (Garboczi et al. 1996). Die Homologie des TCR zu Immunglobulinen zeigt sich hier durch das Vorhandensein zweier konstanter ($C\alpha$ / $C\beta$) und zweier variabler ($V\alpha$ / $V\beta$) Regionen. Die Interaktion des TCR mit dem MHC-Peptid-Komplex kommt durch letztere zustande, weshalb in dieser Region die große Variabilität vorliegt. Die V-Regionen von $V\alpha$ werden auf genomischer Ebene durch V-/ J-Elemente (V = variable; J = joining) kodiert. Bei $V\beta$ werden diese V- und J-Elemente durch ein Drittes, das D-Element (D = diversity) voneinander getrennt (Rowen et al. 1996). Diese Segmente werden auf genetischer Ebene durch Umlagerung, die absichtlich ungenau abläuft, miteinander verbunden. Auch bei diesem Rearrangieren ist eine starke Homologie zu der Antikörpersynthese von B-Zellen zu erkennen. Neben der Tatsache, dass es mehrere verschiedene V-, D- und J-Elemente gibt, trägt die ungenaue Verknüpfung dieser Segmente entscheidend zu der großen Gesamtdiversität von etwa 10^{18} des TCR bei.

A.2.5 Korezeptoren

Der TCR ist mit weiteren Molekülen an der Zelloberfläche assoziiert. Dabei sind neben dem CD3-Komplex, der vor allem an der Signaltransduktion sowie Oberflächenexpression des TCRs beteiligt ist, vor allem die Korezeptoren CD4 bei T-Helferzellen und CD8 bei CTLs zu erwähnen (Janeway, Jr. 1992). Hierbei interagiert CD4 mit MHC-II-Molekülen, und CD8+ T-Zellen erkennen MHC-I-Peptid-Komplexe auf der Zelloberfläche und erhöhen damit die Bindungsstärke des jeweiligen Komplexes bis zu einem Faktor von 100.

A.2.6 Entwicklung und Selektion der T-Zellen

Welche T-Zellen nun CD4 und welche CD8 exprimieren, wird während der Reifung der T-Zellen im Thymus entschieden. Dort findet nach der Rekombination des TCR die positive und negative Selektion statt. Diese Vorgänge gewährleisten die Erkennung der MHC-Moleküle durch die TCRs (positive Selektion) sowie die Eliminierung selbst-reaktiver T-Zellen (negative Selektion). Schätzungen zufolge überleben lediglich etwa zwei Prozent aller Thymozyten die Selektionsvorgänge. Die Zellen exprimieren fortan nur noch einen der beiden Korezeptoren und verlassen den Thymus nach etwa drei Wochen als reife, naive T-Zellen (Shortman et al. 1990; Surh and Sprent 1994).

Nach dem Verlassen des Thymus zirkulieren die naiven T-Zellen durch das Blut- und Lymphsystem, während in geringem Umfang auch eine Teilung naiver T-Zellen stattfindet. Diese Homöostase gewährleistet, dass nicht zu viele T-Zellen erhalten bleiben, jedoch ein ausreichend diverser Pool an naiven T-Zellen am Leben gehalten wird bleibt. Hierzu müssen entsprechende Signale die homöostatische Proliferation der T-Zellen regulieren. Es hat sich gezeigt, dass sowohl Zytokine als auch TCR-Signale die Homöostase der T-Zellen beeinflussen. So benötigen naive T-Zellen zum Überleben in der Peripherie die MHC-Selbstpeptid-TCR Wechselwirkung. (Kirberg et al. 1997; Nesic and Vukmanovic 1998; Rooke et al. 1997; Tanchot et al. 1997; Witherden et al. 2000).

Gleichzeitig inhibieren monoklonale naive T-Zellen die Proliferation von T-Zellen gleicher Spezifität, während transgene naive T-Zellen unterschiedlicher Spezifität sich gegenseitig nicht beeinflussen (Troy and Shen 2003), was eine übermäßige Vermehrung einzelner T-Zellspezifitäten unterbindet und somit die Vielfalt der TCR-Spezifität garantiert. Die Größe der gesamten polyklonalen T-Zellpopulationen wird wahrscheinlich über Zytokine reguliert. Naive T-Zellen exprimieren große Mengen an Interleukin-7-Rezeptor (IL-7R). Experimente mit blockierenden IL-7- und IL-7R-Antikörpern zeigten, dass IL-7 ein limitierender Faktor der homöostatischen Proliferation naiver T-Zellen ist (Schluns et al. 2000).

A.2.7 Aktivierung der T-Zellen

Bei ihrer Zirkulation durch das Blut und die peripheren Lymphorgane treffen die naiven T-Zellen nun auf von professionellen APCs präsentierte Peptide (1. Signal). Als professionelle APCs bezeichnet man solche Zellen, die neben dem Antigenkontakt auch kostimulatorische Signale (z.B. über CD80 oder CD86) vermitteln. Dieser Vorgang wird als „*priming*“ von T-Lymphozyten bezeichnet (im Folgenden als Aktivierung bezeichnet) (Lenschow et al. 1996). Die so präsentierten körperfremden Antigene wurden zuvor von den APCs aufgenommen und in die peripheren Lymphorgane transportiert (Banchereau and Steinman 1998). Die kostimulatorischen Signale durch die APCs sind von entscheidender Bedeutung, da es durch das Fehlen des 2. Signals meist zur Anergie (Reaktivitätsverlust) oder zum Tod der naiven T-Zellen kommt (Guerder et al. 1994). Die erfolgreich aktivierten T-Zellen beginnen mit der Proliferation und Differenzierung zu Effektor- und Gedächtnis-Zellen. Hierbei produzieren die T-Zellen autokrin wirkendes Interleukin-2 (IL-2), wodurch eine erhöhte Expression des IL-2-Rezeptors angeregt wird. So wird die Zelle über mehrere Tage hinweg zu zwei bis drei Zellteilungen pro Tag angeregt. Unterstützt wird die Aktivierung von T-Zellen durch Zytokine (z.B. IL-1 und IL-6), die von den APCs freigesetzt werden, aber auch durch Zell-Zellkontakt mit aktivierten CD4⁺-T-Zellen.

Effektorzellen sind nun in der Lage, ohne weitere Kostimulation bei Antigenerkennung Effektorfunktionen auf eine Zielzelle auszuüben. Die wohl wichtigste Effektorfunktion von CTLs ist die Lyse von Zielzellen, die durch das Ausschütten von Zytotoxinen, wie Perforin und Granzym, und die FasL-induzierte Apoptose erfolgt (Henkart 1994). Die Zytotoxine sind intrazellulär in Vesikeln gespeichert und können über einen kalziumabhängigen Prozess freigesetzt werden. Granzyme sind eine Gruppe mit mindestens fünf Serinproteasen, die über eine enzymatische Kaskade Apoptose induzieren können. Perforine polymerisieren in der Zellmembran der Zielzelle zu Poren, was letztlich zur Lyse dieser Zelle führt. CTLs besitzen neben dieser „Killer-Funktion“ auch die Fähigkeit Zytokine wie TNF α , TNF β und IFN γ zu sekretieren. Die beiden erstgenannten Stoffe können an TNF-Rezeptoren der Zielzelle binden und so an deren Tötung mitwirken. TNF α , TNF β und IFN γ sind darüber hinaus in der Lage, Makrophagen zu aktivieren. Neben dieser Hauptaufgabe von IFN γ bewirkt dieses Zytokin eine verstärkte Expression von MHC-I-Molekülen auf Zellen und hemmt die Virusreplikation. Das Wanderungsverhalten der T-Zellen ändert sich mit der Aktivierung drastisch: Während die Wanderung der naiven T-Zellen darauf ausgerichtet ist, das Zusammentreffen mit APCs in den lymphatischen Organen zu gewährleisten, sollen aktivierte T-Zellen in peripheren Geweben auf potentielle Zielzellen treffen und ihre Effektorfunktionen ausüben.

A.3 Krebs im Kontext des Immunsystems

A.3.1 Die Andersartigkeit der Tumorzellen

Um nun darstellen zu können, wie und durch welche Komponenten das Immunsystem Tumorzellen erkennt, muss zunächst die "Andersartigkeit" (= "Fremd") der Tumorzellen beleuchtet werden. Die Mechanismen, die eine gesunde Zelle zu einer Tumorzelle werden lassen sind vielfältig und die Tumorgenese von einem Carzinoma *in situ*, welches noch Gewebeschränken akzeptiert, bis hin zu einem invasiven, metastasierenden Tumor vollzieht sich in mehreren Schritten. In der Regel führen mehrere Mutationen zu einem veränderten Expressionsverhalten der Zelle, die dadurch einen Selektionsvorteil gegenüber gesunden Zellen erhält und in der Lage ist, unkontrolliert zu proliferieren (Shih et al. 1981; Vogelstein et al. 1988). Hierbei treten die Mutationen vor allem in Tumorsuppressorgenen, Transkriptionsregulatoren, Proto-Onkogenen und weiteren Genen, die für die Regulation von Proliferation und dem Überleben der Zelle notwendig sind, auf. Dies führt zu einer breiten Änderung der intrazellulären Proteine (Fearon and Vogelstein 1990), wodurch sich die Proteome einer gesunden Zelle und einer Tumorzelle voneinander unterscheiden. Die veränderten Proteine, welche immunogene Determinanten hervorbringen, werden als Tumorantigene bezeichnet. Teile dieser Tumorantigene können dann über MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Tumorantigene lassen sich in verschiedene Klassen unterteilen (Tabelle 3) (Stevanovic 2002).

Tabelle 3: Einteilung der TAAs mit Beispielen

Klasse der Antigene	Beispiel
Differenzierungsantigene	Melan A/MART-1, Tyrosinase, gp 100, CEA, NY-BR-1, rab38
Überexprimierte Antigene	Her2/neu, p53, MUC-1
<i>Cancer/Testis</i> -Antigene	MAGE, BAGE, GAGE, NY-Eso-1, SSX
Punktmutationen	β -Catenin, MUM-q, CDK-4, p53, ras
Virale Antigene	HPV (E16, E17), EBV (LMP1, LMP2), HTLV-1

Modifiziert nach (Jager et al. 2003)

Differenzierungsantigene können von Normal- und Tumorgewebe exprimiert werden. *Cancer/Testis*-Antigene werden normalerweise nur von testikulären Keimzellen oder plazentaren Trophoplasten exprimiert. Da diese Zellen keine MHC-I-Moleküle exprimieren, kommt es nicht zu Entstehung von antigenen Peptiden, was diese daher tumorspezifisch

macht. Im Gegensatz hierzu werden Differenzierungsantigene auch auf Zellen des normalen Gewebes präsentiert, was den Einsatz in der Immuntherapie unter der gesicherten Vermeidung einer Autoimmunreaktion schwierig macht. Diese Problematik findet sich auch bei den überexprimierten Antigenen. Diese Proteine werden zwar von Tumorzellen in höherem Maße produziert und präsentiert, finden sich jedoch auch auf normalen Zellen. Da schon eine geringe Menge eines Antigens ausreichen kann um eine Immunreaktion auszulösen, können auch hier Autoimmunreaktionen bei der Verwendung solcher Antigene in der Therapie von Krebspatienten nicht ausgeschlossen werden. Weiter können Mutationen in bestimmten Genen wie z.B. von p53 zu Krebs führen. Weiter werden auch Infektionen mit verschiedenen Viren, wie z.B. dem Epstein-Barr (EBV) oder humanen Papillomavirus (HPV) mit Entstehung von Tumoren assoziiert. Daher sind auch Proteine der beiden zuletzt genannten Gruppen als mögliche TAAs von wissenschaftlichem Interesse.

A.3.2 Erkennung durch das Immunsystem

Viele TAAs sind ursprüngliche Selbstproteine, die entweder verändert, überexprimiert, oder eigentlich nur während der Embryogenese vorkommen. Diese Tatsache lässt vermuten, dass sie vorrangig auf MHC-I-Molekülen präsentiert werden und somit in erster Linie CD8⁺ CTLs allein oder in Kombination mit CD4⁺-T-Zellen die zentrale Rolle bei der Tumorbekämpfung spielen (Garrido et al. 1997; Roth et al. 1994). Außer der Unterstützung der CD8⁺-T-Zellen als T_H1-Zellen wurden auch direkte Effektor Reaktionen von CD4⁺-T-Zellen beschrieben (Hu and Stein-Streilein 1993; Levitsky et al. 1994; Overwijk et al. 1999; Toes et al. 1999). Inzwischen wurde aber gezeigt, dass außer T-Zellen auch andere zelluläre Komponenten des Immunsystems in der Tumorimmunologie eine Rolle spielen. Hierzu gehören Antikörper, NK-Zellen, Monozyten, Makrophagen und DCs, wobei insbesondere DCs eine wichtige Funktion bei der Vermittlung antitumorale Immunität zugesprochen wird (Smyth et al. 2001). NK-Zellen erkennen stressinduzierte Moleküle auf Tumorzellen, sowie eine Verringerung der HLA-Expression. Antikörper können an veränderte Oberflächenmoleküle binden. Das Immunsystem ist also prinzipiell in der Lage, diese Tumorantigene zu erkennen (Itoh 1987; Rosenberg et al. 1988; Rosenberg et al. 1994; van der Bruggen P. et al. 1991). Jedoch kommt es häufig zu einer Anergie und Inhibition der zuständigen Effektorzellen. So wurde beispielsweise gezeigt, dass in der Peripherie von Melanompatienten T-Zellen existieren, die autologe Tumorzellen *in vitro* erkennen und lysieren können (Valmori et al. 2002). *In vivo* kommt es aber nicht zur effizienten Eliminierung der entarteten Zellen. Dieses Fehlen der Effektorfunktion kann verschiedene Ursachen haben. So ist bekannt, dass sowohl in weiter differenzierten murinen, aber auch humanen Kolonkarzinomen die Expression von Granzym B und der ζ-Kette des TCR herunterreguliert sind (Bronstein-Sitton et al. 2003; Nakagomi et

al. 1993). Werden isolierte TILs zusammen mit IL-2 inkubiert, stellt sich nach kurzer Zeit jedoch wieder eine typische Expression der ζ -Kette ein (Nakagomi et al. 1993; Rabinowich et al. 1996). Weiter wurde in der Vergangenheit gezeigt, dass auch die Signaltransduktion von IL-2 und seinem Rezeptor CD25 gestört sein kann, was sich in einer reduzierten Expression von CD25 auf T-Zellen widerspiegeln kann (Chiou et al. 2005; Sheu et al. 1997). Außerdem kann die Deletion von Immunzellen durch Induktion von Apoptose zustande kommen (Hoffmann et al. 2002). Es wurde diskutiert, dass FasL von Tumorzellen exprimiert wird, was zusammen mit der dauerhaften Aktivierung der Immunzellen *Activation Induced Cell Death* (AICD) induzieren kann (Chiou et al. 2005).

A.3.3 Tumorescape

Im Folgenden stellt sich nun die Frage, inwiefern Tumorzellen und ganze Tumoren ihre Erkennung durch das Immunsystem zulassen oder vielmehr, wie sie sich überhaupt ausbreiten können, wenn sie eigentlich erkannt werden. Im Prinzip wird jedes TAA nach demselben Mechanismus erkannt wie ein virales Antigen mit dem Unterschied, dass die Tumorzelle aktiv einer Erkennung entgegen wirkt und versucht zu „entkommen“. Hierbei gibt es zahlreiche Mechanismen auf Seiten des Tumors, die es ihm ermöglichen, sich dem Immunsystem zu entziehen. Hierzu gehören die Stromabarriere, Defizienzen in der Antigenprozessierung, ein verändertes Zytokinmilieu, eine Induktion von regulatorischen T-Zellen sowie eine fehlende Vermittlung kostimulatorischer Signale.

Die Stromabarriere

Die Theorie der Stromabarriere ist eine Möglichkeit des Tumors, dem Immunsystem zu entgehen (Spiotto et al. 2002). Hierbei gibt es eine der Basalmembran ähnliche Struktur, die den Tumor umgibt und so die Infiltration immunkompetenter Zellen verhindert (Buckanovich et al. 2008; Menon et al. 2003; Valmori et al. 2002). Es konnte gezeigt werden, dass die erhöhte Expression des Endothelin B Rezeptors (ETBR) im Blutgefäßsystem des Tumors von Patienten mit OvCa die Infiltration durch Lymphozyten vermindert oder sogar völlig unterdrückt (Buckanovich et al. 2008). Im Gegensatz hierzu konnte in anderen Studien gezeigt werden, dass dieses Stroma bestimmte Oberflächenmarker und Zytokine besitzt, welche eine verstärkte Infiltration von Lymphozyten in das Tumorgewebe erlauben würden. Zu diesen Stoffen zählen der *Tumor Necrosis Factor Superfamily* (TNFSF-14) (Yu et al. 2004) oder das Glykoprotein gp33 (Spiotto and Schreiber 2005).

Defizienzen in der Antigenprozessierung

Eine wichtige Voraussetzung zur Präsentation von Antigenen an CTL ist, wie bereits dargestellt, die Assoziation der Peptide an MHC-Moleküle. Somit sollten Veränderungen innerhalb des MHC-I-Präsentationsweges die einfachste Möglichkeit darstellen, einer CTL-

Antwort zu entkommen. Tatsächlich findet man bei zahlreichen Tumoren Defekte der Antigenprozessierung und –präsentation. Beim OvCa konnten in immunhistologischen Untersuchungen sowohl komplette Verluste der MHC-I-Expression als auch partielle Verluste für HLA-A*02-Allele beobachtet werden. Komplette Verluste der MHC-I-Expression korrelierten mit Defekten in der Expression der schweren Kette von $\beta 2$ Mikroglobulin und TAP1 (Kaklamanis et al. 1995). Einige klinische Studien zeigten Korrelationen zwischen Tumorprogression und MHC-I-Verlusten bzw. Defizienzen für TAP (Cormier et al. 1998; Vitale et al. 1998). Bei Untersuchungen von Tumorzelllinien unterschiedlicher Herkunft fanden sich nicht nur Defizienzen für TAP1 und TAP2, sondern auch für die Bestandteile des Immunoproteasoms LMP2, LMP7 und MECL-1 (Johnsen et al. 1998). Defizienzen im Bereich des Immunoproteasoms werden vor allem mit qualitativen Unterschieden bei der Generierung von T-Zellepitopen in Verbindung gebracht (Morel et al. 2000). Eine Expression von MHC-II findet sich in der Regel nur auf professionellen APC wie Monozyten, Makrophagen, DCs und B-Zellen. Aus diesem Grund weisen Tumorzellen in der Regel keine Expression von MHC-II auf. Die dadurch bedingte fehlende Stimulierung von $CD4^+$ - T_H -Zellen wirkt sich wiederum negativ auf die Aktivierung von $CD8^+$ -T-Zellen aus, da eine Sekretion von Helfer-Zytokinen wie IL-2 ausbleibt (Becker and Brocker 1995).

Verändertes Zytokinmilieu

Tumorzellen können, wie berichtet wurde, ihre Umgebung über ein bestimmtes Zytokinmilieu mit Stoffen wie *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) (Gabrilovich et al. 1996), *Tumor Growth Factor- β* (TGF- β) (Tada et al. 1991) oder IL-10 (Elgert et al. 1998) beeinflussen. Dieses veränderte Chemokinmilieu im Bereich des Tumors kann zum einen die vollständige Reifung infiltrierender DCs verhindern (Gabrilovich et al. 1998; Ishida et al. 1998; Shurin et al. 2002). Zum Anderen kann es auch Anergie und AICD der infiltrierenden Lymphozyten verursachen. So machen sich Tumore, wie Studien zeigen konnten, regulatorische T-Zellen (Tregs) oder *Myeloid-Derived-Suppressor-Cells* (MDSC) zu Nutze, um dem Immunsystem auszuweichen (Sutmuller et al. 2001; van et al. 2001).

Induktion regulatorischer T-Zellen

Es wurde gezeigt, dass das von Krebszellen ausgeschüttete TGF- β eine vermehrte Infiltration von Tregs in den Tumor zur Folge haben kann (Sheu et al. 2001). So berichteten verschiedene Gruppen über Patienten mit Pankreas-, Brust-, Lungen-, Magen-, Haut- und Nierenkrebs von einer erhöhten Anzahl regulatorischer T-Zellen in der Peripherie aber auch im Bereich des Tumors (Cesana et al. 2006b; Griffiths et al. 2007; Ishihara et al. 2003; Liyanage et al. 2002; Wolf et al. 2003). Auch eine Stimulation durch den immunsuppressiven Rezeptor CTLA-4 auf T-Zellen führt zu einer verstärkten Aktivierung regulatorischer T-Zellen (Hodi et al. 2003). Bei der Untersuchung von PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*)

von RCC- (*renal cell carcinoma*) und Melanom-Patienten konnte nach der Behandlung mit hohen IL-2-Dosen ein erhöhter Anteil an Tregs in den PBMCs detektiert werden (Ahmadzadeh and Rosenberg 2006; Cesana et al. 2006a). Dieses verstärkte Auftreten von Tregs in Krebspatienten kann sich negativ auf deren Überlebensprognose auswirken, wie verschiedene Untersuchungsergebnisse in der Vergangenheit zeigen konnten (Griffiths et al. 2007; Sasada et al. 2003; Siddiqui et al. 2007).

Fehlende Vermittlung kostimulatorischer Signale

Es konnte auch gezeigt werden, dass Tumore die Expression von kostimulatorischen Molekülen verlieren und so dem Immunsystem entgehen, da mögliche reaktive T-Lymphozyten nicht aktiviert werden können (Chiou et al. 2005; Harding et al. 1992). Insbesondere die Moleküle CD80 und CD86 werden von den meisten Tumoren nicht exprimiert. In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass die Induktion einer Antitumorantwort u.a. von der Expression des CD80-Moleküls abhängt (Baskar et al. 1993; Townsend and Allison 1993). Ähnlich verhält es sich mit CD54 und CD58, welche von vielen Tumorzellen nur in geringerem Maß exprimiert werden. Das Ausbleiben kostimulatorischer Signale führt bei potentiell reaktiven T-Zellen zur Inaktivierung über Anergiemechanismen.

Antigenverlust

Aufgrund der starken genetischen Veränderungen in einer Tumorzelle verändern sich auch deren Oberflächenstrukturen ständig. So kann das Expressionsmuster von Tumorantigenen innerhalb einer Läsion heterogen sein (Blankenstein et al. 1996; Boczkowski et al. 1996; Lanzavecchia 1996). Die fehlende Erkennung von Tumorzellen durch T-Zellen kann also nicht nur indirekt durch Defizienzen des MHC-I-Präsentationswegs zustande kommen, sondern auch direkt durch den Verlust von Tumorantigenen im Laufe der Tumorprogression. So kann es zu der Auslöschung einer bereits vorhandenen Immunantwort kommen (Boon et al. 1994). Außerdem wurden auch völlige Verluste von Antigen-Expressionen in Melanom- und Brustkrebs-Patienten beschrieben. Während das Tumorantigen in dem primären Tumorgewebe noch exprimiert wurde, ließ es sich im Verlauf der Tumorprogression in Metastasen nicht mehr nachweisen (Maeurer et al. 1996; Pinto et al. 2009). Desweiteren gibt es die Theorie des Immunoediting, wobei durch die Auseinandersetzung des Tumors mit dem Immunsystem Zellen gefördert werden, die von diesem nicht mehr erkannt werden können (Dunn et al. 2002). Das Erhöhen und Aufrechterhalten der Immunogenität des Tumors kann aus diesem Grund ein Ziel der Immuntherapie sein.

A.3.4 Immuntherapien bei Krebs

Trotz all dieser Versuche der Tumorzellen, sich dem Immunsystem zu entziehen, kommt es in Patienten dennoch immer wieder zu spontanen Remissionen des Tumors. Dies kann mit

auf das Einwirken des Immunsystems gegen den Tumor zurückgeführt werden. Die Infiltration durch Zellen des Immunsystems, speziell durch T-Zellen, wirkt sich meist auch positiv auf die Überlebensdauer der Patienten aus. So zeigten Untersuchungen von Melanom-, CRC- (*Colorectal Cancer*) und OvCa-Patienten eine gesteigerte 5-Jahres-Überlebensrate (von 30% auf 73% in CRC und von 4.5% auf 38% in OvCa), wenn sich eine erhöhte Anzahl an T-Zellen im Gewebe des Tumors fand (Zhang et al. 2003; Couzin 2006). Diese T-Zellen hatten den Phänotyp von zytotoxischen Effektor- oder Gedächtniszellen (Galon et al. 2006; Pages et al. 2005).

Das heißt aber, dass mit Hilfe der Immuntherapie der bereits beschriebene Toleranzzustand der Immunzellen bzw. die Tarnung der Tumorzellen überwunden werden muss. Die wichtigsten Ziele bei der Entwicklung einer Immuntherapie sind die Identifizierung von TAAs, die Generierung einer ausreichend starken Immunantwort, die letztendlich zu einer Tumorabstoßung führt, und die gleichzeitige Blockade von *Tumor-Escape-Mechanismen*. Prinzipiell muss man die antigenunabhängigen von den antigenabhängigen Immuntherapien unterscheiden. Bei der Antigenunabhängigen Therapie wird versucht, durch Immunstimulanzien verschiedenster Art, z.B. CpG-Sequenzen (Speiser et al. 2005), Granulozyten–Makrophagenkolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) (Disis et al. 1996) oder IL-2 (Nencioni et al. 2003), die Immunzellen unspezifisch zu aktivieren.

Im Folgenden soll aber nur auf die antigenabhängigen Immuntherapien eingegangen werden. Diesen Therapien ist gemeinsam, dass sie auf TAAs zielen, die im Verlauf der Karzinogenese exprimiert und vom Immunsystem als fremd erkannt werden können. Hier sind drei Ansätze zu unterscheiden:

Die Antikörper-basierte Immuntherapie

Es werden Antikörper gegen TAA oder gegen allgemeine Antigene, die in der Tumorbilogie eine besondere Rolle spielen, wie beispielsweise Wachstumsfaktoren und Angiogenesemarker eingesetzt. Das Ziel ist es, z.B. mit einfachen oder bispezifischen Antikörpern Effektormechanismen zu induzieren, oder die Antikörper gekoppelt an Toxine oder radioaktive Komponenten selbst direkt als Angriffsmolekül einzusetzen (Bleumer et al. 2006; Elaraj et al. 2004; Hainsworth et al. 2005; Huang et al. 2007; Rini et al. 2004).

Adoptive Immuntherapie

Allogene oder autologe immunkompetente oder tumorspezifische Zellen werden *ex vivo* expandiert und anschließend wieder in den Tumorpatienten transferiert (Bukowski et al. 1997; Figlin et al. 1999; Roigas and Massenkeil 2005; Topalian et al. 1988).

T-Zell-Aktivierungsstrategien

Hier soll mit Hilfe von Vakzinen eine T-Zell-basierte Immunantwort induziert werden. Dass Tumor-assoziierte Peptide von T-Zellen erkannt werden können, was letztendlich zur

A Einleitung

Abtötung von Tumorzellen führt, konnte erstmalig von van der Bruggen et al (van der Bruggen P. et al. 1991) gezeigt werden. Für die Generierung einer T-Zellantwort gegen den Tumor gibt es verschiedene Vakzinierungsstrategien, die in der folgenden Tabelle aufgelistet sind.

Tabelle 4: Vakzinierungsstrategien

Strategie	Art des Antigens
Antigen mit oder ohne Adjuvant	Peptide
	Proteine
	nackte DANN oder RNA, rekombinantes Virus
beladene Dendritische Zellen	Peptide
	Tumorlysate
	DNA oder RNA
	Proteine
veränderte oder unveränderte Tumorzellen	autolog
	allogen
	gemischt autolog-allogen
	Tumor-APC-Hybrid

Das Ziel solcher Vakzinierungen ist die Generierung TAA-spezifischer T-Zellen, die klonale Expansion dieser T-Zellen und die anschließende Tumorlyse durch die CTLs. Im Zentrum der Vakzinierungsstrategien stehen neben den T-Zellen die DCs, da diese das TAA in den verschiedenen Darreichungsformen aufnehmen und an naive T-Zellen präsentieren. Zusätzlich zu den verschiedenen TAA-Darreichungsformen ist die Gabe von DC-aktivierenden Adjuvantien, von denen es mittlerweile viele verschiedene gibt. Zu nennen wäre beispielsweise CpG-ODN (Cytosin-phosphatidyl-Guanosin Oligodeoxynukleotide) (Chen et al. 2004) oder GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) (Kavanagh et al. 2007).

Die Generierung einer Vakzine ist sehr vielschichtig und viele Aspekte müssen berücksichtigt werden. Folgende Fragen sollen einen Einblick in die Komplexität geben:

- In welcher Form soll das Antigen verabreicht werden?
- Welche Adjuvantien sind sinnvoll?
- Führen monovalente oder multivalente Vakzinen zu besseren Ergebnissen?
- In welchem Krankheitsstadium ist eine Vakzinierung angemessen?
- Wie häufig und wie lange muss die Vakzinierung erfolgen?
- Wie können antigenspezifische Immunantworten überwacht werden?
- Wie kann eine induzierte Immunantwort aufrechterhalten werden?

Im Gegensatz zu einigen therapeutischen Antikörpern haben die verschiedenen Vakzinierungsstrategien zur Aktivierung von CTLs bisher noch nicht den Weg in den klinischen Alltag gefunden. Es können zwar in den meisten Fällen TAA-spezifische T-Zellen *in vivo* generiert werden, und die Nebenwirkungen dieser Therapien sind sehr moderat. Jedoch sind die Einzelfälle mit einem klinischen Ansprechen oft nicht statistisch signifikant. Als ein Grund dafür lässt sich sicherlich die klinische Prüfung solcher Vakzinierungen in bereits fortgeschrittenen Tumorstadien verantwortlich machen. Die so behandelten Patienten haben häufig im Verlauf der Therapie einen Tumorprogress und müssen deshalb frühzeitig aus der Studie aussteigen. Dies führt oft zu sehr kleinen Patientenkollektiven und somit zu geringerer statistischer Aussagekraft. Zudem haben diese spät behandelten Tumore meist schon verschiedene *Tumor-Escape-Mechanismen* ausgebildet, so dass auch ein aktiviertes Immunsystem wenig ausrichten kann. Eine Lösung wäre zukünftig die Kombination aus einer solchen Vakzinierung mit therapeutischen Antikörpern. Hier wären beispielsweise Antikörper gegen immuninhibitorische Strukturen zu nennen, wie etwa CTLA-4 (Ruter et al. 2009)).

A.3.5 Immuntherapie bei OvCa

Die Rolle des Immunsystems beim OvCa wurde durch die Arbeit von (Zhang et al. 2003) deutlich. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass die 5-Jahres-Überlebensrate von Patientinnen mit der An- bzw. Abwesenheit von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) korreliert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich auch das Verhältnis von CD8⁺- und CD4⁺-positiven TILs auf die Länge der Überlebenszeit auswirkt, mit einer besseren Prognose je höher der Anteil an CD8⁺-T-Zellen ist. Dieser ungünstige Effekt der CD4⁺-T-Zellen konnte auf Tregs zurückgeführt werden, die durch die Expression von CD4, CD25 und FoxP3 (*forkhead box P3*) gekennzeichnet sind. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass immuntherapeutische Ansätze bei der Bekämpfung des OvCas sinnvoll sind.

In früheren immuntherapeutischen Ansätzen bei OvCa wurden Zytokine wie IFN γ und TNF α direkt in die Bauchhöhle appliziert. (Allavena et al. 1988; Vanderkwaak and Alvarez 1999). Dies führte zu einer Proliferation der Lymphozyten, erhöhter Chemokin- und Zytokinproduktion als auch zu einer gesteigerten MHC-I-Expression auf den Tumorzellen. Dennoch zeigten diese Behandlungen nur einen geringen klinischen Effekt bei relativ hohen Nebenwirkungen.

Klinische Studien mit adoptivem T-Zell-Transfer in OvCa-Patientinnen wurden zwar im Allgemeinen gut toleriert, zeigten aber in den meisten Fällen keinerlei Effekt auf Tumorgröße und Wachstum. Dies wurde vor allem mit der kurzen Überlebensdauer der T-Zellen in den Patientinnen und der fehlenden Migration zu den Tumorzellen erklärt (Kershaw et al. 2006).

Um die T-Zellen mit den Tumorzellen in Kontakt zu bringen gab es verschiedene Ansätze mit bispezifischen Antikörpern (Flieger et al. 2000; Marme et al. 2002; Strauss et al. 1999). Bei einigen palliativ behandelten Patienten wurde die Bildung von Aszitis durch den bispezifischen Antikörper HEAxOKT3 deutlich herabgesetzt und eine Aktivierung tumorgerichteter Lymphozyten in der Bauchhöhle beobachtet (Marme et al. 2002).

Einige monoklonale Antikörper sind bereits in klinischen Studien für OvCa-Patientinnen. Der therapeutische Antikörper Oregovomab gegen CA125 ist bereits in fortgeschrittener Phase der klinischen Prüfung (Nicodemus and Berek 2005; Weiner and Borghaei 2006). Korrelationen zwischen Antikörpergabe und positivem klinischen Ansprechen konnte jedoch bisher nicht beobachtet werden (Berek et al. 2009). Andere Antikörper gegen TAAs befinden sich erst in frühen Abschnitten der klinischen Prüfung, darunter Bevacizumab gegen VEGF (*vascular epidermal growth factor*) (Burger et al. 2007), Trastuzumab gegen HER2/neu (Bookman et al. 2003) und Removab gegen EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*) (Schmitt et al. 2004).

Bei Ansätzen zur aktiven T-Zell-Induktion wurden in früheren Studien allogene Tumorzellen als Impfstoff eingesetzt. Alternativ hierzu wurde auch mit DCs vakziniert, die mit Tumorlysat (Hernando et al. 2002) oder definierten MUC-1 Peptiden beladen waren (Brossart et al. 2000). Einige dieser Vakzinen verwendeten auch Peptid/Adjuvant Kombinationen (Knutson et al. 2002). Gemeinsam zeigten all diese Ansätze geringe Nebenwirkungen und dass eine tumorspezifische T-Zell-Induktion in OvCa-Patientinnen möglich ist.

A.3.6 Peptid-basierte Vakzinierung - Identifizierung von T-Zellepitopen

Der große Vorteil einer Peptid-basierten Vakzinierung ist, dass das Risiko einer Autoimmunreaktion durch den Einsatz klar definierter, von TAAs abgeleiteter T-Zellepitope minimiert werden kann. So kommt es sehr selten zu schweren Nebenwirkungen, und diese sind meist, wie bei einer Impfung auf die Reaktion des Immunsystems zurückzuführen. Außerdem ist die Produktion der Peptide unter GMP (*good manufacturing practice*)-Bedingungen erheblich einfacher als Zellpräparationen. Schließlich können innerhalb einer Vakzinierung ganze Peptid-Cocktails verabreicht werden, die eventuell speziell auf den Patienten abgestimmt werden können. Nun stellt sich die Frage, wie man die richtigen T-Zellepitope für eine bestimmte Tumorklasse definieren kann. Drei Methoden beruhen auf bereits existierenden tumorspezifischen T-Zellen. Zwei weitere Methoden gehen von der Antikörper-Reaktion der Patienten oder vorhergesagten MHC-Liganden aus:

„Screening“ von Expressionsdatenbanken

Bei der ersten Methode werden Zellen mit Bibliotheken aus genomischer DNA oder cDNA von Tumorzellen transfiziert und dann in Zytokin-Freisetzungs- oder Zytotoxizitätstests mit den Tumor-reaktiven T-Zellen analysiert (Boon 1993; Smith et al. 2001).

MHC-Liganden-Analyse

Bei der zweiten Methode werden MHC-Liganden von Tumormaterial isoliert und chromatographisch in Fraktionen aufgetrennt. Anschließend werden mit diesen Fraktionen beladene APC in funktionellen T-Zell-Tests untersucht. Peptide aus den Fraktionen, die von T-Zellen erkannt wurden, werden schließlich per Massenspektrometrie sequenziert (Cox et al. 1994).

TIL-Stimulation mit autologen Tumorzellen

Die letzte Methode beruht auf der *in vitro*-Stimulation von TILs mit autologen Tumorzellen (Brandle et al. 1996; Gaudin et al. 1999; Probst-Kepper et al. 2004; Van den Eynde et al. 1999).

Serologische Analyse

Eine weitere Möglichkeit bietet die Serumanalyse von Tumorpatienten, die oft Antikörper gegen TAA enthalten (Gouttefangeas et al. 2007). Auf dieser Tatsache beruht das Prinzip von SEREX (*Serological analysis of autologous tumor antigens by recombinant cDNA expression cloning*). Hier konnten bei der Durchsuchung von cDNA-Expressionsbibliotheken aus menschlichem Serum TAA-spezifische Antikörper identifiziert werden (Koroleva et al. 2002; Sahin et al. 1995). Mittels SEREX, dem Serum Antikörper Detektionsarray (SADA) oder der Proteomics-basierten Analyse SPEAR können weitere immunogene Antigene detektiert werden, gegen die wahrscheinlich auch T-Zellreaktionen entwickelt werden können, wie bereits für das Melanom-assoziierte Antigen NY-ESO-1 gezeigt werden konnte (Gnjatic et al. 2003; Jager et al. 2000).

***In Silico*-Vorhersage oder “Reverse Immunology“**

Eine weitere verbreitete Methode ist die sogenannte "Reverse Immunology". Hierbei nutzt man die Tatsache, dass für viele HLA-Allele Peptidmotive bereits sehr genau definiert sind. Darauf basierend können für die Proteinsequenzen interessanter Tumorantigene Ligandenvorhersagen gemacht werden (Rammensee et al. 1999). Mit den vorhergesagten synthetisierten Liganden werden *in vitro*-T-Zellstimulationen durchgeführt. Anschließend werden die stimulierten T-Zellen auf ihre Tumorreaktivität untersucht (Brossart et al. 1998; Celis et al. 1994; Schmitz et al. 2000; Sun et al. 2000; Vonderheide et al. 1999). Ein alternativer Ansatz anhand von vorhergesagten T-Zellepitopen ist die "Predict, Calibrate, Detect"- Methode (PCD) (Pascolo et al. 2001; Schirle et al. 2000). Hier werden zunächst auch T-Zellepitope vorhergesagt und synthetisiert. In einem natürlichen HLA-Peptid-Gemisch

aus Tumorzellen kann spezifisch nach diesen Peptiden gesucht werden, indem dieses Gemisch chromatographisch getrennt und koeluierende Peptide anschließend massenspektrometrisch sequenziert werden. Dazu wird zuvor das chromatographische System mit den gesuchten Peptiden kalibriert.

A.3.7 TAAs im OvCa

Wie für die meisten Tumore sind für das OvCa bereits eine Vielzahl TAAs bekannt, die mit einer mehr oder weniger hohen Frequenz auf OvCa-Gewebe exprimiert werden. Diese altbekannten TAAs wurden meist schon im Zusammenhang anderer Tumore ausgiebig beschrieben und erst im Nachhinein auch auf OvCa-Gewebe nachgewiesen. *Carcinoembryonic antigen (CEA)* ist hierbei das wohl schon am längsten beschriebene Antigen, das vor allem im Serum von Colonkarzinom Patienten nachgewiesen wurde und im Anschluss auch als Diagnose- und Prognosemarker verwendet wurde (Kleinman and Turner 1972). Weiter wurde NY-ESO-1 erstmals in Melanompatienten (Jager et al. 1998), Her2/neu in Brustkrebspatientinnen (Seshadri et al. 1989) und WT1 in akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) (Chen et al. 1983) beschrieben. MUC-1, Survivin und hTERT sind dagegen TAAs, die in sehr vielen Tumorarten stark exprimiert werden (Ambrosini et al. 1997; Apostolopoulos and McKenzie 1994; Vonderheide et al. 1999). EpCAM ist ein TAA, das auf allen normalen epithelialen Zellen exprimiert wird aber auch auf allen gastrointestinalen Tumoren überexprimiert wird. Durch die hohe Expression im OvCa wird es auch häufig als Marker für OvCa-Zellen verwendet. Für viele dieser Antigene wurden auch schon T-Zellepitope beschrieben, was sie für eine Peptid-Vakzine nutzbar macht. Die in Tabelle 5 blau unterlegten Antigene wurden in dieser Arbeit näher untersucht. Nähere Beschreibungen dieser Antigene befinden sich daher im ersten Ergebnisteil bei der Charakterisierung von Tumorzellen.

A Einleitung

Tabelle 5: OvCa-assoziierte Antigene. Blau unterlegt Antigene, die in dieser Arbeit näher untersucht wurden.

Hinter den jeweiligen Expressionen aus der Literatur stehen in Klammern die jeweiligen Methoden, mit denen diese gemessen wurden. (mRNA): Expression der mRNA des Antigens, (ICH): Expression wurde durch immunhistochemische Färbung gemessen, (WB): Expression wurde durch Westernblot detektiert, (Serum): die Proteinmenge wurde im Serum der Patienten bestimmt.

Antigenfamilie	Antigen	Referenz	% Expression in OvCa
Tumorsuppressorgene			
	WT1	(Bruening et al. 1993)	75% (mRNA)
Onkogene			
	Her-2/neu	(Verri et al. 2005)	27% (ICH)
	hTERT	(Kyo et al. 1999)	80% (mRNA)
	Survivin	(Sui et al. 2002)	51% (ICH)
Cancer/Testis-Antigene			
	NY-ESO-1	(Odunsi et al. 2003)	43% (ICH)
	SPAG9	(Garg et al. 2007)	90% (WB)
Onkofetale Antigene			
	CEA	(Denk et al. 1972)	20-45% (Serum)
	SIX1	(Behbakht et al. 2007)	50-63% (mRNA)
überexprimierte Antigene			
	MUC-1	(Dong et al. 1997)	>90% (ICH)
	EpCAM	(Kim et al. 2003)	>90% (ICH)
	L1CAM	(Fogel et al. 2003)	80% (ICH)
	Testisin	(Shigemasa et al. 2000)	78% (mRNA)
	NeuromedinU	(Euer et al. 2005)	53% (mRNA)
	Jagged2	(Euer et al. 2005)	50% (mRNA)
	Mesothelin	(Hassan and Ho 2008)	67%-100% (ICH)
	CA125	(Canney et al. 1984)	83% (Serum)
	Osteopontin	(Nakae et al. 2006)	81% (Serum)
Angiogenese			
	VEGF	(Ishii 1995)	77% (mRNA)

A.4 Zielsetzung

Das OvCa ist wegen seiner späten Erkennung mangels geeigneter Diagnoseverfahren eine der tödlichsten Tumorerkrankungen bei Frauen. Die Behandlungsstrategien der Ovariectomie und Chemotherapie sind begrenzt und enden meist in der Resistenz gegen sämtliche Chemotherapeutika. Daher werden dringend Behandlungsstrategien gebraucht, die diese Resistenzmechanismen umgehen und bestehende Therapieansätze sinnvoll ergänzen können.

Eine Peptid-basierte Immuntherapie könnte eine solche Ergänzung darstellen. Zum einen ist nach der operativen Entfernung des Tumorgewebes („Debulking“) die Tumormasse geringer und vereinzelte Tumorzellen und Metastasen bieten dem Immunsystem eine bessere Angriffsfläche. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass bei OvCa-Patientinnen außer dem optimalen Debulking die Anwesenheit von intratumoralen T-Zellen der entscheidende Faktor für den weiteren Krankheitsverlauf darstellt (siehe Abb. 2). Dies belegt die wichtige Rolle des Immunsystems im Tumorgeschehen mit TILs als positivem Prognosemarker. Allerdings wird eine erfolgreiche Therapie maßgeblich von zwei Faktoren abhängen: der erfolgreichen Umgehung von Tumorescape-Mechanismen und der Vermeidung oder Aufhebung aneuger und inhibitorischer Zustände der Effektorzellen.

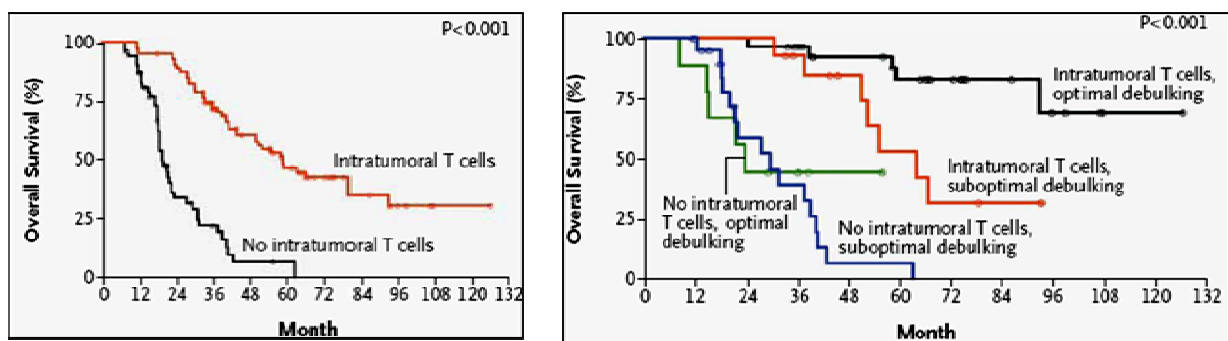


Abbildung 2: Intratumorale T-Zellen spielen die zentrale Rolle bei der Überlebensrate von OvCa-Patientinnen (Zhang et al. 2003).

Das Ziel dieser Arbeit war es neue T-Zellepitope zu identifizieren, die eine Grundlage für eine Peptid-basierte Immuntherapie für OvCa-Patientinnen bilden können.

Zur Veranschaulichung der Strategie und der Verknüpfung der einzelnen Teile dieser Arbeit ist in Abbildung 3 eine Gliederung der verwendeten Methoden dargestellt.

Zielsetzung

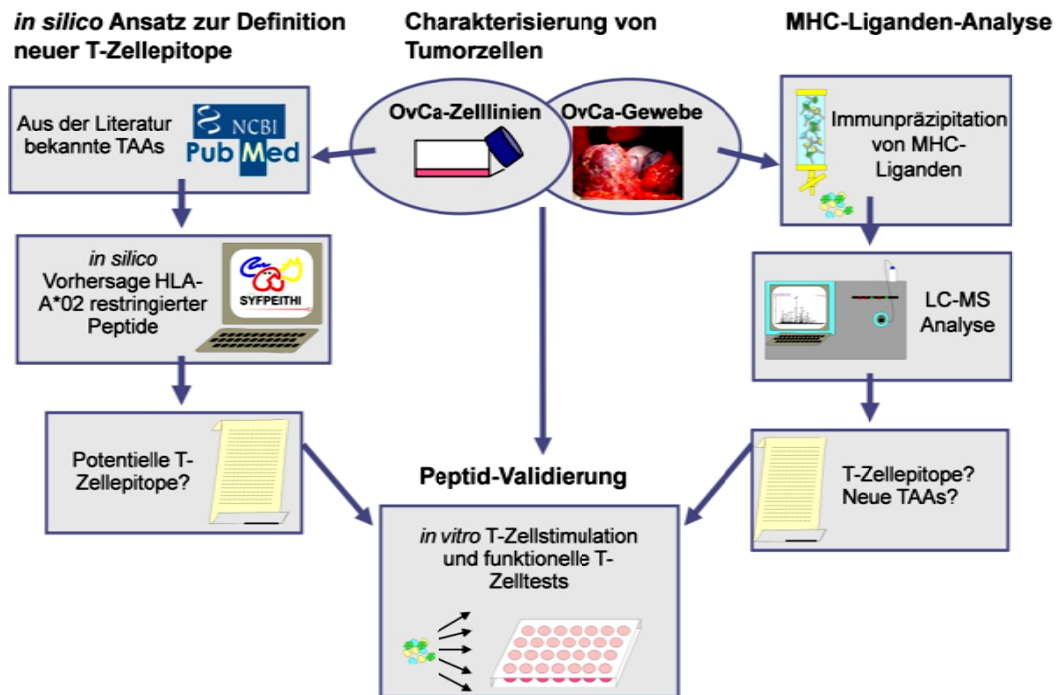


Abbildung 3: Strategie und Verknüpfung der verwendeten Methoden.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollten OvCa-Zelllinien und –Primärgewebe hinsichtlich ihres TAA-Profiles charakterisiert werden, um Kenntnisse über die Häufigkeit verschiedener TAAs zu gewinnen. Die Auswahl der untersuchten TAAs erfolgte unter Kriterien, die daraus identifizierte T-Zellepitope für den therapeutischen Einsatz interessant machen. Darüberhinaus war die Charakterisierung der OvCa-Zelllinien eine Grundlage für weitere Experimente mit generierten TAA-spezifischen CTLs, wie etwa Zytotoxizitätstests.

Im zweiten Teil sollten in einem *in silico* Ansatz neue T-Zellepitope definiert werden. Dazu wurden mit Hilfe des SYFPEITHI-Algorithmus HLA-A*02 restringierte Peptide ausgewählter TAAs vorhergesagt und anschließend für *in vitro* T-Zellstimulationen verwendet. Durch funktionelle T-Zelltests sollten so potentielle T-Zellepitope identifiziert werden, die als therapeutisch nutzbare Peptide in der Tumorthherapie einsetzbar sind.

Im dritten Teil wurde die MHC-Ligandenanalyse verwendet, um mögliche T-Zellepitope auf der Oberfläche von OvCa-Primärgeweben direkt zu finden. Die so identifizierten HLA-Liganden sollten anschließend durch den Abgleich mit einer Proteindatenbank (BLAST) ihrem Quellprotein zugeordnet werden. Die so erhaltenen Quellproteine sollten dann auf mögliche Assoziation mit Tumorerkrankungen geprüft werden und somit als potentielle neue OvCa-assoziierte Tumorantigene identifiziert werden.

B Material und Methoden

B.1 Material

B.1.1 Ethikanträge für die Arbeit mit Patientenproben

Die im Rahmen dieser Arbeit erfolgte Asservierung und Untersuchung von Proben (Blut, Gewebe) von OvCa-Patienten wurden von der Tübinger Ethikkommission genehmigt (siehe Anhang):

„Entwicklung einer Multiepitop-Vakzine gegen Antigene des Ovarialkarzinoms und Tumorassoziertes Endothel“

„Analyse von HLA-Liganden aus Ovarialkarzinomgewebe“

Nummern der Ethikanträge: [113/2006V] und [353/2007BO2]

B.1.2 Geräte

Dampfsterilisator 113	KSG
Dampfsterilisator 11-6-9 HS1-FD	Sauter
Durchflusszytometer FACSCanto™ II mit der Software Diva™	Becton Dickinson
Durchflusszytometer FACSCalibur™ mit Software Cell Quest™ oder Cell Quest Pro™	Becton Dickinson
Einfrierbehälter "Qualifreeze"	Qualilab
Entwickler, M35 X-OMAT Processor	Kodak
FlowJo 7.2 zur Analyse von FACS-Daten	Tree Star
FPLC System ÄKTA prime	Amersham Biosciences
Gammazelle, 1000 Elite	Nordion
Glocke, Genesphere UV100	Axon
Gelkammer, Easy Cast	Hybaid ACS
Heizblock, HBT 130-2	Heap Labor Consult
Kühl-/Gefrierschrank	Bosch
Inkubator für Gewebekulturen (37°C) mit 5% CO ₂ Begasung	Labotect 3250
Lichtmikroskop TEHLAVAL 31	Messer
Lyophilisieranlage Vaco5	Zeiss
MassLynx 4.0 Software	ZIRBUS

B Material und Methoden

Micro Beta Counter 1450 Plus	Perkin Elmer
Mini-Tischzentrifuge	Qualitron
Mixer Model 32BL79 mit 250ml Edelstahlbecher	Waring Commercial
pH-Meter 765	Knick
Pipettierhilfe, Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Pipetten	Abimed
Potter RZR 2020, mit spitz zulaufendem Glasgefäß und Teflonpistill	Heidolph
Q-Tof-Massenspektrometer Q-Tof Ultima	Waters
Quarzküvette, Schichtdicke 10 mm, Zentrum 15 mm	Hellma
Rotationsschüttler, Typ OMV-ROM	Fröbel Labortechnik
Rotator mit Drehteller und Klammern	Bachofer
Schüttler, Rotamax 120	Heidolph
SDS-Gelapparatur, Mini Protein 3 Cell	BioRad
Spannungsquelle, E831	Consort
SpeedVac	Bachhofer
Sterilbank Technoflow Integra	Biosciences
SIGMAPlot 2001	
Taqman Cyclers, ABI PRISM 7700 SDS	Applied Biosystems
Thermocycler „MJ Research PTC-200“	Peltier
Tischkühlzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus
Tischkühlzentrifuge Megafuge 1.0 und 2.0	Heraeus
Ultraschallgerät Sonifier 250, Schallkopf Typ 102-C	G. Heinemann
Ultrazentrifuge L-80 Ultracentrifuge, Rotor Ti70	Beckman Coulter
UV-Spektrometer Ultraspec 3000	Pharmacia
Vorsäulenpumpe ABI 140D Delivery System	Perkin Elmer
Vortexer 7-2020	neoLab
Wasserbad	GFL
Western-Blot-Apparatur	Roth
Zählkammer	Neubauer
5 µm C-18-Material, ID 75 µm, Länge 250 mm	Dionex

B.1.3 Chemikalien für proteinbiochemische Methoden

Acrylamid, 40%, Mix 29:1	AppliChem
Ammoniumpersulfat, APS	Roth
β-Mercaptoethanol, β-ME	Roth

B Material und Methoden

Bromphenolblau	Riedel-de Haën
Bradfordreagenz, Roti Nanoquant	Roth
Bovines Serumalbumin, BSA	Roth
Coomassie, Roti-Nanoquant	Roth
ECL-Reagenz	Amersham Biosciences
Entwicklerlösung	Kodak
Ethylendiamintetraacetat, EDTA	Gibco
Fixierlösung	Kodak
Glycerol	Roth
Glycin	Roth
Isopropanol	Merck
Methanol	Merck
Milchpulver	AppliChem
Natriumazid	Merck
Natriumchlorid, NaCl	Roth
Natriumdeoxycholat	Fluka Biochemika
Nonoxynol-40, NP-40	Fluka Biochemika
Protein-Molekulargewichtstandard	
SeeBlue Plus 2 Pre-Stained Standard	Invitrogen
Natriumdodecylsulfat, SDS	Roth
Tetramethylethylendiamin, TEMED	Roth
Tris-HCl	Sigma Aldrich
Tris-OH	Sigma Aldrich
Tween 20	Merck

B.1.4 Chemikalien für zellbiologische Methoden

Ampuva	Fresenius Kabi
CellFIX (10 x)	Becton Dickinson
Chrom 51 (⁵¹ Cr)	Hartmann Analytic
Cyclosporin A, Sandimmun	Novartis
Cytofix/Cytoperm	Becton Dickinson
Dimethylsulfoxid, DMSO CryoSure	WAK-Chemie
EDTA (0,5 M)	Gibco
Ficoll	Biochrom AG
Fötales Kälber Serum (FCS, hitzeinaktiviert 30 min 56°C)	BioWhittaker
Gentamycin, 50 mg/ml	Gibco

B Material und Methoden

Glucosteril 40%	Fresenius Kabi
GolgiStop	Becton Dickinson
G418, Geneticin	Invitrogen
2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)- ethansulfonsäure, HEPES, 1 M	Gibco
Humanserum	c.c.pro GmbH
Insulin, 10 mg/ml, human rekombinant	Sigma Aldrich
Ionomycin	Sigma Aldrich
L-Glutamin, 200 mM	Gibco
Natriumazid	Merck
PBS	Gibco
Penicillin (10 ³ x U/ml)/Streptomycin (10 g/ml), Pen/Strep	Gibco
Permwash-Puffer (10 x)	Becton Dickinson
Phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA	Sigma Aldrich
Triton X-100	Sigma Aldrich
Trypanblau	Gibco
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories GmbH

B.1.5 Medien und Puffer für zellbiologische Methoden

Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM	Gibco
DMEM-F12	Gibco
Fötale Kälberserum, FCS	Lonza
Iscove's Modified Dulbecco's Medium, IMDM	Gibco
Mc Coy's Medium	Gibco
Phosphat-gepufferte Salzlösung, PBS	Gibco
Roswell Park Memorial Institute 1640, RPMI-1640	Gibco
X-Vivo 15	Lonza
CTL-wash	Cellular Technologie Ltd

B.1.6 Zytokine und Wachstumsfaktoren für die Zellkultur

GM-CSF (Granulozyten–Makrophagenkolonie- stimulierender Faktor), human rekombinant	R&D Systems
IL-1 β (Interleukin 1 β), human rekombinant	R&D Systems
IL-2, Proleukin S, human rekombinant	Chiron
IL-4, human rekombinant	R&D Systems

B Material und Methoden

IL-6, human rekombinant	R&D Systems
IL-7, human rekombinant	R&D Systems
IL-12, human rekombinant	R&D Systems
PGE ₂ (Prostaglandin E2), human rekombinant	Calbiochem
TNF- α (Tumornekrose-Faktor α), human rekombinant	R&D Systems

B.1.7 Zelllinien

Tabelle 6: Andere Zelllinien

Name	Herkunft	Bezug	HLA-Typisierung	Kulturmedium	Wachstumsverhalten
t-CD40L-NIH-3T3	Maus-Fibroblasten	Dr. Schultze, Dana Farber Cancer Institut, Boston, USA	n.b.	DMEM F-12	adhärent
T2-Zellen	T-B-lymphoblastoider Hybrid	ATCC*	HLA-A*02	RPMI-Medium	Suspension
K562	Lymphoblast	ATCC	n.b.	RPMI-Medium	Suspension
JY	B-lymphoblastom	n.b.	HLA-A*02, HLA-B*07	RPMI-Medium	Suspension

*ATCC, *American Type Culture Collection*; ECACC, *European Collection of Cell Cultures*;
n.b.=nicht bekannt

B Material und Methoden

Tabelle 7: OvCa-Zelllinien

Name	Ursprung	Bezug	HLA-Typisierung	Kulturmedium	Wachstumsverhalten
BG1	ovariales Adeno-karzinom	S. Reinarzt, Abteilung Gynäkologie und Geburtshilfe, Universität Marburg (Buick et al., 1985)	A*03, A*26, B*38	DMEM	adhärent
CK19	Pathologie unbekannt	S. Reinarzt, Abteilung Gynäkologie u. Geburtshilfe, Universität Marburg	A*02, A*66, B*41, B*40	DMEM	adhärent
Elgr	maligner Aszites; seröses papilläres Zystadenokarzinom	Dr. B. Gückel, AG Tumorimmunologie Universitätsfrauenklinik Tübingen	A*03, A*30, B*13, B*35	DMEM	adhärent
FraWü	maligner Aszites	Dr. B. Gückel, AG Tumorimmunologie Universitätsfrauenklinik Tübingen	A*02, B*44	DMEM	adhärent
GG	maligner Aszites; wenig differenziert, seröses papilläres Zystadenokarzinom	Dr. B. Gückel, AG Tumorimmunologie Universitätsfrauenklinik Tübingen	A*02, A*32, B*07, B*27	DMEM	adhärent
Hest	maligner Aszites	M. Lindner, Abteilung Gynäkologie u. Geburtshilfe, Universität Heidelberg	A*02, B*27	DMEM	adhärent
HEY	papilläres Zystadenokarzinom	S. Reinarzt, Abteilung Gynäkologie u. Geburtshilfe, Universität Marburg (Geisinger et al., 1989)	A*03, A*26, B*38	DMEM	adhärent
Hi	maligner Aszites	S. Kaul, Frauenklinik, Universität Heidelberg	A*02, A*23, B*44, B*50	DMEM	adhärent
KIHe	maligne pleurale Effusion	Dr. B. Gückel, Abteilung Immunologie, Universitätsfrauenklinik Tübingen	A*01, A*24, B*07, B*37	DMEM	adhärent
MT	maligner Aszites	Dr. B. Gückel, Abteilung Immunologie, Universitätsfrauenklinik Tübingen	A*01, A*02, B*08, B*51	DMEM	adhärent
OAW 42	Aszites, Zystadenokarzinom	ECACC* (85073102)	A*02.	DMEM	adhärent
OvCar29	epitheliales Adenokarzinom	Subklon von OvCar 3, ATCC (HTB 161)	n.b.	DMEM	adhärent
SKOV3	Aszites, Adenokarzinom	ATCC* (HTB 77)	A*03, A*68, B*18, B*35	Mc Coy's	adhärent

n.b.=nicht bekannt

B.1.8 Gesunde Blutspender

Tabelle 8: gesunde Blutspender

Spender	Blutbank Spenden Nr	HLA Typ	Geschlecht / CMV Status
Dr. Brigitte Gückel		A*02	w/+
D12	D206927396	A*02, B*51, B*13	n.b.
D13	n.b.	A*02	+
D14	D206928167	A*02, A*32, B*07, B*44	n.b.
D18	D206930027	A*02, A*01, B*08, B*50	n.b.
D20	D206931060	A*02, A*01, B*18, B*57	n.b.
D25	D207902033	A*02, A*11, B*52, B*44	w
D26	D207902576	A*02, A*33, B*51, B*65	n.b.
D28	D207904255	A*02, A*29, B*44, B*64	w
D31	D207906036	A*02, A*03, B*35	n.b.
D37	n.b.	A*02	n.b.
D39	D207908226	A*02, A*23, B*44, B*56	m/-
D41	D207909328	A*01, A*02, B*08, B*44	m/-
D43	D207909804	A*02, A*32, B*51, B*62	m/-
D44	D207909914	A*02, A*25, B*27, B*38	m/-
D45	D207910462	A*02, A*01, B*08, B*13	m/-
D46	D207912435	A*02, A*01, B*08, B*18	m/-
D47	D207913002	A*02, B*13, B*60	m/-
D54	D207920369	A*02, A*01, B*08, B*44	w/-
D55	D207921004	A*02, A*25, B*07, B*18	m/+
D68	D207925634	A*02, A*31, B*62	m
D69	D207925985	A*02, A*01, B*44, B*8	w/+
D71	D207926885	A*02, B*07, B*08	m
D72	D207928913	A*02, A*03, B*07, B*38	m/+
D73	D207928289	A*02, A*01, B*08, B*57	w
D74	D207929551	A*01, A*02, B*08, B*27	m/+
D76	D207930238	A*02, A*03, B*35, B*60	w/-
D77	D207931444	A*02, A*03, B*07, B*58	m
D87	D208925994	A*02, A*24, B*53, B*27	w
D88	D208926501	A*02, A*03, B*35, B*49	m
D89	D208926600	A*02, A*31, B*56, B*62	m/-
D91	D208927488	A*02	m/-
D92	n.b.	A*02	?
D93	D208931935	A*02, A*11, B*35, B*08	m/-
D94	D208932395	A*02, A*03, B*35, B*49	m/+
D95	D208932510	A*02, A*32, B*08, B*27	m
D96	D209901954	A*02, B*60, B*56	m
D97	D209901864	A*01, A*02, B*38, B*60	m
D102	D209905872	A*02, A*30, B*14, B*44	m

B Material und Methoden

D103	D209905959	A*02, A*03, B*44, B*62	m
D106	D209907233	A*02, A*33, B*51, B*65	m
D107	D209910782	A*02, A*24, B*39, B*51	w
D108	D209911507	A*02, B*18, B*38	m
D109	D209911595	A*02, A*01, B*07	m
D112	D209915865	A*02, A*23, B*35, B*57	m
D113	D209916506	A*02, A*32, B*5, B*65	m
D116	D209920972	A*02, A*03, B*41, B*62	m
D119	D209926716	A*02, A*23, B*35, B*49	m/-
D121	D209927505	A*02, A*03, B*37, B*62	m/-

B.1.9 Patientenmaterial

Tabelle 9: primäres Ovarialtumorgewebe

Patienten-Identifikation	Alter	Pathologie und Einteilung in Differenzierungsgrade *)	HLA-Typisierung
HBL	49	Gering differenziertes transitionalzelliges (solides), fokal auch seröses Adenocarcinom der Ovarien, G3	A*01, A*03 B*07, B*35
ASC	86	Seröses Adenokarzinom der Ovarien, G3	A*01, A*03 B*07, B*08
ASZ	38	Seröses Adenokarzinom der Ovarien, G3	A*01, A*02 B*13, B*44
RKA	61	Muzinöser Borderlinetumor des Ovars	A*01, A*02 B*08, B*41
IKL	74	Seröses Adenokarzinom der Ovarien, G3	A*03, A*32 B*44, B*49
WSC	68	Seröses Adenokarzinom der Ovarien, G2-3	A*02 negativ
H1	74	Papillär-seröses Adenokarzinom der Ovarien, G3*	A*02 positiv
LA	79	Papillär-seröses Adenokarzinom der Ovarien, G1*	A*02 negativ
M1	62	Papillär-seröses Adenokarzinom der Ovarien, G3*	A*02 negativ
S1	62	Papillär-seröses Adenokarzinom der Ovarien, G3*, eine Gewebeprobe aus dem Ovar, abgekürzt mit S1Ova; eine Gewebeprobe aus dem Omentum (Metastase), abgekürzt mit S1Netz	A*02 negativ
S2	78	Papillär-seröses Adenokarzinom der Ovarien G3*	A*02 positiv
S3	45	Papillär-seröses Adenokarzinom der Ovarien G3*, Probe aus dem Omentum (Metastase)	A*02 positiv
S4	48	Adeno-squamöses Karzinom des Corpus Uteri G3*	n.b.
P1	61	Papillär-seröses Adenokarzinom der Ovarien G1*	n.b.
B1	80	Maligner Müller'scher-Mischtumor G3*	n.b.
G1	57	Seröses-endometrioides Adenokarzinom der Ovarien G2*	n.b.
K1	68	Papillär-seröses Adenokarzinom der Ovarien G3*	n.b.
K2	68	Papillär-seröses Adenokarzinom der Ovarien G3*	n.b.
R1	77	Endometrioides Stromasarkom G3*	A*02 positiv
S5	68	Endometrioides Adenokarzinom der Ovarien G2*	n.b.
J1	63	Papillär-seröses Adenokarzinom der Ovarien G2-3*	n.b.
D1	83	Papillär-seröses Adenokarzinom der Ovarien G3*	n.b.
D2	84	Seröses Adenokarzinom der Ovarien G3*	n.b.
G2	63	Seröses Adenokarzinom der Ovarien G3*	n.b.

* G1 bzw. G3: Differenzierungsgrade des Tumorgewebes; G1 differenziert, G3 wenig differenziert.

Tabelle 10: PBMCs von OvCa-Patientinnen

Patienten-Identifikation	Pathologie	HLA Typ
ASZ1610	Seröses Adenokarzinom der Ovarien	A*01, A*02
HBR 1008	Tubulopapilläres Adenokarzinom der Ovarien	A*02
HHE	Zervixkarzinom	A*02
IBI	Mammakarzinom	A*02
ISI2708	seröses tubulopapilläres Adenokarzinom der Ovarien	A*02
KBR	Seröses Adenofibrom	A*02
MPO	Nicht bekannt	A*02
PGSC2603	Seröses Adenokarzinom der Ovarien	A*02
SKR1007	Seröses Adenokarzinom der Ovarien	A*02

B.1.10 Peptide

Theoretischer Hintergrund:

Die Aminosäuresequenz der untersuchten Tumorantigene (Kap. C.1) wurde in die MHC-Datenbank *SYFPEITHI* (Rammensee et al. 1999) eingegeben und 4-23 HLA-A*02-restringierte Peptide pro Tumorantigen, mit der höchsten Wahrscheinlichkeit (*score*) an das MHC-I-Molekül zu binden, ausgewählt. Sie wurden nach Standard-Fmoc-Chemie von Patricia Hrstic in der Abteilung der Molekularen Immunologie hergestellt und durch HPLC- und MS-Analyse auf Identität und Reinheit überprüft. Die Peptide sind in Tabelle 11 gelistet. Für die Rückfaltung der Monomere wurden die Peptide in DMSO in einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst. Für alle Anwendungen in der Zellkultur wurden die Peptide zuerst in DMSO in einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst, und daraufhin mit Bidest auf 1 mg/ml verdünnt.

B Material und Methoden

Tabelle 11: Peptide

Antigen	Sequenz	Position	Antigen	Sequenz	Position
L1CAM	LLANAYIYVV	413-422	SPAG9	QLLETKNAL	419-427
	RINGIPVEEL	367-376		SLLGGITVV	837-845
	SLNGDIKPL	1194-1202		AIIESTPEL	343-351
	SLADYGGSV	1207-1215		ALADGTLAI	1016-1024
	ALQQQPLVL	254-262		ELMPLVVAV	49-57
	ILNSSAVLV	823-831		DLIAKVDEL	433-441
	LLLRWQPPL	934-942		HLKFRISHEL	297-306
Neuro- medin U	PLLQLVPHL	126-134		RLIGRYDEEV	37-46
	AASPLLLLL	18-26		VLQGELEAV	447-455
	ALEELCFMI	77-85		FLSEETEASL	609-618
	SVVHPLLQL	122-130		VMSERVSGL	19-27
	GLQPEQQLQL	45-53		AVLENLDSV	56-64
Jagged 2	SLLLAVTEV	1060-1068		LILENTQLL	413-421
	AICSGIRSL	990-998		KLKDSILSI	998-1006
	LLAVTEVKV	1062-1070		SLAKLTTL	789-797
	LLAGQPEAL	912-920		SLPGHTAPV	13781-13789
	WLACVLCV	1095-1113	KLTRGIIEL	15605-15613	
	LLLLLALWV	13-21	NLTNGIQEL	14825-14833	
	CLKEYQAKV	74-82	SLATSQVTL	9671-9679	
	NLLHGGCTV	250-258	LILPGLVKT	9762-9770	
	RLPRLLLL	8-16	SLTSGLREI	8707-8715	
Testisin	ALLLARAGL	10-18	ALPRTPPSV	10554-10562	
	SLLSHRWAL	70-78	KMISAIPTL	11192-11200	
	ALVKLSAPV	139-148	TISPGIPGV	11312-11320	
	GLWYQIGVV	248-256	LLTSGLVKI	5073-5081	
	RLWDSHVCGV	60-69	DMLASVASL	6556-6564	
	LLFFPLLWAL	299-308	VLQGLLGPL	14136-14144	
	TLQEVQVAII	190-199	GIPGVLTSL	11316-11324	
VEGF	LLSWVHWSL	4-12	GLLETTGLL	11872-11880	
	ALLLYLHHL	13-21	VLQGLLRSL	21311-21319	
	FLLSWVHWSL	3-12	VILIGLAGL	22100-22108	
	YIFKPSCVPL	71-80	YLGQCQLISL	21768-21776	
Mesothelin	LLGPGPVLTV	611-620	QLYWELSKL	20587-20595	
	ALAQKNVKL	88-96	QLTHGITEL	21062-21070	
	LLSEADVRAL	176-185	TLASPTSSV	63-71	
	VLPLTVAEV	539-547	WLWDLTTSL	2051-2059	
	SLSPEELSSV	451-460	SLATEANTV	7556-7564	
	SLLFLLFSL	20-28	Osteo- pontin	NLLAPQNAV	53-61
YLLPAIVHI	148-156	QLYNKYPDAV		31-40	
		VIDSQELSKV		260-269	
		CLLGITCAI		9-17	
RNA- Helikase p68			VICFLLGI	5-13	

B.2 Molekularbiologische Methoden

Alle Reaktionsansätze erfolgten unter einer sterilen Glocke, die vor jedem Ansatz einschließlich der verwendeten Pipetten und des Plastikmaterials UV-bestrahlt wurde, um Kontaminationen mit DNA zu vermeiden.

B.2.1 Isolierung der RNA aus Tumorzellen

Materialien:

75 cm² Zellkulturflasche mit konfluentem Zellbewuchs
oder

ca. 0,5 cm² primäres Tumorgewebe

Reaktionsgefäß 1,5 ml (Eppendorf)

TRIZOL[®] Reagent (Invitrogen)

Chloroform (SIGMA)

Glycogen (Roche)

Isopropanol (Merck)

nukleasefreies Wasser (Promega)

Theoretischer Hintergrund:

TRIZOL[®] ist eine Phenol-haltige Lösung, die zusätzlich Guanidinium-Isothiocyanat und β -Mercaptoethanol enthält. Neben der Fähigkeit Zellen zu lysieren, ist Guanidinium-Isothiocyanat ein potenter RNase-Inhibitor. Anschließend wird die RNA durch Zugabe von Chloroform zur Phenol-haltigen Lösung unter sauren Bedingungen extrahiert. Hierbei verbleiben die DNA und Proteine in der organischen und Interphase während sich die RNA in der wässrigen Phase sammelt. Mit Hilfe von Isopropanol wird die RNA anschließend gefällt. Die Zugabe eines "Carriers" (Glycogen) führt dazu, dass das RNA-Pellet deutlich sichtbar ist und die weiteren Arbeitsschritte erleichtert werden.

Durchführung:

Die Isolation von RNA aus OvCa Zelllinien erfolgte zum Zeitpunkt der Zellkonfluenz. Die Zellen wurden einmal mit PBS gespült und anschließend mit Trypsin/EDTA vom Zellkulturflaschenboden abgelöst. Die Zellen wurden zentrifugiert und das Pellet in 1 ml TRIZOL[®] resuspendiert und bei -80°C eingefroren. Zur Isolation von RNA aus primärem Tumorgewebe wurde das frische Tumorgewebe in Trizol gegeben und mittels zweier Objektträger zu einer Einzelzellsuspension zerrieben. Auch diese Proben wurden bei -80°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden 200 μ l Chloroform zugefügt und die Suspension für

15 s kräftig geschüttelt. Nach einer Inkubation von 2 min bei RT wurde die Suspension für 15 min bei 12000xg und 4°C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nun wurden 1 µl Glycogen und 500 µl Isopropanol zugefügt und weitere 10 min bei RT inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 12000xg und 4°C. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet mit 1 ml 75%-igem Ethanol gewaschen. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 8500xg bei 4°C wurde der Überstand vollständig abgenommen und das Pellet trocken gelassen. Schließlich wurde die RNA in 40 µl RNase freiem Wasser aufgenommen und für 10 min bei 56°C linearisiert. Die Menge und Konzentration der isolierten RNA wurde spektralphotometrisch bestimmt. Hierfür wurde ein Aliquot entnommen und 1:20-1:50 verdünnt. Die Absorption von 1 Unit bei $\lambda=260$ nm (A_{260}) entspricht 40 µg/ml RNA. Daraus folgt für die Berechnung der Konzentration $C = 40 \times A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor}$. Zur Bestimmung der Reinheit der Präparation erfolgte zusätzlich die Messung der Absorption bei $\lambda=280$ nm (A_{280}). Über die Ratio A_{260}/A_{280} konnte die Reinheit der RNA abgeschätzt werden. Die Ratio sollte 1,8 - 2,1 betragen.

B.2.2 cDNA-Synthese

Materialien:

RNA der zu untersuchenden Zellen
Kontroll RNA: Human Ovary Total RNA (Ambion)
DTT (Invitrogen)
dNTP (Invitrogen)
Random Primer (Invitrogen)
RNasin (Promega)
5x Puffer (Invitrogen)
nukleasefreies Wasser
RT-Enzym: Superscript II (Invitrogen)

Theoretischer Hintergrund:

Bei der cDNA-Synthese wurde RNA in komplementäre DNA umgeschrieben. Dies erfolgte durch Bindung von Random-Primern an die Sequenz der mRNA und anschließender Synthese des komplementären Strangs durch das Enzym Reverse Transkriptase im mitgelieferten Puffer. DTT wurde zugegeben, um Sekundärstrukturen innerhalb der RNA aufzulösen. Um RNasen während der Reaktion zu unterdrücken, wurde ein RNaseinhibitor (RNasin) der Reaktion zugefügt.

Durchführung:

Die cDNA Synthese erfolgte mit dem Superscript II Kit TM von Invitrogen in einem Endvolumen von 20 µl. Hierfür wurde zunächst 1 µg RNA mit 1 µl 50 ng/µl Random Primer und nukleasefreiem Wasser 10 min bei 70°C denaturiert. Anschließend erfolgte ein Inkubationsschritt auf Eis für 3 min. Für die anschließende Synthese bei 42°C für 60 min wurden 2 µl 100 mM DTT, 2 µl 5x Puffer, 2 µl 5 mM dNTP, 10 U RNasin und 1 µl RT-Enzym zugegeben. Nach erfolgter Synthese wurde das RT-Enzym bei 93°C für 5 min inaktiviert.

B.2.3 Qualitative RT-PCR

Materialien:

dNTP (Life Technologies)

Taq-DNA-Polymerase: HotStar Taq (Qiagen)

10x Puffer (Qiagen)

MgCl₂ (Qiagen)

nukleasefreies Wasser

Molekulargewichtsmarker, peqGOLD 100-10.000 bp (peqlab Biotechnologie GmbH)

6x Probenpuffer (Promega)

Agarose (Roth)

Ethidiumbromid (Roth)

TAE-Puffer (Promega)

Tabelle 12: spezifische Primer (MWG-Biotech)

Antigen	Sense 5' 3' Antisense 5' 3'	Produkt -größe [bp]	TA [°C]	Annea- ling [min]	MgCl ₂ [mM]	Zyklen	Elonga- tion [min]	Referenz
WT1	ggc atc tga gac cag tga gaa gcg act cag act tga aag cag t	482	65	2	1,5	35	1	Kobayashi et al. 2005
Her- 2/neu	cat caa ctg cac cca ctc ct gca gca gtc tcc gca tgg tg	194	64	2	1,5	35	1	Greiner et al. 2004
NY-ESO- 1	ccc cac cgc ttc ccg tg ctg gcc act gtg gct ggg a	274	60	2	1,5	35	1	Lethe et al. 1998
EpCAM	cag gaa gaa tgt gtc tgt g cca gcg aca cac att tgt aa	956	58	2	1,5	35	1	Xin Xie et al. 2005
L1CAM	acg ggc aac aac agc aac cgg ctt cct gtc aat cat g	429	58	2	1,5	35	1	Gavert et al. 2005
Testisin	ctg act tcc atg cca tcc tt gct tca cga ctc caa tct gat	464	55	0.5	1,5	35	0.75	Manton et al. 2005
CA 125	agt gtc ctt gtg gat ggg ta gat cct cca ggt cta ggt gt	229	62	0.5	1,5	40	0.5	Corrales et al. 2003
β-Actin	ggc atc gtg atg gac tcc g gct gga agg tgg aca gcc ga	610	68	0.5	1,5	20	2	De Smeth et al. 1994

Theoretischer Hintergrund:

Zum Nachweis des jeweiligen TAA in der PCR wurden mit sequenzspezifischen Primern für WT1, Her-2/neu, EpCAM, L1CAM, CA 125, Testisin und NY-ESO-1 die Zielsequenzen der cDNA in getrennten Reaktionsansätzen amplifiziert (Tab. 12)). Ein Ansatz mit Primern für β -Actin wurde für jede synthetisierte cDNA mitgeführt.

Durchführung:

Die Reaktionsansätze zur Amplifikation von WT1, Her-2/neu, EpCAM, L1CAM, CA 125, Testisin und NY-ESO-1 setzten sich wie folgt zusammen: 1 μ l cDNA aus der reversen Transkription, spezifische Primer 500 nM, 20 μ M dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 1,25 U Taq-DNA-Polymerase und 5 μ l 10x Puffer ad 50 μ l nukleasefreies Wasser. Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler nach den in Tabelle 8 angegebenen Amplifikationsbedingungen. Zur Auswertung wurden 15 μ l des PCR-Produktes und ein Molekulargewichtsmarker mit 6x Probenpuffer auf ein 1,5%-iges mit Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel in TAE-Puffer aufgetragen und die DNA in einer 12x14 cm Gelkammer bei einer angelegten Spannung von 100 V entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Nach dem Gellauf wurden die Gele unter UV-Licht ($\lambda=260\text{nm}$) photographisch dokumentiert. Ausgewertet wurde hinsichtlich des Vorhandenseins oder Nicht-Vorhandenseins des entsprechenden Signals ohne Quantifizierung.

B.2.4 Quantitative RT-PCR

Materialien:

SYBR[®]-Green-PCR-Master-Mix (Applied Biosystems)

TaqMan[®]-Universal-PCR-Master-Mix (Applied Biosystems)

96 Well- MicroAmp[®]-Platten, optische Platten und Deckel (Applied Biosystems)

B Material und Methoden

Tabelle 13: spezifische Primer und Sonden (MWG-Biotech)

PCR Methode	Antigen	Sense 5' 3'	Antisense 5' 3'	Referenz
SYBR®-Green	L1CAM	acg ggc aac aac agc aac	cgg ctt cct gtc aat cat g	(Gavert et al. 2005b)
	NMU	aca gcc tga aca aca gct aca	tgc cca act tct gtg tct tc	(Euer et al. 2005)
	Jagged2	gggtcg tac ttg cac tca ca	ccg ttg atc tca tcc aca ca	(Euer et al. 2005)
	VEGF	aac atc acc atg cag att atg c	ggc ttg tca cat ttt tct tgt c	(Weinzierl et al. 2008)
	18s-RNA	cgg cta cca cat cca agg aa	gct gga att acc gcg gct	(Weinzierl et al. 2008)
fluoreszenz-markierte Sonde	hTERT	tga cac ctc acc tca ccc ac	cac tgt ctt ccg caa gtt cac	(Hu et al. 2004)
	Sonde	FAM acc ctg gtc cga ggt gtg tcc ctg a TAMRA		
	Survivin	tgc ccc gac gtt gcc	cag ttc ttg aat gta gag atg cgg t	(Vallbohmer et al. 2005)
	Sonde	FAM cct ggc agc cct ttc tca agc acc TAMRA		
	18s-RNA	cgg cta cga cat cca cgg aa	gct gga att acc gcg gct	(Riker et al. 2000)
	Sonde	FAM tgc tgg cac cag act tgc cct TAMRA		

Theoretischer Hintergrund:

Die RNA-Isolierung, Konzentrationsbestimmung und cDNA Synthese erfolgten wie unter Kapitel B.2.1. und B.2.2.. beschrieben. Die quantitative RT-PCR (qRT-PCR) erfolgte mittels Echtzeit PCR im Taqman-Cycler 7700 SDS. Das Prinzip der Quantifizierung im 7700 SDS-Cycler besteht darin, dass es während der Amplifikation zum Anstieg eines gekoppelten Fluoreszenzsignals kommt, das im Gerät während der Dauer der gesamten Amplifikation aufgenommen wird. Über eine im Gerät integrierte Software wird die logarithmische Fluoreszenzzunahme in Abhängigkeit der Zykluszahl als Amplifikationskurve dargestellt. In der anschließenden Analyse wird eine Gerade, der sogenannte Schwellenwert, durch den linearen Bereich der Kurven gelegt. Der Schnittpunkt dieser Geraden mit den Amplifikationskurven wird als CT-Wert bezeichnet. Der CT-Wert drückt die Zykluszahl aus, bei der erstmals ein Anstieg der Fluoreszenz über die Grundlinie erfasst wird. In diesem PCR-System mit 100%-iger Effizienz nimmt der CT-Wert mit jeder Verdopplung der Startkopienzahl um einen Zyklus an. Zwei Möglichkeiten der Echtzeit-PCR kamen in dieser Arbeit zur Anwendung:

1. SYBR[®]-Green im PCR-Ansatz

Ähnlich wie Ethidiumbromid kann SYBR[®]-Green mit DNA interkalieren und bei bestimmten Wellenlängen Licht emittieren. Die Zugabe von SYBR[®]-Green im PCR-Ansatz führt während der Amplifikation zu einer parallelen Zunahme des Fluoreszenzsignals. Mit dieser Methode wurden Expressionsanalysen in Tumorzellen auf L1CAM, NMU und Jagged2 durchgeführt.

2. Fluoreszenzmarkierte Sonden

Bei dieser Methode wird neben sequenzspezifischen Primern eine spezifische Sonde zugegeben, die innerhalb der Zielsequenz bindet, die nach Primer-Bindung amplifiziert wird. Die Sonde ist am 5'-Ende mit einem Reporter-Farbstoff und am 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff markiert. Bei Anregung der Sonde unter einer spezifischen Wellenlänge wird die Fluoreszenz durch die räumliche Nähe von Quencher und Reporter durch einen sogenannten Fluoreszenz-Energie-Transfer-Effekt (FET) verhindert. Binden Primer und Sonde an die Zielsequenz, erfolgt in der Extensionsphase der PCR eine Veränderung der Sonde durch die Taq-Polymerase. Hierbei kommt es zur Ausbildung einer Sekundärstruktur, die zur Aktivierung der 5'3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase führt. Über diese enzymatische Aktivität wird die Sonde hydrolysiert und die räumliche Nähe von Reporter und Quencher aufgehoben. Die damit verbundene Inaktivierung des FET-Effektes führt zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals, das proportional zur Akkumulation des PCR-Produktes ist. Mit dieser Methode wurden Expressionsanalysen in Tumorzellen auf hTERT, Survivin und VEGF durchgeführt.

Durchführung:

Für die Expressionsnachweise auf L1CAM, NMU, Jagged 2 und 18s-rRNA als Referenz (L1CAM Primer freundlicherweise bereit gestellt von P. Altevogt, DKFZ, Heidelberg) wurden die in Tabelle 13 aufgeführten sequenzspezifischen Primer verwendet. Der PCR-Ansatz erfolgte mit SYBR[®]-Green-PCR-Master-Mix. Für die Expressionsnachweise auf hTERT, Survivin, VEGF und 18s-rRNA als Referenz (VEGF und 18s-RNA Primer freundlicherweise bereit gestellt von A. Weinzierl, Abt. Immunologie, Tübingen) wurden die in Tabelle 13 aufgeführten sequenzspezifischen Primer sowie Sonden, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAM und dem Quencher TAMRA markiert waren, verwendet. Der PCR-Ansatz erfolgte mit TaqMan[®]-Universal-PCR-Master-Mix. Beide Ansätze wurden in 96 Well- MicroAmp[®]-Platten pipettiert und die cDNA wurde 1 : 100 verdünnt in die PCR eingesetzt. Untersucht

B Material und Methoden

wurde in getrennten Reaktionsansätzen das jeweilige TAA und 18sRNA zur Normierung der Expression. Die Reaktionsansätze für SYBR[®]-Green waren wie folgt: 5 µl 1 : 100 verdünnte cDNA, je 300 nM spezifische Primer, 10 µl 2x SYBR[®]-Green-PCR-Master-Mix ad 20 µl nukleasefreies Wasser. Die Reaktionsansätze für die fluoreszenzmarkierten Sonden waren wie folgt: 5 µl 1 : 100 verdünnte cDNA, je 400 nM spezifische Primer, 150 nM Sonde, 10 µl TaqMan[®]-Universal-PCR-Master-Mix ad 20 µl nukleasefreies Wasser. Die Amplifikation im Sequenz-Detektor erfolgte für beide Ansätze unter folgenden Bedingungen:

1 Zyklus

50°C: 2 min

95°C: 10 min

40 Zyklen:

95°C: 15 s

60°C: 1 min

Von Doppelbestimmungen in der PCR wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der ermittelten CT-Werte berechnet. Die L1CAM, NMU und Jagged2 Expressionen wurden über die Expression der 18s-RNA normiert. Angegeben wurde die relative Expression von L1CAM, NMU und Jagged2 als Vielfaches der Expression, die auf Ovarial Normalgewebe (OvaNG) ermittelt wurde.

Damit gilt:

$$\text{Relative Expression} = 2^{-((\text{CT}(*\text{TAA})-\text{CT}(\text{TAA OvaNG}))-(\text{CT}(*18\text{sRNA})-\text{CT}(18\text{sRNA OvaNG})))}$$

CT: Zyklenzahl, bei der erstmals ein Anstieg der Fluoreszenz über die Grundlinie erfasst wird

CT (*TAA): ermittelter CT-Wert für L1CAM, NmU oder Jagged2 der zu untersuchenden Zelllinie

CT (TAA OvaNG): ermittelter CT-Wert für L1CAM, NmU oder Jagged2 der OvaNG Kontrolle

CT (*18s-RNA): ermittelter CT-Wert für 18s-RNA der zu untersuchenden Zelllinie

CT (18s-RNA OvaNG): ermittelter CT-Wert für 18s-RNA der OvaNG Kontrolle

B.3 Proteinbiochemische Methoden

B.3.1 Herstellung von Zelllysaten aus Tumorzellen

Materialien:

75 cm² Zellkulturflasche mit konfluentem Zellbewuchs

oder

ca. 0,5 cm² primäres Tumorgewebe

PBS

RIPA Puffer (*“Radioimmunoprecipitation assay”*-Puffer): 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 1% Natriumdeoxycholat, 0,1% SDS

Durchführung:

Die Herstellung von Zelllysaten aus den verschiedenen Zelllinien bei adhärennten Zellen erfolgte aus jeweils einer 75 cm² großen Zellkulturflasche zum Zeitpunkt der Zellkonfluenz. Die Zellkulturflaschen wurden auf Eis gestellt und 2x mit eiskaltem PBS gewaschen. Dann wurden 500 µl des RIPA-Lysepuffers pro Flasche zugegeben und mit einem Zellschaber die Zellen vom Boden abgelöst. Bei Suspensionszellen wurde das Medium mit den Zellen vollständig abgenommen, zentrifugiert (300xg, 5 min, 4°C), 1x mit eiskaltem PBS gewaschen, nochmals zentrifugiert und dann das Zellpellet in 500 µl RIPA-Puffer resuspendiert. Bei adhärennten Zellen und Suspensionszellen wurde die Zelllösung in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 4°C für 15 min auf einem Rotator inkubiert. Zur Herstellung von Zelllysaten aus primärem Tumorgewebe wurde das frische Tumorgewebe in RIPA Puffer gegeben und mittels zweier Objektträger zu einer Einzelzellsuspension zerrieben. Die so gewonnene Zellsuspension wurde bei -80°C gelagert. Entweder nach der Rotation oder dem Auftauen wurden die Zelllysate für 15 min bei 12000xg und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand mit den darin gelösten Proteinen für weitere Experimente verwendet, beziehungsweise bei -20°C gelagert.

B.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mit der Bradford-Methode

Materialien:

96 Wellplatte, Flachboden

BSA

Bradfordreagenz

Theoretischer Hintergrund:

Die Bradford-Methode dient zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den unterschiedlichen Zelllysaten und beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximum des im Bradfordreagenz befindlichen Farbstoffes Coomassie nach Anlagerung an Proteine von 465 nm nach 595 nm. Diese Verschiebung lässt sich mit einem Spektrometer messen und dabei gilt, je mehr Protein sich in der Lösung befindet, desto höher ist die Intensität bei 595 nm. Anhand einer Eichkurve und der gemessenen Absorption lässt sich dann die Proteinkonzentration berechnen.

Durchführung:

Die Eichkurve wurde in diesem Fall mit verschiedenen BSA-Konzentrationen erstellt, die sich auf 0 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 60 µg/ml, 80 µg/ml und 100 µg/ml beliefen. Das Bradfordreagenz wurde zuvor im Verhältnis 1:5 mit Bidest und die Proteinproben im Verhältnis 1:100 und 1:1000 verdünnt. Das Bradfordreagenz wurde dann im Verhältnis 1:5 mit den Proteinproben und der BSA-Standardreihe vermischt. Von den Proteinproben wurden jeweils Triplets gemessen und der Mittelwert für die Berechnung der Proteinkonzentration verwendet. Die Zelllysate wurden anschließend für den Nachweis der verschiedenen Tumorantigene im Western-Blot verwendet. Dafür wurden pro Experiment jeweils 50 µg Protein eines Zelllysats eingesetzt.

B.3.3 SDS-Gelelektrophorese

Materialien:

Sammelgel-Puffer pH 6,8: Bidest, 1,0 M Tris-HCl

SDS-Auftragspuffer (6x): 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 25% Glycerol, 10% β-Mercaptoethanol, 2% SDS, 0,01% Bromphenolblau

SDS-Elektrophoresepuffer: Bidest, 1,9 M Glycin, 25 mM Tris-OH, 10% SDS

Trenngel-Puffer pH 8,6: Bidest, 1,5 M Tris-HCl

Tabelle 14: SDS-Gellösungen

	4,5%-ige Sammelgellösung	10%-ige Trenngellösung	12%-ige Trenngellösung
Acrylamid 29:1, 40%	0,65 ml	2,5 ml	3,0 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,6	-	2,5 ml	2,5 ml
1,0 M Tris/HCl pH 6,8	0,612 ml	-	-
10% SDS	0,05 ml	0,1 ml	0,1 ml
H ₂ O	3,7 ml	4,9 ml	4,4 ml
TEMED	0,01 ml	0,01 ml	0,01 ml
10% APS	0,025 ml	0,05 ml	0,05 ml

Theoretischer Hintergrund:

Bei der SDS-Gelelektrophorese, auch SDS-PAGE (*sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) genannt, werden negativ geladene Proteine in einem Polyacrylamidgel durch ein elektrisches Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Da durch Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen die Größe der Proteine trotz vergleichbarer Aminosäureanzahl stark schwankt, ist es nötig die Proteinproben vor der Auftrennung in einem Auftragspuffer, der als Reduktionsmittel β -ME und SDS enthält, zu denaturieren. Die Kombination aus Hitze und β -ME führt dazu, dass die Wasserstoffbrückenbindungen und kovalente Sekundärstrukturen wie Disulfidbrücken zerstört werden. SDS steht für Natriumdodecylsulfat und ist ein Detergens, das dafür sorgt, dass alle Proteine eine negative Gesamtladung bekommen. Je nachdem, in welchem Größenbereich die nachzuweisenden Proteine liegen, werden Gele mit unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen verwendet. Die eingesetzte Acrylamidkonzentration betrug 10% bei Proteinen größer als 150 kDa und 12% für Proteine kleiner als 150 kDa. Das Polyacrylamidgel setzte sich aus zwei unterschiedlichen Gelen zusammen: einem oberen Sammelgel und einem darunter liegenden Trenngel (Tab. 14) Das Sammelgel hatte einen niedrigeren Acrylamidgehalt (4-4,5%), und dient zum „Sammeln“ der aufgetragenen Proben damit alle denselben Ausgangspunkt für eine Auftrennung haben. Im Trenngel hingegen geschieht die eigentliche Auftrennung der Proteine. Die Zugabe des Reaktionsstarters APS und des Katalysators TEMED sorgten für die Polymerisation zu einem festen Gel.

Durchführung:

Zunächst wurde das Trenngel hergestellt und im flüssigen Zustand mit Isopropanol überschichtet, um einen waagerechten oberen Abschluss des Gels zu erreichen. Nach der Polymerisation konnte das Sammelgel auf das Trenngel gegossen werden und noch vor der Polymerisation des Sammelgels ein Gelkamm eingesetzt werden, der später die Geltaschen

B Material und Methoden

bildet, in die jeweils eine Proteinprobe pipettiert wurde. Die Proben wurden zusammen mit 5 µl SDS-Auftragspuffer bei 96°C für 10 min aufgeköcht. Zusammen mit den Proteinproben wurden 4 µl des Proteinstandards geladen, um die ungefähre Größe der nachzuweisenden Proteine zu ermitteln. Bis die Proben das Sammelgel durchlaufen haben wurde eine Spannung von 100 V angelegt. Danach wurde das Gel für 1h bei 120 V laufen gelassen.

B.3.4 Westernblot

Materialien:

TBS-T: Bidest, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-OH , 0,05% Tween 20

Blockierungspuffer: TBS-T, 5% Milchpulver

Primär-Antikörperlösung: 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 5% Milchpulver, 2% BSA, 0,1% Tween 20, 0,01% Natriumazid

Transferpuffer: Bidest, 0,2 M Glycin , 20 mM Tris-OH, 20% Methanol

Filterpapiere, Whatman (GE Healthcare)

Nitrozellulose Membran, Hybond ECL (Elektrochemolumineszenz) (GE Healthcare)

ECL-Film, Hyperfilm (GE Healthcare)

Tabelle 15: Erst-Antikörper (anti-human)

Spezifität	Ursprung (Klon)	Isotyp	Endkonzentration	Herkunft
CA125	Maus, monoklonal (X75)	IgG1	14,8 µg/ml	HyTest
COX IV, HRP konjugiert	Maus, monoklonal (20E8)	IgG2a	2,5 µl/ml	Abcam
Mesothelin	Maus, polyklonal	n.a.	1:1000	Abnova
Osteopontin	Maus, monoklonal (1B20)	IgG1	2 µg/ml	IBL
SIX1	Maus, polyklonal	IgG	1:1500	Lifespan Biosciences
SPAG9	Ziege, polyklonal	IgG	1:200	Santa Cruz, Biotech.

Tabelle 16: Zweit-Antikörper, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase.

Spezifität	Ursprung (Klon)	Isotyp	Endkonzentration	Herkunft
anti-Maus	Ziege, polyklonal	IgG	1:10000	Dianova
anti-Ziege	Kaninchen, polyklonal	IgG	1:10000	Dianova

Theoretischer Hintergrund:

Die Western-Blot-Methode erlaubt die immunologische Identifizierung eines Proteins aus einem Proteingemisch, das zuvor mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurde. Damit der spezifische Antikörper an das nachzuweisende Protein binden kann, müssen die aufgetrennten und negativ geladenen Proteine von dem SDS-Gel durch ein elektrisches Feld auf eine Nitrozellulosemembran transferiert werden. Die Durchführung des Western-Blots erfolgte mit der *semi dry*-Methode. Dabei lagen SDS-Gel und Nitrozellulosemembran zwischen zwei Plattenelektroden und wurden von jeweils drei Lagen feuchtem Filterpapier umgeben. Das SDS-Gel befand sich auf Seite der Kathode, damit bei angelegter Spannung die negativ geladenen Proteine in Richtung Anode liefen und dabei auf die Nitrozellulosemembran transferiert wurden. Die Filterpapiere wurden in einem Transferpuffer eingeweicht, der der Leitfähigkeit diente. Das im Transferpuffer enthaltene Methanol sorgte zusätzlich dafür, dass sich das SDS nach und nach von den Proteinen ablöste, so dass diese optimal an die Nitrozellulosemembran binden konnten. Bei der Inkubation in Blockierungspuffer lagerten sich die im Milchpulver enthaltenen Proteine an die noch frei gebliebenen Stellen auf der Nitrozellulosemembran und verhinderten somit eine unspezifische Bindung des Primärantikörpers. Um die Bindung des Antikörpers an das nachzuweisende Protein sichtbar zu machen, wurde ein polyklonaler Sekundär-Antikörper mit Spezifität gegen den Primär-Antikörper eingesetzt. Das Signal des Primär-Antikörpers wird dabei um ein Vielfaches verstärkt, da mehrere Sekundär-Antikörper an einen Primär-Antikörper binden können. Der Sekundär-Antikörper war an die Meerrettich-Peroxidase (engl. *horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt, das bei Anwesenheit seines chromogenen Substrats, das sogenannte ECL-Substrat (Elektrochemolumineszenz-Substrat), ein Lichtsignal erzeugt. Dieses Lichtsignal wurde von einem lichtsensitiven Film erfasst, der anschließend entwickelt wurde. Die Belichtungszeit richtete sich nach der Signalstärke.

Als Ladekontrolle diente die vierte Untereinheit der Cytochrom-c-Oxidase (COX IV). Dieses 16-kDa-große Protein ist in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert. Es wurde davon ausgegangen, dass alle hier verwendeten Zelllinien in etwa die gleiche Menge der Cytochrom C Oxidase exprimieren. COX IV wurde wegen seiner geringen Größe als Ladekontrolle gewählt. Die anderen nachzuweisenden Proteine haben ein höheres Molekulargewicht, so dass der gleichzeitige Nachweis von zwei Proteinen auf einer Nitrozellulosemembran erfolgen konnte. Der hier eingesetzte Primär-Antikörper gegen COX IV war bereits an die HRP gekoppelt.

Durchführung:

Die Proteine eines Gels wurden bei 42 mA innerhalb von 2h auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, bei zwei Gelen erhöhte sich die Stromstärke entsprechend auf 84 mA. Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulosemembran für 1h in Blockierungspuffer blockiert. Der jeweilige Primär-Antikörper wurde in der entsprechenden Verdünnung (siehe Tabelle 15) zu 10 ml der Primär-Antikörperlösung gegeben und die Nitrozellulosemembran über Nacht bei 4°C mit der Lösung inkubiert. Der Primär-Antikörper wurde in der Primär-Antikörperlösung bei 4°C gelagert und mehrmals verwendet. Anschließend wurde die Membran 3 x mit 10 ml TBST gewaschen und für 2h bei RT mit dem in Blockierungspuffer gelösten Zweit-Antikörper inkubiert (siehe Tabelle 16). Nach 3-maligem Waschen in 10 ml TBS-T wurde die Membran mit 500 µl ECL und 500 µl ECL Reagenz beträufelt. Nach Belichtung eines ECL-Films zwischen 2 min und 1h wurde der Film entwickelt.

Der Antikörper gegen COX IV wurde erst nach dem Nachweis des eigentlichen Proteins auf die Membran gegeben. Nach 2h Inkubation und mehreren Waschschritten erfolgte eine erneute Zugabe des ECL-Reagenz und es konnte ein weiterer Film auf die Membran gelegt und anschließend entwickelt werden.

B.3.5 Rückfaltung von MHC Klasse I-Monomeren

Materialien:

reduziertes Glutation (SIGMA)

oxidiertes Glutation (SIGMA)

PMSF (1000x): Methanol (Merck) mit 200 mM PMSF

Rückfaltungspuffer, pH 7.76 bei 10°C, bei 121°C sterilisiert: ddH₂O mit 6.97% L-Arginin (SIGMA),

2.38% HEPES (Roth), 2 mM EDTA (Roth)

DMSO (Merck)

Peptid

Schwere MHC-Kette von HLA-A*0201

Leichte MHC-Kette, β₂-Mikroglobulin

Ureapuffer: ddH₂O mit 8 M Urea (UBC), 10 mM Tris pH 8.0 (SIGMA), 10 mM NaH₂PO₄ (Merck), 0.1

mM EDTA

Injektionspuffer, pH 4.2: ddH₂O mit 3 M Guaninchlorid (Fluka), 10 mM Natriumacetat (SIGMA),

10 mM EDTA (Roth)

Vakuumfilter 250 ml (Millipore)

Rührzelle NMWL 10.000 (Millipore)

Filtermembran NMWL 30.000 (Millipore)

Amicon Ultra-15 (Millipore)

Leupeptin (Roche)

Pepstatin 1000x: Methanol (Merck) mit 0.07% Pepstatin

Tris (SIGMA)

ATP (SIGMA)

D-Biotin (SIGMA)

TBS, pH 8.0, bei 121°C sterilisiert: 20 mM Tris mit 150 mM NaCl (Merck)

TBSA: TBS mit 0.03% Natriumazid (Merck)

Theoretischer Hintergrund:

Denaturierte Proteine können sich unter reduzierenden Bedingungen und bei passendem pH-Wert spontan in ihre natürliche Konformation zurückfalten. Hierbei können auch Proteinkomplexe entstehen, falls deren Untereinheiten vorhanden sind. Um MHC-I-Peptid-Komplexe durch Rückfaltung herstellen zu können, benötigt man große Mengen an denaturierter schwerer Kette, $\beta 2$ Mikroglobulin und Peptid, da der Komplex nur in Anwesenheit aller drei Komponenten stabil vorliegen kann. Dieser Komplex ist in seiner fertig gefalteten Struktur dann sehr stabil. Ein Problem bei dieser Rückfaltung ist die Neigung der schweren MHC-Ketten Aggregate zu formen, welche dann aus der Lösung ausfallen. Um diesen Prozess unter Kontrolle zu halten, findet die Rückfaltung in einem argininhaltigen Puffer mit wenigen chaotropen Komponenten statt. Die benötigten proteinen Elemente für diese Reaktion werden in stark chaotropem, harnstoffhaltigem Puffer gelagert. Vor der Rückfaltung wird ein Azidpuffer mit einem pH-Wert von 4.2 zugegeben und die Proteinlösung dann in den sich rührenden Rückfaltungspuffer injiziert. Dies geschieht so schnell wie möglich, um eine Aggregation zu verhindern. Das Redox-Potential wird durch die Zugabe von reduziertem und oxidiertem Glutation eingestellt. Weiter erfolgt die Inhibition von Proteasen durch das Hinzufügen von PMSF, Leupeptin und Pepstatin. Die schwere MHC-Kette wird mehrmals zugegeben, um den Verlust durch Aggregatbildung zu kompensieren. Nach der Rückfaltung werden Proteine und Komplexe in einem Filtrationsschritt durch eine Membran zurückgehalten. Der Durchfluss enthält ausreichende Mengen an Peptid für die Durchführung einer weiteren Rückfaltung. Trotzdem wird in unserem System nur etwa 1% der ursprünglich eingesetzten Peptidmenge in dem MHC-I-Peptid-Komplex gebunden. Dieser Komplex wird von anderen Proteinen und Aggregaten durch eine FPLC-Separation getrennt.

Durchführung:

Alle Schritte wurden auf Eis oder bei 4°C durchgeführt. Es wurden 385 mg reduziertes und 77.5 mg oxidiertes Glutation, 250 µl PMSF (1000x), 2.5-7.5 mg/ml des gewünschten Peptides (10 mg/ml in DMSO) in 250 ml Rückfaltungspuffer gelöst. Danach wurden 8 mg schwere MHC-Kette (20 mg/ml in 8 M Ureapuffer) in 700 µl Injektionspuffer aufgenommen und mit Hilfe einer Spritze und einer 26 G Nadel in den sich rührenden Rückfaltungspuffer gegeben. Die gleiche Vorgehensweise wurde im Anschluss mit 7 mg der leichten MHC-Kette, in 780 µl Injektionspuffer, durchgeführt. Die Lösung wurde nun für etwa 12h bei 10°C schüttelnd inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden noch 2x je 8 mg schwere MHC-Kette zugegeben. Dies geschah in einem Abstand von 12h. Jetzt wurde die Lösung mit einem 0.22 µm Vakuumfilter filtriert und anschließend in eine Rührzelle gegeben und mit 60 psi unter Druck gesetzt. Zuvor wurde die Rührzelle mit 200 ml ddH₂O gespült. Das Permeat wurde aufgesammelt und später weiter verwendet (siehe unten). Das Retentat wurde auf ein Volumen von etwa 25 ml mit Permeat aufkonzentriert. Die Membran der Rührzelle wurde in einer Petrischale bis zu ihrer späteren Verwendung in TBSA gelagert. Zu den aufgesammelten Permeaten wurden 250 µl PMSF (1000x) gegeben und erneut 8 mg schwere MHC-Kette und 7 mg leichte MHC-Kette, wie bereits beschrieben, zugegeben. Die Inkubationszeit betrug anschließend wieder 12h. Nach dieser Inkubation wurden noch 2x je 8 mg schwere MHC-Kette zugegeben. Dies geschah in einem Abstand von 12 Stunden. Das Retentat und die neue Lösung wurden jetzt zusammen durch einen 0.22 µm Vakuumfilter filtriert. Das Filtrat wurde mit einer, wie bereits beschrieben, vorbereiteten Rührzelle auf ein Volumen von 25 ml aufkonzentriert. In die Rührzelle wurde die bereits verwendete Membran eingesetzt. Die 25 ml Retentate wurde mit Hilfe eines Amicon Ultra-15 und der Zentrifugation bei 3200xg für je 5 min stufenweise auf ein Finalvolumen von 5-6 ml aufkonzentriert. Hierdurch wurden entstandene Komplexe, bestehend aus der schweren MHC-Kette, entfernt. Zur Reinigung des Monomers wurde nun ein FPLC-Lauf mit einer S75 Säule durchgeführt. Hierbei wurde das zuvor bei 3200xg für 5 min zentrifugierte Retentate auf die Säule geladen und Fraktionen von 5 ml des gesamten Laufes (100-200 ml) gesammelt. Die Fraktionen, die das Monomer enthalten wurden gepoolt und mit PMSF, Leupeptin sowie Pepstatin versetzt. Das Volumen wurde anschließend mit Hilfe eines Amicon Ultra-15 und der Zentrifugation bei 3200xg stufenweise auf 5 ml eingeeengt. Zur Biotinilierung der Monomere wurde zunächst 400 µl Tris-Lösung (1 M; pH 8) und 250 µl ATP (100 mM) zugegeben. Nach dem Mischen der Reagenzien wurden noch 10-20 µg BirA Enzyme und 28.5 µl Biotin-Lösung (100 mM) zugegeben. Nach wiederholtem Mischen wurde die Lösung für 12-16h bei 27°C im Wasserbad inkubiert. Erneut wurde ein FPLC-Lauf, wie bereits beschrieben, durchgeführt und die Fraktionen mit dem biotiniliertem Monomer gesammelt.

Auch hier wurden wieder PMSF, Leupeptin sowie Pepstatin zugegeben und durch NaN_3 (0,1% Finalkonzentration) und EDTA (2 mM Finalkonzentration) ergänzt. Ein mit 5 ml TBSA equilibriertes Amicon Ultra-15 wurde zum Aufkonzentrieren des Monomers auf 250-300 μl , sowie der Abtrennung von entstandenen Komplexen der schweren MHC-Kette verwendet. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration wurde diese mit Permeat auf 2 mg/ml eingestellt. Die Monomere wurden in Aliquots von je 50 μg bei -80°C gelagert.

B.3.6 Multimerisierung von MHC Klasse I-Monomeren mittels Streptavidin

Materialien:

Konjugiertes Streptavidin PE (Invitrogen)

Theoretischer Hintergrund:

Streptavidin (aus *Streptomyces avidii*) und Avidin (aus dem Hühnerei) sind Proteine, die über je vier Bindungsstellen für Biotin verfügen. Die Bindungskonstante liegt hier bei 10^{15} mol^{-1} und ist damit eine der größten natürlich vorkommenden. Daher ist es einfach, biotinylierte Proteine über Avidin oder Streptavidin als zentrales Molekül zu Tetrameren zu verbinden. Bei der Färbung von Zellen mit diesen Reagenzien kommt es jedoch auch zu unspezifischen Bindungen an die Zelloberfläche. Bei Streptavidin (60 kDa) sind diese geringer, weshalb es in der Durchflusszytometrie bevorzugt wird und es als Fluoreszenz-Konjugat kommerziell erhältlich ist. Das hier verwendete Streptavidin war ein Konjugat mit R-Phycoerythrin (PE, 240 kDa, Extinktion 480 nm, Emission 575 nm).

Durchführung:

100 μg bei ca. $4-8^\circ\text{C}$ aufgetautes MHC-I-Monomer wurden im stöchiometrisch molaren Verhältnis von 4:1 (HLA-A*0201:Streptavidin) mit R-Phycoerythrin konjugiertem Streptavidin versetzt. Dazu wurde die berechnete Menge Streptavidin in 10 Intervallen à 10% der errechneten Gesamtmenge zugegeben und jeweils für 30 min im Dunkeln bei 4°C rotiert. Die fertige Tetramerlösung wurde bei ca. 8°C im Dunkeln gelagert. Von den Streptavidinkonjugaten wurde 157 μg je 100 μg HLA-A*0201 eingesetzt: (HLA-A*0201 MW=45 kD, Streptavidin MW=60 kD, R-Phycoerythrin MW=240 kD).

B.3.7 Kryokonservierung von HLA Klasse I-Tetrameren

Das Protokoll zur Kryokonservierung von HLA-Klasse-I Tetrameren wurde von J.Nouta vom Leiden University Medical Center zur Verfügung gestellt.

Material:

Für 1 ml 3x Einfriermedium:

HSA 75 µl einer 20%igen Stocklösung

NaN₃ 6 µl einer 10%igen Stocklösung

Protease Inhibitor 1x 120 µl einer 25x Stocklösung

Glycerol 480 µl einer 100%igen Stocklösung

Tris 319 µl einer 20 mM Stocklösung

Durchführung:

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Finalkonzentration eines Tetramers betrug 480 µg/ml in einem Volumen von 103.5 µl. Um die Tetramere einfrieren zu können, wurde ein Drittel des entsprechenden Volumens an Einfriermedium zugegeben und mit der Tetramerlösung gemischt. Anschließend konnten die Tetramere aliquotiert und bei -80°C eingefroren werden. Die Konzentration änderte sich durch die Zugabe des Einfriermediums bei PE-Tetrameren von 480 µg/ml auf 321 µg/ml. Einmal aufgetaut wurden die Tetramere nicht wiederholt eingefroren.

B.3.8 Aufreinigung von MHC-Liganden durch Immunpräzipitation

B.3.8.1 Herstellung der Säule

Materialien:

1 mM HCl

CNBr-activated Sepharose 4B(Amersham Pharmacia Biotech)

Kopplungspuffer: 0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3 mit NaOH eingestellt

0,1 M Glycin

Tabelle 17: Zur Kopplung verwendete Antikörper

Antikörper	MHC-Spezifität	Referenz
L243	HLA-DR	(Lampson and Levy 1980)
W6/32	HLA-A,-B,-C	(Barnstable et al. 1978)
B1.23.2	HLA-B,-C	(Rebai and Malissen 1983)
BB7.2	HLA-A*02	(Parham and Brodsky 1981)

Theoretischer Hintergrund:

Die verschiedenen Antikörper (Tab. 17) wurden im Verhältnis 1:40 (w/v) an CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelt. Die Kopplung des Antikörpers an CNBr-aktivierte Sepharose beruht auf einer nukleophilen Substitutionsreaktion, wobei das Bromid-Anion als Abgangsgruppe fungiert. Als angreifende Nucleophile dienen der Aminoterminus bzw. die ϵ -Aminogruppen von Lysin-Resten. Die Reaktion muss im Basischen stattfinden, da die Aminogruppen nicht protoniert vorliegen dürfen.

Durchführung:

Vor der Antikörper-Kopplung wurde die Sepharose in 40 ml 1 mM HCl 30 min auf dem Rotator bei RT gequollen und aktiviert. Anschließend wurde sie 2 min bei 60 x g ohne Bremse abzentrifugiert und der Überstand durch die Antikörperlösung in 40 ml Kopplungspuffer ersetzt. Diese Mischung wurde für 120 min bei RT auf dem Rotator inkubiert. Vor und nach erfolgter Kopplung wurden zur Bestimmung der Kopplungseffizienz 200 μ l der Sepharose-Antikörpermischung entnommen, die Sepharose bei 13000 rpm für 2 min abzentrifugiert (Biofuge) und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Kopplungseffizienz ergab sich aus dem Verhältnis der OD₂₈₀ am Anfang und am Ende der Kopplungszeit. Anschließend wurden die noch unbesetzten reaktiven Gruppen der Sepharose durch Zugabe von 40 ml 0,1 M Glycin ab gesättigt, die 30 min auf dem Rotator inkubiert wurde. Zum Abschluss wurde die Sepharose mit 40 ml PBS gewaschen, in eine Säule gepackt und nochmals für 30 min mit PBS bei einer Flussrate von 1,0 ml/min gewaschen.

B.3.8.2 Herstellung des Zelllysats

Materialien:

2x Lysepuffer: 200 ml PBS, 0,6% (w/v) CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propansulfonat) (Roche), 3 Tabletten Proteaseinhibitor "complete" (Roche)
0,2 μ m-Filter (Millipore)

Durchführung:

Das gefrorene OvCa-Gewebe wurde zunächst im Mixer zerkleinert. Nach Zugabe eines weiteren Volumens einfach konzentrierten Lysepuffers wurde die Zellsuspension eine Stunde bei 4°C gerührt. Anschließend wurden die Zellen mit einem Potter weiter homogenisiert. Ein weiteres Volumen Lysepuffer wurde zugegeben und das Lysat wiederum eine Stunde bei 4°C gerührt. Anschließend wurde das Lysat 3x 20 sec mittels Ultraschall behandelt, um DNA zu zerstören und Transmembranproteine aus der Membran zu lösen,

danach wurde das Lysat wieder eine Stunde bei 4°C gerührt. Um Zelltrümmer zu beseitigen wurde das Lysat zunächst 20 min bei 4°C und 4000 rpm (Megafuge, Heraeus) und dann in der Ultrazentrifuge (Beckman, Ti45- Rotor) eine Stunde bei 40.000 rpm (158.420xg) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen 0,2 µm-Filter filtriert. Das so erhaltene Filtrat wurde auf die Affinitätssäulen aufgetragen.

B.3.8.3 Affinitätschromatographie und Elution

Materialien:

Triuoro acetic acid (TFA) (Applied Biosystems)

Centricon-10 Zentrifugen-Filtereinheiten (Millipore)

Durchführung:

Das Lysat wurde zunächst einmal linear mit einer Geschwindigkeit von ca. 2 ml/min über die mit den Antikörpern gekoppelte Sepharose-Säule gepumpt und anschließend zyklisch über Nacht. Dabei wurde der Durchfluss aus der Säule gesammelt und aus diesem Sammelbehälter kontinuierlich wieder auf die Säule geladen. Anschließend wurde die Säule 30 min mit PBS und dann 60 min mit Wasser gewaschen, trocken laufen gelassen und dann eluiert. Zur Elution wurde so viel 0,1%-ige TFA auf die Säule gegeben, dass das Gelbett bedeckt war, die Säule wurde 10 min auf einem Schüttler geschüttelt und das Eluat gesammelt. Bei der ersten Elution wurden zusätzlich noch 10 µl 10%-ige TFA zugesetzt. Der Vorgang wurde zehnmal wiederholt. Die Eluate wurden jeweils in einem mit 0,1%-iger TFA gewaschenen Zentricon vereinigt. Zur Bestimmung der Menge an MHC-Molekülen wurden 5% des Eluats abgenommen und mittels Edman-Abbau analysiert. Das Eluat wurde durch das Zentricon zentrifugiert (Megafuge, Heraeus; 4000 rpm, 4°C, Dauerbetrieb). Im Durchfluss befanden sich aufgrund des Zentricon-Ausschlussvolumens von 10 kDa nur die Peptide. Der Durchfluss wurde lyophilisiert und bei -80°C gelagert.

B.3.9 Modifizierung von Peptiden

Materialien:

GUA-Reagenz: (100 mg O-Methyl-Isoharnstoff-Hemisulfat in 102 µl ddH₂O;

Endkonzentration 1,1 M) (ACROS Organics)

NaOH (10 M)

Ameisensäure (konz.)

Elutionslösung: 50% Acetonitril (Baker), 1% Ameisensäure

Hydroxylamin-Lösung

Theoretischer Hintergrund:

HLA-Liganden können an ihrem N-Terminus mit 1-(Nicotinoyloxy)succinimid (NIC-NHS) modifiziert werden. Die Nicotinsäure bleibt dabei kovalent über eine Amid-Bindung am N-Terminus gebunden. Damit bei der Modifizierung der α -Aminogruppen nicht auch gleichzeitig die ε -Aminogruppen von Lysinresten nicotinyliert wurden, mussten diese zuvor mit einem Guanidin-Rest versehen werden. Setzt man für eine Gruppe von Peptiden 1-([H4]Nicotinoyloxy)succinimid, für eine andere 1-([D4]Nicotinoyloxy)succinimid ein, so sind die Peptide der ersten Gruppe anschließend mit dem leichten Isotop der Nikotinsäure (NIC), die der anderen mit der deuterierten und damit schweren Form der Nikotinsäure (dNIC) markiert. Die Eigenschaften der NIC- und dNIC-markierten Peptide unterscheiden sich bei gleicher Sequenz kaum voneinander. In der *high performance liquid chromatography* (HPLC) sieht man jedoch einen leichten Isotopen-Effekt, der sich darin zeigt, dass das dNIC-markierte Peptid einige Sekunden früher eluiert. Im Massenspektrometer lassen sich die Peptide auf Grund ihrer Massendifferenz von 4 Da leicht voneinander unterscheiden. Mit dieser Methode kann man zum Beispiel Peptide von verschiedenen Quellen in einem LC-MS/MS-Lauf mischen, um sie relativ zueinander zu quantifizieren. Wie in der *predict-calibrate-detect* Methode (Kap. B.5.9.6) können synthetische Peptide, die mit einer Form der Nikotinsäure markiert wurden, zu mit der anderen Form der Nikotinsäure markierten natürlich präsentierten HLA-Liganden gegeben werden, um so gezielt nach Peptiden mit der gleichen Sequenz zu suchen.

Durchführung:

a) Selektive Guanidierung der ε -Aminogruppe von Lysinresten in Peptiden

Die zu guanidinylierenden lyophilisierten Peptide wurden zunächst in 500 μ l H₂O aufgenommen, und die Peptidlösung mittels 10 M NaOH auf pH 10,5 gebracht. Der pH wurde mit pH-Papier überprüft. Dann wurden 92 μ l GUA-Reagenz zugegeben. Die Guanidierung fand für 10 min bei 65°C statt. Gestoppt wurde die Reaktion durch pH-Reduzierung auf pH 3-4 mit 11 μ l konzentrierter Ameisensäure.

b) Nicotinylierung der α -Aminogruppe von guanidinylierten Peptiden

Die N-terminale Nicotinylierung der guanidinylierten Peptide fand auf zentrifugentauglichen Säulchen statt, die mit C-18-reversed-phase-Säulenmaterial gefüllt waren. Nach jedem der im Folgenden genannten Schritte wurden die Säulchen bei RT mit 2000 rpm für 15 sec zentrifugiert (Biofuge fresco). Das Säulenmaterial wurde zunächst je dreimal mit 200 μ l Elutionslösung aktiviert und dann je dreimal mit 200 μ l ddH₂O, 0,1% TFA (v/v) äquilibriert. Anschließend wurden die guanidinylierten Peptide in drei 200 μ l-Portionen auf die Säulchen geladen. Nach dem Laden der Probe wurden die Säulchen je dreimal mit 200 μ l ddH₂O

gewaschen, bevor die eigentliche Nicotinylierung stattfand. Diese wurde durch Zugabe von 500 µl der jeweiligen 1H4- bzw. 2D4-NicNHS-Ester-Lösung durchgeführt, wobei - anstelle des Zentrifugationsschrittes - die Säulchen auf gekappte 1 ml-Spritzen gesteckt wurden und mit Hilfe des Kolbens alle 1,5 min je 50 µl Lösung aus den Säulchen gesaugt wurden. Danach fanden wieder drei Waschgänge statt. Um eventuelle Bindungen zwischen dem Nic-Ester und Tyrosinresten zu lösen, wurden erneut je 500 µl 50%-ige Hydroxylamin-Lösung auf die Säulchen gegeben und wieder mit Hilfe der Spritzen-Konstruktion in 1 min-Schritten eluiert. Nach weiteren drei Waschgängen wurden die modifizierten Peptide je viermal mit 50 µl Elutionslösung eluiert und die Eluate gepoolt. Die nach der Entsalzung der guanidinylierten Peptide bzw. nach der Nicotinylierung eluierten Peptide wurden für die LC-MS-Analysen in einer SpeedVac eingeeengt. Nach dem Einengen der Proben auf ca. 10 µl wurden 90 µl Lösung A zugegeben und die Probe nach 10 min Zentrifugation bei RT mit 13000 rpm (Biofuge) in das HPLC-System injiziert (Kap. B.9.4).

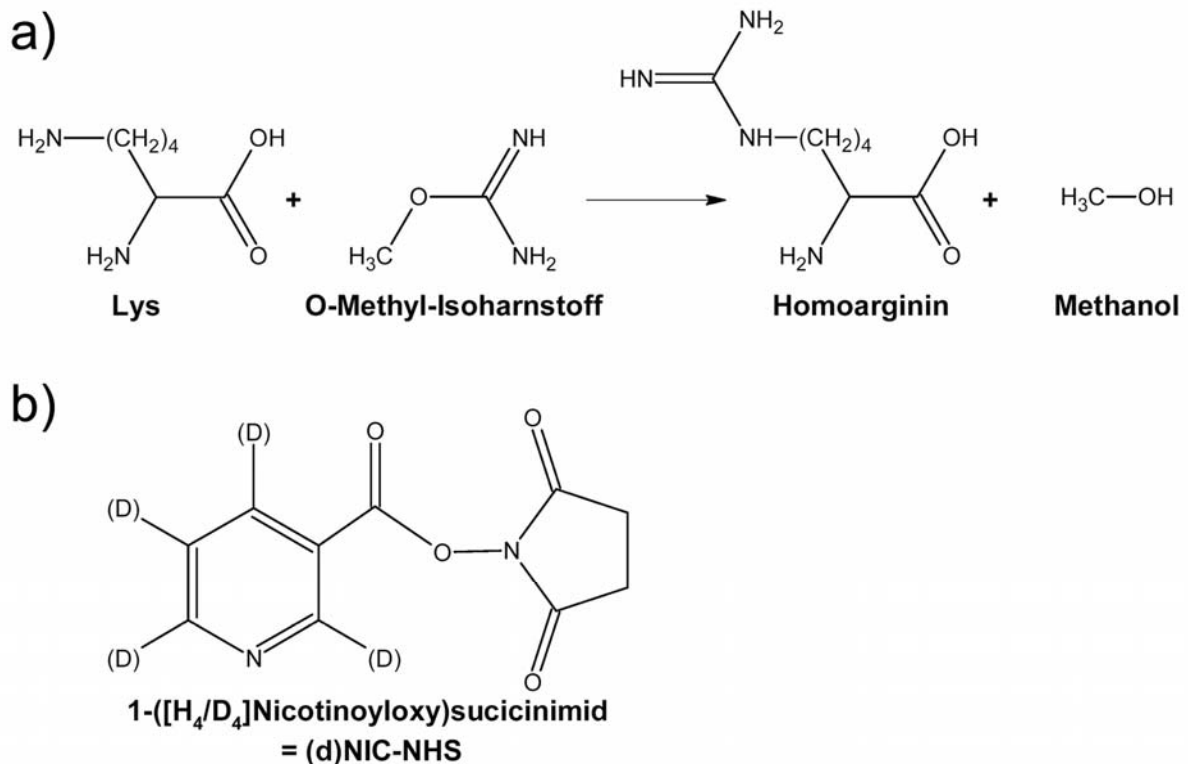


Abbildung 4: a) Modifizierung von Lysin mit O-Methyl-Isourea. b) Strukturformel von (d)NIC. Abbildung nach (Weinzierl 2004).

B.4 Zellbiologische Methoden

B.4.1 Zellkultur von Adhärenenten und Suspensionszellen

Sämtliche Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen in einem Begasungsbrutschrank bei 5% CO₂ und 37°C kultiviert. Alle Arbeiten an diesen Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Wenn nicht anders beschrieben, erfolgten alle Zentrifugationsschritte bei 300 x g für 5 min bei RT.

Materialien:

250 ml Gewebekulturflasche 75 cm² (Nunc)

PBS

Trypsin/EDTA

McCoy's Medium mit 10% FCS (hitzeinaktiviert 30 min 56°C), 1% L-Glutamin, 1% Pen/Strep

DMEM Medium mit 10% FCS, 1% L-Glutamin, 1% Pen/Strep

RPMI-1640 Medium 10% FCS, 1% L-Glutamin, 1% Pen/Strep

Durchführung:

Adhärenente Zellen wurden je nach Wachstumsgeschwindigkeit alle 3-4 Tage im Verhältnis 1:3 gesplittet. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und der Zellrasen mit 1 ml Trypsin/EDTA abgelöst. Nach Zugabe von Medium wurden zwei Drittel dieser Zellsuspension verworfen, der Rest wurde zentrifugiert, in 13 ml frischem Medium resuspendiert und in die Zellkulturflasche zurückgegeben.

Suspensionszellen wurden je nach Bedarf alle 3-4 Tage im Verhältnis 1:10 gesplittet. Dazu wurde der Zellsuspension 9/10 des Volumens entnommen und mit demselben Anteil an frischem Medium aufgefüllt.

B.4.2 Bestimmung der Lebendzellichte

Materialien:

Trypanblaulösung: Trypanblau 1 : 10 in PBS

Durchführung:

Die Ränder der Neubauer-Zählkammer wurde leicht angefeuchtet und dann das Deckglas durch leichtes Andrücken fixiert, wobei Newtonsche Ringe sichtbar wurden. Die Zellsuspension wurde 1:2 mit Trypanblaulösung gemischt (je 30 µl) und dann in den Zwischenraum von Deckglas und Zählkammerboden pipettiert. Die Dichte der ungefärbten,

vitalen Zellen konnte dann unter dem Lichtmikroskop mittels folgender Formel ermittelt:
Zelldichte der Suspension = Zellzahl in 1 Großquadrat x 2 (Verdünnung) x 10^4 Zellen/ml

B.4.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Materialien:

Einfrierbehälter mit Isopropanol

2 ml Cryoröhrchen (Corning)

Einfriermedium: FCS mit 10% DMSO

DC-2x-Einfriermedium: Humanserum mit 20% DMSO und 10% Glucosteril

Waschmedium: RPMI Medium mit 10% CTL-wash (plasmafrei)

Durchführung:

Die Zellen wurden in 1 ml Einfriermedium resuspendiert, in Kryo-Röhrchen gegeben und über Nacht in einem Einfrierbehälter bei -80°C eingefroren. Das im Einfrierbehälter enthaltene Isopropanol sorgt dafür, dass die Zellen sehr langsam und kontinuierlich auf -80°C gekühlt werden (ca. $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Für eine längerfristige Lagerung wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Für DCs wurde DC-2x-Einfriermedium verwendet. Nach der Zentrifugation wurden die DCs pro Aliquot in 500 μl autologem Serum und 500 μl DC-2x-Einfriermedium resuspendiert. Danach wurde wie bei den anderen Zellen verfahren. Alle Zellen wurden in 10 ml warmen Waschmedium aufgetaut, zentrifugiert und in dem jeweiligen Kultivierungsmedium aufgenommen.

B.4.4 Kultivierung der murinen Zelllinie t-CD40L-NIH-3T3

Materialien:

PBS

Trypsin EDTA

250 ml Gewebekulturflasche 75 cm^2 (Nunc)

6 Well Zellkulturplatte (Falcon)

DMEM F-12 Medium mit 10% FCS, 1% L-Glutamin, 1% Pen/Strep, 2,5% HEPES (NIH-Medium)

DMEM F-12 Medium mit 10% FCS, 1% L-Glutamin, 1% Pen/Strep, 2,5% HEPES und 0,4% G418

(NIH+ Medium)

Theoretischer Hintergrund:

Bei der adhärennten Zelllinie NIH-3T3 handelt es sich um murine Fibroblastenzellen, die mit dem CD40-Liganden (CD40L) stabil transfiziert und mit G418 im Medium selektioniert wurden (t-CD40L-NIH-3T3). Um die Transfektion aufrecht zu erhalten müssen die Zellen also in G418 haltigem Medium in Kultur gehalten werden.

Durchführung:

Die t-CD40L-NIH-3T3 Zellen wurden zweimal pro Woche gesplittet, und ein Teil der Zellen wurde für die Kokultivierung mit B-Zellen ausgesät. Dazu wurde das Medium von den Zellen abgenommen, mit PBS gewaschen und die Zellen mit 1 ml Trypsin/EDTA pro Zellflasche abgelöst. Nach Zugabe von Medium zur Unterbrechung der Trypsin/EDTA-Reaktion wurden 8/10 entnommen und zentrifugiert. Der Rest der Zellen wurde mit der entsprechenden Menge NIH+ Medium aufgefüllt und weiter kultiviert. Die zentrifugierten Zellen wurden in NIH- Medium resuspendiert, da sich G418 negativ auf das Wachstum der B-Zellen ausgewirkt. Anschließend wurde die Zellzahl auf 2×10^5 Zellen/ml eingestellt und die Zellen in der Gammazelle bei 96 Gray (Gy) bestrahlt. Durch die γ -Strahlung kommt es in den Zellen zu gravierenden DNA-Schädigungen und nach 1-2 Tagen zur Apoptose. Somit konnte sicher gestellt werden, dass die B-Zellen zwar mit CD40L aktiviert, jedoch nicht überwachsen wurden. Nach der Bestrahlung wurden die t-CD40L-NIH-3T3-Zellen in 6-Kavität-Platten in 2 ml/Kavität ausgesät. Über Nacht adhärten die Zellen, so dass am darauf folgenden Tag die B-Zellen dazugegeben werden konnten.

Übersicht über Isolation von T-Zellen, B-Zellen und DCs aus Vollblut

T-Zellexperimente wurden mit PBMCs gesunder Blutspender (Tab. 8) durchgeführt. Abbildung 2 gibt einen Überblick über die einzelnen Schritte der Isolation von T-Zellen, B-Zellen und DCs aus Vollblut. Zu jedem Schritt gibt es eine nachfolgende detaillierte Beschreibung.

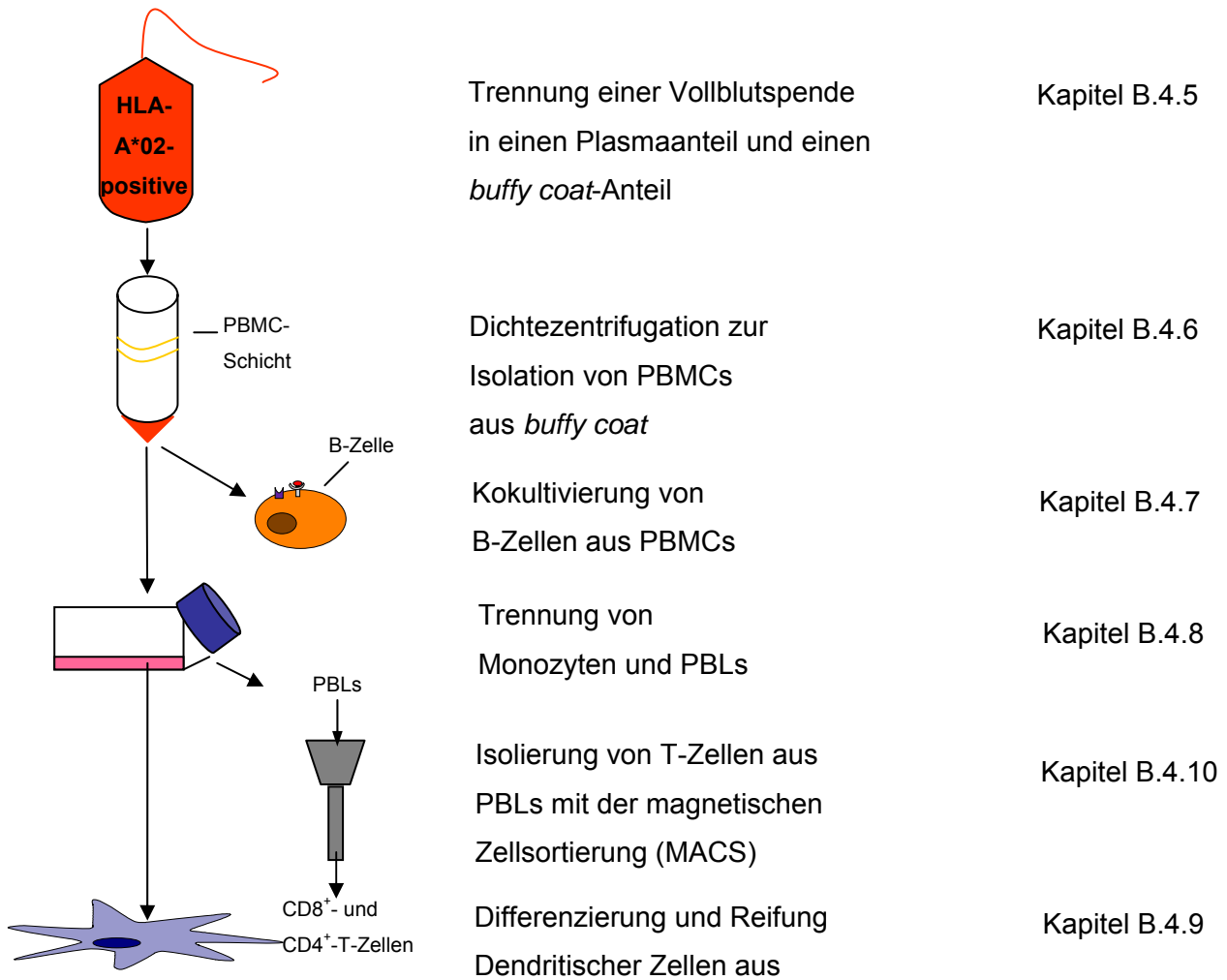


Abbildung 5: grafischer Ablauf der Isolation von T-Zellen, B-Zellen und DCs aus Vollblut.

B.4.5 *buffy coat* Präparation

Die Blutkonserven (500 ml heparinisiertes Vollblut) gesunder Blutspender wurden mit freundlicher Genehmigung von der Blutspendezentrale des Universitätsklinikum Tübingen zur Verfügung gestellt. Alle Vollblutspender besaßen den HLA-Typ HLA-A*02. Vor der PBMC-Isolierung wurde mittels Zentrifugation (1000xg, 25 min ohne Bremse, 20°C) das Plasma vom Vollblut getrennt. Anschließend wurde mit einer „Schneider-Quetsche“ der Plasmaanteil und die Erythrozyten vom *buffy coat* abgetrennt und in verschiedene Konservenbeutel überführt. Das Plasma wurde für 30 min bei 56°C im Wasserbad inaktiviert und dann bei 1600xg für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und das Plasma später als autologes Plasma den individuellen Zellmedien zugesetzt.

B.4.6 Isolation von PBMCs aus *buffy coat*

Materialien:

PBS/EDTA: PBS mit 1 mM EDTA

Ficoll

50 ml-Röhrchen (BD Falcon™)

250 ml Gewebekulturflasche 75 cm² (Nunc)

Theoretischer Hintergrund:

PBMCs enthalten Lymphozyten und Monozyten des peripheren Blutes. Bei dieser Art der Isolation der PBMCs werden weitere Bestandteile wie Thrombozyten, Erythrozyten und Granulozyten durch Zentrifugation über einen Stufengradienten weitgehend abgetrennt. Bei Ficoll handelt es sich um ein Gemisch aus iodhaltigem Metrizamid und dem Polysaccharid Ficoll, was zu einer Dichte von 1,077 g/ml führt. Die Zellgruppen werden während der Zentrifugation aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte von einander getrennt. In der entstehenden und leicht zu entfernenden Interphase befinden sich die PBMCs, während die polymorphkernigen Leukozyten und Erythrozyten pelletieren. EDTA ist ein Chelatbildner und verhindert die Aggregation der Leukozyten.

Durchführung:

Der *buffy coat* wurde mit PBS/EDTA 1:1 verdünnt. In 50 ml-Röhrchen wurden jeweils 50 ml Ficoll vorgelegt und dann mit bis zu 35 ml verdünntem Blut vorsichtig überschichtet. Die anschließende Zentrifugation fand bei 820xg für 20 min bei 20°C mit ausgeschalteter Bremse statt. Nach dem Abnehmen etwa eines Drittels der oberen gelblichen Phase, welche aus verdünntem Plasma und Thrombozyten besteht, wurde die weißliche Interphase vorsichtig abpipettiert. Nun folgten drei Waschschriffe mit PBS/EDTA, wobei die Zentrifugationsgeschwindigkeit kontinuierlich reduziert wurde, um den Wascheffekt zu erhöhen. So wurde der erste Waschschriff bei 280xg für 10 min bei 4°C, der zweite Waschschriff bei 200xg für 10 min bei 4°C und der letzte Waschschriff bei 150xg für 10 min bei 4°C durchgeführt. Danach wurden die Zellen gezählt und für die weiteren Experimente verarbeitet. Aus einer Vollblutspende wurden je nach Spender 3-9x10⁸ PBMCs isoliert. Der größte Anteil von etwa 2-4x10⁸ Zellen wurde für die Trennung von peripheren Lymphozyten (PBL, *peripheral blood lymphocytes*) und Monozyten verwendet (Kap. B.4.9). Ein Teil der PBMCs wurden für die Kokultivierung von B-Zellen mit t-CD40L-NIH-3T3-Zellen verwendet (Kap. B.4.7) und der Rest der PBMCs wurde in Aliquots à 2-4x10⁷ PBMCs eingefroren.

B.4.7 Kokultivierung der B-Zellen

Materialien:

6 Well Zellkulturplatte mit adhärenierten t-CD40L-NIH-3T3-Zellen

IMDM Medium mit 10% Humanserum, 1% L-Glutamin, 1% Pen/Strep, 0,5% Insulin, 0,3% Gentamycin

Cyclosporin A

IL-4

Theoretischer Hintergrund:

Die B-Zellen wurden aus PBMCs gewonnen, die zuvor aus Vollblut isoliert wurden. Ziel der Kokultivierung war es, das antigenpräsentierende Potential der B-Zellen zu aktivieren und die B-Zellen zu vermehren. Dies geschah durch die Bindung des von den t-CD40L-NIH-3T3-Zellen exprimierten CD40L an den CD40-Rezeptor auf den B-Zellen und der Zugabe des Zytokins IL-4 (2 ng/ml) (Schultze et al. 1997). *In vivo* bindet der CD40L von T_H-Zellen an den CD40-Rezeptor auf B-Zellen, nachdem diese den T_H-Zellen das passende Peptid über ihr MHC-II-Molekül präsentiert haben. Zusätzlich schütten die T_H-Zellen dabei IL-4 aus. Diese zwei Signale sorgen für die Aktivierung und die klonale Expansion der B-Zellen. Die Aktivierung äußert sich in der Expression kostimulatorischer Moleküle, wie solche aus der B7-Familie, die wiederum für die Aktivierung von T-Zellen nötig sind. Der Einsatz von t-CD40L-NIH-3T3-Zellen und IL-4 sollte diesen Vorgang simulieren (Valle et al. 1989). Zu den B-Zellen wurde zusätzlich das immunsuppressive Medikament Cyclosporin A ($5,5 \times 10^{-7}$ M) gegeben. Cyclosporin A wird als Medikament in der Transplantationsmedizin eingesetzt, wo es, wie bei der Kokultivierung der B-Zellen, eine Eliminierung der T-Zellen bewirkt. Cyclosporin A bindet in der Zelle an Calcineurin und verhindert somit die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors NF-AT (*nuclear factor of activated T cells*). Als Folge dessen werden zahlreiche Zytokine wie z.B. IL-2 nicht mehr transkribiert, wodurch es zu einer Proliferationshemmung kommt. Calcineurin ist zwar ein ubiquitär exprimiertes Protein, jedoch ist die Menge in T-Zellen besonders niedrig. Deshalb werden T-Zellen schon von niedrigeren Konzentrationen (10 nM) an Cyclosporin gehemmt, während andere Zellen wenig beeinträchtigt werden. (Crabtree 1999).

Durchführung:

Die PBMCs wurden in IMDM Medium auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellt und IL-4 (2 ng/ml) und Cyclosporin A ($5,5 \times 10^{-7}$ M) zugesetzt. Anschließend wurde das Medium von den ausplattierten t-CD40L-NIH-3T3-Zellen abgenommen und pro Kavität 4 ml der B-Zell-Suspension gegeben. Die Rekultivierung der B-Zellen auf neu-ausplattierte t-CD40L-NIH-

B Material und Methoden

3T3-Zellen erfolgte 2x/Woche. Durch die Zugabe von Cyclosporin A nahm die Menge an Zellen/Kavität zunächst ab, wodurch sich die Zellzahl für die Rekultivierung schrittweise verringerte (Tab. 18.). Überschritt die Zellzahl die eingesetzte Zellzahl/6-Well-Platte, wurden die überzähligen B-Zellen in Einfriermedium aufgenommen und bei -80°C eingefroren.

Tabelle 18: Zeitlicher Ablauf der B-Zell-Kokultivierung in der Übersicht.

Tag	Aktion	Einsatz der B-Zellzahl für die Rekultivierung
0	Vorbereitung der t-CD40L-NIH-3T3-Platten, PBMC-Aufreinigung eines neuen Spenders	
1	Start der Kokultur	2 x 10 ⁶ Zellen/ml
5	Vorbereitung der t-CD40L-NIH-3T3-Platten	
6	Rekultivierung der B-Zellen	2 x 10 ⁶ Zellen/ml
8	Vorbereitung der t-CD40L-NIH-3T3-Platten	
9	Rekultivierung der B-Zellen	1,5 x 10 ⁶ Zellen/ml
12	Vorbereitung der t-CD40L-NIH-3T3-Platten	
13	Rekultivierung der B-Zellen	1,0 x 10 ⁶ Zellen/ml
15	Vorbereitung der t-CD40L-NIH-3T3-Platten	
16	Rekultivierung der B-Zellen	0,75 x 10 ⁶ Zellen/ml
19	Vorbereitung der t-CD40L-NIH-3T3-Platten	
20	Rekultivierung der B-Zellen	1,0 x 10 ⁶ Zellen/ml
22	Vorbereitung der t-CD40L-NIH-3T3-Platten	
23	Rekultivierung der B-Zellen	0,75 x 10 ⁶ Zellen/ml

B.4.8 Trennung von Monozyten und peripheren Lymphozyten aus PBMCs

Materialien:

250 ml Gewebekulturflasche 75 cm² (Nunc)

X-Vivo 15 Medium mit, 1% L-Glutamin, 1% Pen/Strep, 3% autologem Plasma (DC-Medium)

X-Vivo 15 Medium mit, 1% L-Glutamin, 1% Pen/Strep, 10% autologem Plasma (T-Zellmedium)

IL-2

IL-7

Durchführung:

Zur Trennung von Monozyten und peripheren Lymphozyten (PBLs) aus PBMCs wurde ein Adhärenzschritt in einer Gewebekulturflasche durchgeführt. Hierfür wurden die PBMCs in

DC-Medium auf $7,6 \times 10^6$ /ml eingestellt und je 13 ml in eine Gewebekulturflasche gegeben. Nach 1-2h Adhärenzzeit im Brutschrank wurden die PBLs im Überstand abgenommen, die Gewebekulturflaschen dreimal gründlich mit PBS gewaschen, um locker haftende PBLs abzuwaschen und dann zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde zu den adhärenen Monozyten, neben diesen sich auch Zellen wie Makrophagen befanden, je 13 ml/Zellflasche DC-Medium gegeben. Die abzentrifugierten PBLs wurden in 13 ml/Zellflasche T-Zellmedium resuspendiert und die Zytokine IL-7 (5 ng/ml) und IL-2 (30 U/ml) als Proliferationsstimulus zugegeben.

B.4.9 Differenzierung und Reifung Dendritischer Zellen

Materialien:

X-Vivo 15 Medium mit 1% L-Glutamin, 1% Pen/Strep, 3% autologem Plasma (DC-Medium)

IL-4

GM-CSF

IL-6

IL-1 β

PGE₂

TNF α

Durchführung:

Um die adhärenen Monozyten zu unreifen DCs zu differenzieren, wurde das Medium von den Monozyten vorsichtig abgenommen und neues DC-Medium (13 ml/Zellflasche), supplementiert mit GM-CSF (100 ng/ml) und IL-4 (40 ng/ml), dazugegeben. Sechs Tage später wurden die unreifen DCs mit verschiedenen Faktoren zur Reifung gebracht (Jonuleit et al. 1996). Dazu wurde das Medium von den unreifen DCs abgenommen und zentrifugiert, da sich im Überstand bereits abgelöste DCs befanden. Die zentrifugierten Zellen wurden in DC-Medium, supplementiert mit IL-4 (40 ng/ml), GM-CSF (100 ng/ml), IL-1 β (10 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml), TNF- α (10 ng/ml) und PGE₂ (1 μ g/ml), aufgenommen und zu den adhärenen DCs in die Gewebekulturflaschen gegeben. Über Nacht reiften die DCs und lösten sich vollständig vom Boden der Zellkulturflasche ab. So konnten die reifen DCs am darauf folgenden Tag geerntet werden, indem das Medium abgenommen, die Zellflasche mit PBS gründlich gespült, um locker haftende DCs abzulösen, und zentrifugiert wurde. Die DCs wurden gezählt. So konnten aus 1×10^8 PBMCs $1,5-2,5 \times 10^7$ DCs gewonnen werden. Ein Teil der DCs wurde direkt für die Peptidbeladung am selben Tag verwendet, der restliche Teil der DCs wurde in DC-Einfriermedium eingefroren.

B.4.10 Isolierung von T-Zellen aus PBLs mit der magnetischen Zellsortierung (MACS)

Materialien:

Pan T-cell separation Kit II (Miltenyi Biotech)

PBS mit 5% BSA, 1% EDTA (MACS Puffer)

MACSColumn (Miltenyi Biotech)

Theoretischer Hintergrund:

Die magnetische Zellsortierung (*MACS, magnetic cell sorting*) macht die Separation von Zellen mit bestimmten gemeinsamen Eigenschaften aus einer gemischten Zellsuspension möglich. Sie beruht auf der Markierung von Zelloberflächenmolekülen mit antikörperkonjugierten magnetischen Kügelchen (*MicroBeads*) und der anschließenden Trennung von markierten und nicht markierten Zellen über ein starkes magnetisches Feld. Dies geschieht über eine Säule (*MACSColumn*), die an den sogenannten MACS Separator montiert wird. Auf diese Säule wird dann die Zellsuspension mit den markierten und unmarkierten Zellen gegeben. Während die markierten Zellen über ihre konjugierten *MicroBeads* in der Säule hängen bleiben, befinden sich die unmarkierten Zellen im Durchfluss. Zur Separation von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen aus den PBLs wurden die Zellen mit verschiedenen biotinylierten Antikörpern gegen diverse Oberflächenmoleküle (CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, Glycophorin A) markiert und über den Magneten getrennt.

Durchführung:

Die PBLs wurden geerntet, zentrifugiert (bei 4°C) und in MACS-Puffer aufgenommen. Dann wurden die Zellen gezählt, zentrifugiert (bei 4°C) und in MACS-Puffer (40 µl/10⁷ PBLs) resuspendiert. Die Ausgangszellzahl betrug in der Regel 1-3x10⁸ PBLs. Zu den Zellen wurde anschließend das biotinylierte Antikörpergemisch (10 µl/10⁷ PBLs) gegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von MACS-Puffer (30 µl/10⁷ PBLs) wurde der mit *MicroBeads* gekoppelte Anti-Biotin-Antikörper (20 µl/10⁷ PBLs) hinzugefügt und die Zellen für weitere 15 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Waschschriff mit MACS-Puffer (bei 4°C), sowie die Resuspension der Zellen in MACS-Puffer (500 µl/10⁸ PBLs). Die Zellsuspension wurde dann auf eine MACS-Säule gegeben, die zuvor an den MACS-Separator montiert wurde. Die durchgelaufenen Zellen wurden zusammen mit dem Durchfluss mehrerer Waschschriffe am unteren Ende der Säule aufgefangen. Die im Durchfluss enthaltenen T-Zellen wurden zentrifugiert, in T-Zellmedium aufgenommen und gezählt. Die Zellzahl betrug in etwa 20-30% der Ausgangszellzahl.

Übersicht über T-Zellstimulationen und funktionelle T-Zell-Assay

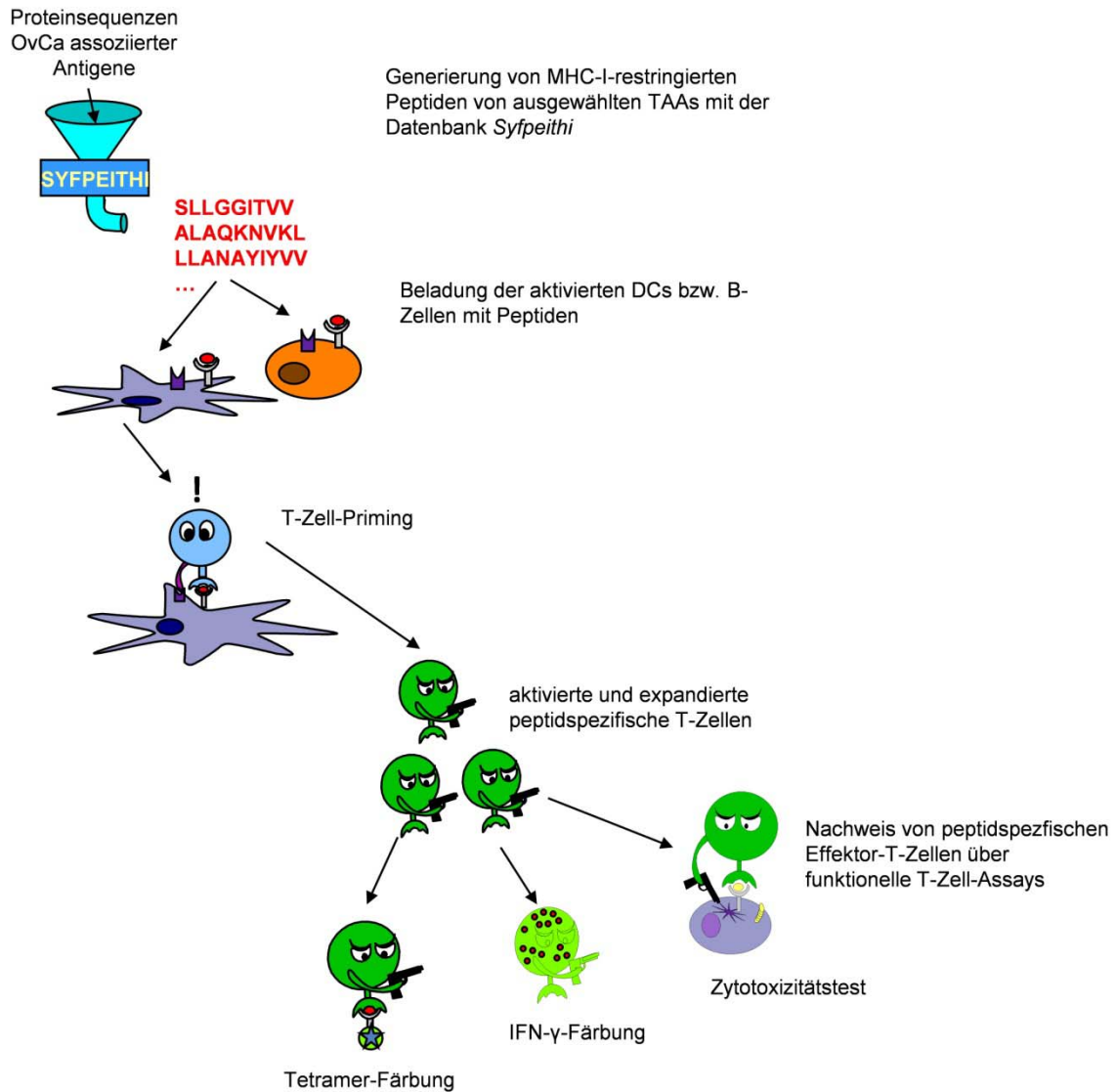


Abbildung 6: T-Zellstimulation und anschließende funktionelle T-Zell Analysen. Überblick über die einzelnen Schritte der T-Zellstimulation mit peptidbeladenen APCs und den anschließenden funktionellen T-Zell-Assays. Zu jedem Schritt gibt es eine nachfolgende detaillierte Beschreibung.

Zeittafel von T-Zellstimulationen und funktionellen T-Zell-Assays

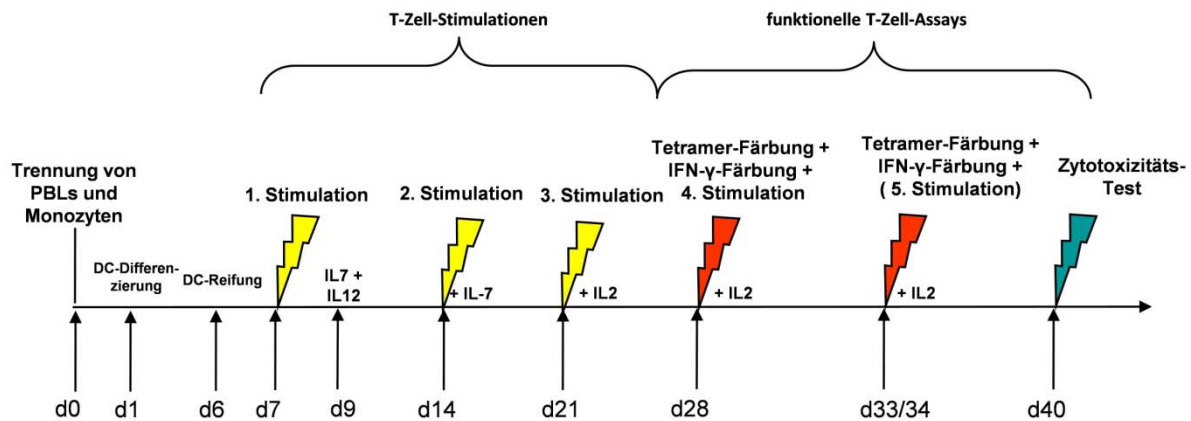


Abbildung 7: Zeittafel der T-Zellexperimente

Überblick über die zeitliche Einordnung der einzelnen Schritte der T-Zellstimulation mit peptidbeladenen APCs und den sich anschließenden funktionellen T-Zell-Assays.

B.4.11 *In vitro priming* von T Zellen mit peptidbeladenen, antigen-präsentierenden Zellen

Materialien:

- Waschmedium
- 24 Wellplatte (Greiner)
- X-Vivo 15-Medium
- T-Zellmedium mit autologem Plasma
- IL-7
- IL-12
- IL-2

Theoretischer Hintergrund:

Die nach dem Protokoll in Kapitel B.4.9 gereiften DCs sind spezialisiert auf die Antigen-Präsentation über MHC-I- und MHC-II-Moleküle sowie auf das Priming von T-Zellen. Dies erfolgt durch eine Hochregulation nach Antigenkontakt von MHC- I- und II-Molekülen, kostimulatorischen Molekülen wie CD80 und CD86 und T-Zell-Adhäsions-Molekülen wie CD48 und CD58 sowie durch Sekretion von inflammatorischen Zytokinen wie z.B. Interleukin-12, TNF α . Um nun diese reifen DCs mit den zu testenden Peptiden extern zu beladen, werden die DCs zuerst in plasmafreiem Medium gewaschen um die Peptidbeladung nicht zu stören. Anschließend wurden sie in einer hohen Konzentration des

zu testenden Peptids aufgenommen so dass die bereits auf den MHC-I-Molekülen präsentierten Peptide verdrängt wurden. Befinden sich nun naive T-Zellen in der Zellpopulation, die den passenden TCR für das über MHC-I präsentierte Peptid besitzen, kommt es zu einem T-Zell Priming und im Verlauf weiterer Stimulationen und Zytokinzugaben zu einer klonalen Expansion dieser spezifischen T-Zellen.

Durchführung:

Nachdem mit der MACS-Methode CD4- und CD8-positive T-Zellen angereichert wurden (Kap. B.4.10) und in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in 24 Wellplatten ausgesät wurden, erfolgte noch am selben Tag die erste Stimulation der T-Zellen mit peptidbeladenen DCs. Zunächst wurden die DCs in CTL-Wash gewaschen und pro Peptidansatz in 1 ml X-Vivo 15-Medium ohne Zusätze resuspendiert. Nun wurden 10 µg/ml des zu testenden Peptids zugegeben und für 1h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zur Stimulation wurden die autologen DCs in einem Verhältnis von 1:10 zu den T-Zellen gegeben. Die T-Zell-Stimulation erfolgte alle sieben Tage und so lange mit DCs, bis die Verfügbarkeit der DCs erschöpft war. Alle weiteren Stimulationen erfolgten mit kokultivierten autologen B-Zellen in einem Verhältnis von 1:4. Die B-Zellen wurden nach Peptidzugabe mit 20 Gy bestrahlt um sie nach zwei Tagen in Apoptose zu treiben. Zusätzlich erfolgten verschiedene Zytokinzugaben: 1-2 Tage nach der 1. Stimulation wurde IL-7 und IL-12 (je 5 ng/ml) zugegeben. Zur 2. Stimulation wurde IL-7 (5 ng/ml) zugegeben und zu allen weiteren Stimulationen wurde IL-2 (30 U/ml) zugegeben (Abb. 7). Die T-Zellen konnten mit Hilfe der Zytokine innerhalb von 30 Tagen auf das etwa 2-3-fache der Ausgangsmenge vermehrt werden. Des Weiteren wurden die Zellen den in Abbildung 6 beschriebenen funktionellen Tests unterzogen.

B.4.12 Peptid-Prästimulation von PBMCs

Materialien:

T-Zellmedium

48 Wellplatte (Greiner)

24 Wellplatte (Greiner)

Peptide von Interesse

IL-2

IL-4

IL-7

Theoretischer Hintergrund:

Mit einer Prästimulation sollen bereits in den PBMCs vorhandene peptidspezifische Gedächtnis-T-Zellen reaktiviert und expandiert werden um sie für nachfolgende Analysen besser sichtbar machen zu können. Es handelt sich also um die gezielte Vermehrung peptidspezifischer T-Zellen, die bereits vorhanden waren. Das Protokoll ist von der Zytokinzugabe, Menge und der entsprechenden Zeitpunkte der Zugabe so aufgebaut, dass eine Aktivierung naiver T-Zellen in Form einer *in vitro-primings* ausgeschlossen werden kann.

Durchführung:

Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Inkubation der Zellen fand bei 37°C und 5% CO₂ statt. Die Zellen der zu untersuchenden Spender wurden aufgetaut, anschließend wurde die Lebendzellzahl bestimmt. Nach dem Einstellen einer Zelldichte von 10-12x10⁶ Zellen/ml wurden entweder 250 µl/Ansatz in eine 48 Wellplatte oder 500 µl/Ansatz in eine 24 Wellplatte überführt und dem Medium wurde jeweils 5 ng/ml IL-4 und IL-7 zugesetzt. Nach einer Ruhephase von etwa 16h wurde zu den Ansätzen die jeweils zu untersuchenden Peptide (10 µg/ml Finalkonzentration) und nochmals IL-4 und IL-7 (jeweils 5 ng/ml Finalkonzentration) zugegeben. An Tag 3 und 5 der Stimulation wurden den Ansätzen jeweils die genannten 250 µl/Ansatz bzw. 500 µl/Ansatz Medium mit jeweils 2 ng/ml IL-2 Finalkonzentration zugegeben. Die Zellen wurden an den Tagen 5, 7 und 9 mit frischem Medium und IL-2 gefüttert. Hier wurden je nach Bedarf 250-500 µl/Ansatz oder 500-1000 µl/Ansatz des Mediums aus der Kultur entfernt und durch das entsprechende Volumen frischen Mediums mit IL-2 (2 ng/ml Finalkonzentration) ersetzt. Von Tag 9 bis 14 bekamen die Zellen nur noch Medium ohne IL-2 und wurden an Tag 14 mit Tetramerfärbung oder der kombinierten Tetramer- und intrazellulären Zytokinfärbung untersucht. Wurden nicht alle Zellen für die Färbung benötigt, wurden die verbliebenen Zellen nochmals mit IL-2 (2 ng/ml Finalkonzentration) gefüttert und weitere 5 Tage später erneut gefärbt und untersucht.

B.5 Analytische Methoden

B.5.1 Durchflusszytometrie

Materialien:

FACS-Clean, FACS-Rinse, FACS-Flow (Becton Dickinson)

PBS mit 1% FCS, 0.01% Natriumazid (FACS-Puffer)

CellFIX (1:10 verdünnt in PBS)

Gefärbte Zellen in Cellfix oder FACS-Puffer

Durchflusszytometer: FACS-Calibur mit Software Cell Quest oder Cell Quest Pro

FACS-Canto II mit Software FACSDiva

Mit verschiedenen Fluorochromen konjugierte Antikörper

Theoretischer Hintergrund:

Bei der Durchflusszytometrie werden zuvor fluoreszenz markierte Zellen aus einer Zellsuspension mit hoher Geschwindigkeit an einem oder mehreren Lasern vorbeigeführt (beim BD FACSCanto™II von Becton Dickinson: 488 nm Feststoff-, 635 nm NeHe- und 405 nm Dioden-Laser). Die dabei entstehende Lichtemission wird gemessen und mittels Photomultipliern als verschiedene optische Parameter bestimmt. Zu diesen Parametern gehören das Vorwärtsstreulicht (FSC), welches ein Maß für die relative Zellgröße darstellt, die Seitwärtsstreuung (SSC), die ein Maß für die relative Zellgranularität liefert, sowie die Fluoreszenzintensitäten für verschiedene Wellenlängen. Die Empfindlichkeit der Photomultiplier kann durch Änderung der Spannung an der Anode eingestellt werden. Da sich das Emissionslicht der verschiedenen Fluorochrome über ein gewisses Spektrum erstrecken und so mehrere Kanäle ansprechen können, ist eine Kompensation bei Mehrfachfärbungen notwendig. Diese kann in Form einer Einzelfärbung entweder mit antikörpermarkierten Zellen des Spenders oder Kügelchen (Beads) vorgenommen werden. Letztere bieten den Vorteil, eine genauere Kompensation auch von niederfrequenten Oberflächenmarkern sowie mit Tandemfarbstoffen konjugierten Antikörpern durchführen zu können. Die neueren Generationen der Mess- und Analysesoftware, zu denen auch die BD FACSDiva™ und FlowJo 7.2 gehören, verwenden im Gegensatz zu BD FACS Calibur Geräten digitale Daten. Diese werden im Falle der BD FACSDiva™ auf einer Skala mit 18 Bit (262-144 Kanäle) dargestellt. Es findet keine analoge Umwandlung der Messwerte von linear in logarithmisch statt. Die Transformation geschieht mit Hilfe der „log look-up table“ die neben nah-idealen mathematischen Log-Werten auch eine bessere Linearität, sowie das einfache Umschalten zwischen linearer und logarithmischer Darstellung erlaubt. Die Skalierung dieser digitalen Messwerte kann daher auch negative Werte annehmen und wird als biexponentielle Darstellung wiedergegeben [BD Biosciences 2007]. Die Färbung

mehrerer extra- und intrazellulärer Marker und Zytokine wird auch „*Multicolorstaining*“ genannt. Sie ermöglicht eine differenzierte Charakterisierung und Beschreibung der Eigenschaften von untersuchten Zellen. Die Etablierung eines Multicolorstainings ist zeit- und kostenintensiv, da die verwendeten Reagenzien immer neu aufeinander abgestimmt werden müssen. So ist es von Bedeutung, auf die Konzentration, den Isotyp und Klon der verwendeten Antikörper zu achten. Bei der Planung einer Antikörperkombination für ein Multicolorstaining sollte z.B. vermieden werden, Marker mit benachbarten Fluoreszenzemissions-Wellenlängen gemeinsam auf einer Zelle zu färben. Weiter muss entschieden werden, welcher Marker durch welches Fluorochrom gefärbt werden soll, da bei ungünstiger Wahl z.B. intermediäre Expressionen nicht detektiert werden können.

Durchführung:

Ungefärbte und einfach gefärbte Zellen für jedes verwendete Fluorochrom wurden als Kontrollen benötigt, um die Geräteparameter zellspezifisch einstellen zu können und die verschiedenen Fluoreszenzkanäle gegeneinander zu kompensieren. Diese Zellen wurden genauso behandelt wie die übrigen mehrfach gefärbten Zellen der jeweiligen Färbung nur, dass jeweils nur ein fluoreszenzmarkierter Antikörper zugegeben wurde. Die gefärbten Zellen wurden am FACS-Calibur oder am FACS-Canto analysiert und mit der Software Cell Quest Pro oder FlowJo ausgewertet. Nach jeder Probe wurde kurz mit FACS-Flow gespült, um Kreuzkontaminationen zwischen aufeinander folgenden Proben auszuschließen.

B.5.2 Charakterisierung der Tumorzellen mittels Durchflusszytometrie

Materialien:

1x10⁶ Zellen einer konfluenten Zellkultur

FACS-Puffer

Tabelle 19: Erst-Antikörper

Färbung	Antigen	Konjugation	Firma / Klon	AK Typ	Isotyp	Verdünnung
Isotyp-Kontrolle	KLH	FITC	BD / X40	monoklonal	IgG1	10 µl direkt
	KLH	FITC	BD / X39	monoklonal	IgG2a	10 µl direkt
intra-zellulär	WT1	unkonjugiert	Abcam / WLM04	monoklonal	IgG1	8 µl direkt
	hTERT	unkonjugiert	Biozol / 2C4	monoklonal	n.b.	10 µl direkt
	Survivin	unkonjugiert	Dako / 12C4	monoklonal	IgG2a	10 µl direkt
	CEA	unkonjugiert	Immunotech	monoklonal	IgG1	10 µl direkt
	VEGF	unkonjugiert	GeneTex	monoklonal	IgG1	5 µl direkt
extra-zellulär	MUC-1	FITC	Santa Cruz / VU4H5	monoklonal	IgG1	15 µl direkt
	Her-2/neu	unkonjugiert	Oncogene /c-neu	monoklonal	IgG1	1 : 20
	EpCAM	unkonjugiert	GeneTex	monoklonal	IgG1	10 µl direkt
	L1CAM	unkonjugiert	L1-11A	monoklonal	IgG1	50 µl direkt

Tabelle 20: Zweit- Antikörper

Antigen	Konjugation	Firma	Verdünnung
goat anti mouse	PE	SIGMA	1 : 50

Durchführung:

Die Zellen wurden nach der Ernte zweimal mit je 1 ml FACS Puffer gewaschen und auf zwei FACS Röhrchen verteilt. Das eine Röhrchen wurde zur Kontrolle nur mit dem 2. Antikörper gefärbt, während das andere die normale Färbung erhielt. Der 1. Antikörper wurde laut Tabelle in einem Färbevolumen von 50 µl verdünnt und für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml FACS-Puffer und Zentrifugation bei 300 x g für 5 min bei RT, wurden der 2. Antikörper zugegeben und ebenfalls für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluss zweimal mit je 1 ml FACS-Puffer gewaschen und zum Schluss in 200 µl CellFIX resuspendiert. Nun folgte die Messung am Durchflusszytometer. Zur Auswertung wurde die Fluoreszenzintensität anhand des Mean-Wertes (mittlere Immunfluoreszenzintensität) bestimmt (mIF-Analysen). Hierbei wurden Mean-Werte der Negativkontrollen von den Mean-Werten des zu untersuchenden Antigens abgezogen (Δ mIF-Werte) oder graphisch als Histogramm-Überlagerungen dargestellt.

B.5.3 Peptidbindungs-Kompetitions-Test

Materialien:

- JY-Zellen
- RPMI-Medium
- 96-Well-Rundbodenplatte
- FACS-Puffer

Tabelle 21: FITC-Reporterpeptid, positiv- und Negativkontrolle und Testpeptide

	Sequenz	Quelle	MHC
FITC-Reporterpeptid	ILK(FITC)EPVHGV	HIV-1 RT	A*02
positiv Kontrolle	YLLPAIVHI	RNA Helikase p68	A*02
negativ Kontrolle	TPRQAILTL	HEX8-ADE05	B*5101
Testpeptide	LLANAYIYVV	L1CAM	A*02
	RINGIPVEEL		A*02
	SLNGDIKPL		A*02
	SLADYGGSV		A*02
	ALQGQPLVL		A*02
	ILNSSAVLV		A*02
	LLLRWQPPL		A*02
	LLSWVHWSL	VEGF-A	A*02
	ALLLYLHHL		A*02
	FLLSWVHWSL		A*02
	YIFKPSCVPL		A*02

Theoretischer Hintergrund:

Dieser Bindungstest beruht auf der Tatsache, dass sich Peptide, die schlechtere Bindungsaffinitäten zu MHC-I-Molekülen besitzen, durch einen Überschuss von sehr gut bindenden Peptiden verdrängen lassen. Hier wurde ein FITC-markiertes Peptid mit mittleren Bindungseigenschaften mit JY-Zellen inkubiert und anschließend ein sehr gut bindendes Peptid als Positivkontrolle zugegeben. Im Vergleich dazu wurden die zu testenden Peptide in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Anschließend konnten, wie bereits beschrieben (van der Burg et al. 1995), die relativen Bindungsaffinitäten der zu testenden Peptide berechnet werden, indem die maximale Verdrängung des Reporterpeptids durch die Positivkontrolle auf 100% gesetzt wurde.

Durchführung:

Am Vortag des Tests wurden JY-Zellen einmal in frischem RPMI-Medium gewaschen und auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurden 200 μ l/Well auf eine 96 Well-Rundbodenplatte ausplattiert und über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen zweimal mit X-Vivo gewaschen und anschließend für 1h mit den Peptiden (Tab. 21) bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Hierzu wurden Kontrollwells mit JY-Zellen und je 1 μ M und 0,1 μ M FITC-Reporterpeptid und JY-Zellen ohne Peptid angelegt. Dann folgten die Kontrollpeptide und die zu testenden Peptide in Konzentrationen von 10 μ g/ml, 1 μ g/ml und 0,1 μ g/ml. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal in FACS-Puffer gewaschen und anschließend im Durchflusszytometer analysiert.

B.5.4 Tetramer-Färbung

Materialien:

96 Wellplatte, Rundboden

PBS mit 2% FCS, 0.01% Natriumazid, 2 mM EDTA (Tetramer-Puffer)

PBS mit 50% FCS, 0.01% Natriumazid (Tetramerlösung)

Tetramer: PE – gekoppelt

Theoretischer Hintergrund:

Die Bindung des TCR von CD8⁺ T-Zellen an den MHC-I-Peptid-Komplex wäre eine gute Grundlage, um die Frequenz von antigenspezifischen T-Zellen bestimmen zu können. Bei diesem Ansatz existiert jedoch das Problem der hohen Dissoziationsrate des MHC-I-Peptid-Komplex und des TCRs (Corr et al. 1994; Matsui et al. 1994). Eine Lösung für dieses Problem ist die Bindung von mehreren TCRs an mehrere MHC-I-Peptid-Komplexe, was die Dissoziationsrate verringert und sich so zur Markierung von CD8⁺ Zellen eignet (Altman et al. 1996).

In der praktischen Anwendung benutzt man hierzu Tetramere aus MHC-I-Peptid-Komplexen. Einer dieser MHC-I-Peptid-Komplexe besteht aus einer rekombinant hergestellten schweren MHC-I-Kette, welche in Anwesenheit des zu bindenden Peptides zurückgefaltet wird. Anschließend wird der Komplex mit Hilfe des Enzyms Bir A und einer rekombinanten Signalsequenz biotinyliert. Die Biotinylierung ermöglicht in dem nun folgenden Schritt die Multimerisierung dieser Monomere. Hierzu werden die MHC-I-Peptid-Komplexe über einen Biotinrest an fluoreszenzmarkiertes Streptavidin gebunden, wodurch letztlich Multimere (meist Tetramere) entstehen.

Die Bindung der MHC-I-Tetramere an CD8⁺ Zellen ist hochspezifisch (Burrows et al. 2000), jedoch auch sehr temperaturabhängig (Whelan et al. 1999). So findet unter physiologischen

Bedingungen die Internalisierung des Tetramers statt, wobei die Fluoreszenz intrazellulär zu beobachten ist [Whelan, J.A. et al. 1999b]. Die Bindung der Tetramere kann auch von anti-CD8 Antikörpern beeinflusst werden, was unter Umständen zu einer Verminderung oder sogar Verdrängung von bereits gebundenen Tetrameren führen kann (Skinner et al. 2000; Denkberg et al. 2001). Bei der Durchführung ist daher darauf zu achten, welcher Typ (Klon und Isotyp) verwendet wird und mit welchem Fluorochrom dieser konjugiert ist. Gegebenfalls muss das Versuchsprotokoll abgeändert werden, damit eine ausreichende Bindung der Tetramere gewährleistet werden kann. Die Färbung von Zellen und deren durchflusszytometrische Analyse (Kap. B.5.1) ist eine sehr sensitive Nachweismethode, deren unteren Grenze bis 0.01% Tetramer positive unter den CD8⁺-Zellen bei PBMCs reicht (He et al. 1999). Weitere Vorteile der Tetramermarkierung sind, dass gefärbte lebende Zellen mit FACS-Sorter (Altman et al. 1996) aussortiert und zum Generieren von T-Zelllinien benutzt werden können (Nielsen et al. 2000). Weiter lässt sich diese Technik mit anderen Färbemethoden wie der Analyse von Oberflächenmarkern (Lee et al. 1999) und intra- oder extrazelluläre Zytokinfärbungen (Appay et al. 2000; Pittet et al. 2001) kombinieren.

Durchführung:

Alle Schritte wurden auf Eis und unter der Vermeidung direkten Lichtes durchgeführt. Die Waschschritte fanden bei 681xg für 3 min bei 4°C statt. Der Überstand nach der Zentrifugation wurde durch ruckartiges Stürzen der Platte entfernt. Die zu färbenden Zellen wurden zunächst in Tetramer-Puffer auf eine Zellkonzentration von 5-10x10⁶ Zellen/ml eingestellt und 200 µl/Test dieser Suspension einer 96 Wellplatte gegeben. Nach einem Zentrifugationsschritt und anschließendem Entfernen des Überstandes wurden die Zellpellets in dem Antikörpercocktail (50 µl, ad. Tetramer-Puffer) resuspendiert. Der Cocktail enthielt die entsprechenden Mengen an Antikörpern, die für das jeweilige Experiment benötigt wurden. Nach einer Inkubation von 20 min bei 4°C im Dunkeln wurden die Proben mit 150 µl/Test Tetramer-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 50 µl Tetramermix resuspendiert und bei 4°C für 30 min im Dunkeln inkubiert. Der Tetramermix setzte sich aus den gewünschten Tetrameren in der entsprechenden Konzentration (5 µg/ml Tetramer) und 50 µl/Test Tetramerlösung zusammen. Nach dem Ansetzen des Tetramermixes wurde dieser 5 min bei 13000 rpm (Biofuge) und 4°C zentrifugiert um mögliche Präzipitate weitgehend zu pelletieren. Nach dem folgenden Waschschritt wurden die Zellen entweder in 150-200 µl/Test Tetramer-Puffer resuspendiert und bis zu ihrer Messung bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt. In den Fällen einer Kombination mit einer intrazellulären Zytokinfärbung wurden die Proben wie weiter unten beschrieben behandelt.

B.5.5 Intrazelluläre IFN γ Färbung

Materialien:

T-Zellmedium

FACS-Puffer

Cytoperm/Cytofix Solution

Permwash-Puffer 10x (BD) 1:10 in PBS verdünnt (Permwash-Puffer)

GolgiSTOP (BD)

PMA (SIGMA)

Ionomycin (SIGMA)

Tabelle 22: Antikörper für IFN γ Färbung

Spezifität	Ursprung (Klon)	Isotyp	Endkonzentration	Herkunft
CD8-FITC	Maus-Hybridom (OKT 8)	IgG2a	1:400	Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie, Prof. H.-G. Rammensee
IFN γ PE	Maus-Hybridom (B27)	IgG ₁	1:200	Pharmingen

Theoretischer Hintergrund:

Aktivierte CTLs schütten als Antwort auf die Bindung an den passenden MHC-I-Peptid-Komplex das Zytokin IFN γ aus (Schroder et al. 2004). Da IFN γ von aktivierten T-Zellen sezerniert wird und bei einer Färbung somit nicht einzelnen Zellen zugeordnet werden könnte, muss die Chemikalie „GolgiStop“ dazugegeben werden. Bei dem im GolgiStop enthaltenen Monensin handelt es sich um ein Ionophor, das den Transport der Proteine vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Golgi-Apparat hemmt. Als Folge akkumulieren die Proteine im ER und können nicht sezerniert werden (Klausner et al. 1992). Als Positivkontrolle wurden PMA und Ionomycin verwendet, wodurch eine unspezifische Stimulation der T-Zellen erreicht wird. Dies geschieht durch eine Nachahmung des TCR-Signals, indem PMA die Proteinkinase C aktiviert und Ionomycin die intrazelluläre Kalziumkonzentration erhöht (Klausner et al. 1992; Nau et al. 1988). Als Negativkontrolle wurde p68 verwendet. P68 ist die Bezeichnung für ein Peptid, das von der RNA-Helikase DDX5 abstammt. DDX5 wird ubiquitär exprimiert und sollte in einem gesunden Organismus keine T-Zellantwort auslösen.

Durchführung:

Alle Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Färbeschritte fanden auf Eis und unter der Vermeidung direkten Lichtes statt. Die Waschschriffe wurden bei 681xg für

B Material und Methoden

5 min bei 4°C durchgeführt. Der Überstand nach der Zentrifugation wurde durch ruckartiges Stürzen der Platte entfernt. Die intrazelluläre Zytokinfärbung erfolgte immer 5 Tage nach der letzten IL-2-Zugabe, egal nach wie vielen Stimulationen die Zellen untersucht wurden. Hierzu wurden die Zellen von jeder peptidstimulierten T-Zellpopulation auf $10\text{-}200 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt und 50 µl/Test in eine 96 Wellplatte transferiert. Von jeder Peptidstimulation wurden zwei Wells angelegt. In einem wurde das Peptid (10 µg/ml) mit dem die Zellen zuvor stimuliert worden waren in 50 µl T-Zellmedium zugegeben und zum anderen Well wurde als Negativkontrolle p68 (10 µg/ml) in 50 µl T-Zellmedium zugegeben. Außerdem wurden Zellen mehrerer T-Zellstimulationen, aber desselben Spenders für die Positivkontrolle gemischt und 50 ng/ml PMA und 1 µM Ionomycin in 50 µl T-Zellmedium zugegeben. Zum Schluss wurde in alle Wells GolgiStop (1:1500) in 50 µl T-Zellmedium/Well zugegeben. Die Zellen wurden für 6h im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen zunächst mit 50 µl/Well, dann mit 150 µl/Wellt FACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert. Danach erfolgte die Resuspension der Zellen in 50 µl/Well FACS-Puffer, supplementiert mit dem FITC-gekoppelten CD8-Antikörper (Tab. 22). Die Zellen wurden bei Dunkelheit und auf Eis für 30 min inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Tests zunächst einmal durch Zugabe von je 50 µl und ein weiteres Mal von je 200 µl FACS-Puffer gewaschen. Nach dem folgendem Waschschrift mit 150 µl/Test FACS-Puffer wurde das Zellpellet in 100 µl/Test Cytfix/Cytoperm resuspendiert und die Proben bei 4°C für 20 min im Dunkeln permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen zunächst mit 100 µl/Test, dann ein zweites Mal mit 200 µl/Test mit Permwash-Puffer gewaschen. Um die Proben auf intrazelluläres IFN γ anzufärben wurden die Zellen jetzt mit dem PE-gekoppelten IFN γ -Antikörper in Permwash-Puffer in einem Gesamtvolumen von 50 µl/Test resuspendiert und für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach dem Waschen mit 150 µl/Test Permwash-Puffer wurden die Proben in 150 µl/Test CellFIX resuspendiert und bis zu der Messung am gleichen Tag bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

B.5.6 Kombinierte Tetramer- und intrazelluläre Zytokin-Färbung

Materialien:

- T-Zellmedium
- FACS-Puffer
- Tetramer-Puffer
- Cytoperm/Cytofix Solution
- Permwash-Puffer
- GolgiSTOP (BD)
- BrefeldinA (SIGMA)
- anti-CD3 Antikörper
- anti-CD28 Antikörper
- PMA (SIGMA)
- Ionomycin (SIGMA)

Tabelle 23: Monoklonale Antikörper zur funktionellen Charakterisierung:

Antikörper/ Antigen	Konjugation	Verdünnung	Hersteller
CD8	PerCP- Cy5.5	1:17	BD
CD107a	FITC	1:150	BD
IFN γ	PE-Cy7	1:40	BD
IL-2	APC	1:40	Biologend
TNF α	Pacific Blue	1:120	Biologend

Tabelle 24: Verwendete Tetramere

Antikörper/ Antigen	Peptidsequenz
L1CAM	LLANAYIYVV
	LLLRWQPPL
CMV pp65	NLVPMVATV
HIV-1 RT	ILKEPVHGV

Durchführung:

Alle Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Färbeschritte fanden auf Eis und unter der Vermeidung direkten Lichtes statt. Die Waschschrte wurden bei 681xg für 3 min bei 4°C durchgeführt. Der Überstand nach der Zentrifugation wurde durch ruckartiges Stürzen der Platte entfernt. Die intrazelluläre Zytokinfärbung erfolgte immer 5 Tage nach der letzten IL-2-Zugabe, egal zu welchem Stimulationszeitpunkt die Zellen untersucht wurden. Hierzu wurden die Zellen von jeder peptidstimulierten T-Zellpopulation auf 10-200x10⁶ Zellen/ml eingestellt und 50 µl/Test in eine 96-Wellplatte transferiert. Zu den Zellen wurden

weitere 50 µl T-Zellmedium mit GolgiSTOP (1:1500 Finalkonzentration) gegeben. Abhängig von den unterschiedlichen Bedingungen wurden die entsprechenden Ansätze im Fall der Negativkontrolle mit p68 (10 µg/ml) in 50 µl T-Zellmedium, der Stimulation mit Peptiden Peptid (10 µg/ml) in 50 µl T-Zellmedium zugegeben oder für die Positivkontrolle mit einer Lösung aus PMA (50 ng/ml Finalkonzentration) und Ionomycin (1 µM Finalkonzentration) in T-Zellmedium auf 150 µl/Test aufgefüllt. Den Ansätzen für die Antikörperkombination mit CD107a wurde ein CD107a-spezifischer, fluorochoorm-gekoppelter Antikörper, (1:150) für die gesamte Inkubationszeit von 6 Stunden bei 37°C zugegeben.

Im Anschluss an die Inkubation wurden die Tests zunächst einmal durch Zugabe von je 50 µl und ein weiteres Mal von je 200 µl FACS-Puffer gewaschen. Nun wurde zunächst die Lebend-Tot-Färbung durchgeführt. Hierzu wurde das Aqua Live/Dead® Reagenz 1:400 mit FACS-Puffer verdünnt und das Zellpellet in 50 µl/Test resuspendiert. Nach einer Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden die Zellen mit 150 µl FACS-Puffer gewaschen. Die Zellpellets wurden nun in FACS-Puffer und CD8-PerCP Antikörper (1:17, 50 µl/Test) resuspendiert und für 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach dem folgendem Waschschrift mit 150 µl/Test Tetramer-Puffer folgte die Tetramer-Färbung (Kap. B.5.4). Danach wurde das Zellpellet in 100 µl/Test Cytifix/Cytoperm resuspendiert und die Proben bei 4°C für 20 min im Dunkeln permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen zunächst mit 100 µl/Test, dann ein zweites Mal mit 200 µl/Test mit Permwash-Puffer gewaschen. Um die Proben auf die Zytokine und Aktivierungsmarker anzufärben, wurden die Zellen jetzt mit der entsprechenden Menge an Antikörpern und Permwash-Puffer in einem Gesamtvolumen von 50 µl/Test resuspendiert und für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach dem Waschen mit 150 µl/Test Permwash-Puffer wurden die Proben in 150 µl/Test Permwash-Puffer resuspendiert und bis zu der Messung am gleichen Tag bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

B.5.7 Zytotoxizitätsmessung

Materialien:

Szintillationszähler (Wallac, 1450 Microbeta Plus, Liquid Scintillation Counter)

X-Vivo 15

T-Zellmedium

CTL-Wash

PBS

Zielzellen (siehe Tabelle 7)

Effektorzellen: peptidspezifische T-Zellen aus diversen Stimulationen

⁵¹Cr (Na₂⁵¹CrO₄), (c = 5 µCi/µl), (NEN Amersham Bioscience)

Synthetische Peptide

LUMA-Platten (Packard, Yttrium Silicate Scintillator-coated White Microplate)

Durchführung:

Im Verlauf dieses Protokolls wurden die Zellen immer für 5 min bei 300xg bei RT zentrifugiert. Am Vortag wurden die Zielzellen mit frischem T-Zellmedium versorgt. Am nächsten Tag wurden die Zielzellen gezählt und die gewünschte Zellmenge in 15 ml-Röhrchen aliquotiert. Von den Zielzellen, deren Lyse durch Effektorzellen induziert werden sollte, wurden 1×10^4 Zellen pro Well benötigt. Diese Zielzellen wurden zweimal mit 5 ml X-Vivo-Medium gewaschen und in einem Endvolumen von ca. 500 μ l X-Vivo-Medium resuspendiert. Anschließend wurde das entsprechende Peptid mit einer Finalkonzentration 10 μ g/ml zugegeben. Zusätzlich wurde diesen 500 μ l Zielzellsuspensionen jeweils 10 μ l ^{51}Cr (100 μ Ci) zupipettiert. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C im Inkubator wurden die Zellen zweimal mit CTL-Wash gewaschen, in 5 ml X-Vivo-Medium aufgenommen und für 30 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen wieder abzentrifugiert, mit 5 ml T-Zellmedium gewaschen, in der entsprechenden Menge (100 μ l/Well) T-Zellmedium aufgenommen und ausplattiert. Bei der Mengenermittlung der Zielzellen wurden die zusätzlich benötigten Zellen für die maximale Lyse und die spontane Lyse mit einberechnet. Die Ermittlung von maximaler Lyse der Zielzellen und der spontanen Lyse der Zielzellen erfolgte in einem 6-fachen Ansatz. Während der einstündigen Inkubation der Zielzellen wurden die Effektorzellen gezählt, die gewünschte Menge für eine Verdünnungsreihe und somit pro Test entnommen ($1,35 \times 10^6$ Zellen/ml), einmal mit 5 ml T-Zellmedium gewaschen und in 450 μ l T-Zellmedium (150 μ l/Well) aufgenommen und in die drei Wells des ersten Triplikates der Verdünnungsreihe pipettiert. Es wurden immer sechs Verdünnungsstufen: 30:1 / 10:1 / 3:1 / 1:1 / 0,3:1 / 0,1:1 angesetzt, wobei die Effektorzellen immer 1:3 verdünnt wurden. Dafür wurden in eine 96 Well-Rundbodenplatte 100 μ l T-Zellmedium vorgelegt. 150 μ l der Effektorzellen wurden in die 1. Reihe der Platte pipettiert, aus dieser Reihe wurden wiederum 50 μ l in die darunterliegende Reihe überführt, resuspendiert, erneut 50 μ l in die darunterliegende Reihe gegeben usw. Nach Ablauf der Inkubation der Zielzellen wurden diese zu den Effektorzellen pipettiert. Für die Messung der maximalen Lyse wurden zu den Zielzellen 100 μ l Triton-X gegeben, für die Bestimmung der spontanen Lyse der Zielzellen wurden nur 100 μ l T-Zellmedium zu den Zielzellen gegeben. Die Platte wurde dann bei 37°C für 4h oder 20h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurden 50 μ l/Well des Überstandes abgenommen, auf eine LUMA-Platte übertragen und über Nacht getrocknet. Am nächsten Tag wurde die Platte im Szintillations-Zähler gemessen, wobei nach den Bedienungsanleitungen des Gerätes und der Software verfahren wurde. Der Prozentsatz der spezifische Lyse wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Spezifische Lyse} = \frac{(\text{experimentelle Lyse} - \text{spontane Lyse}) \times 100}{(\text{maximale Lyse} - \text{spontane Lyse})}$$

Der Prozentsatz an spontaner Freisetzung war bei den getesteten Zielzellen immer unter 10%.

B.5.8 Sequenzanalyse und Quantifizierung von Peptiden durch Edman-Abbau

Der Edman-Abbau ist eine zyklische Reaktionskette zur Sequenzierung und Quantifizierung von Peptiden und Proteinen. Dazu wird pro Reaktionszyklus eine Aminosäure vom N-Terminus abgespalten und detektiert. Der Edman-Sequenzierung liegen folgende drei Reaktionen zu Grunde: Kupplung, Spaltung und Konvertierung. Bei der Kupplung kommt es zu einem nukleophilen Angriff der α -Aminogruppe des N-Terminus am positivierten Kohlenstoff der Isothiocyanatgruppe von Phenylisothiocyanat; es entsteht ein PTC-Peptid (Phenylthiocarbamoylpeptid). Damit das Elektronenpaar des N-terminalen Stickstoffs in freier, unprotonierter Form vorliegt, muss diese Reaktion unter alkalischen Reaktionsbedingungen stattfinden.

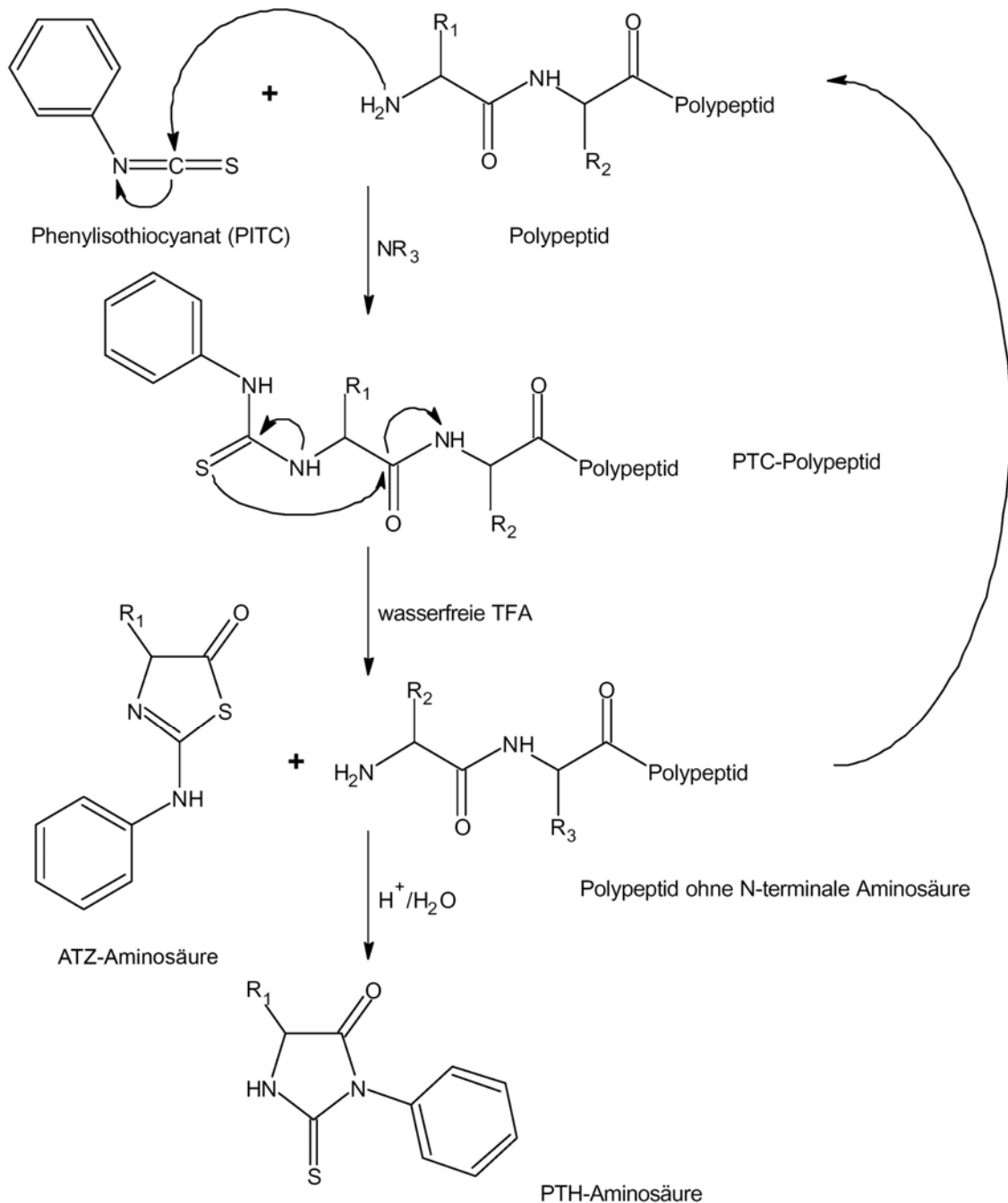


Abbildung 8: Reaktionsschema der Edman-Sequenzierung.

PTC: Phenylthiocarbamoyl, ATZ: Anilinothiazolinon, PTH: Phenylthiohydantoin. Darstellung nach A. Weinzierl (Weinzierl 2004).

Unter Absenkung des pH-Wertes mit Hilfe von wasserfreier TFA kommt es zu einem intramolekularen nukleophilen Angriff des Schwefels an der Carbonylgruppe der ersten Peptidbindung und damit zum zweiten Schritt, der Abspaltung (Abb. 10). Es resultieren eine um eine Aminosäure gekürzte Peptidkette und eine ATZ (Anilinothiazolinon)-Aminosäure, die durch hydrophobe Extraktion vom Restpeptid abgetrennt wird. Im dritten Schritt, der Konvertierung, wird mit wässriger Säure die instabile ATZ-Aminosäure zur stabilen PTH-Aminosäure konvertiert. Die restliche Peptidkette steht einem erneuten Abbau-Zyklus zur

Verfügung. Im Anschluss an die Konvertierung werden die PTH-Aminosäuren chromatographisch getrennt (hier über Reversed-Phase-HPLC) und ihre Absorption bei 269 nm gemessen. Im Vergleich mit den Retentionszeiten einer Referenzprobe, die die PTH-Derivate aller bekannten Aminosäuren enthält, werden die PTH-Aminosäuren identifiziert und über die Peakhöhe ihrer Absorption quantifiziert. Die Nachweisgrenze bei Edmansequenzierungen liegt im Picomolbereich. Prinzipiell ist eine Quantifizierung der PTH-Aminosäuren durch Integration des zur Aminosäure gehörenden UV-Absorptions-Peaks und durch Verrechnung der Hintergrund-Signale vorheriger Abbauzyklen möglich. Jedoch muss dabei bedacht werden, dass Aminosäuren mit funktionellen Gruppen in der Seitenkette durch Nebenreaktionen bei der PTH-Aminosäure-Erzeugung schlechtere Ausbeuten erzielen als Aminosäuren mit aliphatischen Seitenketten. Andererseits können Hintergrundsignale und der "Lag"-Effekt durch unsynchrone Reaktionsschritte die Quantifizierung verfälschen.

B.5.9 Massenspektrometrische Analyse

B.5.9.1 Allgemeine Einführung

Die Massenspektrometrie dient der Bestimmung von Molekülmassen. Dafür werden bei allen massenspektrometrischen Methoden die folgenden drei Schritte durchlaufen: Ionisierung der Proben in der Ionenquelle, Auftrennung der Ionen im Hinblick auf ihr Masse/Ladungsverhältnis (m/z) im Massenanalysator und Detektion der Ionen im Detektor, der die Informationen in ein Massenspektrum umwandelt. Um von großen, nicht flüchtigen Biomolekülen Ionen zu bilden ohne sie dabei zu zerstören, braucht man besonders schonende Ionisierungsmethoden. Dazu zählen die Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI), bei der die Probe mit Photonen beschossen wird, oder die Electrospray Ionisation (ESI), die Ionen durch Versprühen der Probe im elektrischen Feld erzeugt. Diese beiden Methoden sind die am häufigsten eingesetzten Ionisierungstechniken bei der Peptid- und Proteinanalytik in der Massenspektrometrie. Die Auftrennung der Ionen im Analysator kann wiederum durch verschiedene Methoden erfolgen. Quadrupolinstrumente beispielsweise trennen Ionen im Hochfrequenzfeld. Hier stehen vier stabförmige Metallelektroden parallel zueinander und bilden einen Massenfilter, indem sie ein kombiniertes Wechsel und Gleichspannungsfeld aufbauen, durch das nur Ionen definierter m/z -Verhältnisse zum Detektor durchgelassen werden. Time of flight (TOF)-Instrumente dagegen trennen Ionen nach ihrer Flugzeit im Hochvakuum eines Messrohres auf. Dazu werden die Ionen zuvor auf die gleiche kinetische Energie beschleunigt, bevor sie in eine feldfreie Driftstrecke eintreten, in der sie aufgrund verschiedener m/z -Werte verschiedene Geschwindigkeiten erreichen. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich die

Elektrospray-Ionisation (ESI) zur Erzeugung der Ionen und ein Hybrid-Quadrupol-Time-of-Flight- Massenspektrometer zu deren Analyse verwendet. Die Empfindlichkeit dieser Verfahren erstreckt sich bis in den Femtomol- und Subfemtomol-Bereich.

B.5.9.2 Elektrospray-Ionisation

In einem elektrischen Feld werden gelöste Ionen in die Gasphase überführt, indem die Lösung aus einer engen Kapillare versprüht wird. Dabei bilden sich zunächst kleine geladene Lösungströpfchen, die durch Verdampfen des Lösungsmittels kleiner werden, was zu einer Erhöhung der Ladungsdichte an der Oberfläche führt. Die Tröpfchen zerfallen immer weiter durch so genannte Coulomb-Explosionen, bis schließlich freie Gasphasen-Ionen am Übergang in das Massenspektrometer entstehen (Mora et al. 2000; Smith et al. 1990). Das Versprühen der Analytlösung in das elektrische Feld wird durch ein *nebulizer gas* koaxial zur Kapillare unterstützt. Es findet bei Atmosphärendruck statt, während die spätere Analyse der freien Ionen im Hochvakuum durchgeführt wird. Das Potential, das an der leitfähigen Kapillare anliegt und zu der benötigten Potentialdifferenz zwischen Kapillarenspitze und einer *interface*-Platte am Übergang zum Massenspektrometer führt, beträgt 1000-2000 Volt. An der Mikroöffnung zum Massenspektrometer fließt geheiztes Stickstoffgas (*curtain gas*) senkrecht zur Flugrichtung der Tröpfchen des Sprays, wodurch eine Zone hohen Drucks entsteht. Dadurch wird verhindert, dass auch Neutralteilchen in das Hochvakuum gesaugt werden. Die charakteristische Bildung mehrfach geladener Ionen $[M + nH]^{n+}$ beim ESI Verfahren zeigt sich im Spektrum als Serie von Ionensignalen mit $m/z = (M + nH)/n$, die sich in der Anzahl der angelagerten Protonen n und damit ihrer Ladung unterscheiden. Bei Peptiden oder Proteinen, die viele Ladungen tragen können, entstehen so Serien, die aus mehr als hundert „Peaks“ bestehen können. Bei Peptiden mit einem Molekulargewicht zwischen 1000 und 2000 Da dominieren dabei die zweifach geladenen Ionen, die am 0,5 Da betragenden Abstand der Isotopensignale erkannt werden können.

B.5.9.3 Q-TOF-Massenspektrometer

Flugzeitmassenspektrometer (*time-of-flight-/TOF-Analysatoren*) bestimmen die Masse im Hochvakuum ($p = 3,8 \cdot 10^{-8}$ bar) durch eine genaue elektronische Bestimmung der Zeit, welche die Ionen benötigen, um die Strecke zwischen Ionenquelle und Detektor zu durchfliegen. Die Ionen werden an der Quelle durch ein elektrostatisches Feld beschleunigt und durchqueren dann eine feldfreie Driftstrecke, in der sie nach ihrem Masse/Ladungs-Quotienten (m/z) aufgetrennt werden. Letzteres ist möglich, da alle Ionen zwar die gleiche kinetische Energie aus dem elektrostatischen Feld aufnehmen, dabei jedoch entsprechend

ihrer m/z-Werte unterschiedliche Geschwindigkeiten erreichen. Durch Messung der Flugzeit lässt sich das m/z-Verhältnis berechnen:

$$E_{\text{kin}} = \frac{1}{2} mv^2 = mL^2 / 2t^2 = zeU$$

$$m/z = 2eUt^2 / L^2$$

mit

m = Masse des Ions

v = Geschwindigkeit des Ions nach Beschleunigungsstrecke

z = Ladungszahl

e = Elementarladung

t = Gesamtflugzeit

U = beschleunigende Spannung

L = Länge des Flugrohres

Das m/z -Verhältnis ist also proportional zum Quadrat der Flugzeit (Hillenkamp and Karas 1990). Zur Detektion werden Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) verwendet. Der auf die Konversionsdynode auftreffende Ionenstrom erzeugt einen Sekundärionenstrom, der seinerseits durch eine Elektronenkaskade an weiteren Dynoden verstärkt wird. Als Massenanalytoren und -filter dienen Quadrupole. Ein Quadrupol besteht aus vier stabförmigen, parallel angeordneten Metallelektroden, an denen eine Gleich- und eine Wechselspannung anliegen. Das Verhältnis beider Spannungen ist entscheidend dafür, welche Ionen mit einem bestimmten m/z-Verhältnis aufgrund stabiler Oszillationen den Quadrupol passieren und welche an und zwischen den Stäben verloren gehen. Das hier verwendete Hybrid-Quadrupol-Time-of-Flight-Massenspektrometer (Abb. 9) besteht aus den beiden funktionellen Einheiten MS1 und MS2. Die an der Quelle durch ESI gebildeten Ionen erreichen den Quadrupol-Analysator MS1 durch eine unabhängig evakuierte Ionenoptik. Ab hier unterscheidet man zwei Fälle: MS-Experimente ohne Fragmentierung der Ionen und Tandem-MS Experimente (MS/MS oder MS2), bei denen die Ionen fragmentiert werden. Im MS-Modus ohne Fragmentierung der Ionen ist dieser Quadrupol nicht eingeschaltet, sodass die Ionen ihn sowie die dahinter folgende evakuierte Hexapol-Kollisionszelle passieren und von der Hexapol-Transferlinse auf den Pusher fokussiert werden, der den Ionenstrom mit maximaler Frequenz von 20 kHz in die MS2-Einheit ablenkt. Diese ist orthogonal zu MS1 angeordnet und besteht aus dem Refletron-Time-of-flight-Massenspektrometer, in dem die m/z-Verhältnisse durch Messung der Flugzeit zwischen Pusher-Aktivierung und Eintreffen am Detektor bestimmt werden.

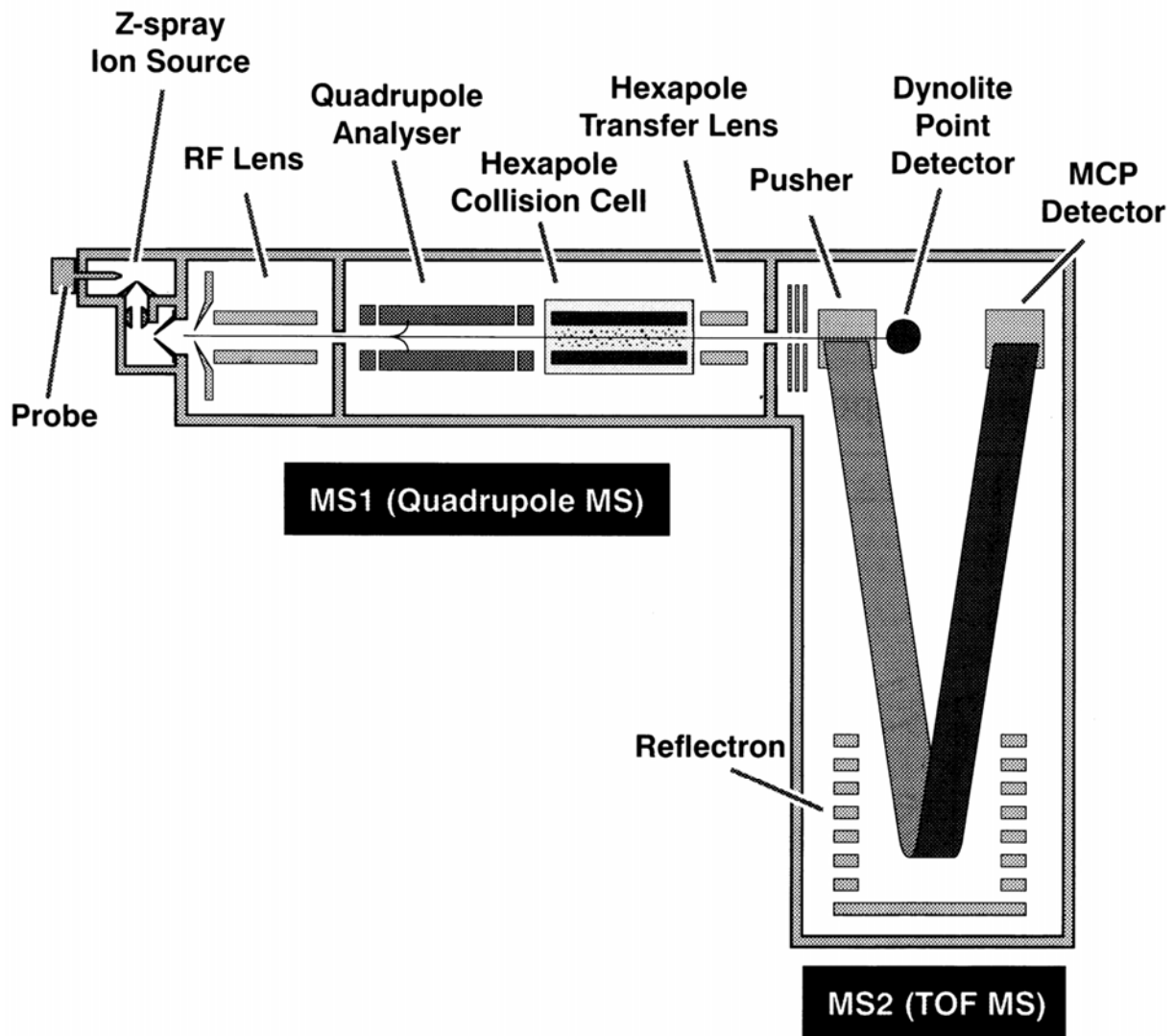


Abbildung 9: Schematischer Aufbau des verwendeten Massenspektrometers.

RF-Lens: radio frequency-Linse, MCP-Detector: multi channel plate-Detektor. Abbildung aus dem Q-ToF Handbuch, Micromass.

Bei Tandem-MS-Experimenten wird der Quadrupol-Analysator so eingestellt, dass nur Ionen eines definierten m/z -Wertes die Kollisionszelle erreichen. Diese ist mit einem Inertgas oder -gasmisch (z. B. Argon, Helium) gefüllt. Bei Niedrig-Energie-Stößen mit den Gasmolekülen wird kinetische Energie auf die Ionen übertragen und in Schwingungsenergie umgewandelt, die das Peptidion durch Fragmentierungsreaktionen wieder abgibt (*collision-induced decomposition*, CID). Die Fragment-Ionen werden ebenso detektiert wie im MS Modus. Vor der Stoßaktivierung ist häufig noch eine zusätzliche Beschleunigung der Ionen nötig. Die angelegte Kollisionsspannung beträgt 20-60 V. Der genaue Wert richtet sich nach Art und Druck des Gases in der Kollisionszelle sowie Art und Ladung des zu fragmentierenden Ions. Um den Ionenstrom optimal einstellen zu können, gibt es einen Punktdetektor für Ionen, die

den MS1 verlassen und nicht am Pusher abgelenkt werden. Zur Gerätesteuerung, Datenaufnahme und -verarbeitung dient die MassLynx 4.0 Software. Das instrumentelle Auflösungsvermögen beträgt etwa 5000 FWHM (*full width at half maximum*). Es wird nach $R = m / \Delta m$ berechnet, wobei m die Masse des verwendeten monoisotopischen „Peaks“ im unteren Massenbereich und Δm seine Halbwertsbreite ist. Ab einem Wert von 2000 FWHM im Massenbereich der Peptidionen wird eine Grundlinientrennung der Isotopenpeaks erreicht. Der m/z -Bereich, der einer Messung zugänglich ist, liegt zwischen 2 und 4000, wobei jedoch auch Moleküle mit einer sehr großen ungeladenen Masse aufgrund ihrer mehrfachen Ladungen in diesem m/z -Bereich liegen und damit analysiert werden können.

B.5.9.4 Liquid Chromatography Mass Spectrometry-Kopplung

Zur *online*-Detektion wird die Mikrospray-Methode eingesetzt. Dabei wird ein HPLC-System zur Reduktion der Probenkomplexität direkt mit einer Elektrospray-Quelle gekoppelt (*liquid chromatography mass spectrometry* (LCMS)-Kopplung). Dies ermöglicht die fortdauernde Aufnahme von MS- und MS2- Spektren der von der Säule eluierten Komponenten. Einen ersten Anhaltspunkt zur Identität der Peptide bietet die Kombination aus Retentionszeit und Masse. Dies ermöglicht außerdem die Selektion bestimmter, beispielsweise vorhergesagter Peptide für die Fragmentierung. Das System erreicht durch die kleinen Elutionsvolumina eine hohe Sensitivität, da die Peptide in konzentrierter Form vorliegen. Die Flussrate für die Elution der Peptide beträgt 300 nl/min. Zunächst wird das System 10 min mit 100% Lösungsmittel B gewaschen und anschließend mit 15% B 30 min lang äquilibriert. 100-150 μ l der in Lösungsmittel A gelösten Probe werden in eine 200 μ l-Probenschleife injiziert und mit einer Flussrate von 20 μ l/min 30 min unter Äquilibrierungsbedingungen auf die C18-Vorsäule geladen, die der Aufkonzentration und Entsalzung dient. Schließlich wird die Säule in das System der μ Kapillarsäule eingeschaltet und die gebundenen Peptide durch einen linearen Gradienten von 8-55% B innerhalb von 95 min auf die μ Kapillarsäule eluiert und dort aufgetrennt. Zum Schluss werden Probenreste durch Waschen mit 100% B entfernt und das System neu äquilibriert. Die Datenerfassung und Auswahl der Vorläufer-Ionen $[M + 2H]^{2+}$ für die Fragmentierung erfolgen automatisch entsprechend der in der MassLynx 4.0 Software eingestellten Parameter. Die Integrationszeit des TOF-Analysators beträgt bei MS-Spektren 1 s und im Tandem-MS-Modus 4 s bei einer Interscanverzögerung von 0,1 s.

B.5.9.5 Interpretation der ESI-MS/MS-Spektren von Peptiden

Durch ESI werden Peptidionen erzeugt, bei denen Protonen an allen basischen Stellen angeheftet sein können, beispielsweise an der N-terminalen Aminogruppe und den

Seitenketten von Histidin, Lysin und Arginin. In der Gasphase ist die Basizität der Seitenketten sehr stark. Daher sind an dieser Stelle angeheftete Protonen sogar bei Stoßaktivierung fixiert. Die Protonen an den N-Termini hingegen können zu jeder der Peptidbindungen wandern (Migration durch interne Solvatisierung). Dort sind sie dann an den Carbonylsauerstoff angelagert. So entsteht aus einem Peptid eine heterogene Population von Ionen, die sich hinsichtlich der Position der Protonen an den Amidbindungen unterscheiden (Wysocki et al. 2000). Die Protonierungsstelle lenkt die Fragmentierungsreaktion. Daher fragmentiert jede Subpopulation von Vorläuferionen unterschiedlich, sodass eine Serie von Produkt-Ionen entsteht, die in ihrer Gesamtheit die Sequenz des Peptids erkennen lässt (Hunt et al. 1986). Die Fragmentierung wird an der protonierten Stelle initiiert und führt zu einem zyklischen Intermediat, das durch eine von zwei verschiedenen Reaktionen schrittweise fragmentiert. Dabei können entweder zwei einfach geladene Produkt-Ionen entstehen oder je ein doppelt geladenes und ein neutrales.

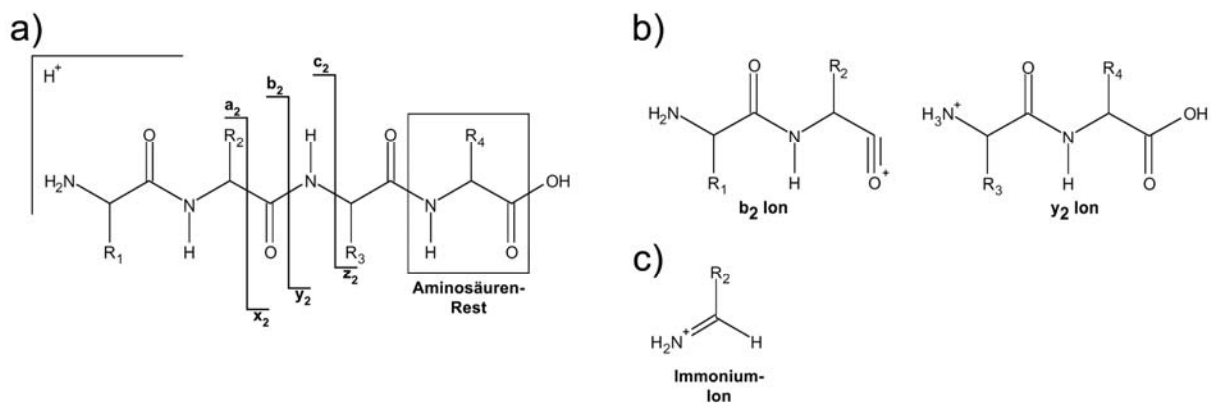


Abbildung 10: Nomenklatur von Peptidfragment-Ionen nach Roepstorff und Fohlman und nach Biemann (Biemann 1992; Roepstorff and Fohlman 1984), indiziert ist jeweils die Anzahl an Aminosäuren, die im Fragment enthalten sind. a) Nomenklatur der durch Brüche im Peptidrückgrat entstehenden Fragment-Ionen, b) Vereinfachte Struktur für b - und y -Ionen, c) Immoniumion der zweiten Aminosäure. Abbildung nach A. Weinzierl (Weinzierl et al. 2007).

N-terminale Fragmente, die eine Ladung tragen und somit sichtbar sind, werden a -, b - und c -Fragmente genannt. Geladene C-Termini gehören zur x -, y - bzw. z -Serie. Jedes Fragment erhält einen zusätzlichen Index, der die Zahl der darin enthaltenen Aminosäuren angibt. In den zu analysierenden Spektren dominieren b - und y -Ionen. Die a -Serie entsteht durch neutralen Verlust von Kohlenmonoxid aus den b -Ionen ($\Delta m = 28$ Da). Weitere mögliche neutrale Verluste sind die Abspaltung von Wasser ($\Delta m = 18$ Da) aus b - und y -Fragmenten sowie aus den Seitenketten von Serin, Threonin, Aspartat und Glutamat, von Ammoniak ($\Delta m = 17$ Da) aus Asparagin, Glutamin, Lysin und Arginin, von Dehydroalanin aus Cystein ($\Delta m = 34$ Da) und die Abspaltung von Methylsulfensäure ($HSOCH_3$, $\Delta = 64$ Da) aus oxidiertem

B Material und Methoden

Methionin. Zusätzlich können noch interne Fragmente durch Bruch von zwei Peptidbindungen auftreten. Der Abstand zwischen den benachbarten „Peaks“ einer Serie entspricht einer Aminosäure, deren Identität anhand der Differenz der m/z -Werte, die für alle Aminosäuren tabelliert sind (Tab. 25), ermittelt wird. Weitere Hinweise auf enthaltene Aminosäuren geben die Immonium-Ionen ($H_2N=CHR^+$), die im unteren Massenbereich des Spektrums sichtbar sind und typische Massen für bestimmte Aminosäuren aufweisen. Ist schließlich eine Teilsequenz des Peptids durch Auswertung des Spektrums bekannt, kann hiermit eine Datenbank-Suche am NCBI mit Hilfe des MASCOT Programms (<http://www.matrixscience.com>) durchgeführt werden [Perkins D.N. 1999]. Je länger die Teilsequenz ist, desto weniger, dafür aber sicherere Treffer erhält man. Aus den Treffern kann dann die Sequenz bestimmt werden, der das Fragmentspektrum am ehesten entspricht. Eine endgültige Bestätigung ist nur durch Aufnahme des Fragmentspektrums des entsprechenden synthetischen Peptids möglich.

Tabelle 25: Massen der proteinogenen Aminosäuren sowie deren Immonium-Ionen.

Aminosäure	Ein-Buchstaben-Code	Masse	Immonium-Ion
Glycin	G	57	30
Alanin	A	71	44
Serin	S	87	60
Prolin	P	97	70
Valin	V	99	72
Threonin	T	101	74
Cystein	C	103	76
Leucin	L	113	86
Isoleucin	I	113	86
Asparagin	N	114	70
Aspartat	D	115	71
Glutamin	Q	128	101
Lysin	K	128/170	101/129
Glutamat	E	129	102
Methionin	M	131	104
Hsitidin	H	137	110
Phenylalanin	F	147	120
Arginin	R	156	70/129
Tyrosin	Y	163	136
Tryptophan	W	186	159

B.5.9.6 Die *predict-calibrate-detect*-Methode

Diese Methode wird angewandt um gezielt nach HLA-Liganden von interessanten Proteinen zu suchen. Potentielle Liganden werden mittels einer Software, zum Beispiel SYFPEITHI [Rammensee 1999], vorhergesagt. Diese werden, wie in Kapitel B.3.9 beschrieben mit einem schweren Isotop markiert, um sie im Weiteren von den natürlich präsentierten Peptiden, die wie in Kapitel B.3.8. beschrieben aufgereinigt werden, unterscheiden zu können. Damit die Eigenschaften der natürlichen Peptide denen der modifizierten entsprechen, müssen auch diese modifiziert werden. Allerdings mit einem leichten Isotop, um sie weiterhin im Massenspektrometer von den synthetischen Peptiden unterscheiden zu können. Im ersten Schritt, dem Kalibrieren, werden die modifizierten synthetischen Peptide in einem LC-MS/MS Experiment untersucht. Dabei wird die Retentionszeit der einzelnen Peptide gemessen und ihre Sequenz durch die Aufnahme von Fragmentspektren verifiziert. Da unterschiedliche Peptide bei gleicher Konzentration in Abhängigkeit von ihrer Sequenz verschieden starke Signale im Massenspektrometer ergeben, werden verschiedene Konzentrationen des ersten Mixes der synthetischen Peptide gemessen. Mit den Verhältnissen der Signalstärken der verschiedenen Peptide in diesen Testläufen werden für einen zweiten Mix neue Konzentrationen der Peptide berechnet, in denen sie ähnlich starke Signale im Massenspektrometer ergeben. Zur Detektion der natürlichen HLA-Liganden werden diese mit den synthetischen Peptiden gemischt und es wird ein weiteres LC-MS/MS-Experiment gemacht. Existiert ein natürlich präsentiertes Peptid mit der gleichen Sequenz wie einer der vorhergesagten HLA-Liganden, eluieren diese fast gleichzeitig. Im Massenspektrum unterscheiden sich die beiden Peptide aber durch eine durch die Isotopenmarkierung definierte Masse. Diese zusammengehörenden Massen-Peaks werden auch als Peak-Paar bezeichnet. Das Vorhandensein der vom natürlichen Liganden erwarteten Masse zu genau dem erwarteten Zeitpunkt gibt eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass ein Peptid mit der vorhergesagten Sequenz tatsächlich auf den untersuchten Zellen präsentiert wurde. Absolute Sicherheit gibt allerdings erst der Vergleich der Fragmentspektren von synthetischem und natürlich präsentiertem Peptid. Diese Methode wurde bereits erfolgreich angewandt, um HLA-Liganden des *carcinoembryonic antigen* CEA und des MAGE-A1-Antigens zu identifizieren (Pascolo et al. 2001; Schirle et al. 2001).

Der Ergebnisteil dieser Arbeit ist in drei Teile unterteilt:

1. Charakterisierung von Tumorzellen: in diesem Kapitel wurden OvCa-Zelllinien und OvCa-Primärgewebe durch PCR, quantitativer PCR, Westernblot und Durchflusszytometrie auf die Expression verschiedener TAAs untersucht.

2. *in silico*-Ansatz zur Definition neuer T-Zellepitope: bereits bekannte TAAs wurden hier verwendet, um *in silico* Epitop-Vorhersagen zu machen. Die resultierenden synthetisch hergestellten Peptide werden weiter verwendet, um *in vitro* T-Zellstimulationen durchzuführen (sogenanntes *in vitro* „T-Zell-Priming“) und durch funktionelle Tests der stimulierten T-Zellen Epitope zu identifizieren.

3. HLA-Liganden Analyse von OvCa-Primärgewebe: pathologisch charakterisiertes OvCa-Gewebe wurde verwendet, um HLA-Liganden zu isolieren. Diese wurden durch gekoppelte HPLC-MS-MS Spektrometrie analysiert und ihren Ursprungsproteinen zugeordnet. Direkt an die jeweiligen Ergebnisteile schließen sich die jeweiligen Diskussionsteile und die Ausblicke an. Einzelne Teile des ersten und zweiten Ergebnisteils wurden von Josefine Götze im Rahmen ihrer Diplomarbeit (Betreuung durch PD Dr. B. Gückel und Helen Hörzer) erstellt. In den entsprechenden Kapiteln wird nochmals separat darauf hingewiesen, welche Ergebnisse von Frau Götze stammen.

C Ergebnisse und Diskussion zur Charakterisierung von Tumorzellen

C.1 Hintergrund und Fragestellung

Die Expression von TAAs ist eine Voraussetzung zur Erkennung von Tumorzellen durch T-Zellen. Daher ist es für Vakzinierungsstrategien mit definierten Tumorantigenen wichtig, einen Überblick über das Expressionsmuster relevanter TAAs auf OvCa-Zelllinien sowie Primärgeweben zu erhalten.

Nun gibt es einige Auswahlkriterien, die ein TAA und die daraus abgeleiteten MHC-Liganden für den therapeutischen Einsatz interessant machen. Die in diesem Teil der Arbeit beschriebenen TAAs wurden daher unter folgenden Kriterien ausgewählt: Zunächst wurde darauf geachtet, dass die Antigene eine möglichst hohe Tumorspezifität haben, um das Risiko für Autoimmunreaktionen zu minimieren. Hierzu wurde die Expression des jeweiligen TAA auf Normalgewebe geprüft. Dies geschah mit Hilfe von mRNA-Daten einer Datenbank von Prof. S. Stevanovic (Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie, Universität

C Ergebnisse und Diskussion zur Charakterisierung von Tumorzellen

Tübingen). Weiter wurde darauf geachtet, dass eine funktionelle Assoziation des TAA mit einem malignen Phänotyp besteht, um Antigenverlustvarianten zu verhindern.

In der Arbeit wurde dann untersucht, wie häufig das Antigen auf den getesteten OvCa-Zelllinien und Geweben zu finden war und wie stark die Überexpression im Vergleich zu Kontrollgeweben war. Darüber hinaus ist die Charakterisierung der OvCa-Zelllinien eine Grundlage für weitere Experimente mit generierten TAA-spezifischen CTLs, wie etwa Zytotoxizitätstests.

Außer den im Folgenden beschriebenen TAAs wurden die bereits gut charakterisierten TAAs WT1, Her-2/neu, hTERT, Survivin, NY-ESO-1, CEA, MUC-1 und EpCAM in die Analysen mit eingeschlossen. Diese Antigene wurden bereits in der Einleitung (Kap. A.3.7.) näher beschrieben.

C.1.1 L1CAM

L1CAM (*L1 cell adhesion molecule*), auch bekannt als CD171, ist ein 200-220 kDa großes Typ I Membran Glykoprotein, das zur Ig Superfamilie gehört (Moos et al. 1988). Die extrazelluläre Domäne besteht aus zahlreichen Ig-ähnlichen Domänen und Fibronektin-ähnlichen Wiederholungen (Typ III). Diese extrazelluläre Domäne ist durch eine einzelne transmembrane Sequenz an eine hochkonservierte zytosolische Domäne gebunden. In neuronalen Zellen spielt L1CAM eine Rolle in der Neuron-Neuron Bindung, Neubildung von Synapsen, Neuritenwachstum und neuronaler Zellmigration (Hortsch 2000; Dahme et al. 1997). Dennoch findet man L1CAM auch auf hämatopoietischen und bestimmten epithelialen Zellen (Debiec et al. 1998; Ebeling et al. 1996; Kowitz et al. 1992; Pancook et al. 1997). Eine L1CAM Überexpression wurde in verschiedenen Tumorentitäten wie Kolonkarzinom (Gavert et al. 2005), OvCa (Fogel et al. 2003) und seit Kurzem auch in Brustkrebs beschrieben (Schroder et al. 2009). Der extrazelluläre Teil von L1CAM

kann auch durch Metalloproteinase ADAM10 von der Zelloberfläche abgespalten werden und findet sich so im Serum vieler OvCa-Patientinnen wieder (Gutwein et al. 2003). Daher wird gespaltenes L1CAM für OvCa auch als neuer prognostischer Marker neben CA125 diskutiert, (Fogel et al. 2004). Außerdem wird abgespaltenes L1CAM zunehmend als Signalmolekül entdeckt, das Signale zur Zellteilung, Migration und Invasion von Tumorzellen vermittelt (Gast et al. 2005; Mechttersheimer et al. 2001). Zudem weisen neuere Ergebnisse auf einen Zusammenhang zwischen L1CAM-Expression und Chemoresistenz hin (Stoeck et al. 2007). Somit könnte eine längerfristige Behandlung mit Cisplatin zu einer verstärkten L1CAM-Expression, ja sogar zu einer Selektion L1CAM exprimierender Tumorzellen mit gesteigerten Wachstums- und Invasionscharakteristika führen und wäre für die Patientinnen sehr ungünstig. Studien mit L1-Antikörpern zeigten aber eine deutliche Reduktion des Tumorwachstums *in vitro* (Gavert et al. 2005a; Primiano et al. 2003) und in einem Xenograft Mausmodell *in vivo* (Arlt et al. 2006). Somit könnte für eine Antikörper-basierte Therapie mit L1-Antikörpern diese erhöhte L1CAM-Expression die therapeutische Wirkung sogar positiv

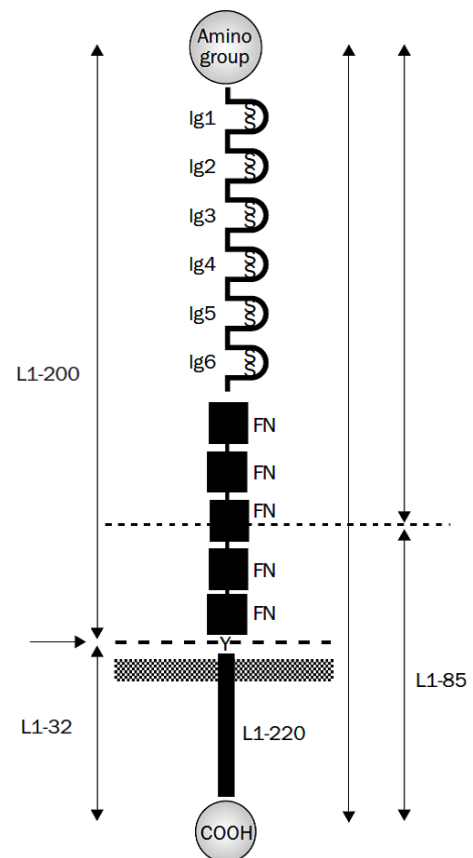


Abbildung 11: Proteolytische Schnittstellen in L1CAM (Fogel et al. 2004)

beeinflussen. Auch für eine peptidbasierte Immuntherapie wäre eine extreme Überexpression von L1CAM eher von Vorteil, da so evtl. mehr L1CAM-abgeleitete Peptide auf der Oberfläche der Tumorzellen präsentiert werden. Dieser Zusammenhang ist jedoch noch nicht eindeutig nachgewiesen.

C.1.2 VEGF

VEGF (*Vascular endothelial growth factor A*) ist ein Mitogen, das in erster Linie von Endothelzellen der Blutgefäße exprimiert wird. Das Protein weist diverse biologische Funktionen wie Stimulation der Angiogenese (Leung et al. 1989; Plouet et al. 1989), Anregung des Wachstums der Endothelzellen (Ferrara and vis-Smyth 1997) und Induktion der Expression von antiapoptotischen Proteinen, wie Bcl-2, in Endothelzellen auf (Gerber et al. 1998). Das menschliche Gen für VEGF ist in acht Exons organisiert, das durch alternatives Spleißen hauptsächlich in den vier Isoformen (VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆) vorkommt (Ferrara et al. 1991; Tischer et al. 1991). Dabei sind VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅ die am häufigsten vorkommenden Isoformen. Ein Tumor benötigt ab einer Größe von ungefähr 1 bis 2 mm³ seine eigene Blutversorgung (Folkman et al. 1971). Unter diesen Umständen kommt es zu hypoxischen Zuständen im Tumorgewebe, welche eine Überexpression von VEGF induzieren. Dies wiederum führt zur verstärkten Blutgefäßbildung und verstärktem Tumorstadium, was inzwischen als prognostischer Parameter gilt (Bossi et al. 1995; Gasparini et al. 1997). Außerdem wurde gezeigt, dass das Tumorstadium in VEGF überexprimierenden Tumoren auch ohne vermehrte Blutgefäßbildung beschleunigt war. Diese Tatsache weist darauf hin, dass VEGF außer seiner klassischen Rolle in der Angiogenese auch eine Rolle in der Metastasierung spielt (Graells et al. 2004). VEGF ist ein interessantes TAA, da es sowohl von angiogenetischen Endothelzellen als auch von Tumorzellen exprimiert wird. Von VEGF-abgeleitete T-Zellepitope könnten deshalb auf beiden Zielzellen präsentiert und erkannt werden, nur, dass bei Endothelzellen die Wahrscheinlichkeit eines Verlustes der MHC-I-Expression unter dem Selektionsdruck einer Immunantwort sehr gering ist. Ein VEGF-abgeleitetes, HLA-B*27 restringiertes Peptid ist bereits bekannt und wurde auf dem HLA-Ligandom von zwei Nierenzellkarzinomen gefunden (Weinzierl et al. 2008). In der Tumorthherapie wurden verschiedene Strategien entwickelt, die den Auf- und Ausbau der Blutversorgung des Tumors durch Eingreifen in die VEGF Signalwege oder durch Regulierung der sezernierten VEGF Konzentration unterbinden sollen. Einige mit VEGF interagierende Moleküle werden zurzeit in klinischen Phase-II Studien getestet. VEGF bindet an zwei Tyrosinkinaserzeptoren (VEGFR-1 und VEGFR-2), die auf den meisten Endothelzellen exprimiert werden. Durch die Bindung mit VEGF dimerisieren die Rezeptoren, und durch Autophosphorylierung erfolgt die Aktivierung des

intrazellulären Signalweges (Matsumoto and Mugishima 2006). VEGFR-1 exprimierende Zellen können selektiv durch das Toxin Gelonin, ein rekombinantes Fusionskonstrukt von VEGF121, getötet werden (Mohamedali et al. 2006). Der wichtigere mitogene und angiogene Mediator VEGFR-2 kann durch Kinaseinhibitoren wie Sunitinib, Sorafenib (Nathan et al. 2006; Schrader et al. 2006), KRN951 (Nakamura et al. 2006) und AMG706 (Polverino et al. 2006) blockiert werden. Der neu entwickelte monoklonale Antikörper Bevacizumab verhindert, dass VEGF an seine Rezeptoren binden kann (Presta et al. 1997). Diese neuen Wirkstoffe werden bereits bei unterschiedlichen Tumorentitäten klinisch eingesetzt.

C.1.3 Testisin

Testisin ist ein Glycosyl-Phosphatidylinositol (GPI) gebundenes oder in der Membran verankertes Protein, das von dem Genen PRSS21 und ESP-1 kodiert wird. Es gehört zur Familie der Serinproteasen, die durch ein hochkonserviertes katalytisches Motiv, bestehend aus Histidin, Aspartat und Serin, gekennzeichnet sind. Diese Aminosäuretriade ist für die enzymatische Aktivität verantwortlich. Testisin gehört zu einer Unterfamilie der Serinproteasen, der Chymotrypsin-Gruppe (S1), die Trypsin, Chymotrypsin und zahlreiche andere sekretierte oder zytoplasmatische Proteasen einschließt. Erstmals wurde eine hohe Testisin-Expression in prämeiotischen Keimzellen in den Hoden gefunden. Auf anderen adulten Normalgeweben konnte hingegen außer auf Eosinophilen (Inoue et al. 1998) keine Expression festgestellt werden. Auf OvCa-Gewebe konnte ebenfalls eine hohe Testisin-Expression festgestellt werden, während diese auf Ovarial-Normalgewebe fehlt (Shigemasa et al. 2000). Bislang wurde kein spezifisches physiologisches Substrat für Testisin beschrieben und der Mechanismus, wie die proteolytische Aktivität in die Keimzellen- oder Tumorbiologie eingreift, bleibt unbekannt. Es wurde jedoch beschrieben, dass Testisin ein GPI-gebundenes Protein auf der Oberfläche von Tumorzellen ist und maligne Transformation initiiert (Tang et al. 2005). Weiter wurde Testisin als ein mit der Metastasierung assoziiertes Gen identifiziert (Bignotti et al. 2007). Diese Eigenschaften machen Testisin zu einem idealen TAA, das direkt mit der Malignität des Tumors verknüpft ist, ausschließlich auf dessen Zelloberfläche und nicht auf Normalgewebe exprimiert wird und zudem noch enzymatische Aktivität besitzt, die vermutlich inhibiert werden kann.

C.1.4 Neuromedin U

Neuromedin U (NmU) ist ein multifunktionales Neuropeptid, das zur Familie der Neuromedine gehört und erstmals aus Nabelschnurblut von Schweinen isoliert wurde. Es wird ubiquitär exprimiert mit höchsten Expressionsraten im Magen-Darm-Trakt und der

Hypophyse (Funes et al. 2002; Howard et al. 2000). Bisher wurden zwei NmU Rezeptoren (NmU R1 und NmU R2) gefunden, wobei NmU R1 nur im Magen-Darm Trakt und NmU R2 nur im Nervensystem exprimiert werden. Die peripheren Funktionen von NmU sind bei der Stimulation glatter Muskeln, Ionentransport im Darm und Regulierung der Nahrungsaufnahme anzusiedeln. Welche Rolle NmU bei der Tumorentwicklung spielt ist bisher nur in Bruchstücken bekannt. In *non small cell lung cancer* (NSCLC) konnte gezeigt werden, dass NmU an GHSR1b und NTSR1 als heterodimeren Rezeptor bindet und dadurch Signale in der Zellzyklusregulation in Gang setzen kann (Takahashi et al. 2006). Eine andere Studie zeigte stark erhöhte NmU Werte in Blutproben von Patienten mit akuter myeloider Leukämie. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass ein neuer autokriner Loop bestehend, aus c-myc, NmU, und seinem Rezeptor NmU R1, das Zellwachstum anregt (Shetzline et al. 2004). Weiter konnte gezeigt werden, dass NmU und sein Rezeptor NmU R2 in Pankreaskarzinom überexprimiert werden und zu erhöhter Metastasierung führen (Ketterer et al. 2009). Im OvCa wurde NmU durch einen Affymetrix GeneChip® als ein hochreguliertes Gen mit hoher Tumorspezifität gefunden und dessen Überexpression nachfolgend durch semi-quantitative RT-PCR auf OvCa-Zelllinien und -Gewebe bestätigt (Euer et al. 2005).

C.1.5 Jagged2

Jagged2 ist einer von fünf Notch-Liganden, die während der embryonalen Entwicklung, aber auch bei der Regulation der Homeostase und der Erhaltung von Stammzellen entscheidende Rollen spielen (Artavanis-Tsakonas et al. 1999; Gridley 1997; Gridley 2003). Notch Liganden sind nach der Ähnlichkeit zu ihren Homologen in *Drosophila* in zwei Gruppen unterteilt (Delta-ähnliche und Serrate-ähnliche). Jagged2 gehört zu der Gruppe der Serrate-ähnlichen Liganden und ist ein membrangebundenes Protein mit vielen *epidermal growth factor* (EGF) Wiederholungen. Notch-Liganden können sowohl eine agonistische interzelluläre Wirkung als auch eine antagonistische intrazelluläre Wirkung haben (D'Souza et al. 2008). Da Notch-Liganden sehr unselektiv an ihre Rezeptoren binden wurde zunächst vermutet, dass eine hohe Redundanz unter diesen sechs Liganden besteht. „Knock-out“ Mäuse für einen der Liganden (Jag1, Jag2 oder DLL4) zeigten jedoch erhebliche embryonale Defekte (D'Souza et al. 2008). Diese Tatsache weist darauf hin, dass die Einzigartigkeit dieser Liganden nicht allein durch ihre Rezeptorbindung gegeben ist sondern auch durch posttranslationalen Modifikationen, proteolytische Prozessierung und Membranaustausch entstehen müssen. Es konnte gezeigt werden, dass Jagged2 die Zytokin-Expression regulieren und somit eine Rekrutierung von Monozyten verhindern kann (Choi et al. 2009). Diese Funktion könnte den Grund einer Überexpression in verschiedenen Tumorentitäten erklären. So konnte eine

Überexpression von Jagged2 in Multiplem Myelom-, Pankreaskarzinom- und B-chronische lymphoblastische Leukämie (B-CLL)-Patienten festgestellt werden (Ghoshal et al. 2009; Mullendore et al. 2009; Rosati et al. 2009). Im OvCa wurde Jagged2 durch einen Affymetrix GeneChip® als ein hochreguliertes Gen mit hoher Tumorspezifität gefunden und dessen Überexpression nachfolgend durch semi-quantitative RT-PCR auf OvCa-Zelllinien und -Geweben bestätigt (Euer et al. 2005).

C.1.6 CA125

Bei dem Protein CA125 (*Cancer Antigen 125*) handelt es sich um ein über 200 kDa-großes Glykoprotein, das von dem Gen MUC16 kodiert wird. CA125 findet sich auf der Zelloberfläche, wird aber auch sezerniert. Im Fetus wird es von Pleura, Peritoneum und Perikard exprimiert. Bei Erwachsenen ist CA125 im Tubenepithel, Endometrium, Endozervix sowie in der Pleura und im Peritoneum nachzuweisen. Es wird vermutet, dass CA125 dort eine Barriere gegenüber fremden und infektiösen Partikeln bildet. CA125 ist ein schon lange bekannter Tumormarker des OvCas und wird von über 80 % aller OvCa im fortgeschrittenen Stadium exprimiert, weswegen es seit vielen Jahren als Tumormarker verwendet wird (Canney et al. 1984). Die CA125-Konzentration im Serum der Patientinnen wird regelmäßig bestimmt, um die Entwicklung des OvCas unter einer Therapie zu überwachen. Bisher ist bekannt, dass CA125 an der Metastasierung beteiligt ist, indem es an Mesothelin der Mesothelzellen bindet (Rump et al. 2004). In klinischer Studie befindet sich derzeit der Antikörper Oregovomab gegen CA125 (Berek et al. 2009).

Von Bellone et al. (Bellone et al. 2009) wurde kürzlich gezeigt, dass gegen ein bestimmtes Peptid von CA125 eine T-Zellantwort generiert werden kann und dass diese T-Zellen auch in der Lage sind Tumorzellen zu lysieren.

C.1.7 Mesothelin

Mesothelin ist ein Glykoprotein, das auf der Oberfläche von Mesothelzellen exprimiert wird. Mesothelzellen kleiden in Form eines Plattenepithels die Pleura, das Peritoneum und das Perikard aus (Hassan et al. 2004). Das Mesothelin-Vorläuferprotein besitzt ein Molekulargewicht von 71 kDa und wird in das 31 kDa-große *megakaryocyte-potentiating factor* (MPF) und das 40 kDa-große Mesothelin gespalten (Ho et al. 2005). Mesothelin wurde bisher auf Pankreaskarzinomen (Argani et al. 2001), Mesotheliomen und 70 % aller epithelialer OvCa stark überexprimiert gefunden (Chang and Pastan 1996). Das Protein kann daher als Differenzierungsantigen bezeichnet werden und stellt auf Grund seiner eher schwachen Expression im Normalgewebe ein ideales Ziel für eine Immuntherapie dar. Die

physiologische Rolle von Mesothelin bleibt spekulativ, da Mäuse mit defektem Mesothelin-Gen keinen veränderten Phänotyp zeigen (Bera and Pastan 2000). Im Kontext von OvCa konnte allerdings gezeigt werden, dass CA125 auf den Tumorzellen an das Mesothelin der Mesothelzellen bindet und an der Metastasierung in die Peritonealhöhle beteiligt ist (Rump et al. 2004). In klinischer Phase I befindet sich derzeit das rekombinante Anti-Mesothelin Immuntoxin SS1P (Hassan et al. 2007). Dieses ist ein chimere Antikörper, bestehend aus einem Fv Anteil gegen Mesothelin und einem daran gekoppelten, attenuierten *Pseudomonas* Endotoxin.

Mesothelin wird von Tumoren teilweise in das Serum abgegeben und Antikörper gegen das Protein konnten bei ca. 40 % aller OvCa-Patientinnen nachgewiesen werden (Ho et al., 2005). Dies weist darauf hin, dass Mesothelin ein immunogenes Protein ist und potentiell eine T-Zellantwort induzieren sollte. Außerdem ist Mesothelin wegen seiner Nachweisbarkeit im Serum als Tumormarker im Gespräch (Chang and Pastan 1996). Dass bestimmte Mesothelin-Epitope tatsächlich eine T-Zellantwort generieren können, wurde von Thomas et al., (Thomas et al. 2004) gezeigt. Die Arbeitsgruppe vakzinierete Pankreaskarzinompatienten mit einer GM-CSF-exprimierenden Pankreaskarzinomzelllinie und testete dann, gegen welche T-Zellepitope die neu entstandenden zytotoxischen T-Zellen (CTL) gerichtet waren. Es zeigte sich, dass die CTLs spezifisch für einige Epitope von Mesothelin waren.

C.1.8 SPAG9

Das Oberflächenprotein SPAG9 (*sperm-associated antigen 9*) gehört zur Familie der mit c-Jun NH₂-terminalen Kinasen (JNK) interagierenden Proteine (*JIP = JNK interacting protein*). SPAG9 wird normalerweise ausschließlich in haploiden Spermienzellen exprimiert und ist dort an der Verschmelzung von Spermium und Eizelle beteiligt (Jagadish et al. 2005). Im Kontext maligner Erkrankungen konnte eine SPAG9-Expression unter anderem bei Nierenzellkarzinomen (Garg et al. 2008), Mammakarzinomen und OvCa (Garg et al. 2007) gezeigt werden, so dass es zu den *Cancer/Testis*-Antigenen gezählt werden kann. *Cancer/Testis*-Antigene werden in vielen Tumoren exprimiert, während die Expression im Normalgewebe ausschließlich auf die Keimzellen beschränkt ist. Sie sind in mehrerer Hinsicht ein ideales Ziel für eine Immuntherapie: Zum einen ist die begrenzte Expression im Normalgewebe von Vorteil, zum anderen sind *Cancer/Testis*-Antigene meist immunogen. Das bedeutet, dass antigenspezifische Antikörper im Serum von Tumorpatienten nachgewiesen werden können (Rana et al. 2006; Suri 2006). SPAG9 wird zusammen mit anti-apoptischen Genen wie BCL2A1 in Tumoren stärker exprimiert, wenn das p53 Gen mutiert ist (Wei et al. 2006). Dieser Zusammenhang wird für das metastatische Potential aggressiver Tumore verantwortlich gemacht. Die Unterdrückung der SPAG9-Expression in

Nierenkarzinom-Zelllinien führte zu einer reduzierten Migration und Invasion dieser Zellen (Garg et al. 2008). Zudem wurde festgestellt, dass etwa zwei Drittel der Patientinnen mit OvCa unabhängig vom Krankheitsstadium Antikörper gegen SPAG9 bilden. Diese Eigenschaften machen SPAG9 zu einem idealen TAA, das direkt mit Malignität des Tumors verknüpft ist, und ausschließlich auf dessen Zelloberfläche und nicht auf Normalgewebe exprimiert wird. Zudem spricht die Bildung von Antikörpern für die Immunogenität des Antigens und ist unabhängig vom Tumorstadium, wodurch sich SPAG9 neben CA125 zu einem Tumormarker qualifiziert (Garg et al. 2007).

C.1.9 SIX1

SIX1 gehört zu den Transkriptionsfaktoren der SIX Klasse mit Homeodomäne. Das Protein ist an der Organentwicklung von Gehirn, Augen, Ohren, Muskeln und Nieren beteiligt (Li et al. 2003), indem es auf Proliferation, Überleben und Migration Einfluss nimmt. In ausdifferenziertem Gewebe kommt es meist zu einem Verlust der Expression, auf Grund dessen es in die Gruppe der reaktivierten onkofetalen Tumorantigene eingeteilt werden kann. Eine Überexpression von SIX1 konnte bereits in mehreren Tumorarten nachgewiesen werden, darunter bei Hepatokarzinomen (Ng et al. 2006), Mammakarzinomen (Ford et al. 1998) und OvCa (Behbakht et al. 2007). SIX1 ist während der Mitose hyperphosphoryliert (Ford et al., 2000) und führt in malignem Gewebe, abhängig vom Grad der Phosphorylierung, zu einer Inhibition des „Checkpoints“ in der G₂-Phase nach DNA-Schädigung (Ford et al. 1998). Zudem wird SIX1 für die Resistenz gegenüber der *tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand* (TRAIL)-vermittelten Apoptose verantwortlich gemacht (Behbakht et al. 2007). Dies ist vor allem deshalb problematisch, da neue Therapiestrategien unter anderem bei OvCa darauf abzielen, den TRAIL-Signalweg zu aktivieren (Rowinsky 2005). Die Tatsache, dass eine SIX1-Überexpression besonders häufig bei Tumoren im Spätstadium zu finden ist und dass die Menge an SIX1-mRNA mit einer schlechten Prognose des Krankheitsverlaufs korreliert, lässt darauf schließen, dass SIX1 direkt an der Malignität des Tumors beteiligt ist.

C.1.10 Osteopontin

Osteopontin (OPN) ist ein saures, phosphoryliertes Glykoprotein, das durch Phosphorylierung, Glykosylierung und proteolytischer Spaltung unterschiedliche Molekulargewichte zwischen 25 kDa und 75 kDa einnehmen kann (Franzen and Heinegard 1985). OPN verdankt seinen Namen seiner Erstentdeckung in Osteoblasten. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass das Protein von vielen Zelltypen exprimiert wird und dass es durch

seine vielen Zustandsformen unterschiedliche Funktionen hat. So ist es unter anderem in Zelladhäsion (Reinholt et al. 1990), Angiogenese (Asou et al. 2001), Apoptose, Entzündungsreaktionen (Denhardt et al. 2001) und Tumormetastasierung involviert. Zusätzlich fungiert OPN als Zytokin und verstärkt die Produktion von $\text{IFN}\gamma$ und IL-12 und hemmt die IL-10-Produktion. Als Differenzierungsantigen konnte OPN bereits überexprimiert in einer Reihe von Tumoren nachgewiesen werden, darunter Lungenkarzinom (Chambers et al. 1996), Mammakarzinom (Tuck et al. 1998), Prostatakarzinom (Thalmann et al. 1999) und OvCa (Song et al. 2008a). Genauso divers wie die physiologische Rolle ist auch der pathologische Einfluss von OPN, da das Protein unter anderem mit einer Reihe von Oberflächenrezeptoren interagiert, was letztendlich zu einer modifizierten Genexpression führen kann. Bei OvCa konnte gezeigt werden, dass OPN den PI3-K/Akt (Phosphoinositol-3-Kinase/Akt) Signalweg aktiviert und somit die Überlebensrate der Tumorzellen unter Stress, wie z.B. unter Hypoxie, erhöht.

Da OPN auch sezerniert wird und die Konzentration im Serum von einem Großteil der OvCa-Patientinnen erhöht ist, wäre es neben CA125 ein potentieller Kandidat für einen diagnostischen Tumormarker (Kim et al. 2002).

C.2 Material und Methoden zur Charakterisierung von Tumorzellen

C.2.1 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien waren bereits in der Arbeitsgruppe verfügbar. Sie stammen zum Teil aus der Abteilung gynäkologische Onkologie Heidelberg, zum Teil aus der Abteilung Gynäkologie und Geburtshilfe Marburg und drei der Zelllinien stammen aus Zell-/Gewebebanken (ECACC, ATCC). Fünf der Zelllinien waren von PD Dr. B. Gückel in früheren Arbeiten etabliert worden. Dabei konnten acht der Zelllinien aus malignem Aszites etabliert werden, eine aus einem Cystadenokarzinom- und nur zwei stammen aus Adenokarzinom-Primärgewebe. Alle Zelllinien waren HLA-A und -B typisiert und wachsen in DMEM-Kulturmedium adhärent.

C Ergebnisse und Diskussion zur Charakterisierung von Tumorzellen

Tabelle 26: OvCa-Zelllinien

Name	Ursprung	Bezug	HLA-Typisierung
BG1	ovariales Adenokarzinom	S. Reinartz, Abteilung Gynäkologie und Geburtshilfe, Universität Marburg (Buick et al., 1985)	A*03, A*26, B*38
CK19	Pathologie unbekannt	S. Reinartz, Abteilung Gynäkologie u. Geburtshilfe, Universität Marburg	A*02, A*66, B*41, B*40
Elgr	maligner Aszites; seröses papilläres Zystadenokarzinom	Dr. B. Gückel, AG Tumorummunologie Universitätsfrauenklinik Tübingen	A*03, A*30, B*13, B*35
FraWü	maligner Aszites	Dr. B. Gückel, AG Tumorummunologie Universitätsfrauenklinik Tübingen	A*02, B*44
GG	maligner Aszites; wenig differenziert, seröses papilläres Zystadenokarzinom	Dr. B. Gückel, AG Tumorummunologie Universitätsfrauenklinik Tübingen	A*02, A*32, B*07, B*27
Hest	maligner Aszites	M. Lindner, Abteilung Gynäkologie u. Geburtshilfe, Universität Heidelberg	A*02, B*27
HEY	papilläres Zystadenokarzinom	S. Reinartz, Abteilung Gynäkologie u. Geburtshilfe, Universität Marburg (Geisinger et al., 1989)	A*03, A*26, B*38
Hi	maligner Aszites	S. Kaul, Frauenklinik, Universität Heidelberg	A*02, A*23, B*44, B*50
KIHe	maligne pleurale Effusion	Dr. B. Gückel, Abteilung Immunologie, Universitätsfrauenklinik Tübingen	A*01, A*24, B*07, B*37
MT	maligner Aszites	Dr. B. Gückel, Abteilung Immunologie, Universitätsfrauenklinik Tübingen	A*01, A*02, B*08, B*51
OAW 42	Aszites, Zystadenokarzinom	ECACC* (85073102)	A*02.
OvCar29	epitheliales Adenokarzinom	Subklon von OvCar 3, ATCC (HTB 161)	n.b.
SKOV3	Aszites, Adenokarzinom	ATCC* (HTB 77)	A*03, A*68, B*18, B*35

n.b. = nicht bekannt

C.2.2 OvCa-Primärgewebe

Das untersuchte OvCa-Primärgewebe wurde im Rahmen OvCa-typischer Operationen an der Universitätsfrauenklinik Tübingen asserviert und von Dr. A. Stähler pathologisch untersucht und präpariert. Anschließend wurde das Gewebe noch am selben Tag zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet und so für weitere Verwendungszwecke zugänglich gemacht. Dieses Material wurde im Rahmen eines Kooperationsprojektes von PD Dr. Gückel und Dr. Sigurdardottir (Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie, Universität Tübingen) anschließend noch weiter untersucht. Im Gegensatz zu den Zelllinien stammt dieses Gewebe ausschließlich von Primärtumoren oder Netzmetastasen und nicht aus Asziten. Der

C Ergebnisse und Diskussion zur Charakterisierung von Tumorzellen

Großteil der Gewebe stammt von papillär-serösen Adenokarzinomen der Ovarien mit überwiegend geringem Differenzierungsgrad.

Tabelle 27: OvCa-Primärgewebe

Patienten-Identifikation	Alter	Pathologie und Einteilung in Differenzierungsgrade *)	HLA-Typisierung
HBL	49	Gering differenziertes transitionalzelliges (solides), fokal auch seröses Adenocarcinom der Ovarien, G3*	A*01, A*03, B*07, B*35
ASC	86	Seröses Adenokarzinom der Ovarien, G3*	A*01, A*03, B*07, B*08
ASZ	38	Seröses Adenocarcinom der Ovarien, G3*	A*01, A*02, B*13, B*44
RKA	61	Muzinöser Borderlinetumor des Ovars	A*01, A*02, B*08, B*41
IKL	74	Seröses Adenokarzinom der Ovarien, G3*	A*03, A*32, B*44, B*49
WSC	68	Seröses Adenokarzinom der Ovarien, G2-3*	A*02 negativ
H1	74	Papillär-seröses Adenokarzinom der Ovarien, G3*	A*02 positiv
LA	79	Papillär-seröses Adenokarzinom der Ovarien, G1*	A*02 negativ
M1	62	Papillär-seröses Adenokarzinom der Ovarien, G3*	A*02 negativ
S1	62	Papillär-seröses Adenokarzinom der Ovarien, G3*, eine Gewebeprobe aus dem Ovar, abgekürzt mit S1Ova; eine Gewebeprobe aus dem Omentum (Metastase), abgekürzt mit S1Netz	A*02 negativ
S2	78	Papillär-seröses Adenokarzinom der Ovarien G3*	A*02 positiv
S3	45	Papillär-seröses Adenokarzinom der Ovarien G3*, Probe aus dem Omentum (Metastase)	A*02 positiv
S4	48	Adeno-squamöses Karzinom des Corpus Uteri G3*	n.b.
P1	61	Papillär-seröses Adenokarzinom der Ovarien G1*	n.b.
B1	80	Maligner Müller'scher-Mischtumor G3*	n.b.
G1	57	Seröses-endometrioides Adenokarzinom der Ovarien G2*	n.b.
K1	68	Papillär-seröses Adenokarzinom der Ovarien G3*	n.b.
K2	68	Papillär-seröses Adenokarzinom der Ovarien G3*	n.b.
R1	77	Endometrioides Stromasarkom G3*	A*02 positiv
S5	68	Endometrioides Adenokarzinom der Ovarien G2*	n.b.
J1	63	Papillär-seröses Adenokarzinom der Ovarien G2-3*	n.b.
D1	83	Papillär-seröses Adenokarzinom der Ovarien G3*	n.b.
D2	84	Seröses Adenokarzinom der Ovarien G3*	n.b.
G2	63	Seröses Adenokarzinom der Ovarien G3*	n.b.
Aszites 1	n.b.	n.b.	n.b.
Aszites 2	n.b.	n.b.	n.b.

*G1 bzw. G3: Differenzierungsgrade des Tumorgewebes; G1 differenziert, G3 wenig differenziert; n.b. = nicht bekannt

C.2.3 Verwendete Untersuchungsmethoden

Die in diesem Kapitel der Arbeit geschilderten Methoden sind ausführlich in den Teilen B.2 Molekularbiologische Methoden, B.3 Biochemische Methoden, B.5 Analytische Methoden und C.3 Ergebnisse beschrieben.

Qualitative RT-PCR:	Kap. B.2.3 und Kap. C.3.1
Quantitative RT-PCR:	Kap. B.2.4 und Kap.C.3.2
Westernblot:	Kap. B.3.4 und Kap.C.3.3
Durchflusszytometrische Analyse:	Kap. B.5.1 und Kap. C.3.4

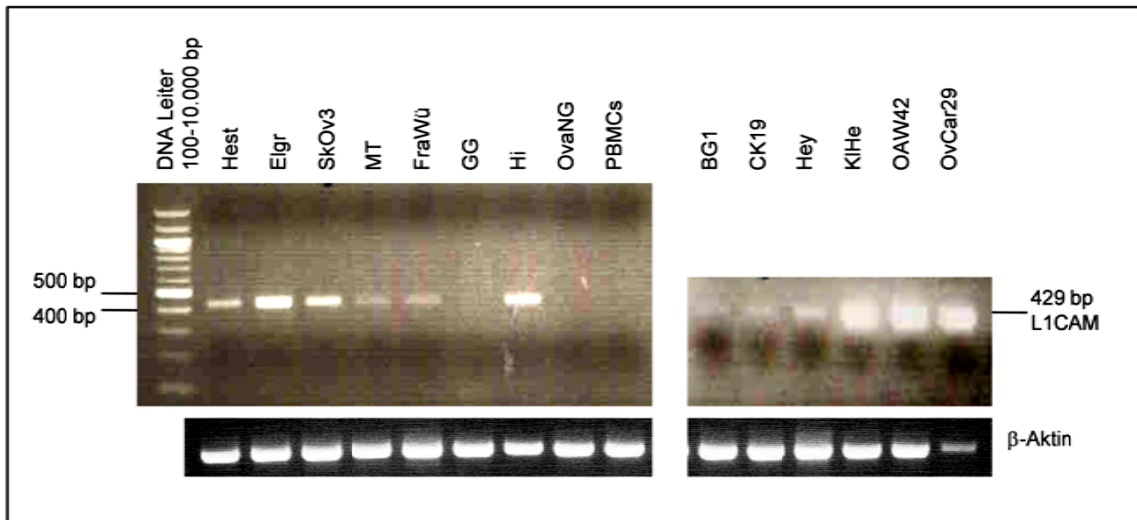
C.3 Ergebnisse zur Charakterisierung von Tumorzellen

Die folgenden Datenbeispiele sollen die verwendeten Methoden zum TAA Nachweis und deren spätere Auswertung erläutern. Exemplarisch wurden die Ergebnisse aller Methoden für das TAA L1CAM dargestellt. Eine Zusammenfassung aller untersuchten OvCa-Zelllinien und OvCa-Gewebe ist am Ende dieses Ergebnisteils in Tabelle 28 dargestellt.

C.3.1 Nachweis OvCa-assoziiertes Antigen mittels qualitativer RT-PCR

Um die Häufigkeit verschiedener TAAs in OvCa nachzuweisen, wurde cDNA von Zelllinien und OvCa-Primärgewebe mit Hilfe der qualitativen RT-PCR analysiert (Kap.2.1.3). Zur Untersuchung wurden die TAAs WT1, Her2/neu, NY-ESO-1, EpCAM, L1CAM, Testisin und CA125 herangezogen. Die zugehörigen Primer stammen aus der Literatur und sind einschließlich den Amplifikationsbedingungen in Tabelle 12 aufgeführt. Da mit der isolierten mRNA kein DNase Verdau durchgeführt wurde, könnte diese noch DANN-Spuren enthalten. Um nun sicher zu gehen, dass die PCR Signale nur von mRNA abstammen, wurde überprüft, ob das PCR Produkt zwei Exons überlappt. RT-PCR Analysen erfolgten nur mit cDNA-Proben, in denen β -Actin erfolgreich nachgewiesen werden konnte. Als Negativkontrolle diente eine kommerziell erhältliche Ovarial-Normalgewebe RNA (*human ovary total* RNA (Ambion)). Die Auswertung im Agarosegel erfolgte rein visuell, beurteilt wurde nur das Vorhandensein oder Nicht-Vorhandensein des entsprechenden Signals. Abbildung 12 zeigt eine repräsentative Auswertung der Expressionssignale von L1CAM auf OvCa-Zelllinien und OvCa-Primärgewebe im Agarosegel.

A L1CAM-Expression auf OvCa-Zelllinien



B L1CAM-Expression auf OvCa-Primärgewebe

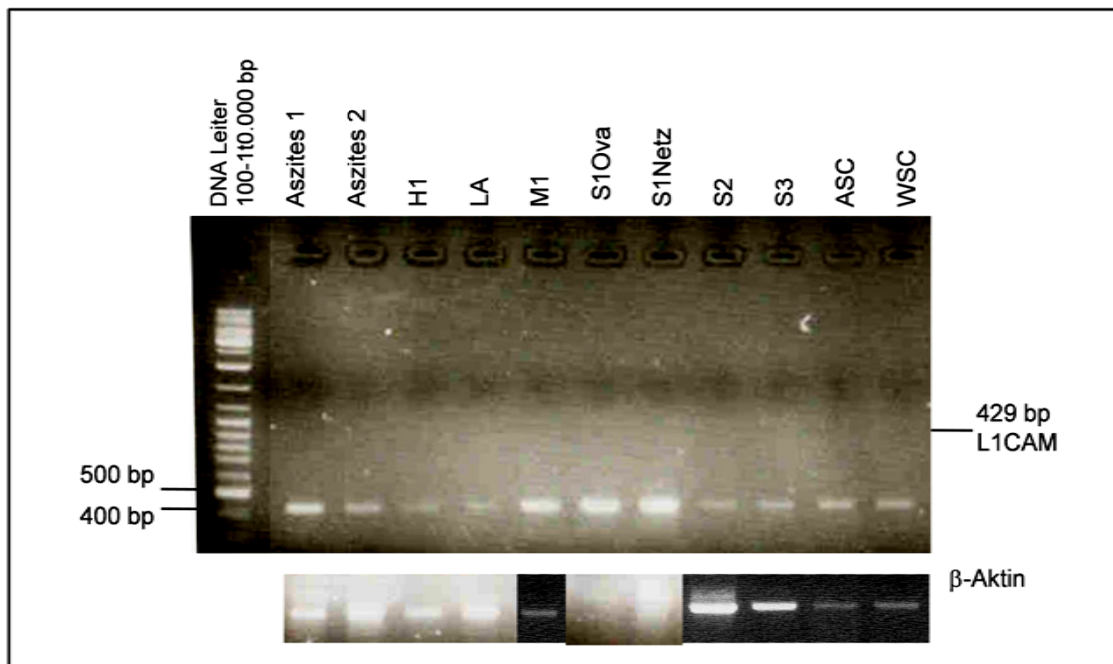


Abbildung 12: Qualitative RT-PCR zur Darstellung der Expression von L1CAM auf OvCa-Zelllinien und OvCa-Primärgewebe.

Zur Bestimmung der Expression von L1CAM wurde aus den Tumorzellen die Gesamt-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Zur Kontrolle der RNA-Extraktion erfolgte die Amplifikation von β -Aktin mit spezifischen Primern. Die PCR auf L1CAM erfolgte in getrennten Ansätzen mit spezifischen Primern. Die Auswertung erfolgte in einem 1,5%-igen Agarosegel. Ausgewertet wurde das Vorhandensein oder Nicht-Vorhandensein des entsprechenden Signals. Die abgebildeten Gele zeigen **A** Expression von L1CAM (429 bp) auf OvCa-Zelllinien mit Ovarial-Normalgewebe- (OvaNG) und PBMC-Kontroll-RNA als Negativkontrolle. Zum Größenvergleich ist ein 100bp-DNA-Molekulargewichtsmarker abgebildet. **B** zeigt die mRNA-Expression von L1CAM (429 bp) auf OvCa-Primärgewebe.

L1CAM wird von fast allen OvCa-Zelllinien exprimiert (12 von 14). Die Expression in BG1 und CK19 ist sehr schwach und nur in GG ist kein Signal zu erkennen. In den OvCa-Primärgeweben ist hingegen in allen Proben ein Expressionssignal zu erkennen (11 von 11). Das entspricht mehr als den in der Literatur beschriebenen 80%. Vergleicht man Zelllinien mit Primärgewebe sieht man, dass weniger Zelllinien als Primärgewebe L1CAM exprimieren. Zu berücksichtigen ist dabei, dass es sich bei den Zelllinien hauptsächlich um aus Asziten isolierte Tumorzellen, also vermutlich entdifferenzierte Tumorzellen handelt. Das hier untersuchte Gewebe stammt hingegen von Primärtumoren und Netzmetastasen ab.

C.3.2 Nachweis OvCa-assoziierter Antigene mittels quantitativer RT-PCR

Die quantitative RT-PCR hat gegenüber der qualitativen RT-PCR die Vorteile, dass sie erstens die sensitivere Messmethode ist und zweitens eine Quantifizierung der Signale möglich macht (Kap. B.2.4). So wurde in den folgenden Abbildungen die Expression von Ovarial-Normalgewebe auf 1 gesetzt und die Expressionssignale der einzelnen Zelllinien darauf normiert. Ein Signal wurde als positiv gewertet, wenn es mehr als 2,5-mal so hoch wie das des Ovarial-Normalgewebes war. Da die Proben jeweils in Triplikaten gemessen wurden, konnte auch eine Standardabweichung berechnet und in Form von Fehlerbalken dargestellt werden. Zur Untersuchung wurden die TAAs hTERT, Survivin, L1CAM, NmU, Jagged2 und VEGF herangezogen. Die zugehörigen Primer stammen aus der Literatur und sind in Tabelle 13 aufgeführt. Hier ist exemplarisch das Expressionsprofil von L1CAM dargestellt.

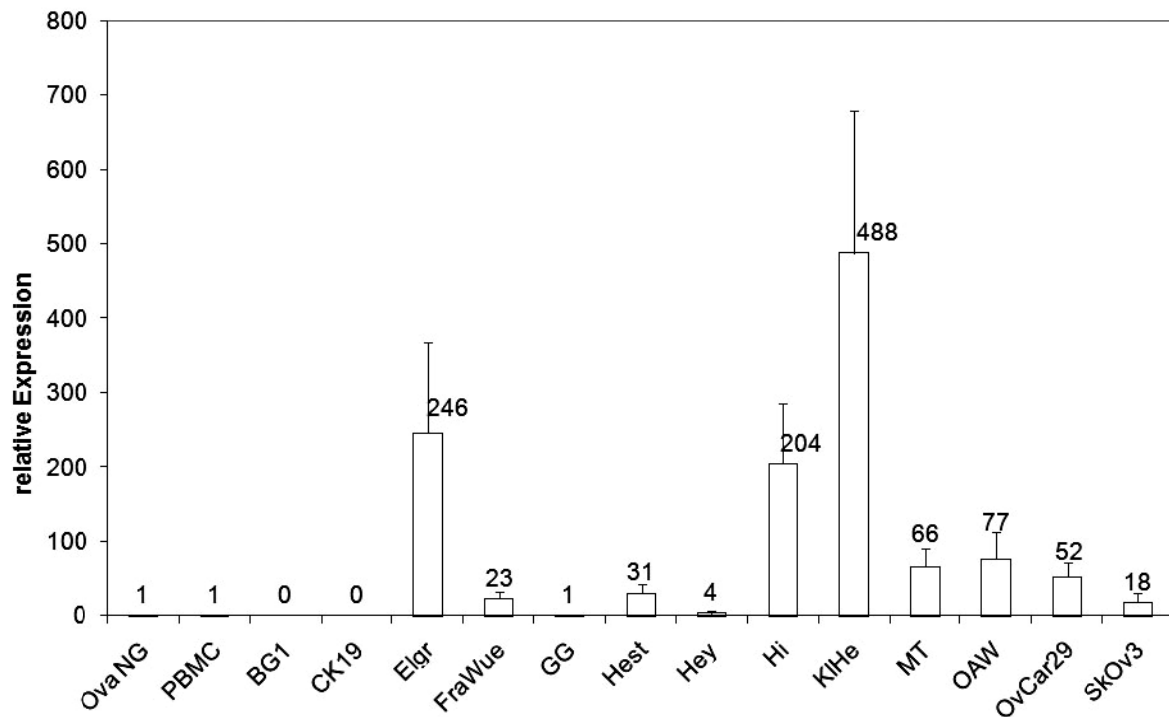


Abbildung 13: Quantitative RT-PCR zur Darstellung der mRNA-Expression von L1CAM auf OvCa-Zelllinien

Zur Bestimmung der mRNA-Expression von L1CAM wurde eine Echtzeit-qRT-PCR mit spezifischen Primern und SYBR[®]-Green durchgeführt und das Ergebnis auf 18S-rRNA-Expression normiert. Angegeben sind die Expressionsstärken in Bezug zur Expression auf Ovarial-Normalgewebe (OvaNG), die auf 1 gesetzt wurde. Die Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte aus Triplikaten in der PCR.

Die auf 1 normierte Negativkontrolle OvaNG wie auch die PBMCs exprimieren kein L1CAM. Auch BG1, CK19 und GG zeigen im Verhältnis dazu kein Signal. Elgr, Hi und KiHe zeigen eine deutliche L1CAM Überexpression. Insgesamt wird L1CAM in 10 von 13 OvCa-Zelllinien im Vergleich zu Ovarial-Normalgewebe überexprimiert.

C.3.3 Nachweis OvCa-assoziierter Antigene mittels Westernblot

Die zuvor beschriebenen molekularbiologischen Methoden geben zwar Aufschluss über die mRNA-Expression der zu untersuchenden Antigene, lassen jedoch keinerlei Rückschluss auf die Protein-Expression zu. Im Folgenden wird daher die proteinchemische Methode des Westernblot zur Analyse der Protein-Expression beschrieben. Sämtliche in diesem Kapitel gezeigte Ergebnisse wurden von Josefine Götze im Rahmen ihrer Diplomarbeit generiert. Zur Untersuchung wurden die TAAs L1CAM, Mesothelin, CA125, VEGF, OPN, SPAG9 und SIX1 herangezogen. Die Auswertung des Westernblot erfolgte rein visuell, beurteilt wurde nur das Vorhandensein oder Nicht-Vorhandensein des entsprechenden Signals. Abbildung 14 zeigt exemplarisch den Westernblot für L1CAM auf sämtlichen OvCa-Primärgeweben.

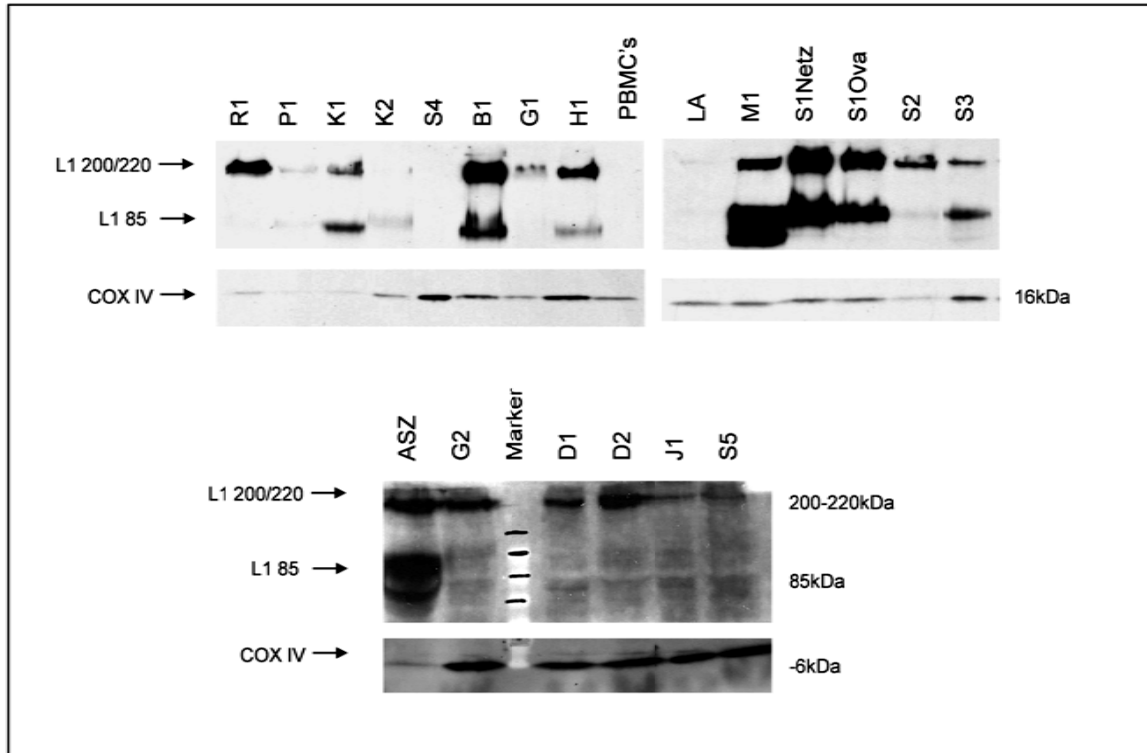


Abbildung 14: Westernblot zur Darstellung der Protein-Expression von L1CAM auf OvCa-Primärgewebe

Zur Bestimmung der Protein-Expression von L1CAM auf OvCa-Primärgewebe wurde ein Westernblot mit dem monoklonalen L1CAM-spezifischen AK L1-11A durchgeführt. Die COX IV-Expression diente als Ladekontrolle. Als Negativkontrolle wurde Proteinlysate von PBMCs verwendet.

Das vorhergesagte Molekulargewicht von L1CAM beträgt in voller Länge 220 kDa. Auf dieser Höhe sind Banden bei den meisten Proben zu erkennen, außer bei den Proben LA, S4, K2 und den PBMCs, die als Negativkontrolle dienten. Wie Mechttersheimer et al. (Mechttersheimer et al. 2001) zeigen konnten, kann L1CAM jedoch auch durch die Metalloproteinase ADAM10 und die Serinproteinase Plasmin in verschieden große Fragmente gespalten werden (Kap.C.1.1, Abb. 11). Daher sieht man neben einer Bande bei 220 kDa bei manchen Proben eine Bande von 85 kDa. Dieses Fragment wird von Plasmin über der Zelloberfläche abgespalten und ist in 9 der 20 untersuchten OvCa-Primärgewebe zu finden. Insgesamt exprimieren 18 der 20 untersuchten OvCa-Primärgewebe L1CAM-Protein.

C.3.4 Nachweis OvCa-assoziierter Antigene mittels durchflusszytometrischer Analyse

Die durchflusszytometrische Analyse (FACS) wurde zusätzlich zur Westernblot Methode zur Bestimmung der Protein-Expression herangezogen. Allerdings konnte diese Methode nur für einige TAAs eingesetzt werden, für die auch FACS-gängige Antikörper verfügbar waren. Ähnlich wie bei den molekularbiologischen Methoden hat die durchflusszytometrische Analyse den Vorteil, dass die Protein-Expression besser quantifiziert werden kann (Kap. B.5.1 und B.5.2.). Die Auswertung erfolgte über die Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität (mIF) nach Abzug der Hintergrundfärbung der entsprechenden Isotypenkontrolle (Δ mIF). Hierbei wurden Δ mIF-Werte unter 2 als negativ gewertet. Zur Untersuchung wurden die TAAs WT1, Her2/neu, hTERT, Survivin, CEA, MUC-1, EpCAM, L1CAM, und VEGF herangezogen. Die zugehörigen Antikörper und Zweitantikörper sind in Tabelle 19 und 20 aufgeführt. Hier sind exemplarisch die Protein-Expressionen von L1CAM und HLA-A*02 auf sechs OvCa-Zelllinien dargestellt.

C Ergebnisse und Diskussion zur Charakterisierung von Tumorzellen

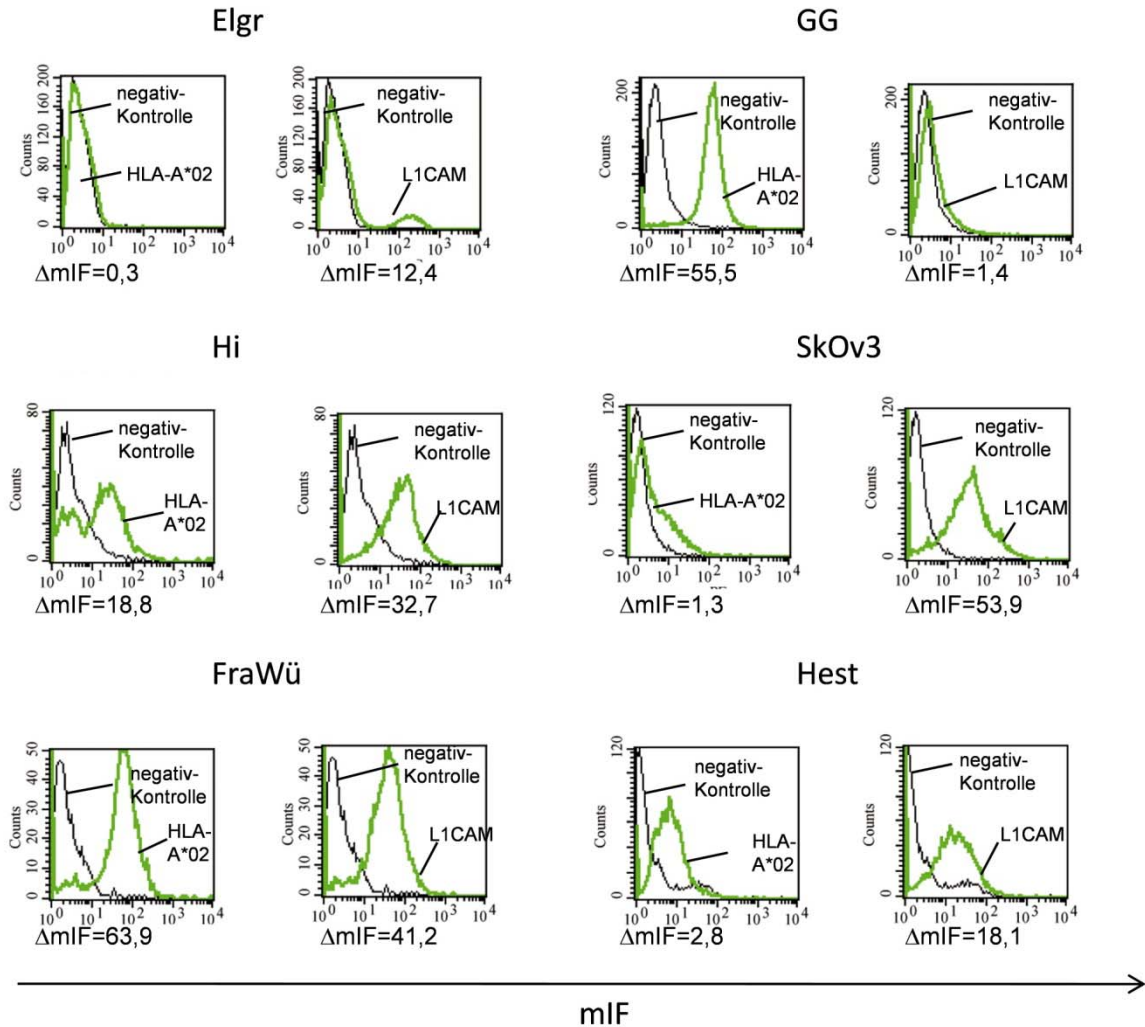


Abbildung 15: Durchflusszytometrische Analyse zur Darstellung der Protein-Expression von HLA-A*02 und L1CAM auf sechs OvCa-Zelllinien.

Die Bestimmung der Protein-Expression von HLA-A*02 und L1CAM erfolgte durchflusszytometrisch mittels indirekter extrazellulärer Fluoreszenzanalyse. Die L1CAM (L1-11A)- und HLA-A*02 (BB7.2)-spezifischen AK wurden mit einem PE-konjugierten Ziege-anti-Maus AK detektiert. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten der jeweiligen Antigene als Überlagerungen über die Negativkontrollen (Färbung nur mit Zweitantikörper).

Bis auf die Zelllinien Elgr und SkOv3 sind alle anderen hier dargestellten HLA-A*02 positiv, wobei hier auch schon deutliche Unterschiede bei den Expressionsstärken feststellbar sind. So exprimieren zum Beispiel die Zelllinien GG und FraWü deutlich mehr HLA-Moleküle ($\Delta mIF=55,52$ und $63,99$) als Hi oder Hest ($\Delta mIF=2,79$ und $18,81$). L1CAM wird von allen Zelllinien außer GG exprimiert. Auch hier gibt es große Unterschiede bei der Expressionshöhe (von $\Delta mIF=1,36$ bis $\Delta mIF=53,94$). Analysen dieser Art sind eine Grundlage für weitere Experimente mit generierten TAA-spezifischen CTLs, wie etwa Zytotoxizitätstests. Da man die HLA-Moleküle in dieser Methode direkt an der Zelloberfläche färbt, gibt dieses Ergebnis direkten Aufschluss über die HLA-Dichte auf der Zelloberfläche. Somit bieten Zellen mit höherer HLA-Dichte auch potentiell mehr Angriffsfläche für CTLs.

C.4 Zusammenfassung und Diskussion zur Charakterisierung von Tumorzellen

C.4.1 Bewertung und Vergleich der verwendeten Methoden zur TAA-Analyse auf Tumorzellen

Analysen der mRNA-Expression

Die Ergebnisse der qualitativen und quantitativen PCR stimmen in zwei der 13 untersuchten Zelllinien (BG1, CK19) nicht überein. Hier zeigt die qualitative PCR für zwei Zelllinien noch schwache Banden, wo die quantitative PCR schon kein Signal mehr detektieren konnte. Dies war nicht zu erwarten, da die quantitative PCR eigentlich die sensitivere Methode sein sollte. Das Ergebnis der quantitativen PCR war reproduzierbar. Insgesamt zeigte sich, dass der Versuch der Quantifizierung der Ergebnisse der qualitativen PCR aufgrund der Bandenintensitäten nicht zuverlässig ist, da beispielsweise die Expressionsbanden für KIHe und OAW42 gleich intensiv erscheinen, in der quantitativen PCR jedoch große Unterschiede aufweisen.

Methodisch kann man zusammenfassen, dass die PCR sicher die einfachste und kostengünstigste Methode ist um sich einen Überblick über Expressionsprofile von Antigenen zu verschaffen. Hier gilt allerdings vor allem bei der Auswahl der Primer, dass nicht alle in der Literatur beschriebenen ohne gründliche Recherchen der Richtigkeit der Sequenz und der Größe des entstehenden PCR Produktes zu verwenden sind. Auch sind die Angaben zum PCR-Programm oft lückenhaft und es bedarf einiger Optimierung bis zuverlässige Expressionsergebnisse erzielt werden können. Die quantitative PCR ist in dieser Hinsicht meist nicht einfacher, dafür aber deutlich kostenintensiver. Auch hier bedarf es einer Optimierung der Amplifikationsbedingungen.

Wie von Weinzierl et al. gezeigt werden konnte, besteht kein klarer Zusammenhang zwischen mRNA-Expression und dem HLA-Ligandom (Weinzierl et al. 2007). In dieser Arbeit wurden Liganden von Proteinen gefunden, für die keine mRNA detektierbar war. Dies ist nicht verwunderlich, da schon die Korrelation zwischen Höhe der mRNA-Expression und Protein-Expression nicht gegeben ist (Gygi et al. 1999).

Analysen der Protein-Expression

Beim Westernblot ist eine Quantifizierung nur sehr vage möglich. Mit Hilfe der COX IV Ladekontrolle lässt sich jedoch feststellen, dass die Tumore K1, B1, M1, S1 und ASZ L1CAM sehr stark exprimieren und auch das abgespaltene Fragment auf der Oberfläche tragen. Diese fünf Tumore hatten einen sehr hohen Differenzierungsgrad (G3). Die Tumore mit niedrigem Differenzierungsgrad (G1-G2) hingegen exprimieren durchgehend wenig L1CAM,

und wenn, dann nur das ungespaltene Gesamtprotein. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen von Mechtersheimer et al., nämlich dass L1CAM und speziell gespaltenes L1CAM in bereits metastasierten Tumoren auftritt und ein Marker für eine schlechte Prognose ist (Mechtersheimer et al. 2001), überein.

Wie schon angesprochen, kann man mit der durchflusszytometrische Analyse der Zelllinien nicht nur die Expression des jeweiligen TAAs quantifizieren, sondern auch die HLA-Dichte auf den Zellen bestimmen. Geht man davon aus, dass höhere TAA-Expressionen auch höhere Peptidkonzentrationen auf MHC-Molekülen bedeuten, könnte man durch diese Färbung z.B. die Lysierbarkeit der Zielzellen durch T-Zellen innerhalb eine Zytotoxizitätstests prognostizieren. Die besten Zielzellen wären somit Zellen mit hoher HLA- und hoher Antigen-Expression. Dass nun aber tatsächlich ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Protein-Expression des TAA und der Peptidkonzentration auf den MHC-Molekülen besteht, konnte bisher noch nicht gezeigt werden.

Methodisch kann man zusammenfassen, dass beide Methoden zur Analyse der Protein-Expression deutlich aufwendiger und kostenintensiver sind als die mRNA-Analysen. Der Westernblot hat den Vorteil, dass man keine einzelnen lebenden Zellen benötigt, was für die Analyse von Gewebestücken interessant ist. Mit der durchflusszytometrische Analyse erhält man hingegen mehr Informationen über Quantität und Lokalisation des untersuchten Proteins. Man kann zum Beispiel durch geeignete Mehrfachfärbungen zunächst die Tumorzellen eingrenzen und dann die Höhe der Protein-Expression des untersuchten TAA auf deren Zelloberfläche oder intrazellulär bestimmen.

C.4.2 Zusammenfassung der Ergebnisse zur TAA-Analyse auf Tumorzellen

Im Folgenden werden alle Expressionsergebnisse der zuvor beschriebenen Methoden auf die 18 hier untersuchten TAAs zusammengefasst. Die Ergebnisse der verschiedenen Methoden für die einzelnen Zelllinien wurden nach den in den jeweiligen Methoden beschriebenen Richtlinien in + und – zusammengefasst und in Tabelle 28 zusammengetragen. In der Tabelle wurden dann die prozentualen Expressionen des jeweiligen TAA bezogen auf die Anzahl der getesteten Zelllinien bzw. Gewebe berechnet. Am rechten Rand der Tabelle sieht man, wie viele der untersuchten TAAs eine Zelllinie/Gewebe parallel trägt. Wurde ein Antigen durch verschiedene Methoden untersucht, so wurde die Expression nur dann als positiv gewertet, wenn sie bei allen getesteten Methoden positiv war. Zelllinien, die nur eine positive mRNA-Expression, jedoch keine Protein-Expression für ein Antigen aufwiesen, wurden also nicht als positiv für das Antigen gewertet.

C Ergebnisse und Diskussion zur Charakterisierung von Tumorzellen

Tabelle 28: Zusammenfassung der verschiedenen Testmethoden und Darstellung aller getesteten Expressionsprofile der OvCa-Zelllinien und OvCa-Primärgewebe

Die jeweiligen Expressionen wurden, wie in den verschiedenen Methoden beschrieben in + und – zusammengefasst und in der Tabelle zusammengetragen. Gezeigt wird wieviele untersuchte Zelllinien/Gewebe für ein Antigen positiv sind, bzw wieviele der untersuchten TAAs eine Zelllinie/Gewebe trägt.

OvCa Zelllinien	Tumor-suppressor			Ongogene									Onkofetale									Überexprimierte										
	WT1			Her2/neu			hTERT			Survivin			CEA			SIX1			MUC-1			EpCAM			L1CAM			NmU				
	PCR	WB	FACS	PCR	WB	FACS	PCR	WB	FACS	PCR	WB	FACS	PCR	WB	FACS	PCR	WB	FACS	PCR	WB	FACS	PCR	WB	FACS	PCR	WB	FACS	PCR	WB	FACS		
BG1	-	n.a.	+	+	n.a.	+	+	n.a.	-	+	n.a.	+	n.a.	n.a.	+	n.a.	+	n.a.	n.a.	n.a.	+	+	n.a.	-	-	n.a.	-	+	n.a.	n.a.		
CK19	+	n.a.	+	+	n.a.	+	+	n.a.	+	+	n.a.	+	n.a.	n.a.	+	n.a.	+	n.a.	n.a.	n.a.	+	-	n.a.	-	-	n.a.	-	+	n.a.	n.a.		
Elgr	-	n.a.	+	+	n.a.	+	+	n.a.	+	+	n.a.	+	n.a.	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	n.a.	n.a.	-	+	n.a.	+	+	n.a.	+	+	n.a.	n.a.		
FraWü	+	n.a.	+	+	n.a.	+	+	n.a.	-	+	n.a.	+	n.a.	n.a.	+	n.a.	+	n.a.	n.a.	n.a.	+	+	n.a.	+	+	n.a.	+	+	n.a.	n.a.		
GG	+	n.a.	+	+	n.a.	+	+	n.a.	+	+	n.a.	+	n.a.	n.a.	-	n.a.	+	n.a.	n.a.	n.a.	-	+	n.a.	+	+	n.a.	-	+	n.a.	n.a.		
Hest	+	n.a.	-	+	n.a.	+	+	n.a.	+	+	n.a.	+	n.a.	n.a.	-	n.a.	+	n.a.	n.a.	n.a.	+	+	n.a.	+	+	n.a.	+	+	n.a.	n.a.		
Hey	-	n.a.	-	+	n.a.	+	+	n.a.	-	+	n.a.	+	n.a.	n.a.	+	n.a.	+	n.a.	n.a.	n.a.	+	+	n.a.	-	+	n.a.	+	+	n.a.	n.a.		
Hi	+	n.a.	+	+	n.a.	+	-	n.a.	+	+	n.a.	+	n.a.	n.a.	+	n.a.	-	n.a.	n.a.	n.a.	+	+	n.a.	+	+	n.a.	+	+	n.a.	n.a.		
KIHe	+	n.a.	+	+	n.a.	+	+	n.a.	+	+	n.a.	+	n.a.	n.a.	+	n.a.	-	n.a.	n.a.	n.a.	+	+	n.a.	+	+	n.a.	+	+	n.a.	n.a.		
MT	+	n.a.	+	+	n.a.	+	-	n.a.	-	+	n.a.	+	n.a.	n.a.	-	n.a.	+	n.a.	n.a.	n.a.	+	-	n.a.	-	+	n.a.	+	+	n.a.	n.a.		
OAW42	+	n.a.	-	+	n.a.	+	+	n.a.	-	+	n.a.	+	n.a.	n.a.	+	n.a.	+	n.a.	n.a.	n.a.	+	+	n.a.	-	+	n.a.	+	+	n.a.	n.a.		
Ovcar29	+	n.a.	+	+	n.a.	+	+	n.a.	+	+	n.a.	+	n.a.	n.a.	+	n.a.	+	n.a.	n.a.	n.a.	+	-	n.a.	-	+	n.a.	+	+	n.a.	n.a.		
SkOv3	-	n.a.	+	+	n.a.	+	+	n.a.	+	+	n.a.	+	n.a.	n.a.	-	n.a.	+	n.a.	n.a.	n.a.	+	+	n.a.	-	+	n.a.	+	+	n.a.	n.a.		
Expression	89%	62%	100%	100%	85%	46%	100%	100%	46%	77%	85%	77%	85%	77%	38%	77%	77%	100%														
OvCa Primärgew.																																
S1	n.a.	n.a.	n.a.	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	+	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
S1 Netz	n.a.	n.a.	n.a.	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	+	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
H1	n.a.	n.a.	n.a.	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	+	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
M1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	+	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
L1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	+	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
S2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	+	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
S3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	+	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
				100%				100%			100%																100%	86%				

	Überexprimierte															Angiogenese			Cancer/Testis			pos. Antigene	OvCa Zelllinien									
	Jagged2			Mesothelin			OPN			CA125			Testisin			VEGF			SPAG9					NY-ESO-1								
	PCR	WB	FACS	PCR	WB	FACS	PCR	WB	FACS	PCR	WB	FACS	PCR	WB	FACS	PCR	WB	FACS	PCR	WB	FACS			PCR	WB	FACS						
+	n.a.	n.a.	n.a.	+	n.a.	n.a.	+	n.a.	+	+	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	-	-	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	n.a.	10/18	BG1							
+	n.a.	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	+	n.a.	-	-	n.a.	-	n.a.	n.a.	+	+	+	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	n.a.	11/18	CK19							
+	n.a.	n.a.	n.a.	+	n.a.	n.a.	+	n.a.	-	+	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	-	-	n.a.	+	n.a.	-	n.a.	n.a.	10/18	Elgr							
+	n.a.	n.a.	n.a.	+	n.a.	n.a.	+	n.a.	+	+	n.a.	+	n.a.	n.a.	+	+	+	n.a.	-	n.a.	+	n.a.	n.a.	11/18	FraWü							
-	n.a.	n.a.	n.a.	+	n.a.	n.a.	+	n.a.	+	+	n.a.	+	n.a.	n.a.	+	+	+	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	n.a.	11/18	GG							
+	n.a.	n.a.	n.a.	+	n.a.	n.a.	+	n.a.	+	+	n.a.	+	n.a.	n.a.	-	+	-	n.a.	+	n.a.	-	n.a.	n.a.	14/18	Hest							
+	n.a.	n.a.	n.a.	+	n.a.	n.a.	+	n.a.	-	+	n.a.	-	n.a.	n.a.	-	-	-	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	n.a.	10/18	Hey							
+	n.a.	n.a.	n.a.	+	n.a.	n.a.	+	n.a.	+	-	n.a.	+	n.a.	n.a.	+	-	+	n.a.	+	n.a.	-	n.a.	n.a.	12/18	Hi							
+	n.a.	n.a.	n.a.	+	n.a.	n.a.	+	n.a.	+	+	n.a.	-	n.a.	n.a.	+	n.a.	+	n.a.	+	n.a.	-	n.a.	n.a.	14/18	KIHe							
+	n.a.	n.a.	n.a.	+	n.a.	n.a.	+	n.a.	+	+	n.a.	-	n.a.	n.a.	+	n.a.	+	n.a.	+	n.a.	-	n.a.	n.a.	11/18	MT							
-	n.a.	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	+	n.a.	+	+	n.a.	-	n.a.	n.a.	+	n.a.	-	n.a.	+	n.a.	-	n.a.	n.a.	10/18	OAW42							
+	n.a.	n.a.	n.a.	+	n.a.	n.a.	+	n.a.	-	-	n.a.	-	n.a.	n.a.	+	n.a.	-	n.a.	+	n.a.	-	n.a.	n.a.	12/18	Ovcar29							
+	n.a.	n.a.	n.a.	+	n.a.	n.a.	+	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	+	n.a.	+	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	n.a.	10/18	SkOv3							
85%				77%				100%			66%	52%		33%			62%	66%	46%	46%			0%									
OvCa Primärgew.																																
n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	+	n.a.	+	n.a.	+	-	n.a.	+	n.a.	n.a.	n.a.	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	9/10	S1							
n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	+	n.a.	+	n.a.	+	+	n.a.	+	n.a.	n.a.	n.a.	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	10/10	S1 Netz							
n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	-	n.a.	+	n.a.	+	-	n.a.	+	n.a.	n.a.	n.a.	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	6/10	H1							
n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	+	n.a.	+	n.a.	+	+	n.a.	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	6/7	M1							
n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	+	n.a.	+	n.a.	+	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	5/6	L1							
n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	+	n.a.	+	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	4/5	S2							
n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	+	n.a.	+	n.a.	+	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	5/6	S3							
				83%				100%			100%	57%		100%			100%			43%												

Betrachtet man die Expressionsprofile von Zelllinien und Primärgeweben, so wird NY-ESO-1 gar nicht (0%) und SPAG9 und CEA von wenigen (43%-46%) OvCas exprimiert. Anschließend könnte man L1CAM, SIX1, Jagged2, MUC-1, Mesothelin, deren Expressionshäufigkeit auf OvCa zwischen 77% und 89% liegt. Eine Expression auf allen untersuchten Zelllinien und Geweben zeigten Her2/neu, Survivin, NmU, und OPN, (100%). Bei hTERT und EpCAM zeigt sich ein großer Unterschied zwischen mRNA- und Protein-Expression, was durchaus nicht ungewöhnlich ist wie Ergebnisse von Gygi belegen (Gygi et al. 1999). Ansonsten korrelieren die verschiedenen Untersuchungsmethoden gut. In wenigen Fällen konnte eine Protein-Expression, jedoch keine mRNA-Expression festgestellt werden. Auch diese Beobachtung wurde bereits von Kayser et al. gemacht und lässt sich durch die Instabilität der mRNA erklären (Kayser et al. 2003).

Auffällig ist, dass in allen Fällen die Primärgewebe häufiger Expressionen für die Antigene aufweisen als die Zelllinien. Trägt man die Antigen-Expression pro einzelner Zelllinie zusammen (rechtste Spalte der Tabelle) so ergibt sich, dass die Zelllinien zwischen 10 und 14 der 18 untersuchten TAAs exprimieren. Bei den Primärgeweben konnten aus Zeitmangel bzw. aus Gründen mangelnder Verfügbarkeit leider nicht alle TAAs gemessen werden. Daher kann hier auch kein direkter Vergleich zu den Zelllinien gezogen werden. Man sieht jedoch deutlich den Trend, dass die meisten Primärgewebe mehrere untersuchte TAAs parallel exprimieren. Dieser Effekt der verminderten Antigenität in den Zelllinien könnte durch Antigenverlustvarianten der entsprechenden Tumorzellen zustande kommen, die im Lauf der Zellkultur entstanden sind (Maeurer et al. 1996). Dies kann im Rahmen dieser Arbeit jedoch nur spekuliert werden.

C.4.3 Vergleich der gemessenen Expressionshäufigkeiten der TAAs mit den Literaturangaben.

In der folgenden Tabelle werden nun die Angaben für die Expressionshäufigkeiten der untersuchten TAAs auf OvCa mit den hier gemessenen Expressionen verglichen. Dabei stehen hinter den jeweiligen Expressions-Daten aus der Literatur in Klammern die jeweiligen Methoden, mit denen diese gemessen wurden. Die hier gemessenen Expressionen sind in Zelllinien und Gewebe aufgespalten und wurden mit einer Toleranz von <10% mit den Literaturwerten verglichen. Die grün unterlegten gemessenen Expressionen stimmen mit der Literatur überein. Rot unterlegte Expressionen sind deutlich höher und blau unterlegte deutlich niedriger als die in der Literatur beschriebenen Werte.

C Ergebnisse und Diskussion zur Charakterisierung von Tumorzellen

Tabelle 29: Expressionshäufigkeiten

Hinter den jeweiligen Expressionshäufigkeiten aus der Literatur stehen in Klammern die jeweiligen Methoden, mit denen diese gemessen wurden. (mRNA): positiver Nachweis der mRNA des Antigens, (ICH): Expression wurde durch immunhistochemische Färbung gemessen, (WB): Expression wurde durch Westernblot detektiert, (Serum): die Proteinmenge wurde im Serum der Patienten bestimmt, (FACS): Expression wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse bestimmt. Mit einer Toleranz von 10% stimmen die grün unterlegten gemessenen Expressionen mit der Literatur überein. Rot unterlegte Expressionen sind deutlich höher und blau unterlegte deutlich niedriger als die in der Literatur beschriebenen Werte.

Antigenfamilie	Antigen	Literatur		gemessen	
		Referenz	% Expression in OvCa	Zelllinien	Gewebe
Tumorsuppressorgene					
	WT1	Bruening 1993	75% (mRNA)	62% (FACS), 69%(PCR)	n.a.
Onkogene					
	Her2/neu	Verri 2005	27% (ICH)	100%	100%
	hTERT	Kyo S. 1999	80% (mRNA)	46% (FACS), 85%(PCR)	n.a.
	Survivin	Sui L. 2002	51% (ICH)	100%	100%
Cancer/Testis-Antigene					
	NY-ESO-1	Odunsi 2003	43% (ICH)	0%	n.a.
	Testisin	Shigemasa 2000	78% (mRNA)	33%	100%
	SPAG9	Garg 2007	90% (WB)	46%	43%
Onkofetale Antigene					
	CEA	Denk 1972	20-45% (Serum)	46%	n.a.
	SIX1	Behbakht 2007	50-63% (mRNA)	77%	100%
überexprimierte Antigene					
	MUC-1	Dong 1997	>90% (ICH)	85%	n.a.
	EpCAM	Kim 2003	>90% (ICH)	38% (FACS), 77%(PCR)	n.a.
	L1CAM	Fogel 2003	80% (ICH)	77%	100%
	NmU	Euer 2005	53% (mRNA)	100%	n.a.
	Jagged2	Euer 2005	50% (mRNA)	85%	n.a.
	Mesothelin	Hassan 2008	67%-100% (ICH)	77%	83%
	CA125	Canney 1984	83% (Serum)	62% (WB), 66% (PCR)	57% (WB), 100%(PCR)
	OPN	Nakae 2006	81% (Serum)	100%	100%
Angiogenese					
	VEGF	Ishii Y. 1995	77% (mRNA)	46% (FACS), 62%(PCR)	100%

C Ergebnisse und Diskussion zur Charakterisierung von Tumorzellen

Betrachtet man die Expressionshäufigkeiten der TAAs auf den Zelllinien, so exprimiert ein gleich hoher Anteil WT1, CEA, MUC-1, L1CAM und Mesothelin wie in der Literatur angegebenen wurde. Dies sind aber nur fünf von 18 untersuchten Antigenen. Her2/neu, Survivin, SIX1, NmU, Jagged2 und OPN werden auf den hier untersuchten Zellen hingegen deutlich häufiger exprimiert, als in der Literatur beschrieben. Betrachtet man die Expressionshäufigkeiten der Zelllinien, so liegen unsere gemessenen Häufigkeiten von hTERT, NY-ESO-1, Testisin, SPAG9, EpCAM, CA125 und VEGF deutlich unter den Angaben aus der Literatur. Auffällig sind hier wieder die bei den TAAs VEGF, CA125, L1CAM und Testisin vorhandenen Unterschiede zwischen deren Expression auf Zelllinien und Primärgeweben.

Der Hauptgrund für die starken Abweichungen der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen von den Literaturangaben sind sicher die großen Unterschiede bei dem untersuchten Zelllinien- und Gewebekollektiv. Wie die dargestellten Ergebnisse zeigen, sieht man selbst in kleinen Kollektiven, die sich durch Kulturdauer oder Herkunft (Zelllinien versus Primärgewebe) unterscheiden, schon deutliche Unterschiede. Zusätzlich können natürlich, wie bereits festgestellt, auch die unterschiedlichen Messmethoden zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen führen (mRNA vs. Protein). Aber auch schon innerhalb einzelner Messmethoden können starke Schwankungen beispielsweise bei der Sensitivität unterschiedlicher Antikörper, Primer-Paare oder PCR-Protokolle auftreten. Es ist also fraglich, ob man die Expressionsergebnisse vergleichen kann wenn man nicht den gleichen Probensatz und die gleiche Messmethode verwendet.

Zum Schluss stellt sich die Frage, ob sich eine der hier beschriebenen Methoden eignet um auf die Präsentation entsprechender TAA-abgeleiteter HLA-Liganden zu schließen. Diese Frage muss man mit einem klaren „Nein“ beantworten. Die Beantwortung dieser Fragestellung ist nur durch eine MS-basierte HLA-Liganden Analyse (Kap. E) möglich. Die Relevanz eines TAA als T-Zell-Target kann darüberhinaus nur in funktionellen, T-Zell-basierten Tests belegt werden (Kap. D). Letztendlich kann die Aussage, ob ein TAA eine klinische Relevanz hat bzw. in einem immuntherapeutischen Ansatz ohne Nebenwirkungen (z.B. Autoimmunität) zielführend ist, nur in klinischen Studien getroffen werden.

D Ergebnisse und Diskussion zum *in silico*-Ansatz zur Definition neuer T-Zellepitope

Nach einer kurzen Einführung in den Hintergrund dieses Ansatzes, die Techniken der Epitopvorhersage und des *in vitro* primings von T-Zellen wird die Strategie der Validierung der *in silico* ausgewählten Peptide bezüglich ihres Potenzials als T-Zellepitope (Peptid-Validierung) erläutert. Dann folgen die Ergebnisse für jedes untersuchte TAA. Die in Kapitel D.3.3.2 und D.3.3.3 gezeigten Ergebnisse zu den TAAs SPAG9 und CA125 waren Bestandteil der Diplomarbeit von Josefine Götze (Betreuung durch Helen Hörzer und PD Dr. B. Gückel).

D.1 Hintergrund und Fragestellung zum *in silico*-Ansatz

Die im vorangegangenen Kapitel beschriebenen TAAs L1CAM, NmU, Jagged2, Testisin, VEGF, SPAG9, CA125, OPN und Mesothelin wurden ausgewählt, da sie in der Literatur als deutlich im OvCa überexprimierte Antigene beschrieben wurden. Zusätzlich sind für die meisten dieser Antigene bisher keine T-Zellepitope beschrieben. Die geringe Expression dieser Antigene auf Normalgeweben war ebenfalls zuvor geprüft worden, und wie der erste Ergebnisteil zeigt, konnte eine Überexpression der ausgewählten Antigene auf laboreigenen Zelllinien und Primärgeweben bestätigt werden (Kap. C.4.2). Diese Erkenntnisse machen diese TAAs zu attraktiven Kandidaten für eine Peptid-basierte Immuntherapie für OvCa-Patientinnen. Um Antigenverlustvarianten entgegenzuwirken werden mittlerweile Peptid-Cocktails zusammengestellt, die Peptide enthalten, die von verschiedenen TAAs abgeleitet sind. Idealerweise wird dieser Cocktail auch aus Peptiden zusammengestellt, die für verschiedene HLA-Typen restringiert sind um die Impfung einem möglichst breiten Patientenkollektiv zur Verfügung stellen zu können. In dieser Arbeit wurden jedoch nur vorhergesagte Peptide für den HLA-Typ A*0201 verwendet, der mit ca. 27% der häufigste in unserer Bevölkerung ist.

Ziel dieser Arbeit war es, aus den für die TAAs L1CAM, NmU, Jagged2, Testisin, VEGF, SPAG9, CA125, OPN und Mesothelin vorherhergesagten Peptiden diejenigen zu identifizieren und zu validieren, die als potentielle T-Zellepitope bzw. als therapeutisch nutzbare Peptide in der Tumorthherapie einsetzbar sind.

D.2 Material und Methoden zum *in silico*-Ansatz

D.2.1 Epitopvorhersage

Mit Hilfe der Proteinsequenz der jeweiligen TAAs wurden mögliche Epitope (HLA-Liganden) vorhergesagt, die die Anforderungen bezüglich Ankeramino­säuren und weiteren Kriterien am besten erfüllen (Abb.16). Hierzu wurde die Epitopvorhersage mit der SYFPEITHI-Datenbank durchgeführt (Rammensee et al. 1999). Der der Epitopvorhersage zugrunde liegende Algorithmus generiert aus einer eingegebenen Proteinsequenz alle möglichen Peptide der gewünschten Länge, in diesem Falle also 9 – 10 Aminosäuren lang. Allen Aminosäuren im Peptid wird aufgrund der Vorlieben der HLA-Moleküle ein Zahlenwert zugeordnet, der maximal +15 für die optimale Aminosäure an der Ankerposition beträgt. Hilfsankeramino­säuren oder solche, die in natürlichen Liganden an einer bestimmten Position bevorzugt sind, erhalten geringere positive Werte. Aminosäuren, die an der betreffenden Position einen negativen Effekt auf die Bindung an das HLA-Molekül haben, wird ein negativer Wert zugeordnet. Am Ende werden die Werte für alle Aminosäuren des Peptides addiert und eine Rangliste aller Peptide erstellt. Daraus ergeben sich die SYFPEITHI-Scores. Für HLA-A*0201 Peptide ist der maximale Score z.B. 36. Das von Influenza A Matrix Protein abgeleitete Epitop GILGFVFTL hat einen Score von 30. Ein natürlich präsentiertes Peptid sollte unter den besten 2% aller Peptide zu finden sein (die Wahrscheinlichkeit dafür beträgt 80%). Somit wurden die besten 2% der vorhergesagten Peptide ausgewählt, synthetisiert, sowie mit Hilfe von HPLC und Massenspektrometrie auf Identität und Reinheit überprüft. Alle verwendeten Peptide sind in Tabelle 11 zusammengestellt.

Das Peptidmotiv für HLA-A*02									
	Position								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Anker		L							V
<u>Hilfsanker</u>						V			
bevorzugte Aminosäuren				E				K	
				K					

Abbildung 16: Peptidmotiv für HLA-A*02 (Rammensee et al. 1999).

Übersicht über die verwendeten Methoden

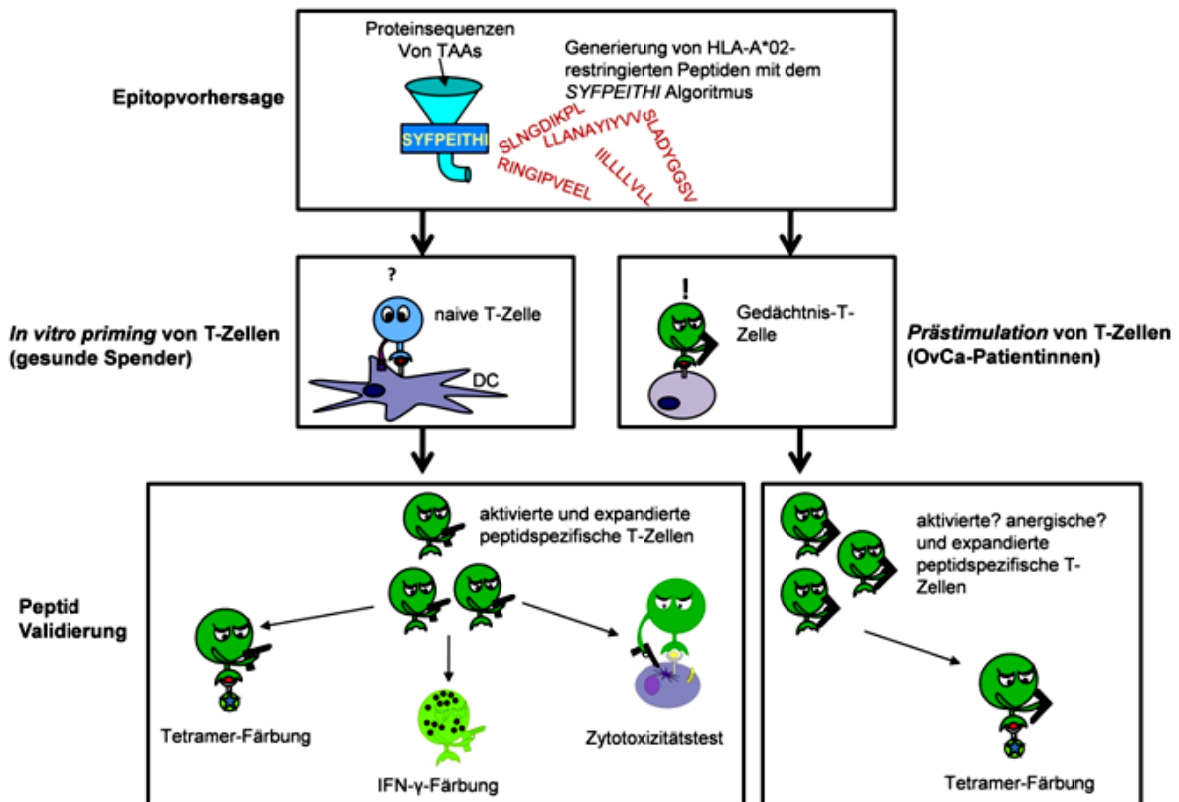


Abbildung 17: Strategie zur Identifizierung neuer T-Zellepitope nach *in silico* Peptid-Vorhersage.

D.2.2 In vitro priming von T-Zellen

Die so generierten Peptide sollten alle auf HLA-A*02-Molekülen binden und können naiven T-Zellen präsentiert werden. Im nächsten Schritt galt es herauszufinden, welche dieser HLA-Liganden auch T-Zellepitope sind, also von T-Zellen erkannt werden können. Hierzu wurde die Methode des *in vitro priming*, im Folgenden als *in vitro* Aktivierung bezeichnet, verwendet. Wie in Kapitel A.2.7. beschrieben, benötigen naive T-Zellen für ihre erste Aktivierung außer dem Antigenkontakt in Form des MHC-gebundenen Peptids auch kostimulatorische Signale. Für die Gewinnung der CD8⁺-T-Zellen wurden aus Vollblutspenden (Tab. 8) erst *buffy coats* hergestellt (Kap. B.4.5) und nach anschließender Dichtegradientenzentrifugation (Kap. B.4.6) eine MACS-Aufreinigung vorgenommen (Kap. B.4.10). Die so gewonnen CD8⁺-T-Zellen wurden anschließend mit autologen gereiften DCs stimuliert, die kostimulatorische Signale auf ihrer Oberfläche tragen und die zuvor mit den zu testenden Peptiden beladen wurden. Diese Stimulation wurde mehrere Male wiederholt und durch Zusatz bestimmter Zytokine eine Expansion peptidspezifischer T-Zellen erzielt (Abb. 6

und 7). Anschließend wurde durch funktionelle Tests geprüft, ob die T-Zellen aktiviert wurden oder keine Erkennung des MHC-gebundenen Peptids stattgefunden hat. Die Prozedur wurde für die getesteten Peptide mindestens mit je drei verschiedenen Spendern wiederholt.

D.2.3 Peptid-Validierung

Um die 80 Peptide untersuchen zu können, die in Tabelle 11 dargestellt sind wurde, nach einem bestimmten Schema vorgegangen: die Peptide wurden in Mischungen von 3-5 Peptiden (Peptidmixe) nach einer Matrix zusammengefasst, so dass jedes Peptid in zwei verschiedenen Peptidmixen vertreten war. Mit diesen Mixen wurden erste Stimulationen durchgeführt und mittels einer intrazellulären IFN γ -Färbung (Kap. B.5.5.) untersucht, ob sich peptidspezifische CD8⁺-T-Zellen innerhalb der T-Zellpopulation gebildet haben, die in Gegenwart des Peptidmixes IFN γ produzieren. Wenn ein Peptidmix eine IFN γ -Produktion in einer T-Zellpopulation auslöste, wurden Einzelpeptidmessungen durchgeführt, um das immunogene Peptid zu identifizieren. Nach einer eindeutigen Identifizierung eines Peptides mit positiver IFN γ T-Zellantwort wurden in Folge Einzelpeptid-Stimulationen durchgeführt, um größere Mengen an peptidspezifischen T-Zellen zu generieren. Mit diesen T-Zellen wurden dann Tetramer-Färbungen oder aber Zytotoxizitätstests durchgeführt.

D.2.4 Peptid-Prästimulation von PBMCs von OvCa-Patientinnen

Eine andere Möglichkeit HLA-Liganden als tatsächliche T-Zellepitope zu identifizieren ist die gezielte Suche nach peptidspezifischen Gedächtnis-T-Zellen in Patienten PBMCs. Hierzu werden die PBMCs wie in Kapitel B.4.12 prästimuliert und somit evtl. vorhandene Gedächtnis T-Zellen aktiviert und expandiert. Dies geschieht durch Zugabe des entsprechenden Peptids ohne DCs und mit einer Zytokin-Zugabe, die die Aktivierung naiver T-Zellen verhindern soll. Die aktivierten Gedächtnis-T-Zellen können anschließend durch eine Tetramer-Färbung oder kombinierte Tetramer- und Zytokin-Färbung nachgewiesen werden (Kap. B.5.4 und B.5.6). Die für diese Experimente verwendeten Patienten PBMCs wurden im Rahmen der medizinischen Doktorarbeit von Lena Herms an der Universitätsfrauenklinik Tübingen asserviert. Die PBMCs von 17 Patientinnen wurden auf HLA-A*02 Expression untersucht und neun wurden als HLA-A*02-positiv identifiziert. Da diese PBMCs nur in sehr begrenzter Menge vorhanden waren, konnten nur ausgewählte Peptide auf diese Art validiert werden.

Tabelle 30: PBMCs von OvCa-Patientinnen

Patienten-Identifikation	Pathologie	HLA Typ
ASZ1610	Seröses Adenokarzinom der Ovarien	A*01, A*02
HBR 1008	Tubulopapilläres Adenokarzinom der Ovarien	A*02
HHE	Zervixkarzinom	A*02
IBI	Mammakarzinom	A*02
ISI2708	seröses tubulopapilläres Adenokarzinom der Ovarien	A*02
KBR	Seröses Adenofibrom	A*02
MPO	nicht bekannt	A*02
PGSC2603	Seröses Adenokarzinom der Ovarien	A*02
SKR1007	Seröses Adenokarzinom der Ovarien	A*02

D.3 Ergebnisse zum *in silico*-Ansatz

Die folgenden Ergebnisse sind in drei Teile unterteilt. In den ersten beiden Teilen werden die Ergebnisse der oben beschriebenen Methoden für die beiden TAAs L1CAM und VEGF dargestellt. Dann folgt ein dritter Teil, in dem exemplarisch für Jagged2, SPAG9 und CA125 die bis zu diesem Zeitpunkt erzielten Ergebnisse dargestellt sind.

D.3.1 L1CAM

D.3.1.1 Charakteristika verwendeter L1CAM-abgeleiteter Peptide

Das Zelladhäsionsmolekül L1CAM spielt eine zentrale Rolle bei der neuronalen Entwicklung. Es wird in 80% aller OvCa überexprimiert und ist durch seine Assoziation mit späten, metastasierenden Tumorstadien hier ein interessantes Tumorantigen (Kap. C.1.1.). Das Protein ist 1257 Aminosäuren lang und nach Epitopvorhersage mit dem SYFPEITHI-Algorithmus wurden sieben Peptide mit den besten „Scores“ für weitere Experimente ausgewählt und synthetisiert. Diese Peptide wurden durch einen Peptidbindungs-Kompetitions-Test auf ihre Fähigkeit hin überprüft, an HLA-A*02-Moleküle zu binden (Kap. B.5.3).

Tabelle 31: Auflistung der von L1CAM abgeleiteten Peptide mit SYFPEITHI-Score und Bindungsaffinität.

^a gibt die Position des Peptids in der Aminosäuresequenz des Proteins an, ^b gibt die relative Bindungsaffinität (rBA) an. Diese ergibt sich durch den Vergleich mit einem Reporterpeptid und dessen Verdrängung durch ein gut bindendes, positives Kontrollpeptid und dem zu analysierenden Peptid.

	Position ^a	Sequenz	SYFPEITHI-Score	rBA (%) ^b
L1CAM 1257 Amino- säuren	413-422	LLANAYIYVV	29	93,6
	367-376	RINGIPVEEL	27	95,4
	1194-1202	SLNGDIKPL	28	99,5
	1207-1215	SLADYGGSV	28	94,2
	254-262	ALQGQPLVL	25	98,8
	823-831	ILNSSAVLV	25	99,7
	934-942	LLLRWQPPL	25	74,8

Die sieben von L1CAM abgeleiteten Peptide sind über die gesamte Proteinsequenz des L1CAM Proteins verteilt und stammen somit sowohl von intrazellulären als auch von extrazellulären Teilen des Proteins ab. Es wurden zwei Decamere und fünf Nonamere ausgewählt und die SYFPEITHI-Scores lagen zwischen 25 und 29. Die Bindungsaffinitäten variierten von 74% bis 99%. Somit haben alle sieben Peptide Sequenzen, die gut auf das HLA-A*02 Motiv passen und bis auf das Peptid LLLRWQPPL binden sie mit einer Bindungsaffinität von über 90% an das MHC-Molekül.

D.3.1.2 Zwei von sieben L1CAM-Peptiden induzieren eine spezifische IFN γ -Antwort in T-Zellen

Nach dem in Kap. D.2.2 und Kap. D.2.3 beschriebenen Schema der *in vitro* Aktivierung von T-Zellen und der Peptid-Validierung konnte für zwei der sieben L1CAM-abgeleiteten Peptide eine IFN γ T-Zellantwort erhalten werden. Nach drei bis vier Stimulationen mit allen sieben Peptiden konnten in 21 von 32 gesunden Spendern immer nur für die Peptide LLANAYIYVV und LLLRWQPPL IFN γ T-Zellantworten gemessen werden. In der folgenden Abbildung 18 sind exemplarisch die *in vitro* aktivierten Zellen des Spenders D41 dargestellt. Sie wurden nach dem in Kap B.5.5 beschriebenen Protokoll auf ihre Peptidspezifität untersucht. Dem Färbeansatz wurde als Negativkontrolle immer ein Ansatz mit dem p68-abgeleiteten Peptid YLLPAIVHI zugefügt. Für die Auswertung wurden im SSC-H gegen FSC-H Dot-Blot die lebenden Lymphozyten eingegrenzt und in den folgenden Abbildungen dargestellt.

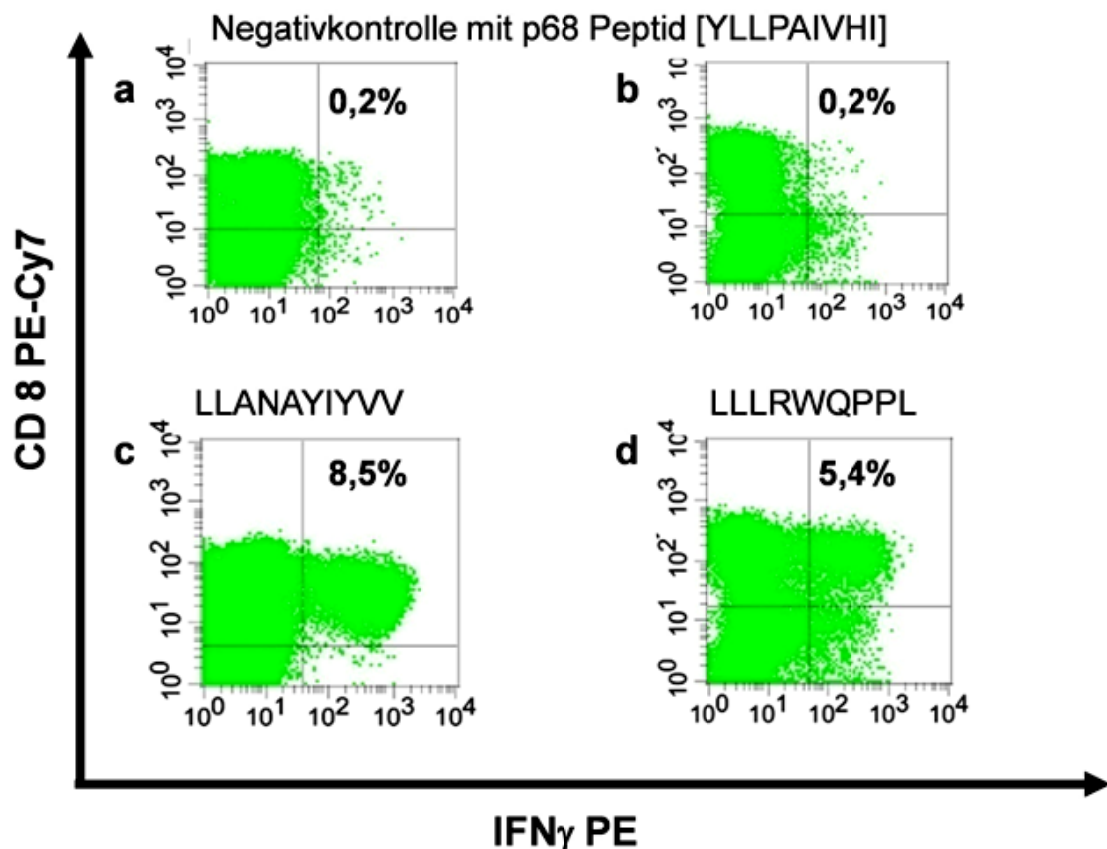


Abbildung 18: Intrazelluläre IFN γ -Färbung der mit L1CAM Peptiden LLANAYIYVV und LLLRWQPPL stimulierten T-Zellen.

Die *in vitro* aktivierten T-Zellen von Spender D41 wurden in einer IFN γ -Färbung auf ihre Peptidspezifität getestet. Als Negativkontrolle diente jeweils ein Ansatz mit p68-Peptid (a und b). Nach 6h Inkubation bei 37°C in Gegenwart der entsprechenden Peptide (c und d) wurden die Zellen extrazellulär mit CD8 PE-Cy7 und intrazellulär mit IFN γ PE gefärbt.

Abbildung 18 zeigt die IFN γ T-Zellantworten des Spenders D41 nach vier Stimulationen. Die Negativkontrolle zeigt eine IFN γ T-Zellantwort von 0,2% in den T-Zellen beider Stimulationsansätze. Zieht man diesen Hintergrund von der Antwort auf die beiden L1CAM Peptide ab, ergibt sich eine IFN γ T-Zellantwort von 8,3% [LLANAYIYVV] und 5,2% [LLLRWQPPL] (Abb.2c und 2d). Zusammenfassend kann man sagen, dass die Peptide LLANAYIYVV und LLLRWQPPL nach *in vitro* Aktivierung eine IFN γ T-Zellantwort in T-Zellen gesunder Spender induzieren können.

D.3.1.3 L1CAM Peptide LLANAYIYVV und LLLRWQPPL stimulieren T-Zellen mit entsprechend spezifischem TCR

Nach Validierung der L1CAM-abgeleiteten Peptide LLANAYIYVV und LLLRWQPPL durch IFN γ T-Zellantworten wurden für diese Peptid/MHC-Komplexe hergestellt (Kap. B.3.5), die daraufhin mit Streptavidin-PE tetramersiert wurden (Kap. B.3.6). Diese Tetramere wurden

D Ergebnisse und Diskussion zum *in silico*-Ansatz zur Definition neuer T-Zellepitope

weiter verwendet, um die peptidspezifischen T-Zellrezeptoren der stimulierten T-Zellen anzufärben (Kap. B.5.4). In der folgenden Abbildung 19 sind exemplarisch die mit Tetramer gefärbten T-Zellen des Spenders D109 dargestellt. Für die Negativkontrolle wurden die Zellen mit einem Tetramer gefärbt, gegen dessen Peptid sie nicht stimuliert worden waren. Für die Auswertung wurden im SSC-H gegen FSC-H Dot-Blot die lebenden Lymphozyten eingegrenzt und dann in einem FSC-H gegen FSC-A Dot-Blot die Einzelzellen von den Dubletten abgegrenzt. In den folgenden Abbildungen sind also nur lebende Einzelzellen dargestellt.

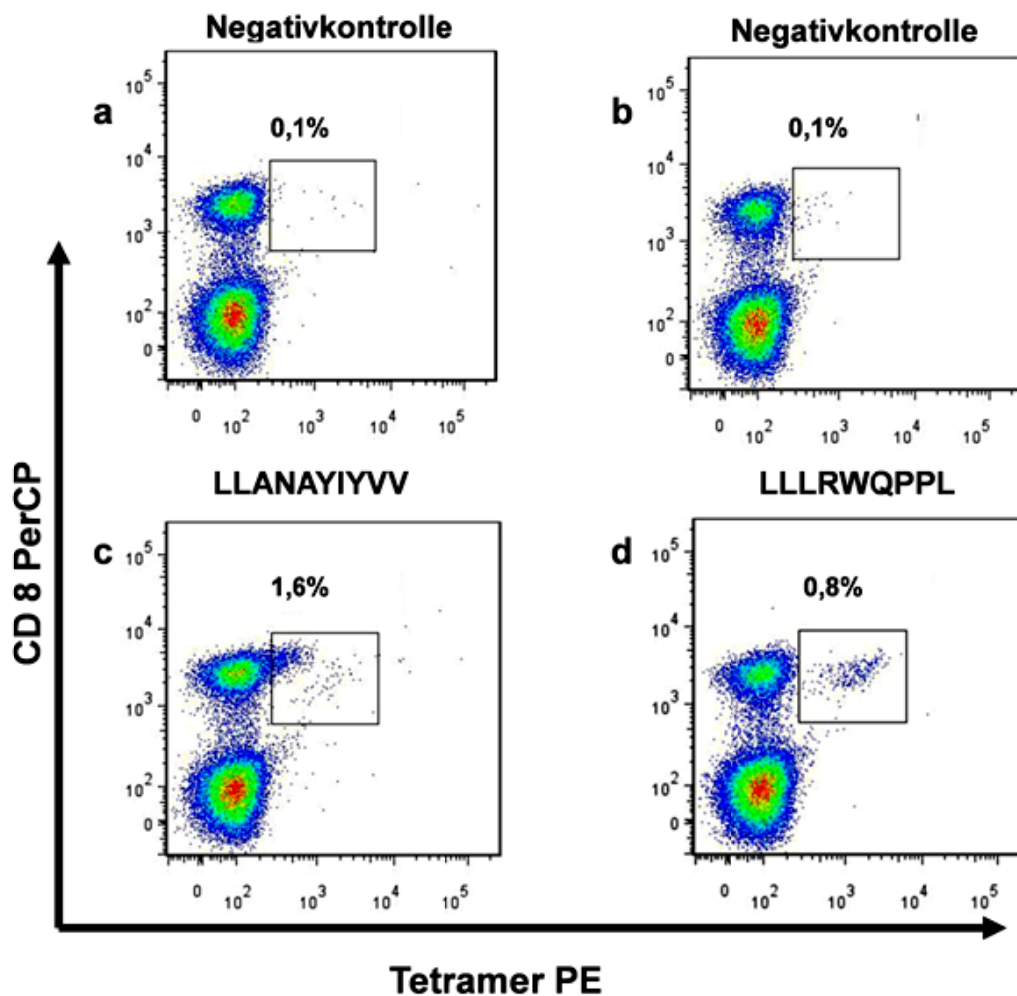


Abbildung 19: Tetramer Färbung der mit L1CAM Peptiden LLANAYIYVV und LLLRWQPPL stimulierten T-Zellen

Die *in vitro* aktivierten T-Zellen von Spender D109 wurden in einer Tetramer-Färbung auf ihre Peptidspezifität getestet. Vor der Tetramer Färbung wurden die T-Zellen mit CD8 PerCP gefärbt. Als Negativkontrolle (a und b) wurden die Zellen mit einem Tetramer kreuzgefärbt, gegen dessen Peptid sie nicht stimuliert worden waren (z.B. LLANAYIYVV-T-Zellen mit LLLRWQPPL-Tetramer).

Abbildung 19 zeigt die Tetramer-Färbungen der T-Zellen des Spenders D109 nach 4 Stimulationen. Die Dot Blots 19c und 19d zeigen deutliche Zellpopulationen, die bestätigen, dass eine Subpopulation der mit den Peptiden stimulierten T-Zellen einen für das Peptid

spezifischen T-Zellrezeptor besitzt. Zieht man die Negativkontrolle als Hintergrund ab ergaben sich für Spender D109 Tetramer-positive Supopulationen von 1,5% [LLANAYIYVV] bzw. 0,7% [LLLRWQPPL]. Somit kann man sagen, dass durch *in vitro* Aktivierung in gesunden Spendern mit den Peptiden LLANAYIYVV und LLLRWQPPL T-Zellen expandiert werden, deren T-Zellrezeptor mit LLANAYIYVV- und LLLRWQPPL-Tetrameren angefärbt werden können.

D.3.1.4 L1CAM-spezifische T-Zellpopulationen sind polyfunktional

Um nun zu zeigen, dass diese *in vitro* aktivierten T-Zellen das Potential haben Zielzellen peptidspezifisch zu lysieren gibt es mehrere Möglichkeiten: Eine davon ist der Nachweis der Ko-Expression diverser Zytokine und dem Degranulationsmarker CD107a als Polyfunktionalitätsnachweis. Studien zeigten, dass die Expression dieses Markers als Surrogatparameter für die Zytotoxizität von CTLs verwendet werden kann (Aktas et al. 2009). Zudem wird diese Polyfunktionalität von CD8⁺ T-Zellen mit einer schützenden, effizienten Immunantwort in Verbindung gebracht (Precopio et al. 2007). Daher wurde im folgenden Versuch geprüft, ob die mit den beiden L1CAM abgeleiteten Peptiden stimulierten T-Zellen erstens CD107a exprimieren und zweitens für mehrere Zytokine positive Antworten zeigen. Die zuvor in der Tetramer-Färbung untersuchten Zellen von Spender D109 wurden nach dem Protokoll in Kapitel B.5.6 für 6h mit dem zur Stimulation verwendeten Peptid konfrontiert und anschließend extrazellulär gegen CD8 und CD107a, sowie intrazellulär gegen IFN γ , IL-2 und TNF α gefärbt. Dem Färbeansatz wurde als Negativkontrolle ein Ansatz mit dem p68-Peptid YLLPAIVHI zugefügt. Als Positivkontrolle dienten unspezifische Stimulationen mit PMA/Ionomycin. Exemplarisch ist hier nur die Positivkontrolle der LLANAYIYVV-stimulierten T-Zelllinie gezeigt. Für die Auswertung wurden nur lebende Einzelzellen dargestellt.

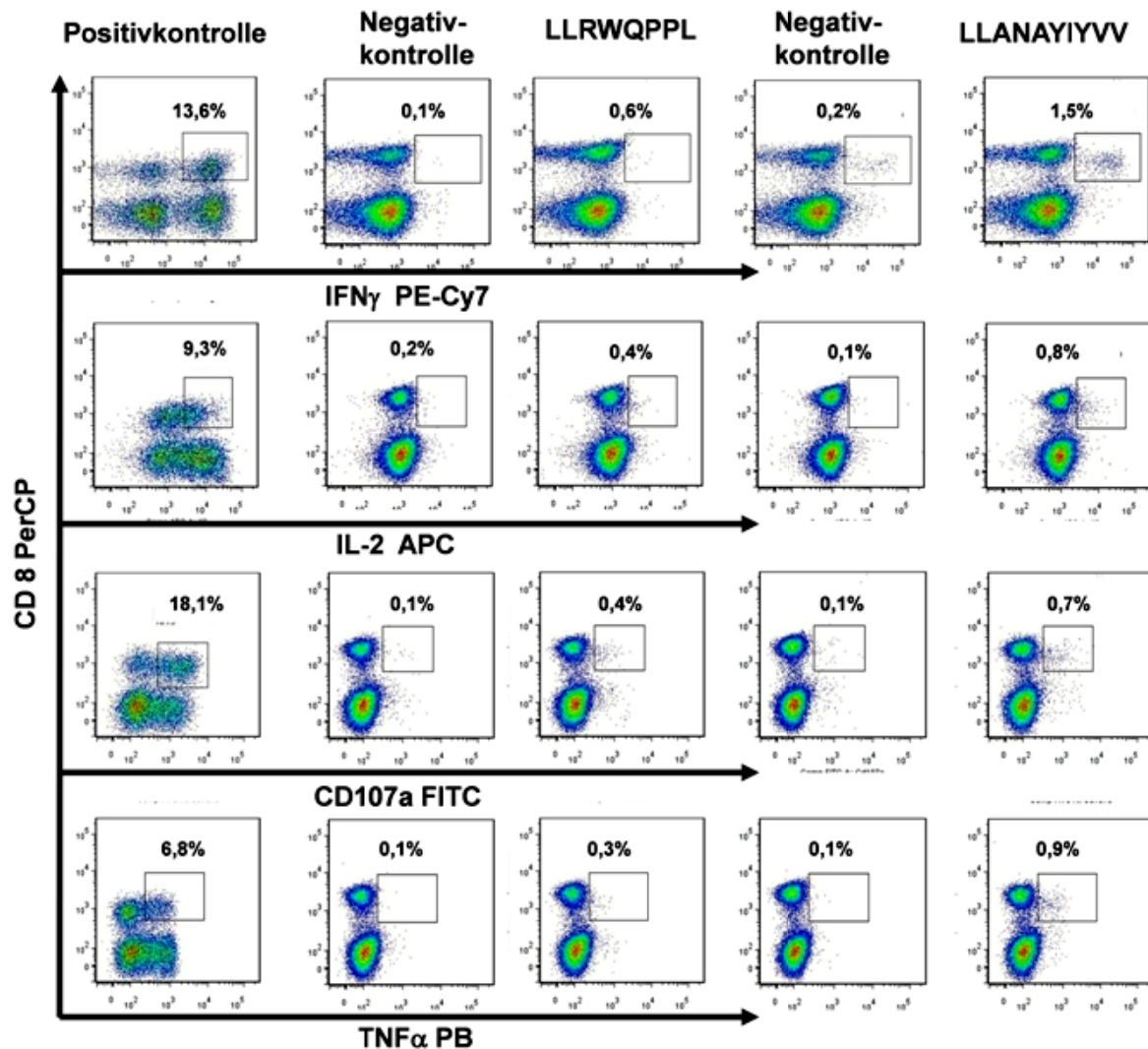


Abbildung 20: Zytokin-Färbung der mit den L1CAM Peptiden LLANAYIVV und LLLRWQPPL stimulierten T-Zellen

Die T-Zelllinien aus Abb.19 von Spender D109 wurden in einer intrazellulären Färbung auf ihre peptidspezifische Polyfunktionalität getestet. Als Negativkontrolle diente jeweils ein Ansatz mit p68-Peptid. Für die Positivkontrolle wurde unspezifisch mit PMA und Ionomycin stimuliert. Nach 6h Inkubation bei 37°C in Gegenwart der entsprechenden Peptide wurden die Zellen extrazellulär mit CD8 PE-Cy7 und CD107a FITC sowie intrazellulär mit IFN γ PE-Cy7, IL-2 APC und TNF α PB gefärbt.

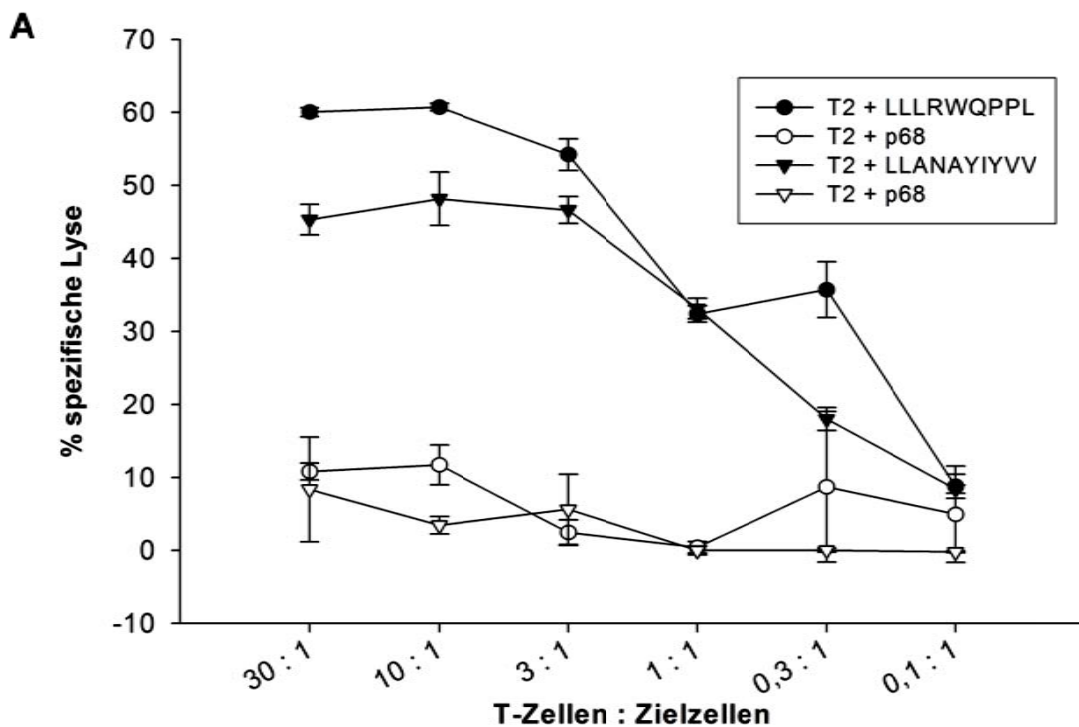
Abbildung 4 fasst die Zytokin-Expressionsanalyse der LLLRWQPPL- bzw. LLANAYIVV-reaktiven T-Zelllinien nach 4 Stimulationen (zuvor per Tetramer-Färbung gezeigt, Abb.4) zusammen. Die Positivkontrolle erbrachte Zytokin-produzierende Subpopulationen zwischen ca. 7-13% für TNF α , IL-2 und IFN γ bzw. ca. 18% für CD107a. Dies sind für PMA/Ionomycin-getriebene Stimulationen vergleichsweise niedrige Werte. Dementsprechend gering ist der Anteil Zytokin-positiver Subpopulationen nach den L1CAM-Peptidstimulationen (LLLRWQPPL/ LLANAYIVV) mit 0,3%/ 0,9% für TNF α , 0,4%/ 0,7% für CD107a, 0,4%/ 0,8% für IL-2 und 0,6%/ 1,5% für IFN γ . Eine deutliche Aussage bezüglich der Polyfunktionalität der untersuchten T-Zellen kann somit nicht aus diesem Experiment gezogen werden. Zu diesem Zweck hätten die T-Zelllinien gegebenenfalls mit Hilfe der

D Ergebnisse und Diskussion zum *in silico*-Ansatz zur Definition neuer T-Zellepitope

entsprechenden Tetramere sortiert und anschließend erneut durchflusszytometrisch analysiert werden müssen. Um dennoch Aufschlüsse über das zytotoxische Potential der L1CAM-stimulierten T-Zelllinien zu erhalten, wurden sie daher zusätzlich in einem Zytotoxizitätstest untersucht.

D.3.1.5 L1CAM-stimulierte T-Zelllinien sind peptispezifisch, aber nur bedingt tumorzellreaktiv

Der „Goldstandard“ für den Beweis, dass *in vitro* stimulierte T-Zellen die Fähigkeit besitzen andere Zellen peptidspezifisch zu lysieren, ist der ^{51}Cr -Freisetzungstest oder Zytotoxizitätstest. Hierbei werden Zielzellen mit radioaktiven ^{51}Cr Chromationen beladen und nach anschließender Kokultur mit Effektorzellen wird die Radioaktivität der lysierten Zellen im Überstand gemessen (Kap. B.5.7). Für diesen Versuch mit L1CAM-stimulierten T-Zellen wurden als Zielzellen zunächst mit Peptid beladene T2-Zellen verwendet. Diese T-B-lymphoblastoide Hybridzelllinie ist TAP-defizient, weshalb sie sich für eine exogene Peptidbeladung gut eignet und dann hohe Expressionsdichten für den entsprechenden HLA-A*02/Peptid-Komplex zeigt (Abb 21A). Um zu überprüfen, ob die Peptide LLANAYIYVV und LLLRWQPPL von Tumorzellen prozessiert und von spezifischen T-Zellen erkannt werden, wurden auch die OvCa-Zelllinien FraWü (HLA-A*02⁺/L1CAM⁺) sowie GG (HLA-A*02⁺/L1CAM⁻) (Kap. C.3.4) als Zielzellen eingesetzt. Sie wurden zudem in parallelen Ansätzen mit den L1CAM-Peptiden exogen beladen (Abb. 21B,C).



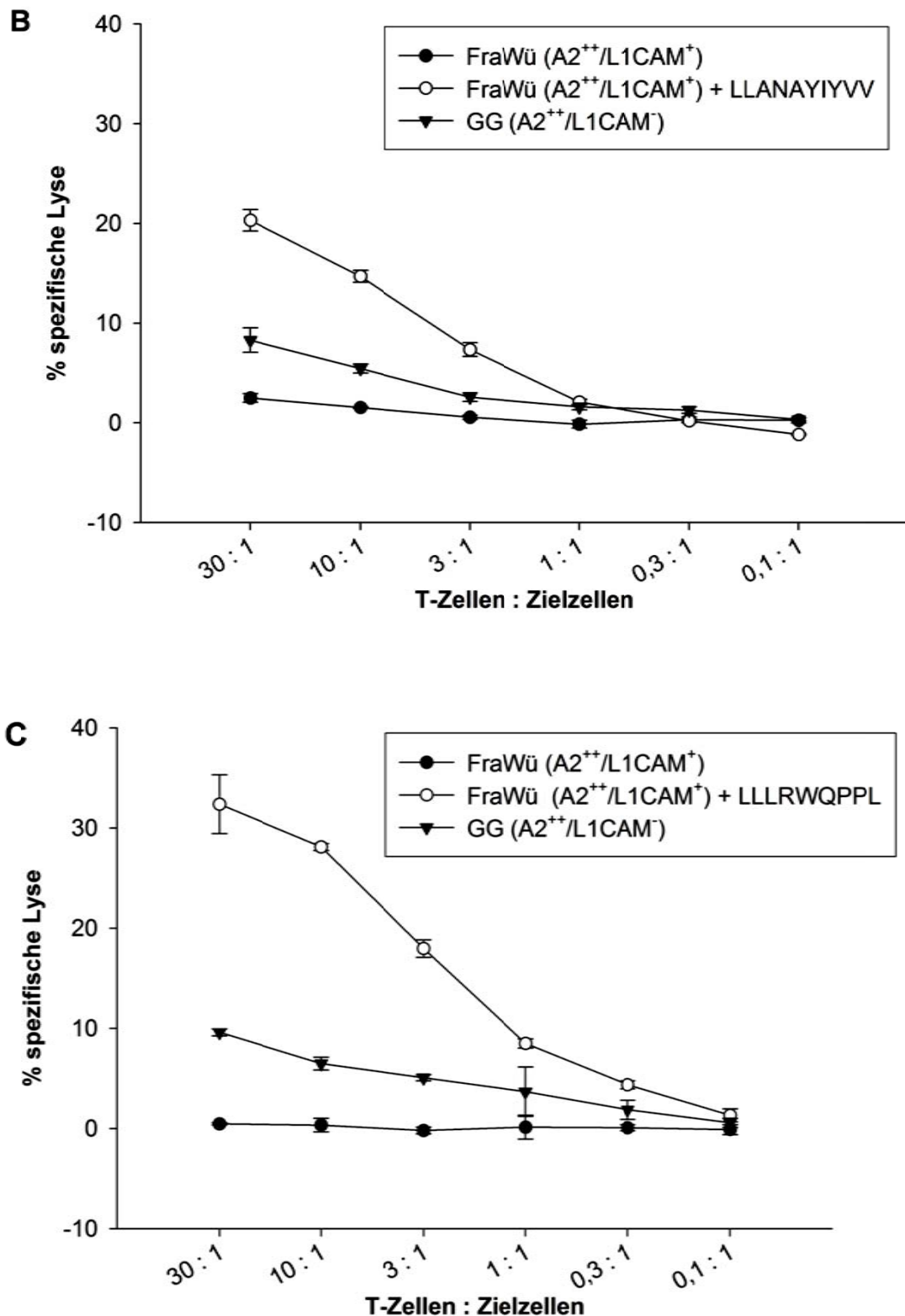


Abbildung 21: Zytotoxizitätstest mit L1CAM spezifischen T-Zellen.

Die mit LLANAYIYVV und LLLRWQPPL stimulierten T-Zellen wurden für 4h und dem jeweiligen L1CAM Peptid beladenen T2-Zellen inkubiert (A). Für die Zytotoxizitätstests B und C wurden FraWü und GG-Zellen mit ⁵¹Cr beladen und mit den jeweiligen T-Zellen für 4h inkubiert. Ein Teil der FraWü-Zellen war mit dem zur Stimulation verwendeten Peptid beladen. Dargestellt ist der Prozentsatz der spezifischen Lyse bei unterschiedlichen Verhältnissen von T-Zellen zu Zielzellen.

Die in Abbildung 21 gezeigten LLANAYIYVV- bzw. LLLRWQPPL-stimulierten T-Zelllinien zeigten in vorangegangenen IFN γ -Färbungen 24% [LLANAYIYVV] und 17% [LLLRWQPPL] positive T-Zellantworten (nicht gezeigt). Diese Zelllinien wurden im folgenden Zytotoxizitätstest jedoch unsortiert eingesetzt. Zum Nachweis ihrer peptidspezifischen Zytotoxizität wurden sie zunächst gegen entsprechend beladene T2-Zellen getestet (Abb. 21A). Bei einer T-Zellen : Zielzellen-Ratio von 30:1 zeigte die LLLRWQPPL-stimulierte T-Zelllinie eine spezifische Lyse von ca. 60%, während die LLANAYIYVV-stimulierte T-Zelllinie bei 45% lag. Die Negativkontrolle (T2+p68) lag in beiden Fällen unter 10%. LLANAYIYVV- bzw. LLLRWQPPL-stimulierte T-Zellen waren nur in der Lage, Tumorzellen nach exogener Peptid-Beladung zu lysieren (ca. 20% bzw. 32%, T-Zellen : Zielzellen-Ratio 30:1). Unbeladene FraWü-Zellen wurden nicht lysiert, obwohl sie das L1CAM-Antigen exprimieren (Abb 5B,C). Die HLA-A*02⁺/L1CAM⁻ OvCa-Zelllinie GG wurde nicht lysiert. Somit konnte gezeigt werden, dass beide T-Zelllinien peptidspezifisch zytotoxisch sind und prinzipiell Tumorzellen mit entsprechenden HLA/Peptid-Komplexen lysieren können. Die „natürliche“ Präsentation dieser HLA/Peptid-Komplexe ist jedoch entweder zu gering oder die verwendeten Epitope werden nicht prozessiert.

D.3.1.6 In OvCa-Patientinnen lassen sich LLANAYIYVV/LLLRWQPPL-spezifische Gedächtnis-T-Zellen nachweisen.

Kultivierte Tumorzelllinien spiegeln nicht notwendigerweise die Antigenität nativen Tumorgewebes wieder und die *in vitro* Aktivierung von T-Zellen gesunder Spender reflektiert nicht mögliche T-Zellantworten in Krebspatienten. Eine weitere Möglichkeit nachzuweisen, ob die beiden von L1CAM-abgeleiteten Peptide von Tumorzellen prozessiert und präsentiert werden, wäre der Nachweis peptidspezifischer Gedächtnis-T-Zellen in PBMCs von OvCa-Patientinnen.

Hier wurden PBMCs von neun HLA-A*02 positiven OvCa-Patientinnen (Tab. 30) mit dem in Kap. B.4.12 beschriebenen Protokoll prästimuliert. Die Peptid-Prästimulierung war notwendig, da ein *ex vivo*-Nachweis peptidspezifischer T-Zellen aus OvCa-Patientinnen nicht gelang (nicht gezeigt). Zu jedem Prästimulationsansatz wurde außer den zwei L1CAM-Peptiden zusätzlich das CMV-Peptid NLVPMVATV (HCMV pp65495-503) zugegeben. In CMV sero-positiven Spendern führt die Zugabe dieses Peptids zu einer Vermehrung der CMV-spezifischen Gedächtnis-T-Zellen und kann somit als Positivkontrolle für die Prästimulation verwendet werden. Da nicht bekannt war, ob die OvCa-Patientinnen CMV sero-positiv oder -negativ waren, war die Zugabe von CMV-Peptid zur Prästimulation nicht für alle Patientinnen eine Positivkontrolle.

D Ergebnisse und Diskussion zum *in silico*-Ansatz zur Definition neuer T-Zellepitope

In einem Vorversuch wurde zunächst geklärt, ob das Protokoll der Prästimulierung zu einer *in vitro* Aktivierung naiver T-Zellen führen könnte. Dazu wurden PBMCs einer gesunden, CMV sero-negativen Spenderin (D76), die nach *in vitro* Aktivierung mit L1CAM-abgeleiteten Peptiden L1CAM-spezifische T-Zellen aufwies, in einem unabhängigen Ansatz dem Peptid-Prästimulierungs-Protokoll unterzogen. Diese Zellen wurden anschließend durch eine kombinierte Tetramer- und intrazelluläre Zytokin-Färbung (Kap. B.5.6.) analysiert. Für diese Färbung werden die prästimulierten T-Zellen in einer Kurzzeit-Stimulation von 6h mit den zur Prästimulation verwendeten Peptiden inkubiert. Zusätzlich wird ein Ansatz mit p68-Peptid als Negativkontrolle analysiert. Dieser Ansatz wurde auch mit den L1CAM- und CMV-Tetrameren gefärbt, da man nur dort eine deutlich sichtbare Population erwartet. T-Zellen, die mit ihrem spezifischen Peptid stimuliert werden, regulieren ihren T-Zellrezeptor nach Erkennung des Peptids herunter (TCR-Deregulation).

So sind in der ersten Zeile der Abbildung 22A die mit Tetramer gefärbten Ansätze mit p68-Peptid zu sehen während die Spalte darunter mit dem jeweiligen Peptid inkubiert wurde (Abb 22B). Dem Versuch wurde zusätzlich eine Negativkontrolle mit einem HIV-Tetramer zugefügt. In allen folgenden Abbildungen werden nur lebende Einzelzellen gezeigt.

D Ergebnisse und Diskussion zum *in silico*-Ansatz zur Definition neuer T-Zellepitope

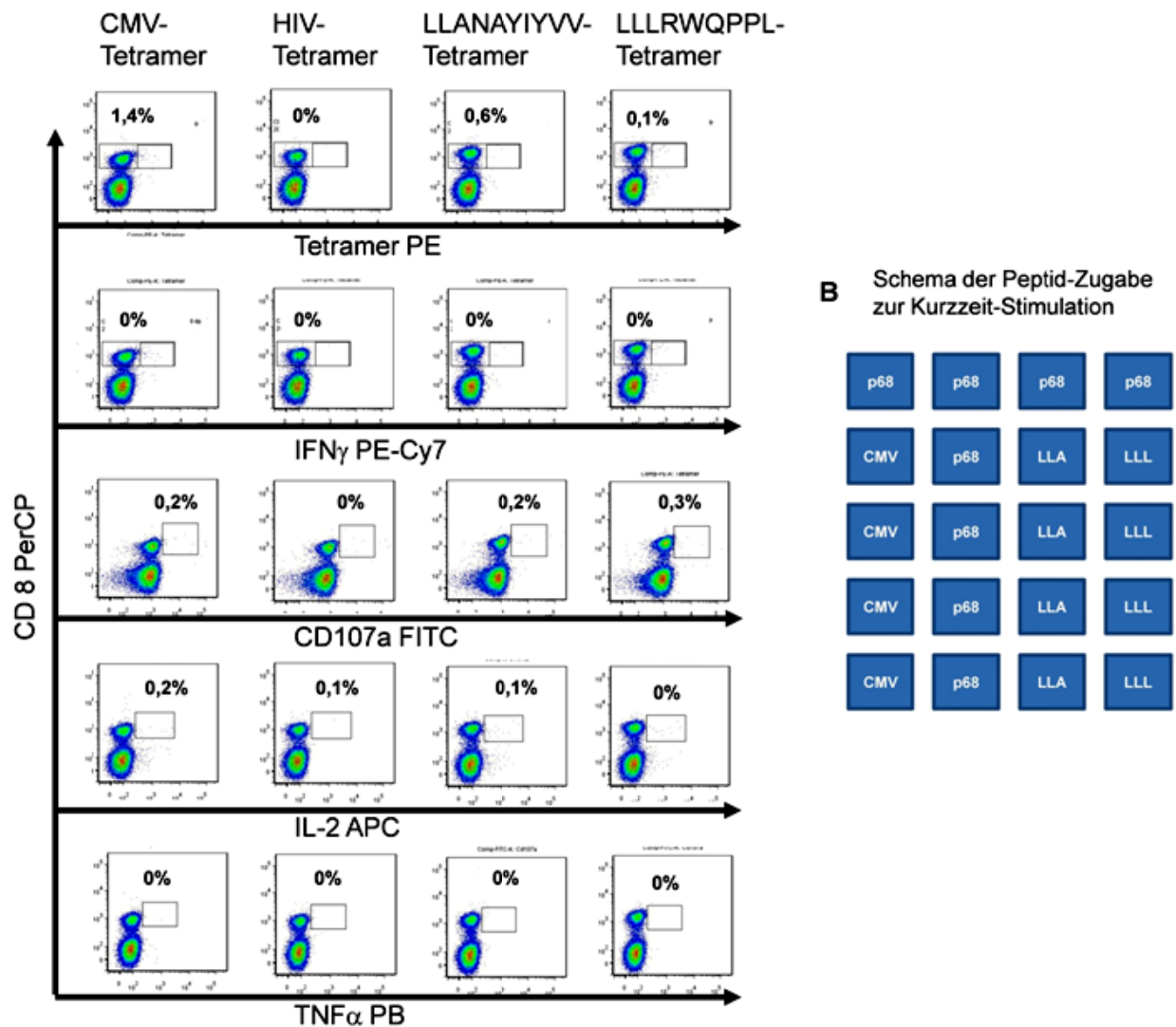


Abbildung 22: Prästimulation führt nicht zu *in vitro* Aktivierung CMV- oder L1CAM-spezifischer T-Zellen.

Die prästimulierten PBMCs von Spender D76 wurden nach einer Kurzzeit-Stimulation in einer kombinierten Tetramer- und intrazellulären Zytokin- Färbung der T-Zellen auf ihre peptidspezifische Polyfunktionalität getestet (A). Nach 6h Inkubation bei 37°C in Gegenwart der entsprechenden Peptide und p68-Peptid als Negativkontrolle (B) wurden die Zellen extrazellulär mit CD8 PE-Cy7 und CD107a FITC und intrazellulär mit IFN γ PE-Cy7, IL-2 APC und TNF α PB gefärbt. Zusätzlich wurden die Ansätze mit p68-Peptid mit den PE-konjugierten CMV-, HIV-, LLANAYIYVV- und LLLRWQPPL-Tetrameren gefärbt. B zeigt die Peptid-Zugabe während der Kurzzeit-Stimulation zu den verschiedenen Färb-Ansätzen (LLA=LLANAYIYVV, LLL=LLLRWQPPL).

Abbildung 22 fasst zusammen, dass die Peptid-Prästimulation mit dem CMV-Peptid und den L1CAM-Peptiden nicht zur Stimulation naiver T-Zellen führt, da diese weder eine spezifische Tetramer-Bindung noch Peptid-induzierte Zytokinproduktion zeigten.

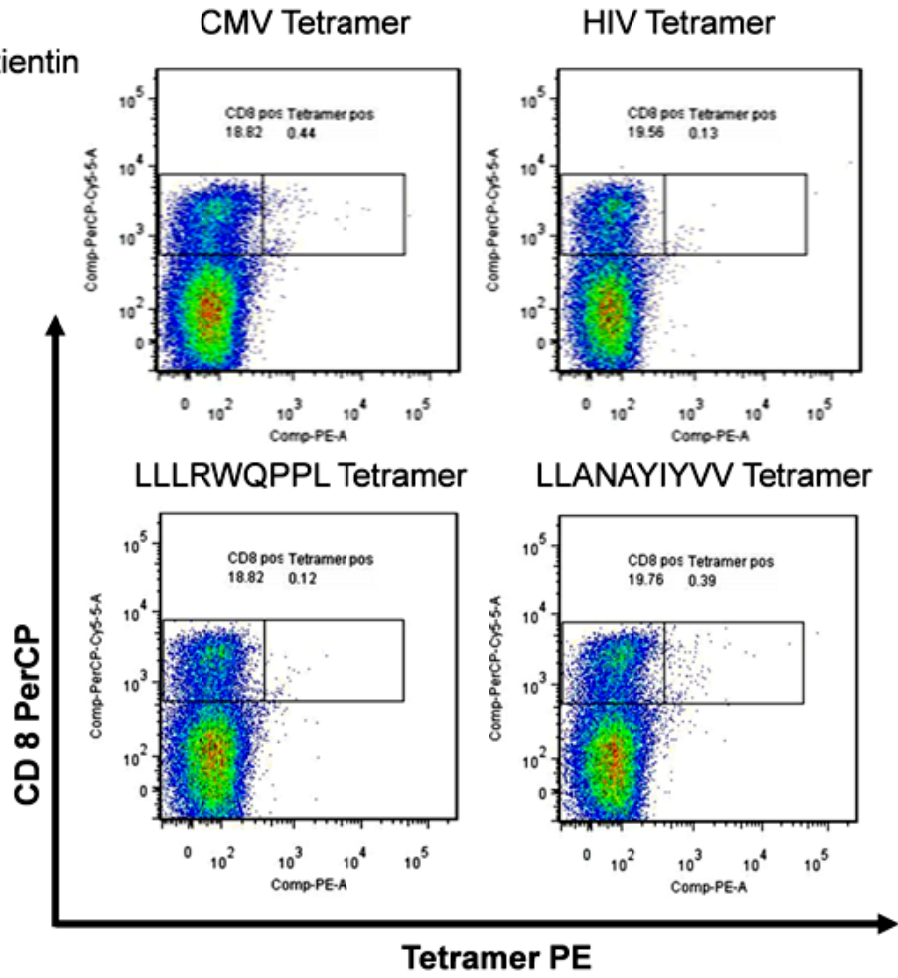
Somit konnte diese Methodik der Peptid-Prästimulation verwendet werden, um L1CAM-spezifische Gedächtnis-T-Zellen in PBMCs von OvCa-Patientinnen nachzuweisen. Die

D Ergebnisse und Diskussion zum *in silico*-Ansatz zur Definition neuer T-Zellepitope

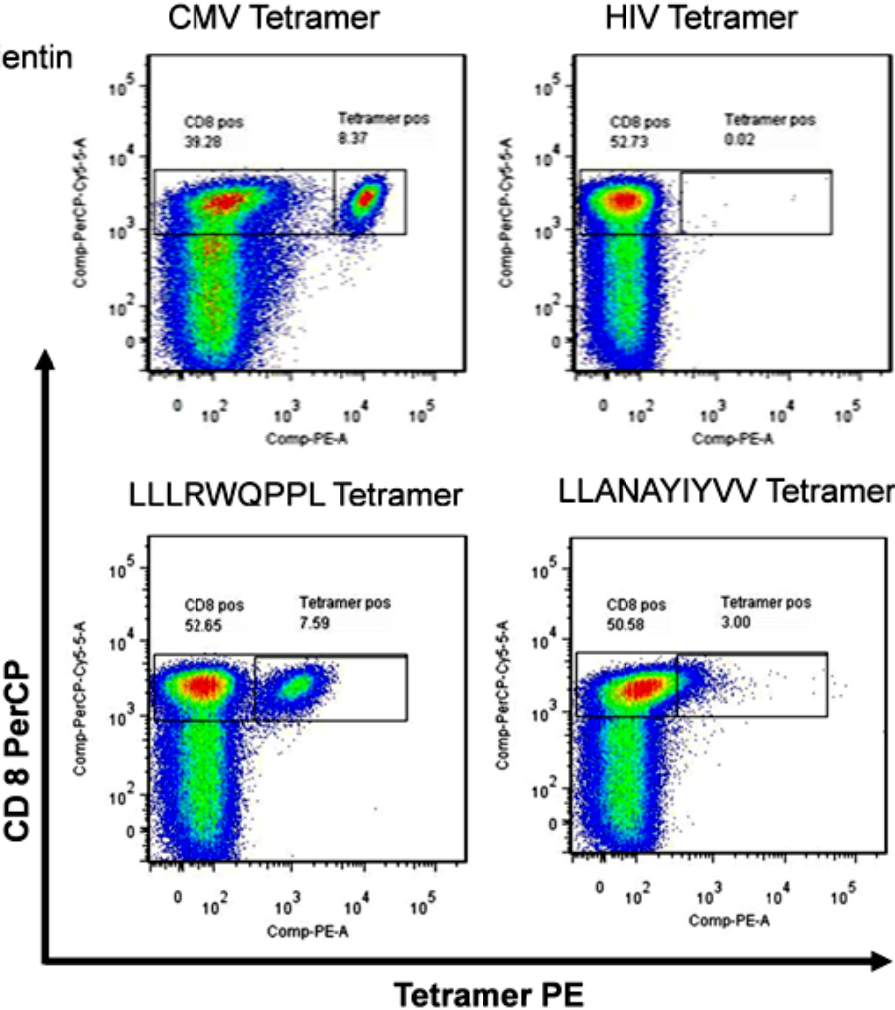
PBMCs aller neuen HLA-A*02-positiven OvCa-Patientinnen wurden mit dem Peptid-Prästimulationsprotokoll stimuliert. Anschließend wurde in einer Tetramer-Färbung überprüft, ob sich L1CAM- oder CMV-peptidspezifische Gedächtnis-T-Zellen vermehrt haben. Konnten solche Zellen nachgewiesen werden, wurde weiter eine kombinierte Tetramer- und intrazelluläre Zytokin-Färbung der T-Zellen durchgeführt. In zwei der neun OvCa-Patientinnen konnten LLANAYIYVV und LLLRWQPPL spezifische T-Zellen durch Tetramer-Färbung nachgewiesen werden. Die übrigen sieben Patientinnen, unter denen auch eine Zervix- und eine Mammakarzinom-Patientin waren, zeigten keine peptidspezifischen Gedächtnis-T-Zellen. Diese Prästimulations-Versuche wurden für die PBMCs aller Patientinnen mindestens zweimal durchgeführt und zeigten jeweils die gleichen Ergebnisse.

In Abbildung 23 sind exemplarisch die Tetramer-Färbungen der PBMCs der beiden Patientinnen gezeigt, in denen sich L1CAM-spezifische Gedächtnis-T-Zellen nachweisen ließen (Abb 7B und 7C). Zusätzlich zeigt Abbildung 7A PBMCs einer Patientin, bei der sich weder CMV- noch L1CAM-spezifische Zellen durch Tetramere anfärben ließen. Um die Analysen verschiedener OvCa-Patienten PBMCs mittels durchflusszytometrischer Methoden direkt vergleichen zu können, wurden sie zeitgleich und mit denselben Antikörper- bzw. Tetramer-Chargen durchgeführt.

A
OvCa-Patientin
ISI



B
OvCa-Patientin
KBR



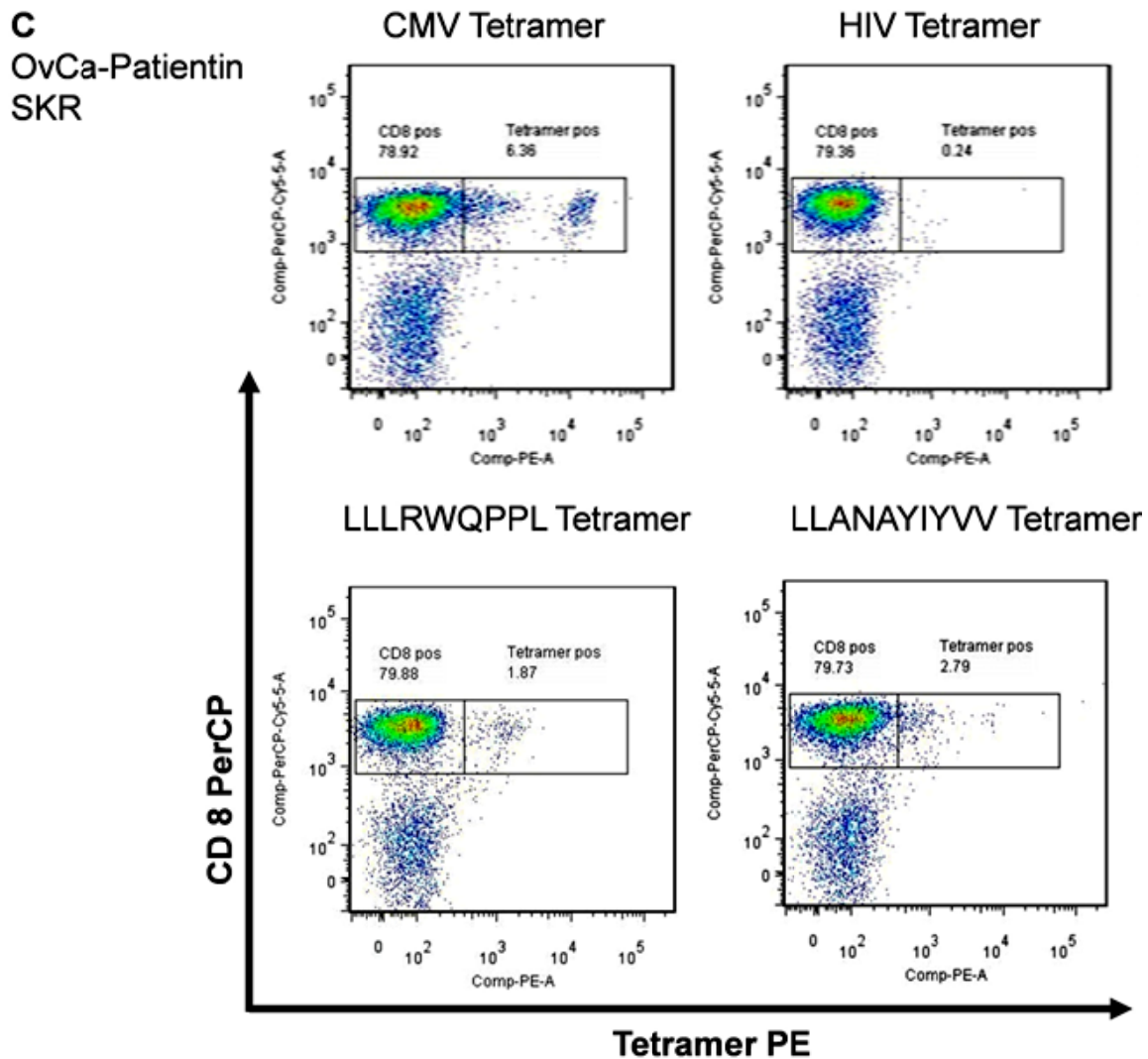


Abbildung 23: PBMCs von OvCa-Patientinnen können L1CAM-spezifische Gedächtnis-T-Zellen enthalten.

Die prästimulierten PBMCs der Patientinnen ISI (A), KBR (B) und SKR (C) wurden mit PE-konjugierten CMV-, HIV-, LLANAYIYVV- und LLLRWQPPL-Tetrameren gefärbt. Das HIV-Tetramer diente hierbei als Negativkontrolle. Zusätzlich wurden die Zellen mit CD8 PE-Cy7 gefärbt. Die Patientinnen SKR und KBR zeigten deutliche T-Zellpopulationen für das CMV- und die beiden L1CAM-Tetramere. Die PBMCs der Patientin ISI zeigten für keines der Tetramere eine T-Zellpopulation. Das HIV-Tetramer zeigte wie erwartet keine Bindung.

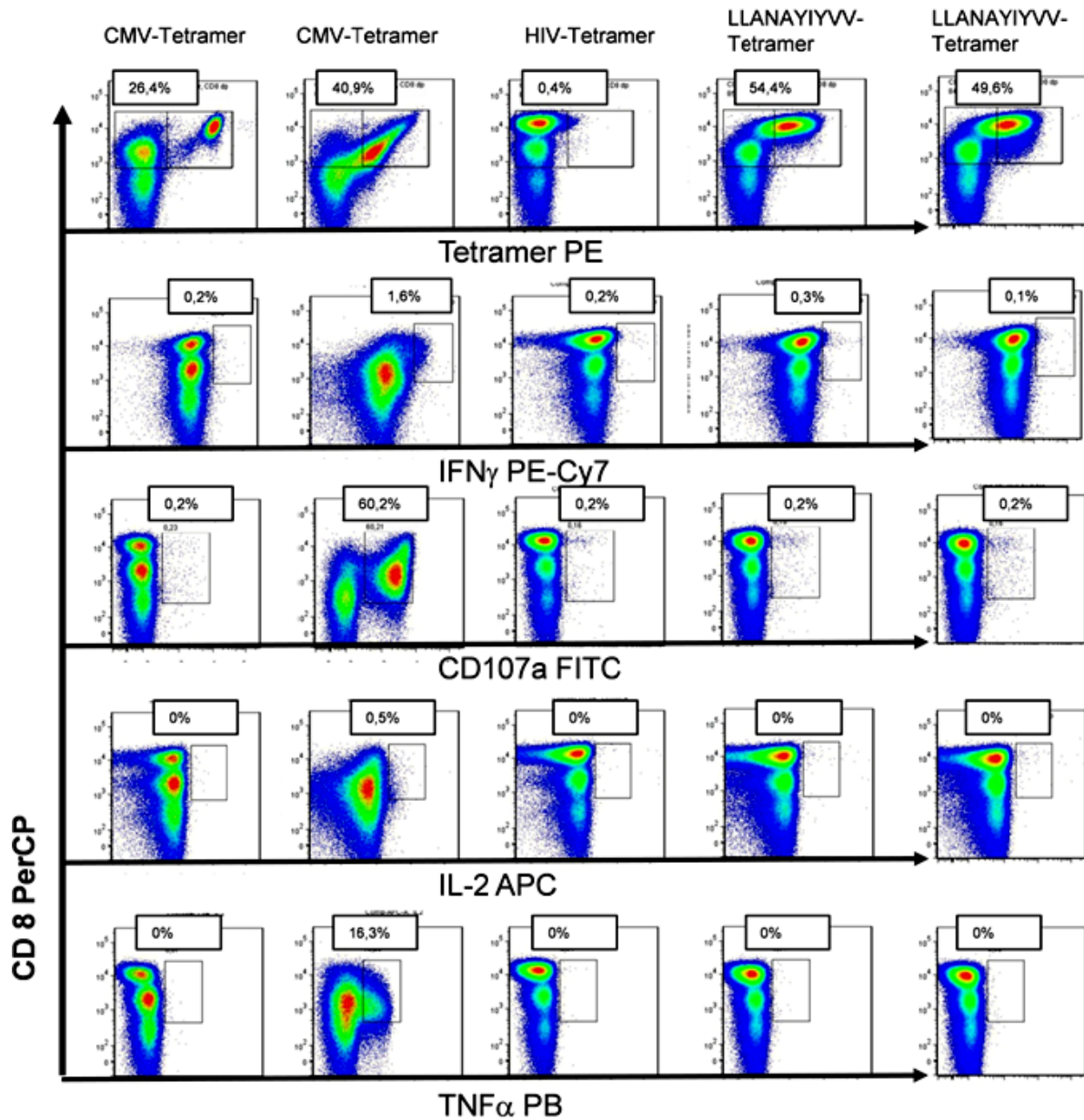
Abbildung 23A zeigt Daten der Patientin ISI, deren PBMCs nach Peptid-Prästimulation im Vergleich zur HIV-Tetramer Kontroll-Färbung keine CMV-, LLANAYIYVV- oder LLLRWQPPL-spezifische T-Zellpopulationen aufwiesen. Im Gegensatz dazu sind in den PBMCs der Patientin KBR (Abb 23B) ca. 8% CMV-spezifische CD8+-T-Zellen nachweisbar, was auf eine durchlaufende CMV-Infektion schließen lässt. Ebenfalls weist diese Patientin deutliche Populationen LLANAYIYVV- und LLLRWQPPL-spezifischer T-Zellen in den Tetramer-Färbungen auf. Bei der Patientin SKR wurden ebenfalls sowohl CMV-spezifische (ca. 6%), LLANAYIYVV-spezifische (ca. 3%) und LLLRWQPPL-spezifische (ca. 2%) T-

D Ergebnisse und Diskussion zum *in silico*-Ansatz zur Definition neuer T-Zellepitope

Zellpopulationen nachgewiesen (Abb. 23C). Zusammenfassend kann man sagen, dass sich durch Prästimulation von OvCa-Patientinnen PBMCs mit den Peptiden LLANAYIYVV und LLLRWQPPL Gedächtnis-T-Zellen vermehren ließen. Diese konnten anschließend durch die entsprechenden Tetramere spezifisch dargestellt werden.

Um die Funktionalität L1CAM-spezifischer T-Zellen aus OvCa-Patientinnen näher zu beleuchten, wurden sie in einer kombinierten Tetramer- und intrazellulären Zytokin-Färbung untersucht. Hierzu wurden die Zellen, wie schon zuvor beschrieben, bei 37°C für 6h mit p68-Peptid als Negativkontrolle und den L1CAM-Peptiden bzw. dem CMV-Peptid inkubiert. In der anschließenden Färbung wurden sowohl dem Ansatz mit p68-Peptid als auch dem Ansatz mit spezifischem Peptid das jeweilige Tetramer zugesetzt um gegebenenfalls eine Deregulierung des T-Zellrezeptors beobachten zu können. In der folgenden Abbildung ist exemplarisch die Färbung von T-Zellen der Patientin KBR mit den Tetrameren gegen CMV und LLANAYIYVV dargestellt. Dieselben Beobachtungen konnte man bei der kombinierten Tetramer- und Zytokin-Färbung mit den Zellen der Patientin SKR machen (nicht gezeigt).

A
OvCa-Patientin
KBR



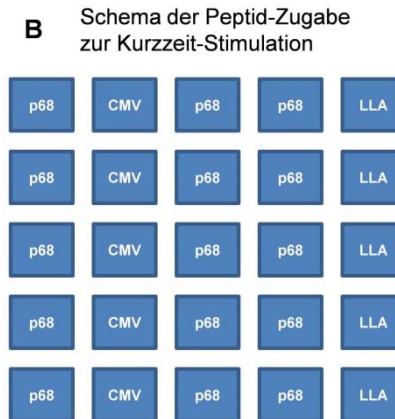


Abbildung 24: Prästimulierte PBMCs der OvCa-Patientin KBR zeigen eine TCR-Deregulation, aber keine Peptid-induzierte Zytokinproduktion.

A zeigt die prästimulierten PBMCs der Patientin KBR, die in einer kombinierten Tetramer- und intrazellulären Zytokin-Färbung auf ihre peptidspezifische Polyfunktionalität getestet wurden. Als Negativkontrolle diente jeweils ein Ansatz mit p68-Peptid. Nach 6h Inkubation bei 37°C in Gegenwart der entsprechenden Peptide wurden die Zellen extrazellulär mit CD8 PE-Cy7 und CD107a FITC und intrazellulär mit IFN γ PE-Cy7, IL-2 APC und TNF α PB gefärbt. Zusätzlich wurden die Ansätze mit p68-Peptid mit den PE-konjugierten CMV-, HIV-, LLANAYIYVV- und LLLRWQPPL-Tetrameren gefärbt. **B** zeigt die Peptid-Zugabe während der Kurzzeit-Stimulation zu den verschiedenen Farbe-Ansätzen (LLA=LLANAYIYVV, LLL=LLLRLWQPPL).

Im Ansatz mit p68-Peptid und dem CMV Tetramer ist eine deutlich abgrenzbare Tetramer-positive Subpopulation zu sehen. Diese verschiebt sich nach Stimulation mit dem CMV-Peptid (2. Spalte) aufgrund der TCR-Deregulation nach links unten. Das bedeutet, dass sowohl die CD8-Expression als auch die Expression des T-Zellrezeptors der Tetramer-positiven Zellen abnimmt. Betrachtet man parallel die Zytokin-Färbungen der mit CMV- und p68-Peptid Kurzzeit-stimulierten T-Zellen (1. und 2. Spalte), kann man eine deutliche Zytokinproduktion bei dem mit CMV-Peptid stimulierten Ansatz erkennen. Der Ansatz mit p68-Peptid zeigt hingegen keine Populationen zytokinproduzierender T-Zellen. Die Färbung für IL-2 ist sehr schwach, während die Färbung für CD107a einen hohen Hintergrund erzeugt. So steigen die Expressionen von IFN γ und IL-2 bei Zugabe von CMV-Peptid nur sehr schwach (IFN γ 0,2% auf 1,6%, IL-2 0% auf 0,5%). Ein sehr starker Anstieg zeigt sich dagegen bei CD107a und TNF α (CD107a 0% auf 60,2%, TNF α 0% auf 16,3%). Bei dem Ansatz zur Negativkontrolle mit p68-Peptid und HIV-Tetramer sieht man, wie erwartet, weder für das Tetramer noch für die Zytokine eine Färbung. Betrachtet man den Ansatz mit p68-Peptid und LLANAYIYVV-Tetramer, sieht man eine deutliche Population Tetramer-bindender T-Zellen, die sich zwar nicht so deutlich abgrenzt wie die CMV-Population, sich aber deutlich von der Negativkontrolle unterscheidet. In dem Ansatz, in dem die LLANAYIYVV-stimulierten T-Zellen mit dem korrespondierenden Tetramer gefärbt wurden (5. Spalte), sieht man im Vergleich zum Ansatz mit p68-Peptid eine geringere TCR-Expressionsdichte (54,4% auf 49,6%). Dies kann man als zusätzlichen Spezifitätshinweis werten. Im Gegensatz zur

Stimulation mit CMV-Peptid konnten nach Kurzzeit-Stimulation mit LLANAYIYVV keine Peptid-induzierte Zytokinproduktion festgestellt werden.

Im Blut der beiden Patientinnen KBR und SKR sind somit zwar LLANAYIYVV-Peptid-spezifische T-Zellen nachweisbar, diese zeigen jedoch keine Effektorfunktionen im Sinne einer Peptid-induzierten Zytokinproduktion. Ähnliche Beobachtungen wurden schon in anderen Studien gemacht, die vor allem Tumor-infiltrierende Lymphozyten untersuchten (Carrabba et al. 2003; Whiteside et al. 1986). Speziell der Verlust der IL-2-Produktion trotz adäquater Kostimulation, zusammen mit der Entwicklung eines toleranten Phänotyps, wurde sowohl in Menschen (Gervois et al. 1996) als auch in Mäusen bereits gezeigt (Slansky et al. 2000).

D.3.2 VEGF

D.3.2.1 Charakterisierung ausgewählter VEGF-abgeleiteter Peptide

Das Mitogen VEGF spielt eine zentrale Rolle in der Angiogenese und wird vor allem von Endothelzellen exprimiert. Es wird in 77% aller OvCa überexprimiert und ist ein interessantes Tumorantigen, da es sowohl von angiogenetischen Endothelzellen im Tumor als auch von den Tumorzellen selber exprimiert wird (Kap. C.1.2). Das Protein ist mit 232 Aminosäuren relativ klein und nach Epitopvorhersage mit Hilfe der SYFPEITHI-Datenbank wurden nur vier Peptide mit den besten „Scores“ für weitere Experimente ausgewählt und synthetisiert. Diese Peptide wurden durch einen Peptidbindungs-Kompetitions-Test auf ihre Fähigkeit hin überprüft, an HLA-A*02-Moleküle zu binden (Kap. B.5.3.).

Tabelle 32: Auflistung der von VEGF abgeleiteten Peptide mit SYFPEITHI-Score und Bindungsaffinität.

^a gibt die Position des Peptids in der Aminosäuresequenz des Proteins an, ^b gibt die relative Bindungsaffinität (rBA) an. Diese ergibt sich durch den Vergleich mit einem Reporterpeptid und dessen Verdrängung durch ein gut bindendes, positives Kontrollpeptid und dem zu analysierenden Peptid.

	Position ^a	Sequenz	SYFPEITHI-Score	rBA (%) ^b
VEGF-A 232 Aminosäuren	4-12	LLSWVHWSL	24	124,1
	13-21	ALLLYLHHL	24	22,8
	3-12	FLLSWVHWSL	25	103,1
	71-80	YIFKPSCVPL	23	59,2

Die vier von VEGF abgeleiteten Peptide sind vor allem im N-terminalen Bereich des Proteins lokalisiert. Dabei unterscheiden sich zwei der Peptide nur durch die Aminosäure Phenylalanin, die an das Peptid LLSWVHWSL am N-Terminus angehängt ist. So wurden

zwei Decamere und zwei Nonamere ausgewählt und die SYFPEITI-Scores laggen zwischen 25 und 23. Die gemessenen Bindungsaffinitäten variieren von 23% bis 124%. Das heißt, dass die beiden von VEGF abgeleiteten Peptide LLSWVHWSL und FLLSWVHWSL besser an das HLA-A*02-Molekül binden als das als Positivkontrolle verwendete p68-Peptid YLLPAIVHI.

D.3.2.2 Zwei von vier VEGF-Peptiden induzieren eine spezifische in IFN γ Antwort in T-Zellen

Nach dem in Kapitel D.2.2 und D.2.3 beschriebenen Schema der *in vitro* Aktivierung von T-Zellen und der Peptid-Validierung konnten gegen zwei der vier von VEGF abgeleiteten Peptide eine IFN γ T-Zellantwort erhalten werden. Nach drei bis vier Stimulationen mit allen vier Peptiden konnten in 15 von 23 gesunden Spendern immer nur für die Peptide LLSWVHWSL und FLLSWVHWSL IFN γ T-Zellantworten gemessen werden. In der folgenden Abbildung 25 sind exemplarisch die *in vitro* aktivierten Zellen des Spenders D20 dargestellt. Sie wurden nach dem in Kapitel B.5.5 beschriebenen Protokoll auf ihre Peptidspezifität hin untersucht. Dem Färbeansatz wurde als Negativkontrolle immer ein Ansatz mit dem p68-Peptid YLLPAIVHI zugefügt. Für die Auswertung wurden im SSC-H gegen FSC-H Dot-Blot die lebenden Lymphozyten eingegrenzt und in den folgenden Abbildungen dargestellt.

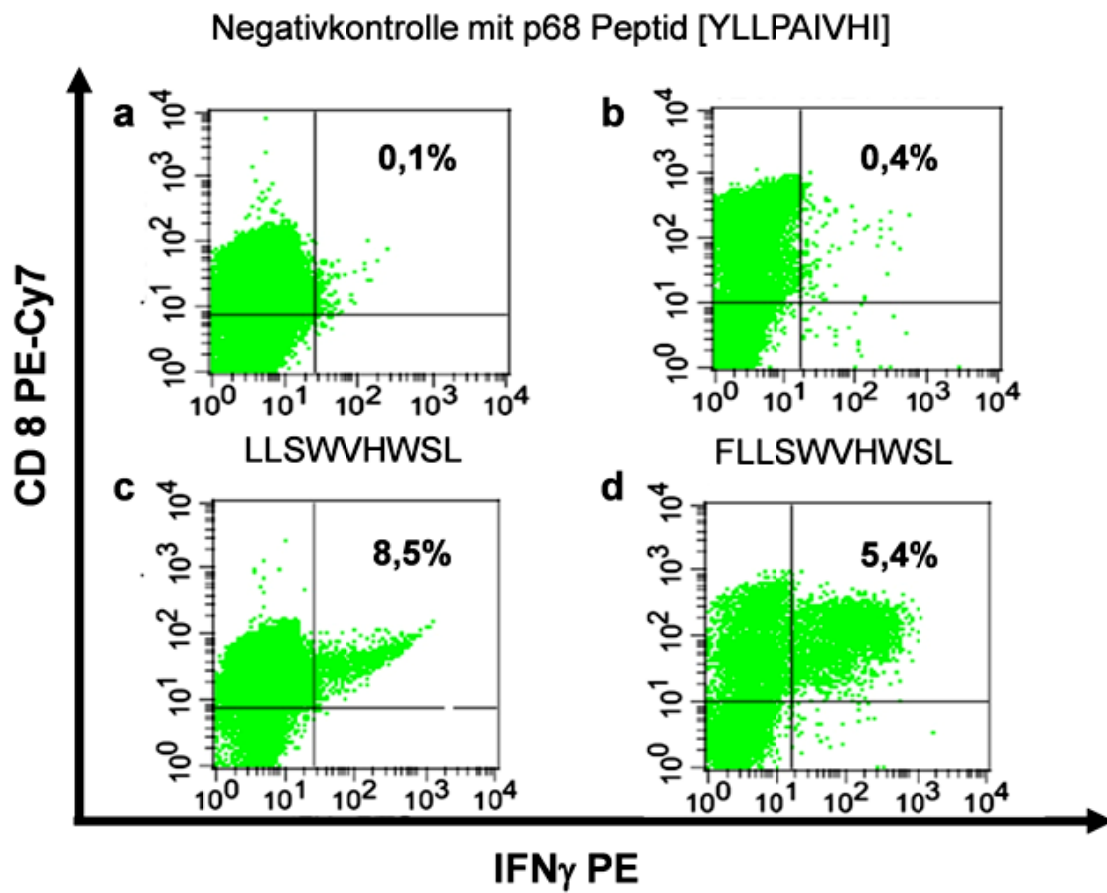


Abbildung 25: Intrazelluläre IFN γ -Färbung der mit VEGF Peptiden LLSVHWSL und FLLSVHWSL stimulierten T-Zellen.

Die *in vitro* aktivierten T-Zellen von Spender D20 wurden in einer IFN γ -Färbung auf ihre Peptidspezifität getestet. Als Negativkontrolle dienten Anätze mit p68-Peptid (a und b). Nach 6h Inkubation bei 37°C in Gegenwart der entsprechenden Peptide (c und d) wurden die Zellen extrazellulär mit CD8 PE-Cy7 und intrazellulär mit IFN γ PE gefärbt.

Abbildung 25 zeigt die IFN γ T-Zellantworten des Spenders D20 nach vier Stimulationen. Die Negativkontrolle zeigt eine IFN γ T-Zellantwort von 0,1% bzw. 0,4% in den T-Zellen beider Stimulationsansätze. Zieht man diesen Hintergrund von der Antwort auf die beiden VEGF-Peptide ab, ergibt sich eine peptidspezifische IFN γ T-Zellantwort von ca. 8% [LLSVHWSL] bzw. 5% [FLLSVHWSL] (Abb.25c und 25d). Zusammenfassend kann man sagen, dass die Peptide LLSVHWSL und FLLSVHWSL nach *in vitro* Aktivierung eine IFN γ T-Zellantwort in gesunden Spendern induzieren können.

D.3.2.3 VEGF Peptide LLSWVHWSL und FLLSWVHWSL stimulieren T-Zellen mit entsprechend spezifischem TCR

Nach Validierung der zwei VEGF-abgeleiteten Peptide LLSWVHWSL und FLLSWVHWSL durch $\text{IFN}\gamma$ T-Zellantworten wurde für FLLSWVHWSL ein Tetramer (Kap. B.3.1) hergestellt. Die Herstellung des LLSWVHWSL-Tetramers war nicht erfolgreich. Das FLLSWVHWSL-Tetramer wurde weiter verwendet, um die peptidspezifischen T-Zellrezeptoren der stimulierten T-Zellen anzufärben (Kap. B.5.4.). In der folgenden Abbildung 26 sind exemplarisch die mit Tetramer gefärbten T-Zellen des Spenders D41 dargestellt. Für die Negativkontrolle wurden die Zellen mit einem Tetramer gefärbt, gegen dessen Peptid sie nicht stimuliert worden waren. Für die Auswertung wurden im SSC-H gegen FSC-H Dot-Blot die lebenden Lymphozyten eingegrenzt und dann in einem FSC-H gegen FSC-A Dot-Blot die Einzelzellen von den Dubletten abgegrenzt. In den folgenden Abbildungen sind also nur lebende Einzelzellen dargestellt.

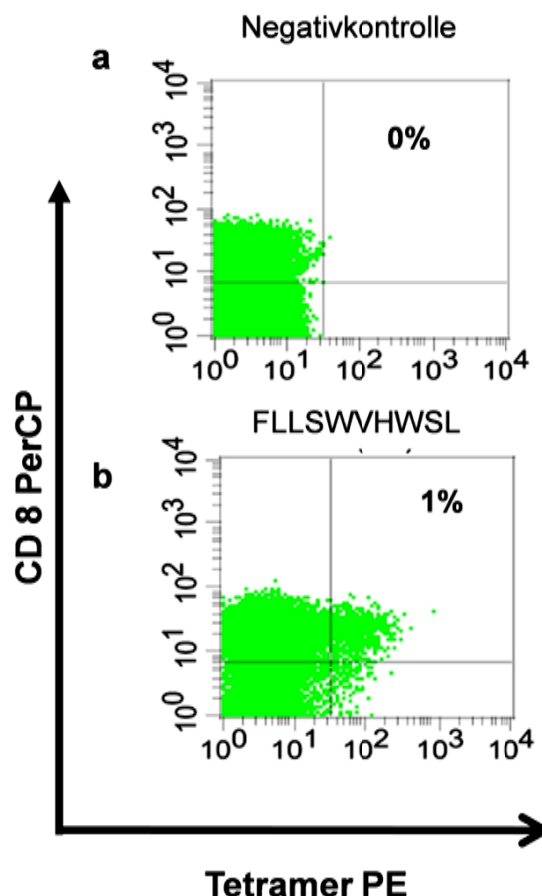


Abbildung 26: Tetramer-Färbung der mit dem VEGF-Peptid FLLSWVHWSL-stimulierten T-Zellen.

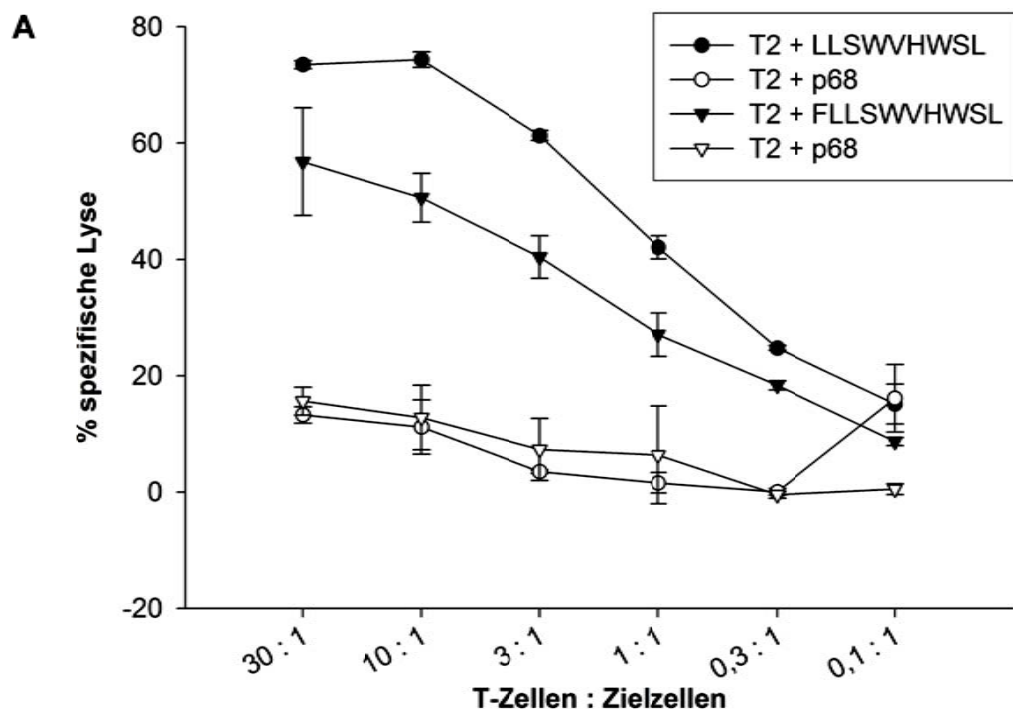
Die *in vitro* aktivierten T-Zellen von Spender D41 wurden in einer Tetramer-Färbung auf ihre Peptidspezifität getestet. Vor der Tetramer-Färbung wurden die T-Zellen mit CD8 PerCP gefärbt. Als Negativkontrolle (a) wurden die Zellen mit einem Tetramer kreuzgefärbt, gegen dessen Peptid sie nicht stimuliert worden waren (z.B. LLANAYIYVV- oder LLRWQPPL-Tetramer).

Abbildung 26 zeigt die Tetramer-Färbungen der T-Zellen des Spenders D41 nach 4 Stimulationen. Der Dot Blot in Abbildung 26b zeigt eine deutliche Zellpopulation, die bestätigt, dass eine Subpopulation der mit den Peptiden stimulierten T-Zellen einen für das Peptid spezifischen T-Zellrezeptor besitzt. Zieht man die Negativkontrolle als Hintergrund ab ergab sich für Spender D41 eine Tetramer-positive Subpopulation von 1%. Somit kann man sagen, dass durch *in vitro* Aktivierung in gesunden Spendern mit dem Peptid FLLSWVHWSL T-Zellen expandiert werden, deren T-Zellrezeptor mit FLLSWVHWSL-Tetramer angefärbt werden können.

D.3.2.4 VEGF-stimulierte T-Zelllinien sind peptispezifisch und die LLSWVHWSL T-Zelllinie auch tumorzellreaktiv

Die mit den VEGF-Peptiden LLSWVHWSL und FLLSWVHWSL *in vitro* stimulierten T-Zellen wurden ebenfalls in einem Zytotoxizitätstest analysiert. Als Zielzellen wurden zunächst mit Peptid beladene T2-Zellen verwendet (Abb. 27A).

Um zu überprüfen, ob die Peptide LLSWVHWSL und FLLSWVHWSL von Tumorzellen prozessiert und von spezifischen T-Zellen erkannt werden, wurden auch die OvCa-Zelllinien FraWü (HLA-A*02⁺/VEGF⁻) sowie GG (HLA-A*02⁺/VEGF⁺) (Kap. C.3.4) als Zielzellen eingesetzt. Die Zelllinie FraWü wurden zudem in parallelen Ansätzen mit den VEGF-Peptiden exogen beladen (Abb. 27 B,C). Die Zelllinie GG wurde dagegen nur unbeladen und mit p68-Peptid beladen als Negativkontrolle verwendet.



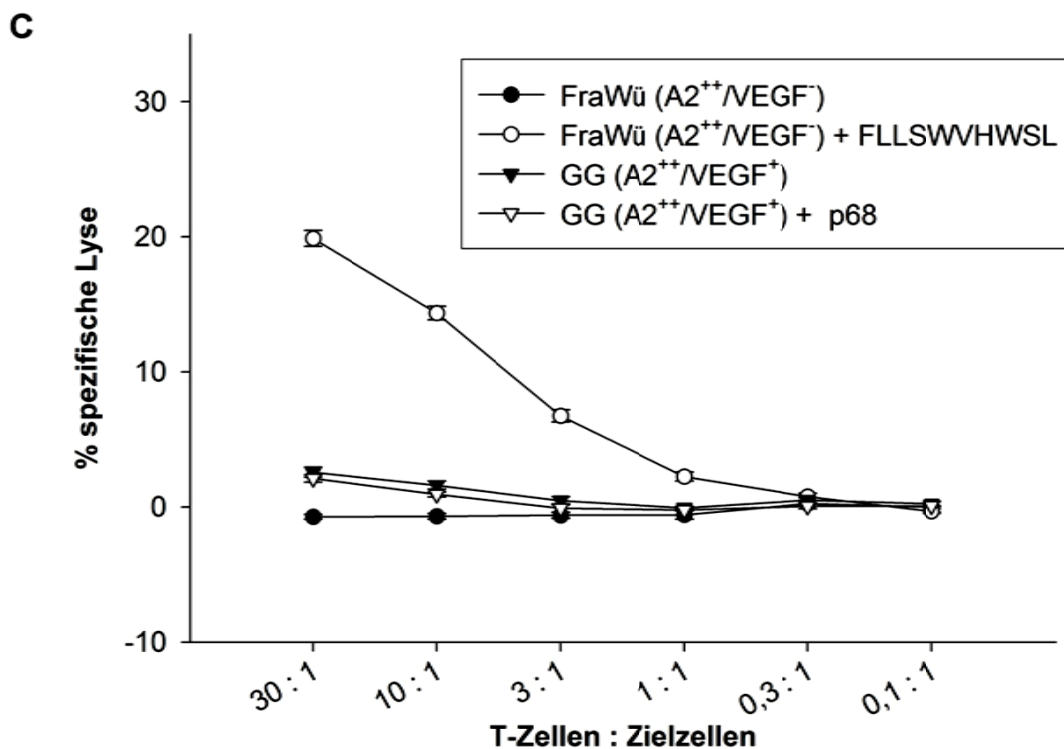
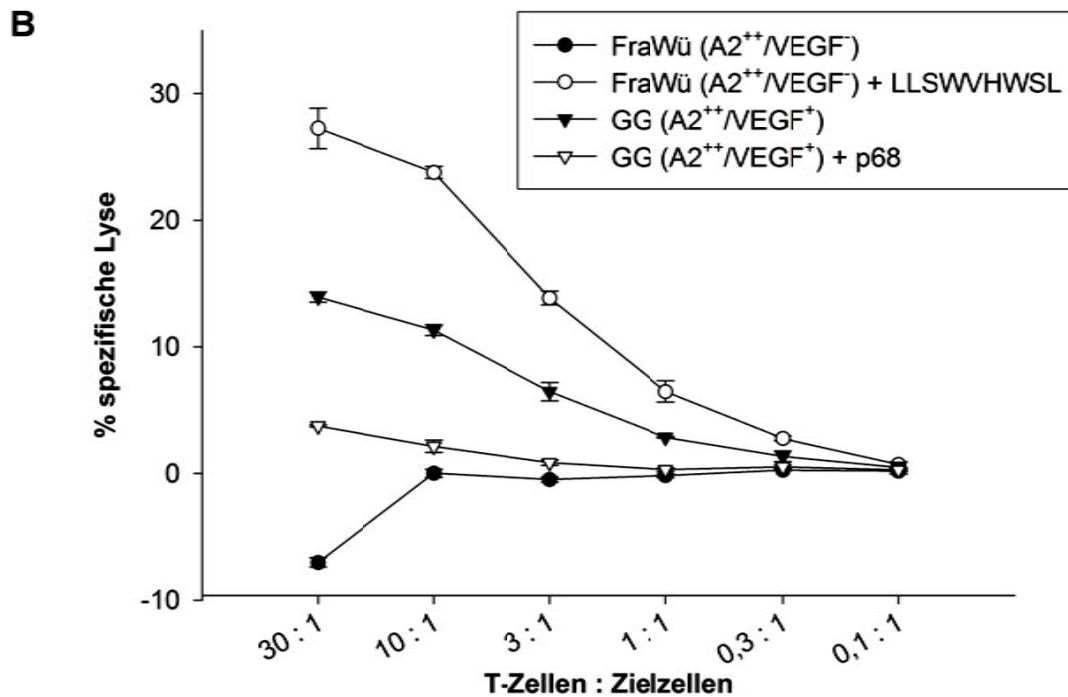


Abbildung 27: Zytotoxizitätstest mit VEGF-spezifischen zytotoxischen T-Zellen.

Die mit LLSWVHWSL und FLLSWVHWSL stimulierten T-Zellen wurden für 4h und dem jeweiligen VEGF Peptid oder p68-beladenen T2-Zellen inkubiert (A). Für die Zytotoxizitätstests B und C wurden FraWü- und GG-Zellen mit ⁵¹Cr beladen und mit den jeweiligen T-Zellen für 4h inkubiert. Ein Teil der FraWü-Zellen war mit dem zur Stimulation verwendeten Peptid beladen und ein Teil der GG-Zellen war als Negativkontrolle mit p68-Peptid beladen. Dargestellt ist der Prozentsatz der spezifischen Lyse bei unterschiedlichen Verhältnissen von T-Zellen zu Zielzellen.

Die in Abbildung 27A gezeigten LLSWVHWSL- bzw. FLLSWVHWSL-stimulierten T-Zelllinien zeigten in vorangegangenen IFN γ -Färbungen 18% [LLSWVHWSL] und 20% [FLLSWVHWSL] positive T-Zellantworten (nicht gezeigt). Diese Zelllinien wurden im Zytotoxizitätstest jedoch unsortiert eingesetzt. Zum Nachweis ihrer peptidspezifischen Zytotoxizität wurden sie zunächst gegen entsprechend beladene T2-Zellen getestet (Abb. 27A). Bei einer T-Zellen : Zielzellen-Ratio von 30:1 zeigte die LLSWVHWSL-stimulierte T-Zelllinie eine spezifische Lyse von ca. 70%, während die FLLSWVHWSL-stimulierte T-Zelllinie bei 60% lag. Die Negativkontrolle (T2+p68) lag in beiden Fällen um 10%. LLSWVHWSL- bzw. FLLSWVHWSL-stimulierte T-Zellen waren in der Lage, Tumorzellen nach exogener Peptid-Beladung zu lysieren (ca. 27% bzw. 20%, T-Zellen : Zielzellen-Ratio 30:1).

Wie erwartet, wurde die unbeladene HLA-A*02⁺/VEGF⁻ OvCa-Zelllinie nicht lysiert. Die unbeladene HLA-A*02⁺/VEGF⁺ OvCa-Zelllinie GG wurde hingegen von LLSWVHWSL-stimulierten T-Zellen lysiert (Abb. 27C). Die mit p68-Peptid beladenen GG-Zellen wurden hingegen „gerettet“ und nicht lysiert. Dieser Effekt kann dadurch erklärt werden, dass bei der Beladung mit dem p68-Peptid die natürlich präsentierten VEGF-Liganden verdrängt wurden. Somit kann der VEGF-abgeleitete HLA-Ligand LLSWVHWSL als T-Zellepitop betrachtet werden und die gezeigte Lyse unbeladener Tumorzellen ist ein Beweis, dass der vorhergesagte Ligand auch *in vivo* prozessiert und präsentiert wird.

D.3.3 Weitere untersuchte Tumorantigene

Im folgenden Kapitel sollen exemplarisch funktionelle T-Zellanalysen bezüglich *in silico* vorhergesagter HLA-A*02-Liganden der TAA Jagged2, SPAG9 und CA125 dargestellt werden. Da zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht für alle Peptide alle Validierungsschritte durchgeführt werden konnten, sind die folgenden Ergebnisse als erste Schritte in der Validierung eines HLA-Liganden als potentiell T-Zellepitop bzw. als therapeutisch nutzbares Peptid in der Tumorthherapie zu sehen.

D.3.3.1 Sechs von neun Jagged2-Peptiden induzieren eine spezifische IFN γ -Antwort in T-Zellen

Jagged2 ist ein Notch-Ligand und spielt eine zentrale Rolle bei der embryonalen Entwicklung. Bei einer Überexpression in Tumoren greift Jagged2 in die Zytokinexpression ein, und ist somit ein interessantes Tumorantigen (Kap. C.1.5.). In 50% aller OvCa wurde überexprimierte Jagged2 mRNA gefunden, was durch eigene Untersuchungen bestätigt werden konnte (Tabelle 28). Bei der Epitopvorhersage mit Hilfe der SYFPEITHI-Datenbank

D Ergebnisse und Diskussion zum *in silico*-Ansatz zur Definition neuer T-Zellepitope

wurden neun Peptide mit den besten „Scores“ für weitere Experimente ausgewählt und synthetisiert.

Tabelle 33: Auflistung der von Jagged2-abgeleiteten Peptide mit SYFPHEITI-Score.

Grau unterlegt sind die Peptide, gegen die eine IFN γ T-Zellantwort gemessen werden konnte.

	Position	Sequenz	SYFPHEITI-Score
Jagged2 1238 Amino- säuren	1060-1068	SLLLAVTEV	30
	990-998	AICSGIRSL	28
	1062-1070	LLAVTEVKV	28
	912-920	LLAGQPEAL	27
	1095-1113	WLACVVLCV	27
	13-21	LLLLLALWV	26
	74-82	CLKEYQAKV	26
	250-258	NLLHGGCTV	26
	8-16	RLPRRLLLL	25

Nach dem in Kapitel D.2.2. und D.2.3 beschriebenen Schema der *in vitro* Aktivierung von T-Zellen und der Peptid-Validierung konnte gegen sechs der neun von Jagged2-abgeleiteten Peptiden eine IFN γ T-Zellantwort erhalten werden. Nach drei bis vier Stimulationen mit allen neun Peptiden konnten in einem (AICSGIRSL, LLAVTEVKV, WLACVVLCV) und zwei (CLKEYQAKV, NLLHGGCTV) von vier gesunden Spendern IFN γ T-Zellantworten gegen die entsprechenden Peptide gemessen werden. In der folgenden Abbildung 28 sind exemplarisch die *in vitro* aktivierten Zellen des Spenders D69 dargestellt, der Antworten gegen alle 6 Peptide zeigte. Die T-Zellen wurden nach dem in Kapitel B.5.5. beschriebenen Protokoll auf ihre Peptidspezifität hin untersucht. Dem Färbeansatz wurde als Negativkontrolle immer ein Ansatz mit dem p68-Peptid YLLPAIVHI zugefügt. Für die Auswertung wurden im SSC-H gegen FSC-H Dot-Blot die lebenden Lymphozyten eingegrenzt und in den folgenden Abbildungen dargestellt.

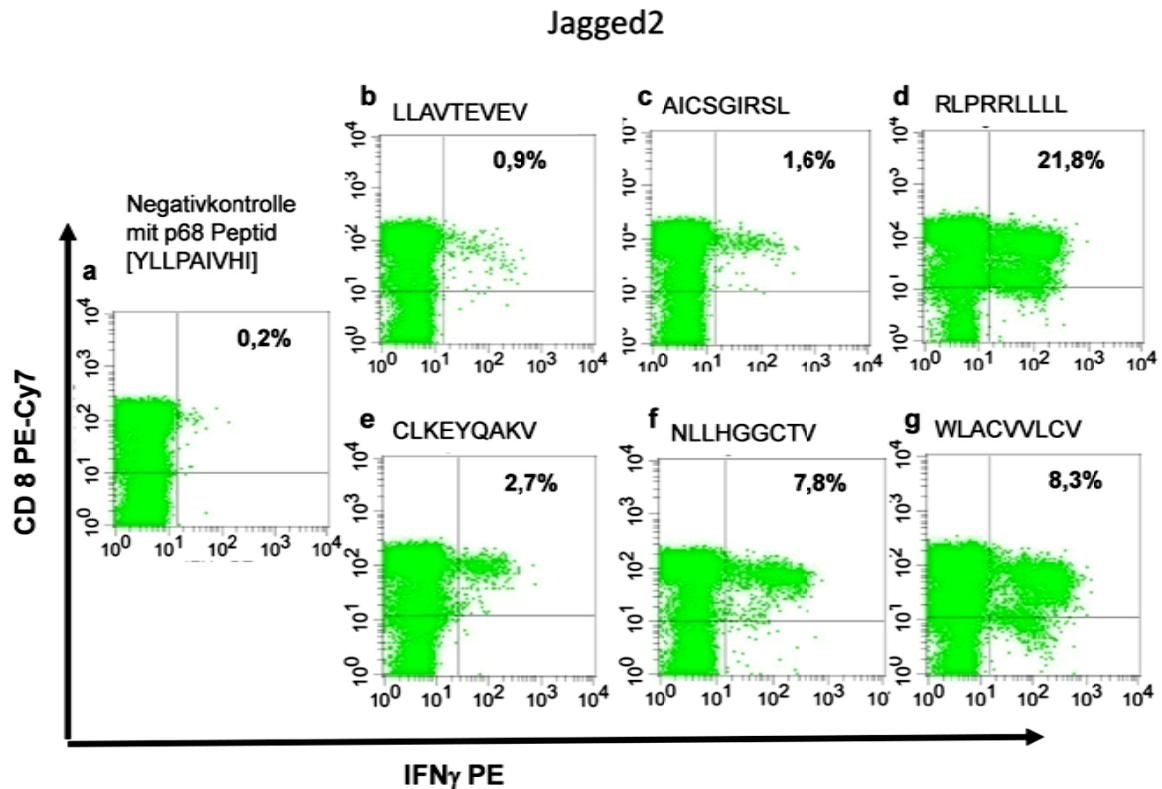


Abbildung 28: Intrazelluläre IFN γ -Färbung der mit Jagged2-abgeleiteten Peptiden stimulierten T-Zellen.

Die *in vitro* aktivierten T-Zellen von Spender D69 wurden in einer IFN γ Färbung auf ihre Peptidspezifität getestet. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit p68-Peptid (a). Nach 6h Inkubation bei 37°C in Gegenwart der entsprechenden Peptide (b-g) wurden die Zellen extrazellulär mit CD8 PE-Cy7 und intrazellulär mit IFN γ PE gefärbt (b-g).

Abbildung 13 zeigt die IFN γ T-Zellantworten des Spenders D69 nach vier Stimulationen. Exemplarisch für die 6 T-Zelllinien ist nur eine Negativkontrolle dargestellt, die eine IFN γ T-Zellantwort von 0,2% zeigt. Zieht man diesen Hintergrund von der Antwort auf die Jagged2-Peptide ab, ergeben sich peptidspezifische IFN γ T-Zellantworten von 0,9% [LLAVTEVEV], 1,6% [AICSGIRSL], 21,8% [RLP RRLLLL], 2,7% [CLKEYQAKV], 7,8% [NLLHGGCTV] und 8,3% [WLACVLCV] (Abb 28c-g). Diese Ergebnisse konnten für den Spender D69 dreimal reproduziert werden. In einem von drei weiteren Spendern konnten nur IFN γ T-Zellantworten gegen die Peptide CLKEYQAKV und NLLHGGCTV gemessen werden.

D.4.1.1 Zwei von 14 SPAG9-Peptiden induzieren eine spezifische IFN γ -Antwort in T-Zellen

SPAG9 ist ein Oberflächenprotein und wird ausschließlich in haploiden Spermienzellen exprimiert. Es gehört zu den *Cancer/Testis*-Antigenen und die Tatsache, dass zwei Drittel der OvCa-Patientinnen Antikörper gegen SPAG9 bilden, machen es zu einem idealen TAA, das immunogen ist und gleichzeitig nicht auf Normalgewebe exprimiert wird (Kap. C.1.8).

D Ergebnisse und Diskussion zum *in silico*-Ansatz zur Definition neuer T-Zellepitope

SPAG9 ist laut Literatur in 90% aller OvCa überexprimiert. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen lag die Expressionshäufigkeit bei 45% (Tabelle 28). Bei der Epitopvorhersage mit Hilfe der SYFPEITHI-Datenbank wurden 14 Peptide mit den besten „Scores“ für weitere Experimente ausgewählt und synthetisiert.

Tabelle 34: Auflistung der von SPAG9-abgeleiteten Peptide mit SYFPHEITI-Score.

Grau unterlegt sind die Peptide, gegen die eine IFN γ T-Zellantwort gemessen werden konnte.

	Position	Sequenz	SYFPEITHI-Score
SPAG9 1321 Amino- säuren	419-427	QLLETKNAL	26
	837-845	SLLGGITVV	32
	343-351	AIIESTPEL	29
	1016-1024	ALADGTLAI	29
	49-57	ELMPLVVAV	28
	433-441	DLIAKVDEL	28
	297-306	HLKFRISHEL	21
	37-46	RLIGRYDEEV	26
	447-455	VLQGELEAV	28
	609-618	FLSEETEASL	27
	19-27	VMSERVSGL	26
	56-64	AVLENLDSV	26
	413-421	LILENTQLL	26
	998-1006	KLKDSILSI	26

Nach dem in Kapitel D.2.2 und D.2.3 beschriebenen Schema des *in vitro* Aktivierung von T-Zellen und der Peptid-Validierung konnte gegen zwei der 14 von SPAG9-abgeleiteten Peptiden eine IFN γ T-Zellantwort erhalten werden. Nach drei bis vier Stimulationen mit allen 14 Peptiden konnten in vier von sieben gesunden Spendern IFN γ T-Zellantworten gegen SLLGGITVV und in drei von neun gesunden Spendern IFN γ T-Zellantworten gegen ELMPLVVAV gemessen werden. In der folgenden Abbildung 29 sind exemplarisch die *in vitro* aktivierten T-Zellen des Spenders D107 dargestellt. Die T-Zellen wurden nach dem in Kapitel B.5.5 beschriebenen Protokoll auf ihre Peptidspezifität hin untersucht. Dem Färbeansatz wurde als Negativkontrolle immer ein Ansatz mit dem p68-Peptid YLLPAIVHI zugefügt. Für die Auswertung wurden im SSC-H gegen FSC-H Dot-Blot die lebenden Lymphozyten eingegrenzt und in den folgenden Abbildungen dargestellt.

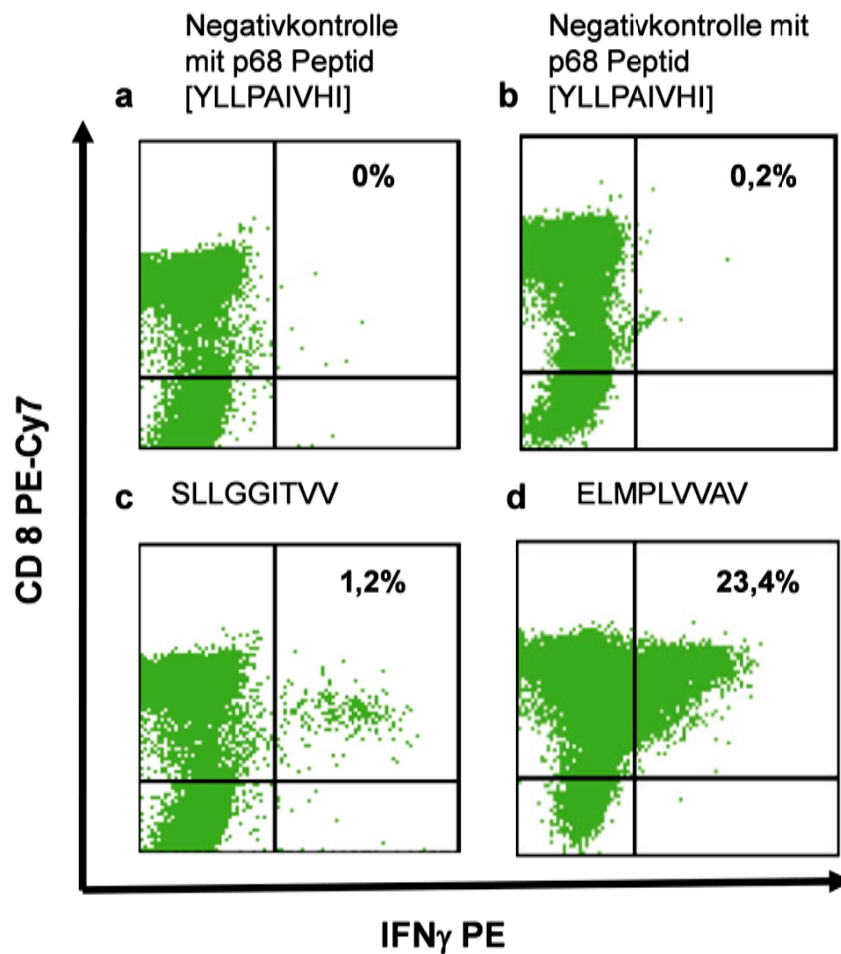


Abbildung 29: Intrazelluläre IFN γ -Färbung der mit SPAG9 abgeleiteten Peptiden stimulierten T-Zellen

Die *in vitro* aktivierten T-Zellen von Spender D107 wurden in einer IFN γ Färbung auf ihre Peptidspezifität getestet. Als Negativkontrolle diente jeweils ein Ansatz mit p68-Peptid (a und b). Nach 6h Inkubation bei 37°C in Gegenwart der entsprechenden Peptide (c und d) wurden die Zellen extrazellulär mit CD8 PE-Cy7 und intrazellulär mit IFN γ PE gefärbt.

Abbildung 29 zeigt die IFN γ T-Zellantworten des Spenders D107 nach vier Stimulationen. Die Negativkontrollen zeigen IFN γ T-Zellantworten von 0% und 0,2% in den T-Zellen beider Stimulationsansätze (Abb. 14a und 14b). Zieht man diesen Hintergrund von der Antwort auf die beiden SPAG9-Peptide ab, ergibt sich eine peptidspezifische IFN γ T-Zellantwort von ca. 1% [SLLGGITVV] und ca. 23% [ELMPLVVAV] (Abb.29c und 29d).

Die mit den SPAG9-Peptiden SLLGGITVV- und ELMPLVVAV-stimulierten T-Zellen wurden nun weiter in einem Zytotoxizitätstest analysiert. Hierbei wurden die SLLGGITVV-spezifischen T-Zellen mit Peptid-beladenen T2-Zellen inkubiert (A), während die ELMPLVVAV-spezifischen T-Zellen mit der Peptid-beladenen OvCa-Zelllinie GG inkubiert

D Ergebnisse und Diskussion zum *in silico*-Ansatz zur Definition neuer T-Zellepitope

wurden (B). Als Negativkontrolle dienten in Abb. 30A p68-beladene T2-Zellen, während in Abb. 30B die unbeladene HLA-A*02⁺/SPAG9⁻ OvCa-Zelllinie GG verwendet wurde.

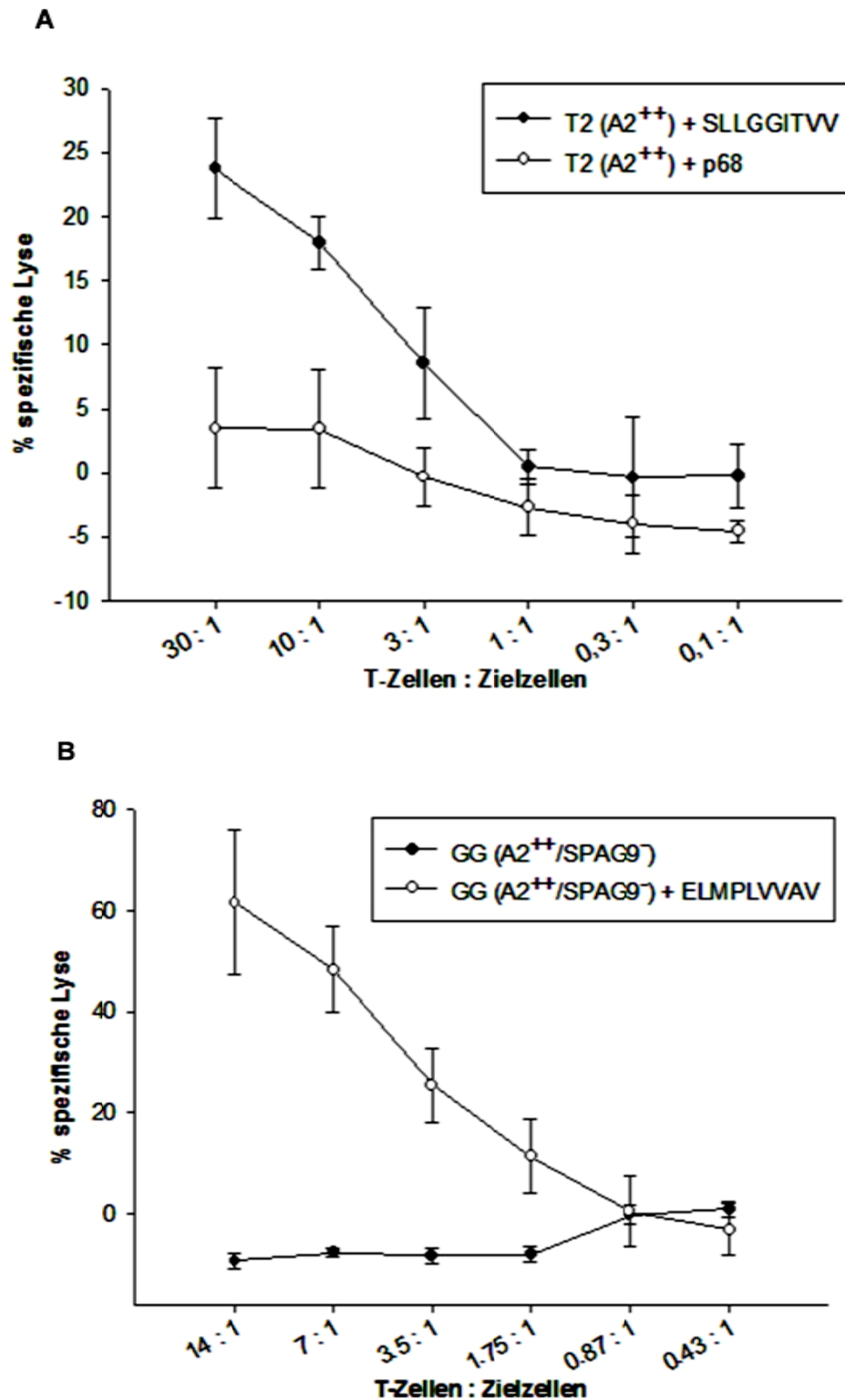


Abbildung 30: Zytotoxizitätstest mit SPAG9-spezifischen zytotoxischen T-Zellen.

Die mit SLLGGITVV- und ELMPLVVAV-stimulierten T-Zellen wurden für 4h mit ⁵¹Cr beladene Zielzellen inkubiert. Für **A** wurden T2-Zellen mit SLLGGITVV oder p68-beladenen. Für **B** wurden beladene und unbeladene GG-Zellen verwendet. Dargestellt ist der Prozentsatz der spezifischen Lyse bei unterschiedlichen Verhältnissen von T-Zellen zu Zielzellen

D Ergebnisse und Diskussion zum *in silico*-Ansatz zur Definition neuer T-Zellepitope

Die in Abbildung 30 gezeigten SLLGGITVV- bzw. ELMPLVVAV-stimulierten T-Zelllinien zeigten in vorangegangenen IFN γ -Färbungen 1% [SLLGGITVV] bzw. 23% [ELMPLVVAV] positive T-Zellpopulationen (Abb 29). Diese T-Zellen wurden im folgenden Zytotoxizitätstest jedoch unsortiert eingesetzt. Zum Nachweis ihrer peptidspezifischen Zytotoxizität wurden sie gegen entsprechend beladene T2-Zellen (Abb. 30A) bzw. gegen die Peptid-beladene OvCa-Zelllinie GG getestet (Abb. 30B). Bei einer T-Zellen : Zielzellen-Ratio von 30:1 zeigte die SLLGGITVV-stimulierte T-Zelllinie eine spezifische Lyse von ca. 25%. Die ELMPLVVAV-stimulierte T-Zelllinie zeigte bei einer T-Zellen : Zielzellen-Ratio von 14:1 eine spezifische Lyse von 60%. Die Negativkontrollen (T2+p68, GG-unbeladen) lagen in beiden Fällen um 0%. SLLGGITVV- bzw. ELMPLVVAV-stimulierte T-Zellen waren in der Lage, T2-Zellen und Tumorzellen nach exogener Peptid-Beladung zu lysieren.

In diesem Fall wäre es interessant gewesen, zusätzlich zu unbeladenen GG-Zellen eine unbeladene HLA-A*02⁺/SPAG9⁺ OvCa-Zelllinie als Zielzellen einzusetzen. Leider reichte die Menge an ELMPLVVAV-stimulierten T-Zellen für einen solchen Versuch nicht aus.

D.4.1.2 Vier von 23 CA125-Peptiden induzieren eine spezifische IFN γ -Antwort in T-Zellen

Das Glykoprotein CA125 ist ein Oberflächenprotein, wird aber auch sezerniert und im Fetus und im Bauchraum exprimiert. CA125 wird schon lange als Tumormarker für OvCa verwendet und in 80% aller OvCa in fortgeschrittenem Stadium überexprimiert. (Kap. C.1.6). Diese Expression konnte auch durch eigene Untersuchungen bestätigt werden (Tabelle 28). Da das Protein mit 200 kDa sehr groß ist, wurden bei der Epitopvorhersage mit Hilfe der SYFPEITHI-Datenbank 23 Peptide mit den besten „Scores“ für weitere Experimente ausgewählt und synthetisiert.

Tabelle 35: Auflistung der von CA125-abgeleiteten Peptide mit SYFPEITHI-Score.
 Grau unterlegt sind die Peptide, gegen die eine IFN γ T-Zellantwort gemessen werden konnte.

	Position	Sequenz	SYFPEITHI-Score
CA125 22152 Amino- säuren	13781-13789	SLPGHTAPV	28
	15605-15613	KLTRGIIEI	28
	14825-14833	NLTNGIQEL	27
	9671-9679	SLATSQVTL	28
	9762-9770	LILPGLVKT	28
	8707-8715	SLTSGLREI	27
	10554-10562	ALPRTTPSV	27
	11192-11200	KMISAIPTL	28
	11312-11320	TISPGIPGV	28
	5073-5081	LLTSGLVKI	29
	6556-6564	DMLASVASL	27
	14136-14144	VLQGLLGPL	28
	11316-11324	GIPGVLTSL	27
	11872-11880	GLLETTGLL	27
	21311-21319	VLQGLLRSL	30
	22100-22108	VILIGLAGL	30
	21768-21776	YLGQCQLISL	28
	20587-20595	QLYWELSKL	27
	21062-21070	QLTHGITEL	27
	63-71	TLASPTSSV	27
	2051-2059	WLWDLTTSL	27
	7556-7564	SLATEANTV	27

Nach dem in Kapitel D.2.2 und D.2.3 beschriebenen Schema der *in vitro* Aktivierung von T-Zellen und der Peptid-Validierung konnte gegen vier der 23 von CA125-abgeleiteten Peptiden eine IFN γ T-Zellantwort erhalten werden. Nach drei bis vier Stimulationen mit allen 23 Peptiden konnten in gesunden Spendern unterschiedlich häufig IFN γ T-Zellantworten gemessen werden. Hierbei ergaben sich für die Peptide KMISAIPTL, GLLETTGLL und SLATEANTV in einem von vier gesunden Spendern positive IFN γ T-Zellantworten, während die SLPGHTAPV- bzw. TISPGIPGV-stimulierten T-Zellen in drei von vier bzw. in zwei von sechs Spendern positive IFN γ T-Zellantworten zeigten. Hier stellt sich sofort die Frage, ob ein Spender gegen mehrere Peptide reagieren kann. In der folgenden Abbildung 31 sind exemplarisch nur die positiven IFN γ T-Zellantworten verschiedener Spender gegen einzelne Peptide dargestellt. Die T-Zellen wurden nach dem in Kapitel B.5.5 beschriebenen Protokoll auf ihre Peptidspezifität hin untersucht. Dem Färbeansatz wurde als Negativkontrolle immer

D Ergebnisse und Diskussion zum *in silico*-Ansatz zur Definition neuer T-Zellepitope

ein Ansatz mit dem p68-Peptid YLLPAIVHI zugefügt. Für die Auswertung wurden im SSC-H gegen FSC-H Dot-Blot die lebenden Lymphozyten eingegrenzt und in den folgenden Abbildungen dargestellt.

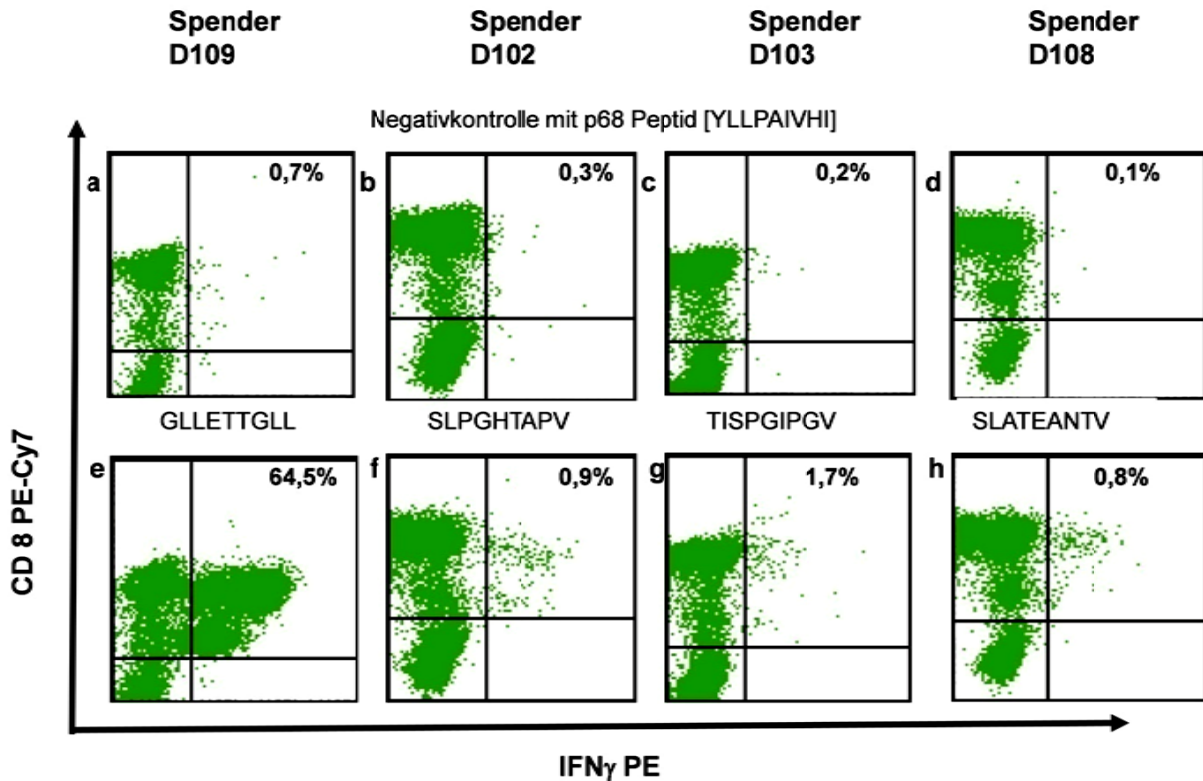


Abbildung 31: Intrazelluläre IFN γ -Färbungen der mit CA125-abgeleiteten Peptiden stimulierten T-Zellen.

Die *in vitro* aktivierten T-Zellen der Spender D102, D103, D108, und D109 wurden in einer IFN γ -Färbung auf ihre Peptidspezifität getestet. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit p68-Peptid (a-d). Nach 6h Inkubation bei 37°C in Gegenwart der entsprechenden Peptide (e-h) wurden die Zellen extrazellulär mit CD8 PE-Cy7 und intrazellulär mit IFN γ PE gefärbt.

Abbildung 16 zeigt die IFN γ T-Zellantworten der Spender D109, D102, D103 und D108 nach vier Stimulationen. Die Negativkontrollen zeigten IFN γ T-Zellantworten zwischen 0,1% und 0,7% in den T-Zellen der vier Stimulationsansätze (Abb. 31a-31d). Zieht man diesen Hintergrund von der Antwort auf die vier CA125-Peptide ab, ergeben sich peptidspezifische IFN γ T-Zellantwort von ca. 64% [GLLETTGLL], 0,6% [SLPGHTAPV], 1,5% [TISPGIPGV] und 0,9% [SLATEANTV] (Abb. 31e-31h). In den untersuchten Spendern konnten immer nur gegen maximal zwei Peptide auf einmal Antworten erhalten werden. Keiner der Spender zeigte simultane Antworten gegen alle vier Peptide.

D Ergebnisse und Diskussion zum *in silico*-Ansatz zur Definition neuer T-Zellepitope

Die mit dem Peptid GLETTGLL stimulierten T-Zellen wurden nun weiter in einem Zytotoxizitätstest analysiert. Hierbei wurden die peptidspezifischen T-Zellen mit der Peptid-beladenen und unbeladenen HLA-A*02+/CA125+ OvCa-Zelllinie FraWü inkubiert. Eine adäquate Negativkontrolle fehlt in diesem Ansatz.

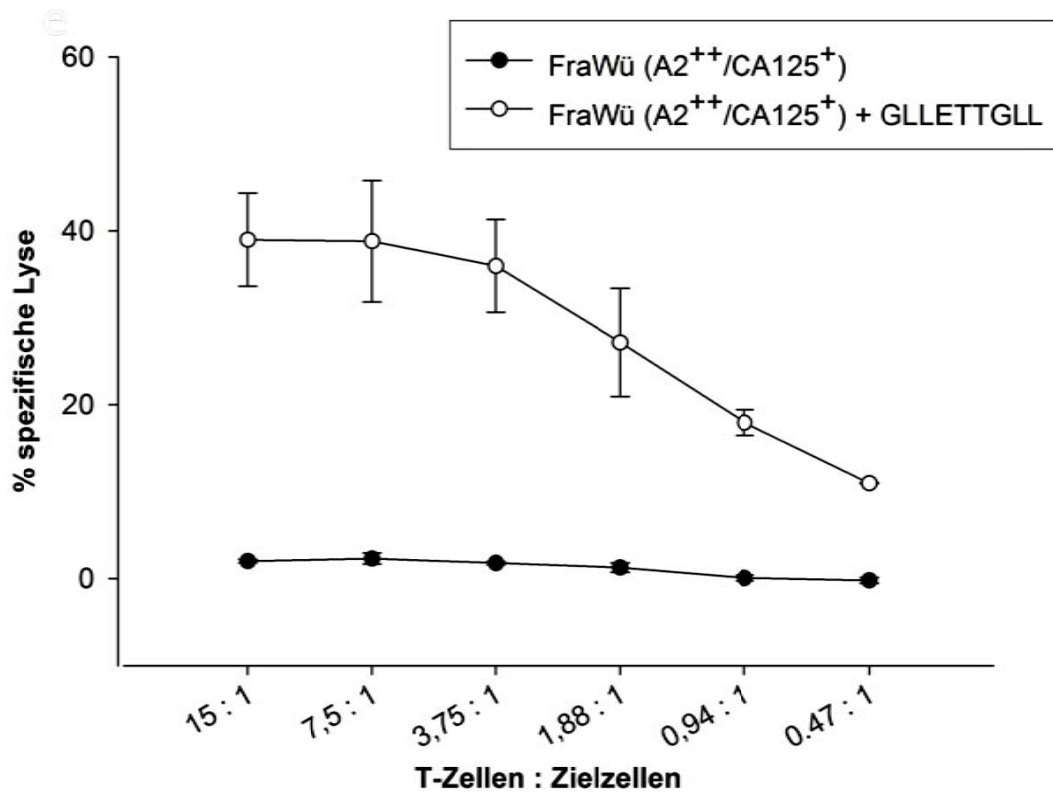


Abbildung 32: Zytotoxizitätstest mit CA125 spezifischen zytotoxischen T-Zellen.

Die mit GLETTGLL-stimulierten T-Zellen wurden für 4h mit ⁵¹Cr beladenen FraWü-Zellen inkubiert. Ein Teil der FraWü-Zellen wurde mit Peptid beladen, während ein Teil der FraWü-Zellen unbeladen blieb. Dargestellt ist der Prozentsatz der spezifischen Lyse bei unterschiedlichen Verhältnissen von T-Zellen zu Zielzellen.

Die in Abb. 17 gezeigten GLETTGLL-stimulierten T-Zellen zeigten in der vorangegangenen IFN γ -Färbungen 64% positive T-Zellen (Abb. 16). Diese T-Zellen wurden im folgenden Zytotoxizitätstest unsortiert eingesetzt. Die GLETTGLL-stimulierten T-Zellen waren nur in der Lage, FraWü-Zellen nach exogener Peptid-Beladung zu lysieren (ca. 40%, T-Zellen : Zielzellen-Ratio 15:1). Unbeladene FraWü-Zellen wurden nicht lysiert, obwohl sie das CA125-Antigen exprimieren (Abb 17). Somit konnte gezeigt werden, dass die T-Zellen peptidspezifisch zytotoxisch sind und prinzipiell Tumorzellen mit entsprechenden HLA/Peptid-Komplexen lysieren können. Die „natürliche“ Präsentation dieser HLA/Peptid-Komplexe ist jedoch entweder zu gering oder die verwendeten Epitope werden nicht prozessiert.

D.4 Zusammenfassung und Diskussion zum *in silico*-Ansatz zur Definition neuer T-Zellepitope

Im Folgenden werden alle Ergebnisse zur Validierung der Peptide zusammengefasst. In der Tabelle 36 sind nur die Peptide aufgeführt, die peptidspezifische IFN γ T-Zellantworten induzieren konnten. In der Spalte der „peptidspezifischen Induktion von IFN γ “ sind zusätzlich die Anzahl der zur Stimulation verwendeten Spender und die Anzahl der Spender mit positiver IFN γ T-Zellantwort aufgeführt (x/y). Außerdem sind in der Spalte „spezifische Tetramer-Bindung“ die Peptide gekennzeichnet, für die HLA/Peptid-Komplexe (Tetramere) hergestellt wurden und deren Peptid-stimulierte T-Zellen eine Bindung an diese Tetramere aufwiesen. In der Spalte „peptidspezifische Lyse“ sind diejenigen Peptide mit „ja“ markiert, deren stimulierte T-Zellen im Zytotoxizitätstest eine Lyse peptidbeladener Zielzellen zeigten. Dann folgt die Spalte „tumorspezifische Lyse“, in der diejenigen Peptide markiert sind, die T-Zellen stimulieren konnten die unbeladene Tumorzellen lysierten. In der letzten Spalte sind die Peptide gekennzeichnet, die in einer Prästimulation in OvCa-Patientinnen verwendet wurden und zum Nachweis von Gedächtnis-T-Zellen geführt haben.

D Ergebnisse und Diskussion zum *in silico*-Ansatz zur Definition neuer T-Zellepitope

Tabelle 36: Übersicht über alle Peptide, die eine IFN γ T-Zellantwort induzieren konnten und ihre weitere Validierung.

¹x Erfolgreiche T-Zellstimulationen in y untersuchten Spendern, nachgewiesen über positive IFN γ T-Zellantworten. ²Spezifische Tetramer-Bindung. ³Erfolgreicher Zytotoxizitätstest von peptidbeladenen HLA-A*02-positiven Zielzellen (T2- oder Tumorzellen). ⁴Erfolgreiche Lyse von Antigen- und HLA-A*02-positiven Tumorzelllinien. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Antigen	Sequenz	¹ peptidspez. Induktion von IFN γ in x/y Spendern	² spezif. Tetramerbindung	³ Peptid-spezifische Lyse	⁴ Tumor-spezifische Lyse	Gedächtnis-T-Zellen in OvCa-Patientinnen
L1	LLANAYIYVV	21 / 32	ja	ja	nein	ja
	LLLRRWQPPL	21 / 32	ja	ja	nein	ja
VEGF	LLSWVHWSL	15 / 23	n.t.	ja	ja	n.t.
	FLLSWVHWSL	16 / 23	ja	ja	nein	n.t.
NMU	PLLQLVPHL	4 / 7	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
Testisin	SLLSHRWAL	3 / 6	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
	GLWYQIGVV	3 / 6	nein	n.t.	n.t.	n.t.
	RLWDSHVCGV	1 / 5	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
Jagged2	AICSGIRSL	1 / 4	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
	LLAVTEVKV	1 / 4	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
	WLACVVLCV	1 / 4	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
	CLKEYQAKV	2 / 4	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
	NLLHGGCTV	2 / 4	n.t.	ja	n.t.	n.t.
	RLPRLLLLL	1 / 4	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
SPAG9	SLLGGITVV	4 / 7	n.t.	ja	n.t.	n.t.
	ELMPLVVAV	3 / 9	n.t.	ja	n.t.	n.t.
CA125	SLPGHTAPV	3 / 4	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
	KMISAIPTL	1 / 4	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
	TISPGIPGV	2 / 6	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
	GLLETTGLL	1 / 4	n.t.	ja	nein	n.t.
	SLATEANTV	1 / 4	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
Mesothelin	LLGPGPVLTIV	5 / 10	n.t.	ja	n.t.	n.t.
OPN	QLYNKYPDAV	1 / 3	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
	VICFCLLGI	1 / 3	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.

n.t.=nicht getestet

Von den 80 vorhergesagten Peptiden, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, zeigten 24 positive IFN γ T-Zellantworten in gesunden Spendern. Für fünf dieser 24 Peptide wurden Tetramere hergestellt, von denen drei eine spezifische Bindung an den T-Zellrezeptor aufwiesen. Die Peptid-stimulierten T-Zellen von neun Peptiden waren in der Lage Peptid-beladene Zielzellen zu lysieren. Allein das VEGF-abgeleitete Peptid LLSWVHWSL konnte T-Zellen stimulieren, die auch unbeladene Tumorzellen lysierten. Gegen die beiden L1CAM-abgeleiteten Peptide LLANAYIYVV und LLLLRRWQPPL konnten

Gedächtnis-T-Zellen in zwei von neun getesteten OvCa-Patientinnen nachgewiesen werden. Somit wären für drei der validierten Peptide die Bedingungen erfüllt, die es als potentielles T-Zellepitop bzw. als therapeutisch zu nutzendes Peptid in der Tumorthherapie einsetzbar machen.

D.4.1 Bewertung und Diskussion der Ergebnisse zu L1CAM-abgeleiteten Peptiden

Mit den beiden L1CAM-abgeleiteten Peptiden LLANAYIYVV und LLLRWQPPL wurden im Rahmen dieser Arbeit mit Abstand die meisten Experimente durchgeführt. Bei den T-Zellstimulationen konnten in sechs von 32 Spendern ähnlich hohe Prozentsätze (über 6%) an positiven IFN γ T-Zellen beobachtet werden, wie sie in Abb.3 dargestellt wurden. In der Regel wurden jedoch Prozentsätze, wie die in Abb.5 zwischen 1% und 2% gemessen. Mit den stimulierten T-Zellen von fünf Spendern, die eine peptidspezifische IFN γ T-Zellantwort zeigten wurde zusätzlich ein *IFN γ secretion assay* (Miltenyi) zur Anreicherung der IFN γ positiven T-Zellen durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Aus keinem dieser Versuche konnte jedoch eine stabile T-Zelllinie etabliert werden. Auch der Versuch die Tetramer-bindenden T-Zellen mit Hilfe eines FACS *Aria Cell-Sorting* Systems aufzureinigen und daraus eine T-Zelllinie zu etablieren, scheiterte. Somit standen zu keinem Zeitpunkt T-Zelllinien zur Verfügung, deren IFN γ positive T-Zellen höherer als 20% war.

Diese Tatsache ist eine mögliche Erklärung dafür, dass L1CAM-spezifische T-Zelllinien nicht in der Lage waren, unbeladene OvCa-Zelllinien zu lysieren. Möglicherweise war sowohl die „natürliche“ Präsentation dieser HLA/Peptid-Komplexe auf den OvCa-Zelllinien zu gering als auch die vorhandene Zahl an peptidspezifischen T-Zellen zu niedrig, um eine spezifische Lyse erkennen zu können. Hier ist möglicherweise die Sensitivitätsgrenze des ^{51}Cr -Freisetzungstests erreicht.

Eine weitere Erklärung für das Fehlen einer tumorspezifischen Lyse ist, dass die verwendeten Epitope nicht oder modifiziert prozessiert werden. Da L1CAM ein stark glykosyliertes Protein ist, wäre es möglich, dass auch die prozessierten Peptide noch Reste der Glykosylierung tragen. Die mit synthetischen Peptiden *in vitro* stimulierten T-Zellen wären somit nicht in der Lage, die „natürlich prozessierten“ glykosylierten Peptide auf der Oberfläche der Tumorzellen zu erkennen und zu lysieren.

Dennoch wurden in den PBMCs von zwei von neun untersuchten OvCa-Patientinnen Gedächtnis-T-Zellen gezeigt, die mit den L1CAM-Peptid/MHC-Komplexen (Tetrameren) spezifisch angefärbt werden konnten. Dazu müssen naive T-Zellen zuvor *in vivo* durch die Präsentation der beiden Peptide auf Tumorzellen oder DCs aktiviert worden sein. Damit wäre der Beweis erbracht, dass die beiden *in silico* vorhergesagten, von L1CAM-

abgeleiteten Peptide LLANAYIYVV und LLLRWQPPL auch *in vivo* prozessiert und präsentiert werden. Die nachgewiesenen Gedächtnis-T-Zellen zeigten in den hier verwendeten Tests keine peptidabhängige Funktionalität, befanden sich demnach in den Patientinnen in einem supprimierten oder anergen Zustand.

L1CAM wäre durch seine häufige und spezifische Überexpression in OvCa und seine Assoziation mit einem malignen Phänotyp ein ideales Tumorantigen für eine Peptidvakzine. Diese beiden Tatsachen machen die Peptide LLANAYIYVV und LLLRWQPPL zu möglichen Kandidaten für eine therapeutische Peptidvakzine für OvCa-Patientinnen.

D.4.2 Bewertung und Diskussion der Ergebnisse zu VEGF-abgeleiteten Peptiden

Mit den VEGF-abgeleiteten Peptiden LLSWVHWSL und FLLSWVHWSL wurden ebenfalls viele T-Zellstimulationen durchgeführt. So konnten in 15 [LLSWVHWSL] und 16 [FLLSWVHWSL] von 23 Spendern positive IFN γ T-Zellantworten induziert werden, die ähnlich wie bei L1CAM in drei Spendern zwischen 6% und 20% lagen. Auch hier scheiterten alle Versuche diese Zellen anzureichern und daraus eine T-Zelllinie zu etablieren. Trotzdem konnte in einem Experiment eine Lyse der unbeladenen HLA-A*02+/VEGF+ OvCa-Zelllinie gezeigt werden. Hierzu waren stimulierte T-Zellen verwendet worden, die 18% IFN γ positive T-Zellen aufwiesen. Da jedoch zu keinem späteren Zeitpunkt noch einmal eine T-Zelllinie ähnlich hoher Peptid-Spezifität zur Verfügung stand, konnte dieses Ergebnis nicht reproduziert werden. Daher es nicht eindeutig genug um das Peptid ohne weitere Versuche als Kandidat für eine therapeutische Peptidvakzine aufnehmen zu können.

D.4.3 Bewertung und Diskussion der Ergebnisse zu Jagged2-abgeleiteten Peptiden

Aus den Ergebnissen zu den Jagged2-abgeleiteten Peptiden können zu diesem Zeitpunkt keinerlei Schlüsse bezüglich der Verwertbarkeit der untersuchten Peptide für eine Peptidvakzine gezogen werden. Die Gründe hierfür liegen in der zu geringen Spenderzahl, für die positive IFN γ T-Zellantworten gemessen werden konnten. Die Tatsache, dass ein einzelner Spender auf sechs der neun getesteten Peptide reagierte, kann entweder in der Besonderheit der Spenderzellen oder aber der besonders hohen Immunogenität des Proteins und damit der daraus abgeleiteten Peptide zurück zu führen sein. Da bisher jedoch keine Antikörper gegen Jagged2 in Tumorpatienten gefunden wurden, ist letztere Möglichkeit eher unwahrscheinlich. Für die Validierung der Peptide mit positiver IFN γ T-Zellantwort

sollten diese Antworten zunächst reproduziert und anschließend die Prozessierung und Präsentation der Peptide auf OvCa-Tumorzellen nachgewiesen werden.

D.4.4 Bewertung und Diskussion der Ergebnisse zu SPAG9-abgeleiteten Peptiden

Die Ergebnisse aus den T-Zellstimulationen mit SPAG9-abgeleiteten Peptiden sind ebenfalls noch nicht ausreichend, um eine Entscheidung über die Verwertbarkeit der Peptide mit positiver IFN γ T-Zellantwort treffen zu können. Tatsache ist jedoch, dass SPAG9 als *Cancer/Testis*-Antigen mit hoher Immunogenität, belegt durch Antikörper, die in Tumorkranken gefunden wurden, ein ideales Tumorantigen für eine Peptidvakzine darstellt. Es wäre also interessant, die Peptide SLLGGITVV und ELMPLVVAV in weiteren T-Zellstimulationen einzusetzen und deren Prozessierung und Präsentation auf OvCa-Tumorzellen durch entsprechende Zytotoxizitätstests nachzuweisen.

D.4.5 Bewertung und Diskussion der Ergebnisse zu CA125-abgeleiteten Peptiden

CA125 wäre hinsichtlich seiner hohen Tumorspezifität und der Assoziation mit einem malignen Phänotyp (beteiligt an Metastasierung, Kap. C.1.6) ein idealer Kandidat für eine Peptidvakzine. Der Einsatz des Antikörpers Oregovomab zeigte bisher vertretbare Nebenwirkungen, so dass auch bei einem Einsatz von CA125 als Peptidvakzine ähnliche moderate Nebenwirkungen zu erwarten sind. Somit wäre es interessant, die Peptide GLETTGLL, SLPGHTAPV, TISPGIPGV und SLATEANTV in weiteren T-Zellstimulationen einzusetzen und deren Prozessierung und Präsentation auf OvCa-Tumorzellen durch entsprechende Zytotoxizitätstests nachzuweisen.

E Ergebnisse und Diskussion zur MHC-Liganden-Analyse

Dieser Ergebnisteil ist in zwei Abschnitte gegliedert. Im ersten Teil wird die MHC-Liganden-Analyse von OvCa-Primärgewebe dargestellt. Im zweiten Teil wird die gezielte Suche nach vorhergesagten von L1CAM- und VEGF-abgeleiteten Peptiden in aufgereinigten MHC-Liganden eines OvCa-Primärgewebes diskutiert.

E.1 MHC-Liganden-Analyse von OvCa-Tumoren

E.1.1 Hintergrund

Nach der Epitopvorhersage *in silico* als Ansatzpunkt zur Identifizierung von T-Zellepitopen wird in diesem Ergebnisteil die MHC-Liganden-Analyse verwendet, um mögliche T-Zellepitope auf der Oberfläche von OvCa-Primärgewebe zu analysieren. Im folgenden Fließschema sind sowohl die Menge an analysiertem Probenmaterial als auch die daraus erzielten Ergebnisse schematisch dargestellt. Hierbei erfolgte die Aufbereitung der Gewebe und Aufreinigung der MHC-Liganden z.T. durch Gerd Fischer. An der Datenaufnahme waren Nina Hillen, Oliver Drews und Marc Günder beteiligt.

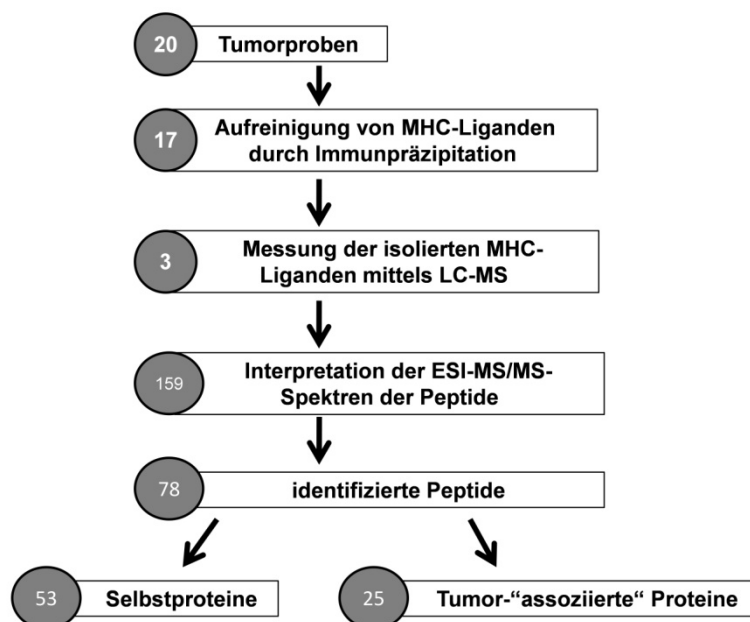


Abbildung 33: Übersicht über die Menge an Proben und die erzielten Ergebnisse.

Zum Abschluss dieser Dissertation lagen unserer Arbeitsgruppe 20 OvCa-Primärgewebe vor. Von 17 dieser Tumoren waren die MHC-Liganden durch Immunpräzipitation aufgereinigt worden. Nur 3 dieser Proben wurden hinsichtlich ihrer HLA-Liganden-Präsentation analysiert. 159 Spektren wurden analysiert und daraus 83 Peptide identifiziert. Davon stammten 58 aus Selbstproteinen und 25 konnten mit Tumorerkrankungen in Verbindung gebracht werden.

E.1.2 Eingesetzte Primärgewebe und Ausbeuten der Liganden- aufreinigung

Das verwendete Probenmaterial deckt sich mit dem in Ergebnisteil C analysierten Material zur Charakterisierung der TAA-Expression auf Tumorzellen (Kap. C.2.2). In der Tabelle wurden jedoch die Spalten „Gewebeart“, „Erhalten am“ und „Tumormasse“ hinzugefügt. „Gewebeart“ beschreibt die genaue Herkunft des Tumormaterials. „OvCa“ bedeutet, dass das Material vom Primärtumor des Ovars abstammt, während „Netz“ für Material aus Netzmetastasen steht. In der Spalte „Erhalten am“ wird deutlich, dass die Probensammlung sich bereits über 2 Jahre erstreckt. Nach einer MHC-Ligandenaufreinigung durch Immunpräzipitation (Kap. B.3.8) konnte für zwei Tumore die Menge an isolierten MHC-Molekülen mittels Edman-Abbau (Kap. B.5.8) bestimmt werden. Die Ergebnisse hierfür sind in Tabelle 3 dargestellt. Die Immunpräzipitation erfolgte beim Tumor HBL in zwei Schritten. Zunächst wurde das Tumorslysate über eine W6/32-gekoppelte und anschließend über eine L234-gekoppelte Sepharose-Säule gepumpt (Kap. B.3.8.3). So konnte eine Trennung der HLA-A,-B,-C von den HLA-DR-Molekülen erreicht werden. Beim Tumor ASZ hingegen wurde diese Trennung auf vier Säulen ausgedehnt, so dass letztendlich vier Fraktionen mit HLA-A*02, HLA-A*01, HLA-B, -C, und HLA-DR eluiert werden konnten. Massenspektrometrisch analysiert wurden nur die Fraktion der HLA-A, -B, -C-Moleküle des Tumors HBL und die Fraktion der HLA-A*02-Moleküle des Tumors ASZ.

E Ergebnisse und Diskussion zur MHC-Liganden-Analyse

Tabelle 37: Zur MHC-Ligandenaufreinigung verwendete Tumore.

Patienten-Identifikation	Gewebeart	Pathologie und Einteilung in Differenzierungsgrade *)	HLA-Typisierung	Erhalten am	Tumor [g]
HBL	n.b.	Gering differenziertes transitionalzelliges (solides), fokal auch seröses Adenocarcinom der Ovarien, G3*	A*01, A*03, B*07, B*35	05.10.2007	10,2
ASZ	n.b.	Seröses Adenocarcinom der Ovarien, G3*	A*01, A*02, B*13, B*44	09.10.2007	16,9
ASC	n.b.	Seröses Adenokarzinom der Ovarien, G3*	A*01, A*03, B*07, B*08	12.12.2007	2,0
RKA	n.b.	Muzinöser Borderlinetumor des Ovars	A*01, A*02, B*08, B*41	23.11.2007	2,0
IKL	n.b.	Seröses Adenokarzinom der Ovarien, G3*	A*03, A*32, B*44, B*49	23.01.2008	1,0
WSC	n.b.	Seröses Adenokarzinom der Ovarien, G2-3*	A*02-negativ	22.01.2008	3,0
H1	OvCa	Papillär-seröses Adenokarzinom der Ovarien, G3*	A*02-positiv	13.01.2009	2,4
LA	OvCa	Papillär-seröses Adenokarzinom der Ovarien, G1*	A*02-negativ	19.02.2009	1,0
M1	Netz	Papillär-seröses Adenokarzinom der Ovarien, G3*	A*02-negativ	30.01.2009	3,3
S3	Netz	Papillär-seröses Adenokarzinom der Ovarien G3*, Probe aus dem Omentum (Metastase)	A*02-positiv	31.03.2009	4,5
S4	Netz	Adeno-squamöses Karzinom des Corpus Uteri G3*	A*02-negativ	13.05.2009	1,0
P1	OvCa	Papillär-seröses Adenokarzinom der Ovarien G1*	n.b.	26.05.2009	0,3
B1	OvCa	Maligner Müller'scher-Mischtumor G3*	A*02-negativ	27.05.2009	1,0
G1	OvCa	Seröses-endometroides Adenokarzinom der Ovarien G2*	A*02-negativ	29.05.2009	3,0
R1	Netz	Endometroides Stromasarkom G3*	A*02-positiv	24.06.3009	3,6
S5	n.b.	Endometroides Adenokarzinom der Ovarien G2*	A*02-positiv	30.06.2009	2,0
J1	Netz	Papillär-seröses Adenokarzinom der Ovarien G2-3*	n.b.	25.08.2009	1,7

*G1 bzw. G3: Differenzierungsgrade des Tumorgewebes; G1 differenziert, G3 wenig differenziert, n.b.= nicht bekannt.

E Ergebnisse und Diskussion zur MHC-Liganden-Analyse

Tabelle 38: Durch Edman-Abbau ermittelte Ausbeuten der MHC-Moleküle nach MHC-Ligandenaufreinigung.

Patienten-Identifikation	Tumor [g]	HLA Klasse I-Moleküle [pmol]	HLA Klasse II-Moleküle [pmol]	Klasse I Liganden	Klasse II Liganden
HBL	10,2	2000	60	65	n.a.
ASZ	16,9	4000	1300	18	n.a.
H1	2,4	n.d.	n.d.	n.a.	n.a.

n.d.= nicht detektierbar, n.a.= nicht analysiert

Wie aus den beiden Tabellen hervorgeht, variierten die Tumormassen der verwendeten Primärgewebe stark. So konnten nur für die beiden größten Tumore HBL und ASZ überhaupt MHC-Moleküle beim Edman-Abbau detektiert werden. In den beiden Fällen sieht es so aus als bestünde eine Korrelation zwischen der Tumormasse und der Menge an isolierten MHC-I-Molekülen. In früheren Arbeiten der Abteilung Immunologie (Müller M. 2008) konnte jedoch gezeigt werden, dass meist weder ein Zusammenhang zwischen Tumormasse und isolierten MHC-Molekülen, noch zwischen der Ausbeute der MHC-Moleküle und der Anzahl der identifizierten HLA-Liganden besteht. Für den Tumor H1 konnten weder MHC-I- noch MHC-II-Moleküle mittels Edman-Abbau detektiert werden. Mit den übrigen aufgereinigten Proben wurde diese Analyse nicht durchgeführt, da man relativ viel Probenmaterial benötigt und die Sensitivität der Methode zu gering für die Probenmenge ist. Zur Analyse des Tumors H1 bleibt anzumerken, dass hier weder bei einem Übersichtslauf (MS1-Experiment) doppelt geladene „Peaks“ erkennbar waren, die auf protonierte Peptid-Fragmente hinwiesen, noch in einem Tandem-MS Lauf auswertbare Peptid-Spektren aufgenommen werden konnten. Nun könnte man vermuten, dass dies an der zu geringen Tumormasse von 2,4 g liegt. Die Übersichtsläufe der Proben R1 und S3 zeigten hingegen viele doppelt geladene „Peaks“ obwohl ihre Tumormassen mit 3,6 g und 4,5 g etwa in der gleichen Größenordnung lagen wie die von H1. Dies lässt darauf schließen, dass H1 entweder ein Tumor war, auf dem die MHC-Moleküle stark herunter reguliert waren oder aber, dass es Probleme bei der MHC-Aufreinigung gab. Generell muss zu den Tumorproben angemerkt werden, dass diese extrem viel Fettgewebe enthielten, speziell wenn das Gewebe aus Netzmetastasen stammte. Dieses Fettgewebe verursachte in den meisten MHC-Präparationen eine dicke Lipidschicht, die auch nach dem Ultrazentrifugations-Schritt nicht vollständig entfernt werden konnte. Diese Lipide könnten Einfluss auf die anschließende Immunpräzipitation genommen haben. Zu der geringen Anzahl an für ASZ identifizierten Klasse I-Peptiden bleibt anzumerken, dass nur die Fraktion der von BB7.2 eluierten Säule (HLA-A*02-Moleküle) gemessen wurde. Die Intensität dieser Probe im MS/MS-Lauf war deutlich geringer als die der HBL-Probe. Zudem

ist die Analyse der Spektren noch nicht abgeschlossen. Die Proben der Klasse II-Liganden wurden bisher weder durch LC-MS gemessen noch ausgewertet.

E.1.3 Ergebnisse der Analyse des Tumors HBL

Die Datenaufnahme der hier gezeigten Daten erfolgte nach Kapitel B.5.9 mit einem Q-ToF-Massenspektrometer. Es wurde zunächst ein MS-Experiment ohne Fragmentierung und anschließend ein Tandem-MS-Experiment durchgeführt. Die Interpretation der MS/MS-Spektren erfolgte nach der in Kapitel B.5.9.6 beschriebenen Methode.

Eine Schwierigkeit, die bei der Auswertung der Quellproteine auftritt, besteht darin, dass nicht jeder Ligand nur einem Quellprotein zugeordnet werden kann. Häufig resultieren mehrere Quellprotein-Zuordnungen aus ähnlichen Proteinen. Zu letzteren zählen entweder verschiedene Isoformen eines Proteins oder verschiedene Proteine mit ähnlicher Funktion, Lokalisation oder Struktur wie beispielsweise verschiedene ATPasen oder ribosomale Proteine. Um den Fehler bei der Vernachlässigung alternativer Quellproteinvarianten konsistent zu halten und eine sinnvolle Auswertung der Daten vorzunehmen, wurde grundsätzlich als Quellprotein dasjenige mit der kleinsten GeneID in der NCBI-Datenbank Entrez Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>) (Maglott et al. 2005) ausgewählt.

In der folgenden Tabelle sind nun sämtliche aus der HBL-Tumorprobe identifizierten Peptid-Sequenzen und ihre zugehörigen GeneIDs bzw Quellproteine dargestellt. Hierbei sind die Quellproteine, die man als Haushaltsgene bezeichnet, weiß unterlegt. Quellproteine, für die in der Literatur eine Verbindung zur Tumorgenese oder Prädisposition für Tumorerkrankungen festgestellt wurde sind gelb unterlegt. Rot unterlegt sind Quellproteine, die als etablierte Tumorantigene bekannt sind oder aber wegen ihrer tumorspezifischen Überexpression bereits Zielmoleküle der klinischen Forschung darstellen.

Eine ausführliche Beschreibung der gelb und rot unterlegten Quellproteine und ihrer Tumorassoziation findet sich im folgenden Abschnitt.

E Ergebnisse und Diskussion zur MHC-Liganden-Analyse

Tabelle 39: Identifizierte HLA-Liganden aus der HBL-Tumorprobe.

Die HLA-Restriktion stammt aus früheren Versuchen, wenn das Peptid schon einmal auf einer typisierten Probe gefunden wurde oder sie wurde mittels SYFPEITHI vorhergesagt. Selbstproteine sind weiß unterlegt. Gelb sind Proteine unterlegt, die in Verbindung mit Tumorgenese oder Timorprädisposition stehen, Rot unterlegt sind etablierte Tumorantigene und Zielmoleküle der klinischen Tumorforschung.

Peptid-Sequenz	HLA-Restriktion	Gene ID	Quellprotein
APEEHPVLL	B*07	60	ACTB (actin, beta)
APRGKSGAAL	B*0702	142	PARP-1 (poly (ADP-ribose) polymerase1)
APRTVALTA	B*0702	3115	HLA-DPB1 (MHC II, DP beta 1)
APSPRPLSL	B*0702	126321	C19orf28 (chrom 19 orf 28)
APYSRPKQL	B*0702	10189	ALY (THO complex 4)
DASKVVTVF	B*0702	9948	WDR1 (WD repeat domain 1)
DSERQNQEY	A*01	3880	KRT19 (keratin 19)
DTDHYFLRY	A*01	51604	PIGT (phosphatidylinositol glycan)
DVIRLIMQY	B*35	55234	SMU1 (smu-1 suppressor of mec-8 and unc-52 homolog (C. elegans))
FPANNIVKF	B*0702	6745	SSR1 (signal sequence receptor, alpha)
FPEEDKKTY	B*35	4718	NDUFC2 (NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, subcomplex 2)
GARPAPGAQA	A*03	8532	CPZ (carboxypeptidase Z)
GPRGWLVL	B*07	712	C1QA (complement component 1, q subcomponent, A chain)
GPRKGGRI	B*0702	28974	C19orf53 (chrom 19 orf 53)
GPRTAALGLL	B*0702	5955	RCN2 (reticulocalbin 2)
HPDEPLYSF	B*0702	933	GTF3C3 (general transcription factor IIIC)
HPTSVISGY	B*35	6950	TCP1 (t-complex 1)
HTDILKEY	A*01	56986	DTWD1 (DTW domain containing 1)
IPRAALLPLL	B*07	5654	HTRA1 (HtrA serine peptidase 1)
IPTKQTQTF	B*0702	3306	HSPA2 (heat shock 70kDa protein 2)
ITAPPSRVL	A*02	6319	SCD1 (stearoyl-CoA desaturase)
KPSKDGVTV	B*0702	8544	PIR (pirin (iron-binding nuclear protein))
KTESHHKAKGK	A*03	3012	HIST1H2ae (histone 1, H2ae)
KYFDEHYEY	Cw*07	1164	CKS2 (CDC28 protein kinase regulatory subunit 2)
LLDIRSEY	A*01	311	ANXA11 (annexin A11)
LPAKILVEF	B*07	11130	ZWINT (ZW10 interactor)
LPHLADLVSY	B*35	7421	VDR (vitamin D receptor)
LPRNEADEL	B*0702	8542	APOL1 (apolipoprotein L 1)
LPRTDYSF	B*07	3113	HLA-DPA1 (MHC II, DP alpha 1)
LPTEPPYTAY	A*01	7458	EIF4H (eukariotic translation initiation factor 4H)
LPYNHQHEY	A*01	9415	FADS2 (fatty acid desaturase 2)
LTDDGNKWLY	A*0101	5708	PSMD2 (proteasome 26S subunit, non-ATPase, 2)
MPVGPDAILRY	B*35	7917	BAT3 (HLA-B associated transcript 3)
NAIHAILLY	B*35	1374	CPT1A (carnitine palmitoyltransferase 1A (liver))
NPFHWGEVEY	B*35	84188	FAR1 (fatty acyl CoA reductase)
NTDSPLRY	A*01	3921	RPSA = OFA-iLR(ribosomal protein SA = oncofetal Ag immature LR)
NTEEEGLKY	A*01	9774	BCLAF1 (BCL2-associated transcription factor 1)

E Ergebnisse und Diskussion zur MHC-Liganden-Analyse

NVADLHEKY	A*03	5693	PSMB5 (proteasome subunit, beta type, 5)
NVHDIMVSF	A*03	55164	SHQ1 (SHQ1 homolog (S. cerevisiae))
NVIRDAVTY	A*03	8294	HIST1H4I (histone 1, H4i)
NVVKLLGEQY	A*03	5977	DPF2 (D4, zinc and double PHD fingers family 2)
QENGPGGKGR	A*03	53820	DSCR6 (Down syndrome critical region gene 6)
QLYWSHPRK	A*03	6235	RPS29 (ribosomal protein S29)
RIFAPNHVVAK	A*0301	6142	RPL18A (ribosomal protein L18a)
RLFVGSIPK	A*0301	10236	HNRDPR (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R)
RLRLGGAAL	A*02	754	PBF (pituitary tumor-transforming 1 interacting protein)
RMRGPAQAK	A*03	56951	C5orf15 (chrom 5 orf 15)
RPAGLPEKY	B*35	6288	SAA1 (serum amyloid A1)
RPKKPGQSF	B*0702	23350	SR140 (U2-associated SR140 protein)
RPRHQGVMV	B*0702	58	actin, alpha 1, skeletal muscle
RPRKAFLLLL	B*07	9601	PDIA4 (protein disulfide isomerase family A, member 4)
RPSGPSKAL	B*0702	372	ARCN1 (archain 1)
RPSTSRSL	B*0702	7431	VIM (vimentin)
RVKLPSGSKK	A*03	6132	RPL8 (ribosomal protein L8)
RVMAPRALL	B*0702	3107	HLA-C (MHC I,C)
RVTYPAQAK	A*03	6185	RPN2 (ribophorin II)
SVDPKNYPK	A*03	3553	IL1B (interleukin 1, beta)
SVNGKVLSK	A*03	23420	NOMO1 (NODAL modulator 1)
TVDQVKDLY	A*01	1356	CP (ceruloplasmin (ferroxidase))
VMAPRLLLL	B*0702	3105	HLA-C (MHC I,C)
YPDRIMNTF	B*0702	7280	TUBB2A (tubulin, beta 2A)
YPFKPPKVTF	B*35	7324	UBE2E1 (ubiquitin-conjugating enzyme E2E 1)
YTDHGSDHHY	A*01	10179	RBM7 (RNA binding motif protein 7)

E.1.3.1 Quellproteine mit Verbindung zur Tumorgenese

Der **THO complex 4** ist ein im Zellkern lokalisiertes Protein, das als molekulares Chaperon fungiert. Es hat Funktionen in der Dimerisation und Bindung von DNA und als mRNA-Exportfaktor. ALY ist ein physiologisches Ziel der PI3-Kinase und eine Phosphorylierung durch Akt aktiviert nicht nur den mRNA-Transport sondern auch die Zellproliferation (Okada et al. 2008). Zudem ist ALY an der T-Zell-Aktivierung und auch an der Aktivierung von Onkogenen beteiligt (Mertz et al. 2007).

Das Protein *phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class T (PIGT)*, das an der Phosphatidylinositolglykan (GPI)-Anker-Biosynthese beteiligt ist, ist Teil der GPI-Transamidase. PIGT ist im endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert und verantwortlich für den Transfer von GPI-Einheiten auf Proteine. Studien zeigten eine erhöhte mRNA-Kopienzahl von PIGT im Zervixkarzinom (Scotto et al. 2008).

Reticulocalbin 2 (**RCN2**) ist ein Kalzium-bindendes Protein, das im ER lokalisiert ist. Studien zeigten eine lineare Korrelation der Expression von RCN2 mit der Tumormasse in Brustdrüsen von BALB-neuT-Mäusen (Cavallo et al. 2005).

T-complex 1 (**TCP1**) ist ein molekulares Chaperon, das zum TCP1-Ring-Komplex gehört, der bei der Faltung von Proteinen beteiligt ist. Dieser Komplex faltet verschiedene Proteine, einschließlich Actin und Tubulin. Es konnte gezeigt werden, dass TCP1 in Colonkarzinom überexprimiert wird und eine Rolle in der Tumor-Progression spielt (Coghlin et al. 2006).

Die Serin Peptidase 1 (**HTRA1**) ist ein sekretiertes Enzym, das die Verfügbarkeit von Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (IGFs) reguliert. Es wird vermutet, dass HTRA1 auch eine Rolle beim Zellwachstum spielt. Eine Studie zeigte eine Herunterregulierung der HTRA1-Genexpression in OvCa im Vergleich zu Normalgewebe und es wird vermutet, dass diese Gene als Tumorsuppressoren agieren (Narkiewicz et al. 2008).

Heat shock 70kDA protein2 (**HSPA2**) gehört zur Familie der HSP70-Chaperone und spielt eine zentrale Rolle in der Spermatogenese. Neben anderen Mitgliedern der HSP70-Familie spielt auch HSPA2 eine bedeutende Rolle beim Überleben und Wachstum von Tumorzellen (Daugaard et al. 2005).

Der Vitamin D3 Rezeptor (**VDR**) gehört zur Familie der *trans-acting transcriptional regulatory factors* und zeigt Ähnlichkeit mit Steroid- und Thyroidhormonrezeptoren. Nachgeschaltete Zielmoleküle des VDR spielen hauptsächlich eine Rolle im Mineralstoffwechsel, jedoch reguliert der Rezeptor auch andere Stoffwechselwege, die im Zusammenhang mit der Immunantwort oder der Tumorgenese stehen. Eine Studie konnte zeigen, dass ein Polymorphismus in VDR mit einer verbesserten Prognose für OvCa-Patientinnen assoziiert werden kann (Tamez et al. 2009).

Das Gen *HLA-B associated transcript3* (**BAT3**) ist im Gencluster der *human major histocompatibility complex class III* (MHC-III) lokalisiert und kodiert für ein nukleares Protein, das von Caspase 3 gespalten wird und in der Kontrolle der Apoptose eine Rolle spielt. Es konnte gezeigt werden, dass BAT3 von Tumorzellen freigesetzt werden kann und dann an den NK-Zellrezeptor NKp30 bindet und so NK-Zellen aktiviert. BAT3 sorgt somit für die Tumorabstoßung in einem Tiermodell für Multiples Myelom (Pogge et al. 2007).

Ribophorin II (**RPN2**) ist ein Membranprotein, das ausschließlich im rauhen ER exprimiert wird. RPN2 ist Teil eines N-Oligosaccharyl-Transferasekomplexes, das an der Glykosylierung von Proteinen beteiligt ist. Durch eine Herunterregulierung mit RPN2-siRNA konnte eine reduzierte Glykosylierung auf Tumorzellen und eine hiermit verbundene erhöhte Sensitivität einer Mammakarzinom-Zelllinien gegenüber Docetaxel festgestellt werden (Honma et al. 2008).

E.1.3.2 Etablierte Tumorantigene und klinische Zielmoleküle

Poly(ADP-ribose)Polymerase1 (**PARP1**) ist ein Chromatin-assoziiertes Enzym, das an der Poly(ADP-ribosyl)ierung verschiedener nuklearer Proteine beteiligt ist. Dadurch nimmt es Einfluss auf zahlreiche zelluläre Prozesse wie Differenzierung, Proliferation und Tumor-Transformation. Während der Apoptose wird PARP1 durch Caspase-3 und -8 gespalten (Okamoto et al. 2000). Durch eine Coaktivierung von *hypoxia-inducible factor 1* (HIF-1) trägt PARP1 zu einem besseren Überleben und Wachstum der Tumorzellen bei (Elser et al. 2008). So wird bereits über den Einsatz von PARP1-Inhibitoren als begleitende Therapieoption zu Chemo- und Strahlentherapie bei Krebspatienten diskutiert (Peralta-Leal et al. 2008).

Keratin 19 (**KRT19**) gehört zur Familie der Keratine, ist verantwortlich für die strukturelle Integrität von Epithelzellen und wird vor allem im Periderm exprimiert. Allerdings ist KRT19 auch ein etabliertes Tumorantigen, das zur Unterscheidung zwischen Normal- und Tumorgewebe vieler Tumorentitäten verwendet wird (Ouellet et al. 2005; Raphael et al. 1994; Trask et al. 1990). In *oral squamous cell carcinoma* (OSCC) korrelierte eine erhöhte KRT19-Expression mit geringerem Differenzierungsgrad des Tumors und schlechterer Prognose (Zhong et al. 2007), während in Brustkrebs-Patientinnen das Fehlen einer KRT19-Expression mit höherem Risiko für ein Rezidiv korrelierte (Parikh et al. 2008).

Stearyl-CoA desaturase (**SCD**) ist ein Enzym, das eine limitierende Rolle im Fettstoffwechsel spielt. SCD kontrolliert das Verhältnis von Ölsäure und Stearinsäure, das wiederum in Zusammenhang mit der Regulation von Zellwachstum und Differenzierung steht. Studien, die SCD-siRNA in Tumorzelllinien einbrachten, zeigten ein reduziertes Tumorwachstum und erhöhte Apoptoserate (Morgan-Lappe et al. 2007; Scaglia and Igal 2008).

Pirin ist ein Eisen-haltiges nukleares Protein, das der Cupin-Superfamilie angehört. Es wird in allen Geweben des Körpers exprimiert und ist in punktförmigen subnuklearen Strukturen konzentriert. Pirin ist vermutlich ein transkriptionaler Cofaktor, der an der Regulation der

E Ergebnisse und Diskussion zur MHC-Liganden-Analyse

DNA-Transkription und Replikation beteiligt ist. Zudem steht er in Verbindung mit dem Raf-MEK-Erk-Signalweg, der eine zentrale Rolle in der Transformation durch Onkogene spielt. Inhibiert man hierbei MEK wurde eine erhöhte Expression von Pirin beobachtet (Bergman et al. 1999). In einer anderen Studie wurde ebenfalls eine erhöhte Expression von Pirin nach der Behandlung mit dem Chemo-Immunotherapeutikum Polysaccharid-K (PSK) beobachtet (Yoshikawa et al. 2004).

CDC28 protein kinase regulatory subunit 1 und 2 (CKS1/2) binden an die katalytische Untereinheit der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) und sind essentiell für deren biologische Funktion. Somit spielen diese beiden kleinen Proteine eine Rolle im Zellzyklus, speziell im Übergang von der Meta- in die Anaphase. Eine Überexpression von CKS1 und 2 wurde bereits in verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen (Kawakami et al. 2006; Uchikado et al. 2006; Urbanowicz-Kachnowicz et al. 1999) und mit einer schlechten Prognose unter anderem auch in OvCa-Patientinnen, assoziiert (Ouellet et al. 2005). Ein „Knock-down“ der CKS1-Expression in Prostatazellen verminderte das Wachstum und die Migrationsaktivität der Zellen, während ein „Knock-down“ der CKS2-Expression den programmierten Zelltod auslöste (Lan et al. 2008). Eine weitere Studie zeigte, dass eine erhöhte Genexpression von CKS1 zu verstärkter Progression von Blasenkarzinom beiträgt (Kawakami et al. 2007).

Das ribosomale Protein SA (**RPSA**) ist ein Laminin-Rezeptor mit hochkonservierter Proteinsequenz, was auf eine biologische Schlüsselfunktion hinweist. Bekannter ist dieses Protein jedoch unter dem Namen *oncofetal Ag immature laminin receptor (OFA-iLR)* bzw. 67 kD-Laminin-Rezeptor (67LR) oder 37 kD-Laminin-Rezeptor-Precursor (37LRP). OFA-iLR ist in vielen Tumorentitäten im Vergleich zum Normal-Gewebe stark überexprimiert (Coggin, Jr. et al. 1999; Diggle et al. 2003). Außerdem steigert eine Überexpression von RPSA die Invasivität und Migrationsfähigkeit in Tumorzellen (Chen et al. 1983). Bisher konnten zwei von RPSA-abgeleitete HLA-A*02-restringierte T-Zellepitope identifiziert werden. Peptidspezifische CTLs gegen diese Epitope waren in der Lage, RPSA-exprimierende Zelllinien und primäre Tumorzellen zu lysieren (Siegel et al. 2006).

Proteasome subunit, beta type 5 (PSMB5) ist eine Untereinheit des Proteasoms und für die ATP/Ubiquitin-abhängige Spaltung von Proteinen in Peptide zuständig. PSMB5 wurde als überexprimiertes Gen in Mammakarzinom im Vergleich zu Normalgewebe gefunden (Deng et al. 2007). Zudem wird PSMB5 mit der Resistenz gegen den Proteasominhibitor Bortezomib (einem neuen Wirkstoff für das Multiple Myelom) in Verbindung gebracht. Hierbei

wurde gezeigt, dass nach Behandlung mit Bortezomib eine Überexpression einer mutierten Variante von PSMB5 auftrat (Oerlemans et al. 2008).

Das Protein *pituitary tumor-transforming 1 interacting protein* (**PBF**) bindet an *pituitary tumor-transforming gene 1 protein* (PTTG1) und aktiviert so die Transkription von Wachstumsfaktoren in Fibroblasten. PBF wurde bereits als prognostischer Marker für Schilddrüsenkrebs beschrieben (Stratford et al. 2005), eine Überexpression dieses Proteins beeinflusst die Effizienz einer Behandlung mit radioaktivem Jod erheblich (Boelaert et al. 2007).

Serum amyloid A1 (**SAA1**) ist ein Edukt von Apolipoprotein, das hauptsächlich in Hepatozyten und unter Einfluss von inflammatorischen Zytokinen exprimiert wird. In Angehörigen von Colonkarzinom-Patienten, die eine genetische Prädisposition haben ebenfalls an Colonkarzinom zu erkranken, wurde eine erhöhte SAA1-Expression in der Darmschleimhaut festgestellt, so dass SAA1 eventuell schon als diagnostischer Marker interessant werden könnte (Hao et al. 2005). Zudem wurde SAA1 als potentieller Marker für den Übergang eines *carcinoma in situ* (CIS) zu invasivem Zervixkarzinom gefunden (Song et al. 2008b).

Vimentin ist ein Protein des Zytoskeletts, das eine bedeutende Rolle beim Erhalt der Zellform, der Integrität des Zytoplasma und Interaktionen des Zytoskeletts spielt. Somit ist Vimentin ein Selbstprotein, das in allen Zellen des Körpers exprimiert wird. In vielen Tumorentitäten wurde jedoch eine Überexpression von Vimentin beschrieben und so gilt Vimentin als diagnostischer und prognostischer Marker beim Nierenzellkarzinom (Kim et al. 2005; Moch et al. 1999; Pitz et al. 1987; Skinnider et al. 2005). Es ist aber auch als Autoantigen bei rheumatoider Arthritis bekannt (Bang et al. 2007; Mewar and Wilson 2006).

Das ribosomale Protein L8 (**RPL8**) ist ein Bestandteil der 60S-Untereinheit des Ribosoms und ist im Zytoplasma lokalisiert. Eine Überexpression von RPL8 wurde in *hepatocellular carcinoma* (HCC) beobachtet (Liu et al. 2007). In Melanom- und Gliom-Patienten wurden auch T-Helferzellen gefunden, die ein HLA-DR7-restringiertes Epitop von RPL8 erkannten (Swoboda et al. 2007).

Ceruloplasmin (**CP**) ist eine Ferroxidase, die an der Peroxidation von Fe(II)transferrin zu Fe(III)transferrin beteiligt ist. Mutationen in diesem Gen führen zu einer Eisen-Akkumulation und Gewebeschäden und werden mit Diabetes und neurologischen Fehlfunktionen in

E Ergebnisse und Diskussion zur MHC-Liganden-Analyse

Verbindung gebracht. CP wurde auch im Serum von Krebs-Patienten gefunden und wird für Prostatakarzinom-Patienten als neuer und zusätzlicher Marker neben PSA diskutiert (Fotiou et al. 2007). Auch im Serum von Pankreaskarzinom-Patienten wurden erhöhte Mengen an CP gefunden (Hanas et al. 2008).

E.1.4 Ergebnisse der Analyse des Tumors ASZ

Die Datenaufnahme und Interpretation der MS/MS-Spektren erfolgte wie für die Tumor-Probe HBL. Die Auswertung dieses Tandem-MS-Laufes ist noch nicht abgeschlossen. Es wurden bisher 18 Peptide und Quellproteine identifiziert, von denen vier eine Verbindung mit Tumorerkrankungen aufweisen und zwei bereits als klinische Zielmoleküle bekannt sind.

Tabelle 40: Identifizierte HLA-Sequenzen aus der ASZ-Tumorprobe.

Die HLA-Restriktion stammt aus früheren Versuchen, wenn das Peptid schon einmal auf einer typisierten Probe gefunden wurde oder sie wurde mittels SYFPEITHI vorhergesagt. Selbstproteine sind weiß unterlegt. Gelb sind Proteine unterlegt, die in Verbindung mit Tumorgenese oder Timorprädisposition stehen, Rot unterlegt sind etablierte Tumorantigene und Zielmoleküle der klinischen Tumorforschung.

Peptid-Sequenz	HLA-Restriktion	Gene ID	Quellprotein
AIVDKVPSV	A*02	22820	COPG (coatomer protein complex, subunit gamma)
ALADGVQKV	A*02	8542	APOL1 (apolipoprotein L, 1)
ALDSQVPKV	A*0201	89846	FGD3 (FYVE, RhoGEF and PH domain containing 3)
ALSDHHIYL	A*02	226	ALDOA (aldolase A, fructose-bisphosphate)
ALVDVLDQP	A*02	282616	IL28A (interleukin 28A (interferon, lambda 2))
ALVQADSPSA	A*02	252995	FNDC5 (fibronectin type III domain containing 5)
GLGPPGRSV	A*02	144108	SPTY2D1 (Suppressor of Ty, domain containing 1)
KLIDRTESL	A*0201	4046	LSP1 (lymphocyte-specific protein 1)
KLNPQQFEV	A*02	3703	STT3A (subunit of the oligosaccharyltransferase complex)
NLAENISRV	A*0201	5834	BPG (phosphorylase, glycogen; brain)
RLAEAQTYL	A*0201	439996	IFIT1L (interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1-like)
RMLPHAPGV	A*0201	3065	HDAC1 (histone deacetylase 1)
SLAEVLQW	A*02	84103	C4orf17 (chrom 4 orf 17)
TLADLVHHV	A*02	8295	TRRAP (transformation/transcription domain-associated protein)
VLLDYVGNVQ	A*02	51676	ASB2 (ankyrin repeat and SOCS box-containing 2)

E Ergebnisse und Diskussion zur MHC-Liganden-Analyse

Lymphocyte-specific protein 1 (LSP1) ist ein intrazelluläres F-Aktin-bindendes Protein, das in Lymphozyten, Neutrophilen, Makrophagen und Endothelzellen exprimiert wird. Es spielt eine Rolle bei der Motilität, Adhäsion und Migration dieser Zellen. Mutationen im LSP1-Gen stehen im Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko an Mamma- und Ovarialkarzinom zu erkranken (Gates et al. 2009; Huijts et al. 2007; Ripperger et al. 2009).

Die Glycogenphosphorylase (**BGP**) wird hauptsächlich im Gehirn exprimiert und formt ein Homotetramer, das die enzymatisch aktive Form bildet. In NSCLC wurde eine Überexpression von BGP festgestellt, die zugleich mit einer schlechten Prognose korreliert (Lee et al. 2006).

Das Apolipoprotein L, 1 (**APOL1**) ist ein sekretiertes Lipoprotein, das an Apolipoprotein A-I bindet. Letzteres ist beim Aufbau von Cholesterylestern im Plasma beteiligt und fördert den Austritt von Cholesterol aus den Zellen. APOL1 spielt eine Rolle beim Austausch und Transport von Lipiden im gesamten Körper, sowie beim Rücktransport von Cholesterol von peripheren Zellen zur Leber. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von APOL1 zu Autophagie induziertem Zelltod führt (Wan et al. 2008). Da das hier identifizierte Peptid schon auf mehreren RCC-Tumoren gefunden wurde (Weinschenk et al. 2002), ist es nun Bestandteil einer Peptid-basierten Immuntherapie für RCC-Patienten (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. S. Stevanovic).

Die Histon-Deacetylase 1 (**HDAC1**) ist Teil des Histon-Deacetylase-Komplexes, der eine Schlüsselrolle bei der Genexpression spielt. HDAC1 interagiert aber auch mit dem Retinoblastom Tumorsuppressor-Protein und dieser Komplex spielt eine Schlüsselrolle bei der Kontrolle der Zellteilung und Differenzierung. HDAC1 spielt auch bei der Deacetylierung von p53 eine Rolle und nimmt auch hierdurch Einfluss auf Zellwachstum und Apoptose. In OvCa wurde eine Überexpression von HDAC 1 im Vergleich zu Ovarial-Normalgewebe festgestellt; ein „knock down“ von HDAC1 durch siRNA verhinderte das Wachstum von OvCa-Tumorzellen (Khabele et al. 2007). HDAC-Inhibitoren werden derzeit in klinischen Studien für verschiedene Tumorentitäten untersucht und auch für den Einsatz in OvCa-Patientinnen diskutiert (Graham et al. 2009; Zhu et al. 2008).

E.1.5 Zusammenfassung und Diskussion

Insgesamt konnten von beiden Tumorproben 78 HLA-Liganden identifiziert und Quellproteinen zugeordnet werden. Davon waren 53 Peptide von Selbstproteinen abgeleitet und 25 im weiteren Sinne Tumor „assoziiert“. 11 Peptide konnten Quellproteinen zugeordnet werden, die mit der Tumorgenese oder einer Prädisposition für Tumor-erkrankungen in Verbindung gebracht wurden. 14 der Peptide

waren von Quellproteinen abgeleitet, die bereits als etablierte Tumorantigene gelten oder aber Zielmoleküle der klinischen Tumorforschung darstellen.

Die Ausbeute an analysierten HLA-Liganden der beiden Tumorproben HBL und ASZ war zwar im Vergleich mit Tumoren anderer Tumorentitäten mit ähnlicher Masse vergleichbar gering, jedoch wurde in vielen OvCa eine extrem niedrige MHC-I-Expression beschrieben (Ge et al. 2003). Zur Auswahl der Quellproteine, die eine Assoziation mit Tumorgenese oder Tumor-Prädisposition besitzen, bleibt anzumerken, dass viele dieser Proteine bisher nur in ein oder zwei Publikationen in diesem Zusammenhang dargestellt wurden und man daher vorsichtig mit der Verwertbarkeit für den klinischen Einsatz sein muss. Bei den Quellproteinen mit spezifischer Überexpression in verschiedenen Tumorentitäten wäre es interessant, diese Überexpression auch in OvCa-Zelllinien und Primärgeweben nachzuweisen. Dasselbe gilt für die bereits etablierten Tumorantigene Keratin 19 und Vimentin, die bisher eher mit RCC und Schilddrüsenkarzinom in Verbindung gebracht wurden (Kim et al. 2005; Raphael et al. 1994).

Interessant sind auch die beiden Quellproteine RPL8 und RPSA, für die bereits T-Zellepitope gefunden wurden, die aber nicht mit den hier gefundenen identisch sind. Einige der oben beschriebenen Antigene scheinen auch spezifisch für andere Tumorentitäten zu sein (CP: Prostatakarzinom, PBF: Schilddrüsenkarzinom, PSMB5: Multiples Myelom). Daher könnten die gefundenen HLA-Liganden auch potentielle T-Zellepitope für die immuntherapeutische Behandlung anderer Tumorentitäten darstellen.

Um nun aber klinisch relevante T-Zellepitope in dieser Sammlung von HLA-Liganden zu identifizieren, müssen diese in funktionellen T-Zell-basierten Tests validiert werden. Dies geschieht derzeit im Rahmen einer von Janet Peper durchgeführten Diplomarbeit.

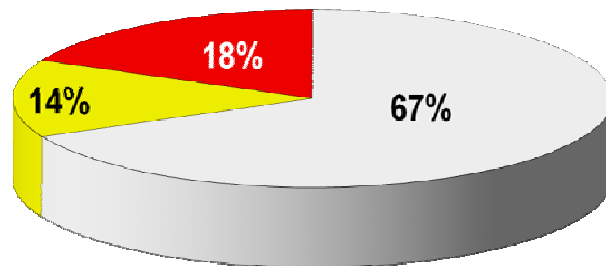


Abbildung 34: Prozentuale Verteilung der Quellproteine.

Selbstproteine sind in weiss, Proteine, die in Verbindung mit Tumorgenese oder Tumorprädisposition stehen in gel und, etablierte Tumorantigene und Zielmoleküle der klinischen Tumorforschung in rot dargestellt.

Zusätzlich sollen auch die übrigen Tumorproben, aus denen bereits die HLA-Liganden mittels Immunpräzipitation isoliert wurden, in LC-MS-Läufen analysiert werden. Die hieraus gewonnenen Daten könnten dann weitere wichtige Fragen beantworten,

- kommen einzelne HLA-Liganden in mehreren Tumorproben vor?
- kommen Tumor-assoziierte Quellproteine in mehreren Tumorproben vor?
- kommen verschiedene HLA-Liganden eines gleichen Quellproteins in mehreren Tumorproben vor?

E.2 Gezielte Suche nach L1CAM- und VEGF-abgeleiteten HLA-Liganden

Für die gezielte Suche nach *in silico* vorhergesagten L1CAM- und VEGF-abgeleiteten HLA-Liganden in einer Primärgewebe-Probe wurden die bereits im Kapitel D.3.1 und D.3.2 beschriebenen L1CAM- und VEGF-Peptide verwendet, die eine T-Zellantwort auslösen konnten.

E.2.1 Kalibrierung mit den modifizierten synthetischen Peptiden

Die synthetischen L1CAM- und VEGF-abgeleiteten Peptide wurden einzeln nach dem in Kapitel B.3.9 beschriebenen Protokoll N-terminal mit dNIC modifiziert und die Lysinreste mit GUA geblockt. Eine Übersicht über die Peptide wie auch das zugehörige Molekulargewicht, die Masse in zweifach geladenem Zustand, Retentionszeit auf der HPLC und die Intensität des aufgenommenen Spektrums ist in Tabelle 41 aufgeführt.

Tabelle 41: Retentionszeiten und Intensitäten der mit dNIC modifizierten Peptide

TAA	Peptid-Sequenz	Molekulargewicht [g/mol]	Molekulargewicht + dNic [g/mol]	M2+ [Da]	Retentionszeit [min]	Intensität
L1CAM	LLANAYIYVV	1137,65	1247,65	624,38	89,38	1640
	LLLRRWQPPL	1134,69	1244,69	622,85	74,09	4760
VEGF	LLSWVHWSL	1139,61	1249,61	625,36	84,34	1960
	FLLSWVHWSL	1286,68	1396,68	698,90	93,26	672

Um die Retentionszeit der Peptide zu bestimmen wurde eine Menge, die 10 pmol vor der Modifizierung entspräche, für einen LC-MS/MS-Lauf eingesetzt. Auf Grund des nicht zu vermeidenden Verlustes während der Modifizierung lag die tatsächlich eingesetzte Menge allerdings darunter. Alle vier Peptide konnten detektiert und über ihre Fragmentspektren

E Ergebnisse und Diskussion zur MHC-Liganden-Analyse

eindeutig identifiziert werden. Mit Hilfe der in diesem ersten Versuch gemessenen Intensitäten wurde ein neuer Peptid-Mix erstellt, in dem die Verhältnisse der Peptid-Konzentrationen der Peptide zueinander antiproportional zum Verhältnis der in diesem Versuch gemessenen Intensitäten ist. Nach Anpassung der Peptid-Konzentrationen wurde der Peptid-Mix erneut gemessen um zu bestätigen, dass alle Peptide mit genügender Intensität gemessen werden können.

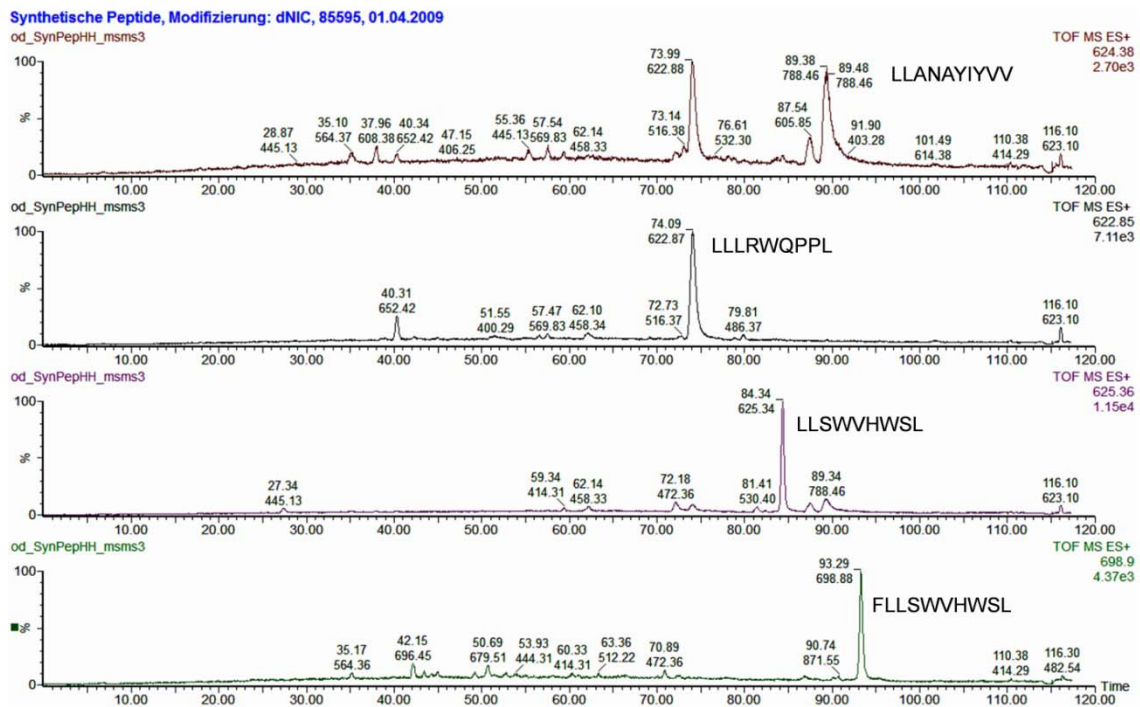


Abbildung 35: Massenspuren der Peptide nach angepasster Konzentration.

Die „Peaks“ zeigen die Retentionszeiten und Intensitäten der dNic-modifizierten Peptide nach Anpassung der Konzentration. Die Identität der einzelnen Peptide wurde durch ein Fragmentspektrum bestätigt.

In Abb. 35 sind die Massenspuren der Peptide nach angepasster Konzentration dargestellt. Die „Peaks“ zeigen die Signale der synthetischen L1CAM- und VEGF-abgeleiteten Peptide mit dNic-modifiziertem N-Terminus. Am rechten Rand des Spektrums sind die zweifach geladenen Massen der Peptide und die Intensität vermerkt. Die x-Achse gibt die Retentionszeit in Minuten an. So ergeben sich Retentionszeiten von 89,38 min [LLANAYIYVV], 74,09 min [LLLRLWQPPL], 84,34 min [LLSWVHWSL] und 93,29 min [FLLSWVHWSL]. In der ersten Massenspur sieht man zwei „Peaks“, wobei der Peak bei 73,99 min auf eine Verunreinigung zurückzuführen ist.

E.2.2 Suche in der Tumorprobe ASZ

Die bereits im Kapitel E 1.4 analysierte Tumorprobe ASZ wurde hier nun verwendet um nach der *predict-calibrate-detect*-Methode (Kap. B.5.9.6) nach den zuvor beschriebenen Peptiden zu suchen. Hierzu wurden die HLA-Liganden der Tumorprobe ASZ mit Nic modifiziert und anschließend mit den synthetischen dNic-modifizierten Peptiden gemischt und gemeinsam in das LC-MS-System eingespritzt. Um die Retentionszeiten der synthetischen Peptide, die von äußeren Umständen, wie zum Beispiel der Temperatur, abhängig sind, möglichst genau unter den Bedingungen des gemischten Laufes zu bestimmen, wurde der Peptid-Mix mit den synthetischen Peptiden direkt vor dem gemischten Lauf noch einmal in einem LC-MS/MS-Lauf gemessen. Um das Prinzip dieses Experiments zu erläutern ist in Abbildung 3 ein idealisiertes Ergebnis eines solchen Experimentes dargestellt. Hierbei sollte man Peptide, die sowohl in der Tumorprobe als auch in den synthetischen Peptiden vorhanden waren, als Doppelpeak erkennen. Die identischen Peptide aus unterschiedlichen Quellen sollten zur selben Zeit eluieren, sich jedoch in ihrer Masse um den Unterschied zwischen Nic und dNic unterscheiden ($\Delta m = 4,03$ Da).

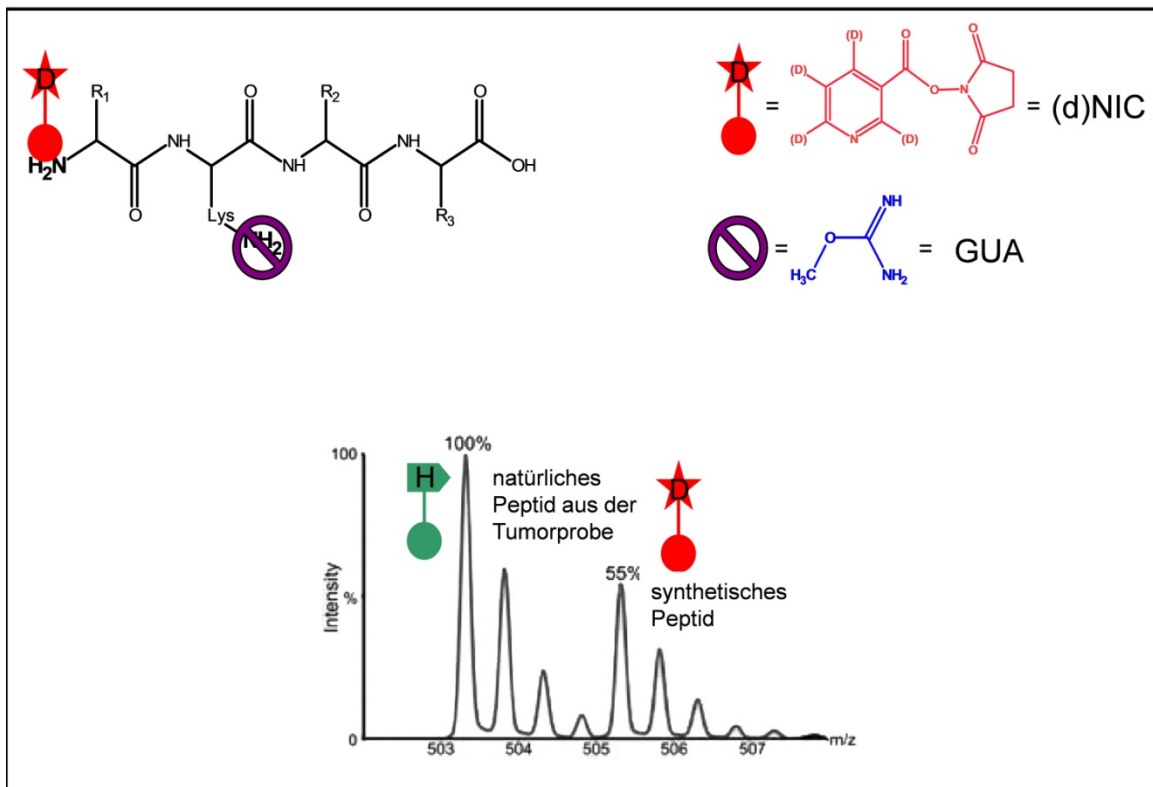


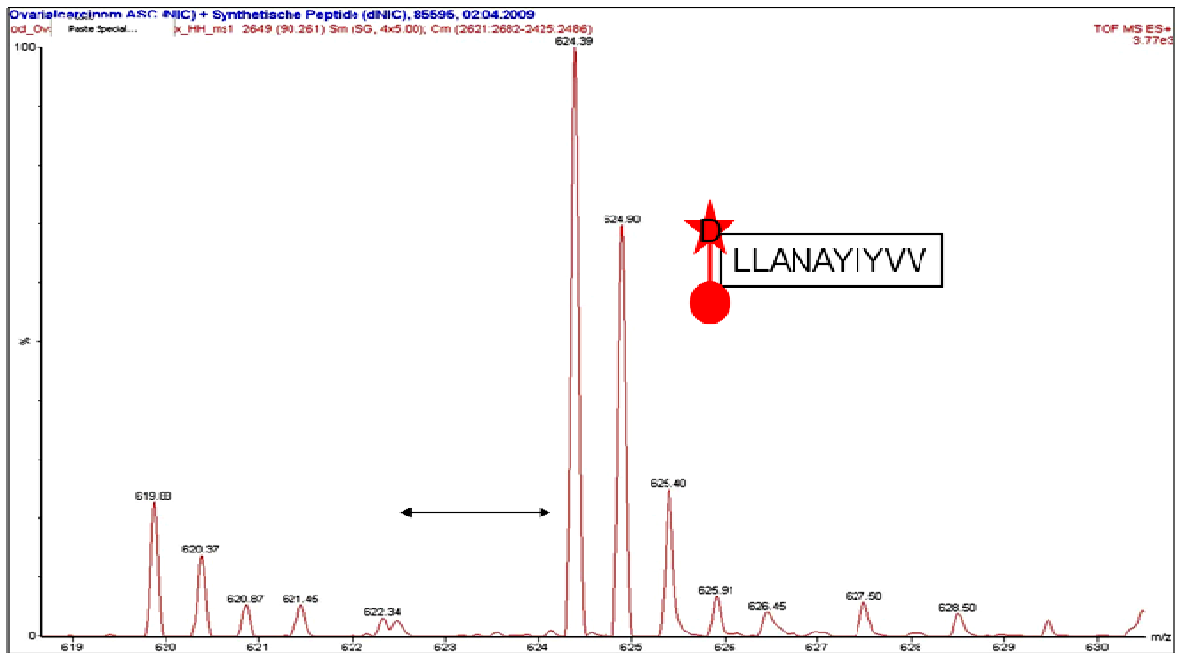
Abbildung 36: Unterschiedliche Modifizierung von Peptiden mit Nic und dNic.

Aus einer Tumorprobe aufgereinigte HLA-Liganden werden mit Nic, synthetische Peptide mit dNic modifiziert. In einem anschließenden gemischten LC-MS-Lauf werden gleiche Peptide mit unterschiedlicher Markierung zur gleichen Zeit eluiert, unterscheiden sich aber durch ihre Massen (Lemmel et al. 2004).

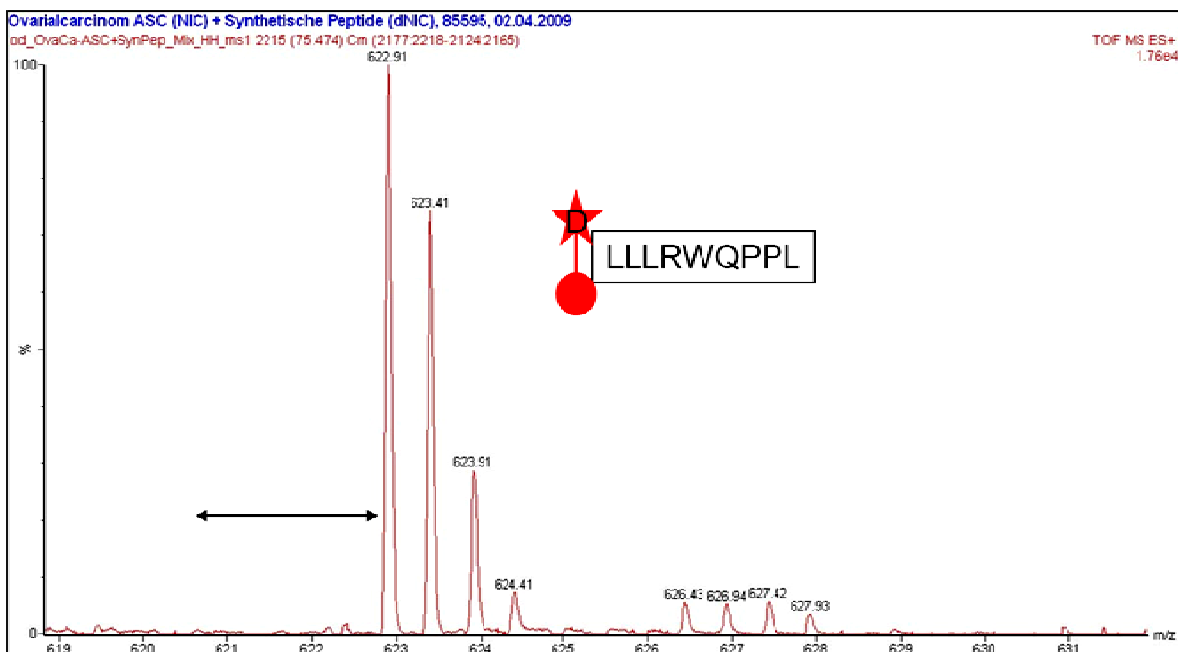
E Ergebnisse und Diskussion zur MHC-Liganden-Analyse

Dieser Methode folgend wurde daher in dem gemischten LC-MS-Lauf zu der Retentionszeit, die das synthetische Peptid im vorangegangenen LC-MS/MS-Lauf hatte, sowohl nach der Masse des dNlc-markierten synthetischen Peptids gesucht als auch nach dem Nic-modifizierten natürlichen Peptid. Für den Fall, dass die Peptide doppelt geladen vorkommen müsste das natürliche Peptid seinen Peak genau 2 Da vor dem synthetischen Peptid zeigen.

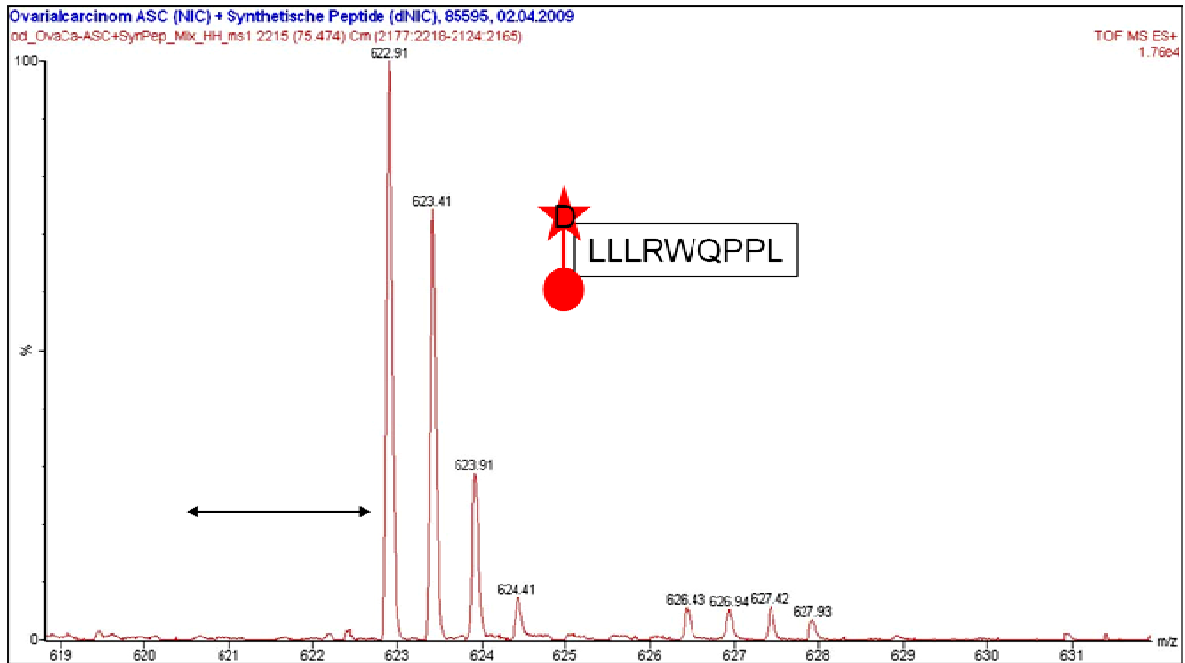
A



B



C



D

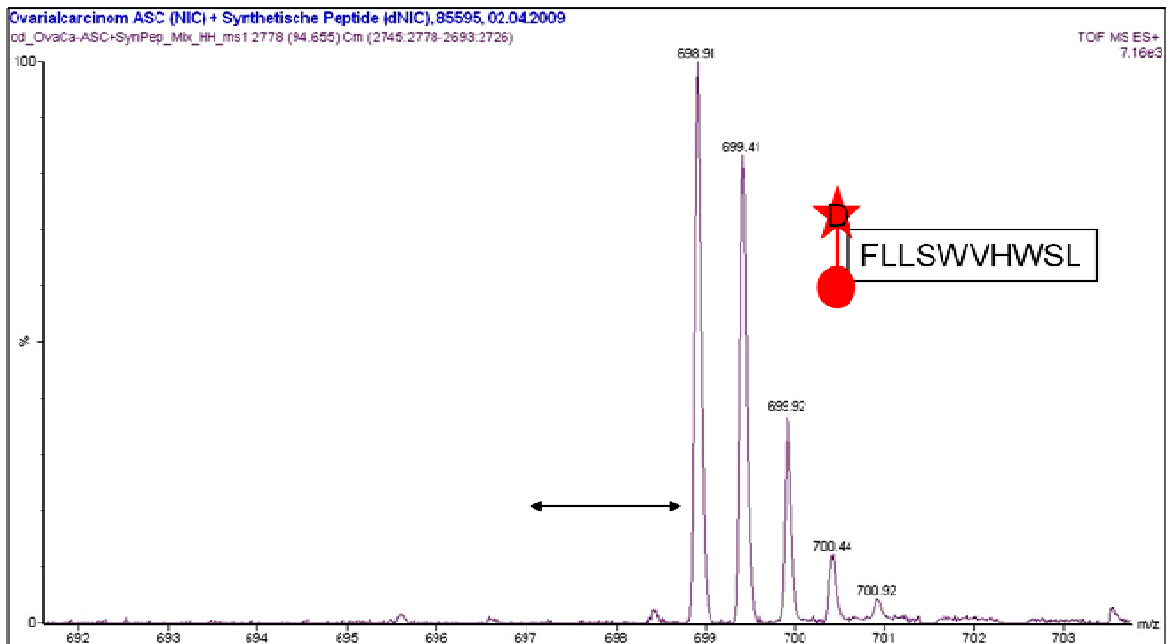


Abbildung 37: Spektren des gemischten LC-MS Laufes.

Detektion der für die synthetischen Peptide LLANAYIVV (A), LLLRWQPPL (B), LLSWVHWSL (C), FLLSWVHWSL (D) erwarteten Massen, aber nicht der Massen der natürlich präsentierten Peptide.

In Abb. 37 A-D sind die Spektren des gemischten LC-MS-Laufes zu den Retentionszeiten der zuvor gemessenen synthetischen Peptide dargestellt. Die Y-Achse zeigt die Intensität der gemessenen „Peaks“ an, während auf der X-Achse das Masse-/Ladungs-Verhältnis aufgetragen ist. Man sieht die Isotopenpeaks der zweifach geladenen, dNic-modifizierten

synthetischen L1CAM- und VEGF-abgeleiteten Peptide. Die natürlichen Nic-modifizierten Peptide müssten genau 2 Da vor dem Peak der synthetischen Peptide zu finden sein. Für keines der 4 Peptide ist hier ein Signal zu erkennen.

E.2.3 Zusammenfassung und Diskussion

Die einfachste Erklärung für das Scheitern dieses Versuchs wäre, dass der Tumor ASZ überhaupt kein L1CAM und VEGF exprimiert und somit auch keine Peptide aus diesen TAAs prozessieren kann. Diese Möglichkeit konnte aber zumindest für L1CAM widerlegt werden. Das Proteinlysate des Tumors ASZ wurde auf einem mit L1CAM-spezifischem Antikörper gefärbten Westernblot aufgetragen und zeigte ein deutliches Signal für L1CAM (Kap.C 1.3.3, Abb. 4).

Weiter wäre es möglich, dass die Peptide nicht wie vorhergesagt prozessiert werden und somit keine natürlich vorkommenden HLA-Liganden und T-Zellepitope darstellen. Diese Möglichkeit wurde jedoch zumindest für die Peptide LLANAYIYVV und LLSWVHWSL im vorangegangenen Ergebnisteil (Kap. D.3.1 und Kap. D.3.2) widerlegt. Hier konnten LLANAYIYVV-peptidspezifische Gedächtnis-T-Zellen in OvCa-Patientinnen nachgewiesen werden, und *in vitro* aktivierte LLSWVHWSL-spezifische T-Zellen erkannten unbeladene Zellen einer OvCa-Zelllinie. Dies schließt jedoch nicht aus, dass es sich bei den genannten Epitopen um individuelle HLA-Liganden handelt, die in im HLA-Ligandom des Tumors ASZ nicht vorhanden sind.

Eine weitere Erklärung für das Fehlen der „Peaks“ der L1CAM- und VEGF-abgeleiteten Peptide in den aus der Tumorprobe isolierten HLA-Liganden könnte eine natürliche Modifikation der Peptide sein. Speziell L1CAM ist ein stark glykosyliertes Protein, so dass die daraus prozessierten Peptide eventuell noch Reste dieser Glykosylierung tragen. Das würde bedeuten, dass die Peptide eine andere Masse als die vorhergesagte hätten und somit durch dieses Experiment nicht detektierbar wären.

Bei dieser Art von Experiment stellt sich generell die Frage der Quantifizierung der verglichenen Signale. Da aus Tumorproben isolierte HLA-Liganden ein Gemisch darstellen, in dem jedes Peptid in seiner individuellen Menge vorhanden ist, kann man diese nur schwer im richtigen Verhältnis zu den beigemischten synthetischen Peptiden setzen. Es wird versucht so viel Tumorprobe einzusetzen, dass die durchschnittliche Signalthöhe im Bereich der synthetischen Peptiden liegt. Wenn nun aber auf der Tumoroberfläche nach einem MHC/Peptid-Komplex mit sehr geringer Konzentration gesucht wird, wird diese Methode an ihre Sensitivitätsgrenze stoßen. Zusätzlich gibt es natürlich noch die gerätespezifische Sensitivitätsgrenze des Massenspektrometers, die bei ca. 100 fmol liegt. Neuere Massenspektrometer, wie die Orbi-Trap haben ihren Sensitivitätsbereich auf den einstelligen

fmol-Bereich ausgeweitet. Es wäre also interessant, das Experiment mit einem solchen Gerät der neueren Generation zu wiederholen.

F Ausblick

Bewertung der hier beschriebenen Methoden: Da die Validierung der sowohl *in silico* vorhergesagten als auch der auf OvCa-Primärgewebe identifizierten HLA-Liganden noch nicht abgeschlossen ist, kann man noch keine endgültige Aussage über die Effizienz der verwendeten Methoden zur Identifizierung und Validierung klinisch relevanter T-Zellepitope machen. Generell ist zu bedenken, dass beide Methoden mit erheblichem materiellem und instrumentellem Aufwand verbunden sind und nicht zwingend zu einem positiven Ergebnis führen. Wie gezeigt gibt es viele *in silico* vorhergesagte Peptide, die zwar eine IFN γ T-Zellantwort induzieren können, deren Prozessierung und Präsentation auf Tumorzellen jedoch schwer nachzuweisen ist. Weiter gibt es aber auch viel von Tumorgeweben eluierte HLA-Liganden, die keine IFN γ T-Zellantwort induzieren können und somit auch nicht als Kandidaten für eine therapeutische Peptidvakzine in Frage kommen. Eine elegante Möglichkeit ist sicher die auch in dieser Arbeit verwendete „predict-calibrate-detect“-Methode, bei der *in silico* vorhergesagte Peptide bekannter TAAs mit Hilfe differentieller Modifizierung massenspektrometrisch in aufgereinigten HLA-Liganden von Tumorgeweben gesucht werden. Jedoch ist auch hier eine gewisse Anzahl vorhergesagter Peptide und untersuchter Tumorproben nötig, um auf positive Ergebnisse zu stoßen. Eine größere Chance bei der Suche nach und Validierung von klinisch relevanten T-Zellepitopen gibt es also nur, wenn die Anzahl der untersuchten vorhergesagten Peptide bzw. die Anzahl der untersuchten Tumorproben möglichst groß ist. Vermutlich kann man den Erfolg zusätzlich durch die parallele Verwendung verschiedener Methoden steigern. Einen eindeutigen Beleg für die therapeutische Relevanz eines identifizierten T-Zellepitops kann jedoch immer nur eine klinische Studie erbringen.

Zusätzliche T-Zellepitope der ausgewählten TAAs: Die hier identifizierten T-Zellepitope könnten nach weiteren Validierungsschritten Bestandteil einer immuntherapeutischen, peptidbasierten Vakzine für OvCa-Patientinnen sein. Solch eine Vakzine müsste idealerweise mehrere Peptide aus unterschiedlichen Tumorantigenen umfassen. Somit kann verhindert werden, dass der Tumor Ausweich-Mechanismen entwickelt, mit denen er sich der Kontrolle durch das Immunsystem entzieht. Außerdem steigt die Wahrscheinlichkeit, dass die Vakzine einen großen Teil der vom Tumor tatsächlich exprimierten Antigene abdeckt. Diese Arbeit beschäftigte sich ausschließlich mit MHC-I restringierten T-Zellepitopen. Eine Vakzine müsste neben MHC-I-restringierten Peptiden jedoch auch Peptide enthalten, die auf MHC-II-Molekülen binden und eine CD4⁺-T_H-Immunreaktion induzieren, da diese eine wichtige Helferfunktion erfüllen und die Aufrechterhaltung einer CD8⁺-Antwort steigern (Bonehill et al. 2005). Außerdem müssten T-Zellepitope identifiziert

werden, die nahezu alle HLA-Typen abdecken, so dass die Vakzine nicht auf ein kleines Patientenkollektiv beschränkt bliebe.

Klinische Perspektive: Eine Alternative zur Vakzinierung mit einem Mix aus ubiquitär exprimierten TAA-abgeleiteten Peptiden wäre ein individualisiertes Vorgehen. Dabei wird jeder operierte Tumor auf die Expression bestimmter Tumorantigene charakterisiert und dann die Vakzine entsprechend zusammengestellt. Von Vorteil ist die erhöhte Wahrscheinlichkeit einer Wirksamkeit, jedoch gibt es zahlreiche Nachteile gegenüber einer im Voraus zusammengestellten Peptidvakzine. So sind Kosten- und Zeitaufwand enorm hoch und die Vergleichbarkeit der Vakzinen innerhalb einer Studie sowie das Monitoring sind kaum möglich. Darüber hinaus besteht Unsicherheit darüber, ob eventuelle Metastasen die nachgewiesenen Tumorantigene im Primärtumor überhaupt noch exprimieren.

Neben den TAAs, die die Vakzine abdecken soll, ist auch die Wahl des Adjuvanz sehr wichtig, da die Peptide in einem immunstimulatorischen Milieu präsentiert werden müssen. Die Auswahl an möglichen Adjuvantien ist sehr groß. Sie reicht von Zytokinen wie etwa GM-CSF und IFN- α , über TLR-Liganden (*toll-like-receptor*) wie CpG oder LPS bis hin zu Molekülen der TNF-Superfamilie wie CD40L (Kornbluth and Stone 2006); dagegen ist die Zahl der bereits klinisch zugelassenen Adjuvantien sehr gering. Welches Adjuvanz bei der Generierung tumorspezifischer T-Zellen am sinnvollsten ist, wird derzeit noch diskutiert.

Bisherige Vakzinierungsstrategien konnten zwar eine tumorspezifische T-Zellantwort generieren, jedoch kam es in nur seltenen Fällen zu einem klinischen Ansprechen. Als Hauptgrund dafür werden immunsuppressive Mechanismen im Tumormilieu verantwortlich gemacht. Neben der Aktivierung einer tumorspezifischen Immunreaktion gilt es daher, diese immunsuppressiven Mechanismen zu hemmen. Dies könnte zum Beispiel durch Gabe von Antikörpern geschehen, die Moleküle wie beispielsweise CTLA-4 und IL-10 hemmen oder die direkte Hemmung der Tregs durch Cyclophosphamide (Radojcic et al. 2010). Andererseits birgt die Blockierung immunsuppressiver Mechanismen ein hohes Risiko, da die Wahrscheinlichkeit einer Autoimmunreaktion ansteigt. Diese Gefahr gilt es mit dem Nutzen einer solchen Therapie auszuloten. Eine Lösung hierfür wäre die selektive Hemmung von TAA-spezifischen Tregs. Dies lässt sich jedoch mit den heute angewendeten Methoden noch nicht optimal realisieren.

Ein weiterer Diskussionspunkt ist der Zeitpunkt, an dem die Gabe einer peptidbasierten Vakzine am sinnvollsten wäre. Bisher wurden Vakzinierungsstudien oft bei Patienten in bereits weit fortgeschrittenem Karzinomstadien durchgeführt. Ob das klinische Ansprechen bei frühen Stadien größer ist, lässt sich somit nicht ausschließen. Dazu kommt, dass die Gabe von Chemotherapeutika das Immunsystem schwächt und somit auch die Erfolgsaussichten einer Vakzinierung verschlechtert. Demgegenüber scheint es als

gesichert, dass es bei Patienten, die nach einer Operation eine geringere Tumorlast haben (*minimal residual disease*), sinnvoll ist eine Tumorstimmung durchzuführen, da vereinzelte Tumorzellen und Metastasen dem Immunsystem eventuell besser zugänglich sind.

Dass tumorspezifische Vakzinen in Zukunft nur mit einer Kombination aus aktivierenden und hemmenden Bestandteilen zu einem effektiven klinischen Ansprechen führen, scheint aus den Erfahrungen der letzten Jahre als gesichert. Um welche Bestandteile es sich jedoch im Einzelnen handelt und welche Adjuvantien im jeweiligen Kontext mehr Vorteile bringen, bleibt noch abzuwägen.

G Zusammenfassung

Die Entwicklung einer Peptid-basierten Immuntherapie setzt neben der Auswahl geeigneter Tumor-assoziiertes Antigene (TAA) weiter die Identifikation daraus abgeleiteter T-Zellepitope voraus. Bei der Auswahl der Antigene sind eine möglichst hohe Tumorspezifität, eine hohe Expression des Antigens im Tumorgewebe, ein häufiges Auftreten auf verschiedenen Subtypen, eine funktionelle Assoziation mit dem malignen Phänotyp und schließlich die Immunogenität des Antigens maßgebend für die klinische Relevanz der davon abgeleiteten T-Zellepitope. Die T-Zellepitope müssen sich durch die Fähigkeit T-Zellen zu stimulieren und schließlich durch Prozessierung und Präsentation auf den Tumorzellen auszeichnen, um als therapeutisch einsetzbare T-Zellepitope validiert werden zu können.

Nach Literatur-Recherchen wurden nach oben genannten Kriterien 18 TAAs ausgewählt, deren Expressionsprofile anschließend auf OvCa-Zelllinien und –Primärgeweben analysiert wurden. Die Charakterisierung der OvCa-Zelllinien und -Primärgeweben ergab, dass bis auf ein TAA (NY-ESO-1) alle 17 untersuchten TAAs auf über 50% der untersuchten Zelllinien/Geweben exprimiert wurden. Weiter ergab sich, dass Zelllinien im Vergleich zu den untersuchten Primärgeweben eine reduzierte Antigenität aufwiesen.

Die Epitopvorhersage *in silico* von neun der zuvor untersuchten TAAs führte zu 80 HLA-A*02-restringierten Peptiden, von denen 24 eine peptidspezifische IFN γ T-Zellantwort induzieren konnten. Von den *in vitro* stimulierten T-Zelllinien waren neun in der Lage peptidspezifisch Zielzellen zu lysieren. Eine Validierung als T-Zellepitop für den möglichen Einsatz in einer Peptid-basierten Immuntherapie gelang für zwei L1CAM-abgeleitete und ein VEGF-abgeleitetes Peptid. In PBMCs zweier OvCa-Patientinnen wurden L1CAM-Peptid-spezifische Gedächtnis T-Zellen gefunden. Diese Gedächtnis T-Zellen zeigten keine Peptid-induzierbare Zytokinproduktion. Mit dem VEGF-Peptid konnten *in vitro* T-Zellen stimuliert werden, die in der Lage waren VEGF-exprimierende OvCa-Zellen zu lysieren. Dies belegt die natürliche Prozessierung und Präsentation des vorhergesagten VEGF-Peptids.

Bei der Untersuchung des HLA-Ligandoms zweier OvCa-Tumorproben mittels Immunpräzipitation der MHC-Moleküle und anschließender LC-MS-Analyse der eluierten MHC-Liganden wurden 78 Peptide identifiziert. 24 dieser Peptide wurden Quellproteinen zugeordnet, die mit der Prädisposition für eine Tumorerkrankung oder der Tumorgenese in

G Zusammenfassung

Verbindung gebracht werden oder aber wegen ihrer tumorspezifischen Überexpression bereits Zielmoleküle der klinischen Forschung darstellen (RPL8, OFA-iLR, HDAC1). Diese Proteine sind potentielle neue OvCa-assoziierte Tumorantigene, bzw. die daraus abgeleiteten HLA-Liganden stellen potentielle T-Zellepitope für eine Peptid-basierte Immuntherapie dar.

H Abkürzungsverzeichnis

AICD	<i>Activation Induced Cell Death</i>
ADCC	<i>Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity</i>
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
B-CLL	B-Chronische Lymphoblastische Leukämie
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CA125	<i>Cancer Antigen 125</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDR	<i>Complementary Determining Region</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CEA	<i>Carcinoembryonic Antigen</i>
CD40L	CD40-Ligand
CDC	<i>Complement Dependent Cytotoxicity</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX IV	Cytochrom-c-Oxidase, Untereinheit IV
CpG ODN	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin Oligodeoxynukleotide
⁵¹ Cr	51 Chrom
CRC	<i>Colorectal Cancer</i>
CTL	<i>Cytotoxic T Lymphocyte</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4</i>
Da	Dalton
DC	<i>Dendritic Cell</i>
ddH ₂ O	doppelt-destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNic	[D ₄]-Nikotinsäure
ECACC	<i>European Collection of Cell Cultures</i>
ECL	Elektrochemolumineszenz
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>

H Abkürzungsverzeichnis

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EpCAM	<i>Epithelial Cell Adhesion Molecule</i>
FasL	Fas-Ligand
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FoxP3	<i>Forkhead box P3</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
GAM	<i>Goat Anti Mouse</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
GPI	Glycosyl-Phosphatidylinositol
GUA	O-Methyl-Isoharnstoff-Hemisulfat
Gy	Gray
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HER2/neu	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>
HIF	<i>Hypoxia Inducible Factor</i>
HI-Virus	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPV	Humanes Papillomavirus
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IFN γ	Interferon γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
JIP	<i>JNK Interacting Protein</i>
JNK	c-Jun NH ₂ -terminale Kinase
kb	Kilo Basen
kDa	KiloDalton
L1CAM	<i>L1 Cell Adhesion Molecule</i>
LC	<i>Liquid Chromatography</i>
MACS	<i>Magnetic Cell Sorting</i>
MDSC	<i>Myeloid Derived Suppressor Cell</i>

H Abkürzungsverzeichnis

mIF	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
min	Minute
MPF	<i>Megakaryocyte-Potentiating Factor</i>
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
MS	Massenspektrometrie
MUC-1	Mucin-1
NaCl	Natriumchlorid
NF-AT	<i>Nuclear Factor of Activated T cells</i>
NIC	[H ₄]-Nikotinsäure
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NmU	Neuromedin U
NSCLC	<i>Non Small Cell Lung Cancer</i>
NP-40	Nonoxynol-40
OPN	Osteopontin
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PBL	<i>Peripheral Blood Lymphocytes</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PE	Phycoerythrin
PGE ₂	Prostaglandin E2
PI3-K	Phosphoinositol-3-Kinase
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
qRT-PCR	<i>Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction</i>
RCC	<i>Renal Cell Carcinoma</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation Assay</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>Sodium Dodecylsulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel</i>
<i>Electrophoresis</i>	
SIX1	SIX homebox 1
SPAG9	<i>Sperm-Associated Antigen 9</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
β-ME	β-Mercaptoethanol
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen

H Abkürzungsverzeichnis

TAP	<i>Transporter Associated with Antigen Processing</i>
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TBS-T	<i>Tris-Buffered Saline with Tween 20</i>
TCR	<i>T Cell Receptor</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	<i>Trifluor Acetic Acid</i>
T _H -Zelle	T-Helferzelle
TIL	Tumorinfiltrierender Lymphozyt
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	<i>Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand</i>
Treg	regulatorische T-Zelle
TS-TMBSA	Tris/sodium chloride buffer with tween 20, milk and BSA
VEGF	Vascular Epidermal Growth Factor
WT1	<i>Wilms Tumor 1</i>

Referenzen

- Ahmadzadeh, M. and S. A. Rosenberg. 2006. IL-2 administration increases CD4+ CD25(hi) Foxp3+ regulatory T cells in cancer patients. *Blood* 107:2409-2414.
- Aktas, E., U. C. Kucuksezer, S. Bilgic, G. Erten, and G. Deniz. 2009. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell Immunol.* 254:149-154.
- Allavena, P., G. Peri, B. M. Di, F. Peccatori, F. Chiaffarino, P. Pirovano, and A. Mantovani. 1988. Lymphocytes infiltrating ovarian carcinoma: modulation of functional activity by intraperitoneal treatment with biological response modifiers. *Nat.Immun.Cell Growth Regul.* 7:230-238.
- Altman, J. D., P. A. Moss, P. J. Goulder, D. H. Barouch, M. G. Heyzer-Williams, J. I. Bell, A. J. McMichael, and M. M. Davis. 1996. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274:94-96.
- Ambrosini, G., C. Adida, and D. C. Altieri. 1997. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat.Med.* 3:917-921.
- Apostolopoulos, V. and I. F. C. McKenzie. 1994. Cellular Mucins - Targets for Immunotherapy. *Critical Reviews in Immunology* 14:293-309.
- Appay, V., D. F. Nixon, S. M. Donahoe, G. M. Gillespie, T. Dong, A. King, G. S. Ogg, H. M. Spiegel, C. Conlon, C. A. Spina, D. V. Havlir, D. D. Richman, A. Waters, P. Easterbrook, A. J. McMichael, and S. L. Rowland-Jones. 2000. HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J.Exp.Med.* 192:63-75.
- Argani, P., C. Iacobuzio-Donahue, B. Ryu, C. Rosty, M. Goggins, R. E. Wilentz, S. R. Murugesan, S. D. Leach, E. Jaffee, C. J. Yeo, J. L. Cameron, S. E. Kern, and R. H. Hruban. 2001. Mesothelin is overexpressed in the vast majority of ductal adenocarcinomas of the pancreas: identification of a new pancreatic cancer marker by serial analysis of gene expression (SAGE). *Clin.Cancer Res.* 7:3862-3868.
- Arlt, M. J., I. Novak-Hofer, D. Gast, V. Gschwend, G. Moldenhauer, J. Grunberg, M. Honer, P. A. Schubiger, P. Altevogt, and A. Kruger. 2006. Efficient inhibition of intra-peritoneal tumor growth and dissemination of human ovarian carcinoma cells in nude mice by anti-L1-cell adhesion molecule monoclonal antibody treatment. *Cancer Res.* 66:936-943.
- Artavanis-Tsakonas, S., M. D. Rand, and R. J. Lake. 1999. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284:770-776.
- Asou, Y., S. R. Rittling, H. Yoshitake, K. Tsuji, K. Shinomiya, A. Nifuji, D. T. Denhardt, and M. Noda. 2001. Osteopontin facilitates angiogenesis, accumulation of osteoclasts, and resorption in ectopic bone. *Endocrinology* 142:1325-1332.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252.

Literaturverzeichnis

- Bang, H., K. Egerer, A. Gauliard, K. Luthke, P. E. Rudolph, G. Fredenhagen, W. Berg, E. Feist, and G. R. Burmester. 2007. Mutation and citrullination modifies vimentin to a novel autoantigen for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 56:2503-2511.
- Barnstable, C. J., E. A. Jones, and M. J. Crumpton. 1978. Isolation, structure and genetics of HLA-A, -B, -C and -DRw (Ia) antigens. *Br.Med.Bull.* 34:241-246.
- Baskar, S., S. Ostrand-Rosenberg, N. Nabavi, L. M. Nadler, G. J. Freeman, and L. H. Glimcher. 1993. Constitutive expression of B7 restores immunogenicity of tumor cells expressing truncated major histocompatibility complex class II molecules. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90:5687-5690.
- Becker, J. C. and E. B. Brocker. 1995. Lymphocyte-melanoma interaction: role of surface molecules. *Recent Results Cancer Res.* 139:205-214.
- Behbakht, K., L. Qamar, C. S. Aldridge, R. D. Coletta, S. A. Davidson, A. Thorburn, and H. L. Ford. 2007. Six1 overexpression in ovarian carcinoma causes resistance to TRAIL-mediated apoptosis and is associated with poor survival. *Cancer Res.* 67:3036-3042.
- Bellone, S., S. Anfossi, T. J. O'Brien, M. J. Cannon, D. A. Silasi, M. Azodi, P. E. Schwartz, T. J. Rutherford, S. Pecorelli, and A. D. Santin. 2009. Generation of CA125-specific cytotoxic T lymphocytes in human leukocyte antigen-A2.1-positive healthy donors and patients with advanced ovarian cancer. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 200:75-10.
- Bera, T. K. and I. Pastan. 2000. Mesothelin is not required for normal mouse development or reproduction. *Mol.Cell Biol.* 20:2902-2906.
- Beral, V., R. Doll, C. Hermon, R. Peto, and G. Reeves. 2008. Ovarian cancer and oral contraceptives: collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23,257 women with ovarian cancer and 87,303 controls. *Lancet* 371:303-314.
- Berek, J., P. Taylor, W. McGuire, L. M. Smith, B. Schultes, and C. F. Nicodemus. 2009. Oregovomab maintenance monoimmunotherapy does not improve outcomes in advanced ovarian cancer. *J.Clin.Oncol.* 27:418-425.
- Bergman, A. C., A. A. Alaiya, W. Wendler, B. Binetruy, M. Shoshan, K. Sakaguchi, T. Bergman, U. Kronenwett, G. Auer, E. Appella, H. Jornvall, and S. Linder. 1999. Protein kinase-dependent overexpression of the nuclear protein pirin in c-JUN and RAS transformed fibroblasts. *Cell Mol.Life Sci.* 55:467-471.
- Biemann, K. 1992. Mass spectrometry of peptides and proteins. *Annu.Rev.Biochem.* 61:977-1010.
- Bignotti, E., R. A. Tassi, S. Calza, A. Ravaggi, E. Bandiera, E. Rossi, C. Donzelli, B. Pasinetti, S. Pecorelli, and A. D. Santin. 2007. Gene expression profile of ovarian serous papillary carcinomas: identification of metastasis-associated genes. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 196:245-11.
- Blankenstein, T., S. Cayeux, and Z. Qin. 1996. Genetic approaches to cancer immunotherapy. *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.* 129:1-49.
- Bleumer, I., E. Oosterwijk, J. C. Oosterwijk-Wakka, M. C. Voller, S. Melchior, S. O. Warnaar, C. Mala, J. Beck, and P. F. Mulders. 2006. A clinical trial with chimeric monoclonal

Literaturverzeichnis

- antibody WX-G250 and low dose interleukin-2 pulsing scheme for advanced renal cell carcinoma. *J.Urol.* 175:57-62.
- Boczkowski, D., S. K. Nair, D. Snyder, and E. Gilboa. 1996. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J.Exp.Med.* 184:465-472.
- Boelaert, K., V. E. Smith, A. L. Stratford, T. Kogai, L. A. Tannahill, J. C. Watkinson, M. C. Eggo, J. A. Franklyn, and C. J. McCabe. 2007. PTTG and PBF repress the human sodium iodide symporter. *Oncogene* 26:4344-4356.
- Bonehill, A., C. Heirman, and K. Thielemans. 2005. Genetic approaches for the induction of a CD4+ T cell response in cancer immunotherapy. *J.Gene Med.* 7:686-695.
- Bookman, M. A., K. M. Darcy, D. Clarke-Pearson, R. A. Boothby, and I. R. Horowitz. 2003. Evaluation of monoclonal humanized anti-HER2 antibody, trastuzumab, in patients with recurrent or refractory ovarian or primary peritoneal carcinoma with overexpression of HER2: a phase II trial of the Gynecologic Oncology Group. *J.Clin.Oncol.* 21:283-290.
- Boon, T. 1993. Teaching the immune system to fight cancer. *Sci.Am.* 268:82-89.
- Boon, T., J. C. Cerottini, E. B. Van den, B. P. van der, and P. A. Van. 1994. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu.Rev.Immunol.* 12:337-365.
- Bossi, P., G. Viale, A. K. Lee, R. Alfano, G. Coggi, and S. Bosari. 1995. Angiogenesis in colorectal tumors: microvessel quantitation in adenomas and carcinomas with clinicopathological correlations. *Cancer Res.* 55:5049-5053.
- Bouvier, M. and D. C. Wiley. 1994. Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of MHC class I molecules. *Science* 265:398-402.
- Brandle, D., F. Brasseur, P. Weynants, T. Boon, and E. B. Van den. 1996. A mutated HLA-A2 molecule recognized by autologous cytotoxic T lymphocytes on a human renal cell carcinoma. *J.Exp.Med.* 183:2501-2508.
- Bristow, R. E. and D. S. Chi. 2006. Platinum-based neoadjuvant chemotherapy and interval surgical cytoreduction for advanced ovarian cancer: a meta-analysis. *Gynecol.Oncol.* 103:1070-1076.
- Bristow, R. E., E. L. Eisenhauer, A. Santillan, and D. S. Chi. 2007. Delaying the primary surgical effort for advanced ovarian cancer: a systematic review of neoadjuvant chemotherapy and interval cytoreduction. *Gynecol.Oncol.* 104:480-490.
- Bristow, R. E., R. S. Tomacruz, D. K. Armstrong, E. L. Trimble, and F. J. Montz. 2002. Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis. *J.Clin.Oncol.* 20:1248-1259.
- Bronstein-Sitton, N., L. Cohen-Daniel, I. Vaknin, A. V. Ezernitchi, B. Leshem, A. Halabi, Y. Houri-Hadad, E. Greenbaum, Z. Zakay-Rones, L. Shapira, and M. Baniyash. 2003. Sustained exposure to bacterial antigen induces interferon-gamma-dependent T cell receptor zeta down-regulation and impaired T cell function. *Nat.Immunol.* 4:957-964.
- Brossart, P., G. Stuhler, T. Flad, S. Stevanovic, H. G. Rammensee, L. Kanz, and W. Brugger. 1998. Her-2/neu-derived peptides are tumor-associated antigens expressed

- by human renal cell and colon carcinoma lines and are recognized by in vitro induced specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res.* 58:732-736.
- Brossart, P., S. Wirths, G. Stuhler, V. L. Reichardt, L. Kanz, and W. Brugger. 2000. Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood* 96:3102-3108.
- Bruening, W., P. Gros, T. Sato, J. Stanimir, Y. Nakamura, D. Housman, and J. Pelletier. 1993. Analysis of the 11p13 Wilms' tumor suppressor gene (WT1) in ovarian tumors. *Cancer Invest* 11:393-399.
- Buckanovich, R. J., A. Facciabene, S. Kim, F. Benencia, D. Sasaroli, K. Balint, D. Katsaros, A. O'Brien-Jenkins, P. A. Gimotty, and G. Coukos. 2008. Endothelin B receptor mediates the endothelial barrier to T cell homing to tumors and disables immune therapy. *Nat.Med.* 14:28-36.
- Bukowski, R. M., T. Olencki, Q. Wang, D. Peereboom, G. T. Budd, P. Elson, K. Sandstrom, L. Tuason, P. Rayman, R. Tubbs, D. McLain, E. Klein, A. Novick, and J. Finke. 1997. Phase II trial of interleukin-2 and interferon-alpha in patients with renal cell carcinoma: clinical results and immunologic correlates of response. *J.Immunother.* 20:301-311.
- Burger, R. A., M. W. Sill, B. J. Monk, B. E. Greer, and J. I. Sorosky. 2007. Phase II trial of bevacizumab in persistent or recurrent epithelial ovarian cancer or primary peritoneal cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *J.Clin.Oncol.* 25:5165-5171.
- Burrows, S. R., N. Kienzle, A. Winterhalter, M. Bharadwaj, J. D. Altman, and A. Brooks. 2000. Peptide-MHC class I tetrameric complexes display exquisite ligand specificity. *J.Immunol.* 165:6229-6234.
- Canney, P. A., M. Moore, P. M. Wilkinson, and R. D. James. 1984. Ovarian cancer antigen CA125: a prospective clinical assessment of its role as a tumour marker. *Br.J.Cancer* 50:765-769.
- Carrabba, M. G., C. Castelli, M. J. Maeurer, P. Squarcina, A. Cova, L. Pilla, N. Renkvist, G. Parmiani, and L. Rivoltini. 2003. Suboptimal activation of CD8(+) T cells by melanoma-derived altered peptide ligands: role of Melan-A/MART-1 optimized analogues. *Cancer Res.* 63:1560-1567.
- Cavallo, F., A. Astolfi, M. Iezzi, F. Cordero, P. L. Lollini, G. Forni, and R. Calogero. 2005. An integrated approach of immunogenomics and bioinformatics to identify new Tumor Associated Antigens (TAA) for mammary cancer immunological prevention. *BMC.Bioinformatics.* 6 Suppl 4:S7.
- Celis, E., V. Tsai, C. Crimi, R. DeMars, P. A. Wentworth, R. W. Chesnut, H. M. Grey, A. Sette, and H. M. Serra. 1994. Induction of anti-tumor cytotoxic T lymphocytes in normal humans using primary cultures and synthetic peptide epitopes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91:2105-2109.
- Cesana, G. C., G. DeRaffele, S. Cohen, D. Moroziewicz, J. Mitcham, J. Stoutenburg, K. Cheung, C. Hesdorffer, S. Kim-Schulze, and H. L. Kaufman. 2006b. 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.* 24:1169-1177.

Literaturverzeichnis

- Cesana, G. C., G. DeRaffele, S. Cohen, D. Moroziewicz, J. Mitcham, J. Stoutenburg, K. Cheung, C. Hesdorffer, S. Kim-Schulze, and H. L. Kaufman. 2006a. 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.* 24:1169-1177.
- Chambers, A. F., S. M. Wilson, N. Kerkvliet, F. P. O'Malley, J. F. Harris, and A. G. Casson. 1996. Osteopontin expression in lung cancer. *Lung Cancer* 15:311-323.
- Chang, K. and I. Pastan. 1996. Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93:136-140.
- Chen, C. Y., J. H. Jia, X. L. Pan, Y. B. Zhou, and W. M. Zhao. 2004. [Study of antileukemic effect of CpG-oligodeoxynucleotides treated cord blood]. *Zhonghua Xue.Ye.Xue.Za Zhi.* 25:13-16.
- Chen, P. M., H. Chiang, C. K. Chou, T. S. Hwang, B. N. Chiang, and M. F. Greaves. 1983. Immunological classification of T-cell acute lymphoblastic leukaemia using monoclonal antibodies. *Leuk.Res.* 7:339-348.
- Chiou, S. H., B. C. Sheu, W. C. Chang, S. C. Huang, and H. Hong-Nerng. 2005. Current concepts of tumor-infiltrating lymphocytes in human malignancies. *J.Reprod.Immunol.* 67:35-50.
- Choi, K., Y. H. Ahn, D. L. Gibbons, H. T. Tran, C. J. Creighton, L. Girard, J. D. Minna, F. X. Qin, and J. M. Kurie. 2009. Distinct biological roles for the notch ligands Jagged-1 and Jagged-2. *J.Biol.Chem.* 284:17766-17774.
- Coggin, J. H., Jr., A. L. Barsoum, and J. W. Rohrer. 1999. 37 kiloDalton oncofetal antigen protein and immature laminin receptor protein are identical, universal T-cell inducing immunogens on primary rodent and human cancers. *Anticancer Res.* 19:5535-5542.
- Coghlin, C., B. Carpenter, S. R. Dundas, L. C. Lawrie, C. Telfer, and G. I. Murray. 2006. Characterization and over-expression of chaperonin t-complex proteins in colorectal cancer. *J.Pathol.* 210:351-357.
- Colombo, N., D. Guthrie, S. Chiari, M. Parmar, W. Qian, A. M. Swart, V. Torri, C. Williams, A. Lissoni, and C. Bonazzi. 2003. International Collaborative Ovarian Neoplasm trial 1: a randomized trial of adjuvant chemotherapy in women with early-stage ovarian cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* 95:125-132.
- Cormier, J. N., Y. M. Hijazi, A. Abati, P. Fetsch, M. Bettinotti, S. M. Steinberg, S. A. Rosenberg, and F. M. Marincola. 1998. Heterogeneous expression of melanoma-associated antigens and HLA-A2 in metastatic melanoma in vivo. *Int.J.Cancer* 75:517-524.
- Corr, M., A. E. Slanetz, L. F. Boyd, M. T. Jelonek, S. Khilko, B. K. al-Ramadi, Y. S. Kim, S. E. Maher, A. L. Bothwell, and D. H. Margulies. 1994. T cell receptor-MHC class I peptide interactions: affinity, kinetics, and specificity. *Science* 265:946-949.
- Couzin, J. 2006. Cancer. T cells a boon for colon cancer prognosis. *Science* 313:1868-1869.
- Cox, A. L., J. Skipper, Y. Chen, R. A. Henderson, T. L. Darrow, J. Shabanowitz, V. H. Engelhard, D. F. Hunt, and C. L. Slingsluff, Jr. 1994. Identification of a peptide

- recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science* 264:716-719.
- Crabtree, G. R. 1999. Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca²⁺, calcineurin, and NF-AT. *Cell* 96:611-614.
- D'Souza, B., A. Miyamoto, and G. Weinmaster. 2008. The many facets of Notch ligands. *Oncogene* 27:5148-5167.
- Dahme, M., U. Bartsch, R. Martini, B. Anliker, M. Schachner, and N. Mantei. 1997. Disruption of the mouse L1 gene leads to malformations of the nervous system. *Nat.Genet.* 17:346-349.
- Daugaard, M., M. Jaattela, and M. Rohde. 2005. Hsp70-2 is required for tumor cell growth and survival. *Cell Cycle* 4:877-880.
- Davis, M. M., J. J. Boniface, Z. Reich, D. Lyons, J. Hampl, B. Arden, and Y. Chien. 1998. Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annu.Rev.Immunol.* 16:523-544.
- Debiec, H., E. I. Christensen, and P. M. Ronco. 1998. The cell adhesion molecule L1 is developmentally regulated in the renal epithelium and is involved in kidney branching morphogenesis. *J.Cell Biol.* 143:2067-2079.
- Deng, S., H. Zhou, R. Xiong, Y. Lu, D. Yan, T. Xing, L. Dong, E. Tang, and H. Yang. 2007. Over-expression of genes and proteins of ubiquitin specific peptidases (USPs) and proteasome subunits (PSs) in breast cancer tissue observed by the methods of RFDD-PCR and proteomics. *Breast Cancer Res.Treat.* 104:21-30.
- Denhardt, D. T., M. Noda, A. W. O'Regan, D. Pavlin, and J. S. Berman. 2001. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J.Clin.Invest* 107:1055-1061.
- Denk, H., G. Tappeiner, R. Eckerstorfer, and J. H. Holzner. 1972. Carcinoembryonic antigen (CEA) in gastrointestinal and extragastrointestinal tumors and its relationship to tumor-cell differentiation. *Int.J.Cancer* 10:262-272.
- Denkberg, G., C. J. Cohen, and Y. Reiter. 2001. Critical role for CD8 in binding of MHC tetramers to TCR: CD8 antibodies block specific binding of human tumor-specific MHC-peptide tetramers to TCR. *J.Immunol.* 167:270-276.
- Diggle, C. P., S. Cruickshank, J. D. Olsburgh, S. Pellegrin, B. Smith, R. E. Banks, P. J. Selby, M. A. Knowles, J. Southgate, and P. Harnden. 2003. Identification of genes up-regulated in urothelial tumors: the 67-kd laminin receptor and tumor-associated trypsin inhibitor. *Am.J.Pathol.* 163:493-504.
- Disis, M. L., H. Bernhard, F. M. Shiota, S. L. Hand, J. R. Gralow, E. S. Huseby, S. Gillis, and M. A. Cheever. 1996. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: an effective adjuvant for protein and peptide-based vaccines. *Blood* 88:202-210.
- Dong, Y., M. D. Walsh, M. C. Cummings, R. G. Wright, S. K. Khoo, P. G. Parsons, and M. A. McGuckin. 1997. Expression of MUC1 and MUC2 mucins in epithelial ovarian tumours. *Journal of Pathology* 183:311-317.
- du Bois A., H. J. Luck, W. Meier, H. P. Adams, V. Mobus, S. Costa, T. Bauknecht, B. Richter, M. Warm, W. Schroder, S. Olbricht, U. Nitz, C. Jackisch, G. Emons, U. Wagner, W.

- Kuhn, and J. Pfisterer. 2003. A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* 95:1320-1329.
- du Bois A., B. Weber, J. Rochon, W. Meier, A. Goupil, S. Olbricht, J. C. Barats, W. Kuhn, H. Orfeuvre, U. Wagner, B. Richter, H. J. Lueck, J. Pfisterer, S. Costa, W. Schroeder, R. Kimmig, and E. Pujade-Lauraine. 2006. Addition of epirubicin as a third drug to carboplatin-paclitaxel in first-line treatment of advanced ovarian cancer: a prospectively randomized gynecologic cancer intergroup trial by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Ovarian Cancer Study Group and the Groupe d'Investigateurs Nationaux pour l'Etude des Cancers Ovariens. *J.Clin.Oncol.* 24:1127-1135.
- Dunn, G. P., A. T. Bruce, H. Ikeda, L. J. Old, and R. D. Schreiber. 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat.Immunol.* 3:991-998.
- Ebeling, O., A. Duczmal, S. Aigner, C. Geiger, S. Schollhammer, J. T. Kemshead, P. Moller, R. Schwartz-Albiez, and P. Altevogt. 1996. L1 adhesion molecule on human lymphocytes and monocytes: expression and involvement in binding to alpha v beta 3 integrin. *Eur.J.Immunol.* 26:2508-2516.
- Elaraj, D. M., D. E. White, S. M. Steinberg, L. Haworth, S. A. Rosenberg, and J. C. Yang. 2004. A pilot study of antiangiogenic therapy with bevacizumab and thalidomide in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J.Immunother.* 27:259-264.
- Elgert, K. D., D. G. Alleva, and D. W. Mullins. 1998. Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. *J.Leukoc.Biol.* 64:275-290.
- Elser, M., L. Borsig, P. O. Hassa, S. Erener, S. Messner, T. Valovka, S. Keller, M. Gassmann, and M. O. Hottiger. 2008. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 promotes tumor cell survival by coactivating hypoxia-inducible factor-1-dependent gene expression. *Mol.Cancer Res.* 6:282-290.
- Euer, N. I., S. Kaul, H. Deissler, V. J. Mobus, R. Zeillinger, and U. H. Weidle. 2005. Identification of L1CAM, Jagged2 and Neuromedin U as ovarian cancer-associated antigens. *Oncol.Rep.* 13:375-387.
- Falk, K., O. Rotzschke, S. Stevanovic, G. Jung, and H. G. Rammensee. 1991. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351:290-296.
- Fearon, E. R. and B. Vogelstein. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61:759-767.
- Ferrara, N., K. A. Houck, L. B. Jakeman, J. Winer, and D. W. Leung. 1991. The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *J.Cell Biochem.* 47:211-218.
- Ferrara, N. and T. vis-Smyth. 1997. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr.Rev.* 18:4-25.
- Figlin, R. A., J. A. Thompson, R. M. Bukowski, N. J. Vogelzang, A. C. Novick, P. Lange, G. D. Steinberg, and A. S. Belldegrun. 1999. Multicenter, randomized, phase III trial of CD8(+) tumor-infiltrating lymphocytes in combination with recombinant interleukin-2 in metastatic renal cell carcinoma. *J.Clin.Oncol.* 17:2521-2529.

- Flieger, D., P. Kufer, I. Beier, T. Sauerbruch, and I. G. Schmidt-Wolf. 2000. A bispecific single-chain antibody directed against EpCAM/CD3 in combination with the cytokines interferon alpha and interleukin-2 efficiently retargets T and CD3+CD56+ natural-killer-like T lymphocytes to EpCAM-expressing tumor cells. *Cancer Immunol.Immunother.* 49:441-448.
- Fogel, M., P. Gutwein, S. Mechtersheimer, S. Riedle, A. Stoeck, A. Smirnov, L. Edler, A. Ben Arie, M. Huszar, and P. Altevogt. 2003. L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas. *Lancet* 362:869-875.
- Fogel, M., M. Huszar, P. Altevogt, and A. Ben Arie. 2004b. L1 (CD171) as a novel biomarker for ovarian and endometrial carcinomas. *Expert.Rev.Mol.Diagn.* 4:455-462.
- Folkman, J., E. Merler, C. Abernathy, and G. Williams. 1971. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J.Exp.Med.* 133:275-288.
- Ford, H. L., E. N. Kabingu, E. A. Bump, G. L. Mutter, and A. B. Pardee. 1998. Abrogation of the G2 cell cycle checkpoint associated with overexpression of HSIX1: a possible mechanism of breast carcinogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95:12608-12613.
- Fotiou, K., G. Vaiopoulos, K. Lilakos, A. Giannopoulos, K. Mandalenaki, G. Marinos, G. Koritsiadis, J. Sourdis, E. Konstantinidou, and K. Konstantopoulos. 2007. Serum ceruloplasmin as a marker in prostate cancer. *Minerva Urol.Nefrol.* 59:407-411.
- Franzen, A. and D. Heinegard. 1985. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochem.J.* 232:715-724.
- Friedlander, M. L. 1998. Prognostic factors in ovarian cancer. *Semin.Oncol.* 25:305-314.
- Funes, S., J. A. Hedrick, S. Yang, L. Shan, M. Bayne, F. J. Monsma, Jr., and E. L. Gustafson. 2002. Cloning and characterization of murine neuromedin U receptors. *Peptides* 23:1607-1615.
- Gabrilovich, D., T. Ishida, T. Oyama, S. Ran, V. Kravtsov, S. Nadaf, and D. P. Carbone. 1998. Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood* 92:4150-4166.
- Gabrilovich, D. I., H. L. Chen, K. R. Girgis, H. T. Cunningham, G. M. Meny, S. Nadaf, D. Kavanaugh, and D. P. Carbone. 1996. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat.Med.* 2:1096-1103.
- Galon, J., A. Costes, F. Sanchez-Cabo, A. Kirilovsky, B. Mlecnik, C. Lagorce-Pages, M. Tosolini, M. Camus, A. Berger, P. Wind, F. Zinzindohoue, P. Bruneval, P. H. Cugnenc, Z. Trajanoski, W. H. Fridman, and F. Pages. 2006. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313:1960-1964.
- Garboczi, D. N., U. Utz, P. Ghosh, A. Seth, J. Kim, E. A. VanTienhoven, W. E. Biddison, and D. C. Wiley. 1996. Assembly, specific binding, and crystallization of a human TCR-alpha-beta with an antigenic Tax peptide from human T lymphotropic virus type 1 and the class I MHC molecule HLA-A2. *J.Immunol.* 157:5403-5410.

Literaturverzeichnis

- Garg, M., D. Chaurasiya, R. Rana, N. Jagadish, D. Kanojia, N. Dudha, N. Kamran, S. Salhan, A. Bhatnagar, S. Suri, A. Gupta, and A. Suri. 2007. Sperm-associated antigen 9, a novel cancer testis antigen, is a potential target for immunotherapy in epithelial ovarian cancer. *Clin.Cancer Res.* 13:1421-1428.
- Garg, M., D. Kanojia, A. Khosla, N. Dudha, S. Sati, D. Chaurasiya, N. Jagadish, A. Seth, R. Kumar, S. Gupta, A. Gupta, N. K. Lohiya, and A. Suri. 2008. Sperm-associated antigen 9 is associated with tumor growth, migration, and invasion in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 68:8240-8248.
- Garrido, F., F. Ruiz-Cabello, T. Cabrera, J. J. Perez-Villar, M. Lopez-Botet, M. Duggan-Keen, and P. L. Stern. 1997. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol.Today* 18:89-95.
- Gasparini, G., M. Toi, M. Gion, P. Verderio, R. Dittadi, M. Hanatani, I. Matsubara, O. Vinante, E. Bonoldi, P. Boracchi, C. Gatti, H. Suzuki, and T. Tominaga. 1997. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein in node-negative breast carcinoma. *J.Natl.Cancer Inst.* 89:139-147.
- Gast, D., S. Riedle, S. Riedle, H. Schabath, S. Schlich, A. Schneider, Y. Issa, A. Stoeck, M. Fogel, S. Joumaa, T. Wenger, I. Herr, P. Gutwein, and P. Altevogt. 2005. L1 augments cell migration and tumor growth but not beta3 integrin expression in ovarian carcinomas. *Int.J.Cancer* 115:658-665.
- Gates, M. A., S. S. Tworoger, K. L. Terry, V. De, I, D. J. Hunter, S. E. Hankinson, and D. W. Cramer. 2009. Breast cancer susceptibility alleles and ovarian cancer risk in 2 study populations. *Int.J.Cancer* 124:729-733.
- Gaudin, C., F. Kremer, E. Angevin, V. Scott, and F. Triebel. 1999. A hsp70-2 mutation recognized by CTL on a human renal cell carcinoma. *J.Immunol.* 162:1730-1738.
- Gavert, N., M. Conacci-Sorrell, D. Gast, A. Schneider, P. Altevogt, T. Brabletz, and A. Ben-Ze'ev. 2005b. L1, a novel target of beta-catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers. *J.Cell Biol.* 168:633-642.
- Ge, H. L., X. R. Zhang, Y. Wang, A. L. Ma, H. Z. Zhang, S. J. Wang, and G. Y. Zhou. 2003. [Study of HLA molecules and its associated genes expression in human ovarian cancer cells]. *Xi.Bao.Yu Fen.Zi.Mian.Yi.Xue.Za Zhi.* 19:41-44.
- Gerber, H. P., V. Dixit, and N. Ferrara. 1998. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J.Biol.Chem.* 273:13313-13316.
- Gervois, N., Y. Guilloux, E. Diez, and F. Jotereau. 1996. Suboptimal activation of melanoma infiltrating lymphocytes (TIL) due to low avidity of TCR/MHC-tumor peptide interactions. *J.Exp.Med.* 183:2403-2407.
- Ghoshal, P., A. J. Nganga, J. Moran-Giupati, A. Szafranek, T. R. Johnson, A. J. Bigelow, C. M. Houde, H. vet-Loiseau, D. J. Smiraglia, N. Ersing, A. A. Chanan-Khan, and L. J. Coignet. 2009. Loss of the SMRT/NCoR2 corepressor correlates with JAG2 overexpression in multiple myeloma. *Cancer Res.* 69:4380-4387.
- Gnjatic, S., D. Atanackovic, E. Jager, M. Matsuo, A. Selvakumar, N. K. Altorki, R. G. Maki, B. Dupont, G. Ritter, Y. T. Chen, A. Knuth, and L. J. Old. 2003. Survey of naturally

- occurring CD4+ T cell responses against NY-ESO-1 in cancer patients: correlation with antibody responses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100:8862-8867.
- Gouttefangeas, C., A. Stenzl, S. Stevanovic, and H. G. Rammensee. 2007. Immunotherapy of renal cell carcinoma. *Cancer Immunol.Immunother.* 56:117-128.
- Graells, J., A. Vinyals, A. Figueras, A. Llorens, A. Moreno, J. Marcoval, F. J. Gonzalez, and A. Fabra. 2004. Overproduction of VEGF concomitantly expressed with its receptors promotes growth and survival of melanoma cells through MAPK and PI3K signaling. *J.Invest Dermatol.* 123:1151-1161.
- Graham, J. S., S. B. Kaye, and R. Brown. 2009. The promises and pitfalls of epigenetic therapies in solid tumours. *Eur.J.Cancer* 45:1129-1136.
- Gridley, T. 2003. Notch signaling and inherited disease syndromes. *Hum.Mol.Genet.* 12 Spec No 1:R9-13.
- Gridley, T. 1997. Notch signaling in vertebrate development and disease. *Mol.Cell Neurosci.* 9:103-108.
- Griffiths, R. W., E. Elkord, D. E. Gilham, V. Ramani, N. Clarke, P. L. Stern, and R. E. Hawkins. 2007. Frequency of regulatory T cells in renal cell carcinoma patients and investigation of correlation with survival. *Cancer Immunol.Immunother.* 56:1743-1753.
- Guerder, S., J. Meyerhoff, and R. Flavell. 1994. The role of the T cell costimulator B7-1 in autoimmunity and the induction and maintenance of tolerance to peripheral antigen. *Immunity.* 1:155-166.
- Gungor, M., F. Ortac, M. Arvas, D. Kosebay, M. Sonmezer, and K. Kose. 2005. The role of secondary cytoreductive surgery for recurrent ovarian cancer. *Gynecol.Oncol.* 97:74-79.
- Gutwein, P., S. Mechtersheimer, S. Riedle, A. Stoeck, D. Gast, S. Joumaa, H. Zentgraf, M. Fogel, and D. P. Altevogt. 2003. ADAM10-mediated cleavage of L1 adhesion molecule at the cell surface and in released membrane vesicles. *FASEB J.* 17:292-294.
- Gygi, S. P., Y. Rochon, B. R. Franza, and R. Aebersold. 1999. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol.Cell Biol.* 19:1720-1730.
- Hainsworth, J. D., J. A. Sosman, D. R. Spigel, D. L. Edwards, C. Baughman, and A. Greco. 2005. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with a combination of bevacizumab and erlotinib. *J.Clin.Oncol.* 23:7889-7896.
- Han, E. S., P. Lin, and M. Wakabayashi. 2009. Current status on biologic therapies in the treatment of epithelial ovarian cancer. *Curr.Treat.Options.Oncol.* 10:54-66.
- Hanas, J. S., J. R. Hocker, J. Y. Cheung, J. L. Larabee, M. R. Lerner, S. A. Lightfoot, D. L. Morgan, K. D. Denson, K. C. Prejeant, Y. Gusev, B. J. Smith, R. J. Hanas, R. G. Postier, and D. J. Brackett. 2008. Biomarker identification in human pancreatic cancer sera. *Pancreas* 36:61-69.
- Hao, C. Y., D. H. Moore, P. Wong, J. L. Bennington, N. M. Lee, and L. C. Chen. 2005. Alteration of gene expression in macroscopically normal colonic mucosa from

Literaturverzeichnis

- individuals with a family history of sporadic colon cancer. *Clin.Cancer Res.* 11:1400-1407.
- Harding, F. A., J. G. McArthur, J. A. Gross, D. H. Raulet, and J. P. Allison. 1992. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 356:607-609.
- Hassan, R., T. Bera, and I. Pastan. 2004. Mesothelin: a new target for immunotherapy. *Clin.Cancer Res.* 10:3937-3942.
- Hassan, R., V. C. Broaddus, S. Wilson, D. J. Liewehr, and J. Zhang. 2007. Anti-mesothelin immunotoxin SS1P in combination with gemcitabine results in increased activity against mesothelin-expressing tumor xenografts. *Clin.Cancer Res.* 13:7166-7171.
- Hassan, R. and M. Ho. 2008. Mesothelin targeted cancer immunotherapy. *Eur.J.Cancer* 44:46-53.
- He, X. S., B. Rehermann, F. X. Lopez-Labrador, J. Boisvert, R. Cheung, J. Mumm, H. Wedemeyer, M. Berenguer, T. L. Wright, M. M. Davis, and H. B. Greenberg. 1999. Quantitative analysis of hepatitis C virus-specific CD8(+) T cells in peripheral blood and liver using peptide-MHC tetramers. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:5692-5697.
- Henkart, P. A. 1994. Lymphocyte-mediated cytotoxicity: two pathways and multiple effector molecules. *Immunity.* 1:343-346.
- Hernando, J. J., T. W. Park, K. Kubler, R. Offergeld, H. Schlebusch, and T. Bauknecht. 2002. Vaccination with autologous tumour antigen-pulsed dendritic cells in advanced gynaecological malignancies: clinical and immunological evaluation of a phase I trial. *Cancer Immunol.Immunother.* 51:45-52.
- Hillenkamp, F. and M. Karas. 1990. Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization. *Methods Enzymol.* 193:280-295.
- Ho, M., R. Hassan, J. Zhang, Q. C. Wang, M. Onda, T. Bera, and I. Pastan. 2005. Humoral immune response to mesothelin in mesothelioma and ovarian cancer patients. *Clin.Cancer Res.* 11:3814-3820.
- Hodi, F. S., M. C. Mihm, R. J. Soiffer, F. G. Haluska, M. Butler, M. V. Seiden, T. Davis, R. Henry-Spires, S. MacRae, A. Willman, R. Padera, M. T. Jaklitsch, S. Shankar, T. C. Chen, A. Korman, J. P. Allison, and G. Dranoff. 2003. Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100:4712-4717.
- Hoffmann, T. K., G. Dworacki, T. Tsukihira, N. Meidenbauer, W. Gooding, J. T. Johnson, and T. L. Whiteside. 2002. Spontaneous apoptosis of circulating T lymphocytes in patients with head and neck cancer and its clinical importance. *Clin.Cancer Res.* 8:2553-2562.
- Holdsworth, R., C. K. Hurley, S. G. Marsh, M. Lau, H. J. Noreen, J. H. Kempenich, M. Setterholm, and M. Maier. 2009. The HLA dictionary 2008: a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, and -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ antigens. *Tissue Antigens* 73:95-170.

- Honma, K., K. Iwao-Koizumi, F. Takeshita, Y. Yamamoto, T. Yoshida, K. Nishio, S. Nagahara, K. Kato, and T. Ochiya. 2008. RPN2 gene confers docetaxel resistance in breast cancer. *Nat.Med.* 14:939-948.
- Hortsch, M. 2000. Structural and functional evolution of the L1 family: are four adhesion molecules better than one? *Mol.Cell Neurosci.* 15:1-10.
- Howard, A. D., R. Wang, S. S. Pong, T. N. Mellin, A. Strack, X. M. Guan, Z. Zeng, D. L. Williams, Jr., S. D. Feighner, C. N. Nunes, B. Murphy, J. N. Stair, H. Yu, Q. Jiang, M. K. Clements, C. P. Tan, K. K. McKee, D. L. Hreniuk, T. P. McDonald, K. R. Lynch, J. F. Evans, C. P. Austin, C. T. Caskey, L. H. Van der Ploeg, and Q. Liu. 2000. Identification of receptors for neuromedin U and its role in feeding. *Nature* 406:70-74.
- Hu, H. and J. Stein-Streilein. 1993. Hapten-immune pulmonary interstitial fibrosis (HIPIF) in mice requires both CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *J.Leukoc.Biol.* 54:414-422.
- Hu, L. H., F. H. Chen, Y. R. Li, and L. Wang. 2004. Real-time determination of human telomerase reverse transcriptase mRNA in gastric cancer. *World J.Gastroenterol.* 10:3514-3517.
- Huang, T. H., K. R. Chintalacheruvu, and S. L. Morrison. 2007. Targeting IFN-alpha to B cell lymphoma by a tumor-specific antibody elicits potent antitumor activities. *J.Immunol.* 179:6881-6888.
- Huijts, P. E., M. P. Vreeswijk, K. H. Kroeze-Jansema, C. E. Jacobi, C. Seynaeve, E. M. Krol-Warmerdam, P. M. Wijers-Koster, J. C. Blom, K. A. Pooley, J. G. Klijn, R. A. Tollenaar, P. Devilee, and C. J. van Asperen. 2007. Clinical correlates of low-risk variants in FGFR2, TNRC9, MAP3K1, LSP1 and 8q24 in a Dutch cohort of incident breast cancer cases. *Breast Cancer Res.* 9:R78.
- Hunt, D. F., J. R. Yates, J. Shabanowitz, S. Winston, and C. R. Hauer. 1986. Protein Sequencing by Tandem Mass-Spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83:6233-6237.
- Inoue, M., N. Kanbe, M. Kurosawa, and H. Kido. 1998. Cloning and tissue distribution of a novel serine protease esp-1 from human eosinophils. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 252:307-312.
- Ishida, T., T. Oyama, D. P. Carbone, and D. I. Gabrilovich. 1998. Defective function of Langerhans cells in tumor-bearing animals is the result of defective maturation from hemopoietic progenitors. *J.Immunol.* 161:4842-4851.
- Ishihara, M., I. Tawara, L. Wang, Y. Takahashi, and H. Shiku. 2003. Elimination of CD4+ T cells may overcome suppression of anti-HER2 immune responses in tumor-bearing hosts. *Int.J.Oncol.* 22:1135-1139.
- Ishii, Y. 1995. [Expression and subtype analysis of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (flt-1) in human ovarian tumors]. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 47:133-140.
- Itoh, K. 1987. [Tumor-infiltrating lymphocytes from human metastatic melanoma]. *Gan To Kagaku Ryoho* 14:2119-2126.

- Jacobs, I. J., S. J. Skates, N. MacDonald, U. Menon, A. N. Rosenthal, A. P. Davies, R. Woolas, A. R. Jeyarajah, K. Sibley, D. G. Lowe, and D. H. Oram. 1999. Screening for ovarian cancer: a pilot randomised controlled trial. *Lancet* 353:1207-1210.
- Jagadish, N., R. Rana, R. Selvi, D. Mishra, M. Garg, S. Yadav, J. C. Herr, K. Okumura, A. Hasegawa, K. Koyama, and A. Suri. 2005. Characterization of a novel human sperm-associated antigen 9 (SPAG9) having structural homology with c-Jun N-terminal kinase-interacting protein. *Biochem.J.* 389:73-82.
- Jager, E., Y. T. Chen, J. W. Drijfhout, J. Karbach, M. Ringhoffer, D. Jager, M. Arand, H. Wada, Y. Noguchi, E. Stockert, L. J. Old, and A. Knuth. 1998. Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: Definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *Journal of Experimental Medicine* 187:265-270.
- Jager, E., D. Jager, and A. Knuth. 2003. Antigen-specific immunotherapy and cancer vaccines. *Int.J.Cancer* 106:817-820.
- Jager, E., Y. Nagata, S. Gnjatic, H. Wada, E. Stockert, J. Karbach, P. R. Dunbar, S. Y. Lee, A. Jungbluth, D. Jager, M. Arand, G. Ritter, V. Cerundolo, B. Dupont, Y. T. Chen, L. J. Old, and A. Knuth. 2000. Monitoring CD8 T cell responses to NY-ESO-1: correlation of humoral and cellular immune responses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97:4760-4765.
- Janeway, C. A., Jr. 1992. The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu.Rev.Immunol.* 10:645-674.
- Johnsen, A., J. France, M. S. Sy, and C. V. Harding. 1998. Down-regulation of the transporter for antigen presentation, proteasome subunits, and class I major histocompatibility complex in tumor cell lines. *Cancer Res.* 58:3660-3667.
- Jonuleit, H., J. Knop, and A. H. Enk. 1996. Cytokines and their effects on maturation, differentiation and migration of dendritic cells. *Arch.Dermatol.Res.* 289:1-8.
- Kaklamanis, L., R. Leek, M. Koukourakis, K. C. Gatter, and A. L. Harris. 1995. Loss of transporter in antigen processing 1 transport protein and major histocompatibility complex class I molecules in metastatic versus primary breast cancer. *Cancer Res.* 55:5191-5194.
- Kavanagh, B., A. Ko, A. Venook, K. Margolin, H. Zeh, M. Lotze, B. Schillinger, W. Liu, Y. Lu, P. Mitsky, M. Schilling, N. Bercovici, M. Loudovaris, R. Guillermo, S. M. Lee, J. Bender, B. Mills, and L. Fong. 2007. Vaccination of metastatic colorectal cancer patients with matured dendritic cells loaded with multiple major histocompatibility complex class I peptides. *J.Immunother.* 30:762-772.
- Kawakami, K., H. Enokida, T. Tachiwada, T. Gotanda, K. Tsuneyoshi, H. Kubo, K. Nishiyama, M. Takiguchi, M. Nakagawa, and N. Seki. 2006. Identification of differentially expressed genes in human bladder cancer through genome-wide gene expression profiling. *Oncol.Rep.* 16:521-531.
- Kawakami, K., H. Enokida, T. Tachiwada, K. Nishiyama, N. Seki, and M. Nakagawa. 2007. Increased SKP2 and CKS1 gene expression contributes to the progression of human urothelial carcinoma. *J.Urol.* 178:301-307.

- Kayser, S., I. Watermann, C. Rentzsch, T. Weinschenk, D. Wallwiener, and B. Guckel. 2003. Tumor-associated antigen profiling in breast and ovarian cancer: mRNA, protein or T cell recognition? *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* 129:397-409.
- Kershaw, M. H., J. A. Westwood, L. L. Parker, G. Wang, Z. Eshhar, S. A. Mavroukakis, D. E. White, J. R. Wunderlich, S. Canevari, L. Rogers-Freezer, C. C. Chen, J. C. Yang, S. A. Rosenberg, and P. Hwu. 2006. A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. *Clin.Cancer Res.* 12:6106-6115.
- Ketterer, K., B. Kong, D. Frank, N. A. Giese, A. Bauer, J. Hoheisel, M. Korc, J. Kleeff, C. W. Michalski, and H. Friess. 2009. Neuromedin U is overexpressed in pancreatic cancer and increases invasiveness via the hepatocyte growth factor c-Met pathway. *Cancer Lett.* 277:72-81.
- Khabele, D., D. S. Son, A. K. Parl, G. L. Goldberg, L. H. Augenlicht, J. M. Mariadason, and V. M. Rice. 2007. Drug-induced inactivation or gene silencing of class I histone deacetylases suppresses ovarian cancer cell growth: implications for therapy. *Cancer Biol.Ther.* 6:795-801.
- Kim, H. L., D. Seligson, X. Liu, N. Janzen, M. H. Bui, H. Yu, T. Shi, A. S. Beldegrun, S. Horvath, and R. A. Figlin. 2005. Using tumor markers to predict the survival of patients with metastatic renal cell carcinoma. *J.Urol.* 173:1496-1501.
- Kim, J. H., D. Herlyn, K. K. Wong, D. C. Park, J. O. Schorge, K. H. Lu, S. J. Skates, D. W. Cramer, R. S. Berkowitz, and S. C. Mok. 2003. Identification of epithelial cell adhesion molecule autoantibody in patients with ovarian cancer. *Clin.Cancer Res.* 9:4782-4791.
- Kim, J. H., S. J. Skates, T. Uede, K. K. Wong, J. O. Schorge, C. M. Feltmate, R. S. Berkowitz, D. W. Cramer, and S. C. Mok. 2002. Osteopontin as a potential diagnostic biomarker for ovarian cancer. *JAMA* 287:1671-1679.
- Kirberg, J., A. Berns, and B. H. von. 1997. Peripheral T cell survival requires continual ligation of the T cell receptor to major histocompatibility complex-encoded molecules. *J.Exp.Med.* 186:1269-1275.
- Klausner, R. D., J. G. Donaldson, and J. Lippincott-Schwartz. 1992. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J.Cell Biol.* 116:1071-1080.
- Kleinman, M. S. and M. D. Turner. 1972. Radioimmunoassay of carcinoembryonic antigen in serum of normal subjects and patients with colonic carcinoma. *Gut* 13:390-394.
- Knutson, K. L., K. Schiffman, M. A. Cheever, and M. L. Disis. 2002. Immunization of cancer patients with a HER-2/neu, HLA-A2 peptide, p369-377, results in short-lived peptide-specific immunity. *Clin.Cancer Res.* 8:1014-1018.
- Kornbluth, R. S. and G. W. Stone. 2006. Immunostimulatory combinations: designing the next generation of vaccine adjuvants. *J.Leukoc.Biol.* 80:1084-1102.
- Koroleva, E. P., M. A. Lagarkova, A. A. Mesheryakov, M. J. Scanlan, L. J. Old, S. A. Nedospasov, and D. V. Kuprash. 2002. Serological identification of antigens associated with renal cell carcinoma. *Russ.J.Immunol.* 7:229-238.

Literaturverzeichnis

- Kowitz, A., G. Kadmon, M. Eckert, V. Schirrmacher, M. Schachner, and P. Altevogt. 1992. Expression and function of the neural cell adhesion molecule L1 in mouse leukocytes. *Eur.J.Immunol.* 22:1199-1205.
- Kristensen, G. B., I. Vergote, G. Stuart, J. M. Del Campo, J. Kaern, A. B. Lopez, E. Eisenhauer, E. avall-Lundquist, M. Ridderheim, H. Havsteen, M. R. Mirza, M. Scheistroen, and E. Vrdoljak. 2003. First-line treatment of ovarian cancer FIGO stages IIb-IV with paclitaxel/epirubicin/carboplatin versus paclitaxel/carboplatin. *Int.J.Gynecol.Cancer* 13 Suppl 2:172-177.
- Kuhn, W., S. Rutke, K. Spathe, B. Schmalfeldt, G. Florack, H. B. von, D. Pachyn, K. Ulm, and H. Graeff. 2001. Neoadjuvant chemotherapy followed by tumor debulking prolongs survival for patients with poor prognosis in International Federation of Gynecology and Obstetrics Stage IIIC ovarian carcinoma. *Cancer* 92:2585-2591.
- Kyo, S., T. Kanaya, M. Takakura, M. Tanaka, A. Yamashita, H. Inoue, and M. Inoue. 1999. Expression of human telomerase subunits in ovarian malignant, borderline and benign tumors. *Int.J.Cancer* 80:804-809.
- Lampson, L. A. and R. Levy. 1980. Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line. *J.Immunol.* 125:293-299.
- Lan, Y., Y. Zhang, J. Wang, C. Lin, M. M. Ittmann, and F. Wang. 2008. Aberrant expression of Cks1 and Cks2 contributes to prostate tumorigenesis by promoting proliferation and inhibiting programmed cell death. *Int.J.Cancer* 123:543-551.
- Lanzavecchia, A. 1996. Mechanisms of antigen uptake for presentation. *Curr.Opin.Immunol.* 8:348-354.
- Lee, M. K., J. H. Kim, C. H. Lee, J. M. Kim, C. D. Kang, Y. D. Kim, K. U. Choi, H. W. Kim, J. Y. Kim, d. Y. Park, and M. Y. Sol. 2006. Clinicopathological significance of BGP expression in non-small-cell lung carcinoma: relationship with histological type, microvessel density and patients' survival. *Pathology* 38:555-560.
- Lee, P. P., C. Yee, P. A. Savage, L. Fong, D. Brockstedt, J. S. Weber, D. Johnson, S. Swetter, J. Thompson, P. D. Greenberg, M. Roederer, and M. M. Davis. 1999. Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nat.Med.* 5:677-685.
- Lemmel, C., S. Weik, U. Eberle, J. Dengjel, T. Kratt, H. D. Becker, H. G. Rammensee, and S. Stevanovic. 2004. Differential quantitative analysis of MHC ligands by mass spectrometry using stable isotope labeling. *Nat.Biotechnol.* 22:450-454.
- Lenschow, D. J., T. L. Walunas, and J. A. Bluestone. 1996. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu.Rev.Immunol.* 14:233-258.
- Leung, D. W., G. Cachianes, W. J. Kuang, D. V. Goeddel, and N. Ferrara. 1989. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246:1306-1309.
- Levitsky, H. I., A. Lazenby, R. J. Hayashi, and D. M. Pardoll. 1994. In vivo priming of two distinct antitumor effector populations: the role of MHC class I expression. *J.Exp.Med.* 179:1215-1224.
- Li, X., K. A. Oghi, J. Zhang, A. Krones, K. T. Bush, C. K. Glass, S. K. Nigam, A. K. Aggarwal, R. Maas, D. W. Rose, and M. G. Rosenfeld. 2003. Eya protein phosphatase activity

- regulates Six1-Dach-Eya transcriptional effects in mammalian organogenesis. *Nature* 426:247-254.
- Lichtenegger, W., J. Sehouli, E. Buchmann, C. Karajanev, and H. Weidemann. 1998. Operative results after primary and secondary debulking-operations in advanced ovarian cancer (AOC). *J.Obstet.Gynaecol.Res.* 24:447-451.
- Liu, Y., X. Zhu, J. Zhu, S. Liao, Q. Tang, K. Liu, X. Guan, J. Zhang, and Z. Feng. 2007. Identification of differential expression of genes in hepatocellular carcinoma by suppression subtractive hybridization combined cDNA microarray. *Oncol.Rep.* 18:943-951.
- Liyanage, U. K., T. T. Moore, H. G. Joo, Y. Tanaka, V. Herrmann, G. Doherty, J. A. Drebin, S. M. Strasberg, T. J. Eberlein, P. S. Goedegebuure, and D. C. Linehan. 2002. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J.Immunol.* 169:2756-2761.
- Madden, D. R., D. N. Garboczi, and D. C. Wiley. 1993. The antigenic identity of peptide-MHC complexes: a comparison of the conformations of five viral peptides presented by HLA-A2. *Cell* 75:693-708.
- Maeurer, M. J., S. M. Gollin, D. Martin, W. Swaney, J. Bryant, C. Castelli, P. Robbins, G. Parmiani, W. J. Storkus, and M. T. Lotze. 1996. Tumor escape from immune recognition: lethal recurrent melanoma in a patient associated with downregulation of the peptide transporter protein TAP-1 and loss of expression of the immunodominant MART-1/Melan-A antigen. *J.Clin.Invest* 98:1633-1641.
- Maglott, D., J. Ostell, K. D. Pruitt, and T. Tatusova. 2005. Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. *Nucleic Acids Res.* 33:D54-D58.
- Markman, M. and M. A. Bookman. 2000. Second-line treatment of ovarian cancer. *Oncologist.* 5:26-35.
- Markman, M., J. Markman, K. Webster, K. Zanotti, B. Kulp, G. Peterson, and J. Belinson. 2004. Duration of response to second-line, platinum-based chemotherapy for ovarian cancer: implications for patient management and clinical trial design. *J.Clin.Oncol.* 22:3120-3125.
- Markman, M., R. Rothman, T. Hakes, B. Reichman, W. Hoskins, S. Rubin, W. Jones, L. Almadrones, and J. L. Lewis, Jr. 1991. Second-line platinum therapy in patients with ovarian cancer previously treated with cisplatin. *J.Clin.Oncol.* 9:389-393.
- Marme, A., G. Strauss, G. Bastert, E. M. Grischke, and G. Moldenhauer. 2002. Intraperitoneal bispecific antibody (HEA125xOKT3) therapy inhibits malignant ascites production in advanced ovarian carcinoma. *Int.J.Cancer* 101:183-189.
- Martin, L. and R. Schilder. 2007. Novel approaches in advancing the treatment of epithelial ovarian cancer: the role of angiogenesis inhibition. *J.Clin.Oncol.* 25:2894-2901.
- Matsui, K., J. J. Boniface, P. Steffner, P. A. Reay, and M. M. Davis. 1994. Kinetics of T-cell receptor binding to peptide/I-Ek complexes: correlation of the dissociation rate with T-cell responsiveness. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91:12862-12866.

Literaturverzeichnis

- Matsumoto, T. and H. Mugishima. 2006. Signal transduction via vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors and their roles in atherogenesis. *J.Atheroscler.Thromb.* 13:130-135.
- Mechtersheimer, S., P. Gutwein, N. Agmon-Levin, A. Stoeck, M. Oleszewski, S. Riedle, R. Postina, F. Fahrenholz, M. Fogel, V. Lemmon, and P. Altevogt. 2001. Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins. *J.Cell Biol.* 155:661-673.
- Menon, A. G., G. J. Fleuren, E. A. Alphenaar, L. E. Jonges, C. M. Janssen van Rhijn, N. G. Ensink, H. Putter, R. A. Tollenaar, d. van, V, and P. J. Kuppen. 2003. A basal membrane-like structure surrounding tumour nodules may prevent intraepithelial leucocyte infiltration in colorectal cancer. *Cancer Immunol.Immunother.* 52:121-126.
- Mertz, J. A., R. Kobayashi, and J. P. Dudley. 2007. ALY is a common coactivator of RUNX1 and c-Myb on the type B leukemogenic virus enhancer. *J.Virol.* 81:3503-3513.
- Mewar, D. and A. G. Wilson. 2006. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: a review. *Biomed.Pharmacother.* 60:648-655.
- Moch, H., P. Schraml, L. Bubendorf, M. Mirlacher, J. Kononen, T. Gasser, M. J. Mihatsch, O. P. Kallioniemi, and G. Sauter. 1999. High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma. *Am.J.Pathol.* 154:981-986.
- Mohamedali, K. A., A. T. Poblenz, C. R. Sikes, N. M. Navone, P. E. Thorpe, B. G. Darnay, and M. G. Rosenblum. 2006. Inhibition of prostate tumor growth and bone remodeling by the vascular targeting agent VEGF121/rGel. *Cancer Res.* 66:10919-10928.
- Moos, M., R. Tacke, H. Scherer, D. Teplow, K. Fruh, and M. Schachner. 1988. Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin. *Nature* 334:701-703.
- Mora, J. F., G. J. Van Berkel, C. G. Enke, R. B. Cole, M. Martinez-Sanchez, and J. B. Fenn. 2000. Electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry. *J.Mass Spectrom.* 35:939-952.
- Morel, S., F. Levy, O. Burlet-Schiltz, F. Brasseur, M. Probst-Kepper, A. L. Peitrequin, B. Monsarrat, V. R. Van, J. C. Cerottini, T. Boon, J. E. Gairin, and B. J. Van den Eynde. 2000. Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity.* 12:107-117.
- Morgan-Lappe, S. E., L. A. Tucker, X. Huang, Q. Zhang, A. V. Sarthy, D. Zakula, L. Vernetti, M. Schurdak, J. Wang, and S. W. Fesik. 2007. Identification of Ras-related nuclear protein, targeting protein for xenopus kinesin-like protein 2, and stearyl-CoA desaturase 1 as promising cancer targets from an RNAi-based screen. *Cancer Res.* 67:4390-4398.
- Mullendore, M. E., J. B. Koorstra, Y. M. Li, G. J. Offerhaus, X. Fan, C. M. Henderson, W. Matsui, C. G. Eberhart, A. Maitra, and G. Feldmann. 2009. Ligand-dependent Notch signaling is involved in tumor initiation and tumor maintenance in pancreatic cancer. *Clin.Cancer Res.* 15:2291-2301.

- Müller M. HLA-Ligandom- und Expressions-Analyse von Tumor- und Autophagie-assoziierten Antigenen in soliden Tumoren und Zelllinien. 2008.
Ref Type: Generic
- Munkarah, A. R. and R. L. Coleman. 2004. Critical evaluation of secondary cytoreduction in recurrent ovarian cancer. *Gynecol.Oncol.* 95:273-280.
- Nakae, M., I. Iwamoto, T. Fujino, Y. Maehata, S. Togami, M. Yoshinaga, and T. Douchi. 2006. Preoperative plasma osteopontin level as a biomarker complementary to carbohydrate antigen 125 in predicting ovarian cancer. *J.Obstet.Gynaecol.Res.* 32:309-314.
- Nakagomi, H., M. Petersson, I. Magnusson, C. Juhlin, M. Matsuda, H. Mellstedt, J. L. Taupin, E. Vivier, P. Anderson, and R. Kiessling. 1993. Decreased expression of the signal-transducing zeta chains in tumor-infiltrating T-cells and NK cells of patients with colorectal carcinoma. *Cancer Res.* 53:5610-5612.
- Nakamura, K., E. Taguchi, T. Miura, A. Yamamoto, K. Takahashi, F. Bichat, N. Guilbaud, K. Hasegawa, K. Kubo, Y. Fujiwara, R. Suzuki, K. Kubo, M. Shibuya, and T. Isae. 2006. KRN951, a highly potent inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, has antitumor activities and affects functional vascular properties. *Cancer Res.* 66:9134-9142.
- Narkiewicz, J., D. Klasa-Mazurkiewicz, D. Zurawa-Janicka, J. Skorko-Glonek, J. Emerich, and B. Lipinska. 2008. Changes in mRNA and protein levels of human HtrA1, HtrA2 and HtrA3 in ovarian cancer. *Clin.Biochem.* 41:561-569.
- Nathan, P., D. Chao, C. Brock, P. Savage, M. Harries, M. Gore, and T. Eisen. 2006. The place of VEGF inhibition in the current management of renal cell carcinoma. *Br.J.Cancer* 94:1217-1220.
- Nau, G. J., D. K. Kim, and F. W. Fitch. 1988. Agents that mimic antigen receptor signaling inhibit proliferation of cloned murine T lymphocytes induced by IL-2. *J.Immunol.* 141:3557-3563.
- Nencioni, A., M. R. Muller, F. Grunebach, A. Garuti, M. C. Mingari, F. Patrone, A. Ballestrero, and P. Brossart. 2003. Dendritic cells transfected with tumor RNA for the induction of antitumor CTL in colorectal cancer. *Cancer Gene Ther.* 10:209-214.
- Nesic, D. and S. Vukmanovic. 1998. MHC class I is required for peripheral accumulation of CD8+ thymic emigrants. *J.Immunol.* 160:3705-3712.
- Ng, K. T., K. Man, C. K. Sun, T. K. Lee, R. T. Poon, C. M. Lo, and S. T. Fan. 2006. Clinicopathological significance of homeoprotein Six1 in hepatocellular carcinoma. *Br.J.Cancer* 95:1050-1055.
- Nicodemus, C. F. and J. S. Berek. 2005. Monoclonal antibody therapy of ovarian cancer. *Expert.Rev.Anticancer Ther.* 5:87-96.
- Nielsen, M. B., V. Monsurro, S. A. Migueles, E. Wang, A. Perez-Diez, K. H. Lee, U. Kammula, S. A. Rosenberg, and F. M. Marincola. 2000. Status of activation of circulating vaccine-elicited CD8+ T cells. *J.Immunol.* 165:2287-2296.
- Odunsi, K., A. A. Jungbluth, E. Stockert, F. Qian, S. Gnjjatic, J. Tammela, M. Intengan, A. Beck, B. Keitz, D. Santiago, B. Williamson, M. J. Scanlan, G. Ritter, Y. T. Chen, D.

Literaturverzeichnis

- Driscoll, A. Sood, S. Lele, and L. J. Old. 2003. NY-ESO-1 and LAGE-1 cancer-testis antigens are potential targets for immunotherapy in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res.* 63:6076-6083.
- Oerlemans, R., N. E. Franke, Y. G. Assaraf, J. Cloos, Z. van, I, C. R. Berkers, G. L. Scheffer, K. Debipersad, K. Vojtekova, C. Lemos, J. W. van der Heijden, B. Ylstra, G. J. Peters, G. L. Kaspers, B. A. Dijkmans, R. J. Scheper, and G. Jansen. 2008. Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunit beta5 (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein. *Blood* 112:2489-2499.
- Okada, M., S. W. Jang, and K. Ye. 2008. Akt phosphorylation and nuclear phosphoinositide association mediate mRNA export and cell proliferation activities by ALY. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 105:8649-8654.
- Okamoto, K., T. Kobayashi, T. Kobata, T. Hasunuma, T. Kato, T. Sumida, and K. Nishioka. 2000. Fas-associated death domain protein is a Fas-mediated apoptosis modulator in synoviocytes. *Rheumatology.(Oxford)* 39:471-480.
- Ouellet, V., D. M. Provencher, C. M. Maugard, P. C. Le, F. Ren, C. Lussier, J. Novak, B. Ge, T. J. Hudson, P. N. Tonin, and A. M. Mes-Masson. 2005. Discrimination between serous low malignant potential and invasive epithelial ovarian tumors using molecular profiling. *Oncogene* 24:4672-4687.
- Overwijk, W. W., D. S. Lee, D. R. Surman, K. R. Irvine, C. E. Touloukian, C. C. Chan, M. W. Carroll, B. Moss, S. A. Rosenberg, and N. P. Restifo. 1999. Vaccination with a recombinant vaccinia virus encoding a "self" antigen induces autoimmune vitiligo and tumor cell destruction in mice: requirement for CD4(+) T lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:2982-2987.
- Ozols, R. F., B. N. Bundy, B. E. Greer, J. M. Fowler, D. Clarke-Pearson, R. A. Burger, R. S. Mannel, K. DeGeest, E. M. Hartenbach, and R. Baergen. 2003. Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *J.Clin.Oncol.* 21:3194-3200.
- Pages, F., A. Berger, M. Camus, F. Sanchez-Cabo, A. Costes, R. Molidor, B. Mlecnik, A. Kirilovsky, M. Nilsson, D. Damotte, T. Meatchi, P. Bruneval, P. H. Cugnenc, Z. Trajanoski, W. H. Fridman, and J. Galon. 2005. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N.Engl.J.Med.* 353:2654-2666.
- Pancook, J. D., R. A. Reisfeld, N. Varki, A. Vitiello, R. I. Fox, and A. M. Montgomery. 1997. Expression and regulation of the neural cell adhesion molecule L1 on human cells of myelomonocytic and lymphoid origin. *J.Immunol.* 158:4413-4421.
- Parham, P. and F. M. Brodsky. 1981. Partial purification and some properties of BB7.2. A cytotoxic monoclonal antibody with specificity for HLA-A2 and a variant of HLA-A28. *Hum.Immunol.* 3:277-299.
- Parikh, R. R., Q. Yang, S. A. Higgins, and B. G. Haffty. 2008. Outcomes in young women with breast cancer of triple-negative phenotype: the prognostic significance of CK19 expression. *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.* 70:35-42.
- Park, T. W. and W. C. Kuhn. 2004. Neoadjuvant chemotherapy in ovarian cancer. *Expert.Rev.Anticancer Ther.* 4:639-647.

- Parker, K. C., M. A. Bednarek, and J. E. Coligan. 1994. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J.Immunol.* 152:163-175.
- Pascolo, S., M. Schirle, B. Guckel, T. Dumrese, S. Stumm, S. Kayser, A. Moris, D. Wallwiener, H. G. Rammensee, and S. Stevanovic. 2001. A MAGE-A1 HLA-A A*0201 epitope identified by mass spectrometry. *Cancer Res.* 61:4072-4077.
- Pearce, C. L., A. M. Near, D. J. Van Den Berg, S. J. Ramus, A. Gentry-Maharaj, U. Menon, S. A. Gayther, A. R. Anderson, C. K. Edlund, A. H. Wu, X. Chen, J. Beesley, P. M. Webb, S. K. Holt, C. Chen, J. A. Doherty, M. A. Rossing, A. S. Whittemore, V. McGuire, R. A. DiCioccio, M. T. Goodman, G. Lurie, M. E. Carney, L. R. Wilkens, R. B. Ness, K. B. Moysich, R. Edwards, E. Jennison, S. K. Kjaer, E. Hogdall, C. K. Hogdall, E. L. Goode, T. A. Sellers, R. A. Vierkant, J. C. Cunningham, J. M. Schildkraut, A. Berchuck, P. G. Moorman, E. S. Iversen, D. W. Cramer, K. L. Terry, A. F. Vitonis, L. Titus-Ernstoff, H. Song, P. D. Pharoah, A. B. Spurdle, H. nton-Culver, A. Ziogas, W. Brewster, V. Galitovskiy, and G. Chenevix-Trench. 2009. Validating genetic risk associations for ovarian cancer through the international Ovarian Cancer Association Consortium. *Br.J.Cancer* 100:412-420.
- Peralta-Leal, A., M. I. Rodriguez, and F. J. Oliver. 2008. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 (PARP-1) in carcinogenesis: potential role of PARP inhibitors in cancer treatment. *Clin.Transl.Oncol.* 10:318-323.
- Pfisterer, J., B. Weber, A. Reuss, R. Kimmig, B. A. du, U. Wagner, H. Bourgeois, W. Meier, S. Costa, J. U. Blohmer, A. Lortholary, S. Olbricht, A. Stahle, C. Jackisch, A. C. Hardy-Bessard, V. Mobus, J. Quaas, B. Richter, W. Schroder, J. F. Geay, H. J. Luck, W. Kuhn, H. Meden, U. Nitz, and E. Pujade-Lauraine. 2006. Randomized phase III trial of topotecan following carboplatin and paclitaxel in first-line treatment of advanced ovarian cancer: a gynecologic cancer intergroup trial of the AGO-OVAR and GINECO. *J.Natl.Cancer Inst.* 98:1036-1045.
- Pinto, A. E., S. Andre, G. Silva, S. Vieira, A. C. Santos, S. Dias, and J. Soares. 2009. BCL-6 oncoprotein in breast cancer: loss of expression in disease progression. *Pathobiology* 76:235-242.
- Pittet, M. J., A. Zippelius, D. E. Speiser, M. Assenmacher, P. Guillaume, D. Valmori, D. Lienard, F. Lejeune, J. C. Cerottini, and P. Romero. 2001. Ex vivo IFN-gamma secretion by circulating CD8 T lymphocytes: implications of a novel approach for T cell monitoring in infectious and malignant diseases. *J.Immunol.* 166:7634-7640.
- Pitz, S., R. Moll, S. Storkel, and W. Thoenes. 1987. Expression of intermediate filament proteins in subtypes of renal cell carcinomas and in renal oncocytomas. Distinction of two classes of renal cell tumors. *Lab Invest* 56:642-653.
- Plouet, J., J. Schilling, and D. Gospodarowicz. 1989. Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *EMBO J.* 8:3801-3806.
- Pogge, v. S., V. R. Simhadri, B. von Tresckow, S. Sasse, K. S. Reiners, H. P. Hansen, A. Rothe, B. Boll, V. L. Simhadri, P. Borchmann, P. J. McKinnon, M. Hallek, and A. Engert. 2007. Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the NKp30 receptor on natural killer cells. *Immunity.* 27:965-974.

Literaturverzeichnis

- Polverino, A., A. Coxon, C. Starnes, Z. Diaz, T. DeMelfi, L. Wang, J. Bready, J. Estrada, R. Cattle, S. Kaufman, D. Chen, Y. Gan, G. Kumar, J. Meyer, S. Neervannan, G. Alva, J. Talvenheimo, S. Montestruque, A. Tasker, V. Patel, R. Radinsky, and R. Kendall. 2006. AMG 706, an oral, multikinase inhibitor that selectively targets vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and kit receptors, potently inhibits angiogenesis and induces regression in tumor xenografts. *Cancer Res.* 66:8715-8721.
- Precopio, M. L., M. R. Betts, J. Parrino, D. A. Price, E. Gostick, D. R. Ambrozak, T. E. Asher, D. C. Douek, A. Harari, G. Pantaleo, R. Bailer, B. S. Graham, M. Roederer, and R. A. Koup. 2007. Immunization with vaccinia virus induces polyfunctional and phenotypically distinctive CD8(+) T cell responses. *J.Exp.Med.* 204:1405-1416.
- Presta, L. G., H. Chen, S. J. O'Connor, V. Chisholm, Y. G. Meng, L. Krummen, M. Winkler, and N. Ferrara. 1997. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res.* 57:4593-4599.
- Primiano, T., M. Baig, A. Maliyekkel, B. D. Chang, S. Fellars, J. Sadhu, S. A. Axenovich, T. A. Holzmayer, and I. B. Roninson. 2003. Identification of potential anticancer drug targets through the selection of growth-inhibitory genetic suppressor elements. *Cancer Cell* 4:41-53.
- Probst-Kepper, M., H. J. Hecht, H. Herrmann, V. Janke, F. Ocklenburg, J. Klempnauer, B. J. Van den Eynde, and S. Weiss. 2004. Conformational restraints and flexibility of 14-meric peptides in complex with HLA-B*3501. *J.Immunol.* 173:5610-5616.
- Rabinowich, H., M. Banks, T. E. Reichert, T. F. Logan, J. M. Kirkwood, and T. L. Whiteside. 1996. Expression and activity of signaling molecules in T lymphocytes obtained from patients with metastatic melanoma before and after interleukin 2 therapy. *Clin.Cancer Res.* 2:1263-1274.
- Radojicic, V., K. B. Bezak, M. Skarica, M. A. Pletneva, K. Yoshimura, R. D. Schulick, and L. Luznik. 2010. Cyclophosphamide resets dendritic cell homeostasis and enhances antitumor immunity through effects that extend beyond regulatory T cell elimination. *Cancer Immunol.Immunother.* 59:137-148.
- Rammensee, H., J. Bachmann, N. P. Emmerich, O. A. Bachor, and S. Stevanovic. 1999. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50:213-219.
- Rammensee, H. G., K. Falk, and O. Rotzschke. 1993. MHC molecules as peptide receptors. *Curr.Opin.Immunol.* 5:35-44.
- Rana, R., N. Jagadish, M. Garg, D. Mishra, N. Dahiya, D. Chaurasiya, and A. Suri. 2006. Immunogenicity study of recombinant human sperm-associated antigen 9 in bonnet macaque (*Macaca radiata*). *Hum.Reprod.* 21:2894-2900.
- Raphael, S. J., G. Keown-Eyssen, and S. L. Asa. 1994. High-molecular-weight cytokeratin and cytokeratin-19 in the diagnosis of thyroid tumors. *Mod.Pathol.* 7:295-300.
- Rebai, N. and B. Malissen. 1983. Structural and genetic analyses of HLA class I molecules using monoclonal xenoantibodies. *Tissue Antigens* 22:107-117.

Literaturverzeichnis

- Reinholt, F. P., K. Hultenby, A. Oldberg, and D. Heinegard. 1990. Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87:4473-4475.
- Riker, A. I., U. S. Kammula, M. C. Panelli, E. Wang, G. A. Ohnmacht, S. M. Steinberg, S. A. Rosenberg, and F. M. Marincola. 2000. Threshold levels of gene expression of the melanoma antigen gp100 correlate with tumor cell recognition by cytotoxic T lymphocytes. *Int.J.Cancer* 86:818-826.
- Rini, B. I., S. Halabi, J. Taylor, E. J. Small, and R. L. Schilsky. 2004. Cancer and Leukemia Group B 90206: A randomized phase III trial of interferon-alpha or interferon-alpha plus anti-vascular endothelial growth factor antibody (bevacizumab) in metastatic renal cell carcinoma. *Clin.Cancer Res.* 10:2584-2586.
- Ripperger, T., D. Gadzicki, A. Meindl, and B. Schlegelberger. 2009. Breast cancer susceptibility: current knowledge and implications for genetic counselling. *Eur.J.Hum.Genet.* 17:722-731.
- RKI. Krebs in Deutschland 2003-2004, Häufigkeiten und Trends. 2008.
Ref Type: Report
- Roepstorff, P. and J. Fohlman. 1984. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed.Mass Spectrom.* 11:601.
- Roigas, J. and G. Massenkeil. 2005. Nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation in metastatic renal cell carcinoma: a new therapeutic option or just a clinical experiment? *World J.Urol.* 23:213-220.
- Rooke, R., C. Waltzinger, C. Benoist, and D. Mathis. 1997. Targeted complementation of MHC class II deficiency by intrathymic delivery of recombinant adenoviruses. *Immunity.* 7:123-134.
- Rosati, E., R. Sabatini, G. Rampino, A. Tabilio, I. M. Di, K. Fettucciari, A. Bartoli, S. Coaccioli, I. Screpanti, and P. Marconi. 2009. Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells. *Blood* 113:856-865.
- Rosenberg, S. A., B. S. Packard, P. M. Aebersold, D. Solomon, S. L. Topalian, S. T. Toy, P. Simon, M. T. Lotze, J. C. Yang, C. A. Seipp, and . 1988. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N.Engl.J.Med.* 319:1676-1680.
- Rosenberg, S. A., J. R. Yannelli, J. C. Yang, S. L. Topalian, D. J. Schwartzentruber, J. S. Weber, D. R. Parkinson, C. A. Seipp, J. H. Einhorn, and D. E. White. 1994. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J.Natl.Cancer Inst.* 86:1159-1166.
- Rosenthal, A. and I. Jacobs. 1998. Ovarian cancer screening. *Semin.Oncol.* 25:315-325.
- Roth, C., C. Rochlitz, and P. Kourilsky. 1994. Immune response against tumors. *Adv.Immunol.* 57:281-351.
- Rowen, L., B. F. Koop, and L. Hood. 1996. The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus. *Science* 272:1755-1762.

- Rowinsky, E. K. 2005. Targeted induction of apoptosis in cancer management: the emerging role of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor activating agents. *J.Clin.Oncol.* 23:9394-9407.
- Rump, A., Y. Morikawa, M. Tanaka, S. Minami, N. Umesaki, M. Takeuchi, and A. Miyajima. 2004. Binding of ovarian cancer antigen CA125/MUC16 to mesothelin mediates cell adhesion. *J.Biol.Chem.* 279:9190-9198.
- Ruter, J., B. G. Barnett, I. Kryczek, M. J. Brumlik, B. J. Daniel, G. Coukos, W. Zou, and T. J. Curiel. 2009. Altering regulatory T cell function in cancer immunotherapy: a novel means to boost the efficacy of cancer vaccines. *Front Biosci.* 14:1761-1770.
- Sahin, U., O. Tureci, H. Schmitt, B. Cochlovius, T. Johannes, R. Schmits, F. Stenner, G. Luo, I. Schobert, and M. Pfreundschuh. 1995. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92:11810-11813.
- Saper, M. A., P. J. Bjorkman, and D. C. Wiley. 1991. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *J.Mol.Biol.* 219:277-319.
- Sasada, T., M. Kimura, Y. Yoshida, M. Kanai, and A. Takabayashi. 2003. CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer* 98:1089-1099.
- Scaglia, N. and R. A. Igal. 2008. Inhibition of Stearoyl-CoA Desaturase 1 expression in human lung adenocarcinoma cells impairs tumorigenesis. *Int.J.Oncol.* 33:839-850.
- Schirle, M., W. Keilholz, B. Weber, C. Gouttefangeas, T. Dumrese, H. D. Becker, S. Stevanovic, and H. G. Rammensee. 2000. Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T cell-independent approach. *Eur.J.Immunol.* 30:2216-2225.
- Schirle, M., T. Weinschenk, and S. Stevanovic. 2001. Combining computer algorithms with experimental approaches permits the rapid and accurate identification of T cell epitopes from defined antigens. *J.Immunol.Methods* 257:1-16.
- Schluns, K. S., W. C. Kieper, S. C. Jameson, and L. Lefrancois. 2000. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat.Immunol.* 1:426-432.
- Schmidt-Matthiesen, B. W. 2000. *Gynäkologische Onkologie.*
- Schmitt, M., A. Schmitt, P. Reinhardt, B. Thess, B. Manfras, H. Lindhofer, H. Riechelmann, M. Wiesneth, and S. Gronau. 2004. Opsonization with a trifunctional bispecific (alphaCD3 x alphaEpCAM) antibody results in efficient lysis in vitro and in vivo of EpCAM positive tumor cells by cytotoxic T lymphocytes. *Int.J.Oncol.* 25:841-848.
- Schmitz, M., P. Diestelkoetter, B. Weigle, F. Schmachtenberg, S. Stevanovic, D. Ockert, H. G. Rammensee, and E. P. Rieber. 2000. Generation of survivin-specific CD8+ T effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides. *Cancer Res.* 60:4845-4849.
- Schrader, A. J., Z. Varga, S. Pfoertner, U. Goelden, J. Buer, and R. Hofmann. 2006. Treatment targeted at vascular endothelial growth factor: a promising approach to managing metastatic kidney cancer. *BJU.Int.* 97:461-465.

Literaturverzeichnis

- Schroder, C., U. Schumacher, M. Fogel, F. Feuerhake, V. Muller, R. M. Wirtz, P. Altevogt, S. Krenkel, F. Janicke, and K. Milde-Langosch. 2009. Expression and prognostic value of L1-CAM in breast cancer. *Oncol.Rep.* 22:1109-1117.
- Schroder, K., P. J. Hertzog, T. Ravasi, and D. A. Hume. 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J.Leukoc.Biol.* 75:163-189.
- Schultze, J. L., S. Michalak, M. J. Seamon, G. Dranoff, K. Jung, J. Daley, J. C. Delgado, J. G. Gribben, and L. M. Nadler. 1997. CD40-activated human B cells: an alternative source of highly efficient antigen presenting cells to generate autologous antigen-specific T cells for adoptive immunotherapy. *J.Clin.Invest* 100:2757-2765.
- Schwartz, P. E. 2009. Contemporary considerations for neoadjuvant chemotherapy in primary ovarian cancer. *Curr.Oncol.Rep.* 11:457-465.
- Scotto, L., G. Narayan, S. V. Nandula, H. Arias-Pulido, S. Subramaniam, A. Schneider, A. M. Kaufmann, J. D. Wright, B. Pothuri, M. Mansukhani, and V. V. Murty. 2008. Identification of copy number gain and overexpressed genes on chromosome arm 20q by an integrative genomic approach in cervical cancer: potential role in progression. *Genes Chromosomes.Cancer* 47:755-765.
- Seshadri, R., C. Matthews, A. Dobrovic, and D. J. Horsfall. 1989. The significance of oncogene amplification in primary breast cancer. *Int.J.Cancer* 43:270-272.
- Shetzline, S. E., R. Rallapalli, K. J. Dowd, S. Zou, Y. Nakata, C. R. Swider, A. Kalota, J. K. Choi, and A. M. Gewirtz. 2004. Neuromedin U: a Myb-regulated autocrine growth factor for human myeloid leukemias. *Blood* 104:1833-1840.
- Sheu, B. C., R. H. Lin, H. N. Ho, and S. C. Huang. 1997. Down-regulation of CD25 expression on the surface of activated tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical carcinoma. *Hum.Immunol.* 56:39-48.
- Sheu, B. C., R. H. Lin, H. C. Lien, H. N. Ho, S. M. Hsu, and S. C. Huang. 2001. Predominant Th2/Tc2 polarity of tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical cancer. *J.Immunol.* 167:2972-2978.
- Shigemasa, K., L. J. Underwood, J. Beard, H. Tanimoto, K. Ohama, T. H. Parmley, and T. J. O'Brien. 2000. Overexpression of testisin, a serine protease expressed by testicular germ cells, in epithelial ovarian tumor cells. *J.Soc.Gynecol.Investig.* 7:358-362.
- Shih, C., L. C. Padhy, M. Murray, and R. A. Weinberg. 1981. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* 290:261-264.
- Shortman, K., M. Egerton, G. J. Spangrude, and R. Scollay. 1990. The generation and fate of thymocytes. *Semin.Immunol.* 2:3-12.
- Shurin, M. R., Z. R. Yurkovetsky, I. L. Tourkova, L. Balkir, and G. V. Shurin. 2002. Inhibition of CD40 expression and CD40-mediated dendritic cell function by tumor-derived IL-10. *Int.J.Cancer* 101:61-68.
- Siddiqui, S. A., X. Frigola, S. Bonne-Annee, M. Mercader, S. M. Kuntz, A. E. Krambeck, S. Sengupta, H. Dong, J. C. Cheville, C. M. Lohse, C. J. Krco, W. S. Webster, B. C. Leibovich, M. L. Blute, K. L. Knutson, and E. D. Kwon. 2007. Tumor-infiltrating Foxp3-

- CD4+CD25+ T cells predict poor survival in renal cell carcinoma. *Clin.Cancer Res.* 13:2075-2081.
- Siegel, S., A. Wagner, B. Friedrichs, A. Wendeler, L. Wendel, D. Kabelitz, J. Steinmann, A. Barsoum, J. Coggin, J. Rohrer, P. Dreger, N. Schmitz, and M. Zeis. 2006. Identification of HLA-A*0201-presented T cell epitopes derived from the oncofetal antigen-immature laminin receptor protein in patients with hematological malignancies. *J.Immunol.* 176:6935-6944.
- Skinner, P. J., M. A. Daniels, C. S. Schmidt, S. C. Jameson, and A. T. Haase. 2000. Cutting edge: In situ tetramer staining of antigen-specific T cells in tissues. *J.Immunol.* 165:613-617.
- Skinnider, B. F., A. L. Folpe, R. A. Hennigar, S. D. Lim, C. Cohen, P. Tamboli, A. Young, M. de Peralta-Venturina, and M. B. Amin. 2005. Distribution of cytokeratins and vimentin in adult renal neoplasms and normal renal tissue: potential utility of a cytokeratin antibody panel in the differential diagnosis of renal tumors. *Am.J.Surg.Pathol.* 29:747-754.
- Slansky, J. E., F. M. Rattis, L. F. Boyd, T. Fahmy, E. M. Jaffee, J. P. Schneck, D. H. Margulies, and D. M. Pardoll. 2000. Enhanced antigen-specific antitumor immunity with altered peptide ligands that stabilize the MHC-peptide-TCR complex. *Immunity.* 13:529-538.
- Smith, E. S., A. Mandokhot, E. E. Evans, L. Mueller, M. A. Borrello, D. M. Sahasrabudhe, and M. Zauderer. 2001. Lethality-based selection of recombinant genes in mammalian cells: application to identifying tumor antigens. *Nat.Med.* 7:967-972.
- Smith, R. D., J. A. Loo, C. G. Edmonds, C. J. Barinaga, and H. R. Udseth. 1990. New developments in biochemical mass spectrometry: electrospray ionization. *Anal.Chem.* 62:882-899.
- Smyth, M. J., D. I. Godfrey, and J. A. Trapani. 2001. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat.Immunol.* 2:293-299.
- SNELL, G. D. 1964. METHODS FOR STUDY OF HISTOCOMPATIBILITY GENES AND ISOANTIGENS. *Methods Med.Res.* 10:1-7.
- Song, G., Q. F. Cai, Y. B. Mao, Y. L. Ming, S. D. Bao, and G. L. Ouyang. 2008a. Osteopontin promotes ovarian cancer progression and cell survival and increases HIF-1alpha expression through the PI3-K/Akt pathway. *Cancer Sci.* 99:1901-1907.
- Song, J. Y., J. K. Lee, N. W. Lee, H. H. Jung, S. H. Kim, and K. W. Lee. 2008b. Microarray analysis of normal cervix, carcinoma in situ, and invasive cervical cancer: identification of candidate genes in pathogenesis of invasion in cervical cancer. *Int.J.Gynecol.Cancer* 18:1051-1059.
- Speiser, D. E., D. Lienard, N. Rufer, V. Rubio-Godoy, D. Rimoldi, F. Lejeune, A. M. Krieg, J. C. Cerottini, and P. Romero. 2005. Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909. *J.Clin.Invest* 115:739-746.
- Spiotto, M. T. and H. Schreiber. 2005. Rapid destruction of the tumor microenvironment by CTLs recognizing cancer-specific antigens cross-presented by stromal cells. *Cancer Immun.* 5:8.

Literaturverzeichnis

- Spiotto, M. T., P. Yu, D. A. Rowley, M. I. Nishimura, S. C. Meredith, T. F. Gajewski, Y. X. Fu, and H. Schreiber. 2002. Increasing tumor antigen expression overcomes "ignorance" to solid tumors via crosspresentation by bone marrow-derived stromal cells. *Immunity*. 17:737-747.
- Stevanovic, S. 2002. Identification of tumour-associated T-cell epitopes for vaccine development. *Nat.Rev.Cancer* 2:514-520.
- Stoeck, A., D. Gast, M. P. Sanderson, Y. Issa, P. Gutwein, and P. Altevogt. 2007. L1-CAM in a membrane-bound or soluble form augments protection from apoptosis in ovarian carcinoma cells. *Gynecol.Oncol.* 104:461-469.
- Stratford, A. L., K. Boelaert, L. A. Tannahill, D. S. Kim, A. Warfield, M. C. Eggo, N. J. Gittoes, L. S. Young, J. A. Franklyn, and C. J. McCabe. 2005. Pituitary tumor transforming gene binding factor: a novel transforming gene in thyroid tumorigenesis. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 90:4341-4349.
- Strauss, G., B. Guckel, D. Wallwiener, and G. Moldenhauer. 1999. Without prior stimulation, tumor-associated lymphocytes from malignant effusions lyse autologous tumor cells in the presence of bispecific antibody HEA125xOKT3. *Clin.Cancer Res.* 5:171-180.
- Sui, L., Y. Dong, M. Ohno, Y. Watanabe, K. Sugimoto, and M. Tokuda. 2002. Survivin expression and its correlation with cell proliferation and prognosis in epithelial ovarian tumors. *Int.J.Oncol.* 21:315-320.
- Sun, Y., M. Song, S. Stevanovic, C. Jankowiak, A. Paschen, H. G. Rammensee, and D. Schadendorf. 2000. Identification of a new HLA-A(*)0201-restricted T-cell epitope from the tyrosinase-related protein 2 (TRP2) melanoma antigen. *Int.J.Cancer* 87:399-404.
- Surh, C. D. and J. Sprent. 1994. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 372:100-103.
- Suri, A. 2006. Cancer testis antigens--their importance in immunotherapy and in the early detection of cancer. *Expert.Opin.Biol.Ther.* 6:379-389.
- Sutmoller, R. P., L. M. van Duivenvoorde, E. A. van, T. N. Schumacher, M. E. Wildenberg, J. P. Allison, R. E. Toes, R. Offringa, and C. J. Melief. 2001. Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J.Exp.Med.* 194:823-832.
- Swoboda, R. K., R. Somasundaram, L. Caputo, E. M. Ochoa, P. A. Gimotty, F. M. Marincola, P. Van Belle, S. Barth, D. Elder, D. Guerry, B. Czerniecki, L. Schuchter, R. H. Vonderheide, and D. Herlyn. 2007. Shared MHC class II-dependent melanoma ribosomal protein L8 identified by phage display. *Cancer Res.* 67:3555-3559.
- Tada, T., S. Ohzeki, K. Utsumi, H. Takiuchi, M. Muramatsu, X. F. Li, J. Shimizu, H. Fujiwara, and T. Hamaoka. 1991. Transforming growth factor-beta-induced inhibition of T cell function. Susceptibility difference in T cells of various phenotypes and functions and its relevance to immunosuppression in the tumor-bearing state. *J.Immunol.* 146:1077-1082.
- Takahashi, K., C. Furukawa, A. Takano, N. Ishikawa, T. Kato, S. Hayama, C. Suzuki, W. Yasui, K. Inai, S. Sone, T. Ito, H. Nishimura, E. Tsuchiya, Y. Nakamura, and Y.

Literaturverzeichnis

- Daigo. 2006. The neuromedin U-growth hormone secretagogue receptor 1b/neurotensin receptor 1 oncogenic signaling pathway as a therapeutic target for lung cancer. *Cancer Res.* 66:9408-9419.
- Tamez, S., C. Norizoe, K. Ochiai, D. Takahashi, A. Shimojima, Y. Tsutsumi, N. Yanaihara, T. Tanaka, A. Okamoto, and M. Urashima. 2009. Vitamin D receptor polymorphisms and prognosis of patients with epithelial ovarian cancer. *Br.J.Cancer* 101:1957-1960.
- Tanchot, C., F. A. Lemonnier, B. Perarnau, A. A. Freitas, and B. Rocha. 1997. Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells. *Science* 276:2057-2062.
- Tang, T., M. Kmet, L. Corral, S. Vartanian, A. Tobler, and J. Papkoff. 2005. Testisin, a glycosyl-phosphatidylinositol-linked serine protease, promotes malignant transformation in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 65:868-878.
- Tebes, S. J., R. A. Sayer, J. M. Palmer, C. C. Tebes, M. A. Martino, and M. S. Hoffman. 2007. Cytoreductive surgery for patients with recurrent epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol.Oncol.* 106:482-487.
- Thalmann, G. N., R. A. Sikes, R. E. Devoll, J. A. Kiefer, R. Markwalder, I. Klima, C. M. Farach-Carson, U. E. Studer, and L. W. Chung. 1999. Osteopontin: possible role in prostate cancer progression. *Clin.Cancer Res.* 5:2271-2277.
- Thigpen, J. T. 1999. Limited-stage ovarian carcinoma. *Semin.Oncol.* 26:29-33.
- Thomas, A. M., L. M. Santarsiero, E. R. Lutz, T. D. Armstrong, Y. C. Chen, L. Q. Huang, D. A. Laheru, M. Goggins, R. H. Hruban, and E. M. Jaffee. 2004. Mesothelin-specific CD8(+) T cell responses provide evidence of in vivo cross-priming by antigen-presenting cells in vaccinated pancreatic cancer patients. *J.Exp.Med.* 200:297-306.
- Tischer, E., R. Mitchell, T. Hartman, M. Silva, D. Gospodarowicz, J. C. Fiddes, and J. A. Abraham. 1991. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J.Biol.Chem.* 266:11947-11954.
- Toes, R. E., F. Ossendorp, R. Offringa, and C. J. Melief. 1999. CD4 T cells and their role in antitumor immune responses. *J.Exp.Med.* 189:753-756.
- Topalian, S. L., D. Solomon, F. P. Avis, A. E. Chang, D. L. Freerksen, W. M. Linehan, M. T. Lotze, C. N. Robertson, C. A. Seipp, P. Simon, and . 1988. Immunotherapy of patients with advanced cancer using tumor-infiltrating lymphocytes and recombinant interleukin-2: a pilot study. *J.Clin.Oncol.* 6:839-853.
- Townsend, S. E. and J. P. Allison. 1993. Tumor rejection after direct costimulation of CD8+ T cells by B7-transfected melanoma cells. *Science* 259:368-370.
- Trask, D. K., V. Band, D. A. Zajchowski, P. Yaswen, T. Suh, and R. Sager. 1990. Keratins as markers that distinguish normal and tumor-derived mammary epithelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87:2319-2323.
- Trimbos, J. B., I. Vergote, G. Bolis, J. B. Vermorken, C. Mangioni, C. Madronal, M. Franchi, S. Tateo, G. Zanetta, G. Scarfone, L. Giurgea, P. Timmers, C. Coens, and S. Pecorelli. 2003. Impact of adjuvant chemotherapy and surgical staging in early-stage

- ovarian carcinoma: European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Adjuvant ChemoTherapy in Ovarian Neoplasm trial. *J.Natl.Cancer Inst.* 95:113-125.
- Troy, A. E. and H. Shen. 2003. Cutting edge: homeostatic proliferation of peripheral T lymphocytes is regulated by clonal competition. *J.Immunol.* 170:672-676.
- Tuck, A. B., F. P. O'Malley, H. Singhal, J. F. Harris, K. S. Tonkin, N. Kerkvliet, Z. Saad, G. S. Doig, and A. F. Chambers. 1998. Osteopontin expression in a group of lymph node negative breast cancer patients. *Int.J.Cancer* 79:502-508.
- Uchikado, Y., H. Inoue, N. Haraguchi, K. Mimori, S. Natsugoe, H. Okumura, T. Aikou, and M. Mori. 2006. Gene expression profiling of lymph node metastasis by oligomicroarray analysis using laser microdissection in esophageal squamous cell carcinoma. *Int.J.Oncol.* 29:1337-1347.
- Urbanowicz-Kachnowicz, I., N. Baghdassarian, C. Nakache, D. Gracia, Y. Mekki, P. A. Bryon, and M. Ffrench. 1999. cksbs expression is linked to cell proliferation in normal and malignant human lymphoid cells. *Int.J.Cancer* 82:98-104.
- Vallbohmer, D., J. H. Peters, D. Oh, H. Kuramochi, D. Shimizu, S. R. Demeester, J. A. Hagen, P. T. Chandrasoma, K. D. Danenberg, T. R. DeMeester, and P. Danenberg. 2005. Survivin, a potential biomarker in the development of Barrett's adenocarcinoma. *Surgery* 138:701-706.
- Valle, A., C. E. Zuber, T. Defrance, O. Djossou, R. M. De, and J. Banchereau. 1989. Activation of human B lymphocytes through CD40 and interleukin 4. *Eur.J.Immunol.* 19:1463-1467.
- Valmori, D., C. Scheibenbogen, V. Dutoit, D. Nagorsen, A. M. Asemisen, V. Rubio-Godoy, D. Rimoldi, P. Guillaume, P. Romero, D. Schadendorf, M. Lipp, P. Y. Dietrich, E. Thiel, J. C. Cerottini, D. Lienard, and U. Keilholz. 2002. Circulating Tumor-reactive CD8(+) T cells in melanoma patients contain a CD45RA(+)CCR7(-) effector subset exerting ex vivo tumor-specific cytolytic activity. *Cancer Res.* 62:1743-1750.
- Van den Eynde, B. J., B. Gaugler, M. Probst-Kepper, L. Michaux, O. Devuyst, F. Lorge, P. Weynants, and T. Boon. 1999. A new antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human kidney tumor results from reverse strand transcription. *J.Exp.Med.* 190:1793-1800.
- van der Bruggen P., C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, P. E. De, E. B. Van den, A. Knuth, and T. Boon. 1991. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254:1643-1647.
- van der Burg, S. H., E. Ras, J. W. Drijfhout, W. E. Benckhuijsen, A. J. Bremers, C. J. Melief, and W. M. Kast. 1995. An HLA class I peptide-binding assay based on competition for binding to class I molecules on intact human B cells. Identification of conserved HIV-1 polymerase peptides binding to HLA-A*0301. *Hum.Immunol.* 44:189-198.
- van Haaften-Day, C., Y. Shen, F. Xu, Y. Yu, A. Berchuck, L. J. Havrilesky, H. W. de Bruijn, A. G. van der Zee, R. C. Bast, Jr., and N. F. Hacker. 2001. OVX1, macrophage-colony stimulating factor, and CA-125-II as tumor markers for epithelial ovarian carcinoma: a critical appraisal. *Cancer* 92:2837-2844.
- van, E. A., R. P. Suttmuller, A. A. Hurwitz, J. Ziskin, J. Villasenor, J. P. Medema, W. W. Overwijk, N. P. Restifo, C. J. Melief, R. Offringa, and J. P. Allison. 2001. Elucidating

- the autoimmune and antitumor effector mechanisms of a treatment based on cytotoxic T lymphocyte antigen-4 blockade in combination with a B16 melanoma vaccine: comparison of prophylaxis and therapy. *J.Exp.Med.* 194:481-489.
- Vanderkwaak, T. J. and R. D. Alvarez. 1999. Immune directed therapy for ovarian carcinoma. *Curr.Opin.Obstet.Gynecol.* 11:29-34.
- Verri, E., P. Guglielmini, M. Puntoni, L. Perdelli, A. Papadia, P. Lorenzi, A. Rubagotti, N. Ragni, and F. Boccardo. 2005. HER2/neu oncoprotein overexpression in epithelial ovarian cancer: evaluation of its prevalence and prognostic significance. *Clinical study. Oncology* 68:154-161.
- Vitale, M., R. Rezzani, L. Rodella, G. Zauli, P. Grigolato, M. Cadei, D. J. Hicklin, and S. Ferrone. 1998. HLA class I antigen and transporter associated with antigen processing (TAP1 and TAP2) down-regulation in high-grade primary breast carcinoma lesions. *Cancer Res.* 58:737-742.
- Vogelstein, B., E. R. Fearon, S. R. Hamilton, S. E. Kern, A. C. Preisinger, M. Leppert, Y. Nakamura, R. White, A. M. Smits, and J. L. Bos. 1988. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N.Engl.J.Med.* 319:525-532.
- Vonderheide, R. H., W. C. Hahn, J. L. Schultze, and L. M. Nadler. 1999. The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity.* 10:673-679.
- Wan, G., S. Zhaorigetu, Z. Liu, R. Kaini, Z. Jiang, and C. A. Hu. 2008. Apolipoprotein L1, a novel Bcl-2 homology domain 3-only lipid-binding protein, induces autophagic cell death. *J.Biol.Chem.* 283:21540-21549.
- Wei, C. L., Q. Wu, V. B. Vega, K. P. Chiu, P. Ng, T. Zhang, A. Shahab, H. C. Yong, Y. Fu, Z. Weng, J. Liu, X. D. Zhao, J. L. Chew, Y. L. Lee, V. A. Kuznetsov, W. K. Sung, L. D. Miller, B. Lim, E. T. Liu, Q. Yu, H. H. Ng, and Y. Ruan. 2006. A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. *Cell* 124:207-219.
- Weiner, L. M. and H. Borghaei. 2006. Targeted therapies in solid tumors: monoclonal antibodies and small molecules. *Hum.Antibodies* 15:103-111.
- Weinschenk, T., C. Gouttefangeas, M. Schirle, F. Obermayr, S. Walter, O. Schoor, R. Kurek, W. Loeser, K. H. Bichler, D. Wernet, S. Stevanovic, and H. G. Rammensee. 2002. Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. *Cancer Res.* 62:5818-5827.
- Weinzierl, A. O. Quantitativer Vergleich von Transkriptom und HLA-Ligandom in Tumoren. 2004.
Ref Type: Generic
- Weinzierl, A. O., C. Lemmel, O. Schoor, M. Muller, T. Kruger, D. Wernet, J. Hennenlotter, A. Stenzl, K. Klingel, H. G. Rammensee, and S. Stevanovic. 2007. Distorted relation between mRNA copy number and corresponding major histocompatibility complex ligand density on the cell surface. *Mol.Cell Proteomics.* 6:102-113.
- Weinzierl, A. O., D. Maurer, F. Altenberend, N. Schneiderhan-Marra, K. Klingel, O. Schoor, D. Wernet, T. Joos, H. G. Rammensee, and S. Stevanovic. 2008. A cryptic vascular endothelial growth factor T-cell epitope: identification and characterization by mass spectrometry and T-cell assays. *Cancer Res.* 68:2447-2454.

Literaturverzeichnis

- Whelan, J. A., P. R. Dunbar, D. A. Price, M. A. Purbhoo, F. Lechner, G. S. Ogg, G. Griffiths, R. E. Phillips, V. Cerundolo, and A. K. Sewell. 1999. Specificity of CTL interactions with peptide-MHC class I tetrameric complexes is temperature dependent. *J.Immunol.* 163:4342-4348.
- Whiteside, T. L., S. Miescher, J. Hurlimann, L. Moretta, and F. Von, V. 1986. Separation, phenotyping and limiting dilution analysis of T-lymphocytes infiltrating human solid tumors. *Int.J.Cancer* 37:803-811.
- Williams, A., C. A. Peh, and T. Elliott. 2002. The cell biology of MHC class I antigen presentation. *Tissue Antigens* 59:3-17.
- Witherden, D., O. N. van, C. Waltzinger, A. Weiss, C. Benoist, and D. Mathis. 2000. Tetracycline-controllable selection of CD4(+) T cells: half-life and survival signals in the absence of major histocompatibility complex class II molecules. *J.Exp.Med.* 191:355-364.
- Wolf, A. M., D. Wolf, M. Steurer, G. Gastl, E. Gunsilius, and B. Grubeck-Loebenstein. 2003. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin.Cancer Res.* 9:606-612.
- Wysocki, V. H., G. Tsaprailis, L. L. Smith, and L. A. Breci. 2000. Special feature: Commentary - Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation. *Journal of Mass Spectrometry* 35:1399-1406.
- Yoshikawa, R., H. Yanagi, T. Hashimoto-Tamaoki, T. Morinaga, Y. Nakano, M. Noda, Y. Fujiwara, H. Okamura, and T. Yamamura. 2004. Gene expression in response to anti-tumour intervention by polysaccharide-K (PSK) in colorectal carcinoma cells. *Oncology Reports* 12:1287-1293.
- Yu, P., Y. Lee, W. Liu, R. K. Chin, J. Wang, Y. Wang, A. Schietinger, M. Philip, H. Schreiber, and Y. X. Fu. 2004. Priming of naive T cells inside tumors leads to eradication of established tumors. *Nat.Immunol.* 5:141-149.
- Zhang, L., J. R. Conejo-Garcia, D. Katsaros, P. A. Gimotty, M. Massobrio, G. Regnani, A. Makrigiannakis, H. Gray, K. Schlienger, M. N. Liebman, S. C. Rubin, and G. Coukos. 2003. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N.Engl.J.Med.* 348:203-213.
- Zhong, L. P., W. T. Chen, C. P. Zhang, and Z. Y. Zhang. 2007. Increased CK19 expression correlated with pathologic differentiation grade and prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.* 104:377-384.
- Zhu, K., D. Qu, T. Sakamoto, I. Fukasawa, M. Hayashi, and N. Inaba. 2008. Telomerase expression and cell proliferation in ovarian cancer cells induced by histone deacetylase inhibitors. *Arch.Gynecol.Obstet.* 277:15-19.



Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität an
am Universitätsklinikum Tübingen, Schleichstrasse 8, D-72076 Tübingen

Herrn
OA Dr. med. Alexander Marmé
Universitäts-Frauenklinik mit Poliklinik
Gynäko-Onkologie
Calwerstraße 7
72076 TÜBINGEN

Universitätsklinikum Tübingen
Ethik-Kommission der
Medizinischen Fakultät

Vorsitzender
Prof. Dr. med. D. Luft

☎ 07071-29 77661
Fax 07071-29 5965
ethik.kommission@med.uni-tuebingen.de

nachrichtlich:
Herrn Prof.Dr.med. Diethelm Wallwiener

9. Februar 2007
Datum

113/2006V
Projekt-Nummer
Bitte stets angeben

7.2.2007
eingegangen am

Entwicklung einer Multipitop-Vakzine gegen Antigene des Ovarialkarzinoms und tumorassoziiertes Endothel.

Hier:

Prüfplan Version 1 vom 1. Februar 2007, ergänzte Patientinneninformation und Einverständniserklärung.

Sehr geehrter Herr Kollege,

die ergänzenden Unterlagen zur genannten Studie haben der Ethik-Kommission zur Beratung vorgelegen. Mit den Ergänzungen in der Patientinneninformation und der Einverständniserklärung wurden die im Votum vom 26. April 2006 genannten Empfehlungen der Ethik-Kommission berücksichtigt.

Danach bestehen gegen die Durchführung dieser Studie seitens der Kommission keine Bedenken.

Die Ethik-Kommission geht davon aus, daß auch in der Datenbank, in der die Ergebnisse zusammengeführt werden sollen, ausschließlich verschlüsselte Daten verwendet werden.

Da laut Prüfplan die Patientinnen auf deren Wunsch über etwaige therapeutische Optionen, die sich aus den Studienergebnissen ergeben, informiert werden können, sollte in der Einverständniserklärung eine entsprechende Wahloption angeboten werden.

Für die Durchführung Ihres Studienvorhabens wünschen wir viel Erfolg.

Mit freundlichen Grüßen

Prof.Dr.med. Dieter Luft
Vorsitzender der Ethik-Kommission

Seite 2

ALLGEMEINE HINWEISE ZUM VOTUM DER ETHIK-KOMMISSION

Mitglieder der Ethik-Kommission

Privatdozent Dr.med. Margitta Albinus	Pharmakologie, Toxikologie
Professor Dr.med. Henner Giedke	Psychiatrie
Professor Dr.med. Else Heidemann	Innere Medizin
Professor Dr.med. Dieter Luft	Innere Medizin
Professor Dr.med. Christian F. Poets	Kinderheilkunde
Professor Dr.med. Dr.theol. Dietrich Rössler	Medizinische Ethik und Praktische Theologie
Professor Dr.jur. Dr.h.c. Georg Sandberger	Medizinorganisationsrecht, Hochschulrecht, deutsches und internationales Wirtschaftsrecht
Professor Dr.med. Reinhard Teichmann	Allgemeine Chirurgie
Professor Dr.med. Dr.phil. Urban Wiesing	Medizinische Ethik und Theoretische Medizin

Die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen verfährt entsprechend den GCP-/ICH- Richtlinien, der Deklaration von Helsinki in der jeweils gültigen Fassung sowie den gesetzlichen Bestimmungen.

Die Ethik-Kommission ist gemäß § 20 Abs. 7 MPG, Aktenzeichen: Z14-A1871-14924/97, gemäß § 92 Strahlenschutzverordnung, Aktenzeichen: Z 2.1.2-22471/2-EK-012-Ber und gemäß § 28g der Röntgenverordnung, Aktenzeichen: Z 2.1.2-22472/2.EK-013/R registriert.

Unabhängig vom Beratungsergebnis macht die Ethik-Kommission darauf aufmerksam, dass die medizinische, ethische und rechtliche Verantwortung für die Durchführung einer klinischen Prüfung beim Leiter der klinischen Prüfung und auch bei allen an der Prüfung teilnehmenden Ärzten liegt.

Änderungen im Prüfplan und in der Phase der Umsetzung bitten wir der Kommission mitzuteilen; dabei wären wir Ihnen dankbar, wenn Sie geänderte Passagen deutlich kennzeichnen würden.

Nach Abschluss der Studie bittet die Kommission um einen abschließenden Bericht.



Universitätsklinikum Tübingen

Ethik-Kommission an der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität
und am Universitätsklinikum Tübingen, Schleichstrasse 8, D-72076 Tübingen

Ethik-Kommission
an der Medizinischen Fakultät
und am Universitätsklinikum

Herr
OA Dr. med. Alexander Marmé
Gynäko-Onkologie
Universitäts-Frauenklinik mit Poliklinik
Calwerstraße 7
72076 Tübingen

Vorsitzender
Prof. Dr. med. D. Luft

☎ 07071-29 77661
Fax 07071-29 5965
ethik.kommission@med.uni-tuebingen.de

nachrichtlich:
Herr Prof. Dr. med. Diethelm Wallwiener

353/2007BO2
unsere Projekt Nummer

4. September 2007
eingegangen am

17. Oktober 2007
Datum

Analyse von HLA-Liganden aus Ovarialcarzinom-Gewebe. Version 1 vom 30. 08.07
Begleitschreiben vom 27.08.2007

Sehr geehrter Herr Kollege,

die Unterlagen zur oben genannten Studie haben der Ethik-Kommission an der Medizinischen Fakultät und am Universitätsklinikum Tübingen zur Beratung vorgelegen. Danach bestehen seitens der Ethik-Kommission keine Bedenken gegen die Durchführung dieser Studie.

Die Ethik-Kommission geht davon aus, (Abschnitt 1.2) dass Gegenstand des jetzt vorgelegten Prüfplans ausschließlich die Charakterisierung von HLA-Liganden Ovarialcarzinom-assoziiert Antigenen und T-Zellepitope ist und dass für die geplante Phase I/II-Studie ein den Anforderungen des AMG genügender Prüfplan vorgelegt werden wird.

Für die Durchführung der Untersuchung wünschen wir Ihnen viel Erfolg.

Mit freundlichen Grüßen


Prof. Dr. med. Dieter Luft
Vorsitzender der Ethik-Kommission

Seite 2

FB/666_08/2007 - BZ

Universitätsklinikum Tübingen
Anstalt des öffentlichen Rechts
Sitz Tübingen
Geissweg 3 - 72076 Tübingen
Telefon: (0 70 71) 29-0
www.medin.uni-tuebingen.de
Steuer-Nr. 86156/09402
USt-ID: DE 146 889 674

Aufsichtsrat
Julian Würtenberger
(Vorsitzender)

Vorstand
Prof. Dr. Michael Bamberg (Vorsitzender)
Rüdiger Strehl (Stellv. Vorsitzender)*
Gabriele Sonntag (Stellv. Vorsitzende)*
Prof. Dr. Karl Ulrich Bartz-Schmidt
Prof. Dr. Ingo B. Autenrieth
Günther Brenzel
* wechselseitige Vertretungsbefugnis

Banken
Baden-Württembergische Bank Stuttgart
(BLZ 600 501 01) Konto-Nr. 7477 5037 93
IBAN: DE41 6005 0101 7477 5037 93
SWIFT-Nr.: SOLADEST
Kreissparkasse Tübingen
(BLZ 641 500 20) Konto-Nr. 14 144
IBAN: DE79 6415 0020 0000 0141 44
SWIFT-Nr.: SOLADES1TUB

Publikationen und Kongressbeiträge

Veröffentlichung:

Automated overexpression and isotopic labelling of biologically active oncoproteins in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120.

Desplancq D, Rinaldi AS, Hörzer H, Ho Y, Nierengarten H, Atkinson RA, Kieffer B, Weiss E. *Biotechnol Appl Biochem*. 2008 Sep;51 (PT1):53-61.

Abstracts:

Götze J, Hörzer H, Stevanović S, Sigurdardóttir D, Schäfer R, Gückel B. New T cell epitopes from CA125, SPAG9 and mesothelin as candidates for immunotherapy of ovarian cancer. 7th annual CIMT meeting, may 2009, Mainz

Hörzer H, Oliver Drews O, Nina Hillen N, Sigurdardóttir D, Stevanovic S, Staebler A, Wallwiener D, Gückel B. Identification of new MHC class-I ligands on ovarian carcinoma by mass spectrometry: basis for immunotherapy. 7th annual CIMT meeting, may 2009, Mainz

Sigurdardóttir D, Hörzer H, Staebler A, Gückel B, and Rammensee HG. Phenotypic and functional analysis of tumor infiltrating lymphocytes suggests complex interactions between TILs in ovarian cancer. 7th annual CIMT meeting, may 2009, Mainz

Hörzer H, Marmé A, Stevanovic S, Altevogt P, Wallwiener D, Gückel B. Entwicklung einer Peptid-basierten Vakzine gegen Antigene des Ovarialkarzinoms (OvCa) und dessen Tumor-assoziiertem Endothel. DGGG 2008 Hamburg, *GebFra* S179, 2008

Hörzer H, Stevanovic S, Marmé A, Altevogt P, Wallwiener D, Gückel B. Development of a peptide-vaccine targeting ovarian carcinomas and their vasculature. 6th annual CIMT meeting, may 2008, Mainz

Hörzer H, Stevanovic S, Marmé A, Altevogt P, Walwiener D, Gückel B. Development of a peptide-vaccine targeting ovarian carcinoma and their vasculature. *In J Cancer Res and Treat* 2008; 31 (suppl 1):107

Hörzer H, Stevanovic S, Marmé A, Altevogt P, Walwiener D, Gückel B. Development of a peptide-vaccine targeting ovarian carcinoma and their vasculature. *5th annual CIMT meeting*, april 2007, Würzburg, P17

In Vorbereitung (Arbeitstitel):

Brigitte Gückel, Helen Hörzer, Ana-Cristina Bagú, Despina Rudolf, Simone Kayser, Dorothee Wernet, Dagmar Sigurdardóttir, Stefan Stevanović Induction of cytotoxic T cells against mucin-1-derived peptides modified at human leukocyte antigen-A2 binding residues.

Helen Hörzer, Dagmar Sigurdardóttir, Josefine Götze, Stefan Stevanovic, Peter Altevogt, Diethelm Wallwiener, Brigitte Gückel. Identification of two new T cell epitopes derived from OvCa associated antigen L1CAM.

Danksagungen

Mein Dank geht zunächst an PD Dr. Brigitte Gückel, die mich die ganzen vier Jahre über in allem unterstützt hat was ich angefangen habe. Für die Freiräume, die ich hatte und das immer offene Ohr für neue Projekte, aber auch die wunderbare Betreuung bei allem was das Präsentieren und Schreiben meiner Ergebnisse angeht. Trotz harter Zeiten und vieler Rückschläge hat sie den Mut nie verloren und mich immer unterstützt.

Weiter möchte ich Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee dafür danken, dass er mich so selbstverständlich in seiner Abteilung aufgenommen hat, wo ich so viel sowohl vom Wissen als auch von der hervorragenden Arbeitsatmosphäre profitiert habe. Auch er hatte immer ein offenes Ohr und hat mich sowohl wissenschaftlich als auch während meiner Schwangerschaften wunderbar unterstützt.

Dann möchte ich Prof. Dr. Stevanovic danken für das Interesse an immer neuen Projekten und die nicht abreißende Flut an neuen Peptiden und die Hilfe bei allem was Massenspektrometrie und HLA-Typisierung meiner exotischen HLA-Liganden angeht. Danke auch für die Blitzkorrekturen mit seinem „Adlerauge“.

Vielen Dank an Patricia Hrstic für die Synthese der unendlich vielen Peptide, aber auch für ihr wundervolle Freundschaft und die schönen Jogginggespräche.

Großen Dank auch an das MS-Team Margret Müller, Nina Hillen für die viele Geduld, mir das Auswerten von Massenspektren beizubringen. Weiter danke ich besonders Oli Drews für die ständige Bereitschaft bei der Lösung von Problemen aller Art. Oli und Marc Günder danke ich ausserdem für die Hilfe beim Messen meiner Proben zu jeder Tageszeit.

Dr. Dagmar Sigurdardottir möchte ich danken für gute Kooperation und Ihren Tatendrang, der uns alle mitriss, für die vielen unersetzbaren Tipps und Tricks und dafür, dass Sie mir manchmal die Augen fürs Wesentliche geöffnet hat.

Ebenfalls ein herzliches Dankeschön an Dr. Annette Stäbler für die interessanten Kooperationsgespräche und die nicht abreißende Flut an OvCa-Proben.

Weiter danke ich den immer wechselnden Mitarbeiter/innen der AG Gückel. Den TAs Bea Hoffmann, Melanie Kraft und schließlich Brigitte Frank für ihre Unterstützung. Weiter Danke ich Lena Herms für die schöne Zeit und Freundschaft und auch für das Einfrieren der vielen

Anhang

OvCa Blutproben, aber auch Valentins Nabelschnurblut! Viele Dank an Josefine Götze, meine Muster-Diplomandin für Ihr Engagement und unendlichen Fleiß. Vielen Dank auch an Janet Peper und Maria Schewe, die weiter die Stellung halten und durch Dick und Dünn gehen.

Weiter gebührt mein Dank Beate Pömmel, Claudia Falkenburger und Franziska Löwenstein für die Geduld und Hilfe bei allen lösbaeren und unlösbaeren Problemen.

Lynne Yakes und Gerhard Hörr danke ich für ihre Hilfe und die souveräne Organisation der Abteilung.

Herzlichen Dank auch an die vielen Mitarbeiter der Abteilung Immunologie, Stevanovics, Deckers, Ceciles, Jungs und Steinles für die wunderbare Arbeitsatmosphäre und Hilfe aller Art.

Danke auch an Stefan Löb, Dr. Richard Schäfer und die Mitarbeiterinnen der Blutbank, die den Strom an frischem Spenderblut nicht abreißen ließen.

Vielen Dank an die DFG und das Schlieben-Lange-Programm für die großzügige finanzielle Unterstützung.

Herzlichen Dank auch an die Koordinatorinnen und Koordinatoren des Graduiertenkollegs 794 Bettina Weiss, Julia Stalleicken, Mirjam Knöll und Jürgen Frank für ihr Engagement.

Besonders danke ich schließlich dem Oma, Opa, Oma, Opa-Team ohne die ich weder die praktische Arbeit noch das Schreiben dieses Werkes je zu Ende hätte bringen können. Danke für die unendliche Geduld, die nicht endende Versorgung mit warmen Mahlzeiten, Tee und Obsttellern.

Schließlich danke ich meinem Mann und meinem Sohn für die Liebe, den Rückhalt und die Motivation, die sie mir in jeder Pause gegeben haben.

Lebenslauf

Name: Helen Hörzer
Geburtsdatum: 11. November 1979
Geburtsort: Filderstadt
Nationalität: deutsch
Familienstand: verheiratet, ein Sohn (*13.03.2008)

1986 – 1990 Besuch der Kirchfeldschule (Grundschule), Kirchentellinsfurt

1990 - 1999 Besuch des Wildermuth-Gymnasium Tübingen

10/ 2000 – 08/ 2002 Grundstudium Chemie (Diplom) an der Albert-Ludwigs
Universität Freiburg

09/ 2002 – 01/ 2005 Hauptstudium der Biotechnologie an der ESBS (Ecole
Supérieure de Biotechnologie Strasbourg)

01/ 2005 – 09/ 2005 Diplomarbeit an der ESBS
Thema: Expression von E6 mittels induzierbarem
Expressionssystem in Cyanobakterien, Isolierung und
Markierung von E6 für NMR Analysen
Betreuer: Prof. E. Weiss, Immunotechnologie

12/ 2005 – 03/ 2009 Promotion an der Universitäts-Frauenklinik Tübingen
Thema: Identifizierung neuer T-Zellepitope als Grundlage
einer Peptid-basierten Immuntherapie für Ovarialkarzinom-
Patientinnen
Betreuerin: PD Dr. Brigitte Gückel, Abt. Tumormmunologie