

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

Qualitative und quantitative Analyse und Vergleich von
Tumorantigenen und HLA Klasse I-Liganden in
Primärtumoren und Metastasen des Nierenzellkarzinoms

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhardt Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Juliane Sarah Stickel
aus Calw

2011

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

Qualitative und quantitative Analyse und Vergleich von
Tumorantigenen und HLA Klasse I-Liganden in
Primärtumoren und Metastasen des Nierenzellkarzinoms

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhardt Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Juliane Sarah Stickel
aus Calw

2011

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Stevanović

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Salih

3. Berichterstatter: Professor Dr. B. Seliger

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	1
1.1 VOM HLA-MOLEKÜL ZUR IMMUNTHERAPIE.....	1
1.1.1 Aufbau und Funktion des MHC-Moleküls	2
1.1.1.1 Aufbau des MHC-I-Komplexes	4
1.1.1.2 Aufbau des MHC-II-Komplexes	5
1.1.2 Antigenprozessierung und Antigenpräsentation auf MHC-I-Moleküle	5
1.1.3 Aufbau des T-Zell-Rezeptors (TCR).....	7
1.1.4 Interaktion zwischen MHC-I und TCR	8
1.1.5 Signaltransduktion und Funktion der CD8-T-Zellen.....	9
1.1.6 Krebs und Immunsystem.....	11
1.1.6.1 Immunüberwachung	11
1.1.6.2 Tumorimmunogenität.....	13
1.1.6.3 Immun-Escape-Mechanismen von Tumoren	13
1.1.7 Immuntherapie	14
1.1.7.1 Antikörper	15
1.1.7.2 T-Zell und NK-Zelltransfer	17
1.1.7.3 T-Zellrezeptor-Transfer.....	18
1.1.7.4 Tumorstoffe	18
1.1.7.5 Immunadjuvantien	20
1.2 METASTASEN	22
1.2.1 Definition	22
1.2.2 Einteilung und Ausbreitungsmechanismen	22
1.2.3 Metastasierungsprozess	25
1.3 DAS NIERENZELLKARZINOM.....	30
1.3.1 Einteilung, Staging und Grading.....	30
1.3.2 Pathomechanismen der Entstehung	33
1.3.3 Metastasen.....	34
1.3.4 Klinik und Diagnose.....	36
1.3.5 Therapie	38
1.3.5.1 Targettherapie	39
1.3.5.2 Immuntherapie.....	42
1.4 ZIELE DER ARBEIT	46
2. MATERIAL UND METHODEN.....	48
2.1 ISOLIERUNG HLA-KLASSE-I-GEBUNDENER PEPTIDE	48
2.1.1 Auswahl der Patienten, verwendetes Gewebematerial	48
2.1.2 Herstellung des Gewebelysats	49
2.1.3 Affinitätschromatographie mittels BrCN-Säule	50
2.1.3.1 Antikörper	50
2.1.3.2 Herstellung der Affinitätschromatographiesäulen	50
2.1.3.3 Durchführung der Affinitätschromatographie	51
2.1.3.4 Ultrafiltration zur Isolierung der MHC-gebundenen Peptide.....	52
2.2 QUANTITATIVE ANALYSE	52
2.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot	52

2.2.1.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	54
2.2.1.2 Western Blotting	55
2.2.2 Sequenzanalyse nach Edman.....	56
2.2.2.1 Quantifizierung der MHC-Ausbeute	57
2.3 QUALITATIVE ANALYSE.....	57
2.3.1 Peptidsequenzanalyse mittels Massenspektrometrie.....	57
2.3.1.1 Elektronenspray-Ionisation (ESI)	58
2.3.1.2 Q-TOF-Massenspektrometer.....	60
2.3.1.3 Liquid-Chromatographie / Massenspektrometer-Kopplung.....	63
2.3.1.4 Interpretation von MS/MS-Spektren zur Peptidsequenzanalyse	64
2.3.1.5 Herstellung synthetischer Peptide	68
2.3.2 Vergleichende Analyse mittels „stable isotope labelling“	69
2.3.2.1 Guanidinylierung der ε-Aminogruppe der Lysinreste von Peptiden mit O-Methyl-Iso-Harnstoff-Hemisulfat.....	70
2.3.2.2 Nicotinylierung der α-Aminogruppe von guanidinylierten Peptiden	70
2.3.2.3 Auswertung der differentiellen Peptidanalyse	71
2.3.3. mRNA-Expressionsanalyse.....	72
2.4 T-ZELL-EXPERIMENTE	74
2.4.1 Isolierung von PBMCs aus peripherem Blut.....	74
2.4.2 Aufreinigung CD8 ⁺ T-Zellen durch magnetically activated cell sorting	75
2.4.3 Präparation humaner dendritischer Zellen (DCs).....	76
2.4.4 Peptidstimulation mittels dendritischer Zellen (DCs)	77
2.4.5 Peptidstimulation mittels artifiziellen antigen-präsentierenden Zellen (aAPCs).....	78
2.4.5.1 MHC-Monomersynthese	78
2.4.5.2 Herstellung von aAPCs.....	79
2.4.5.3 Antigen-spezifische Stimulation von T-Zellen mit aAPCs	80
2.4.6 Tetramer staining von stimulierten CD8 ⁺ -T-Zellen.....	80
2.4.6.1 Herstellung von MHC-Tetrameren	80
2.4.6.2 Tetramerfärbung	81
2.4.7 Intrazelluläre Interferon-γ-Färbung von stimulierten CD8 ⁺ -T-Zellen .	82
2.4.8 Durchflusszytometrie.....	83

3. ERGEBNISSE..... 85

3.1 BEARBEITETE UND ANALYSIERTE GEWEBEPROBEN	87
3.2 ERGEBNISSE DER QUANTITATIVEN ANALYSE	89
3.2.1 Western Blotting	89
3.2.2 Edman-Sequenzierung.....	93
3.3 ERGEBNISSE DER QUALITATIVEN ANALYSE.....	96
3.3.1 Vergleich aller Peptide auf Tumor und Normalgewebe bzw. Tumor und Metastase.....	96
3.3.1.1 HLA-Klasse-I Peptidpräsentation.....	98
3.3.1.2 m-RNA Expression	102
3.3.2 Identifizierte HLA-Klasse-I Peptide auf RCC377 und RCC399	107

3.3.3 Vergleich der Einzelpeptide auf Tumor und Normalgewebe bzw. Tumor und Metastase, auf m-RNA Expressions- und HLA-Präsentationsebene	116
3.3.3.1 Überpräsentierte (HLA) Peptide auf Tumor und Metastase	117
3.3.3.2 Überpräsentierte (HLA) Peptide auf Metastasengewebe	119
3.3.3.3 Überpräsentierte (HLA) Peptide nur auf Tumorgewebe	121
3.3.3.4 Überexprimierte (mRNA) Peptide auf Tumor und Metastase ..	122
3.3.3.5 Überexprimierte (mRNA) Peptide auf Metastasengewebe	124
3.3.3.6 Überexprimierte (mRNA) Peptide nur auf Tumorgewebe	126
3.4. ERGEBNISSE DER T-ZELL EXPERIMENTE	131
4. DISKUSSION	143
4.1. DISKUSSION DER METHODEN UND ERGEBNISSE DER QUANTITATIVEN HLA-LIGANDEN ANALYSE	143
4.1.1 Diskussion der Methoden: Edmansequenzierung und Western Blotting	143
4.1.1.1. Verarbeitete Gewebeproben	143
4.1.1.2. Western Blotting	144
4.1.1.3. Edmansequenzierung	145
4.1.2 Diskussion der Ergebnisse der quantitativen Analyse	146
4.2. DISKUSSION DER METHODEN UND ERGEBNISSE DER QUALITATIVEN-DIFFERENTIELLEN HLA-LIGANDEN ANALYSE	149
4.2.1. Diskussion der Methode differentielle Peptidanalyse mittels „stable isotope labeling“	151
4.2.2. Diskussion der Ergebnisse: Vergleich aller Peptide auf Tumor- und Normalgewebe bzw. Tumor- und Metastasengewebe	153
4.2.3. Diskussion der Ergebnisse: Vergleich der Einzelpeptide auf Tumor- und Normalgewebe bzw. Tumor- und Metastasengewebe	157
4.2.3.1 Diskussion ausgewählter überpräsentierter (HLA) Peptide auf Tumor- und Metastasengewebe	158
4.2.3.2 Diskussion ausgewählter überpräsentierter (HLA) Peptide auf Metastasengewebe	162
4.2.3.3 Diskussion ausgewählter überpräsentierter (HLA) Peptide auf Tumorgewebe	166
4.2.3.4 Diskussion ausgewählter überexprimierter (mRNA) Peptide ...	167
4.3. DISKUSSION DER METHODEN UND ERGEBNISSE DER T-ZELL-EXPERIMENTE	171
5. ZUSAMMENFASSUNG	175
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	177
LITERATURVERZEICHNIS	179
DANKSAGUNG	212
PUBLIKATION	213
LEBENS LAUF	214

1. Einleitung

1.1 Vom HLA-Molekül zur Immuntherapie

Die Leistung des Immunsystems besteht darin, die Integrität eines Individuums zu bewahren, indem ein Schutz gegen Angriffe von außen (Bakterien, Viren, etc.) und von innen (entartete Zellen) vermittelt wird. Dazu muss das Immunsystem zwei wesentliche Aufgaben bewältigen:

Erstens „eigen“ und „fremd“ unterscheiden und damit Pathogene erkennen und zweitens diese effektiv beseitigen. Die Ausführung dieser Aufgaben wird als Immunantwort bezeichnet. Ihre Stärke erwächst aus antigen-unspezifischer „angeborener“ Immunität die, einmal aktiviert, sich in Phagozytose, Entzündung und Zellyse manifestiert. Das Komplementsystem, Monozyten, dendritische Zellen, Makrophagen, neutrophile und basophile Granulozyten, Mastzellen, folliculäre dendritische Zellen und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind die Exekutoren dieser „angeborenen“ Immunität. Die erworbene Immunantwort zeichnet sich hingegen durch ihre Spezifität der Pathogenerkennung und durch das immunologische Gedächtnis aus. Lymphozyten spielen die zentrale Rolle in allen erworbenen Immunantworten. Nach Antigenkontakt durch antigenpräsentierende Zellen kommt es zur Proliferation der einzelnen Lymphozytenklone und zur Aktivierung entsprechender spezifischer Effektorsysteme: B-Zellen produzieren Antikörper, die extrazelluläre Pathogene binden, T-Zellen können andere Immunzellen aktivieren bzw. infizierte oder entartete Zellen töten. Ein Teil der proliferierenden B- bzw. T-Lymphozyten differenziert zu Gedächtniszellen.

Eine erfolgreiche Immunantwort basiert auf der Interaktion von erworbenen und angeborenen Effektorsystemen.

Seit mehr als 200 Jahren haben Wissenschaftler erkannt, dass solch eine erfolgreiche Immunreaktion gegen eine Infektion zum Schutz gegen denselben Infekt führt. Begründer dieser recht jungen Wissenschaft der Immunologie ist Edward Jenner, der 1796 entdeckte, dass ein Mensch vor Pocken geschützt ist, wenn man ihn mit Kuhpocken oder Vacciniaviren impft. Dies war der Grundstein

für eine immer größer werdende Zahl an Vakzinen, die uns vor bakteriellen und viralen Infekten schützen.

Erste Versuche, die Kräfte des Immunsystems für die Bekämpfung von bösartigen Erkrankungen zu nutzen, gab es allerdings erst 100 Jahre später durch Paul Ehrlich [1]. Hierbei spielen vor allem neue Erkenntnisse und Entwicklungen um zelluläre und molekulare Interaktion zwischen Tumorzelle und Immunsystem eine bedeutende Rolle. Dazu gehören vor allem Antigenpräsentation entarteter Zellen, Immunüberwachung durch Zellen des Immunsystems, Immunsuppression und Tumorprogression. Im Folgenden wird auf diese Bereiche der Immunantwort, die in der Tumorentstehung und –abwehr eine bedeutende Stellung einnehmen, besonders eingegangen, wenngleich diese immer im Zusammenhang mit der Gesamtheit des Immunsystems gesehen werden müssen.

1.1.1 Aufbau und Funktion des MHC-Moleküls

Die zelluläre Immunantwort wird von den T-Lymphozyten geleitet. Diese Zellen sind in der Lage Antigene, die auf der Oberfläche von Wirtszellen durch den MHC-Komplex präsentiert werden, zu erkennen [2]. Der Terminus MHC (major histocompatibility complex) beschreibt eine Gruppe von Genen, die im humanen Organismus auf Chromosom 6 liegen und für hochpolymorphe, membrangebundenen Glykopeptide codieren. Die Namensgebung stammt von der Erkenntnis, dass diese Moleküle hauptverantwortlich für die Gewebsverträglichkeit, z.B. im Rahmen der Organtransplantation, sind. Im Menschen spricht man synonym auch von HLA-Molekülen (human leucozyte antigene), da sie erstmals auf Leukozyten entdeckt wurden. Man unterscheidet vier verschiedene Klassen von MHC-Molekülen, wobei nur MHC-I und MHC-II für die Histokompatibilität verantwortlich sind. Um eine Unterscheidung zwischen „eigen“ und „fremd“ zu ermöglichen, liegen die einzelnen Subtypen der MHC-Molekülklassen I und II in der Bevölkerung in einer außerordentlichen Vielfalt vor: Die menschlichen MHC-Gene der Klasse I kodieren für die Moleküle HLA-A bis -K die der Klasse II für die Moleküle HLA-DR, -DP, -DQ, -DM und -DO. Es werden ständig neue Subtypen der MHC-Moleküle entdeckt

und beschrieben. Für jedes dieser einzelnen Gene besteht ein ausgeprägter Polymorphismus, was somit zu vielen verschiedenen Allelen in der Bevölkerung führt. So waren beispielsweise am 20.11.2008 für das Gen HLA-A 697 Allele, für das Gen HLA-B 1109 Allele usw. bekannt (www.anthonynolan.org.uk/HIG/). Die Gene des MHC werden kodominant vererbt, folglich ergibt sich für jeden Menschen eine HLA-Typisierung, die, Heterozygotie vorausgesetzt, jeweils zwei spezifische Allele für HLA-I und -II umfasst.

Eine weitere Funktion der MHC-Moleküle stellt die Präsentation von Antigenen dar. Obwohl sich die MHC-Moleküle strukturell sehr ähneln unterscheiden sie sich in der Art und Weise, wie und welche Peptide in der Zelle von ihnen aufgenommen werden.

MHC-I-Moleküle präsentieren Peptide, die im Zytosol der Wirtszelle synthetisiert und prozessiert werden. Dies können virale oder bakterielle Proteine in einer infizierten Zelle sein, aber auch normale zelluläre Proteine oder Tumorproteine. Fast alle kernhaltigen Zellen exprimieren MHC-I-Moleküle, allerdings variiert der Umfang der Expression zwischen den verschiedenen Zelltypen. MHC-I präsentierte Peptide werden von cytotoxischen CD8-T-Zellen erkannt.

MHC-II-Moleküle binden dagegen Peptide, die von exogenen Antigenen stammen, durch Endozytose internalisiert und in Phagosom abgebaut wurden. Darum findet man MHC-II-Moleküle normalerweise auf B-Lymphozyten, dendritischen Zellen und Makrophagen [3]. MHC-II präsentierte Peptide werden von CD4-T-Zellen erkannt. Die Genregionen der MHC-Klassen III und IV hingegen kodieren für eine recht heterogene Gruppe von Proteinen, unter ihnen Serumproteine wie Komplementfaktoren und Zytokine.

Neuere Erkenntnisse lassen vermuten, dass MHC-II-Moleküle auch auf Tumorzellen exprimiert werden [4]. Dies würde eine direkte Erkennung von Tumorgewebe durch CD4⁺ T-Helferzellen ermöglichen, was für die Steuerung und Aufrechterhaltung einer zellulären Immunantwort eminent wichtig wäre. Ungleich mehr Daten liegen bisher allerdings zur Peptidpräsentation durch MHC I-Moleküle vor. Aus diesem Grund wird im Folgenden vermehrt auf Struktur, Aufbau und Funktion des MHC-I-Komplexes eingegangen

1.1.1.1 Aufbau des MHC-I-Komplexes

Die MHC-Moleküle der Klasse I bestehen aus zwei Polypeptidketten: Einer größeren α -Kette, die im MHC-Locus kodiert ist und einer kleineren, nicht kovalent angelagerten Kette, dem β_2 -Mikroglobulin, die nicht polymorph und nicht im MHC codiert ist. Die α -Kette, auch schwere Kette genannt, ist 350 Aminosäuren lang und durchspannt mit ihrem Carboxyende die Membran [2, 5]. Sie ist in drei Domänen, α_1 , α_2 und α_3 eingeteilt. Die α_3 -Domäne und das β_2 -Mikroglobulin haben eine gefaltete Struktur, die stark einer Immunglobulin-domäne ähnelt. Der peptidbindende Bereich wird durch die α_1 und α_2 Domäne gebildet. In ihnen liegen auch die Polymorphismen vor, die die Peptidbindungseigenschaften von MHC-I und die Antigenerkennung von T-Zellen beeinflussen [6, 7]. Die Besonderheit des MHC-Komplexes besteht darin, dass er in der Lage ist mit einer einzelnen Bindungsstelle Peptide mit einer hohen Affinität zu binden, während gleichzeitig die Fähigkeit, ein breites Spektrum verschiedener Peptide zu binden, erhalten bleibt. Ein weiteres wichtiges Merkmal ist, dass die Peptide integrale Bestandteile des MHC-Komplexes sind, d.h. ohne Peptid ist der Komplex nicht stabil. Vom MHC-I-Komplex gebundene Peptide haben eine Länge von 8-10 Aminosäuren. Die Bindung der Peptide geschieht zum einen durch Wasserstoffbrücken an den Amino- und Carboxyenden des Peptids mit unveränderlichen Bereichen der peptidbindenden Spalte, zum anderen durch nichtkovalente Wechselwirkungen mit polymorphen Bereichen der Peptidbindungsfurche [8]. Diese nichtkovalente Wechselwirkungen entstehen zwischen definierten Aminosäureresten des Peptides, so genannten „Ankeramino-säuren“, mit ebenso bestimmten Aminosäuren der Peptidbindungstasche. Hierdurch entsteht das so genannte Peptidbindungsmotiv des HLA-Moleküls [9, 10]. Da die einzelnen Allele der HLA-Moleküle sich insbesondere im Aufbau ihrer Peptidbindungsfurche unterscheiden, existiert für jedes HLA-Allel ein mehr oder weniger typisches Peptidbindungsmotiv. Durch Kenntnis der Peptidbindungsmotive lassen sich folglich Peptide anhand ihrer Sequenz einzelnen HLA-Allelen zuordnen. Neben dem Peptidbindungsmotiv entscheiden auch sterische Effekte über die Bindungsfähigkeit eines Peptids auf einem HLA-Molekül [11].

1.1.1.2 Aufbau des MHC-II-Komplexes

Der MHC-II-Komplex besteht aus einem nichtkovalenten Komplex der zwei Ketten α und β , die beide aus zwei Untereinheiten bestehen und die Membran durchspannen. Auch hier liegen die polymorphen Stellen im peptidbindenden Spalt, der von den Untereinheiten $\alpha 1$ und $\beta 1$ gebildet wird [12-14]. Peptide die an den MHC-II-Komplex gebunden sind unterscheiden sich in zweifacher Hinsicht von denen des MHC-I-Komplexes: Erstens sind die Peptide mindestens 13 Aminosäuren lang und oft erheblich länger. Zweitens werden die Peptidenden nicht gebunden, das Peptid liegt stattdessen in ausgestreckter Konformation längs der MHC-II-Bindungsfurche. Dort wird es von Peptidseitengruppen verankert. Die Taschen können ein größeres Spektrum an verschiedenen Aminosäurenketten aufnehmen als beim MHC-I-Molekül, sodass es schwieriger ist Verankerungsreste zu bestimmen und vorherzusagen welche Peptide an bestimmte MHC-II-Moleküle binden [15, 16].

1.1.2 Antigenprozessierung und Antigenpräsentation auf MHC-I-Moleküle

Bereits 1985 wurde beschrieben, dass T-Zellen in der Lage sind Peptidfragmente von Proteinen zu erkennen, die als Komplex aus Peptid und MHC-Molekül an der Zelloberfläche vorliegen. Allerdings gelang es erst 1990 die MHC-gebundenen Peptide zu reinigen und zu sequenzieren [17]. Es wurden erstmals Sequenzmotive entdeckt, mit denen Peptide in MHC-Allelen verankert werden. Diese Analyse wird heute routinemäßig durchgeführt, um die T-Zellen Immunogenität von Peptiden vorauszusagen, die es ihnen ermöglicht eine Immunantwort auszulösen, zu unterdrücken oder zu modulieren. Die Peptide entstehen aus einem intakten Antigen durch Modifikation des nativen Proteins. Dieser Vorgang wird Antigenprozessierung genannt, das Vorzeigen des Peptids auf der Zelloberfläche Antigenpräsentation.

MHC-I-Moleküle präsentieren Peptide aus dem Zytosol der Zelle. Sie selbst werden während ihrer Synthese vom Zytosol ins endoplasmatische Retikulum (ER) verlagert. Peptidantigene für die Beladung der MHC-I-Moleküle entstehen durch Degradation zytosolischer Proteine durch verschiedene Proteasomen. Es

handelt sich hierbei um einen großen zylindrischen Komplex aus ungefähr 28 Untereinheiten, die in vier Ringen übereinander gestapelt sind. Das Zentrum ist hohl und wird von den aktiven, das Protein zerkleinernden, proteolytischen Untereinheiten ausgekleidet. Zu diesen gehören LMP2 und LMP7, die beide im MHC-Gen codiert sind, sowie MECL-1. [18-20]. Die durch die proteasomale Prozessierung entstandenen Peptide besitzen bereits einen zum MHC-Bindungsmotiv passenden C-Terminus, der N-Terminus muss gelegentlich durch so genanntes „Trimming“ durch zytosolische Proteasen modifiziert werden [21]. Die proteolytischen Untereinheiten des Proteasoms können durch zwei Aktivatoren (PA 28- α und PA 28- β), die Interferon γ abhängig induziert werden, aktiviert werden [2].

Die im Zytosol hergestellten Peptide werden in das endoplasmatische Retikulum transportiert, wo sich die neu synthetisierten MHC-I-Moleküle befinden. Zwei MHC verknüpfte, ebenfalls interferoninduzierbare Gene, TAP1 und TAP2 (transporters associated with antigen processing) ermöglichen diesen Transport [22]. Diese kodieren für zwei Proteine, die zur Familie der Transportermoleküle mit ATP-Bindungskassette (ABC-Transporter) gehören. Es handelt sich um Heterodimere aus jeweils zwei hydrophoben Transmembrandomänen, die ins ER ragen, und zwei ATP-bindenden Domänen im Zytoplasma der Zelle [23, 24]. Der TAP-Komplex zeigt des weiteren eine gewisse Spezifität für die Peptide, die er transportiert: Er bevorzugt Peptide von acht bis zehn Aminosäuren mit hydrophoben oder basischen Aminosäureresten am Carboxyende; dies entspricht genau den Merkmalen der Peptide, die an MHC-Moleküle binden [25].

Die Peptidbindung ist ein wichtiger Schritt beim Zusammenbau eines stabilen MHC-I-Moleküls, erst nach Bindung an ein Peptid verlässt es das ER und kann an die Zelloberfläche gelangen. An der Assoziation von MHC-I- α -Kette, β_2 -Mikroglobulin und Peptid sind im menschlichen Organismus eine Reihe von Proteinen mit chaperonartiger Funktion beteiligt: Calnexin ermöglicht die Bindung zwischen MHC-I- α -Kette und β_2 -Mikroglobulin [26, 27]. Anschließend sorgt ein Komplex aus Calretikulिन, Tapasin, welches eine Brücke zum TAP-Komplex bildet, und Erp57 für die Bindung des Peptides [28-31]. Das

vollständig gefaltete MHC-I-Molekül und sein gebundenes Peptid werden schließlich an die Zelloberfläche transportiert.

Es wurde in zahlreichen Publikationen gezeigt, dass Zellen mit einem Gendefekt für TAP 1 und 2 nur eine geringe Menge MHC-I-Moleküle auf der Zelloberfläche besitzen, die die meisten viralen und MHC-assoziierten Peptide nicht präsentieren [32]. Diesen Mechanismus nutzen sowohl Viren, als auch Tumorzellen um sich vor der Entdeckung und Zerstörung durch CD8-T-Zellen zu schützen [33-35].

Neuere Erkenntnisse zeigen jedoch auch, dass Zellen mit TAP-Defekt trotzdem in der Lage sind, unter gewissen Bedingungen MHC-I-assoziierte Peptide zu präsentieren [36-40]. Über diesen TAP-unabhängigen Mechanismus können sowohl virale als auch intrazelluläre Peptide den T-Zellen präsentiert werden [41-46].

1.1.3 Aufbau des T-Zell-Rezeptors (TCR)

T-Zellen sind in der Lage fremde Antigene, die mittels MHC-Komplex auf Oberflächen von körpereigenen Zellen präsentiert werden, zu erkennen. Um diese Antigene spezifisch zu erkennen, benötigt jede T-Zelle einen einzigartigen Rezeptor, der spezifisch ein Antigen erkennt und trotzdem bei allen T-Zellen zur selben Reaktion führt.

Die Suche nach der Struktur des T-Zellrezeptors (TCR) begann schon 1975, gestaltete sich aber als sehr frustrierend. Erst 1984 gelang es durch cDNA-Klonierung von Genen, bei denen es während der T-Zell-Entwicklung zu Rearrangements kommt, und deren Sequenzierung, die Struktur des Rezeptors aufzuklären [47-50].

Jede T-Zelle trägt auf ihrer Oberfläche etwa 30000 Antigenrezeptoren. Es gibt zwei verschiedene Klassen von T-Zell-Rezeptoren, die entweder aus einer α - und einer β -Kette ($\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor) oder aus einer γ - und einer δ -Kette ($\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptor) bestehen. Nur 1%-10% der T-Zellen im Blut tragen $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptoren, ihre Funktion ist noch nicht vollständig geklärt; neuere Erkenntnisse weisen jedoch darauf hin, dass diese der Erkennung bestimmter mikrobieller Antigene dienen [51, 52]. Im Folgenden wird, wegen ihrer wichtigen

Funktion in der Erkennung und Beseitigung von Tumorzellen, nur auf die α : β -T-Zellen näher eingegangen.

Die α - und β -Polypeptidketten des TCRs sind durch eine Disulfidbrücke verbunden, dieses α : β -Heterodimer ist strukturell dem F_{ab} -Fragment eines Immunglobulins sehr ähnlich. Es besitzt allerdings nur eine variable Antigenbindungsstelle in Homologie zur V-Region und eine konstante Region in Homologie zur C-Region der Immunglobuline. Jede Kette durchdringt die Lipiddoppelschicht mit einer hydrophoben Transmembrandomäne und endet in einem kurzen zytoplasmatischem Schwanzstück [53, 54].

Das riesige Repertoire an unterschiedlichen Lymphozyten-Spezifitäten wird durch die variable Region des TCR ermöglicht. Diese entsteht, wie bei den Immunglobulinen, durch somatische Rekombination und ermöglicht so eine extreme Diversität in den drei antigenerkennenden Domänen (complementarity determining regions, CDRs) der variablen Region bei einer limitierten Anzahl an Genen [55, 56].

Alle Antigenrezeptoren sind mit so genannten unveränderlichen Molekülen (Cofaktoren) assoziiert. Ihre Funktion besteht in der Signalübertragung und damit der Lymphozytenaktivierung nach Antigenkontakt. Der CD3-Komplex, bestehend aus einer CD3 γ - einer CD3 δ - und zwei CD3 ϵ -Untereinheiten und eine ζ -Kette fungiert als Cofaktor des TCRs [57, 58]. Die Cofaktoren enthalten so genannte Tyrosinaktivierungssequenzen von Immunrezeptoren (ITAMs). Sie bestehen aus zwei Tyrosinresten, die durch etwa neun bis zwölf Aminosäuren voneinander getrennt sind [59]. ITAMs spielen eine bedeutende Rolle in der Signalweiterleitung und Aktivierung nach Antigenkontakt. Insgesamt enthält der T-Zell-Rezeptor-Komplex 10 ITAMs.

1.1.3 Interaktion zwischen MHC-I und TCR

Jede reife T-Zelle exprimiert einen TCR-Corezeptor (CD4 bzw. CD8). CD4 erkennen nur MHC-II-, CD8 nur MHC-I-Moleküle. Die Corezeptoren sind für das Zusammenbringen des „funktionell richtigen“ T-Zellsubtyps mit dem „richtigen“ MHC/Peptid-Komplex von großer Bedeutung. Im Folgenden wird auf die für

diese Doktorarbeit wichtige Interaktion zwischen MHC-I und CD8-TCR genauer eingegangen.

Zusammen mit der ersten röntgenkristallographisch ermittelten Struktur eines T-Zell-Rezeptors 1996 wurde auch die Struktur desselben TCRs, gebunden an einen Peptid:MHC-I-Liganden (pMHC-I), veröffentlicht [53, 60, 61].

Der TCR bindet an den pMHC-I-Komplex mit einer relativ schwachen Bindungsaffinität von ca. 1-100 μ M. Er liegt diagonal über dem Peptid und der peptidbindenden Spalte. Die α -Kette des TCRs liegt über der α_2 -Domäne und dem Aminoterminus des gebundenen Peptids, die β -Kette des TCRs über der α_1 -Domäne und dem Carboxyende des Peptids. Die drei CDR-Schleifen des TCRs treffen sich über den zentralen Aminosäuren des Peptids [62, 63]. Die T-Zell-Antwort ist von verschiedenen Faktoren abhängig, so kann schon der Austausch einer Aminosäure sowohl im präsentierten Peptid als auch im MHC-I-Komplex die Antwort so verändern, dass anstatt eines schnellen Abtötens der Zelle gar keine Antwort erfolgt [64, 65]. Diese doppelte Spezifität ist die Grundlage für die MHC-Restriktion der T-Zell-Antwort. Des Weiteren hängt diese Antwort auch von der Anzahl der peptidpräsentierenden MHC-Komplexe ab. Die meisten Peptide werden in einer geringen Menge, von <100 Kopien pro Zelle präsentiert. Aus diesem Grund sind T-Zellen in der Lage, Änderungen in der Anzahl präsentierter Peptide zu erkennen. Es ist bis heute nicht klar, wo die kritische Grenze an pMHC-I-Komplexen auf der Zelloberfläche liegt, die zur Aktivierung von T-Zellen führt, Angaben variieren zwischen einigen tausend und unter 10 pMHC-I-Komplexen [66]. Neuere Untersuchungen zeigen allerdings, dass T-Zellen in der Lage sind, spezifisch kleine Mengen (3-10 pMHC-I-Moleküle) präsentierter Virus- oder Tumorpeptide zu erkennen [67]. Dies legt nahe, dass die Suszeptibilität von T-Zellen für Tumorzellen nicht von der Gesamtmenge an präsentierten, tumorassoziierten Antigenen, sondern von ihrer spezifischen Präsentation auf MHC-I-Molekülen abhängt [68].

1.1.4 Signaltransduktion und Funktion der CD8-T-Zellen

Bindet ein Antigen an den T-Zell-Rezeptor, kommt es zur Ausbildung von Aggregaten (crosslinking), welche die Cofaktoren (CD8) in die Nähe der

Rezeptoren bringen. Rezeptorständige Tyrosinkinase der Src-Familie, Lck und Fyn, phosphorylieren in der Folge die ITAMs [69, 70]. Nach der Phosphorylierung wird die Signalkaskade mit dem ζ -Ketten-assoziierten Protein (ZAP-70) fortgesetzt. ZAP-70 bindet an die phosphorylierten ITAMs und wird ebenfalls durch die Src-Kinase Lck aktiviert [71]. Das aktivierte ZAP-70 phosphoryliert im Folgenden das Substrat LAT (linker of activation in T-cells), welches mit der Innenseite der Membran assoziiert ist und somit eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion spielt [72]. Die nächsten Schritte dienen dazu, das Signal an der Zellmembran weiterzuleiten und letztendlich dem Zellkern zu übermitteln, wo es schließlich zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und damit zur Expression eines Genes kommt. Hieran sind zwei Gruppen von Proteinen beteiligt, das Enzym PLC- γ und das kleine G-Protein Ras [73, 74].

CD8 positive T-Zellen haben die Aufgabe virusinfizierte oder entartete Zellen zu zerstören, sie werden deshalb cytotoxische T-Zellen genannt. Ihre Wirkung besteht hauptsächlich in der calciumabhängigen Freisetzung lytischer Granula, die Perforin und drei Serinproteasen (Granzyme) enthalten. Perforin und Granzyme sind für das effiziente Abtöten von Zellen verantwortlich. Man nimmt an, dass Perforin, nach Polymerisation, Poren in der Zielzelle bildet durch die Wasser, Salze und Granzyme, die in der Zelle Apoptose auslösen, eindringen können [75, 76].

Ein weiterer Wirkmechanismus von CD8-T-Zellen besteht in der Bindung des Fas-Liganden auf ihrer Oberfläche an den Fas-Rezeptor der Zielzelle. Dadurch werden Caspasen aktiviert, die in der Zielzelle den programmierten Zelltod auslösen [77-79].

Des Weiteren produzieren aktivierte cytotoxische T-Zellen Cytokine, wie Interferon γ und Tumornekrosefaktor α und β . Interferon γ hemmt direkt die virale Replikation, verstärkt durch Replikationssteigerung die MHC-I-Peptidpräsentation und lockt Makrophagen an. Tumornekrosefaktor α und β tragen ebenfalls zur Makrophagenanlockung und Tötung von Zielzellen bei [80-82].

1.1.5 Krebs und Immunsystem

Die Vorstellung, dass das Immunsystem kontinuierlich darauf achtet, sich abnormal entwickelnde Zellen zu zerstören und damit einer Tumorgenese entgegenzuwirken, gibt es schon sehr lange. Schon Ende des 19. Jahrhunderts vermutete Paul Ehrlich, dass Krebszellen vom Immunsystem angegriffen und zerstört werden können. Bereits vor mehr als 100 Jahren versuchte auch William B. Coley die Aktivierung des Immunsystems zu nutzen um Krebszellen aktiv zu bekämpfen, indem er Tumorpatienten bakteriellen Impfstoffen verabreichte [83].

Auf die Überlegungen und Experimente dieser beiden Wissenschaftler geht die Theorie der Immunüberwachung (Immunosurveillance-Theorie) zurück, nach der im Körper laufend Krebszellen entstehen, die jedoch vom Immunsystem eliminiert werden [84]. Diese Theorie wurde in den letzten Jahrzehnten kontrovers diskutiert, da sowohl Argumente für sie als auch gegen sie sprechen. Zu den Proargumenten kann die Tatsache gezählt werden, dass man in vielen Tumoren lymphatische Infiltrate, die als TILs (tumor infiltrating lymphocytes) bezeichnet werden, findet. Ebenso kann es zur spontanen Regression von Tumoren kommen, die man als einen geglückten Angriff des Immunsystems werten kann. Man hat beobachtet, dass bei immundefizienten Patienten z.B. nach Transplantationen vermehrt Tumoren auftreten [85]. Allerdings tritt bei Immunsupprimierten nur ein limitiertes Spektrum von Tumorarten auf, die vor allem virusassoziiert sind. Mausexperimente haben gezeigt, dass eine schützende Immunantwort gegen Tumoren möglich ist [86], allerdings auch, dass Tiere mit rudimentärem Immunsystem oder fehlender T-Zell-Antwort trotzdem eine Tumoresistenz zeigen können [84].

Im Folgenden werden die Abläufe und Bedingungen der Immunosurveillance genauer beschrieben.

1.1.6.1 Immunüberwachung

Heute sind drei wesentliche Mechanismen der Krebserkennung durch das Immunsystem bekannt:

- Antikörper erkennen veränderte Zelloberflächenstrukturen auf Krebszellen.
- T-Lymphozyten erkennen veränderte Proteinfragmente aus dem Zellinneren, die von HLA-Molekülen auf der Oberfläche von Krebszellen gezeigt werden.
- Natürliche Killerzellen erkennen Krebszellen, die entweder ihre HLA-Expression verändert oder verloren haben oder stressinduzierte Moleküle auf der Oberfläche zeigen [87].

Im Folgenden wird vor allem auf die Immunüberwachung durch T-Zellen genauer eingegangen, da dieser Mechanismus für diese Dissertation von vorrangiger Bedeutung ist.

MHC-I-präsentierte Tumorantigene, die von T-Zellen erkannt werden können, lassen sich wie folgt unterteilen [88]:

Zum einen die Tumorspezifischen Antigene (TSA), deren Gene während der Onkogenese durch Mutationen entstanden sind und somit absolut tumorspezifisch sind. So sind Antigene aus Punktmutationen (CDK4 [89]), Rastermutationen (TGFbRII [90]) und Translokationen mit folgender Fusionsproteinbildung (BCR-ABL [91]) bekannt. Weiter sind tumorspezifische Antigene aus Antisense-Transkripten von normalen Genen bekannt (RU2AS). Auch posttranslationale Modifikationen (*Tyrosinase* [92]) und tumorvirale Proteine (HPV16 E7 [93]) können zur Entstehung von tumorspezifischen Antigenen führen. Proteine aus im adulten Organismus nicht mehr exprimierten Genen, z.B. dem karzinoembryonalen Antigen (CEA [94]) oder aus solchen Genen, die im adulten Organismus nur in immunprivilegierten Organen, z.B. den Hoden exprimiert werden (*Cancer testis antigens, MAGE-family* [95]), sind zwar nicht ausschließlich im Tumor anzutreffen, jedoch im Rahmen der Tumorimmunologie ebenso als tumorspezifisch anzusehen.

Zum anderen Proteine und nichtproteinogene Strukturen, die im Tumor gegenüber den Normalgeweben stark überexprimiert sind, werden als Tumor-assoziierte-Antigene (TAA) bezeichnet. Hierzu gehören Her2/neu [96], MUC1 [97], Gangliosid GD3 [98], NY-ESO-I [99], welche zwar auch im

Normalgeweben anzutreffen sind, jedoch aufgrund quantitativer Effekte nur im Tumor immunogen wirken [100].

MHC-präsentierte Tumorantigene können von T-Zellen erkannt werden und durch eine tumorspezifische T-Zellantwort zur Abstoßung des Tumors führen. Diese spontane Reaktion gegen einen etablierten Tumor erfolgt jedoch nur in Ausnahmefällen [101-103]. Allerdings hat sich für Neoplasien unter anderem Melanome, Kolonkarzinome und Ovarialkarzinome gezeigt, dass eine vermehrte Infiltration von T-Lymphozyten für eine verbesserte Prognose spricht [104-106].

1.1.6.2 Tumorimmunogenität

Unter Immunogenität eines Tumors versteht man seine Fähigkeit eine Immunreaktion auszulösen. Lange glaubte man, dass dies bei Tumoren trotz der Antigenpräsentation nicht möglich sei, da sie nicht als Pathogene wirken. Neuere Studien zeigen hingegen, dass zahlreiche Tumoren Chemokine produzieren, die Immunzellen anlocken [107, 108]. Ebenfalls wirken Zerfallsprodukte nekrotisierender Tumoren (z.B. Hitzeschockproteine) als inflammatorische Substanzen [109]. Auch einige Tumorantigene wie z.B. MUC-1 und CEA selbst sind in der Lage eine entzündliche Reaktion zu bewirken [110, 111].

1.1.6.3 Immun-Escape-Mechanismen von Tumoren

Trotz der Fähigkeit des Immunsystems Tumorzellen aufzuspüren und zu zerstören gehören Krebserkrankungen zu den häufigsten Ursachen für Morbidität und Mortalität und die meisten Tumoren scheinen nicht unter immunologischer Kontrolle zu stehen. Dies legt die Vermutung nahe, dass Tumoren über Methoden verfügen, trotz der Präsenz von Antigenen einen Zustand der Immuntoleranz zu entwickeln. Diese Fähigkeit bezeichnet man als „immune escape“. Es werden mehrere Mechanismen hierfür diskutiert, die zwar hochinteressante therapeutische Angriffspunkte darstellen können, aber auch die Entwicklung effektiver Immuntherapien erschweren:

Eine homogene Expression von HLA-Klasse-I-Molekülen ist in soliden Tumoren nicht generell gegeben, vor allem metastasierte Stadien sind häufig durch eine inhomogene oder fehlende Expression von HLA-Molekülen charakterisiert [112, 113]. Für den Verlust der HLA-Moleküle werden verschiedene Mutationen unter anderem im β_2 -Mikroglobulin-Gen verantwortlich gemacht. Es können auch Adhäsionsmoleküle fehlen, die für eine Adhäsion an Lymphozyten benötigt werden, was zu Anergie der T-Zelle gegen das Antigen führt.

Zudem sind Tumoren in der Lage sowohl systemisch als auch lokal immunsuppressiv zu wirken. Zum Beispiel indem sie immunsuppressive Zytokine wie transforming growth factor β (TFG- β) oder das immunsuppressive Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), produzieren [114-116].

Ein anderer immunsuppressiver Effekt besteht in der vermehrten Anzahl an regulatorischen T-Lymphozyten im peripheren Blut bei einigen Tumorpatienten [117, 118].

Tumorzellen weisen sehr häufig eine Deregulation von molekularen Mechanismen auf verschiedenen Ebenen der Signalwege der Apoptose auf. Sie verschaffen sich durch Überexpression anti-apoptotischer Proteine wie Bcl-2 oder durch Herabregulation so genannter Todesrezeptoren wie CD95/FAS und TRAIL-Rezeptoren einen Überlebensvorteil [119].

Des Weiteren können Tumorzellen dadurch entkommen, dass sie durch ihre generelle genetische Instabilität immunogene Antigene verändern und so der Zerstörung durch T-Zellen entgehen.

1.1.7 Immuntherapie

Obwohl schon gegen Ende des 19. Jahrhunderts von Paul Ehrlich versucht wurde, die Kräfte des Immunsystems für die Bekämpfung von Tumoren zu nutzen [1], fanden doch erst in den letzten zwei Jahrzehnten Immuntherapieverfahren ihren Eingang in die zugelassene Therapie verschiedener Tumorerkrankungen. In den letzten hundert Jahren hat sich die Immuntherapie von vagen Versuchen das Immunsystem unspezifisch zu stimulieren [83], zu einem hoch spezialisierten Teilgebiet der Medizin

entwickelt, in dem definierte immunologische Effektormoleküle gezielt gegen bekannte Antigene auf und in Tumorzellen gerichtet sind.

Die zahlreichen Methoden und Entwicklungen im Bereich der Immuntherapie werden im Folgenden besprochen und erläutert. Besonders wird hier auf den Ansatz der Tumovaccinierung eingegangen, da alle in dieser Dissertation durchgeführten Untersuchungen und Experimente auf die Entwicklung solcher Vakzine zielen.

1.1.7.1 Antikörper

Monoklonale Antikörper (mAK) gegen tumorassoziierte Proteine sind mittlerweile zugelassene, spezifische und effektive Immuntherapeutika. Obwohl schon vor einhundert Jahren die Bedeutung der Antikörper in der Krebstherapie entdeckt und beschrieben wurde [1], gelang die breite Umsetzung dieser Idee erst durch die von Köhler und Milstein entwickelte Hybridom-Technologie [120]. Tabelle 1 gibt einen Überblick über alle monoklonalen Antikörper (mAK), die momentan für die Krebstherapie in den USA zugelassen sind. Bis auf Gemtuzumab ozogamicin und Tositumomab sind alle genannten Antikörper inzwischen auch in Deutschland zugelassen.

Die wichtigste Eigenschaft die ein für die Krebstherapie einsetzbarer mAK erfüllen muss, ist die Spezifität seines variablen Anteils für eine definierte Zielstruktur. Dies können Oberflächenmoleküle auf Tumorzellen (Rituximab [121]) oder Gefäß- und Stromazellen (Cetuximab [116]) oder tumorbiologisch relevante lösliche Liganden (Bevacizumab [122]) sein.

Anhand ihrer Wirkung lassen sich mAKs in zwei Gruppen einteilen:

Erstens targetierende mAK, diese markieren Zellen die das entsprechende Zielmolekül tragen und rekrutieren über ihren konstanten Teil des Immunglobulins (Fc) Komplement und zytotoxische Immunzellen. Alternativ können diese Antikörper auch mit Radioisotopen (Tositumomab, Ibritumomab tiuxetan) oder Zelltoxinen (Gemtuzumab ozogamicin) konjugiert werden.

Zweitens funktionelle mAK, die als Antagonisten oder Agonisten von Targetmolekülen mit tumorbiologisch relevanter Funktion wirken. Sie blockieren beispielsweise Wachstumsfaktor-Rezeptoren (Trastuzumab [123]) und

neutralisieren lösliche Wachstumsfaktoren (Bevacizumab [122]). Antikörper können auf unterschiedliche Weise generiert werden. Mit der Hybridomtechnologie kann in der Gewebekultur immortalisierten Plasmazelllinien und Milzzellen eine Maus, die die Information zur Antikörperbildung durch Immunisierung besitzen fusionieren und so ein antikörperproduzierendes Zellhybrid entstehen. Gebildete Antikörper werden als murin bezeichnet. Chimäre Antikörper hingegen besitzen eine humane konstante Region (Fc) und nur der variable Teil ist murin. Dies bietet sowohl für die Halbwertszeit, für allergische bzw. Abstoßungsreaktionen, als auch für die Immunreaktion menschlicher Immunzellen Vorteile.

Durch CDR-Grafting entstehen humane Antikörper, in die einzelne antigenbindende Antikörperregionen eingefügt wurden.

Heute setzt sich mehr und mehr die so genannte HuMAb-Technologie durch, bei der Mäuse für humanes Immunglobulin immunisiert werden, wodurch primär humane Antikörper entstehen.

Das Nebenwirkungsspektrum der Antikörper ist ganz wesentlich von der Antigenspezifität des jeweiligen Antikörpers abhängig [124-127]. Allerdings gibt es mit Fieber und Schüttelfrost auch substanztypische, akute Nebenwirkungen. Allergische Reaktionen sind bei humanisierten Antikörpern ausgesprochen selten [128].

Tab.1: Zugelassene Antikörper (USA) in der Krebstherapie nach Finn et al. [129]

Antikörper	Typ	Zielstruktur	Indikation
Trastuzumab (Herceptin)	humanisiert	HER2 Rezeptor	HER2-positives MammaCa
Bevacizumab (Avastin)	humanisiert	Vascular endothelial growth factor (VEGF)	Nicht-kleinzelliges BronchialCa, KolorektalCa, MammaCa
Cetuximab (Erbix)	Chimär	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor	KolorektalCa, Kopf/HalsCa
Panitumumab (ABX-EGF)		Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor	KolorektalCa
Ibritumomab tiuxetan (Zevalin)	murin ⁹⁰ Yttrium-konjugiert	CD20 B-Zellen Oberflächenantigen	Non Hodgkin B-Zell Lymphom
Alemtuzumab (Campath)	humanisiert	CD52 Lymphozyten Oberflächenantigen	CLL, T-Zell Lymphome
Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg)	Humanisiert, konjugiert mit Calicheamicin	CD33 Leukämie Oberflächenantigen	AML
Rituximab (Rituxan)	Chimär	CD20 B-Zellen Oberflächenantigen	Non Hodgkin Lymphome
Tositumomab (Bexxar)		CD20 B-Zellen Oberflächenantigen	Kutane T-Zell Lymphome

1.1.7.2 T-Zell und NK-Zelltransfer

Das Konzept der adoptiven zellulären Immuntherapie wurde erstmalig vor 50 Jahren von Mitchison präsentiert und verfolgt das Ziel der Elimination von malignen Zellen durch den Transfer von reifen T-Zellen oder Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) [130].

Eine eindrucksvolle Bestätigung der Wirkung transferierter Lymphozyten liefert die allogene Knochenmarktransplantation. Aber auch bei soliden Tumoren wurde bereits in den 80er Jahren der adoptive Transfer autologer T-Zellen erfolgreich klinisch getestet [131]. Erst mit der Charakterisierung

tumorassoziierter Antigene, die von humanen T-Zellen erkannt werden können, hatte man die Möglichkeit in vitro antigenspezifische T-Zellen herzustellen und erfolgreich zu transferieren. Durch Entwicklung neuer Methoden zur in-vitro Selektion und Expansion ist es heute möglich, polyklonale T-Zellen mit der erwünschten Antigenspezifität herzustellen, deren Wirksamkeit in zahlreichen klinischen Studien, vor allem im Bereich hämatologischer Krebserkrankungen und dem malignen Melanom, momentan untersucht wird [132-135].

Aufgrund ihrer spontanen zytotoxischen Aktivität gegenüber leukämischen Blasten und anderen malignen Zellen wird auch natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), vor allem den CD56-NK-Zellen, eine wichtige Funktion in der Behandlung maligner Erkrankungen zugeschrieben. Momentan werden zahlreiche Studien zum NK-Zell-Transfer nach oder mit haploidenter Stammzelltransplantation bei hämatologischen Tumoren durchgeführt [136-138].

1.1.7.3 T-Zellrezeptor-Transfer

MHC präsentierte TAAs können über den TCR von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden. Der therapeutische Transfer von TCR-Genen in humane T-Zellen würde das T-Zell-Repertoire eines Patienten mit neuen TAA-spezifischen TCR ausstatten. Es ist heute möglich TCR via retroviralem Gentransfer funktionell in humanen und Maus-T-Zellen kompetent zu exprimieren [139-141]. Momentan existiert allerdings nur eine klinische Studie zum T-Zellrezeptor-Transfer bei Patienten mit malignem Melanom [142].

1.1.7.4 Tumorstoffe

Das Ziel einer Tumorstoffimpfung liegt darin, direkt im Patienten durch aktive Immunisierung tumorspezifische T-Zellen zu induzieren, die den Tumor dann möglichst gezielt und somit nebenwirkungsarm zerstören. Neben den Effektor-T-Zellen, welche den Tumor eliminieren können, sollen hierbei auch langlebige tumorspezifische Gedächtniszellen induziert werden, die einen Rückfall verhindern könnten.

Trotz der großen Fortschritte in der Grundlagenforschung und zahlreicher Impfstudien, sind derzeit noch keine Tumorstoffimpfungen zugelassen. Dies liegt hauptsächlich daran, dass viele Phase I und-II Studien zwar eine vakzine-induzierte T-Zellantwort zeigen konnten, allerdings häufig ohne relevanten klinischen Erfolg [143-145]. Aus diesem Grund werden momentane Impfstoffstrategien verbessert, um Quantität und Qualität der T-Zellantwort zu erhöhen.

Grundlage jeder Tumorstoffimpfung stellt die Identifizierung von tumorassoziierten, HLA-präsentierten Peptiden auf Tumorzellen dar. Hierzu stehen verschiedene Methoden zur Verfügung: Die HLA-Ligandensequenzierung mit anschließender Überprüfung der Eignung als T-Zell-Epitop [146], die Identifizierung tumorassoziiertes T-Zell-Epitops durch Epitopvorhersage, die Genexpressionsanalyse und die cDNA-Expressionsklonierung.

Ein weiterer wichtiger Faktor für eine Tumorstoffimpfung ist eine geeignete Applikationsform bzw. ein geeigneter Vektor für den Impfstoff. Bei der „konventionellen Impfung“ werden die Tumorstoffantigene ohne geeigneten Vektor appliziert. Hierzu können entweder einzelne tumorassoziierte Peptide [147], ganze tumorassoziierte Proteine oder sogar ganze Tumorzellen [148] verwendet werden. Des Weiteren können DNA-Plasmide, die für das Antigen codieren appliziert werden [149].

Verschiedene Viren wie z.B. Adenoviren, Herpesviren usw. eignen sich als Vektoren [150, 151]. Ihr Hauptvorteil ist ihre große Immunogenität, die zu einer starken Immunantwort mit lang anhaltender immunologischer Erinnerung führt [152]. Eine weitere Möglichkeit eines Vektors bietet die Impfung mit DCs, die zuvor mit Peptiden beladen wurden [153-155]. Reife DCs sind in der Lage eine effektive T-Zell-Immunität hervorzurufen. Tabelle 2 stellt die relevanten Vor- und Nachteile der einzelnen Vakzinemöglichkeiten gegenüber [156].

Die dritte Variable auf dem Weg zu einer erfolgreichen Tumorstoffimpfung ist das Impfschema im Bezug auf Dosis, Frequenz, Route und eventuell Einsatz eines Adjuvans. So sind zum Beispiel Peptide an sich wenig immunogen, in Kombination mit den Adjuvantien IFA, QS21 und einem Toll-like-Rezeptor-

Liganden konnten aber nachweisbar cytotoxische T-Zellen induziert werden [157-159].

Aktuelle Studien zur Tumorstimmung vor allem im Bezug auf das Nierenzellkarzinom, werden im Kapitel „Nierenzellkarzinom“ (1.3.) beschrieben.

Tab. 2: Vor- und Nachteile der verschiedenen Vakzine Strategien nach Kochenderfer et al. [156]

Strategie	Vorteile	Nachteile
Virale Vakzine	CD8-T-Zell- und B-Zellreaktion gegen ganze Proteine möglich	Neutralisierende Immunreaktion gegen virale Proteine erschwert Wiederholungsimpfungen
DNA Vakzine	Einfach herzustellen, in Mäusen CD8-T-Zell und Antikörperreaktion gegen ganze Proteine möglich	Eventuell weniger effektiv als virale und Peptid Vakzine bei der Induktion von CD8-T-Zellen
DC Vakzine	Eindrucksvolle Antitumor-Immunität im Maus-Modell	Herstellung aufwändig, Anti-fetal-bovine Serum, Immunreaktion macht DCs möglicherweise in Mäusen effektiver als in klinischen Studien
Ganzzell-Vakzine aus Tumorzellen	Durch die Verwendung von Tumorzellen Chance auf Immunreaktion gegen alle Peptide des Tumors	Große Mengen an Tumorzellen werden benötigt
Peptid Vakzine	Einfach herzustellen, starke CD8-T-Zellreaktion nach wiederholten Impfungen oder Impfungen mit Adjuvantien	Immunreaktion auf ein oder einzelne Peptide limitiert

1.1.7.5 Immunadjuvantien

Die Art und Stärke einer Immunreaktion kann durch eine Reihe von Substanzen beeinflusst werden, die unter dem Begriff Immunmodulatoren zusammengefasst werden. Hierzu gehören z.B. auch Substanzen die die Wirkung von Impfstoffen oder das Immunsystem an sich verstärken, so

genannte Immunadjuvantien. Bereits vor 100 Jahren konnte William Coley mit bakteriellen Lysaten zum Teil überraschende Erfolge gegen Malignome erzielen. In den letzten Jahren hat die Entdeckung zellulärer Rezeptoren und die detaillierte Aufklärung körpereigener immunregulatorischer Prozesse zum Verständnis der molekularen Wirkungsweise vieler Adjuvantien beigetragen und zur Entwicklung neuer Wirkstoffklassen geführt. Viele dieser Substanzen werden derzeit präklinisch und klinisch getestet. Die Wirkung der heute bekannten Adjuvantien beruhen auf sechs unterschiedlichen Mechanismen: 1. Die Verbesserung der Pharmakokinetik des Impfstoffs, 2. verbesserte Antigenpräsentation, 3. Rekrutierung von CD4-T-Helferlymphozyten, 4. direkte Immunstimulation durch Applikation von Zytokinen, 5. agonistische Wirkung auf Toll-like-Rezeptoren und 6. systemische Modulation der Lymphozyten-Effektorfunktion. Tabelle 3 stellt die wichtigsten, bereits zugelassenen bzw. in der fortgeschrittenen klinischen Testung befindlichen Adjuvantien dar.

Tab.3: Immunadjuvantienklassen der wichtigsten zugelassenen bzw. in klinischer Testung befindlichen Wirkstoffe [87].

Adjuvantienklassen	Wirkmechanismen	Beispiele
Aluminiumsalze	1., 2., 5.	AlPO ₄ , Al(OH) ₃
Ölbasierte Adjuvantien und Liposomen	1., 2., 5.	IFA (Montanide ISA 51), Chiron MF59
Saponine	1., 2., 5.	GPI-0100, ISCOM, QS-21
Toll-like-Rezeptor-Liganden	5., 6.	Triacyl-Lipopeptide, Loxribin, Pam3cys
Rekombinate Zytokine und mAK	2., 4., 6.	IL-2, IL-12, IFN γ , GM-CSF, CD40-AK

1.2 Metastasen

1.2.1 Definition

Wenn man von den heutigen Behandlungsmöglichkeiten maligner Tumoren ausgeht, dann muss man feststellen, dass nicht mehr der Primärtumor das eigentliche Krebsproblem darstellt, sondern die Metastasierung [160]. Heute sterben weitaus mehr Patienten an den Folgen der Metastasierung, vor allem in Lunge, Leber und Gehirn, als an den direkten Folgen des Primärtumors [161]. Bedenkt man, dass bei 60% aller Patienten mit einem Malignom klinisch evidente oder Mikrometastasen bereits bei der Erstdiagnose vorliegen [162], wird klar, dass das Verständnis des Pathomechanismus und die Bekämpfung der Metastasierung eine zentrale Rolle in der Entwicklung neuer Krebstherapien spielen.

Der Begriff Metastase stammt aus dem Griechischen und bedeutet Ort oder Stelle, die lateinische Bezeichnung ist Filia (Tochter) und bedeutet Tochtergeschwulst. Die Fähigkeit zur Bildung von Metastasen, stellt das wichtigste und zuverlässigste Kennzeichen bösartiger Tumoren dar [163].

Als Metastase wird die lokale Absiedelung und Proliferation von Tumorzellen, die lymphogen, hämatogen oder auf anderem Weg vom Primärtumor aus im Organismus verschleppt wurden, bezeichnet [162, 163]. Manche Autoren sprechen erst von einer Metastase, wenn eine Vaskularisierung der Tumorverbände vorliegt [164]. Dies ist gewöhnlich bei Tumorzellkomplexen über 1-2 mm der Fall, darunter wird häufig von Mikrometastasen gesprochen [165]. Unabhängig ob die Angiogenese für die Annahme einer Metastase notwendig ist oder nicht, geht aus der obigen Definition hervor, dass es sich bei einer Tumorzellembolie nicht um eine Metastase handelt, weil das lokale Tumorzellwachstum fehlt. Die embolische Verschleppung von Tumorzellen stellt zwar eine der Möglichkeiten für die Entstehung von Metastasen dar, ist jedoch nicht mit dem Metastasierungsprozess identisch.

1.2.2 Einteilung und Ausbreitungsmechanismen

Maligne Tumoren können sich im Organismus auf verschiedenen Wegen ausbreiten: 1. in Gewebsräumen, 2. lymphogen, 3. hämatogen, 4. über seröse

Höhlen, 5. im Zerebrospinalraum und 6. auf epithelialen Oberflächen [166]. Die Infiltration von Gewebsräumen stellt den ersten Schritt zur Ausbreitung bei den meisten Neoplasien dar. Viele derbe und fibröse Gewebe, wie beispielsweise die fibrösen Kapseln von Leber, Milz und Niere, das Periost, Bänder, Faszien und die Haut, halten der direkten Invasion durch einen Tumore relativ lange stand. So enthält Knorpel beispielsweise einen antiinvasiven Faktor, ein low-moleculare-weight Protein, der proteolytische Enzyme und Neovaskularisation verhindert [167].

Malignome besitzen normalerweise keine Lymphgefäße, aus diesem Grund findet die Interaktion zwischen Tumorzellen und Lymphgefäßen hauptsächlich in der Tumorperipherie statt [168]. Um in Lymphgefäße der Peripherie einzudringen müssen Tumorzellen keine Gefäßmembran durchdringen. Die meisten Zellen erreichen die regionalen Lymphknoten als Embolus mit der afferenten Lymphe, von dort aus verlässt nach ca. 10-60 Minuten ein Teil der malignen Zellen den Lymphknoten über efferente Lymphgefäße [162]. Die Lymphknoten wirken somit nicht wirklich als mechanische Barriere für die Tumorausbreitung. Mit zunehmender Obstruktion der regionalen Lymphgefäße durch den Tumor kann es zu retrograder Verschleppung von malignen Zellen und somit zu, von der Norm abweichenden, Metastasenlokalisationen kommen.

Arterien sind normalerweise vor einer Invasion durch Tumorzellen gefeit. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass elastische Fasern der Gefäßmembran antiproteolytische Faktoren sezernieren [169]. Die hämatogene Metastasierung erfolgt aus diesem Grund hauptsächlich über das venöse System. Tumorzellen gelangen vor allem im Bereich der venösen Kapsel des Tumors, aber auch über lymphatische Zuflüsse der Venen, in den Blutkreislauf. Normalerweise werden sie im ersten Kapillarbett das sie erreichen gestoppt; somit verbleiben Tumorzellen aus systemischen Venen in der Lunge, aus der Pfortader in der Leber und aus den Pulmonalvenen in jedem peripheren Organ. Auch hier gibt es Ausnahmen, wie paradoxe Embolien bei offenem Foramen ovale oder retrograde Verschleppung von Tumorzellen.

Metastasierung in seröse Höhlen, wie Peritoneum, Pleura und Perikard, erfolgt über zwei unterschiedliche Mechanismen. Im Peritoneum spielt die direkte

Ausbreitung von losgelösten Tumorzellen im Gewebe eine große Rolle, während in der Pleura die Ausbreitung über subseröse Lymphgefäße im Vordergrund steht [167].

Der Liquor im Zerebrospinalraum bietet Tumorzellen die Möglichkeit zur Ausbreitung im ZNS. Extrakranielle Tumoren können über die venösen Sinus ins Gehirn oder über perivenöse Lymphgefäße durch die Intervertebralforamina in den Spinalkanal gelangen. Intrakranielle und interspinale Tumoren können sich auch über die Leptomeningen ausbreiten.

Metastasen auf epithelialen Oberflächen können entweder durch direkte Ausbreitung des Primärtumors, durch Implantation, durch so genannte Impfmetastasen oder durch Kontakt entstehen. Relativ häufig sind Implantationsmetastasen in weiblichen Genitaltrakt, z.B. als Krukenbergtumoren auf den Ovarien, welche Metastasen eines Siegelringkarzinoms des Magens entsprechen.

Kontaktmetastasen auf epithelialen Oberflächen sind relativ selten, es wurden lediglich Fälle von Metastasierung von Ober- zu Unterlippe, von der Zunge zur Mundschleimhaut und vom Augenlid auf die Konjunktiva beschrieben [170].

Die Verteilung von Metastasen unterschiedlicher Tumoren hängt von zahlreichen Faktoren ab, die auch trotz intensiver Forschung noch nicht vollständig bekannt sind. Eine Vielzahl klinischer Studien und experimenteller Untersuchungen mit radioaktiv markierten Tumorzellen belegt schon in den 60er Jahren, dass bestimmte Tumoren durchweg in bestimmte Organe metastasieren [171]. Ein Teil der Metastasenlokalisationen kann durch den Blutabfluss an sich erklärt werden. Hieraus ergeben sich nach Walter [172] sechs hämatogene Metastasierungstypen: Der Lungentypus, der nach Einbruch in die Pulmonalvenen in Leber, Knochen und Gehirn metastasiert (z.B. Bronchialkarzinom), der Lebertypus, der nach Einbruch in die Lebervenen zunächst in die Lunge metastasiert (z.B. HCC), der Hohlvenentypus der über die Vena cava auch zunächst in die Lunge metastasiert (z.B. NCC) und der Pfortadertypus der in die Leber metastasiert (z.B. Kolonkarzinom). Zwei Spezialtypen werden unterschieden: der Zisternentypus, der über den Ductus thoracicus auch zunächst in die Lunge metastasiert (z.B. Magenkarzinom) und

der Vertebralvenentypus, wobei es über retrograden Blutfluss zur Ausbreitung der Tumorzellen über den Vertebralvenenplexus in die Knochen, vor allem in die Wirbelsäule, kommt (z.B. Prostata- und Mammakarzinom).

Allerdings lassen sich über diese Einteilung manche Metastasierungswege wie beispielsweise Lebermetastasen von Aderhautmelanomen nicht erklären [173, 174]. Paget erklärte diese regellose Verteilung schon 1989 mit der Vermutung, dass Tumorzellen nur in einer angemessenen Umgebung wachsen (seed and soil Theorie) [175]. Zahlreiche aktuelle Studien bestätigen diese Theorie, indem sie beispielsweise zeigten, dass Tumorzellen selektiv an Epithelien oder Membranen bestimmter Gewebe binden, leichter eindringen oder auf organspezifische Wachstumsfaktoren reagieren, abhängig von den exprimierten Rezeptoren und Signalkaskaden [176, 177]. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Kolon oder Pankreaskarzinome, die EGFR und MET überexprimieren, stark auf den hohen Gehalt von TGF α und Hepatozytenwachstumsfaktor in der Leber reagieren [178, 179]. Durch cDNA Mikroarray-Analyse wurden Gene identifiziert, die für alle Metastasenloki typisch sind (Osteopontin), aber auch Gene die nur in Tumorzellen mit bestimmter Gewebsbevorzugung vorkamen (CXCR4) [180, 181]. Tabelle 4 zeigt in klinischen und experimentellen Studien identifizierte Metastasengene und ihr Vorkommen in bestimmten Metastasenloki [182].

1.2.3 Metastasierungsprozess

Der Prozess der Metastasierung beinhaltet eine Serie genau definierter, aufeinander folgender Schritte, allgemein als metastatische Kaskade bezeichnet [163]. Kann eine maligne Zelle einen der Schritte nicht vollziehen, wird sich keine klinisch relevanten Metastasen entwickeln [183].

Früher wurde vermutet, dass nur ein kleiner Anteil der Tumorzellen, der erst spät im Krankheitsverlauf entsteht die Fähigkeit besitzt sich vom Primärtumor zu lösen und Absiedelungen zu bilden [163]. Bernards und Weinberg entwickelten eine andere Theorie, nach der die Fähigkeit zur Metastasierung schon früh in der Primärtumorentwicklung erlangt wird und somit an die meisten Tumorzellen weitergegeben wird [184]. Dieser Ansatz wurde durch mehrere

Genom- und Mausstudien unterstützt, so wurde gezeigt, dass das Metastasierungspotential eng mit bestimmten Genexpressionsmustern korreliert [185-187]. Obwohl allgemein anerkannt ist, dass ein Primärtumor sehr heterogen aufgebaut ist, wurden die genannten Studien mit der kompletten Tumormasse durchgeführt. Es konnte nicht nur gezeigt werden, dass das Metastasierungspotential an sich, sondern auch die Metastasierung in ein bestimmtes Organ genetisch schon im Primärtumor festgelegt ist [188]. Des Weiteren kann man einzelne zirkulierende Tumorzellen (CTC) und disseminierte Tumorzellen (DTC) in Knochenmark und Lymphknoten schon in frühen Stadien bei Tumorkranken finden [189].

Trotz dieser neuen Erkenntnisse ist die von Poste beschriebene Metastasierungskaskade noch heute gültig, auch wenn noch nicht alle Schritte auf molekularer Ebene abschließend erklärt sind:

Wachstum und Ausbreitung des Primärtumors, Invasion in Blut oder Lymphgefäße, Verschleppung der Tumorzellen, Adhäsion an das Endothel und Extravasation, Invasion des neuen Gewebes mit Zellproliferation und Angiogenese [163]. Neoplastische Zellen sind durch ihre genetische Instabilität in der Lage, sich durch Dedifferenzierung in mobilere mesenchymale und apoptoseresistente Zelltypen zu verwandeln [190, 191]. Dieser Prozess wird epitheliale-mesenchymale Transformation (EMT) genannt und kann durch bestimmte Stimuli wie TGF β , MAP-Kinase, Verlust von E-Cadherin oder die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie SNA1 angeregt werden [192, 193]. Zusätzlich spielen der Wnt-, Notch- und Hedgehog-Signalweg eine Rolle [190]. Welche Bedeutung der EMT im Metastasierungsprozess von Malignomen innehat ist noch nicht abschließend geklärt, jedoch ist er nicht mit der Metastasierung an sich gleichzusetzen. Klar ist aber, dass der Verlust von Zell-Zelladhäsion die Basis für Invasion und Metastasierung bildet [194].

Normalerweise gehen Zellen, die ihre Verbindung zum Ursprungsgewebe verlieren in Apoptose [195, 196]. Zahlreiche Studien zeigen, dass diese Mechanismen in Metastasen ausgeschaltet oder dereguliert sind. So kommt es beispielsweise zur Aktivierung von Überlebenssignalwegen (PI3-Kinase-Akt),

Überexpression von MMPs, TrkB Rezeptoren und antiapoptotischen Proteinen (BCL-2, BCL-XL) sowie zur Inaktivierung von p53 [197, 198].

Tumorwachstum und –progression sind durch die Gefäßversorgung limitiert (33). Vaskularisierung wird durch Neoangiogenese [199] und Übergriff auf bestehende Blutgefäße ermöglicht. Zahlreiche Onkogene (RAS, EGFR, HER2/NEU), Zytokine (VEGF), proteolytische Enzyme und Hypoxie können die Neoangiogenese verstärken [200-202]. Um Metastasen zu bilden müssen maligne Zellen die Gefäßwand durchdringen. Gefäßwände neu gebildeter Gefäße und Kapillaren sind oft fehlerhaft und undicht und erleichtern den Tumorzellen die Intravasation [199]. Des Weiteren hat man beobachtet, dass Tumorzellen in der Lage sind gewebst destructive, lysosomale und kollagenolytische Enzyme zu produzieren [203].

Es können mehrere Millionen Zellen pro Gramm Tumorgewebe täglich ins lymphatische oder Blutsystem gelangen [204], wie viele dieser zirkulierenden Zellen überleben ist bis heute ungeklärt. Die meisten Studien ergaben Überlebensraten unter 0,01% [205, 206], allerdings wurde in neueren Modellen gezeigt, dass beinahe alle malignen Zellen überleben und das Gefäßsystem wieder verlassen [207]. An der Gefäßwand können maligne Zellen mittels mechanischer Haftung über Fibrin und Thrombozytenplaques sowie durch Bindung an Endothelien arretieren [167]. Für die Extravasation werden ähnliche Mechanismen vermutet wie für die Invasion der Gefäße. Es wurden zahlreiche Motilitätsmechanismen [208, 209], Chemokine [210] und Proteinasen (MMP, Cathepsine, uPA) [211-213] hierfür identifiziert.

Im letzten Schritt der Metastasierungskaskade müssen Tumorzellen im Gewebe verankert werden und neue Zellkontakte aufbauen. Hierzu können sie zuvor herunterregulierte Gene für Adhäsionsmoleküle wieder aktivieren [214].

Bis heute ist eine Vielzahl von Onkogenen und Suppressorgenen analysiert, die eine Rolle in der Metastasierungskaskade spielen und als Ansatzpunkt neuer Therapien dienen können (Tab.4, 5 und 6). Trotzdem bedarf es noch weiterer intensiver Forschung um alle Mechanismen dieses komplexen Prozesses zu verstehen und neue Therapien für Patienten mit metastasierten Malignomen zu entwickeln.

Tab.4: Beispiele für an der Tumorprogression und Metastasierung beteiligter Genen modifiziert nach Eccles et al. [182]

Metastasenlokalisation	Gene / Signalweg
Metastasen allgemein	RUNX1, Kollagene, Myosin, BMI-1, Ki67, FGFR2, BUB1 und viele weitere Bindegewebsgene
Invasion	GPCR11, Cadherin 11, Vimentin, S100A8, LOX
Lymphknotenmetastasen	VAV3, PAX5, IGFBP7, Kollagene, S100 calciumbindende Proteine, Cathepsin B, D und L, MMP16, Integrin α 1, α 5, α 6 und β 5, uPAR, CD73, HIF1 α , Gene assoziiert mit Tumor-Matrix-Interaktion
Knochenmetastasen	TFF1 und 3, FGF-MAPK Signalweg, CXCR4, FGF5, MMP1, ADAMTS1, IL11, CTGF, Proteoglycan 1
Lungenmetastasen	SPARC, VCAM1, ID1IL13R α 2, ID1, MMP1 und 2, Epiregulin, Integrin α 3, CD44, Cyclin D1, Vimentin, p53, XBP1, BST1
Knochenmarkmetastasen	HIF1 α , CK 8, 18, 19, Jak-Stat-Signalweg
Nierenzellkarzinommetastasen	Caveolin 1, Lysyl Oxidase, Annexin A4, MMP14, Topoll α

Tab. 5: Beispiele wichtiger Metastasensuppressorgene und ihre Funktion nach Eccles et al. [182]

Metastasen Suppressor Gene	Funktion
Cadherin 11	Zelladhäsion, Zytoskelettstruktur
Caspase 8	Proapoptotisches Enzym
CD44	Zelladhäsion
Claudin 1 und 4	Bestandteil von Tight junctions
CRSP 3	Coaktivator der Transkription
Connective tissue growth factor	Integrin Bindung
Gelsolin	Aktin Polymerisation
E und N Cadherin	Ca ²⁺ -abhängige Zelladhäsion
KAI1	Integrininteraktion, bindet DARC auf Endothelzellen, EGFR Desensibilisierung
KISS 1	G-Protein Rezeptor Ligand
RECK	Reguliert Matrixmetalloproteinasen
RhoGD12	Reguliert Rho und Rac Funktion im Bezug auf Zellausbreitung und Motilität
Src-suppressed C Kinase Substrat	Moduliert Rho Signalweg
JNKK1/MKK4	Aktiviert p38 MAP Kinase und JNK
MKK6	Aktiviert p38 MAP Kinase
MKK7	Aktiviert JNK
Nm23	Histidinkinase, phosphoryliert Kinasesuppressor von Ras
RKIP	Hemmt RAF-vermittelte MAP/ERK Kinase Phosphorylierung
BRMS1	Chromatinumbau, Zell-Zell-Signale, PI3 Kinase Signalwirkung
Drg-1	Unbekannt

Tab. 6: Beispiele aktueller oder zukünftiger Behandlungsansätze für metastasierte Malignome modifiziert nach Eccles et al. [182]

Zelluläre Funktion	Beispiele für molekulare Targets	Beispiel für klinische oder präklinische Anwendungen
Angiogenese	VEGF, VEGF-R, Integrine	Bevacizumab, Semaxanib, Vatalanib, Vitaxin
Proteolyse/Invasion	uPA, MMPs	Amiloride, Marimastat, Prinomastat
Osteolyse	Farnesyl-diphosphat-Synthase	Bisphosphonate
Zellmotilität Apoptose	C-MET, Src, Rock, PLCy TRKB, PI3K, AKT, Twist, Snail	PHA665752, AMD3100 CEP751, PI103, ZSTK474
Onkogene	EGFR, ERB-B2, BCR-ABL, KIT	Gefitinib, Erlotinib, Cetuximab
Hypoxie	HIF1 α , NF κ B, LOX	YC-1, Vitexin

1.3 Das Nierenzellkarzinom

Das Nierenzellkarzinom (RCC) ist mit 90% aller renalen Malignome der häufigste bösartige Tumor der Niere und macht rund 2% aller Neoplasien aus [215, 216]. Im Jahr 2007 erkrankten in den USA 51190 Patienten neu am Nierenzellkarzinom, 12890 starben an den Folgen des Tumors [217], womit das Nierenzellkarzinom momentan an Platz 12 der häufigsten Todesursachen rangiert. Die Inzidenz dieses Tumors hat in den letzten 2 Jahrzehnten stetig, um ca. 2% pro Jahr zugenommen [217]. In Deutschland geht man von einer jährlichen Neuerkrankungsrate von ungefähr 6-7 Patienten pro 100.000 Einwohnern aus und auch hier wird eine steigende Inzidenz vermutet [218]. Die Geschlechterverteilung des Nierenzellkarzinoms wird mit etwa 2/3 der Erkrankungen bei Männern und 1/3 bei Frauen angegeben.

1.3.1 Einteilung, Staging und Grading

Histologisch werden verschiedene Phänotypen des Nierenzellkarzinoms differenziert, die sich hinsichtlich ihrer Häufigkeit und ihrer pathologischen Charakteristika unterscheiden. Maligne epitheliale Tumoren der Niere werden gemäß der histologischen Klassifikation renaler Tumoren der Union

internationale Contre le Cancer (UICC), des American Joint Committee on Cancer (AJCC) [219] sowie nach der Heidelberger Klassifikation [220] in fünf Phänotypen eingeteilt:

1. Konventionelles, klarzelliges Nierenzellkarzinom 70-80%
2. Papilläres (chromophiles) Nierenzellkarzinom 10-15%
3. Chromophobes Nierenzellkarzinom 5%
4. Sammelrohr (Ductus Bellini) Nierenzellkarzinom <1%
5. Unklassifizierte Nierenzellkarzinome 3-5%

Die histologische Bestimmung des Grades der Entdifferenzierung, das „Grading“, erfolgt beim Nierenzellkarzinom analog zum Grading anderer solider Tumoren, ebenfalls nach dem System der UICC/AJCC von 2009 [221]:

- | | |
|------|--|
| Gx | Ein Differenzierungsgrad kann nicht angegeben werden |
| G1 | Gut differenziertes Nierenzellkarzinom |
| G2 | Moderat differenziertes Nierenzellkarzinom |
| G3-4 | schlecht bis undifferenziertes Nierenzellkarzinom |

Die klinische Einteilung des Krankheitsstadiums erfolgt für das Nierenzellkarzinom, wie auch für die meisten anderen soliden Tumoren, mit Hilfe des von der AJCC publizierten TNM-Systems. Dabei handelt es sich um ein dreidimensionales Klassifikations- und Verschlüsselungssystem, das in den drei Dimensionen Primärtumor (T), regionäre Lymphknotenmetastasen (N) und Fernmetastasen (M) die Ausprägung einer malignen Neoplasie verschlüsselt. Tabelle 7 zeigt die aktuell gültige TNM-Klassifikation für das Nierenzellkarzinom der AJCC von 2009 [221].

Tab. 7: TNM-Klassifikation des Nierenzellkarzinoms nach UICC 2009 [221]

TNM	UICC 2009 Definition
T = Primärtumor	
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt auf Primärtumor
T1	Tumordurchmesser maximal 7 cm in seiner größten Ausdehnung, begrenzt auf die Niere T1a Tumordurchmesser maximal 4 cm T1b Tumordurchmesser mehr als 4 cm aber unter 7 cm
T2	Tumordurchmesser mehr als 7 cm, begrenzt auf die Niere
T3	Tumor infiltriert perirenale Strukturen, durchbricht jedoch nicht die Gerotafaszie T3a Tumor infiltriert Nebenniere oder perirenales Fettgewebe T3b makroskopische Ausbreitung in Nierenvene oder Vena cava caudal des Zwerchfells T3c Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in Vena cava kranial des Zwerchfells
T4	Tumor durchbricht die Gerotafaszie
N = regionäre Lymphknoten	
Nx	Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	Keine regionäre Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in einem regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in mehr als einem regionären Lymphknoten
M = Fernmetastasen	
Mx	Vorhandensein von Fernmetastasen nicht beurteilbar
M0	Keine Fernmetastasen vorhanden
M1	Fernmetastasen vorhanden

Die einzelnen Ausprägungen der TNM-Klassifikation wurden für das Nierenzellkarzinom in vier Krankheitsstadien zusammengefasst, die für die Prognose des Patienten eine essentielle Rolle spielen. Diese Einteilung, zusammen mit der jeweiligen 5-Jahresüberlebensrate, ist in Tabelle 8 wiedergegeben.

Tab. 8: Stadieneinteilung des Nierenzellkarzinoms nach UICC, mit 5-Jahresüberlebensrate in % nach Ficarra et al. 2002 [222]

UICC-Stadium	UICC 2009 TNM-Klassifikation			5-Jahresüberlebensrate in %
I	T1	N0	M0	94
II	T2	N0	M0	90
III	T1	N1	M0	63
	T2	N1	M0	
	T3	N0, N1	M0	
IV	T4	N0, N1	M0	28
	Jedes T	N2	M0	
	Jedes T	Jedes N	M1	

1.3.2 Pathomechanismen der Entstehung

Es sind zahlreiche Risikofaktoren bekannt, die zur Entstehung eines Nierenzellkarzinoms führen können. Hierzu gehören karzinogene Substanzen, wie Zigarettenrauch (RR zwischen 1,4 und 2,3), Kautabak, Cadmium, Blei, photochemische Substanzen, Thorotrast, Teer und Holzschutzmittel, sowie epidemiologische Risikofaktoren wie Adipositas (RR 2,7), Hypertonie und urbane Herkunft [223]. Des Weiteren lässt sich in 4% der Fälle eine familiäre Häufungen des Nierenzellkarzinoms beobachten. Folgende genetische Syndrome sind mit einem erhöhten Auftreten maligner Nierentumoren assoziiert: Das von Hippel-Lindau-Syndrom, das hereditäre papilläre Nierenzellkarzinom, die tuberöse Hirnsklerose und das Birt-Hogg-Dube-Syndrom.

Viele molekularpathologische Mechanismen, die zur Entwicklung des Nierenzellkarzinoms führen, sind heute bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit soll jedoch nur ein einziger namentlich genannt werden, da er den zentralsten Mechanismus in der Entstehung des klarzelligen Nierenzellkarzinoms darstellt.

In 50-60% der sporadischen klarzelligen Nierenzellkarzinome kommt es zum Funktionsverlust des von-Hippel-Lindau (VHL) Gens, zum einen durch Deletion des kurzen Arms von Chromosom 3 (3p) [224], sowie durch somatische Mutationen und epigenetische Veränderungen (Hypermethylierung) [225]. Das VHL-Protein ist essentieller Bestandteil der E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes

(VEC). VEC spielt eine zentrale Rolle in der schnellen Degradation des konstitutiv exprimierten hypoxie-inducible factor (HIF) unter normoxischen Bedingungen [216]. HIF wirkt als Transkriptionsfaktor, der, wenn er physiologischerweise unter hypoxischen Bedingungen nicht abgebaut wird, zu einer Reaktion des zellulären Stoffwechsels auf Transkriptionsebene führt. Folge des mutierten VHL-Proteins ist ein defekter VEC, was zu einer verminderten Degradation und somit erhöhter Konzentration von HIF in der RCC-Zelle führt, und schließlich zur Deregulation der Transkription und anderer zellulärer Prozesse [226, 227]. Dieser Mechanismus führt zur Hochregulation verschiedener immunologisch relevanter, tumorassoziierter Antigene, wie dem MET-Protoonkogen, VEGF, TGF- α , dem Chemokinrezeptor CXCR4, der Carboanhydrase 9 u.a. [228, 229].

1.3.3 Metastasen

Bei Diagnosestellung eines Nierenzellkarzinoms sind bereits 20% der Tumoren lokal fortgeschritten [230] und bei 25-30% der Patienten sind Metastasen festzustellen [217]. Weitere 30% entwickeln im Verlauf der Erkrankung Metastasen [231]. Sind Metastasen vorhanden, liegt die mittlere Überlebensdauer für Patienten mit Nierenzellkarzinom unbehandelt bei ungefähr 6-7 Monaten und die 2-Jahres Überlebensrate zwischen 20% und 30% [232], wobei metachrone, also im Verlauf auftretende Metastasen, eine bessere Prognose aufweisen als synchrone Metastasen [233]. Ebenso haben Patienten mit einzelnen Lungenmetastasen eine höhere Überlebensrate, als Patienten mit anderen Metastasenloki [234]. Die lymphogene Metastasierung umfasst in erster Linie die Lymphstationen am Nierenstiel, die regionalen, paraaortalen, parakavalen und iliakalen Lymphknoten. Fernmetastasen des Nierenzellkarzinoms bevorzugen folgende Organe:

- Lunge (50-60%) [235]
- Knochen (30-40%) [236]
- Leber (30-40%) [237]
- Nebenniere, kontralaterale Niere,
Retroperitoneum und Gehirn (je 5%) [237]

Allerdings können Metastasen des Nierenzellkarzinoms beinahe in allen Körperregionen beobachtet werden (Tab. 9).

Tab. 9: Studien zur Verteilung und Lokalisation von Metastasen (in %) des Nierenzellkarzinoms, modifiziert nach Griffin et al. [238]. Lu, Lunge; Kn, Knochen; Le, Leber; Ge, Gehirn; Lymph, Lymphknoten; n.f., nicht festgestellt

Studie	Patient- enzahl	Lu.	Kn.	Le.	Ge.	Lymph.	Andere Lokali- sationen
Saidi et al. 1998	45	38	17	15	7	62	Fossa renalis (10%), Becken (7%), kontrolaterale Niere (3%), Zoekum (3%), Haut (3%)
Beisland et al. 2004	305	38	20	15	9	-	Intraabdominal (3%), lokal (18%), andere (21%)
Eggener et al. 2006	1554	64	15	11	7	13	Lokal (9%), andere (10%)
Kuczyk et al. 1997	100	71	37	23	-	63	Gesamt (43%)
Chae et al. 2005	194	71	32	12	15	12	Lokal (17%), Nackenmuskeln (5%), kontrolaterale Niere (10%)
Masa-toshi et al. 2000	265	47	18	7	2	n.f.	Retroperitoneal- Organe (11%), Schilddrüsen (4%)
Dinney et al. 1992	314	45	34	17	7	n.f.	Nebenniere (7%)

Es sind einige Faktoren bekannt, die die Entstehung von Metastasen beim Nierenzellkarzinom beeinflussen: Zum einen ist das Stadium und das Grading des Primärtumors entscheidend, vor allem Patienten mit T3 und T4 sowie G3-4 Tumoren zeigen im Verlauf eine höhere Metastasierungsrate und eine schlechtere Prognose im Bezug auf das Gesamtüberleben [239-242]. Tabelle

10 zeigt verschiedene Studien, die das Auftreten von Metastasen im Bezug auf das Stadium des Primärtumors untersucht haben.

Tab. 10: Studien zur Metastasenentwicklung nach chirurgischer Therapie primär lokalisierter Nierenzellkarzinome, nach Griffin et al. 2007 [238].

Studie	Jahr	Patienten- zahl	Stadium	Patienten mit Met.- Entwicklung	Zeit zur Met.- Entwicklung in Monaten
Masatoshi et al.	2000	265	pT1	9	43,6
			pT2	32	39,6
			pT3	33	25
Sandeck et al.	1995	159	pT1	0	-
			pT2	15	29,5
			pT3	53	22
Hafez et al.	1997	327	pT1	4	-
			pT2	5	> 48
			pT3	12	6-24
Lavy et al.	1998	286	pT1	7	38
			pT2	27	32
			pT3	39	17

Ein weiterer Faktor für die Metastasierung ist der Tumorsubtyp. So wurde gezeigt, dass klarzellige RCCs doppelt so häufig metastasieren, wie papilläre und chromophobe RCCs [243, 244].

Zahlreiche, im Kapitel Metastasen beschriebene Onko- und Suppressorgene, wurden für die Metastasierungskaskade des Nierenzellkarzinoms als relevant entdeckt, wie beispielsweise Matrixmetalloproteinase 14, Topoisomerase II α , Caveolin 1, Annexin A4 und die Lysyl Oxidase [231].

1.3.4 Klinik und Diagnose

Das Nierenzellkarzinom ist insbesondere in frühen Stadien symptomarm und einer nichtapparativen klinischen Diagnostik nur wenig zugänglich. Die klassische Symptomtrias der nephrogenen Neoplasie, bestehend aus Flankenschmerz, Hämaturie und intraabdomineller Raumforderung tritt nur bei ca. 10% aller RCC-Patienten auf und weist in der Regel auf ein fortgeschrittenes Tumorstadium hin [223]. Weitere klinische Symptome sind

unspezifischer, wie Gewichtsverlust, Fieber, arterielle Hypertonie, sowie eine Varikozele testis, insbesondere des linken Hodens bei Kompromittierung des venösen Abstroms aus dem Hoden via Vena testicularis und Vena renalis. Als laborchemische Symptome des Nierenzellkarzinoms sind eine erhöhte BSG (Blutkörperchen-senkungsgeschwindigkeit) sowie eine Tumoranämie mit erniedrigtem Serum-Ferritin zu nennen.

Des Weiteren können aufgrund von inkretorischer Aktivität des Tumors zum Teil neoplastische Symptome wie Hyperkalzämie, Hypertonie oder Polyglobulie auftreten. Das bekannteste paraneoplastische Syndrom durch Leberfunktionsstörungen beim Nierenzellkarzinom stellt das Stauffer-Syndrom mit erhöhter BSG, erhöhtem α -2-Globulin, alkalischer Phosphatase und γ -Glutamyltransferase, einer Hyperalbuminämie und einem erniedrigten Quickwert dar.

All diese Symptome sind weder spezifisch noch besonders sensitiv, was dazu führt, dass zwischen 25-30% aller neu diagnostizierten Nierenzellkarzinome bereits Metastasen gebildet haben [245].

Häufig werden Nierenzellkarzinome als Zufallsbefunde bei einem Abdomenultraschall festgestellt; für die renale Sonographie als Suchverfahren auf RCCs wird eine Sensitivität von mindestens 82% angegeben [246]. Die Durchführung als Dopplersonographie kann den Informationsgewinn, insbesondere hinsichtlich einer Gefäßinvasion, deutlich steigern. Besonders in der Ausbreitungsdiagnostik und in der OP-Planung sind neben der klassischen Röntgendiagnostik, die modernen Schnittbildverfahren, wie Computertomographie (CT) oder alternativ Magnetresonanztomographie (MRT), unverzichtbar und hochsensitiver Standard. Weitere bildgebende Verfahren, die die moderne Diagnostik ergänzen können sind Angiographie, Nierenfunktionsszintigraphie und die Skellettszintigraphie. Heute können so bereits 61% der Nierenzellkarzinome in asymptomatischen Stadien diagnostiziert werden [247].

Viele experimentelle Bestrebungen wurden unternommen, einen im Serum nachweisbaren Tumormarker zur Diagnostik und Verlaufsbeobachtung zu definieren. Unter den mitdiskutierten Markern ist z.B. TuM2-Pk [248]. Jedoch

konnte bis heute kein Serummarker in der klinischen Standarddiagnostik etablieren.

1.3.5 Therapie

Die Standardtherapie des nicht metastasierten Nierenzellkarzinoms besteht in einer operativen Entfernung des Tumors mittels radikaler Nephrektomie durch Exzision der Gerotafaszie und ihres Inhalts unter Mitnahme der perirenaln Lymphknoten [249, 250]. Heute kann diese Operation in vielen Fällen laparoskopische durchgeführt werden. Zudem ist es möglich bei kleineren Tumoren (T1), bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion, oder bei Einzelniere, nur einen Teil der Niere zu entfernen (partielle Nephrektomie) [251-253]. Auch beim metastasierten Nierenzellkarzinom sollte eine Resektion des Primärtumors mittels radikaler Nephrektomie durchgeführt werden, da sich in Studien eine Überlebensverlängerung im Vergleich zur alleinigen systemischen Therapie gezeigt hat [254]. Ebenfalls sollten singuläre Metastasen operativ entfernt werden.

Im Gegensatz zu den guten Ergebnissen der chirurgischen Therapie des Nierenzellkarzinoms im lokalisierten Stadium sind die systemischen Therapieoptionen bei generalisierter Krankheit eingeschränkt.

Das Nierenzellkarzinom gilt allgemein als resistent gegen Chemotherapie, Strahlen- und Hormontherapie [255]. So zeigte Yagoda et al. 1995 in einer Metaanalyse, die 3502 an metastasiertem Nierenzellkarzinom erkrankte und chemotherapeutisch behandelte Patienten umfasste, dass die generelle Ansprechrate im Sinne einer kompletten oder partiellen Remission nur bei 5,6% lag [256]. Neuere zytotoxische Substanzen wie Gemcitabine, Irinotecan, Oxaliplatin, Paclitaxel und Carboplatin wurden als Monotherapie und in Kombination in Phase-II-Studien getestet. Hier konnte beispielsweise für die Kombination von Capecitabine und Gemcitabine eine partielle Remissionsrate von 15,8% erreicht werden [257]. Obwohl es keinen etablierten Einsatz von Chemotherapie bei fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom gibt, könnte die Kombination neuere Substanzen eine Rolle in der Behandlung von Patienten, die eine Krankheitsprogression unter der Standardtherapie zeigen, spielen [258].

Auch die Strahlentherapie spielt eine untergeordnete Rolle in der kurativen Behandlung von renalen Neoplasien. Weder für die präoperative [259, 260], noch für die postoperative Strahlentherapie, konnte eine signifikante Prognoseverbesserung gezeigt werden [261, 262]. Einzige Ausnahme scheinen Patienten in fortgeschrittenem Tumorstadium (T3) zu sein, die lokal nur bedingt operabel sind [263]. Darüber hinaus ist die Radiatio in der Palliativmedizin als Methode der Schmerzbekämpfung und zur Verbesserung der Lebensqualität vor allem bei Skelett- und Hirnmetastasen eine wirksame Methode. Zur Entfernung von solitären Metastasen gewinnt auch die Radiofrequenzablation eine immer größere Bedeutung [264].

1.3.5.1 Targettherapie

Unter Targettherapie werden Substanzen zusammengefasst, die meist klar definierte molekulare Angriffspunkte haben. Mit der Analyse der molekularen Pathogenese des Nierenzellkarzinoms wurden in den letzten Jahren zahlreiche solcher molekularen Angriffspunkte und entsprechende Wirkstoffe identifiziert und entwickelt. Ein großer Erfolg in der Targettherapie des Nierenzellkarzinoms stellt die Entwicklung und Zulassung der Tyrosinkinaseinhibitoren Sunitinib und Sorafinib dar. Beide Substanzen sind so genannte „small molecule drugs“ mit multiplen Angriffspunkten.

Sunitinib hemmt VEGF-Rezeptoren, FLT3, c-KIT und PDGF-Rezeptoren [265]. Momentan ist Sunitinib als orale Medikation in der „second-line“ Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms anerkannt, da zahlreiche Studien einen Vorteil gegenüber palliativer Therapie und IFN- α gezeigt haben [266]. Allerdings müssen die, nicht unerheblichen, Nebenwirkungen, wie Hyperthyreose, Hypertonie, Hautveränderungen, Müdigkeit und Neutropenie beachtet werden [223].

Sorafinib hemmt ebenfalls VEGF- und PDGF-Rezeptoren, sowie FLT3, RAF-1 und BRAF [267]. Bekannte Nebenwirkungen sind Diarrhöe, Hautveränderungen, Hypophosphatämie, Hypertonus und kardiale Beschwerden [223], weswegen Sorafinib nicht bei Patienten mit kardialen

Vorerkrankungen empfohlen wird. Auch Sorafinib ist nur für die „second-line“ Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms zugelassen.

Neben diesen beiden bereits zugelassenen Targets Substanzen, werden zahlreiche weitere mögliche Therapeutika des Nierenzellkarzinoms in klinischen Studien momentan getestet. Hierzu gehören weitere Tyrosinkinaseinhibitoren, wie Pazopanib und Axitinib [268], sowie Proteasomeninhibitoren (Bortezomib) [269, 270] und Inhibitoren der Histondeacetylase (Vorinostat) .

mTOR (mammalian target of rapamycin) ist ein Protein, welches im menschlichen Körper eine wichtige Rolle in Signalkaskaden für Wachstum, Überleben, Proliferation und Motilität spielt. Es konnte gezeigt werden, dass mTOR in ca. 5% der Nierenzellkarzinome überexprimiert ist, und mit einer schlechten Prognose und hoher Aggressivität des Tumors einhergeht [271]. Substanzen wie Sirolimus, Temsirolimus und Everolimus hemmen mTOR und befinden sich momentan in der klinischen Testphase für die Therapie des Nierenzellkarzinoms [272].

Tabelle 11 zeigt eine Zusammenfassung neuer Targets Substanzen in der Therapie des Nierenzellkarzinoms im Bezug auf Wirkung und Toxizität.

Tab. 11: Zusammenfassung neuer Targettherapiesubstanzen in der Therapie des Nierenzellkarzinoms, im Bezug auf Wirkung und Toxizität, modifiziert nach Costa et al. 2007 [258], met., metastasiert; ev., eventuelle.

Substanz	Wirk-mechanismus	Nebenwirkungen	Studien-ergebnisse
Zugelassen			
Sorafenib	SMD	Hautausschlag, Diarrhöe, Hypertonus	Längeres PFS als mit Placebo in zytokinrefraktären Patienten
Sunitinib	SMD	Thrombozytopenie, Leukopenie, Hautveränderungen Diarrhöe, Hypertonus	Höhere RR und längeres PFS als mit IFN- α bei unbehandelten Patienten
Temsirolimus	Hemmt mTOR-Kinase	Hautausschlag, Stomatitis	Längeres PFS und OS als mit IFN- α bei unbehandelten Hochrisikopatienten mit met. RCC
Wirksam			
Pazopanib	SMD	Erhöhung der Leberenzyme, Diarrhöe, Hypertension	40% RR in Phase-II-Studien
Everolimus	Hemmt mTOR-Kinase	Hautausschlag	32% RR in Phase-II-Studien
Axitinib	SMD	Hypertonus, Stomatitis	46% RR in Phase-II-Studien
Ev. Aktivität			
Sirolimus	mTOR Hemmung	Hautausschlag, Stomatitis, Pneumonie	Keine Studien vorhanden
Vorinostat	Histondeacetylase Hemmer	Diarrhöe, Müdigkeit	Keine Studien vorhanden
Lapatinib	SMD	Hautausschlag, Diarrhöe	Eventuelle Aktivität in Tumoren, die EGFR überexprimieren
Bortezomib	Proteasomen-Inhibitor	Thrombozytopenie, periphere Neuropathie	RRs von 11% und 4% in zwei Phase-II-Studien

1.3.5.2 Immuntherapie

Das Nierenzellkarzinom wird häufig als „immunogener Tumor“ bezeichnet. Dies beruht auf den Tatsachen, dass spontane Remissionen (die dem Immunsystem zugeschrieben werden) im Prozentbereich beobachtet werden [273], Nierentumore durch T-Lymphozyten infiltriert und TILs sowohl in Lymphknoten als auch im peripheren Blut nachgewiesen werden können [274]. Den hohen Stellenwert des Immunsystems zeigen zudem zahlreiche Tumorescapephänomene, die beim Nierenzellkarzinom eine bedeutende Rolle spielen. Aus diesen Gründen wurde bereits früh versucht, die Kräfte des Immunsystems für eine Therapie des Nierenzellkarzinoms zu nutzen:

Die ersten Versuche einer Immuntherapie des Nierenzellkarzinoms wurde 1984 mit dem Zytokin IL-2 unternommen. Es kann i.v., s.c. oder inhalativ verabreicht werden. IL-2 stimuliert beispielsweise die Proliferation von spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten gegen tumorassoziierte Antigene sowie die Reifung von NK-Zellen. Heute gehört IL-2 zu den zugelassenen Therapeutika bei Nierenzellkarzinom mit dem durchschnittlich Remissionsraten von 20% erzielt werden können [275-278]. Ebenso zugelassen ist das Zytokin Interferon- α , welches eine antiproliferative und antivirale Aktivität besitzt. Eine zusammenfassende Cochrane-Analyse von 53 Studien mit 6117 Patienten zur IFN-basierten Therapie metastasierter RCCs ergab eine mittlere Ansprechrates von 12,9%, eine Remissionsrate von 3,6% und eine mittlere Überlebensrate von 13,3 Monaten [275]. In zahlreichen Studien wurde zudem die Wirksamkeit von Zytokinen in Kombination mit Chemotherapie, wie z.B. Vinblastin mit IFN- α (zugelassen [279]), und IL-2 mit 5-FU ([280]) untersucht. Tabelle 12 zeigt mehrere zytokinbasierte Therapieansätze des Nierenzellkarzinoms, die bereits zugelassen oder in der klinischen Prüfung weit fortgeschritten sind.

Beim Nierenzellkarzinom sind insbesondere der endotheliale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) und der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF), wie zuvor beschreiben, überexprimiert und bieten damit ein mögliches Ziel einer Antikörpertherapie [216]. Bevacizumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper, der an alle Isoformen des VEGF bindet. Für das Nierenzellkarzinom konnten in Phase-II-Studien eine Verlängerung des progressionsfreien

Überlebens gezeigt werden [281], Phase-III-Studienergebnisse stehen allerdings bislang noch aus. Viel versprechende Ergebnisse ergaben sich ebenfalls bei der Kombination von Bevacizumab mit dem EGFR-Antikörper Erlotinib [282], ebenso in der Einzelanwendung verschiedener EGFR-Antikörper (Panitumumab [283], Cetuximab [284]).

G250 gehört zur Familie der Carboanhydrasen und wird in 80% aller Nierenzellkarzinome exprimiert; mit Rencarex, einem Antikörper gegen dieses Antigen, konnten in einer Phase-II-Studie erstmals positive Ergebnisse erzielt werden [285].

Tabelle 12 gibt einen Überblick über Antikörper, die sich momentan in klinischer Erprobung für die Behandlung des Nierenzellkarzinoms befinden.

Auch die allogene Stammzelltransplantation, die hauptsächlich in der Behandlung hämatologischer Tumoren zum Einsatz kommt, wurde in Studien für die Therapie des Nierenzellkarzinoms untersucht [286]. Den Berichten über Remissionen steht in diesen Studien die nicht unerhebliche Zahl transplantationsbedingter Todesfälle gegenüber [287].

In den letzten 30 Jahren wurden von einer Reihe von Arbeitsgruppen auch Vakzine-Ansätze für die Therapie des Nierenzellkarzinom entwickelt [288].

Bei der adjuvanten Tumorimpfung des nichtmetastasierten Nierenzellkarzinoms standen autologe Tumorzellvakzine (Reniale) und Hitzeschockprotein-Vakzine (Oncophage) im Vordergrund. Für Reniale zeigen Phase-III-Studien bereits einen höheren Prozentsatz an rezidivfreien Patienten im Vergleich zu Patienten die nur radikal nephrektomiert wurden [289]. Auch für Oncophage laufen momentan Phase-III-Studien [290] (Tab. 12).

Bei der Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms spielen vor allem Ansätze mit dendritischen Zellen eine Rolle. Die bisher durchgeführten klinischen Studien mit DCs unterscheiden sich vor allem in den Aspekten Herkunft der DCs, Reifungsstatus und Antigenformulierung zur Beladung der DCs (Tab. 13). Allerdings konnte in den bestehenden Phase I und II Studien nur geringe Benefits für die Patienten erzielt werden [276].

In Zusammenarbeit mit der Universitätsklinik für Urologie in Tübingen, wird von unserer Arbeitsgruppe zudem im Moment eine Studie zur adjuvanten

antigenspezifischen Immuntherapie von Patienten mit fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom durch Tumor-assoziierten Peptidvakkzine durchgeführt. Eine genauere Beschreibung dieser Studie erfolgt im Ergebnisteil dieser Arbeit. Trotz der enormen Fortschritte im Verständnis der Tumorbio- und -immunologie des Nierenzellkarzinoms, scheint es noch ein langer Weg, dieses Wissen in gut wirksame Therapiestrategien umzusetzen, welche zu einer deutlichen Prognoseverbesserung bei Patienten mit metastasierter Krankheit führen.

Tab. 12: Immuntherapeutika des Nierenzellkarzinoms, die bereits zugelassen oder deren klinische Prüfung weit fortgeschritten sind.

Name	Zielstruktur	Status	Referenzen
Reniale	Autologe Tumorzellvakzine	Abgeschlossene Phase-III-Studie	[289]
Oncophage	Hitzeschockprotein- Vakzine	Laufende Phase- III-Studie	[290]
Rencarex	G250-Antikörper	Laufende Phase- III-Studie	[285]
Roferon	IFN- α 2a	Zugelassen	[275]
Proleukin	IL-2	Zugelassen	[275]
Roferon + Vinblastin	IFN- α 2a + CTx	Zugelassen	[279]
Roferon + 13-cis- Retinolsäure	IFN- α 2a + Immunmodulation	Abgeschlossene Phase-III-Studie	[291, 292]
Roferon + Proleukin + 5-FU	IFN- α 2a + IL-2 + CTx	Abgeschlossene Phase-III-Studie	[280, 293]

Tab. 13: Neue immuntherapeutische Ansätze des Nierenzellkarzinoms, die sich in frühen Abschnitten der klinischen Prüfung befinden.

Therapieansatz	Zielstruktur	Status	Referenz
Avastin (Bevacizumab)	VEGF-Ak	Abgeschlossene Phase-II-Studie, laufende Phase- III-Studien	[281]
Avastin + Tarceva (Bevacizumab + Erlotinib)	Bevacizumab, VEGF- Antikörper + Erlotinib, EGFR-Ak	Abgeschlossene Phase-II-Studie	[282]
ABX-EGF (Panitumumab)	EGFR-Tyrosinkinase- Inhibitor	Abgeschlossene Phase-II-Studie	[283]
Allogene Stammzell- transplantation	Immunmodulation	Abgeschlossene Phase-II-Studien	[286, 287]
Autologe DC-Vakzine	Beladen mit autologem Tumorzell- Lysat + Keyhole- limpet-Hämocyanin + adjuvante Gabe von IL-2	Abgeschlossene Phase-I/II-Studie	[276]
Autologe DC-Vakzine	Transfektion mit Tumor-RNA	Abgeschlossene Phase-I/II-Studie	[276]
Autologe DC-Vakzine	Beladen mit Tumorzell-Lysat	Abgeschlossene Phase-I/II-Studie	[276]
Autologe DC-Vakzine	Elektrofusion mit autologen oder allogenen Tumorzellen	Abgeschlossene Phase-I/II-Studie	[276]
Autologe DC-Vakzine	Beladen mit Tumorzelllysate + Keyhole-limpet- Hämocyanin	Abgeschlossene Phase-I/II-Studie	[294]

1.4 Ziele der Arbeit

Das Nierenzellkarzinom ist als häufigster maligner Tumor der Niere des Erwachsenen für ungefähr 2% aller humanen Neoplasien verantwortlich. Durch das Fehlen von Frühsymptomen bestehen bei einem großen Anteil der Patienten zum Diagnosezeitpunkt schon Lymphknoten- oder Fernmetastasen [295]. Das metastasierte Nierenzellkarzinom hat auch heute noch eine sehr schlechte Prognose, mit einer Todesrate von 100.000 Patienten pro Jahr [296] und einer 5-Jahresüberlebensrate von unter 2% [297]. In der Mehrzahl der Fälle ist die Todesursache nicht durch den Primärtumor verursacht, der meist chirurgische entfernt werden kann, sondern durch die synchronen und metachronen Metastasen, die sich ungehindert im Körper ausbreiten können.

Die große Immunogenität des Nierenzellkarzinoms hat in den letzten Jahren zu zahlreichen immuntherapeutischen Konzepten, Therapieoptionen und auch klinischen Studien, wie beispielsweise Tumorimpfung mit HLA-präsentierten Peptiden tumorassoziierter Antigene, geführt. Doch obwohl die meisten dieser Impfstudien Patienten mit metastasierter Erkrankung einschließen, ist bis jetzt noch nichts über die HLA-Peptidpräsentation auf Metastasen im Vergleich zum Primärtumor und Normalgewebe bekannt. So wurden auch die meisten der verwandten Peptide auf primären Nierenzellkarzinomen analysiert [88, 245, 298, 299]. Bislang wurden die HLA-Präsentation und die entsprechende mRNA-Expression des primären Nierenzellkarzinoms nur mit dem normalen Nierengewebe und nicht mit den Metastasen verglichen [146, 300]. Aus diesem Grund besteht die zentrale Zielsetzung dieser Arbeit in der Analyse der Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen Primärtumor, autologem Normalgewebe und Metastasen des Nierenzellkarzinoms. Dieser Vergleich soll sowohl auf dem Level der HLA-Präsentation als auch auf dem Level der mRNA-Expression durchgeführt werden. Das Ziel dieser Untersuchung ist es, einen Einblick in das HLA-Peptid-Ligandom des metastasierten Nierenzellkarzinoms zu gewinnen und neue metastasenspezifische HLA-Liganden zu identifizieren, die eine Perspektive für die Immuntherapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms geben.

Um dies zu erreichen, werden sowohl quantitative Analysen HLA-präsentierter Peptide mittels Westerblot und Edmansequenzierung, als auch qualitative und vergleichende massenspektrometrische Analysen mittels „stable isotope labelling“ und LC-MS basierter Peptidsequenzierung durchgeführt. Zusätzlich wird für Primärtumor, Normalgewebe und Metastase die mRNA-Expression im Bezug auf einzelne Peptide, aber auch auf das gesamte Expressionsprofil, untersucht und verglichen.

Die Überprüfung der Immunogenität und damit die Eignung als T-Zell-Epitop tumorassoziierter Peptide wird mittels T-Zellstimulationsexperimenten durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1 Isolierung HLA-Klasse-I-gebundener Peptide

Als Quelle der möglichen Zielstrukturen für die Immuntherapie dienen entweder Tumorzelllinien oder Tumorgewebe. Tumorzelllinien haben den großen Vorteil, dass sie relativ leicht und in großen Mengen homogen kultivierbar sind, zudem sind sie einer umfassenden Charakterisierung zugänglich und können experimentell manipuliert werden. Solides Tumorgewebe ist hingegen sehr heterogen und der feste Gewebsverbund ist nur schwer für die HLA-Ligandensequenzierung aufzubereiten. Trotzdem bietet solides Tumorgewebe einen immensen Vorteil, Situation besteht, wohingegen langjährig kultivierte Zelllinien an Ähnlichkeit zum Primärtumor verlieren.

Die klassische HLA-Ligandenisolierung lässt sich in drei grundsätzliche Schritte aufteilen: Die Herstellung eines Zellysats und den Zellaufschluss, die Immunpräzipitation durch Affinitätschromatographie mittels HLA-spezifischer Antikörper und die Peptidlösung mittels Ultrafiltration.

2.1.1 Auswahl der Patienten, verwendetes Gewebematerial

Für die HLA-Ligandomanalyse wurde ausschließlich solides Nierenzellkarzinomgewebe verwendet. Als Ausgangsmaterial hierfür wurden frische Resektate durch die Universitätsklinik für Urologie Tübingen, zur Verfügung gestellt. Es wurden sowohl Patienten eingeschlossen, deren Krankheit sich bereits bei Diagnosestellung im metastasierten Stadium befand als auch Patienten die erst Monate bis Jahre nach Diagnose und Therapie des Primärtumors Metastasen entwickelten. Bei der Durchführung der Tumornephrektomie in der urologischen Universitätsklinik wurde direkt nach Resektion des tumortragenden Gewebes eine möglichst große Probe des Primärtumors, sowie autologes, gesundes Nierengewebe, möglichst weit vom Tumor entfernt, entnommen und in flüssigem Stickstoff bei ca. -196 °C schockgefroren.

Eventuelle Metastasen wurden entweder innerhalb der Primäroperation (hauptsächlich Lymphknotenmetastasen) oder in einer sekundären Operation

(hauptsächlich Fernmetastasen) entnommen. Auch hier wurde versucht möglichst viel malignes Gewebe für die durchgeführte Studie zu gewinnen.

Primärtumor, autologes Normalgewebe und Metastase des Patienten wurden jeweils in separaten Falcon-Tubes bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Zur HLA-Typisierung wurden intra- bzw. postoperativ 10 ml EDTA-Blut abgenommen und im Zentrum für klinische Transfusionsmedizin, Tübingen, analysiert.

Alle Patienten wurden vor der Probeentnahme ausführlich über Methoden und Ziele der Studie aufgeklärt und unterzeichneten eine Einverständniserklärung. Ein positives Votum der örtlichen Ethikkommission zum Projekt „T-Zellepitope für die Immuntherapie des Nierenzellkarzinoms“ liegt unter der Projektnummer 438/2004V vor.

2.1.2 Herstellung des Gewebelysats

Der gesamte Prozess der Lysatherstellung wurde bei 4°C durchgeführt. Aus PBS, 0,6% CHAPS und 6 Tabletten Proteaseinhibitoren „complete“ (Roche) wurden 200ml doppelkonzentrierter Lysepuffer hergestellt, der zum Aufschluss der Zellmembran diente. Das Gewebe wurde, im gefrorenen Zustand unter Zugabe eines dem Gewebevolumen äquivalenten Volumens doppelkonzentriertem Lysepuffer zunächst mit einem Skalpell in ca. 1-5 mm große Stücke zerkleinert um Zellschädigung und Erwärmung durch einen Mixer zu vermeiden. Der weitere Gewebsaufschluss erfolgte unter etappenweiser Zugabe zweier, dem Tumolvolumen äquivalenter Volumen, einfachkonzentriertem Lysepuffer, mechanisch mit dem Potter (Heidolph; RZR2020).

Das hierdurch erhaltene Gewebelysats wurde nach Zugabe eines weiteren Volumens einfachkonzentrierten Lysepuffers, unter leichtem Rühren für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde das Lysat unter Kühlung 3 mal 20 sek. sonifiziert (Sonifier 250, Branson), um die Zellmembranen durch Ultraschallwellen weiter aufzuschließen.

Zur Entfernung des Zelldetritus wurde zunächst 20 min bei 4000 rpm und 4°C (Heraeus Instruments, Megafuge 1.0 R) und anschließend eine Stunde bei 40000 rpm, 4°C (Beckman L-80 Ultracentrifuge, Rotor Ti 45 oder Ti 70) zentrifugiert. Die Pellets wurden nach beiden Zentrifugationsschritten verworfen.

Der Überstand wurde zur Entfernung letzter kolloidaler Bestandteile sterilfiltriert (Sartolab-P20 plus; Porengröße 0.2 µm). Vom Filtrat wurden 500 µl abgenommen und für eventuelle spätere Untersuchungen bei -20°C gelagert.

2.1.3 Affinitätschromatographie mittels BrCN-Säule

2.1.3.1 Antikörper

Die im Gewebe enthaltenen MHC-Klasse I-Moleküle mit gebundenen Peptiden wurden affinitätschromatographisch aufgereinigt. Zur Bindung der MHC-Moleküle wurde der anti-human IgG_{2a}-Antikörper W6/32 [301], der selektiv an MHC-Moleküle der Klasse I A, B und C bindet, verwendet. Zusätzlich wurden MHC-Klasse-II-Moleküle mittels des Antikörpers L243, der selektiv an humane HLA-II-DR bindet und spezifische HLA Subtypen mittels GAP A3, der selektiv an MHC-I A3 bindet, isoliert, jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter analysiert.

Alle Antikörper wurden laborintern von Frau Claudia Falkenburger hergestellt und freundlicherweise zu Verfügung gestellt.

2.1.3.2 Herstellung der Affinitätschromatographiesäulen

Zur Affinitätschromatographie wurden BrCN-Säulen verwendet. Hierzu wurde 40mg pro mg Antikörper BrCN-Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech), zunächst durch Inkubation mit 1 mM HCL für 30 min aktiviert. Anschließend wurde die Sepharose bei 4°C, 300 rpm, 4 min ohne Bremse abzentrifugiert (Heraeus Instruments, Megafuge 1.0 R) und mit 1mg des Antikörpers pro g Gewebe, jedoch mindestens 20 mg, nach photometrischer Konzentrationsbestimmung (t_0) für 120 min (t_{120}) inkubiert.

Nach Abzentrifugation der Sepharose (4°C, 300 rpm, 4 min, ohne Bremse) wurden 100 µl des Überstands zur photometrischen

Kopplungseffizienzbestimmung abgenommen. Diese errechnet sich aus den Konzentrationsbestimmungen zum Zeitpunkt t_0 und t_{120} und sollte nach zwei Stunden zwischen 95 und 99% liegen.

Freie Bindungsstellen der BrCN-Sepharose wurden anschließend durch 60 min Inkubation mit 0,2 M Glycin blockiert. Nach Abzentrifugation der Sepharose (4°C, 300 rpm, 4 min, ohne Bremse), wurde das entstehende Gelbett zweimal mit PBS (phosphate buffered saline) gewaschen und nach Resuspension in PBS in die Chromatographiesäule überführt. Zur Äquilibrierung wurde die Säule für 30 min bei linearem Fluss und einer Flussrate von 2 ml/min mit Lysepuffer gewaschen.

2.1.3.3 Durchführung der Affinitätschromatographie

Das Gewebelysat wurde zyklisch für mindestens 12 h bei einer Flussrate von 2 ml/min über die BrCN-Säule geleitet, so dass das Gesamtvolumen des Lysats theoretisch mindestens fünfmal die Säule passieren konnte und möglichst alle MHC-Moleküle an den Fab-Teil der sepharose-gebundenen Antikörper gekoppelt wurden.

Das Lysat wurde gesammelt und für spätere Kontrollen bei -20°C gelagert.

Anschließend erfolgten zwei Waschschrte, zunächst 30 min mit PBS und einer Flussrate von 1-1,5 ml/min und im Anschluss 60 min mit destilliertem Wasser (Flussrate 1-1,5 ml/min).

Im nächsten Schritt wurden die Antikörper-MHC-Peptid-Komplexe durch Säurebehandlung eluiert. Hierzu wurde die Säule so weit entleert, dass sich gerade kein Wasserspiegel mehr über dem Säulenmaterial befand, die BrCN-Sepharose aber nicht trocken lief. Im ersten Schritt wurden 200 µl 0,2 % TFA und 10 µl 10% TFA auf die Matrix mittels Hamilton-Spritze aufgetragen, so dass die Matrix bedeckt war. Nach 20-30 min Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Rüttler wurde das Eluat in zwei Centricons gepumpt (Ultrafiltrationseinheit, Centrikon, YM-10, Amicon, 2ml). Es folgten sieben weitere Eluationsschritte mit Inkubation von 200-400 µl 0,2 % TFA für 20-30 min. Nach jedem Elutionschritt wurden 5 µl des Eluats für die quantitative Bestimmung mittels Western Blot, sowie 10 µl des Eluats für die quantitative

Bestimmung mittels Edmansequenzierung abgenommen und, in zuvor mit 10 % TFA gewaschene Eppendorf Cups bei -20°C, gelagert.

2.1.3.4 Ultrafiltration zur Isolierung der MHC-gebundenen Peptide

Das Eluat der Affinitätschromatographie wurde direkt in Ultrafiltrationseinheiten geleitet. Die Filter wurden zuvor zweimal mit 0,2 % TFA in destilliertem Wasser gewaschen, um eine Kontamination der Probe mit im Filtermaterial enthaltenen Polyethylenglycol zu vermeiden. Die verwendeten Filter lassen Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von 10kDa passieren und trennen damit die im Eluat enthaltenem Peptide (durchschnittliches Molekulargewicht, ca. 1,1 kDa) von den MHC Klasse I- α -Ketten (Molekulargewicht 43 kDa), dem β_2 -Mikroglobulin (Molekulargewicht 12 kDa) und den IgG-Antikörpern (Molekulargewicht der γ -Kette 55 kDa, der λ -Kette 22 kDa), sowie von anderen, das Eluat kontaminierenden, Makromolekülen. Die Ultrafiltration erfolgte bei Zentrifugation mit 4000 rpm, 4°C (Heraeus Instruments, Megafuge 1.0 R) bis das gesamte Volumen den Filter passiert hatte. Das Ultrafiltrat wurde vor der Aufkonzentrierung mittels Lyophilisation (Gefriertrocknung) bei -80°C eingefroren.

Bei der Lyophilisation (Vaco5, ZIRBUS) verdampft das als Eiskristalle vorliegende Lösungsmittel, ohne zuvor in den flüssigen Zustand überzugehen. Nach vollständiger Sublimation des Lösungsmittels über Nacht wurde das MHC-I-Peptide enthaltende Lyophilisat bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

2.2 Quantitative Analyse

2.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot

Die Auftrennung der Proteine aus den Eluaten der Affinitätschromatographie erfolgte nach ihrem Molekulargewicht mittels einer Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese [302]. Hierbei werden die Proteine in einem, die Schwefelbrücken reduzierenden Ladepuffer, auf ein diskontinuierliches Polyacrylamidgel, bestehend aus einem Sammelgel und einem Trenngel,

aufgetragen. Das im Ladepuffer und im Gel enthaltene Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet an Proteine in einem stöchiometrischen Verhältnis von ca. 1,4 g SDS/1 g Protein, wobei jedes SDS-Molekül eine negative Ladung beisteuert. Dadurch wird die Eigenladung der Proteine überdeckt und es entsteht ein konstantes Ladung/Masse-Verhältnis. Die Proteine durchwandern im elektrischen Feld zunächst das Sammel- und dann das Trenngel. Die Porengröße des Sammelgels ist so groß, dass noch kein Molekularsiebeffekt auftritt, es dient zur Fokussierung der Proteinbanden nach dem Prinzip der Isotachophorese. Hierzu dient das im Gel enthaltene Glycin als „terminating Ion“, da seine elektrophoretische Mobilität geringer ist als die der Protein-SDS-Aggregate und die ebenfalls enthaltenen Chloridionen als „leading Ionen“, da ihre Mobilität höher ist als die der Aggregate. Unter den Bedingungen der Elektrophorese können sich die beiden Banden (Chlorid und Glycin) nicht trennen, da sonst eine positiv geladene Zone entstünde (Kirchhoffsches Gesetz) und die Protein-SDS-Aggregate werden gewissermaßen zwischen den Chlorid- und Glycinbanden fokussiert. Dieser Effekt fällt beim Übertreten in das Trenngel durch die Änderung des pH-Wertes weg, jedoch entsteht durch die höhere Dichte des Trenngels der gewünschte Molekularsiebeffekt. Im Polyacrylamidgel besteht über einen bestimmten Bereich ein linearer Zusammenhang zwischen der Wanderungsstrecke s und dem Logarithmus des Molekulargewichts des Proteins [303]. Die Molekulargewichtbestimmung der Proteine erfolgt durch Vergleich der Laufstrecken mit der bekannter Probeproteine (Marker).

Um ein Protein aus einem elektrophoretisch getrennten Proteingemisch immunologisch zu identifizieren, überträgt man die Proteine zunächst durch Elektroblothing aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran [304]. Diese wird anschließend mit einem Antikörper gegen das zu detektierende Protein inkubiert. Die so markierte Bande wird schließlich meistens mit Hilfe eines Chemolumineszenzsystems, das aus einem Sekundärantikörper mit gekoppeltem Enzym zur Aktivierung eines autolumineszierenden Farbstoffs gegen den Primärantikörper besteht, detektierbar gemacht.

Diese Methode wird als Immunoblotting bzw. Western Blotting bezeichnet.

2.2.1.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Das 15% Polyacrylamid-Trenngel wurde zuerst hergestellt, zwischen die Platten der Elektrophoreseapparatur (Mini-Protean II Elektrophoresis Cell, Biorad) gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach Aushärtung des Gels für ca. 30 min und Entfernung des Isopropanols, wurde es mit dem Sammelgel überschichtet und ein Kamm, der die Auftragstaschen formt, eingeschoben. Trenn- und Sammelgel wurden aus folgenden Substanzen hergestellt (Tab. 14):

Tab. 14: Verwendete Reagenzien zur Herstellung der PAGE-Gele

Substanz	Hersteller	Trenngel 15%	Sammelgel 4,5%
40% Acrylamid / N,N'-Methylenbisacrylamid	29:1, Sigma	2,25 ml	0,4 ml
1,5 M Tris-HCL, pH 8,6	Sigma	1,5 ml	-
1,0 M Tris-HCL, pH 6,8	Sigma	-	0,3 ml
ddH ₂ O		2,1 ml	1,75 ml
10% SDS	Sigma	60 µl	25 µl
10% Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma	60 µl	25 µl
TEMED	Sigma	7,5 µl	3,75 µl

Nach abgeschlossener Polymerisation wurde das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt, diese wurde mit Laufpuffer (0,25 M Tris-HCL (Sigma), 1,9 M Glycin (Roth), 0,1% SDS (Sigma), pH 8,75) gefüllt und der Kamm vorsichtig aus dem Gel entfernt. Zur Bestimmung der MHC-Ausbeute aus der unter 2.1 beschriebenen Gewebeaufarbeitung wurden jeweils 5 µl von jedem der acht Eluate der Affinitätschromatographie (pH 3) mit 5 µl Laemmli-Probenladepuffer (125 mM Tris-HCl (Sigma) pH 6,8, 3,5% SDS (Sigma), 20% Glycerin (Roth), 10% Mercaptoethanol (Sigma), 0,2% Bromphenolblau) aufgefüllt, mit 1 µl 1M NaOH neutralisiert und auf dem Heizblock (Thermomixer 5436, Eppendorf) 5 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben in die Auftragstaschen des Gels geladen, zusätzlich wurde eine Tasche mit einem Proteinstandard (SeeBlue Pre-Stained Standard, Invitrogen, 175 kDa, 83 kDa, 62 kDa, 47,5 kDa, 32,5 kDa, 25 kDa, 16,5 kDa, 6,5 kDa) zur Bestimmung des

Molekulargewichts beschickt. Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 120V bei 30 mA über eine Stunde durchgeführt (Power Pac 200, Biorad).

2.2.1.2 Western Blotting

Zur Anfertigung dieser Arbeit wurden Westernblots mit Antikörpern gegen β 2-Mikroglobulin mit dem Ziel der Quantifizierung der MHC-Isolierung aus Tumor, Normalgewebe und Metastase hergestellt. Da β 2-Mikroglobulin im MHC-Klasse-I-Molekül in äquimolarer Konzentration zur α -Kette vorliegt, lässt sich die Konzentration von MHC-Molekülen durch Bestimmung von β 2-Mikroglobulin nur näherungsweise bestimmen.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Proben mit einer Semidry-Blotting-Apparatur (Transfer-Blot Kammer SDI, CTI) auf eine Nitrocellulosemembran (Hybond ECL, Pharmacia) transferiert. Dazu wurden in Puffer getränkte Filterpapiere (Whatman 3MM), die Blotmembran und das Polyacrylamidgel übereinander auf die Anode gelegt, zuerst vier Lagen Filterpapier, getränkt in Anodenpuffer (50 mM Natriumborat (Sigma), 20% Methanol, pH 9), dann die Nitrocellulosemembran, ebenfalls getränkt in Anodenpuffer, das Polyacrylamidgel, getränkt in Kathodenpuffer und zuletzt wieder vier Lagen Filterpapier, getränkt in Kathodenpuffer. Das Elektroblotting wurde mit einer Stromstärke von 42 mA pro in der Apparatur befindlichem Gel für 2 Stunden durchgeführt.

Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurde die Membran anschließend für eine Stunde in TBB (0,1% Nonidet P-40, 3% Rinderserum-Albumin, 5mM EDTA in TBS (50 mM Tris-Base, 150 mM NaCl, pH 8,0)) inkubiert. Als Erstantikörper wurde anschließend ein polyklonaler Antikörper (Kaninchen-Anti-Mensch) gegen β 2-Mikroglobulin-IgG (Abcam) in einer Verdünnung von 1:5000 in TBB eingesetzt und die Membran über Nacht bei 4°C mit diesem inkubiert. Anschließend wurde der Blot dreimal 5 min in TWB (0,1% Nonidet P-40 in TBS) gewaschen und mit dem Zweitantikörper für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Es handelt sich dabei um einen, mit Meerrettich-Peroxidase konjugierten, Esel-Anti-Kaninchen-IgG (Amersham) in einer Verdünnung von 1:5000 in TBB. Zur

Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper wurde die Nitrozellulosemembran im Anschluss dreimal für 10 min mit TWB gewaschen.

Die Visualisierung der Banden erfolgte unter Ausnützen der Luminolreaktion. Luminol wird durch die Meerrettich-Peroxidase unter Lichtemission ($\lambda = 428 \text{ nm}$) oxidiert. Das Luminol enthaltende Entwicklungsreagenz (ChemiLuminescence Reagent Plus, PerkinElmer) wurde für 2,5 min dünn auf die Nitrocellulosemembran aufgetragen. Die Detektion der Lichtemission erfolgte mittels einer Kamera (Fuji Film, LAS-1000); mit der Software „Image Gauge (Fuji Film)“ wurde das Foto digital ausgewertet.

2.2.2 Sequenzanalyse nach Edman

Die N-terminale Sequenzanalyse nach Edman (Edman-Abbau, Pehr Edman) ist eine gut automatisierte Methode zur Sequenzierung von Proteinen durch wiederholte Endgruppenbestimmung. Das Prinzip besteht aus drei Teilschritten (Kupplung, Spaltung, Konvertierung), die zu einer zyklischen Abspaltung und Identifizierung der N-terminalen Aminosäure führen.

Im ersten Teilschritt, der Kupplung, wird an die freie N-terminale Aminogruppe des Peptids Phenylisothiocyanat (PITC) gekoppelt. Dabei entsteht ein Phenylthiocarbonylpeptid (PTC-Peptid). Diese Reaktion kann jedoch nur bei unprotonierten Aminogruppen stattfinden, weshalb ein pH-Wert von 9 eingehalten werden muss. In einer Nebenreaktion wird PITC alkalisch zu Anilin hydrolysiert. Das Anilin kann dann mit PITC zu Diphenylharnstoff (DPTU) reagieren.

Bei der Spaltung, dem zweiten Teilschritt, wird das PTC-Peptid wasserfrei mit TFA behandelt, wobei die Carbonylgruppe der Aminosäure mit dem Schwefel des PITCs einen Ring bildet und vom Restpeptid abgespalten wird. Es entsteht somit eine heterozyklisches Derivat der ersten Aminosäure, die Anilinothiazolinon (ATZ)-Aminosäure, und ein, um eine Aminosäure verkürztes, Peptid. Die relativ hydrophobe ATZ-Aminosäure wird extrahiert und im dritten, dem Konvertierungsschritt zu einem stabileren Derivat, der Phenylthiohydantoin (PTH)-Aminosäure überführt. Vom Restpeptid kann dann erneut die N-terminale Aminosäure abgespalten werden. Die PTH-Aminosäure

wird chromatographisch im Vergleich zu den Retentionszeiten von Referenzproben identifiziert, die PTH-Derivate bekannter Aminosäuren enthalten. Die Automatisierung des Edman-Abbaus ermöglicht heute durchschnittlich 30-40 Aminosäuren eines Peptids zu bestimmen. Die benötigte Peptidmenge liegt bei 10-100 pmol.

2.2.2.1 Quantifizierung der MHC-Ausbeute

Da die N-terminale Sequenz des MHC-Moleküls bekannt war, konnte mittels des Konzentrationsanstiegs (Peakhöhe der Absorption bei 269 nm) einer bestimmten Aminosäure im jeweiligen Zyklus, die Masse des in der Probe enthaltenen MHC grob ermittelt werden. Es wurde das automatische Proteinsequenziergerät Procise 494A Protein Sequencer (ABI) mit einer speziellen C18-Säule (Spheri-5 PTH 5 μm , 220 x 2,1 mm; PerkinElmer) verwendet. Die ersten 7 Aminosäuren, für die α -Kette GSHSMRY und für das β 2-Mikroglobulin IQRTPKI, des MHC-Klasse-I-Moleküls wurden jeweils sequenziert und ausgewertet. Dies geschah in erster Linie über einen Konzentrationsanstieg der Aminosäure Histidin im 3. Zyklus, die sich bei der α -Kette des MHC-Moleküls auf Position drei befindet. Damit eine zuverlässige Aussage getroffen werden kann, sollte im Idealfall die Konzentration im 4. Zyklus wieder sinken, um sich vom Hintergrund abzuheben.

In gleicher Weise war es auch möglich, die Menge an eluierten Antikörpern und MHC-Klasse-II-Molekülen zu bestimmen.

2.3 Qualitative Analyse

2.3.1 Peptidsequenzanalyse mittels Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (MS) bietet die Möglichkeit, Molekülmassen von Ionen in der Gasphase zu bestimmen. Die Ionen werden hierbei in einer Ionenquelle durch unterschiedliche Methoden erzeugt, in einem Massenanalysator entsprechend ihres Masse/Ladungsquotienten (m/z) aufgetrennt und in einem Detektor qualitativ durch ihren m/z -Wert und quantitativ anhand ihrer relativen Menge analysiert. Damit ist sie, neben vielen anderen Anwendungsbereichen, die zentrale Methodik in der modernen

Protein- und Peptidanalytik. Die Empfindlichkeit dieses Verfahrens erstreckt sich bis in den Femtomol- und Subfemtomol-Bereich, sodass sie hier der Edman-Sequenzierung überlegen ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich die Elektronensprayionisation (ESI) zur Erzeugung der Ionen und ein Hybrid-Quadrupol-Time-of-flight-Massenspektrometer (Q-TOF) zu deren Analyse verwendet. Aus diesem Grund beziehen sich alle im Folgenden gegebenen Erläuterungen zu Funktionsweise und Durchführung auch nur auf diesen Gerätetyp.

2.3.1.1 Elektronenspray-Ionisation (ESI)

Bei der Elektronenspray-Ionisation handelt es sich um eine schonende Ionisierungsmethode, die sich gut für große, nichtflüchtige Biomoleküle eignet. Das Grundprinzip der ESI-MS beruht auf der Dispersion des Lösungsmittels im elektrischen Feld und der folgenden Desolvatisierung der gelösten Ionen. In einem elektrischen Feld werden gelöste Ionen in die Gasphase überführt, indem die Lösung aus einer engen Kapillare versprüht wird. Dadurch bilden sich zunächst kleine geladene Lösungströpfchen, die durch Verdampfen des Lösungsmittels kleiner werden, was zu einer Erhöhung der Ladungsdichte an der Oberfläche führt. Wird schließlich das Stabilitätslimit (Rayleigh-Limit) überschritten, gleicht also die Ladung des Tröpfchens die Oberflächenspannung gerade aus, kommt es zur so genannten Coulomb-Explosion, d.h. zum Zerfall des Ausgangstropfens in viele, nur wenige Nanometer durchmessende Tröpfchen [305], bis schließlich freie Gasphase-Ionen am Übergang in das Massenspektrometer entstehen.

Zur Erklärung dieses Prozesses existieren zwei Theorien:

Die *single-ion-in-droplet*-Theorie nach Dole und Röllgen geht von der Existenz kleinster Tropfen aus, die aus einer Reihe von Coulomb-Explosionen entstehen und die nur noch ein Analytmolekül enthalten. Dieses einzelne Analytmolekül geht dann durch vollständige Desolvatisierung des Lösungsmittels in die Gasphase über. Das *ion-evaporation*-Modell nach Iribarne und Thomson hingegen schlägt die direkte Emission der Analytionen in die Gasphase aus Tröpfchen mit sehr hoher Ladungsdichte vor. Das Versprühen der Analytlösung

in das elektrische Feld wird durch ein *nebulizer gas*, coaxial 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 (Ionenbrücke) am Übergang zum Massenspektrometer führt, beträgt 1000-2000 Volt. An der Mikroöffnung (ca. 100 µm) zum Massenspektrometer fließt geheiztes Stickstoffgas (*curtain-gas*) senkrecht zur Flugrichtung der Tröpfchen des Sprays, wodurch eine Zone hohen Drucks entsteht. Dies verhindert, dass auch Neutralteilchen in das Hochvakuum gesaugt werden.

Die charakteristische Bildung mehrfach geladener Ionen $(M + nH)^+$ 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 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 Abstand der Isotopensignale – 0,5 Da – erkannt werden können.

Die in der ESI-Ionenquelle ablaufenden Prozesse sind schematisch in Abbildung 1 dargestellt.

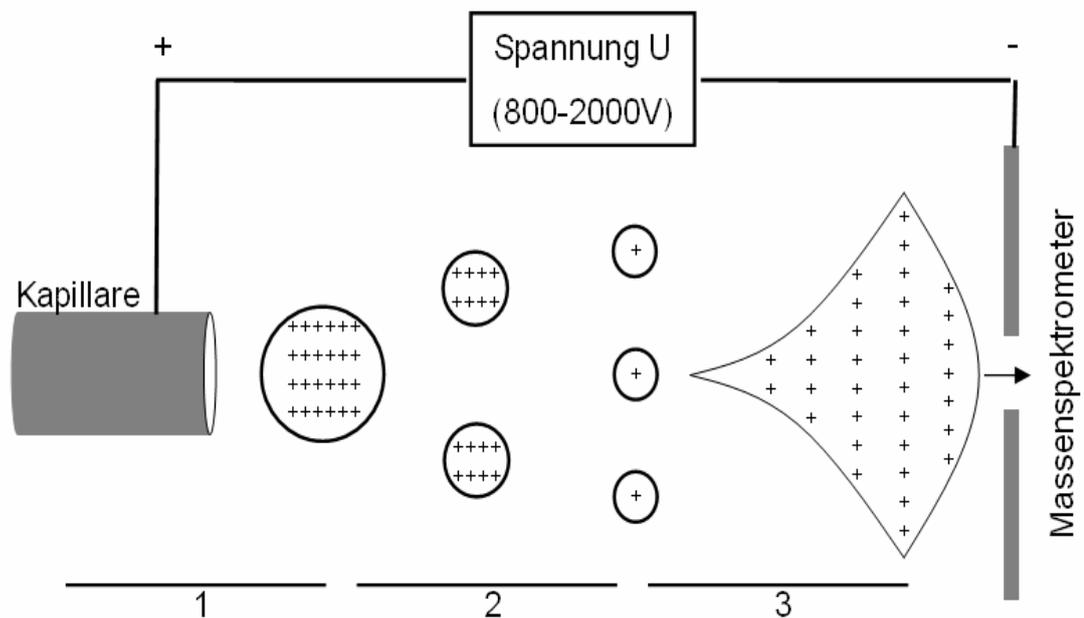


Abb. 1: Schematischer Aufbau der Ionenquelle eines ESI-MS, sowie Darstellung des Ionisierungsprozess:

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

2.3.1.2 Q-TOF-Massenspektrometer

Das Q-TOF besteht aus zwei Einheiten (MS1 und MS2), die hintereinander geschaltet sind: einem Quadrupol (Q) und einem *Time-of-flight* Analysator (TOF).

Quadrupole dienen als Massenanalytoren und –filter und sind als erstes Massenspektrometer (MS1) hinter die oben beschriebene Interface-Platte geschaltet. 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 -Wert, aufgrund stabiler Oszillationen, den Quadrupol passieren können und welche an und zwischen den Stäben verloren gehen. Hierdurch ergibt sich die Möglichkeit aus einem Peptidgemisch einzelne Peptidspezies definierter Masse und Ladung herauszufiltern und zu analysieren. Zur Sequenzierung von Peptiden ist es nötig diese zu

fragmentieren (collision-induced decomposition, CID). Zu diesem Zweck ist dem Quadrupol eine edelgasgefüllte Kollisionskammer nachgeschaltet. Durch inelastische Stöße, während eines Fragmentierungslaufs, indem die Peptide die mit Argon befüllte Kammer durchfliegen, zerfallen die Peptide bevorzugt zwischen dem Carbonylkohlenstoff und dem Amidstickstoff der Peptidbindung. Vor der Stoßaktivierung ist häufig noch eine zusätzliche Beschleunigung der Ionen nötig. Die angelegte Kollisionsspannung beträgt 20-60V. Der genaue Wert richtet sich nach Art und Druck des Gases in der Kollisionszelle sowie Art und Ladung des zu fragmentierenden Ions.

Der Kollisionskammer folgt das eigentliche analytische Massenspektrometer (MS2), welches nach dem Prinzip der Flugzeitmessung (TOF, *time of flight*) arbeitet. Durch eine Hexapol-Transferlinse wird der Ionenstrom auf den Pusher fokussiert, der diesen auf die Driftstrecke der analytischen MS-Einheit ablenkt. Flugzeitmassenspektrometer (TOF) bestimmen Ionenmassen im Hochvakuum ($p = 3, 8 \cdot 10^{-8} \text{bar}$) durch eine exakte elektronische Bestimmung der Zeit, die 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 m/z -Wert aufgetrennt werden. Letzteres ist möglich, da alle Ionen zwar die gleiche kinetische Energie (E_{kin}) aus dem elektrostatischen Feld aufnehmen, dabei jedoch, entsprechend ihres m/z -wertes, unterschiedliche Geschwindigkeiten erreichen. Durch Messung der Flugzeit lässt sich das m/z -Verhältnis der Peptide bzw. Peptidfragmente berechnen:

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

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

m = Masse des Ions

v = Geschwindigkeit des Ions nach der Beschleunigungsstrecke

z = Ladungszahl

e = Elementarladung

t = Gesamtflugzeit

L = Länge der feldfreien Driftstrecke des Flugrohres

Zur Detektion werden Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) verwendet. Der auf die Konversionsdyode auftreffende Ionenstrom erzeugt einen Sekundärionenstrom, der seinerseits durch eine Elektronenkaskade an weiteren Dynoden verstärkt wird.

Zur Gerätesteuerung, Datenaufnahme und -verarbeitung wurde die MassLynx 4.0 Software (Micromass, Manchester, UK) verwendet. Das instrumentelle Auflösungsvermögen beträgt in 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 erheblich größere Moleküle aufgrund ihrer mehrfachen Ladungen analysiert werden können.

Das hier beschriebene ESI-Q-TOF-Massenspektrometer, mit dem alle MS/MS-Experimente dieser Arbeit durchgeführt wurden, ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

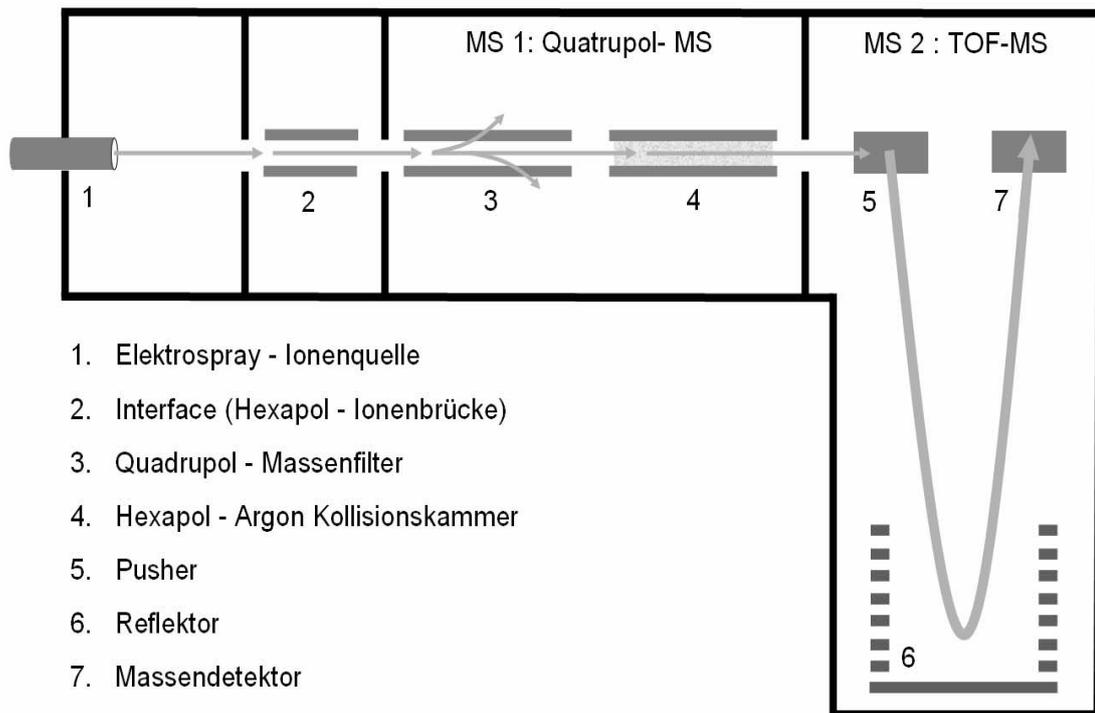


Abb. 2: Schematischer Aufbau eines ESI-Q-TOF-Massenspektrometers (Micromass Manchester)

2.3.1.3 Liquid-Chromatographie / Massenspektrometer-Kopplung

Um eine kontinuierliche Sequenzierung der einzelnen Peptide aus dem komplexen Peptidgemisch, das aus der Aufarbeitung der unterschiedlichen Gewebe erhalten wurde, zu ermöglichen, war die chromatographische Auftrennung der Peptide vor der massenspektrometrischen Sequenzierung nötig. Hierzu wurde ein HPLC-Gerät (High Performance Liquid Chromatography) direkt mit der Elektrospray-Einheit des Massenspektrometers (Q-TOF; Micromass, Manchester, UK) gekoppelt. Dies ermöglicht die fortlaufende Aufnahme von MS/MS-Spektren der von der Säule eluierten Komponenten.

Einen ersten Anhaltspunkt zur Identität der Peptide bietet die Kombination aus Retentionszeit und Masse. Diese 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. Für alle im Rahmen dieser Arbeit

erfolgten Messungen wurde eine nanoLC (Eksigent) eingesetzt. Diese arbeitete splitfrei mit Flussraten zwischen 1 und 1000 nl/min (in der vorliegenden Arbeit 300 nl/min). Vor Befahrung wurde das System zunächst zehn Minuten mit 100% Lösungsmittel B (20% H₂O (HPLC-grade, Lichrosolv), 80% Acetonitril (HPLC-grade, Lichrosolv), pH 2 mit Ameisensäure (conc.) eingestellt) gewaschen und anschließend mit 15% B 30 Minuten lang äquibriert. 100-150 µl der in Lösungsmittel A (H₂O (HPLC-grade, Lichrosolv), pH 2 mit Ameisensäure (conc.) eingestellt) gelösten Probe wurden in eine 200 µl-Probenschleife injiziert und mit einer Flussrate von 20 µl/min 30 Minuten unter Äquibriierungsbedingungen auf die C18-Vorsäule (300 µm, 10 mm, Dionex) geladen, die der Aufkonzentrierung und Entsalzung diente. Schließlich wurde die Säule in das System einer µKapillarsäule eingeschaltet. Die gebundenen Peptide werden durch einen linearen Gradienten innerhalb von 120 Minuten auf die µKapillarsäule eluiert und dort aufgetrennt. Zum Schluss wurden Probenreste durch Waschen mit 100% B1 entfernt und das System neu äquibriert.

Datenerfassung und Auswahl der Vorläufer-Ionen ($M + 2H$)²⁺ für die Fragmentierung erfolgten automatisch entsprechend der in der MassLynx 4.0 Software eingestellten Parameter (*data-dependent ion selection*, DDIS). Die Integrationszeit des TOF-Analysators betrug im MS/MS-Modus 4 s bei einer Interscanverzögerung von 0,1 s.

2.3.1.4 Interpretation von MS/MS-Spektren zur Peptidsequenzanalyse

Die Auswertung von CID-MS/MS-Spektren (Kollisionsinduzierte Tandem-Massenspektrometrie) zur Sequenzierung MHC-gebundener Peptide gehörte zu den zentralen Aufgaben bei der Anfertigung dieser Arbeit. Sie wurde manuell mit Unterstützung des Computerprogramms MassLynx 4.0 durchgeführt.

Die Grundbausteine der Peptide sind die 20 proteinogenen Aminosäuren. Diese unterscheiden sich in ihrer Masse, nur Lysin und Glutamin sowie Leucin und Isoleucin haben dieselbe Masse. Dieser Massenunterschied bildet die

Grundlage für die Sequenzanalyse der Peptide. Tabelle 15 listet die proteinogenen Aminosäuren mit ihrer Masse auf.

Tab.15: Darstellung der proteinogenen Aminosäuren mit den entsprechenden molekularen Massen.

Aminosäure	3-Buchstaben-Code	1-Buchstaben-Code	Masse	Immonium-ion
Alanin	Ala	A	71	44
Arginin	Arg	R	156	129
Asparagin	Asn	N	114	87
Aspartat	Asp	D	115	88
Cystein	Cys	C	103	76
Glutamat	Glu	E	129	102
Glutamin	Gln	Q	128	101
Glycin	Gly	G	57	30
Histidin	His	H	137	110
Isoleucin	Ile	I	113	86
Leucin	Leu	L	113	86
Lysin	Lys	K	128	101
Methionin	Met	M	131	104
Phenylalanin	Phe	F	147	120
Prolin	Pro	P	97	70
Serin	Ser	S	87	60
Threonin	Thr	T	101	74
Tryptophan	Trp	W	186	159
Tyrosin	Tyr	Y	163	136
Valin	Val	V	99	72

Die Fragmentierung der Peptide in der Edelgaskollisionskammer geschieht hauptsächlich im Peptidrückgrat. Dabei entstehen Fragmente die entweder den N- oder den C-Terminus des Ausgangspeptids enthalten. Nur ladungstragende Fragmente werden im MS detektiert. Die Nomenklatur der Peptidfragmenten [306, 307] hängt davon ab, welcher Terminus im Fragment enthalten ist. Handelt es sich um ein N-terminales Fragment, so gehört es, je nach Bruchstelle im Peptidrückgrat, der a-, b-, oder c-Serie an. Enthält das Fragment hingegen den C-Terminus des Peptids so handelt es sich um ein x-, y-, oder z-Ion. Die Position der genauen Bruchstelle im Peptidrückgrat wird zum einen über die genannten Buchstaben (Bruchstelle an Peptidbindung – b- oder y-

Serie; Bruchstelle zwischen C1 und C2 eines Aminosäurerestes – a- oder x-Serie; Bruchstelle zwischen C2 und Aminogruppe eines Aminosäurerestes – c- oder z- Serie) zum anderen über Zahlen, welche die Anzahl der im Fragment enthaltenen, vollständigen Aminosäurereste wiedergibt, definiert. Die Peptidfragmentnomenklatur ist schematisch in Abbildung 3.a,b,c dargestellt. Die y- und c-Ionen entstehen dabei durch Wasserstoff-Transfer von anderen Aminosäuren. Von all diesen Ionen, werden b- und y-Ionen gewöhnlich mit der höchsten Intensität detektiert. Das a-Ion, welches ebenfalls vergleichsweise häufig auftritt, wird aus dem korrespondierenden b-Ion durch Verlust von Kohlenmonoxid (CO: $\Delta m = -28$ Da) gebildet. Zudem treten begleitende Serien mit Abständen von $\Delta m = -18$ Da (Verlust von Wasser; häufig bei S, T, D, E), $\Delta m = -17$ Da (Verlust von Ammoniak; häufig bei Q, K, R) und $\Delta m = -64$ Da (Verlust von Methylsulfensäure; bei oxidiertem M) auf.

Neben den zuvor beschriebenen, entstehen bei der Fragmentation noch so genannte interne Fragmente, sowie Immoniumionen. Die internen Fragmente entstehen durch mehrfache Brüche im Peptidrückgrat und enthalten weder den N- noch den C-Terminus des ursprünglichen Peptids. Zumeist jedoch liegen die zwei Bruchstellen der internen Fragmente an den Peptidbindungen, so dass ein Ende des Fragments einer y-Serie, das andere einer b-Serie entspricht. Es entsteht also ein Amino-Acylium-Ion (Abbildung 3d). Interne Fragmente, die nur einen Aminosäurerest enthalten und aus der Kombination eines y- und a-Bruchs entstanden sind, werden als Immoniumionen bezeichnet (Abbildung 3e). Sie werden mit dem Einbuchstabencode der entsprechenden Aminosäure beschriftet. Die Immoniumionen einiger Aminosäuren (F oder H) zeigen regelmäßig in den CID-MS/MS-Spektren eine hohe Intensität, sodass bei Vorhandensein des entsprechenden Signals auf die Präsenz der Aminosäure im zu analysierenden Peptid geschlossen werden kann.

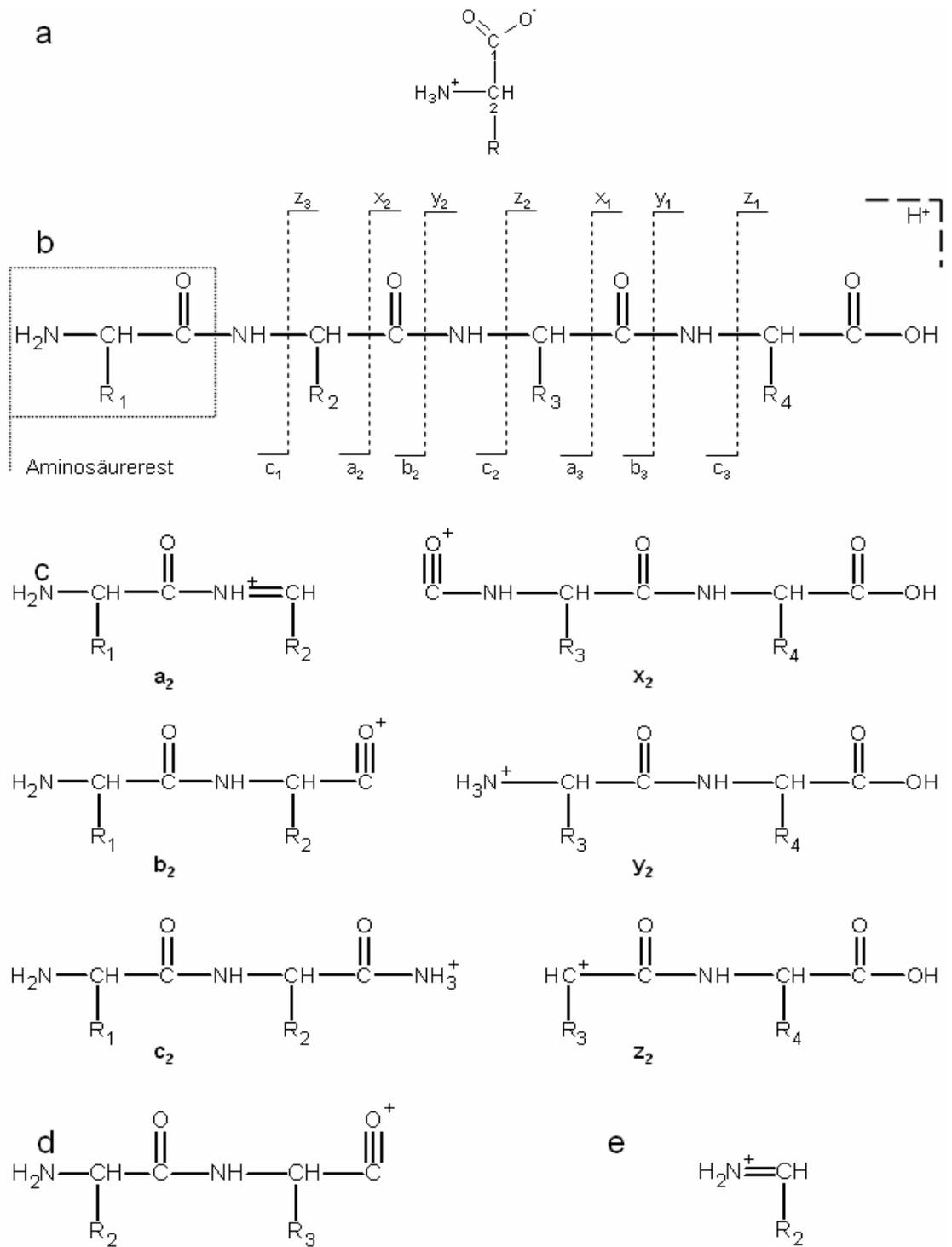


Abb. 3: Nomenklatur der Peptidfragment-Ionen:

- a) Grundstruktur einer Aminosäure
- b) Aufbau eines Peptidrückgrats (4 Aminosäuren R1-R4 von N- nach C-terminal)
- c) Peptidbindung und Nomenklatur der Bruchstellen innerhalb des Rückgrats.
Strukturformeln der Fragmentationen: links N-terminale Fragmente (a, b, c)
rechts C-terminale Fragmente (x, y, z)
- d) Strukturformel eines internen Fragments: Amino-Acylium-Ion
- e) Strukturformel eines internen Fragments: Immoniumion

All diese Informationen helfen bei der Interpretation eines Fragmentspektrums und letztendlich bei der Identifizierung einer Peptidsequenz, indem sich aus der Massendifferenz zwischen den Signalen einer Serie auf die zu Grunde liegende Aminosäure schließen lässt. Die vollständige Identifizierung von Peptiden direkt anhand der manuellen Auswertung von Tandem-MS-Spektren, ist sowohl komplex, als auch zeitaufwändig. Allerdings genügt auch schon eine Teilsequenz von 3-5 Aminosäuren des Peptids, kombiniert mit seiner Gesamtmasse, um mittels MASCOT-Datenbanksuche (www.matrix-science.com, Matrix Science Ltd., London, UK) eine Peptidsequenz und ihre Zuordnung zum Quellprotein zu ermitteln [308]. Je länger die Teilsequenz ist, desto spezifischere Treffer erhält man. Um die Treffer einzuschränken wird außerdem die Massengenauigkeit angegeben; diese liegt beim hier verwendeten Q-TOF üblicherweise bei 0,2 Da (200 ppm).

Eine eindeutige Verifizierung einer Sequenz kann schließlich anhand des Fragmentspektrums des analogen synthetischen Peptids erfolgen.

2.3.1.5 Herstellung synthetischer Peptide

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl für die Verifikation experimenteller LC/MS - Spektren, als auch für die T-Zell-Experimente synthetische Peptide verwendet. Die Synthese aller Peptide wurde nach der Standardmethode der Solide-Phase-Fmoc- Chemie (72) in einem *Abimed Economy Peptide Synthesizer* (EPS 221) hauptsächlich von Frau Patricia Hrstic durchgeführt.

2.3.2 Vergleichende Analyse mittels „stable isotope labelling“

Die differentielle quantitative Analyse von Tumor-, Metastasen-, und Normalgewebe auf verschiedenen zellulärer Ebenen spielt eine Schlüsselrolle bei der Identifizierung und Untersuchung von tumor- bzw. metastasenassoziierten Antigenen. Auf Ebene des Transkriptoms sind diese Analysen bereits seit Jahren etabliert, mittels qRT-PCR können einzelne Genprodukte quantifiziert werden und anhand von Gene Chip Experimenten kann das gesamte Genom einer Zelle verglichen werden.

Beides sind jedoch Methoden, die keine direkten Informationen über MHC-präsentierte Peptide liefern. Rückschlüsse auf MHC-Ligandenpräsentation aufgrund von Unterschieden auf mRNA- bzw. Proteinebene zu ziehen, birgt die Gefahr von Fehlschlüssen in sich, da zunehmende Hinweise existieren, dass bestimmte Epitope nur auf Tumorzellen präsentiert werden, obgleich das Quellprotein in gleicher Menge in beiden Zelltypen vorhanden ist. Auch gibt es zunehmend Beweise für Unterschiede der Peptidpools, die vom Immunproteasom bzw. dem konstitutiven Proteasom generiert werden. Die zuverlässigste Informationsquelle für HLA-Epitope scheinen daher die MHC-Liganden selbst zu sein und nicht die ihnen zugrunde liegenden mRNA oder Proteine.

Für die differentielle, quantitative Analyse von MHC-Liganden wurde in dieser Arbeit die, von Claudia Lemmel etablierte und von Oliver Weinzierl verfeinerte, Methode der stabilen Isotopenmarkierung (stable isotope labelling) mit N-terminaler Modifizierung durch Nikotinylierung und Guanidinylierung verwendet. Hierbei soll die Guanidinylierung eine Signalaufspaltung verhindern, indem alle ϵ -Aminogruppen der Lysinreste der Peptide vor der N-terminalen Modifizierung blockiert werden. Die Nikotinylierung des N-Terminus hat den Erhalt des N-terminalen Ladungsträgers im Peptid zum Ziel. Für die differentielle Nikotinylierung (dNIC) musste das für die Peptidmodifizierung verwendete Reagenz, der leichte H_4 - und der schwere D_4 -Nikotinoyl-N-Hydroxy-Succinimid-Ester (H_4 NIC bzw. D_4 NIC) synthetisch hergestellt werden. Dies wurde freundlicherweise von Andreas Weinzierl durchgeführt.

2.3.2.1 Guanidinylierung der ϵ -Aminogruppe der Lysinreste von Peptiden mit O-Methyl-Iso-Harnstoff-Hemisulfat

Die lyophilisierten Eluate der Immunpräzipitation wurden in 500 μ l LC-MS-Wasser (LiChrosolv, Merck, Darmstadt) gelöst und mit 92 μ l GUA-Reagenz (100 mg O-Methyl-Isoharnstoff, 102 μ l ddH₂O) sowie 20 μ l Natronlauge (10M) gemischt. Es wurde sichergestellt, dass der pH-Wert zwischen 10,5 und 11,5 liegt. Die Guanidierung erfolgte bei 65°C und wurde nach 10 min mit 10 μ l konzentrierter Ameisensäure auf Eis gestoppt. Wiederum wurde der pH-Wert überprüft, der für die weiteren Reaktionen bei 3 bis 4 liegen musste.

Die weitere Modifizierung erfolgte auf *Peptide Cleanup C18 Spin Tubes* (Agilent). Dazu wurden die Säulen zunächst durch dreimaliges Auftragen von 200 μ l 50% ACN (Acetonitril) mit 0,1% TFA und anschließender Zentrifugation für 15 sec bei 2000 rpm (Heraeus Biofuge Tischzentrifuge) aktiviert. Nach erfolgter Äquilibrierung (3 x 200 μ l H₂O, 0,1 % TFA) wurden die Proben (in 200 μ l Aliquots, die je dreimal die Säule passierten) aufgetragen. Zum Entsalzen wurden die Säulen dreimal mit 200 μ l H₂O gewaschen.

2.3.2.2 Nicotinylierung der α -Aminogruppe von guanidinylierten Peptiden

Die Nikotinylierung mit 500 μ l H₄NIC (NIC) bzw. D₄NIC (dNIC)-Reagenz (20mM) wurde im Anschluss an die oben beschriebenen Schritte durchgeführt. Dazu wurden die Säulen auf die abgeschnittene Spitze von 1 ml-Spritzen aufgesetzt und das Reagenz in 50 μ l-Schritten alle 1,5 min mit Hilfe des Stempels durch das Säulenmaterial gesogen. Nach einem weiteren Waschschrift (3 x 200 μ l H₂O) wurden unerwünschte Nikotinylierungen von Tyrosinseitenketten, durch 10-minütige Behandlung mit 500 μ l Hydroxylamin (50 μ l pro min), entfernt. Nach einem abschließenden Waschschrift (3 x 200 μ l H₂O) wurden die modifizierten Peptide in TFA gewaschene Eppendorf Cups eluiert (4 x 50 μ l 50% ACN, 1% Ameisensäure).

Um zwei Peptideluate mittels MS vergleichen zu können, wurde eine der Proben mit NIC, die andere mit dNIC modifiziert. Dabei wurde auch stets eine Blindprobe (LC-MS-Wasser ohne Peptid) mitgeführt. Nach der Elution wurde in der Speedvac (Vacuum Concentrator, Bachhofer) zunächst ACN abgedampft,

das wie Nicotinsäure bei 260 nm leicht absorbiert und somit bei der Analyse stören würde. Die Proben wurden mit Lösungsmittel A₂ wieder auf 200 µl aufgefüllt. Um den Peptidgehalt der Proben abschätzen zu können, wurde die Absorption bei 260 nm gemessen, mit der der Blindprobe verglichen und korrigiert.

Anschließend wurde je die Hälfte der dNIC bzw. NIC Probe, mit dem geringeren Peptidgehalt, mit einem Aliquot der jeweils anderen Probe vermischt, das einen gleichen Peptidgehalt hatte. Diese Mischung wurde für die LC-MS-Experimente verwendet, während die Reste beider Proben für separate LC-MS/MS-Messungen eingesetzt wurden (2.3.1).

2.3.2.3 Auswertung der differentiellen Peptidanalyse

Mit der Mischung von Peptiden aus zwei differentiell modifizierten Proben wurde ein LC-MS-Experiment durchgeführt. Pärchen von Peptidsignalen, die sich entsprechend der differentiellen Modifikation mit NIC und dNIC um 4 Da unterschieden, wurden manuell in den MS-Daten des Experiments gesucht. Zur Darstellung wurden Massenchromatogramme der leichten, sowie schweren Version eines Peptids erstellt und die Scans aufsummiert, die dieses Peptid enthielten. Dabei wurde eine gleiche Anzahl von Scans, mit ähnlicher Retentionszeit als Hintergrund, subtrahiert. Im so entstandenen Peptidpaar (NIC, dNIC) konnte die relative Peptidmenge, anhand der Intensität des monoisotopen Peaks beider Peptide, bestimmt werden (Abb. 4).

Eine detailliertere Beschreibung der Auswertung der quantitativen differentiellen Peptidanalyse erfolgt im Ergebnisteil dieser Arbeit.

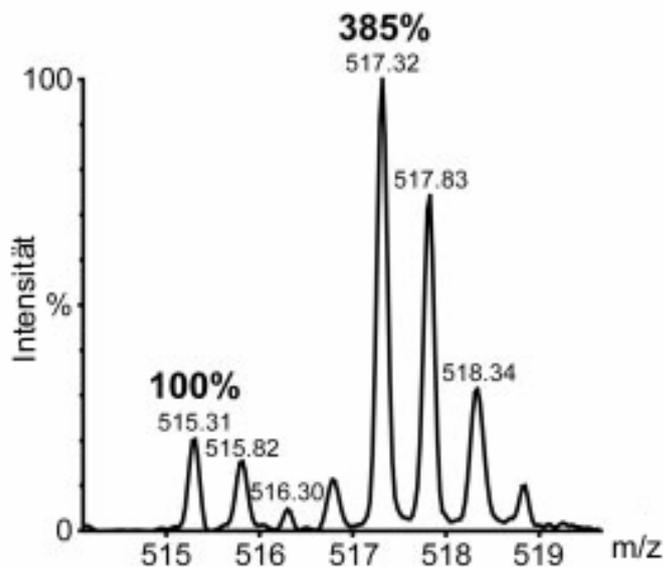


Abb. 4: Differentielle HLA-Ligandenanalyse

Im Peptidpaar (RPSLRALL, glutamate receptor, AMPA 4) wurde die Intensität des Monoisotopenpeak des mit leichtem H_4NIC modifizierten Peptid (aus Metastase/Normalgewebe) auf 100% festgelegt und der korrespondierende Wert für das mit schwerem D_4NIC modifizierte Peptid (aus Tumor) berechnet.

2.3.3. mRNA-Expressionsanalyse

Um die gewonnenen Peptide einem Tumorantigen oder einem normalen, körpereigenen Protein zuzuordnen, wurde zusätzlich zum Vergleich auf HLA-Liganden-Ebene ein Vergleich von Antigenen auf mRNA-Ebene vorgenommen. Hierfür wurde die RNA-Microarray-Technologie eingesetzt. Diese Methode beruht auf der Hybridisierung von, aus Gewebe gewonnener, biotynlierter und fluoreszenzmarkierter RNA mit, auf dem Array angeordneten, Oligonucleotiden. Die verwendeten GeneChips HG-U-133 Plus 2.0 (Affimetrix) enthalten bis zu 47000 Gene, womit die Mehrheit der Antigene in den untersuchten Zellen erfasst werden konnten.

Vor der MHC-Isolierung wurde von jedem untersuchten Gewebe (Tumor, Normalgewebe, Metastase) ein ca. 2 x 2 mm großes Gewebestück abgetrennt um es für die mRNA-Expressionsanalyse zu verwenden.

Die Zerteilung des Gewebes fand bei 4 °C in flüssigem Stickstoff statt. Die für die mRNA-Analyse bestimmten Proben wurden in RNAlater-Lösung (RNA

stabilisation reagent (Quiagen)) in Eppendorfcups bei -20 °C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren.

Alle weiteren Schritte zur RNA-Extraktion, Amplifikation, sowie das Beladen und Auslesen der GeneChips wurden von der Mikroarray Facility der Universität Tübingen durchgeführt. Die GeneChips wurden mit dem Affimetrix GeneChip Scanner 3000 ausgelesen.

Die anschließende Datenanalyse erfolgte mit der Software GCOS (Affimetrix), es wurden alle Standardeinstellungen des Herstellers übernommen. Anhand der Expressionsdaten konnte ein Vergleich von Tumor, Normalgewebe und Metastase auf mRNA-Ebene, sowohl für einzelne Peptide als auch für ein komplettes Gewebe durchgeführt werden. Die relativen Expressionswerte wurden aus den logarithmischen Signalverhältnissen der Affimetrix Software bestimmt, wobei die Expression der Gesamt-RNA des Nierennormalgewebes auf 1,0 festgelegt wurde. Zusätzlich konnte die RNA-Expression in den Nierenzellkarzinomgeweben mit einer großen Anzahl gesunder, humaner Gewebe verglichen werden. Die Gesamt-RNA der gezeigten, gesunden Gewebe wurde kommerziell von verschiedenen Firmen erworben (Ambion, Clontech, Stratagene), die einzelnen Proben stellen Mixturen der organspezifischen Gesamt-RNA von 2 bis 62 Individuen dar. Eine ausführliche Beschreibung der Auswertung der Microarray-Daten findet sich im Ergebnisteil dieser Arbeit.

2.4 T-Zell-Experimente

2.4.1 Isolierung von PBMCs aus peripherem Blut

Als Ausgangsmaterial zur Isolierung von PBMCs aus Blutprodukten wurden ausschließlich Leukaphereseprodukte verwendet, die von der Klinik für Transfusionsmedizin der Universität Tübingen bereitgestellt wurden. Je nachdem mit welchem Peptid stimuliert werden sollte, wurden ausschließlich Spender mit dem zum Peptid passenden HLA-Profil ausgewählt. Alle im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen. Das Leukapherisat (peripheres, leukozytenangereichertes Blut) wurde zunächst aus dem Infusionsbeutel in eine Zellkulturflasche umgefüllt. Enthielt der Infusionsbeutel weniger als 120 ml Blut, wurde mit PBS (BioWittaker) auf 120 ml aufgefüllt. In vier 50 ml Falcon Tubes (BD, Bioscience) wurde je 15 ml Lymphozytenseparationsmedium (Ficoll-Hypaque (spez. Dichte 1.077 g/ml), Ficolite H, Linaris) vorgelegt, vorsichtig mit je 30 ml Blut überschichtet und für 20 min bei 2000 rpm ohne Bremse zentrifugiert (Heraeus Instruments, Megafuge 1.0 R, 20°C).

Nach erfolgter Zellseparation wurde die Leukozytenfraktion als Interphase zwischen Ficoll und Serum vorsichtig abgenommen, wiederum in vier 50 ml Falcon Tubes überführt, mit 30 ml PBS gewaschen und abzentrifugiert (1800 rpm, 10 min, 20°C). Nach Abdekantieren des Überstandes wurden die Zellen gezählt und zehn Proben mit je 2×10^6 Zellen in Einfriermedium (90% FCS (für 30 min hitzeinaktiviert bei 56°C, PAA Laboratories), 10% DMSO) bei -80°C asserviert. Es konnten regelmäßig zwischen $0,75$ und 2×10^9 Leukozyten isoliert werden.

Die isolierten Leukozyten wurden entweder direkt weiterverarbeitet oder eine Nacht im T-Zell-Medium (RPMI 1640 (Gibco), 2mM L-Glutamax (Gibco), 1% Penicillin/Streptomycin (BioWhittaker), 10% hitzeinaktiviertes humanes Serum (Invitrogen), 20 µg/ml Gentamycin (BioWhittaker)) kultiviert.

2.4.2 Aufreinigung CD8⁺ T-Zellen durch magnetically activated cell sorting

Die Aufreinigung von CD8 T-Zellen aus der Leukozytenfraktion humaner Blutprodukte erfolgte unter Verwendung der Methodik der magnetischen Zellsortierung (magnetically activated cell sorting, MACS). Im Prinzip beruht diese Methode darauf, Zellen, die ein bestimmtes Oberflächenprotein tragen, dadurch aufzureinigen, dass man zunächst einen biotinylierten Primärantikörper gegen dieses Oberflächenprotein und anschließend Streptavidin-gekoppelte, magnetische Partikel (Microbeads) zugibt. Die so markierten Zellen werden in speziellen, magnetischen Säulen zurückgehalten, während unmarkierte Zellen ausgewaschen werden können.

Alle Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die Zentrifugationen erfolgten 10 min bei 1500 rpm und 4°C (Heraeus Instruments, Megafuge 1.0 R). Frische, isolierte PBMCs wurden mit PBE (PBS, 2 mM EDTA, 0,5% Rinderserumalbumin (BSA, biotinfrei, Sigma A3059), sterilfiltriert) gewaschen und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend mit einer Endkonzentration von 2×10^8 Zellen/ml und 5 µg/ml OKT-8 Antikörper (anti-CD8-Antikörper, Abcam) in PBE resuspendiert. Nach 15-minütiger, rotierender Inkubation bei 4°C erfolgten zwei Waschschrte mit 30 und 10 ml PBE. Die Zellen wurden wiederum mit einer Endkonzentration von 2×10^8 Zellen/ml und 10 µl Streptavidin-Microbeads (Miltenyi Biotec) pro 2×10^7 Zellen in PBE resuspendiert. Es erfolgte eine weitere Inkubationszeit von 15 min (4°C, rotierend) und ein zweimaliges Waschen mit PBE.

Die eigentliche Aufreinigung der nun magnetisch „gefärbten“ CD8-Zellen erfolgte unter Verwendung kommerzieller „MACS-Säulen“ (LS-Column, Miltenyi Biotec), sowie des dafür vorgesehenen Magneten (Miltenyi Biotec). Die in den Magneten eingespannten Säulen wurden zunächst mit 3ml PBE äquilibriert, bevor die in 1000 µl PBE resuspendierten Zellen aufgetragen wurden. Nach dreimaligem Waschen mit je 1 ml PBE wurde die Säule aus dem Magneten entnommen. Mit 4 ml PBE und unter Zuhilfenahme eines Stempels wurden die CD8⁺-Zellen in ein 15 ml Falcon-Tube eluiert. Die so erhaltene Zellfraktion wurde zentrifugiert und zweimal mit PBE gewaschen. Nach Zählung der Zellen

wurden 1×10^6 Lymphozyten bei -80°C in Einfriermedium asserviert, der Rest wurde zur weiteren Kultivierung in 5ml T-Zellmedium resuspendiert.

2.4.3 Präparation humaner dendritischer Zellen (DCs)

Dendritische Zellen (DC) sind äußerst potente antigenpräsentierende Zellen, die in der Lage sind primäre zytotoxische T-Zellantworten zu induzieren. Im nicht lymphoiden Gewebe befinden sich die DCs in einem unreifen Zustand, in welchem sie eine enorme Fähigkeit besitzen, unterschiedliche Antigene (Mikroorganismen, Antigen-Antikörperkomplexe, apoptotische und nekrotische Zellen) aufzunehmen. Diese aufgenommenen antigenen Strukturen werden in der Folge prozessiert und sehr effizient im Kontext mit MHC Molekülen der Klasse I und II präsentiert. Gleichzeitig werden die DCs aktiviert, was zu einer beginnenden Reifung und zur Sekretion von Chemokinen und Zytokinen führt. Die freigesetzten Chemokine rekrutieren weitere immunkompetente Zellen. Die herausragende Rolle der DCs für die Induktion einer spezifischen Immunantwort beruht sowohl auf der starken Expression von kostimulatorischen Molekülen als auch auf der Sekretion von potenten Zytokinen wie z.B. IL-12.

Alle folgenden Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen. Im Verlauf dieses Protokolls erfolgte die Zentrifugation jeweils für 10min bei 460xg und 4°C (Megafuge: 1500 rpm).

Für die Präparation der DCs wurden frisch isolierte PBMCs in T-Zell-Medium aufgenommen und gezählt. Anschließend wurden sie mit einer Dichte von $100\text{--}120 \times 10^6$ Zellen in 20ml X-vivo 20 (serumfreies Medium, Cambrex) aufgenommen und in Zellkulturflaschen (Greiner, bio-one) überführt. Die übrig gebliebenen PBMCs wurden für Restimulationen in 2×10^7 Aliquots eingefroren. Nach einem zweistündigen Adhärenzschritt im Brutschrank bei 37°C wurde das Medium abgenommen, in ein 50ml Falcon-Tube überführt und 3x mit je 10ml XVivo-Medium nachgespült. Die so erhaltenen PBLs wurden abzentrifugiert, gezählt und in 2×10^7 Aliquots eingefroren.

Zu den am Plastikboden der Flasche adhärennten Monocyten wurde neues T-Zell-Medium gegeben, das an Tag 1 nach der Adhärenz mit 100ng/ml GM-CSF

und 20ng/ml IL-4 (beides in PBS mit 0,1 % HSA, bei -20°C gelagert, R&D Systems) versetzt wurde. Nach drei und fünf Tagen Inkubation im Brutschrank bei 37°C wurde 7,5ml des Mediums abgenommen und durch 7,5ml frisches T-Zell-Medium -versetzt mit 100ng/ml GM-CSF sowie 20 ng/ml IL-4- ersetzt.

Am siebten Tag wurden die inzwischen entstandenen unreifen dendritischen Zellen durch mindestens 24-stündige Inkubation mit 100ng/ml LPS gereift und konnten als reife DCs geerntet werden. Hierzu wurde der Überstand aus den Zellkulturflaschen entnommen und in 50ml Falcons überführt. In die Zellkulturflaschen wurde nun 10ml PBS mit 5mM EDTA gegeben um die adhären DCs zu lösen. Die Zellen wurden ebenfalls in Falcon-Tubes überführt mit T-Zell-Medium gewaschen, abzentrifugiert und gezählt. Anschließend wurden die DCs sofort zur Stimulation von T-Zellen weiterverarbeitet.

2.4.4 Peptidstimulation mittels dendritischer Zellen (DCs)

Alle im Folgenden beschriebene Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen ausgeführt. Die Zentrifugationen erfolgten 5min bei 1500rpm und 20°C. Die Stimulationen wurden in 24-*well*-Platten (Greiner bio-one) durchgeführt.

Für jedes Peptid, mit dem stimuliert werden sollte, wurden mindestens drei *wells* angesetzt. Pro *well* wurden 5×10^5 DCs eingesetzt. Überschüssige DCs wurden für die Restimulation eingefroren. Für die Beladung mit Peptid wurden die DCs zunächst in einem 15ml Falcon in 1ml Medium mit 1mg/ml Peptid 2h im Brutschrank inkubiert. Autologe PBMCs oder PBLs wurden zweimal in T-Zellmedium gewaschen und gezählt. Pro *well* wurden 3×10^6 Zellen in 1ml T-Zell-Medium vorgelegt, zu denen die DCs (in 1ml T-Zell-Medium) nach der Beladung hinzugegeben wurden. Es folgte eine 7-tägige Ruhezeit der Zellen im Brutschrank.

Zur Restimulation wurden die Zellen aus den *wells* entnommen, mit T-Zell-Medium gewaschen und mit einer Zellzahl von 5×10^5 pro *well* erneut ausgesät. Waren noch genügend DCs vorhanden wurden diese in T-Zell-Medium aufgetaut und gewaschen, wie zuvor beschrieben mit Peptid beladen und zu den vorgelegten PBMCs gegeben. Waren keine DCs mehr vorhanden, wurden

autologe PBMCs aufgetaut, mit T-Zell-Medium gewaschen und wie zuvor die DCs mit Peptid beladen. Pro *well* wurden $2,5 \times 10^6$ PBMCs benötigt. Nach der Peptidbeladung wurden die PBMCs mit 30 Gy bestrahlt und in die *wells* verteilt (Gesamtvolumen 2 ml pro *well*). Bei jeder Restimulation wurden nun an jedem 2. Tag 2ng/ml IL-2 (in PBS mit 0,1% HSA, bei -20°C gelagert, R&D Systems) zugegeben, beginnend mit dem 1. Tag nach Restimulation. Falls erforderlich (Gelbfärbung des Mediums) wurde jeweils 1ml Medium vorsichtig aus jedem *well* abgenommen und durch 1ml neues Medium, versetzt mit IL-2 ersetzt. Nach wiederum sieben Tagen konnten die Zellen für verschiedene Experimente, wie Tetramerfärbung eingesetzt oder erneut restimuliert werden.

2.4.5 Peptidstimulation mittels artifiziellen antigenpräsentierenden Zellen (aAPCs)

2.4.5.1 MHC-Monomersynthese

Die Herstellung der MHC-Klasse-I-Monomere, die für die Herstellung der aAPCs sowie zur MHC-Tetramersynthese benötigt wurden, wurden zum größten Teil von Patrizia Hrstic durchgeführt. Vom Autor selbst wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei MHC-Monomersynthesen durchgeführt. Die Methodik der Monomerproduktion soll aus diesem Grund hier nur in Kürze dargestellt werden.

Die α -Kette der verschiedenen HLA-Allele sowie das invariante β_2 -Mikroglobulin wurde in Bakterien (*e.coli*) gentechnologisch produziert. Die *inclusion bodies* der Bakterien wurden durch Ultrazentrifugation präpariert, um aus ihnen schließlich die Proteine aufzugereinigen. Um aus den so erhaltenen denaturierten Proteinen native MHC-Moleküle herzustellen, wurde die α -Kette unter Zugabe von β_2 -Mikroglobulin, synthetischem Peptid und Harnstoff „rückgefaltet“ und anschließend durch Ultrafiltration aufkonzentriert. Es folgten zwei HPLC-Fraktionierungen, zwischen denen zur Vorbereitung der Tetramersynthese die MHC-Monomere biotinyliert wurden.

2.4.5.2 Herstellung von aAPCs

Artifizielle antigenpräsentierende Zellen (aAPCs) sind Kügelchen (*beads*), die mit MHC-Peptid-Komplexen, sowie Antikörpern gegen kostimulatorische Moleküle (CD28, 4-1BBL) beladen sind. Sie werden zur antigenspezifischen Stimulation von T-Zellen *in vitro* eingesetzt, da die Stimulationsbedingungen so am besten zu kontrollieren sind. Diese Methodik bietet somit eine effiziente Alternative zur herkömmlichen T-Zellstimulation mit dendritischen Zellen (2.4.4) [309].

Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen, in 96-*well*-Platten (Greiner, bio-one) und auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt. Zentrifugationen erfolgten für 2 min bei 2500 rpm. Es wurde mit einem Synthesevolumen von 250 µl/*well* und dem Synthesemedium PBE gearbeitet. Die Gesamtanordnung entsprach der gleichen Anordnung, die für die T-Zell-Stimulation später verwendet werden sollte.

Zunächst wurde die benötigte Anzahl *beads*, 5,6 µm durchmessende, streptavidin-beladene Polystyrol-Partikel mit einer Bindungskapazität von 0,064 µg Biotin/mg (Bangs Laboratories), nämlich pro *well* (für 4 Stimulationen mit je 2×10^5 *beads*) zweimal mit PBE gewaschen und in PBE resuspendiert.

Es wurden jeweils *beads* mit zwei unterschiedlichen MHC-Konzentrationen auf der Oberfläche hergestellt:

- für *high density beads* wurden 20 nM MHC-Monomere verwendet
- für *low density beads* wurden 200 pM MHC-Monomere verwendet

Dazu wurden zuerst die entsprechenden MHC-Monomere in PBE auf eine Konzentration von 5 µg/ml (Stimulation mit hoher MHC-Dichte) oder auf 0,05 µg/ml (Stimulation mit geringer MHC-Dichte) verdünnt und 50 µl dieser Verdünnung pro *well* pipettiert.

Die kostimulierenden Antikörper anti-CD28 und anti-4-1BB wurden im Verhältnis 1:3 und in einer Gesamtkonzentration von 20nM eingesetzt. Auch die kostimulatorischen Antikörper wurden in PBE so eingestellt, dass nach Zugabe von 50µl dieses Antikörpermixes pro *well* eine Gesamtkonzentration von 20nM, bezogen auf das Gesamtvolumen von 250 µl des Beladungsansatzes, vorlag.

Die *wells* wurden in folgender Reihenfolge mit den oben beschriebenen Reagenzien bestückt: Zunächst 50µl Monomer-Stammlösung, high- oder low-density, dann 50µl der Antikörperstammlösung und zum Reaktionsstart schließlich 150µl der Streptavidin-Microbeads-Stammsuspension. Die 96-*well*-Platte wurden im Anschluss für 30min auf einem Schüttler (IKA-Vibrax-VXR) inkubiert.

Nach abgeschlossener Synthese wurden die MHC-antiCD28-Microbeads noch viermal mit 200 µl PBE pro *well* gewaschen, in 200µl PBE pro *well* resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank gelagert.

2.4.5.3 Antigen-spezifische Stimulation von T-Zellen mit aAPCs

Alle Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die gesamte Stimulation erstreckte sich über etwas mehr als 3 Wochen und bestand aus 3 identischen Zyklen zu je einer Woche. Die Stimulation begann am Tag 1 in 96-*well*-Platten. Hierzu wurden die CD8⁺-Zellen aus der MACS-Separation gezählt und in vorgewärmtes T-Zell-Medium aufgenommen. Pro *well* wurden 1x10⁶ Zellen in 100µl und 2x10⁵ aAPCs in 50µl vereinigt. Dem T-Zell-Medium wurde IL-2 (in PBS mit 0,1% HSA, bei -20°C gelagert, R&D Systems) mit einer Endkonzentration von 5ng/ml zugesetzt. An Tag 4 wurden pro *well* 100 µl Medium abgenommen und durch frisches, IL-2-haltiges Medium ersetzt (Endkonzentration im *well* 2ng/ml). An den Tagen 8 und 15 wurden die Zellen wie an Tag 1 mit 200000 beads und 10ng/ml IL-12 p70 unter Austausch von 100µl Medium restimuliert, während an den Tagen 11 und 18 wie an Tag 4 gefüttert wurde. An Tag 21 wurden aus jedem *well* 50µl entnommen und mit Tetramer gefärbt (2.4.6).

2.4.6 Tetramer staining von stimulierten CD8⁺-T-Zellen

2.4.6.1 Herstellung von MHC-Tetrameren

Zur durchflusszytometrischen Detektion epitopspezifischer T-Zellen wurden fluoreszenzfarbstoffkonjugierte Peptid:MHC-Tetramere verwendet. Die Herstellung dieser Tetramere erfolgte bei 4°C in lichtundurchlässigen 1,5ml Kryoröhrchen (Eppendorf) unter fortwährender Rotation. Hierzu wurde eine

Aliquot mit 50µg biotinyliertem MHC-Monomer aufgetaut und kurz abzentrifugiert. Alle 30min wurden 10% von 78,5µl Streptavidin-Phycoerythrin (Strep-PE, 1mg/ml, Molecular Probes) oder 43,5µl Streptavidin-Allophycocyanin (Strep-APC, 1mg/ml, Molecular Probes) zugesetzt. Dies entspricht einem stöchiometrischen Verhältnis von 4:1 (MHC-Monomere:Streptavidin-Konjugat). Nach 10 Zugaben wurde das Tetramer abzentrifugiert und bei 4°C dunkel gelagert.

2.4.6.2 Tetramerfärbung

Die Tetramerfärbung wurde in 96-*well*-Platten durchgeführt. Zentrifugationen erfolgten bei 1800 rpm und 4°C für 2 min. Alle Schritte, außer der Entnahme von Zellen aus Stimulationsansätzen, wurden unsteril und bei 4°C oder auf Eis durchgeführt.

50µl Aliquots der zu färbenden Zellen (etwa 2×10^5 Zellen) wurden in 96-*well*-Platten überführt und mit PBEA (0,5% Rinderserumalbumin (BSA, Sigma), 2 mM EDTA, 0,1% Natriumazid in PBS) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 50µl Antikörperlösung für 20min bei 4°C inkubiert. Die Antikörperlösung enthielt die Antikörper in der richtigen Verdünnung (Tab.16) in PBEA, sowie 10µg/ml freies Streptavidin, um verbliebenes Biotin aus der Zellkultur abzufangen, welches sonst zu einem hohen Hintergrund führen würde. Die T-Zellen wurden jeweils mit PE-Tetrameren und mit APC-Tetrameren gefärbt. Es wurden PE-Tetramere mit dem zu testenden Peptid-MHC-Monomer und APC-Tetramere mit einem irrelevanten Peptid-MHC-Monomer verwendet.

Tab. 16: Monoklonale Maus-anti-human CD8-Antikörper für die Tetramerfärbung

Antikörper	Hersteller	Verdünnung	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
FITC	laborintern (Klon OKT8)	1:100	495 nm	520 nm
PE	Immunotools (Klon MEM-31)	1:120	564 nm	575 nm
PerCP	Becton Dickinson (Klon SK1)	1:20	490 nm	675 nm
APC	Becton Dickinson (Klon SK1)	1:50	650 nm	660 nm

Nach zweimaligem Waschen mit PFEA (2% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FCS), 2mM EDTA, 0,01% Natriumazid) wurden die Zellen in 50µl Tetramerklösung bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Tetramerklösung bestand aus 2 µg/ml APC-konjugiertem Tetramer bzw. 5µg/ml PE-konjugiertem Tetramer in TBS (50% PBS, 50% FCS, 2mM EDTA, 0,01% Natriumazid). Sie wurde vor Verwendung kurz abzentrifugiert, um eventuell vorhandene Aggregate zu entfernen. Nach drei Waschschritten mit PFEA wurden die Zellen in 100-200µl FACS-Fix (1% Formaldehyd) resuspendiert und mit dem FACS-Gerät analysiert.

2.4.7 Intrazelluläre Interferon- γ -Färbung von stimulierten CD8⁺-T-Zellen

Um die antigenspezifische IFN- γ -Sekretion von Zellen nachzuweisen, wurde ein Interferon- γ -release-assay mit Tetramerfärbung durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen möglichst einen Tag vor der eigentlichen Färbung in eine neue 96-well-Platte überführt und zuvor mindestens eine Woche nicht mit IL-2 gefüttert. Vor der Intrazellulärfärbung erfolgte eine Stimulation mit Peptid. Angesetzt wurden 3 wells für das Peptid (10µg/ml), mit dem die Zellen im Vorfeld stimuliert wurden, sowie ein well mit einem Fremdpeptid (10µg/ml), mit dem die Zellen bisher keinen Kontakt hatten (Negativkontrolle), ein well ohne Peptid und ein well, das mit PMA (50ng/ml, Sigma) und Ionomycin (1µM, Sigma) als Positivkontrolle stimuliert wurde. Pro well wurden etwa 400.000 Zellen

eingesetzt. Nach einer Stunde im Brutschrank bei 37°C wurde allen sechs *wells* Golgi-Stop-Lösung (1:1500, Becton Dickinson) zugesetzt, um die intrazellulären Proteintransportvorgänge in den Zellen zu stoppen, was eine intrazelluläre Akkumulierung von Zytokinen zur Folge hat. Nach mindestens 5 weiteren Stunden Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ konnte mit der Färbung begonnen werden.

War es möglich ein MHC-Tetramer des untersuchten Peptids zu synthetisieren, wurde die Intrazellulärfärbung im Anschluss an eine normale Tetramerfärbung durchgeführt (2.4.6.1). Alle Schritte fanden bei 4°C oder auf Eis, unter Vermeidung von Lichteinfall, statt. Zentrifugiert wurde für 2 min bei 4°C und 1800 rpm. Nach dem abschließenden Waschen mit PFEA wurden die Zellen nicht in FACS-Fix aufgenommen, sondern mit 100 µl Cytofix/Cytoperm (Becton Dickinson) 20 min bei 4°C permeabilisiert. Nach zwei Waschschrritten mit Perm/Wash (Becton Dickinson) wurde mit einem FITC-konjugierten anti-IFN-γ-Antikörper in einer 1:200 Verdünnung 30 min bei 4°C inkubiert. Nach zwei Waschschrritten mit Perm/Wash und PFEA wurden die Zellen in 100-200 µl FACS-Fix resuspendiert, lichtundurchlässig eingepackt und bis zur Analyse im Kühlschrank gelagert.

2.4.8 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie werden in einem Flüssigkeitsstrom befindliche Zellen mit Hilfe eines *Fluorescence-Activated-Cell-Sorter* (FACS) analysiert, gezählt und gegebenenfalls getrennt. Somit wird eine Charakterisierung der Zellsuspension hinsichtlich Zellzahl, Zellgröße und Granularität möglich. Das zur Detektion verwendete Laserlicht (Wellenlänge: Argonlaser 488 nm, Diodenlaser 633 nm) wird durch die eingeleiteten Zellen gestreut. Die Streuung in Einstrahlrichtung (forward scatter, FSC) gibt hierbei Auskunft über die Größe der Zellen, während die Seitwärtsstreuung (side scatter, SSC) Aussagen über deren Granularität erlaubt. Anhand dieser beiden Größen lassen sich verschiedenen Zellpopulationen unterscheiden.

Zusätzlich können Fluoreszenzmessungen durchgeführt werden, d.h. es können Oberflächenmoleküle durch monoklonale Antikörper oder MHC-

Tetramere gefärbt werden, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind oder die ihrerseits von fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpern erkannt werden. Zur parallelen Färbung mehrerer Oberflächenmoleküle müssen Fluoreszenzfarbstoffe mit unterschiedlichen Emissionsspektren verwendet werden. Während beispielsweise Fluoresceinisothiocyanat (FITC) vorwiegend im grünen Spektralbereich emittiert, liegt die Emission von Phycoerythrin (PE) im roten Bereich. Tabelle 14 zeigt die Emissions- und Absorptionsmaxima der in dieser Arbeit verwendeten Fluochrome.

Alle Messungen wurden am FACS-Calibur (Becton Dickinson) durchgeführt. Zum Spülen und zum Betrieb des Geräts wurden die vom Hersteller empfohlenen Puffer FACS-Flow, FACS-Clean und FACS-Rinse (beide Becton Dickinson) verwendet. Die Steuerung des Geräts sowie die Auswertung und graphische Aufbereitung erfolgte mit dem Computerprogramm CellQuest Pro (Becton Dickinson).

Zunächst wurden die Spannungen an FSC- und SSC-Detektoren so abgestimmt, dass bei der Auftragung von FSC- gegen SSC-Signal im dot-blot-Modus eine definierte Population lebender Zellen zu erkennen war. Diese wurde dann durch Setzen eines Rahmens (gate) ausgewählt und für die weitere Analyse verwendet.

Anhand ungefärbter Zellen und mit nur je einem Antikörper gefärbter Zellen (anti-CD8-FITC, anti-CD8-APC, anti-CD8-PerCP und anti-CD8-PE) wurden die Messkanäle (FL1-FL4) für die Fluoreszenz im Histogramm-Modus eingestellt. Die Kompensation der Überlappung verschiedener Fluoreszenzkanäle wurde dann vom FACS-Gerät automatisch durchgeführt und anschließend anhand der Kontrollzellen überprüft. Alle weiteren Messungen wurden mit den gleichen Einstellungen vorgenommen. Es wurden stets so viele Zellen wie möglich gemessen, da mit einer sehr niedrigen Frequenz antigenspezifischer Zellen gerechnet werden musste. Nach jeder Probe wurde kurz mit FACS-Flow gespült um eine Kreuzkontamination zwischen aufeinander folgenden Proben zu vermeiden. So konnte beispielsweise durch graphische Auftragung des anti-CD8-FITC Signals gegen das Tetramersignal (PE oder APC) eine Detektion antigenspezifischer, CD8-positiver Zellen erfolgen.

3. Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der vergleichenden Analyse von Tumor und Metastasengewebe des Nierenzellkarzinoms, sowie des korrespondierenden Nierennormalgewebes sowohl auf HLA-Liganden-Ebene, als auch auf mRNA-Ebene dargestellt. Abbildung 6 zeigt die verschiedenen Arbeitsschritte dieses Projekts.

Tumor, Metastase und Normalgewebe wurden jeweils vom selben Patienten gewonnen und die HLA-Liganden vom jeweiligen Gewebe separat isoliert (Abb. 6A). Kleine Mengen der gewonnenen Peptide wurden zur quantitativen Analyse mittels Edmansequenzierung und Western Blot verwendet.

Im Anschluss wurde die Isotopenmarkierung für Normal- und Metatasengewebe mit H_4NIC und für Tumorgewebe mit D_4NIC durchgeführt (Abb. 6B). Zur Verhältnisanalyse wurden Peptide aus Normal- und Tumorgewebe, sowie aus Metastasen- und Tumorgewebe im Verhältnis 1:1 gemischt und massenspektrometrisch analysiert, die Sequenzanalyse wurde für jedes der Gewebe separat durchgeführt (Abb. 6C 1,2).

Des Weiteren soll hier auf die Ergebnisse der durchgeführten T-Zellexperimente eingegangen werden. Diese wurden weitgehend unabhängig von der oben beschriebenen Vergleichsanalyse durchgeführt.

Alle zuvor beschriebenen Experimente und Arbeitsschritte wurden vom Verfasser dieser Arbeit selbständig ausgeführt. Davon ausgeschlossen sind die Erstellung der Peptidspektren und Peptidpärchen am Massenspektrometer sowie die graphische Aufarbeitung der analysierten Peptidpärchen, diese Arbeitsschritte oblagen verschiedenen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe.

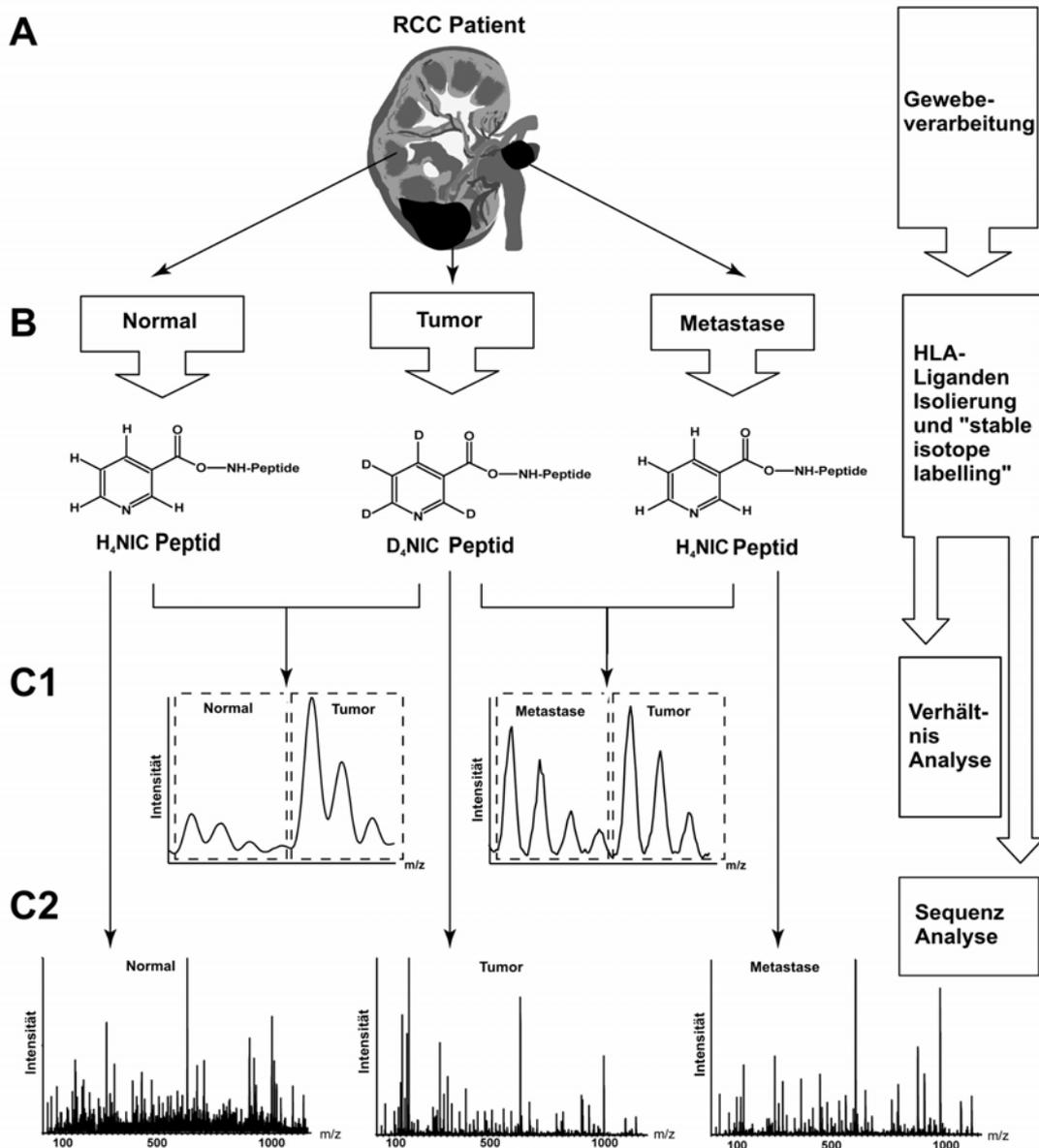


Abbildung 6: Projektbeschreibung

A) HLA Liganden wurden aus Gewebe von Primärtumor, Normalgewebe und Metastase des jeweiligen Patienten isoliert.

B) Strategie für differentielle Modifikation von HLA Liganden. Tumorgewebe wurde N-terminal mit schwerer Nicotinsäure, Normalgewebe und Metastasengewebe mit der leichten Form modifiziert. D, Deuterium; H, Sauerstoff.

C1) Für die Vergleichsanalyse wurden die HLA Liganden von Tumor und Metastase bzw. von Tumor und Normalgewebe im Gesamtpeptidverhältnis von 1:1 gemischt und mittels ESI-LC/MS analysiert.

C2) Die Sequenzanalyse wurde jeweils individuell für die HLA-Peptide aus Tumor-, Metastasen- und Normalgewebe mittels ESI-LC-MS/MS durchgeführt.

3.1 Bearbeitete und analysierte Gewebeproben

Der in diesem Kapitel besprochene Datensatz entstand aus der Verarbeitung und Analyse von insgesamt 9 Nierenzellkarzinomen. Tabelle 17 zeigt Art und Herkunft des verwendeten Gewebematerials, sowie Gewicht, histologischer Befund, TNM-Klassifikation, Tumorgrading und HLA-Typisierung der einzelnen Proben. Insgesamt wurden 5 Nierenzellkarzinome von denen sowohl Tumor, als auch Metastasen und Normalgewebe vorhanden war, 1 RCCs von denen nur Normal- und Metastasengewebe vorhanden war, sowie 4 RCC-Metastasen von denen weder Normal- noch Tumorgewebe vorhanden war, bearbeitet.

Die bearbeiteten Metastasen stammten hauptsächlich aus regionären und abdominellen Lymphknoten, zusätzlich konnten einzelne oder multiple Metastasen aus Pankreas, Leber, Nebenniere und der kontralaterale Niere untersucht werden. Bei 5 der Patientin traten die untersuchten Metastasen synchron, d.h. bei Diagnosestellung bereits auf, bei den übrigen 4 kam es im Abstand von 9 Monaten bis zu 15 Jahren nach Auftreten des Primärtumors zur Metastasierung.

Bei allen bearbeiteten Tumoren handelte es sich um klarzellige Nierenzellkarzinome, mit weitgehend schlechter Differenzierung (G2-3) und in 4 Fällen fortgeschrittener lokaler Infiltration (pT3b). Bei RCC333 und RCC112 fehlte die TNM-Klassifikation und das Grading.

Tab. 17: In der Studie verwendete Nierenzellkarzinomgewebe. Nur für RCC 399 und RCC 377 wurden zusätzlich zur HLA A und B Typisierung auch eine HLA C Typisierung durchgeführt.

Gewebe	Tumor (T) Normal tissue (N) Metastasis (M)	Masse [g]	Klin. Fakten	HLA
RCC377	T N M (Lymphknoten)	12,7 4,2 4,5	ccRCC, pT3b, pN1, M1, G2-3	A*01, A*03, B*07, Cw*07
RCC399	T N M (Lymphknoten)	13,8 2,4 1,0	ccRCC pT3b, pN2, M1, G3	A*01, A*02, B*08, B*50, Cw*06, Cw*07
RCC343	T N M (Leber)	2,1 3,2 3,2	ccRCC pT1, N0, M0, G2, Met. 9 Monate später	A*01, A*31, B*08, B*15
RCC70	T N M (Lymphknoten)	8,3 4,4 2,6	ccRCC pT3, pN1, M0, G2	A* 01, A* 02, B* 07, B* 08
RCC364	T N M (Lymphknoten)	5,8 1,2 0,4	cc/eos. RCC, pT2, N1, M0, G2	A*02, B*14, B*51
RCC395	M (Lymphknoten)	1,4	ccRCC, pT3b, N1, M0, G3	A*02, A*25, B*18, B*40
RCC333	M (Pankreas)	10,9	ccRCC, TNM nicht bekannt, Met 12 Jahre später	A*02,A*24, B*07,B*55
RCC328	M (kontrolat. Niere)	1,5	ccRCC pT2, Nx, M0, G2 Met. 5 Jahre später	A*03,A*68, B*07,B*51
RCC112	M (Nebenniere)	2,5	ccRCC TNM nicht bekannt	A*01, A*31, B*08, B*27
RCC173	N M (kontrolat. Niere)	5,0 5,1	ccRCC pT1b, N0, M1, G2 Met. 15 Jahre später	A*03,A*68, B*35,B*51

Von allen aufgeführten Geweben wurde eine HLA-Isolierung und Genexpressionsanalyse, sowie die quantitative Analyse mittels Western Blot und Edman-Abbau, durchgeführt. Die Isotopenmarkierung und Peptidsequenzierung wurde ausschließlich für RCC377 und RCC399 durchgeführt. Die vergleichende RNA-Analyse wurde zusätzlich für RCC343 ausgeführt. Für RCC377 und RCC399 wurden jeweils Tumor, Normalgewebe und paraaortale Lymphknotenmetastasen untersucht. Beide Lymphknoten waren makroskopisch komplett tumorös durchsetzt. RCC399 wies zusätzlich ossäre Metastasen mit intraspinaler Komponente auf, die jedoch nicht chirurgisch entfernt werden konnten. Für RCC343 wurde ebenfalls Tumor- und Normalgewebe, sowie eine metachrone (9 Monate später) Lebermetastase analysiert, von der jedoch nur 0,1g für die HLA-Präparation bereitstand. Die Ergebnisse der Untersuchungen für RCC377 und RCC399 wurden veröffentlicht, aus diesem Grund wurde zur Vollständigkeit zusätzlich zur HLA-A und -B Typisierung eine HLA-C Typisierung der Patienten durchgeführt.

3.2 Ergebnisse der quantitativen Analyse

Die im Folgenden vorgestellten Ergebnisse der quantitativen HLA-Analyse beziehen sich ausschließlich auf HLA-Klasse-I-Peptide, da auch nur für diese eine Sequenzanalyse mittels Massenspektrometrie durchgeführt wurde. Die quantitative Analyse von HLA-II-Peptiden wurde mittels Edmanabbau durchgeführt, soll hier aber nicht detailliert aufgeführt werden. Allgemein lässt sich sagen, dass sowohl in Tumor-, Normal- und Metastasengewebe geringe Mengen HLA-Klasse-II nachgewiesen werden konnten. Mittels Western Blot konnte nur die HLA-I-Ausbeute bestimmt werden, da keine geeigneten Antikörper für den Nachweis von HLA-Klasse-II bekannt und vorhanden waren.

3.2.1 Western Blotting

Der quantitative MHC-Nachweis mittels Western Blot wurde, wie zuvor beschrieben, über die Detektion des 12 kDa schweren β_2 -Mikroglobulins im Eluat durchgeführt. Diese Methode diente mehr als Kontrolle, ob die HLA Isolierung erfolgreich war, als einer genauen Festlegung der exakten MHC-

Menge. Hauptziel war es, einen direkten Vergleich der MHC-Mengen in Metastase, Tumor- und Normalgewebe durchführen zu können. Hierzu wurden die bei der MHC-Präzipitation abgenommenen Eluate (5 µl/Elutionsschritt) verwendet. Für RCC 377, 399, 343 und 364, die alle aus Tumor-, Normal- und Metastasengewebe bestanden, wurden die Elutionen 1-4 und 5-8 gepoolt um MHC-Moleküle aus allen drei Geweben in einem Gel zu separieren und somit genau die selben Bedingungen für eine vergleichende Analyse der Gewebe zu schaffen. Bei allen anderen RCCs wurden die Proben aus den 8 Elutionschritten jeweils einzeln in eine Tasche des Gels gefüllt. Dies diente überwiegend der Überprüfung, ob alle Elutionsschritte eine genügende MHC-Ausbeute lieferten. Abbildung 7 zeigt einen Western Blot aus Zelllysaten der Pankreasmetastase des Nierenzellkarzinoms RCC333. 1-8 entsprechen den Proben, die bei jeder der 8 Elutionen entnommen wurden. Für RCC333 ergab der Western Blot eine MHC-Ausbeute in allen 8 Elutionsschritten, wobei die größte Menge in den ersten 4 Elutionen erzielt wurde. Elution 8 zeigt nur noch eine geringe MHC-Ausbeute. Alle anderen, auf diese Weise untersuchten Einzelgewebe (RCC395, RCC328, RCC173, RCC70), ergaben ähnliche Ergebnisse, so dass eine Beendigung der Eluation nach dem 8. Elutionsschritt gerechtfertigt erschien.

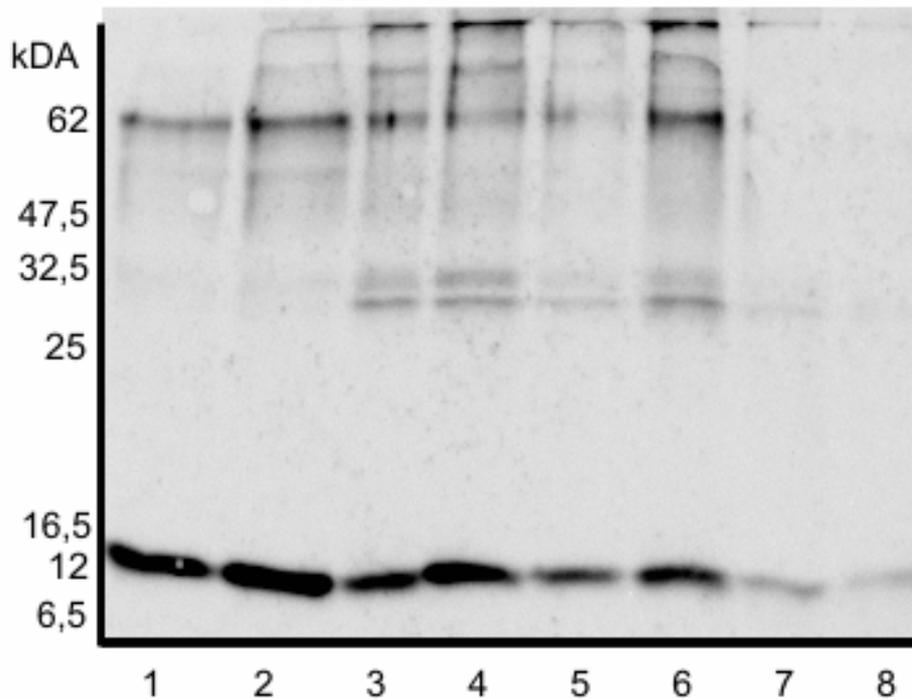


Abb.7: Quantifizierung der gewonnenen MHC-Klasse-I-Molekülmenge durch Western Blot-Analyse des Metastaseneluats von RCC333. 1-8 entsprechen den 8 Elutionsschritten.

Abbildung 8 zeigt die Western Blot Analyse aus Zelllysaten der Nierenzellkarzinome RCC377 (8 A) und RCC364 (8 B), für die jeweils Eluate aus Metastase, Tumor und Normalgewebe auf ein Gel aufgetragen wurden. Für beide Gewebe ergibt sich die größte MHC-Ausbeute im Tumorgewebe, das mit einer Masse von 12,7g (RCC377) bzw. 5,8g (RCC364), deutlich schwerer als das korrespondierende Normal- und Metastasengewebe war und somit eine höhere MHC-Ausbeute erwarten ließ.

Trotz beinahe identischem Probengewicht ergaben die Elutionen des Metastasengewebes von RCC377 in den Eluaten 5-8 eine deutlich höhere MHC-Klasse-I-Ausbeute als das Nierennormalgewebe.

Metastasen- und Normalgewebslysate von RCC364 zeigten eine nahezu identische MHC-Ausbeute wobei das Metastasengewebe mit einer Masse von 0,4g deutlich unter der des Normalgewebes lag. Allgemein lässt sich feststellen,

dass die MHC-Ausbeute bei allen drei Geweben von beiden Nierenzellkarzinomen in den Elutionen 5-8 ergiebiger waren als in Elution 1-4.

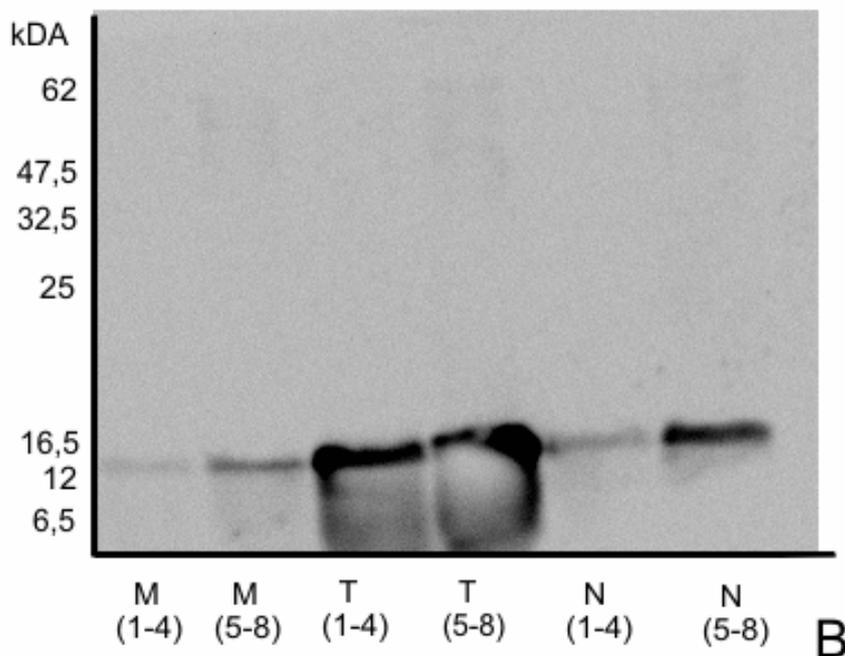
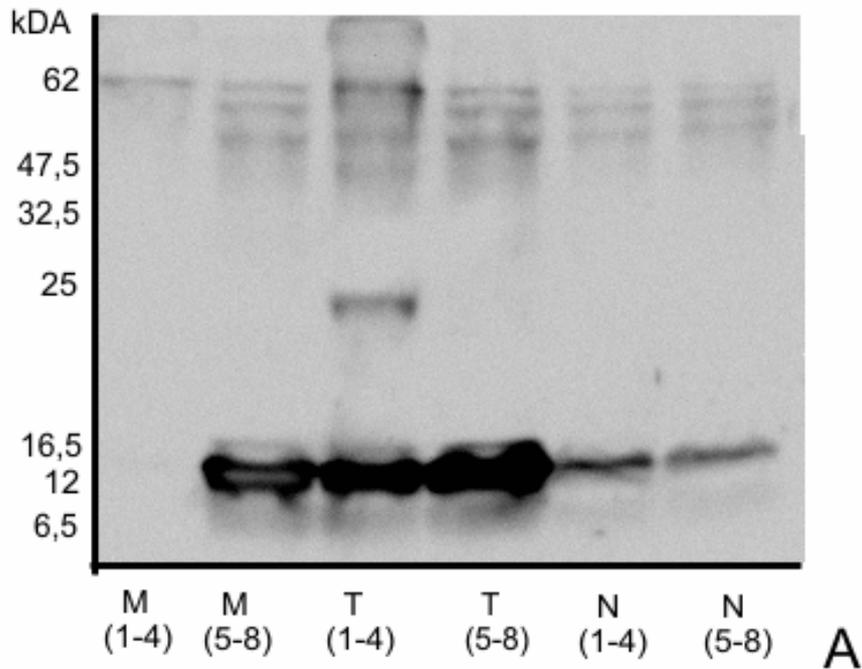


Abb. 8: Vergleichende Quantifizierung der gewonnenen MHC-Klasse-I-Molekülmenge durch Western Blot-Analyse des Metastasen-, Tumor- und Normalgewebes von RCC377 (A) und RCC364 (B). Elutionen 1-4 und 5-8 wurden gepoolt. M, Metastase; T, Tumor; N, Normalgewebe.

3.2.2 Edman-Sequenzierung

Eine weitere Möglichkeit zur Quantifizierung der eluierten MHC-Moleküle bietet die Proteinsequenzierung mittels Edman-Abbau. Aufgrund der höheren Automatisierbarkeit und der standardisierteren Auswertung wurde diese Methode in der Arbeit genutzt, um genauere Angaben über die MHC-Ausbeute der Immunpräzipitation zu machen. Besonders gut lässt sich, wie zuvor beschrieben, die Konzentration von MHC-Klasse-I an der α -Kette erkennen, welche N-terminal die Sequenz GSHSM besitzt. Wie bereits erläutert, ist ein deutlicher Anstieg der Konzentration einzelner Aminosäuren in der Sequenz entsprechend dem Zyklus und ein anschließender Abfall derselben ein Hinweis auf die Menge des gesuchten Proteins in der Probe. Bei der α -Kette lässt sich dieses Phänomen am besten an der Aminosäure Histidin in Position 3 nachvollziehen. Wenn man den Anstieg der Konzentration an Histidin von Zyklus 2 nach Zyklus 3 mit der Menge der α -Ketten und damit an MHC-Klasse-I-Molekülen gleichsetzt, lässt sich die eluierte Gesamtmenge an MHC berechnen. Allerdings muss beachtet werden, dass es durch Artefakte und Verunreinigungen zu einem leichten, aber kontinuierlichen Anstieg des Histidins in allen Zyklen kommt. Dieser Anstieg muss vom Gesamtanstieg zwischen Zyklus 2 und 3 abgezogen werden, um keine fälschlicherweise erhöhten Werte zu erhalten. Für die Edman-Sequenzierung wurden jeweils 80 μ l des Gesamteluats verwendet (10 μ l pro Elutionsschritt) was 5% der Gesamtmenge an eluiertem Lysat entspricht.

Die Elutionen von Tumor-, Normal-, und Metastasengewebe wurden jeweils separat ausgewertet um die erhaltenen MHC-Mengen vergleichen zu können.

Tabelle 18 zeigt die Ergebnisse der Edmansequenzierung für alle untersuchten Gewebe. Es handelt sich um die aus dem jeweiligen Gewebe gewonnene Gesamt-MHC-Klasse-I-Molekül-Menge. Die besten Ergebnisse zeigen sich hierbei für RCC377 mit 6000 pmol für das Tumorgewebe, 500 pmol für das Normalgewebe und 3500 pmol für das Metastasengewebe. Bei den Einzelproben konnte das beste Ergebnis mit 3000 pmol für die Metastase von RCC333 erzielt werden. Die unten aufgeführten Ergebnisse waren zudem

ausschlaggebend für die Entscheidung welche der RCC-Proben modifiziert und sequenziert wurden.

Tab. 18: Ergebnisse der quantitativen Peptidanalyse mittels Edmansequenzierung.

Gewebe	Tumor (T) Normal tissue (N) Metastasis (M)	Edmanergebnisse [pmol]	Durchschnittl. HLA-Menge [pmol/g]
RCC377	T	6000	472.4
	N	500	119.0
	M (Lymphknoten)	3500	777.8
RCC399	T	1000	72.5
	N	60	25.0
	M (Lymphknoten)	40	40.0
RCC343	T	200	95.2
	N	20	6.3
	M (Leber)	1400	437.5
RCC364	T	1000	172.4
	N	10	8.3
	M (Lymphknoten)	20	50.0
RCC70	T	3200	385.5
	N	300	68.2
	M (Lymphknoten)	200	76.9
RCC395	M (Lymphknoten)	50	35.7
RCC333	M (Pankreas)	3000	275.2
RCC328	M (kontralat. Niere)	300	200.0
RCC112	M (Nebenniere)	700	280.0
RCC173	N	40	8.0
	M (kontralat. Niere)	240	47.1

Um genauere Aussagen über die MHC-Klasse-I-Menge auf Tumor-, Normal- und Metastasengewebe machen zu können, wurde die Ausbeute an MHC für die jeweiligen Gewebe auf die Menge, die in 1g Gewebe enthalten ist,

normalisiert (Tab. 18). Um statistisch signifikante Unterschiede zwischen den MHC-Klasse-I-Mengen auf den unterschiedlichen Geweben aufzudecken, wurden ungepaarte t-Tests durchgeführt (Graph Pad Prism 3). Die graphische Darstellung erfolgte in Abbildung 9 mittels eines Balkendiagramms. Die Ergebnisse der quantitativen MHC-Bestimmung zeigten eine sehr hohe Streubreite mit Gesamt-MHC-Mengen zwischen 6000pmol und 10pmol sowie normalisiertem MHC-Gehalt zwischen 777.8pmol/g und 6.3pmol/g.

Der Gesamtvergleich aller 10 analysierten RCC-Proben ergab für das Tumorgewebe (n=5) eine mittlere MHC-Menge von 239.6 ± 80.24 , für das Normalgewebe (n=6) von 39.13 ± 18.64 und für das Metastasengewebe (n=10) von 227.4 ± 68.37 . Während die MHC-Klasse-I-Menge auf Tumor und Metastasengewebe nahezu identisch war, zeigte sich ein deutlicher Unterschied zum Normalgewebe. Aufgrund geringer Fallzahlen konnte dieser Unterschied nur im Vergleich Tumor und Normalgewebe Signifikanzniveau erreichen ($p=0.026$), nicht jedoch für den Vergleich Metastase und Normalgewebe ($p=0.066$). Trotzdem zeigt der quantitative Gesamtvergleich einen deutlich erhöhten MHC-Klasse-I-Gehalt auf Tumor- und Metastasengewebe im Vergleich zum Nierennormalgewebe.

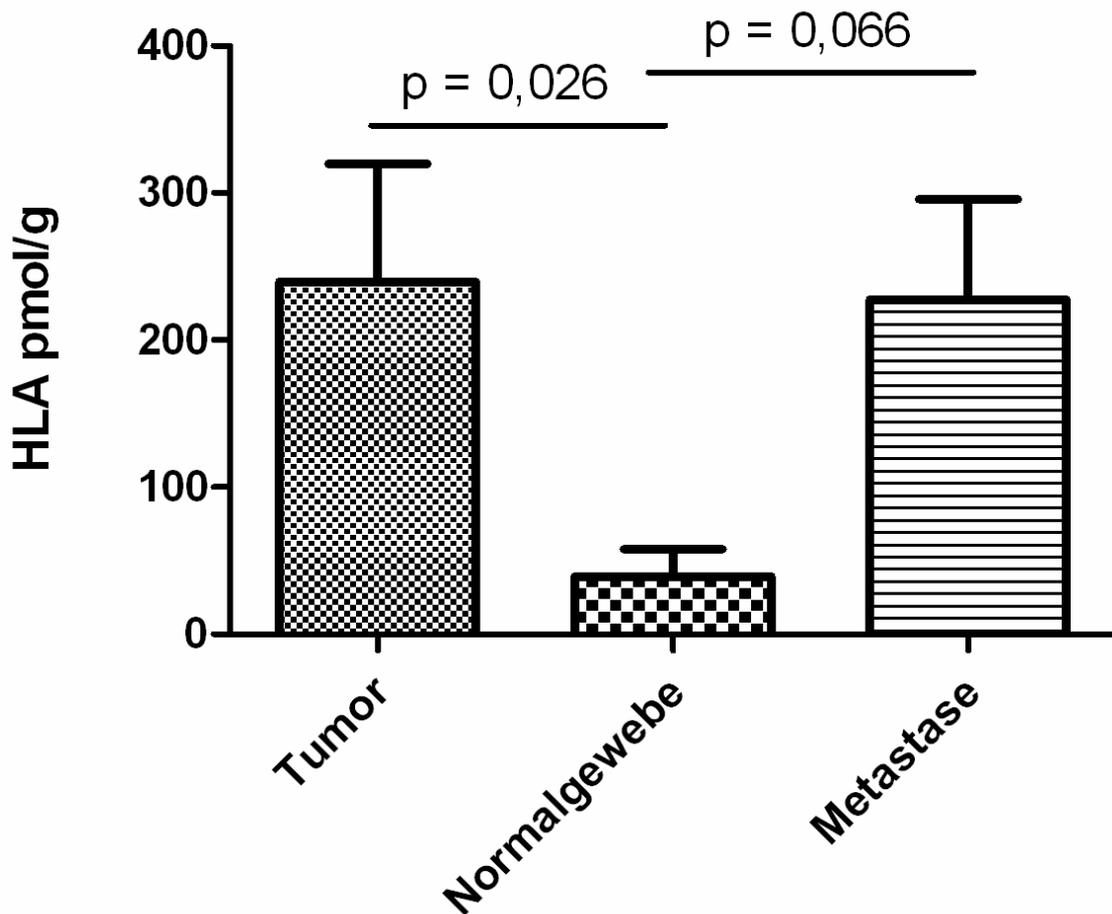


Abb. 9: Vergleich des durchschnittlicher Gehalt an MHC-Klasse-I-Molekülen auf 1g analysiertem Gewebe in pmol/g auf Tumor-, Normal- und Metastasengewebe. P-Wert und Standartabweichung wurden mittels ungepaartem t-Test berechnet.

3.3 Ergebnisse der qualitativen Analyse

3.3.1 Vergleich aller Peptide auf Tumor und Normalgewebe bzw. Tumor und Metastase

Der in diesem Abschnitt besprochene Datensatz entstand aus der Analyse der Nierenzellkarzinome RCC377, RCC399 und RCC343. Die Peptidsequenzanalyse und die Peptidmodifikation mit anschließender Vergleichsanalyse wurden ausschließlich für den Peptidsatz, der aus RCC377 und RCC399 gewonnen wurde durchgeführt. Für alle drei genannten Gewebe wurde die vergleichende Analyse der Genexpressionsdaten durchgeführt.

Die Anzahl der sequenzierten Peptide auf Tumor-, Normal- und Metastasengewebe variierte stark, was schon anhand der zuvor beschriebenen Ergebnisse der Edmansequenzierung zu erwarten war.

Insgesamt konnten 142 verschiedene Peptide auf den zwei untersuchten Nierenzellkarzinomen identifiziert werden, wobei 74 auf RCC377 und 68 auf RCC399 gefunden wurden (Tab. 19).

Für jede Peptidsequenz, die identifiziert wurde, wurde im zugehörigen Modifikationslauf das korrespondierende Peptidpärchen, wie in Abschnitt 2.3.2.3 beschrieben, gesucht und das Präsentationsverhältnis zwischen Tumor- und Normalgewebe, bzw. zwischen Tumor- und Metastasengewebe berechnet. Hierzu wurde im Peptidpaar (NIC, dNIC) die relative Peptidmenge anhand der Intensität des monoisotopen Peaks beider Peptide bestimmt und das Präsentationsverhältnis als Quotient aus relativer Peptidmenge Tumor / relativer Peptidmenge Metastase bzw. Normalgewebe errechnet.

Es konnten für RCC377 im Vergleich Tumor- und Metastasengewebe 214 Peptidpärchen und im Vergleich Tumor- und Normalgewebe 132 Peptidpärchen identifiziert werden. Für RCC399 ergab sich im Vergleich Tumor- und Metastasengewebe 175 Pärchen und im Vergleich Tumor- und Normalgewebe 128 Pärchen (Tab. 19). Diese Zahlen beinhalten auch Peptidpärchen, deren Peptide nicht sequenziert und identifiziert werden konnten.

In dieser Arbeit wurde der Grenzwert für Präsentationsverhältnisse, bei denen das Peptid auf einem der Gewebe eine Überpräsentation zeigt, auf 10% festgelegt.

Auf dieser Grundlage konnten 11 HLA-Liganden auf RCC377 und 3 HLA-Liganden auf RCC399 identifiziert werden, die auf Tumor und Metastase, im Vergleich zu Normalgewebe, überpräsentiert waren. 4 Liganden zeigten auf RCC377 und 2 Liganden auf RCC399 eine Überpräsentation auf Metastasengewebe im Vergleich zu Tumor- und Normalgewebe. 2 Peptide auf RCC377 sowie 8 Peptide auf RCC399 zeigten eine Überpräsentation auf dem Tumor im Vergleich zu Normal- und Metastasengewebe. 57 der Peptide auf RCC377 und 55 der Peptide auf RCC399 zeigten keine Überpräsentation im definierten Bereich (Tab. 19).

Tab. 19: Gesamtzahl untersuchter mRNA und HLA Ligandenpaare für RCC 377, RCC399 und RCC343 sowie aller identifizierter Peptidsequenzen auf diesen Geweben.

Gewebe	mRNA Paare	HLA Paare	Identifizierte Peptidsequenzen				
			gesamt	T and M > N	M > T und N	T > M und N	∅
RCC377			74	11	4	2	57
T vs. M	25664	214					
T vs. N	24798	132					
RCC399			68	3	2	8	55
T vs. M	24773	175					
T vs. N	21457	128					
RCC343		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
T vs. M	24332						.
T vs. N	23231						

3.3.1.1 HLA-Klasse-I Peptidpräsentation

Um die Präsentationsverhältnisse der einzelnen Peptidpärchen gesammelt zu betrachten und eine Aussage über die Gesamtähnlichkeit von Tumor- und Normalgewebe bzw. Tumor- und Metastasengewebe zu treffen, wurden in Abbildung 10 die Ergebnisse in Balkendiagrammen zusammengefasst, durch die anschließend eine Gauß'sche Kurve gezogen wurde. Um die Streubreite der Ergebnisse möglichst gering zu halten, wurden die Werte der Präsentationsverhältnisse zunächst logarithmiert, die Säulenbreiten wurden so angepasst, dass eine möglichst gute Annäherung der Funktion an eine Gauß'sche Normalverteilung möglich war.

Die Gauß'sche Funktion (Normalverteilung) konnte das Verteilungsmuster der Werte am ehesten widerspiegeln, man muss schließlich davon ausgehen, dass ein Grossteil der MHC-präsentierten Peptide auf allen menschlichen Zellen in ähnlicher Häufigkeit vorkommen und nur ein geringer Teil tumor- oder metastasenspezifisch ist und somit auf diesen Geweben überpräsentiert wird. Dies bedeutet, dass im mittleren Bereich der Gauß'schen Kurve die Präsentationsverhältnisse der Peptide stehen, die keinen deutlichen

Unterschied auf Tumor- und Normalgewebe, bzw. Tumor- und Metastasegewebe zeigen. In den Randbereichen der Kurve sind somit die Präsentationsverhältnisse der Peptide angesiedelt, deren Präsentation sich deutlich zwischen Tumor- und Normalgewebe bzw. Tumor- und Metastasegewebe unterscheidet. Auf Grund dieser Annahme wurde der Scheitel der Gausskurve, der Mittelwert (μ) auf 0 festgelegt, auch wenn die tatsächlichen μ -Werte der einzelnen Datensätze zwischen 0,36 und 0,17 schwankten.

Wie zuvor dargestellt wurde der Grenzwert ab welchem ein Peptid auf einem Gewebe als überpräsentiert gilt auf 10% festgelegt ($x_{TOP10\%}$), d.h. alle Peptide mit einem Präsentationsverhältnis zwischen Tumor- und Normalgewebe bzw. zwischen Tumor- und Metastasegewebe, das außerhalb 90% der Normalverteilung liegt, sind auf dem entsprechenden Gewebe überpräsentiert. Für RCC377 lag der $x_{TOP10\%}$ -Wert für den Vergleich Tumor- und Normalgewebe bei 1.82 und für den Vergleich Tumor- und Metastasegewebe bei 1.13. Für RCC399 lag der $x_{TOP10\%}$ -Wert für den Vergleich Tumor- und Normalgewebe bei 2.73 und für den Vergleich Tumor- und Metastasegewebe bei 2.40.

Als Richtwert für die Gesamtähnlichkeit der Gewebe wurde die Halbwertsbreite ω der Normalverteilung bestimmt. Zusätzlich wurde mithilfe des nichtparametrischen „Kolmogorov-Smirnov-Tests“, für zwei unabhängige Proben die Signifikanz der Unterschiede in den Präsentationsverhältnissen der einzelnen Gewebe geprüft.

Je größer die Streuung der Werte innerhalb der Gausschen Kurve, desto unterschiedlicher ist die MHC-Klasse-I-Präsentation auf den verglichenen Geweben und desto größer ist auch die Halbwertsbreite ω der Normalverteilung.

Der Vergleich von Primärtumor und Normalgewebe ergab für RCC377 ein ω von 1.86 und für RCC399 ein ω von 2.79. Der Vergleich von Primärtumor und Metastase ergab für RCC377 ein ω von 1.15 und für RCC399 ein ω von 2.45. Die Ergebnisse zeigen, dass sich Tumor- und Metastasegewebe in beiden RCC-Proben im Bezug auf MHC-Klasse-I-Präsentation ähnlicher sind, als

Tumor- und Normalgewebe. Diese Unterschiede in der Verteilung der HLA-Liganden-Präsentationsverhältnisse im Vergleich Primärtumor und Normalgewebe- bzw. Metastasengewebe waren für RCC377 signifikant ($p = 0,03$, $Z = 1.44$, $n > 131$). Für RCC399 konnte aufgrund der limitierten Anzahl an identifizierten Peptidpärchen kein Signifikanzniveau erreicht werden, obwohl die Halbwertsbreite im Vergleich Primärtumor und Normalgewebe deutlich über der des Vergleichs Tumor- und Metastasengewebe lag.

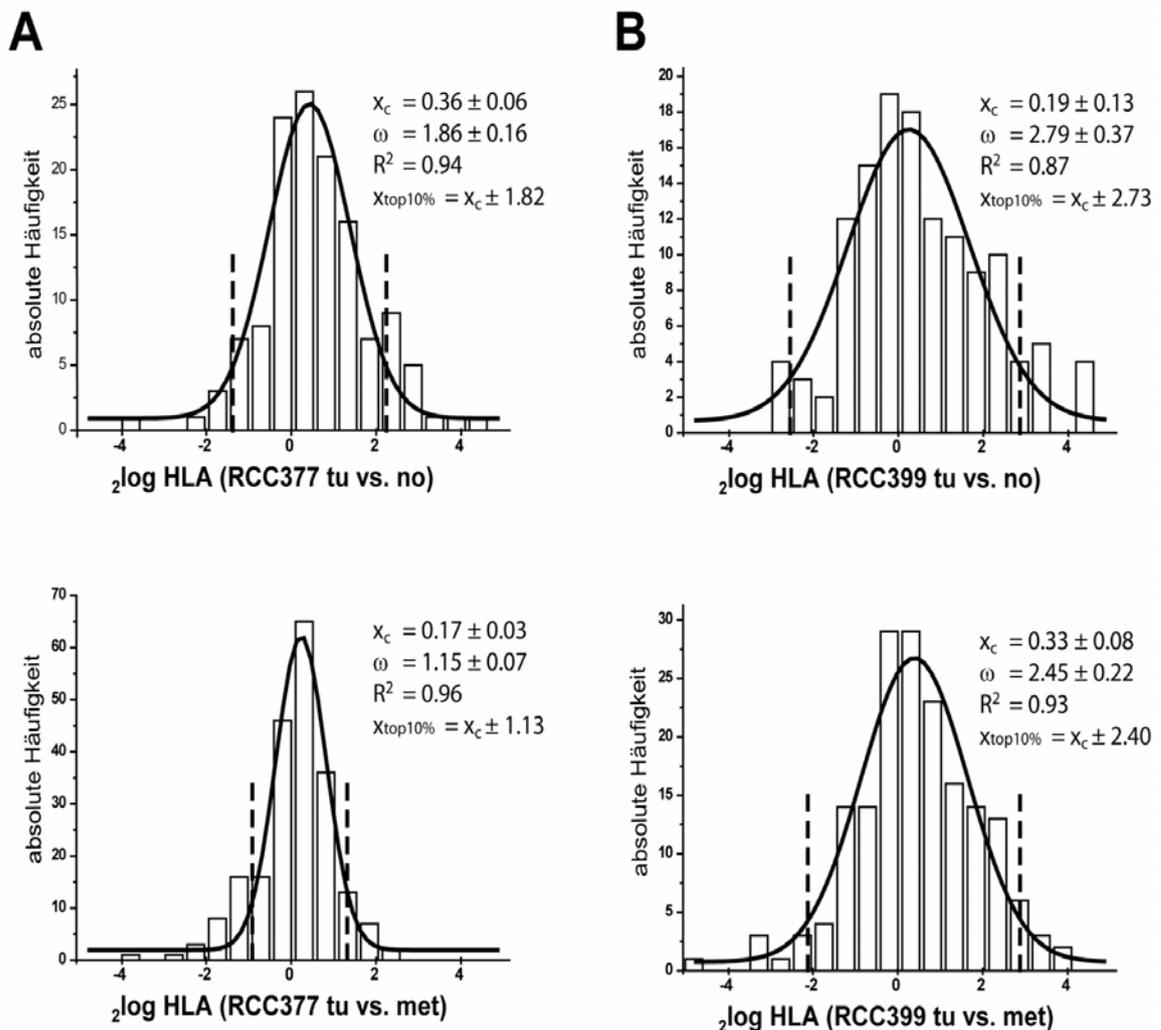


Abb. 10: Normalisierung der Präsentationsverhältnisdaten der HLA-Liganden aus RCC377 (linke Spalte) und aus RCC399 (rechte Spalte).

Die Präsentationsverhältnisse der Peptidpärchen von Tumor- und Normalgewebe bzw. Tumor- und Metastasengewebe wurden logarithmiert und Häufigkeitszählungen mit einer Säulenbreite von 0,3 durchgeführt. Die Säulenbreite wurde so angepasst, dass der R^2 -Wert der Gauß'schen Kurve möglichst nahe an 1,0 kam. Mit Hilfe der Gauß'schen-Funktion wurde für jede Datenreihe der Mittelwert (x_c) berechnet. Alle Daten wurden auf $x_c = 0$ normalisiert. Der Grenzwert der Präsentationsverhältnisse, der den höchsten 10% der Präsentation entsprachen ($x_{TOP 10\%}$) wurde berechnet und durch die gestrichelten Linien markiert. Die Halbwertsbreite ω der Gauß-Kurve gibt die Gesamtähnlichkeit der jeweils verglichenen Gewebe an.

3.3.1.2 m-RNA Expression

Das Genexpressionsprofil wurde für die Nierenzellkarzinome RCC377, RCC399 und RCC343 zwischen Tumor- und Normalgewebe bzw. Tumor- und Metastasengewebe untersucht. In die Analyse wurden alle Gene mit einbezogen, die in beiden verglichenen Geweben vorhanden waren. Die Expressionsverhältnisse wurden anhand der relativen Genexpressionswerte des Affimetrix-Programms berechnet. Wie für die MHC-Klasse-I-Präsentationsverhältnisanalyse zuvor beschrieben, wurde auch hier die Werte logarithmiert, in Säulendiagrammen dargestellt und mittels Gauß'scher Funktion normalisiert (Abbildung 11). Für die mRNA-Analyse lagen mit 25664, 24773 und 24332 Genpärchen für den Vergleich von Tumor und Metastase auf RCC377, RCC399 und RCC343 und mit 24798, 21457 und 23231 Genpärchen für den Vergleich Tumor und Normalgewebe auf RCC377, RCC399 und RCC343 die Anzahl der Expressionsverhältnisse deutlich höher als bei den Präsentationsverhältnissen. Dies erlaubt eine wesentlich genauere Näherung an eine Normalverteilung. Hierzu wurde die Säulenbreite auf 0,3 und der Mittelwert X_c auf 0 festgelegt.

Wie zuvor beschrieben, wurde der Grenzwert der Expressionsverhältnisse, der den höchsten 10% der Genexpression entsprach ($x_{TOP} 10\%$) berechnet und eine Ähnlichkeitsanalyse anhand der Halbwertsbreite durchgeführt.

Der Vergleich von Primärtumor und Normalgewebe ergab für RCC377 ein ω von 1,30, für RCC399 ein ω von 1,53 und für RCC343 ein ω von 1,63. Der Vergleich von Primärtumor und Metastase ergab für RCC377 ein ω von 1,04, für RCC399 ein ω von 1,41 und für RCC343 ein ω von 0,85. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich in allen drei RCC-Proben, auch im Bezug auf mRNA-Expression, Tumor- und Metastasengewebe ähnlicher sind, als Tumor- und Normalgewebe. Für alle untersuchten Gewebe ergaben die Expressionsverhältnisse einen signifikanten Unterschied in der Verteilung zwischen Tumor- und Normalgewebe bzw. Tumor und Metastase ($p < 0.001$, $Z > 9.86$, $n > 21456$).

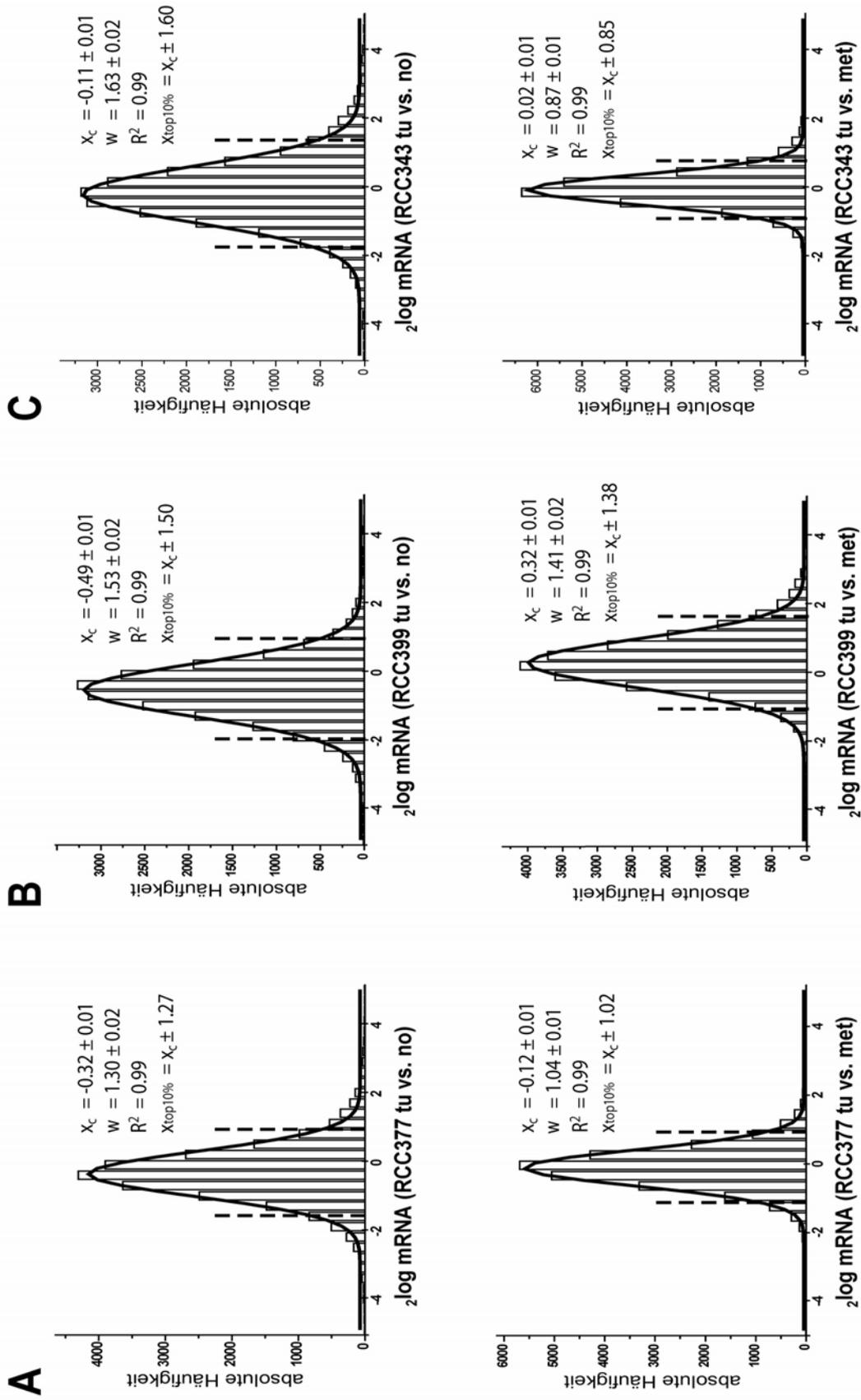


Abb. 11: Normalisierung der mRNA-Expressionsverhältnisdaten von RCC377 (A), RCC399 (B) und RCC343 (C).

Die errechneten Genexpressionsverhältnisse zwischen Tumor- und Normalgewebe bzw. Tumor- und Metastasengewebe wurden logarithmiert und die Gauß'sche-Kurve mit einer Säulenbreite von 0,3 berechnet um einen möglichst guten R^2 -Wert zu erzielen. Der Mittelwert (x_c) wurde für alle vorliegenden Datensätze bestimmt und alle Werte wurden auf $x_c = 0$ normalisiert. Grenzwert der Expressionsverhältnisse, der den höchsten 10% der Genexpression entsprach ($x_{TOP\ 10\%}$) wurde berechnet und durch die gestrichelten Linien markiert. Die Halbwertsbreite ω der Gauss-Kurve gibt die Gesamtähnlichkeit der jeweils verglichenen Gewebe an.

Um eine Aussage über die Ähnlichkeit des Metastasengewebes zu verschiedenen Normalgeweben machen zu können, wurde im Rahmen der qualitativen Analyse die mRNA Expression zwischen Nierennormalgewebe und Metastase, sowie Metastase und Normalgewebe aus der jeweiligen Metastasenlokalisierung auf RCC377, RCC399 und RCC343 verglichen. Für RCC377 und RCC399 wurde die Genexpression des Metastasengewebes mit der des Normalgewebes eines Lymphknotens verglichen, für RCC343 mit der Genexpression von Lebergewebe. Ziel der Analyse war es herauszufinden ob das Metastasengewebe mehr seinem Ursprungsgewebe (Niere) gleicht oder eine größere Ähnlichkeit zum Gewebe der Metastasenlokalisierung besitzt.

Es wurden auch hier nur Gene in die Auswertung einbezogen, die auf beiden verglichenen Geweben vorhanden waren.

Wie zuvor beschrieben wurden auch für diesen Vergleich die errechneten Expressionsverhältnisse logarithmiert, in Säulendiagrammen dargestellt und mit Hilfe der Gauß'schen Funktion näherungsweise normalisiert (Abb.12). Hierzu wurde wiederum die Säulenbreite auf 0,3 und der Mittelwert (x_c) auf 0 festgelegt.

Die als Ähnlichkeitsfaktor festgelegte Halbwertsbreite ω ergab für den Vergleich Metastase und Nierennormalgewebe auf RCC377 einen Wert von 1,4, auf RCC399 einen Wert von 1,95 und auf RCC343 einen Wert von 1,72. Für den Vergleich Metastase und Lymphknoten- bzw. Lebernnormalgewebe ergab sich für RCC377 ein ω von 1,86, für RCC399 ein ω von 2,11 und für RCC343 ein ω von 2,56. Diese Ergebnisse zeigen, dass für alle drei Gewebe im Bezug auf

mRNA-Expression die Metastase mehr ihrem Ursprungsgewebe (Niere) ähnelt, als dem Gewebe, in das der Tumor gestreut hat.

Wie zu erwarten, zeigt sich im Vergleich der Halbwertsbreiten zwischen Tumor- und Metastasengewebe (Abb. 11) und zwischen Normal- und Metastasengewebe (Abb. 12), dass sich auf Ebene des Genoms Tumor und Metastase ähnlicher sind als Metastase und Normalgewebe.

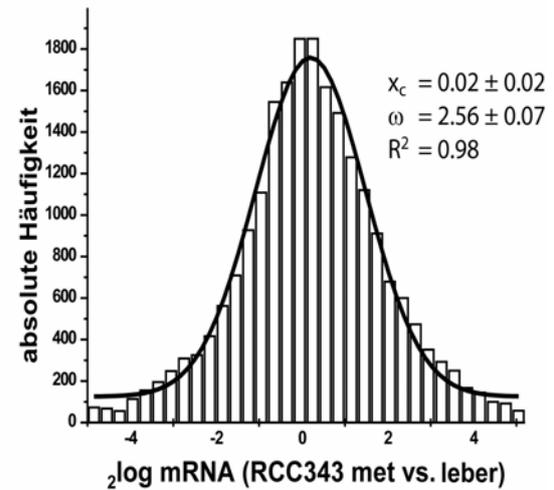
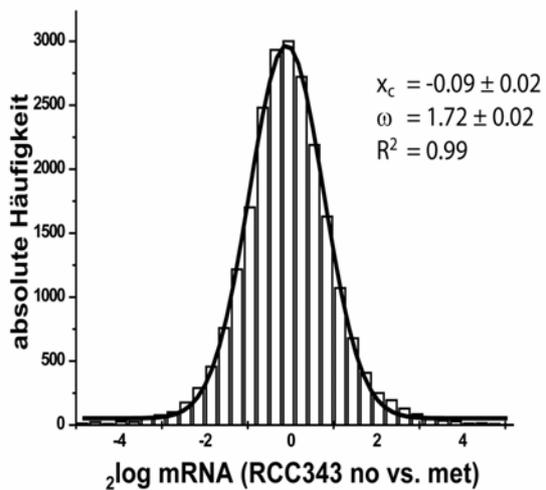
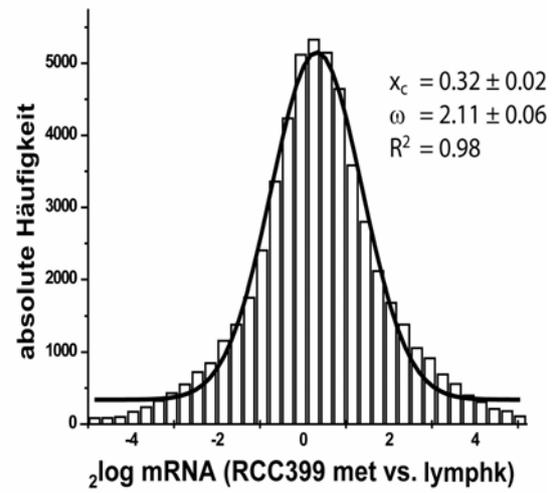
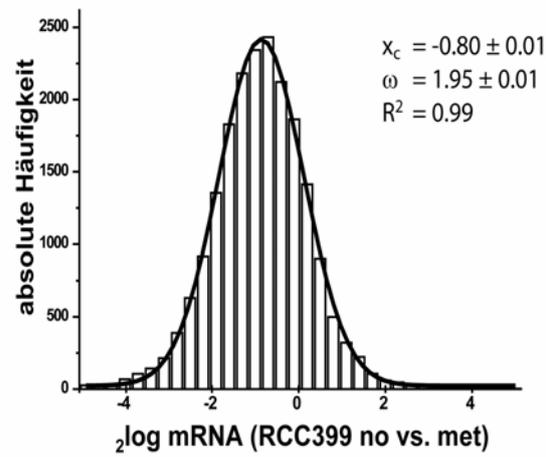
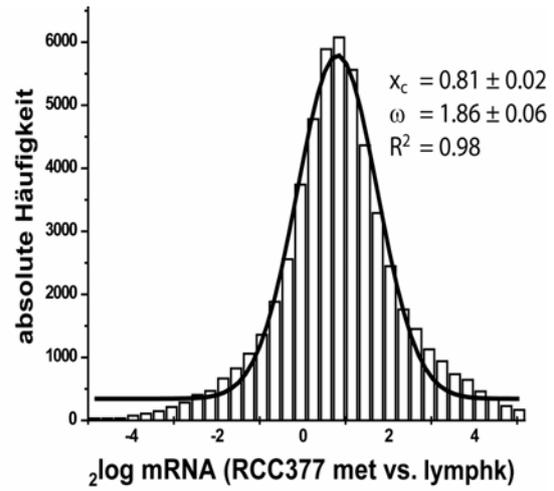
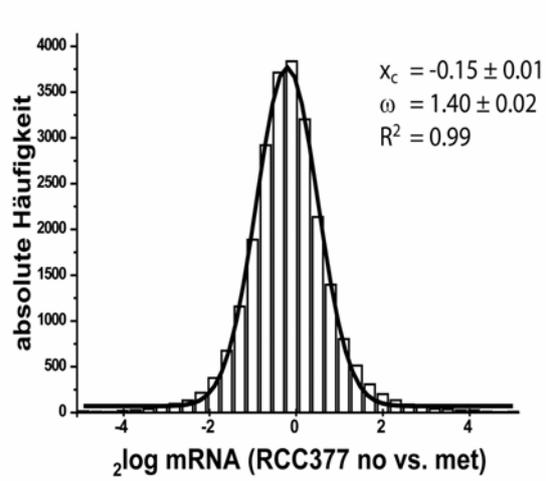


Abb.12 Vergleich der Genexpressionsdaten von RCC377 (oben), RCC399 (mitte) und RCC343 (unten) mit Nierennormalgewebe (linke Spalte) und Normalgewebe der Metastasenstationen (rechte Spalte).

Die errechneten Genexpressionsverhältnisse zwischen Metastasen und Normalgewebe bzw. Metastasen und Normalgewebe der Metastasenstationen (Lymphknoten und Leber) wurden logarithmiert, in Säulendiagrammen dargestellt und die Gauß'sche-Kurve wurde, mit einer Säulenbreite von 0,3 um einen möglichst guten R^2 -Wert zu erzielen, berechnet. Der Mittelwert (μ) wurde für alle vorliegenden Datensätzen bestimmt und alle Daten wurden auf $\mu = 0$ normalisiert. Die Halbwertsbreite ω der Gauß'schen-Kurve gibt die Gesamtähnlichkeit der jeweils verglichenen Gewebe an.

3.3.2 Identifizierte HLA-Klasse-I Peptide auf RCC377 und RCC399

Die im folgenden Kapitel besprochenen Peptide stammen allesamt aus der Analyse der Nierenzellkarzinome RCC377 und RCC399, es wurde jeweils Tumor, Metastase und Normalgewebe analysiert.

Insgesamt konnten 142 Peptide identifiziert werden, 74 davon auf RCC377, 68 auf RCC399; dabei wurde nur eine definierte Peptidsequenz auf beiden Geweben gefunden: Hierbei handelt es sich um das aus Phosphatidylinositolglycan stammende Peptid DTDHYFLRY, das sowohl auf dem Tumorgewebe von RCC377 als auch von RCC399, vorkam. Es konnte dem auf beiden Geweben vorkommenden HLA-Allotyp A*01 zugeordnet werden. Das zugehörige Protein spielt eine Rolle in der Biosynthese des GPI-Ankers, der hauptsächlich auf der Zelloberfläche von Blutzellen für die Proteinbindung zuständig ist [310].

Tabelle 20 zeigt, dass ein Großteil der identifizierten Sequenzen aus den Tumoren der untersuchten Gewebe stammen. Auf Tumor und Metastase bzw. Normalgewebe konnten für RCC377 hingegen nur 20 bzw. 2 Peptide identifiziert werden. Für RCC399 waren es 7 bzw. 2. Auf RCC377 konnten 16 Peptide analysiert werden die nur auf Metastasengewebe vorkamen, nur 3 Peptide konnten ausschließlich auf Normalgewebe gefunden werden. Nur auf Metastasengewebe bzw. Normalgewebe konnten für RCC399 3 bzw. 2 Peptide identifiziert werden.

Tab. 20: Anzahl identifizierter Peptidsequenzen auf RCC377 und RCC399, aufgeschlüsselt nach Herkunft aus Tumor-, Normal- oder Metastasengewebe. Pep., Peptide; T, Tumor; N, Normalgewebe; M, Metastase.

Gewebe	Identifizierte Peptidsequenzen			
	gesamt	Pep. nur auf T	Pep. auf T u. M bzw. T u. N	Pep. nur auf M bzw. N
RCC 377	74			
T vs. M		38	20	16
T vs. N		69	2	3
RCC 399	68			
T vs. M		58	7	3
T vs. N		64	2	2

Tabelle 21 zeigt alle identifizierten, durch Tumor, Metastase und Normalgewebe präsentierten Peptide. Diese lassen sich in drei Gruppen einteilen, auf die im Folgenden genauer eingegangen wird:

Die erste und zugleich größte Gruppe von Peptiden entstammt Proteinen des normalen und grundlegenden Zellstoffwechsels, hauptsächlich also konstitutiv in den meisten Körperzellen exprimierten Strukturproteinen, Enzymen und Rezeptoren. Diese Peptide repräsentieren klassische „Selbstpeptide“ und sind im Hinblick auf eine tumorspezifische Immuntherapie irrelevant. Proteine, die besonders häufig als Quelle von HLA-präsentierten Peptiden identifiziert werden konnten, sind β -Actin (ACTB), Myosin light Chain (MYL6), Aldolase A (ALDOA), Vimentin (VIM), Hämoglobin β (HBB) sowie HLA Klasse I-Moleküle u.v.a.. Das Präsentations- bzw. Expressionsmuster all dieser Proteine war, hinsichtlich einer relevanten Überexpression bzw. -präsentation unauffällig. Eine Ausnahme stellt lediglich die Aldolase A dar, deren Peptid ALSDHHIYL eine signifikante Überpräsentation auf Tumorgewebe von RCC377 zeigte.

Die zweite Gruppe umfasst neue und klassische Peptide aus etablierten, tumorassoziierten Antigenen des Nierenzellkarzinoms, Peptide aus z.B. Catenin β , Adipophilin (Adipose differentiation-related protein, ADFP) sowie aus Apolipoprotein (APOL). Die Proteine dieser Gruppe sind in der Literatur als Quellen immunogener Peptide beschrieben, einige dieser Peptide kamen bereits in Vakzinierungsstudien zum Einsatz.

In der dritten Gruppe finden sich Peptide und deren Quellproteine, die noch nicht als tumorassoziierte Antigene des Nierenzellkarzinoms bekannt sind, deren Präsentations- bzw. Expressionsschema in dieser Arbeit jedoch eine solche Tumorassoziation in allen oder in individuellen Tumoren bzw. Metastasen nahe legt. Diese beiden Gruppen werden eingehender im Kapitel 3.3.3 besprochen. Als Beispiele dieser Gruppe seien u.a. das CD151 und das Tumorprotein p53 genannt.

Peptide aus Gruppe 2 und 3 konnten in manchen Fällen zwar auch auf Normalgewebe gefunden werden, allerdings war die beschriebene Überpräsentation bzw. Überexpression stets nur auf Tumor- bzw. Metastasengewebe gegeben.

Tab. 21: Identifizierte Peptidsequenzen aus Tumor, Metastase und Normalgewebe von RCC377 und RCC399. Gensymbole und Gennamen können auf www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez gefunden werden. Den Liganden wurde eine HLA Typisierung anhand der Ankeraminosäuren zugeteilt (www.syfpeithi.de).

Sequenz	Gen-Name	Entrez Gene ID	HLA
AASKERSGVSL	Histone 1, H1c	3006	n.a.
AELRHVMTNL	Calmodulin 1 (phosphorylase kinase, delta)	801	B*50
ALATLIHQV	COP 9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 7A (Arabidopsis)	50813	A*02
ALFKHILLY	Dopey family member 2	9980	A*03
ALKNPPINTK	Actin related protein 2/3 complex subunit 6, 16 kDa	10092	A*03
ALNELLQHV	Talin 1	7094	A*02
ALPSRILLWK	Matrix-remodelling associated 8	54587	A*03
ALSDHHIYL	Aldolase A fructose-biphosphate	226	A*02
APARLFALL	Syndecan 4 (amphiglycan, ryudocan)	6385	B*07
APRALLLL	Major histocompatibility complex class I, C	3107	B*07

APRGLEPIAI	Aquaporin 9	366	n.z.
APRPPPKPM	Ribosomal protein S26	6231	B*07
ARALMLQGVDL	Heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)	3329	fr.
ASERGRLLY	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1	216	A*01
ATDYHVRVY	Fibronectin type III domain, containing 3B	64778	A*01
ATLKWILENK	General transcription factor II, i	2969	A*03
AVNAHSNILK	Ubiquitin-conjugating enzyme E2G 2	7327	A*03
AVSGAVNDSIKAI	Ecotropic viral integration site 1	2122	n.z.
DNSEGLTLLDLL	Platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide	5156	n.z.
DTDHYFLRY	Collagen-like tail subunit of asymmetric acetylcholine	8292	A*01
EAFVRHIL	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase C-4 to C-12 straight chain	34	B*08
ELHRVDLVL	Mannosyl (beta-1,4)-glycoprotein beta-1,4- N-acetylglucosaminyltransferase	4248	A*02
ERIFSQHLQ	Pitriysin metallopeptidase 1	10531	n.z.
EVGMVEEVVEV	Hypothetical protein	730227	A*02
FGEHLLESDF	Crystallin alpha B	1410	n.z.
FGLPRLPEE	Heat shock 27kDa protein 1	3315	B*08
FPNIPGKSL	Degenerative spermatocyte homolog 1, lipid desaturase	8560	B*07
FRLGNVL	Hemoglobin, beta	3043	n.z.
FRVGNVQEL	Collagen alpha 3 type	1293	n.z.
FVHDLVLYL	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	1026	A*02
FVQMMTAK	Calmodulin (phosphorylase kinase delta)	801	A*03
GPRGWLVL	Complement component 1, q subcomponent, A chain	712	n.z.
GSHSMRYFF	Major histocompatibility complex class I	3105	Art.
GVHGGLINK	Profilin 1	5216	A*03

HEYPWILSA	Coatomer protein complex subunit alpha	1314	B*50
HLLLLMIHV	Pleckstrin homology domain containing, family M (with RUN domain) member 2	23207	A*02
HSEYHTLLY	Histone deacetylase 5	10014	A*01
IADMGHLKY	Proliferating cell nuclear antigen	5111	A*01
IESRTLAI	Adipose differentiation-related protein	123	B*50
IGVSVPIPVIGL	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2C	3358	n.z.
ILLSHLH	CHK 1 checkpoint homolog	1111	A*02
IPRAALLPLL	HtrA serine peptidase 1	5654	B*07
IREVPLNTIIF	Serpin peptidase inhibitor, clade C (antithrombin), member 1	462	n.z.
IRSQAIHQL	Lysyl-t-RNA synthetase	3735	n.z.
KEAPPMEKP	Ribosomal protein S15	6209	B*50
KEFPGFLEN	S100 calcium binding protein A10 (annexin II ligand, calpactin I, light polypeptide (p11))	6281	B*50
KIADRFLLY	LIM domain only 4	8543	A*03
KIIAFVLEGK	Trans-golgi network protein 2	10618	A*03
KLFDHAVSKF	Acyl-CoA synthetase long chain family member 4	2182	A*03
KLLNYAPLEK	CD 151 molecule	977	A*03
KPAGPPGILAL	Myosin, heavy polypeptide 9, non-Muscle	4627	n.z.
KPNANRIAL	Lectin, galactoside-binding soluble 3 (galectin 3)	3958	B*07
KPRPIIPML	Jumonji domain containing 2B	23030	B*07
KVANIILSY	KIAA 1840	80208	A*03
KVLDTIMATKL	Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14	54625	n.z.
LDFGSLSNL	Aquaporin 6, kidney specific	363	A*02
LHLGYLPNQL	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptid	1653	n.z.
LKVLKADVVL	Interleukin 4 induced 1	259307	n.z.
LLDQGQLNKY	Clathrin, heavy polypeptide	1213	A*01
LLIENVASL	Ras homolog gene family, member A	387	A*02

LTDRGVMSY	Interferon regulatory factor 3	3661	A*01
LVFPSEIVGK	Cholinergic receptor, muscarinic 3	1131	A*03
LVVYPWTQRF	Hemoglobin beta	3043	Art.
MPRGVVVTL	RAB4A member RAS oncogene Family	5867	B*07
MQQKLVDQNIFS	Cathepsin D (lysosomal aspartyl peptidase)	1509	n.z.
MRFLAATFL	RAP 1A member of RAS Oncogene family pseudogene	5907	n.z.
MRYVASYLL	Ribosomal protein, large, P2	6181	B*08
NYIDPKDAEK	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)- like 2 (Human antigen B)	1993	n.z.
QEPSDVVNSL	Integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)	3673	B*50
QIFVKTLTGK	Ribosomal protein S27s	6233	A*03
QLLSVDGRSL	Myeloid/lymphoid leukemia, 4	4301	A*02
QTDKLEKELY	Signal recognition particle 72kDa	6731	A*01
RADGNFLLY	Uroplakin 3A	7380	A*01
RARDAILDAL	PYD and CARD domain containing	29108	n.z.
REHAPFLVA	Patatin-like phospholipase domain containing 2	57104	B*50
REIVHLQA	Tubulin beta 4	10382	B*50
RFQSSAVMAL	Histone 3 H3	8290	A*02
RGVDLDQLLDM	Ribosomal protein S15	6209	n.z.
RILSGVGTK	Ribosomal protein S11	6205	A*03
RIRDVINVF	Cyclin L1	57018	n.z.
RISPDRVY	Macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)	4282	n.z.
RLAQHITYV	MCM7 minichromosome maintenance deficient 7	4176	A*02
RLASTLVHL	Clathrin, heavy polypeptide (Hc)	1213	A*02
RLASYLDRV	CD28 molecule	940	A*02
RLDELGGVYL	Growth hormone releasing hormone	2691	A*02
RLIQESPTL	O-Acyltransferase 5	10162	n.z.

RLLDVLAPL	Collagen, type XVII, alpha 1	80781	A*02
RLLEVPVML	Isochorismatase domain containing 2	79763	A*02
RLLHEMILV	Coatamer protein complex, beta	1315	A*02
RLRLGGAAL	Pituitary tumor-transforming 1 interacting protein	754	n.z.
RLSFPNLFK	KIAA0415	9907	A*03
RLWGEPVNL	Ubiquitin specific peptidase 9, X linked	8239	A*02
RMSDLHVLL	Hyaluronan binding protein 2	3026	A*02
RPAQLHIGF	Ubiquitin-activating enzyme E1 (A1S9T and BN75 temperature sensitivity complementing)	7317	B*07
RPELVRPAL	Aldo-keto reductase family 1, member C4	1109	B*07
RPFERTITM	Syndecan binding protein	6386	B*08
RPILTIITL	Tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)	7157	B*07
RPIRQILYL	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 12	27335	B*07
RPLYKNIVL	ARP3 actin-related protein 3 homolog (yeast)	10096	B*07
RPRGLALVL	Caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 2)	835	B*07
RPRVTEPISA	Apolipoprotein L, 1, APOL 1	8542	B*07
RPSLRALL	Glutamate receptor, ionotropic, AMPA 4	2893	n.z.
RPSSVLRTL	Zinc finger protein 22 (KOX 15)	7570	B*07
RPTFRQMQL	Filamin A, alpha (actin binding protein 280)	2316	B*07
RPTLWAAAL	Insulin-like growth factor binding protein 1	3484	B*07
RVAPEEHPVL	Actin, beta	60	Art.
RVHAYIISY	EH-domain containing 2	30846	A*03
RVMAPRALL	Major histocompatibility complex class I, C	3107	n.z.
RVRDINEAF	Transcription factor 4	6925	n.z.
RVSDINFTL	SAPS domain family, member 3	55291	n.z.

SIDRTVMYY	Protein phosphatase 1B, magnesium-dependent, beta isoform	5495	A*01
SIIGRLLEV	Protein phosphatase 1, catalytic subunit alpha isoform	5499	A*02
SLIGHLQTL	Dual specificity phosphatase 5	1847	A*02
SLLTSSKGQLQK	Adipose differentiation-related protein	123	A*03
SLMHSEFILK	Dynein, light chain, roadblock-type 1	83658	A*03
SLWDRILFH	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	2180	A*03
SLYASSPGGVYATR	DNA (cytosine-5-) methyltransferase 2	1787	A*03
SPHPAIARL	Complement component 4A (Rodgers blood group)	720	B*07
SPRENILVSL	Charcot-Leyden crystal protein	1178	B*07
SPYQNIKIL	Spermine synthase	6611	n.z.
SRISLPLPNF	Vimentin	7431	n.z.
STDHIPILY	Glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 1	2673	A*01
STDPSVLGKY	Hairy and enhancer of split 1	3280	A*01
TGYGRPRQI	Transgelin	6876	B*08
TLADLVHHV	Transformation domain associated Protein	8295	A*02
TPDTGRILSKL	Phosphatidylinositol 4-kinase catalytic beta polypeptid	5298	B*07
TPRDLVLRSL	Myosin IG	64005	B*07
TSALPIIQK	Adipose differentiation-related protein	123	A*03
TSERTVLRVY	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptid 16	8449	A*01
TSYNKHIIQV	ATG2 autophagy related 2 homolog B (S. cerevisiae)	55102	A*02
TVDQVKDLY	Ceruloplasmin (ferroxidase)	1356	A*01
TVGLIRNL	Catenin beta 1	1499	A*02
VAKAVTQAL	Talin 1	7094	n.z.
VGILAKGLLL	KIAA1086	23217	n.z.
VGLIRNLAL	Catenin beta 1	1499	B*08
VLIDYQRNV	Neuromedin B receptor	4829	A*02

VLSSRLAFA	Major histocompatibility complex class II, DR beta 3	3125	A*02
VLVDRTIYI	Heat-responsive protein 12	10247	A*02
VLYDRVLKY	Signal recognition particle 68 kDa	6730	A*03
VMALKKLL	Transportin 3	23534	n.z.
VPFRHLLL	CD4 Rezeptor	920	B*08
VPRPVLRALSF	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide ²⁴	57062	n.z.
VTYVPVTTFKNL	Ribosomal protein L31	6160	n.z.
VYIDRVRSLS	Hemoglobin beta	3043	n.z.
YALPHAILRL	Actin, beta	60	A*02
YIIELWFAF	ATPase	51761	A*02
YLRPPSF	Crystallin alpha B	1410	Fr.
YSIITPNILRL	Complement component 3	718	n.z.

Sequenzen von neuen, zuvor noch nicht beschriebene Peptiden, sowie Sequenzen die nicht eindeutig zugeordnet werden konnten, wurden anhand des Vergleichs mit dem synthetischen Peptid verifiziert. Abbildung 13 zeigt eine solche Verifizierung für TVGLIRNL, ein neu identifiziertes Peptid aus *Catenin beta*. Das graue, obere Spektrum zeigt das experimentelle Peptid, das weiße untere Spektrum zeigt das synthetisch hergestellte Peptid. Beide Spektren sind näherungsweise deckungsgleich, kleinere Abweichungen lassen sich durch Messungenauigkeiten erklären.

Abb. 13: Beispiel für die Verifikation eines identifizierten experimentellen LC/MS-Spektrums (A) mittels Sequenzierung des entsprechenden synthetischen Peptids (B). Verifiziert wurde die Sequenz TVGLIRNL aus *Catenin beta*.

3.3.3 Vergleich der Einzelpeptide auf Tumor und Normalgewebe bzw. Tumor und Metastase, auf m-RNA Expressions- und HLA-Präsentationsebene

Im Rahmen dieser Dissertation wurde zum ersten Mal die differentielle Präsentation einzelner HLA-Liganden auf unterschiedlichen Geweben (Tumor, Normal- und Metastasengewebe) des Nierenzellkarzinoms untersucht. Dies bietet die Möglichkeit, direkt mögliche Liganden für eine Immuntherapie zu identifizieren. Aus diesem Grund wurden zunächst alle auf RCC377 und RCC399 analysierten MHC-Klasse-I Peptide auf eine Überpräsentation auf HLA-Level untersucht. Hierbei wurde den Peptiden spezielle Achtung geschenkt, die später Angriffspunkte einer Immuntherapie darstellen könnten, da sie auf Tumorgewebe, auf Metastasengewebe oder auf beiden überpräsentiert waren. Erst im zweiten Schritt wurde die mRNA-Expression der Peptide in den unterschiedlichen Geweben nach demselben Schema untersucht.

Im nun folgenden Kapitel sollen MHC-Klasse-I Peptide besprochen werden die eine signifikante Überpräsentation bzw. -expression auf Tumorgewebe, auf Metastasengewebe oder auf beiden zeigen. Als signifikant galt der zuvor (3.3.1.1, 3.3.1.2) berechnete Grenzwert der Präsentations- bzw. Expressionsverhältnisse, der den höchsten 10% der Präsentation/Expression entsprach (xTOP 10%). Für RCC377 lag der xTOP10%-Wert auf HLA-Liganden-Ebene für den Vergleich Tumor- und Normalgewebe bei +/- 1,82 und für den Vergleich Tumor- und Metastasengewebe bei +/- 1,13. Auf mRNA-Ebene lag er für den Vergleich Tumor- und Normalgewebe bei +/- 1,27 und für den Vergleich Tumor- und Metastasengewebe bei +/- 1,02. Für RCC399 lag der xTOP10%-Wert auf HLA-Liganden-Ebene für den Vergleich Tumor- und Normalgewebe bei +/- 2,73 und für den Vergleich Tumor- und Metastasengewebe bei +/- 2,40. Auf mRNA-Ebene lag er für den Vergleich Tumor- und Normalgewebe bei +/- 1,5 und für den Vergleich Tumor- und Metastasengewebe bei +/- 1,38. Wie bereits im Gesamtvergleich der Peptide, wurden auch hier die Präsentations- bzw. Expressionsverhältnisse logarithmiert. Die Tabellen 22 A-C und 23 A-C zeigen die jeweils überexprimierten bzw. überpräsentierten Peptide. Die Peptidverhältnisse, die in

der jeweiligen Untertabelle für die angegebene Fragestellung von Bedeutung sind, wurden hervorgehoben. Aufgrund der Division und Logarithmierung sprechen im Vergleich Tumor und Normalgewebe bzw. Tumor und Metastasengewebe besonders hohe positive Werte für eine Überpräsentation bzw. –expression des Peptids auf Tumorgewebe, während besonders hohe negative Werte im Vergleich Tumor und Metastasengewebe für eine Überpräsentation bzw. –expression des Peptids auf der Metastase sprechen.

Die diskutierten Peptide werden, wie zuvor besprochen eingeteilt in:

1. Selbstpeptide, die zwar Überpräsentation- oder –expression zeigen, aber bei denen es keinen Hinweis auf Tumorassoziation gibt,
2. in bekannte tumorassoziierter Antigene des Nierenzellkarzinoms und
3. bisher unbekannte Peptide und deren Quellproteine, die möglicherweise als neue tumorassoziierte Antigene klassifiziert werden können.

3.3.3.1 Überpräsentierte (HLA) Peptide auf Tumor und Metastase

Im Rahmen dieser Arbeit zeigten 14 der analysierten Peptide eine signifikante Überpräsentation auf Tumor- und Metastasengewebe im Vergleich zum Nierennormalgewebe. Davon wurden 11 auf RCC377 und 3 auf RCC399 identifiziert.

Für vier dieser Peptide (AASKERSGVSL aus *histone 1, H1c* (HIST1H1C), KVANIILSY aus *KIAA1840* (KIAA1840), TSERTVRLRY aus *DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 16* (DEAH16) und ALFKHILLY aus *dopey family member 2* (DOPEY2)) konnte in der bestehenden Literatur keinerlei Hinweis auf eine Tumorassoziation gefunden werden. Während HIST1H1C, DEAH16 und KIAA1840 als klassische Selbstpeptide mit Bedeutung für Proteininformation als RNA-Helicase, bzw. als Transmembranprotein gelten, ist die Funktion von DOPEY2 noch nicht hinreichend geklärt; ein definitiver Beweis für eine tumorassoziation im Nierenzellkarzinom muss durch weitere Untersuchungen erbracht werden. Es ist allerdings zu beachten, dass DOPEY2 auch auf mRNA-Ebene eine 7- bzw. 25- fache Überexpression auf Tumor- bzw. Metastasengewebe, im Vergleich zum Normalgewebe zeigt und auch, im

Vergleich zu anderen menschlichen Normalgeweben, auf dem Nierenzellkarzinom überexprimiert ist (Abb. 14A)

Im Verlauf dieser Untersuchung konnten zum ersten Mal für Peptide aus *adipose differentiation related protein* (ADFP) und aus *apolipoprotein L-1* (APOL1) gezeigt werden, dass sie nicht nur auf mRNA-Level eine Überexpression auf Tumor- und Metastasengewebe des Nierenzellkarzinoms zeigen sondern auch auf HLA-Ebene. Es handelt sich hierbei um zwei bekannte, bereits in Impfstudien eingesetzte tumorassoziierte Antigene des Nierenzellkarzinoms, deren Einsatz als Impfvaccine aufgrund unserer Ergebnisse gerechtfertigt scheint. Es konnten insgesamt zwei Peptide aus ADPF (TSALPIIQK, SLLTSSKGQLQK) sowie zwei Liganden aus APOL1 (IESRTLAI, RPRVTEPISA) sequenziert werden, wobei es sich bei RPRVTEPISA um einen völlig neuen Liganden dieses Proteins handelt, der auf den HLA-Allotyp B*07 passt.

Insgesamt konnten 8 der überpräsentierten Peptide als neue potenzielle tumorassoziierte Antigene des Nierenzellkarzinoms identifiziert werden:

Calmodulin 1 (CALM1), aus dem AELRHVMTNL identifiziert wurde, spielt eine Rolle in der Entwicklung von Gliomen, eine Überexpression von *CD4* (CD4), aus dem VPFRHLLL identifiziert wurde, wird in der Literatur mit Kopf-Hals-Karzinomen und Mammakarzinomen in Verbindung gebracht [311, 312]

GVHGGLINK aus *profilin 1* (PFN1) und IPRAALLPLL aus *HtrA serine peptidase 1* (HTRA1) wurden in der Literatur als mögliche Tumorsuppressoren beschrieben [313-315]. Wohingegen eine Überexpression der Quellproteine von LHLGYLPNQL aus *DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 1* (DEAD1) in Retinoblastom- und Neuroblastomzellen, von KIADRFLLY aus *LIM domain only 4* (LMO4) in Pankreas- und Mammakarzinomen, sowie von APARLFALL aus *syndecan 4* (SDC4) in Mammakarzinomen beschrieben wurde [316-318]. SDC4 zeigt zusätzlich eine Überexpression auf mRNA-Ebene in Tumor- und Metastasengewebe im Vergleich zum Normalgewebe, allerdings keine signifikante Überexpression zu anderen menschlichen Normalgeweben.

Als besonders interessanter Kandidat für die Immuntherapie kann RPILTIITL aus *tumor protein p53* (TP53) genannt werden. Sowohl das oben beschriebene

LMO4, als auch TP53, sind bereits bekannte Onkogene und werden in der Diskussion genauer betrachtet.

Tab. 22: HLA Liganden aus RCC377 und RCC399 mit signifikanten Unterschieden auf HLA Präsentationsebene.

A, HLA Liganden, die eine hohe Präsentation auf Tumor und Metastasengewebe im Vergleich zu Normalgewebe zeigen.

B, HLA Liganden die eine hohe Präsentation auf Metastasengewebe im Vergleich zum Tumorgewebe zeigen.

C, HLA Liganden, die eine Überpräsentation auf Tumorgewebe, aber nicht auf Metastasen, zeigen.

Pep T/M, \log_2 HLA Liganden Verhältnis (T/M); Pep T/N, \log_2 HLA Liganden Verhältnis (T/N); RNA T/M, \log_2 RNA Verhältnis (T/M); RNA T/N, \log_2 RNA Verhältnis (T/N); n.z., nicht zugeteilt. Die Spalte, die für die jeweilige Betrachtung von Bedeutung ist, wurde fettgedruckt.

Gensymbole und Gennamen können in Tabelle 21 gefunden werden sowie auf www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez. Den Liganden wurde eine HLA Typisierung anhand der Ankeraminosäuren zugeteilt (www.syfpeithi.de).

Gen-symbol	Sequenz	Pep T/N	Pep T/M	RNA T/N	RNA T/M	HLA	Gewebe
DDX1	LHLGYLPNQL	3.51	-1.04	-0.60	0.30	n.z.	RCC377
ADFP	SLLTSSKGQLQK	3.25	0.07	2.80	-0.20	A*03	RCC377
CALM1	AELRHVMTNL	3.15	0.18	0.82	-0.49	B*50	RCC399
HIST1H1	AASKERSGVSL	2.92	-0.02	-0.69	1.52	n.z.	RCC377
C							
CD4	VPFRHLLL	2.86	-0.67	0.10	1.70	B*08	RCC399
DHX16	TSERTVLRVY	2.83	0.65	1.38	-1.10	A*01	RCC399
PFN1	GVHGGLINK	2.62	0.06	0.91	-0.20	A*03	RCC377
HTRA1	IPRAALLPLL	2.40	0.51	1.18	0.00	B*07	RCC377
SDC4	APARLFALL	2.23	-1.28	-1.81	-1.31	B*07	RCC377
TP53	RPILTIITL	2.10	0.30	1.10	0.70	B*07	RCC377
KIAA184	KVANIILSY	2.09	0.33	0.41	-0.10	A*03	RCC377
0							
DOPEY2	ALFKHILLY	2.06	0.22	2.80	0.40	A*03	RCC377
LMO4	KIADRFLLY	2.04	0.11	-1.52	-1.11	A*03	RCC377
APOL1	RPRVTEPISA	1.87	0.19	2.00	-0.60	B*07	RCC377

Tab. 22 A

3.3.3.2 Überpräsentierte (HLA) Peptide auf Metastasengewebe

Sechs Peptide aus den analysierten Geweben zeigten eine Überpräsentation auf Metastasengewebe im Vergleich zum Tumor- und Normalgewebe, vier aus RCC377, zwei aus RCC399.

Für jedes Quellprotein dieser hier identifizierten Peptide wurden Literaturverweise im Bezug auf Tumorprogression und Metastasierung gesucht. Für FPNIPGKSL aus *degenerative spermatocyte homolog 1, lipid desaturase* (DEGS1) konnte keinerlei Tumor- bzw. Metastasenassoziation in der vorhandenen Literatur gefunden werden, es gilt als klassisches Selbstpeptid. DEGS1 zeigt allerdings auch eine Überexpression auf dem Metastasengewebe von RCC377, eine Metastasenassoziation bei Nierenzellkarzinomen sollte aus diesem Grund weiter untersucht werden.

SLMHSFILK aus *dynein, light Chain, roadblock-type 1* (DYNLRB1) und RARDAILDAL aus *PYD and CARD domain containing* (PYCARD), welches zusätzlich auch eine signifikante Überexpression auf Tumor- und Metastasengewebe von RCC377 zeigt, gelten als Tumorsuppressoren [319, 320], während eine Überexpression des Quellprotein von RLLEVPVML, *isochorismatase domain containing 2* (ISOC2) den Tumorsuppressor p16IMK4a hemmt und so zur Tumorgenese beiträgt [321]. Eine eindeutige Metastasenassoziation konnte ausschließlich für QEPSDVVNSL aus *intergrin, alpha 2* (ITGA2) und KLLNYAPLEK aus *CD151* (CD151) gefunden werden, wobei CD151 zusätzlich auch eine Überexpression auf der Metastase von RCC377 zeigt. Beide werden im Diskussionsteil dieser Arbeit detailliert besprochen.

Gen-symbol	Sequenz	Pep T/N	Pep T/M	RNA T/N	RNA T/M	HLA	Gewebe
DYNLRB1	SLMHSFILK	-0.49	-3.64	0.07	-0.10	A*03	RCC377
ISOC2	RLLEVPVML	-2.80	-3.19	-0.40	-0.38	A*02	RCC399
ITGA2	QEPSDVVNSL	0.92	-2.75	-2.10	0.39	B*50	RCC399
PYCARD	RARDAILDAL	0.54	-1.38	1.50	0.29	n.z.	RCC377
DEGS1	FPNIPGKSL	0.42	-1.37	0.20	-1.20	B*07	RCC377
CD151	KLLNYAPLEK	0.12	-1.20	0.40	-0.50	A*03	RCC377

Tab. 22 B

3.3.3.3 Überpräsentierte (HLA) Peptide nur auf Tumorgewebe

Insgesamt zeigten 10 der, im Rahmen dieser Arbeit analysierten Peptide, eine Überpräsentation auf dem Tumor (im Vergleich zu Normal- und Metastasengewebe), wovon zwei auf RCC377 und acht auf RCC399 identifiziert wurden.

Ein Großteil dieser Peptide musste als Selbstpeptide eingeordnet werden, da in der vorhandenen Literatur keinerlei Hinweis auf eine Tumorassoziation ihrer Quellproteine zu finden war. Hierzu gehörten ALSDHHIYL aus *aldolase A* (ALDOA), das schon in früheren Arbeiten als typisches Selbstpeptid des Nierenzellkarzinoms identifiziert wurde, ALATLIHQV aus *COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 7A* (COPS7A), RLASTLVHL aus *clathrin heavy polypeptide* (CLTC), ALNELLQHV aus *talin 1* (TLN1) und ATLKWILENK aus *general transcription factor II, i* (GTF2I). Auch für FRVGNQEL aus *collagen type VI, alpha 3* (COL6A3) konnte in der Literatur kein Hinweis auf maligne Tumorassoziation gefunden werden, allerdings bietet es sich aufgrund der bekannten Überexpression in benignen, tenosynovialen Riesenzelltumoren [322] und der zusätzlichen Überexpression auf mRNA-Ebene (Tumorgewebe von RCC399) für weitere Untersuchungen an.

Aus *Catenin beta 1* (CTNNB1), einem für das Kolonkarzinom bekannten tumorassoziierten Antigen, konnten im Rahmen dieser Arbeit zwei Peptide identifiziert werden: VGLIRNLAL und das zuvor unbekanntes TVGLIRNL; beide passen auf den HLA-Allotyp A*02. Obwohl neuere Studien auch eine Überexpression von Catenin beta 1 auf Nierenzellkarzinomen beschrieben haben [323], konnte auf dem hier untersuchten Tumorgewebe nur eine signifikante Überpräsentation auf HLA-Ebene nicht auf mRNA-Ebene gezeigt werden.

Drei der auf dem Tumorgewebe überpräsentierten Peptide konnten potentiellen neuen tumorassoziierten Antigenen zugeordnet werden. SIIGRLLEV aus *protein phosphatase 1, catalytic subunit alpha isoform* (PPP1CA), für das eine Überexpression im Bezug auf allgemeine Tumorentstehung und Progression, sowie eine Überexpression in oralen Plattenepithelkarzinomen beschrieben wurde [324]; NYIDPKDAEK aus *embryonic lethal abnormal vision Drosophila-like 2 Hu antigen B* (ELAVL2) das eine Überexpression im Blut von Patienten

mit kleinzelligem Bronchialkarzinom zeigt [325] und ASERGRLLY aus *aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1* (ALDH1A1) für das eine Überexpression in Pankreas-, Leber- und Bronchialkarzinomen beschrieben wurde [326-328].

Gen-symbol	Sequenz	Pep T/N	Pep T/M	RNA T/N	RNA T/M	HLA	Gewebe
ALDOA	ALSDHHIYL	4.13	1.83	0.60	3.62	A*02	RCC399
COL6A3	FRVGNVQEL	3.43	2.01	2.10	1.59	n.z.	RCC399
PPP1CA	SIIGRLLEV	3.40	2.45	0.37	1.18	A*02	RCC399
COPS7A	ALATLIHQV	3.22	3.90	-0.70	0.00	A*02	RCC399
ELAVL2	NYIDPKDAEK	3.19	3.45	0.10	-0.38	n.z.	RCC399
CLTC	RLASTLVHL	3.10	2.15	-0.40	-1.29	A*02	RCC399
CTNNB1	VGLIRNLAL	2.77	2.02	-0.20	0.29	B*08	RCC399
TLN1	ALNELLQHV	2.75	2.38	-0.40	2.19	A*02	RCC399
GTF2I	ATLKWILENK	2.34	1.85	0.79	-0.89	A*03	RCC377
ALDH1A1	ASERGRLLY	2.05	1.68	0.70	0.70	A*01	RCC377

Tab. 22 C

3.3.3.4 Überexprimierte (mRNA) Peptide auf Tumor und Metastase

Es konnten insgesamt 12 Peptide identifiziert werden, die eine Überexpression sowohl auf Tumor als auch auf der Metastase, im Vergleich zum Normalgewebe zeigten. Jeweils sechs dieser Peptide stammten aus RCC377 und RCC399.

Für den Großteil dieser Peptide war in der bestehenden Literatur noch keine Tumorassoziation beschrieben. So handelt es sich bei LDFGSLSNL aus *aquaporin 6* (AQP6), bei RMSDLHVLL aus *hyaluronan binding protein 2* (HABP2), RVHAYIISY aus *EH-domain containing 2* (EHD2) und SPYQNIKIL aus *spermine synthetase* (SMS) mit großer Wahrscheinlichkeit um Selbstpeptide, denen erst durch weitere Experimente eine Tumorassoziation zugeordnet werden könnte. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich weder eine Überpräsentation auf HLA-Ebene noch eine Überexpression im Vergleich zu anderen Körpergeweben. Auch für ALFKHILLY aus *dopey family member 2* (DOPEY2) konnte in der Literatur keinerlei Tumorassoziation nachgewiesen werden, allerdings legt die zuvor beschriebene zusätzliche Überpräsentation

auf Tumor- und Metastasengewebe eine weitere Untersuchung dieses Peptids nahe.

GPRGWLVL aus *complement component 1, q subcomponent, A chain* (C1QA) und REHAPFLVA aus *patatin-like phospholipase domain containing 2* (PNPLA2) werden zwar zu den Selbstpeptiden gezählt, trotzdem ist zu beachten, dass C1QA im Bezug auf Mammakarzinom-Metastasen in der Literatur erwähnt wird [329] und PNPLA2 in Retinoblastomzellen sowie in Tumor und Metastase von RCC399 gegenüber allen anderen Körpergewebe zeigt eine Überexpression zeigt.

Zwei schon bekannte tumorassoziierte Peptide des Nierenzellkarzinoms zeigten ebenfalls eine Überexpression auf Tumor und Metastase, SLLTSSKGQLQK aus *adipose differentiation related protein* (ADFP) und IESRTLAI A ein neues Peptid aus *Apolipoprotein L-1* (APOL1); sie wurden bereits bei den Ergebnissen der überpräsentierten Peptide erläutert und werden in der Diskussion ausführlich besprochen.

Vier der überexprimierten Peptide konnten als neue potentielle tumorassoziierte Antigene identifiziert werden. TVDQVKDLY aus *ceruloplasmin* (CP), das für Ovarial-, Mamma-, Kolon- und Prostatakarzinome als Tumormarker diskutiert wird [330-332] und VLIDYQRNV aus *exportin 1* (NMBR), das eine Überexpression auf zahlreichen Tumoren unter anderem Cervixkarzinom zeigt und mit dem Apoptoseinhibitor Survivin interagiert [333]. Desweiteren RARDAILDAL aus *PYCARDPYD and CARD domain containing* (PYCARD), das schon in Kapitel 3.3.3.2 besprochen wurde und DNSEGLTLLDLL aus *platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide* (PDGFRA), das in Ovarial-, Mamma-, Kolon- und Bronchialkarzinomen überexprimiert ist. Auf die Rolle von PDGFRA wird in der Diskussion noch ausführlicher eingegangen.

Tab. 23: HLA Liganden aus RCC377 und RCC399 mit signifikanten Unterschieden auf mRNA Expressionsebene.

A, HLA Liganden, die eine hohe Expression auf Tumor und Metastasengewebe im Vergleich zu Normalgewebe zeigen.

B, HLA Liganden, die eine hohe Expression auf Metastasengewebe im Vergleich zum Tumorgewebe zeigen.

C, HLA Liganden, die eine Überexpression auf Tumorgewebe aber nicht auf Metastasen zeigen.

Pep T/M, log₂ HLA Liganden Verhältnis (T/M); Pep T/N, log₂ HLA Liganden Verhältnis (T/N); RNA T/M, log₂ RNA Verhältnis (T/M); RNA T/N, log₂ RNA Verhältnis (T/N); n.z., nicht zugeteilt. Die Spalte, die für die jeweilige Betrachtung von Bedeutung ist, wurde fettgedruckt.

Gen-symbol	Sequenz	Pep T/N	Pep T/M	RNA T/N	RNA T/M	HLA	Gewebe
CP	TVDQVKDLY	-0.37	1.5	4.4	0.6	A*01	RCC377
C1QA	GPRGWLVL	0.14	0.2	3.09	-0.4	n.z.	RCC377
DOPEY2	ALFKHILLY	2.06	0.22	2.8	0.4	A*03	RCC377
ADFP	SLLTSSKGQLQK	3.25	0.07	2.8	-0.2	A*03	RCC377
AQP6	LDFGSLSNL	0.98	1.33	2.51	0.6	A*02	RCC399
NMBR	VLIDYQRNV	0.46	0.61	2.44	0.4	A*02	RCC399
HABP2	RMSDLHVLL	-0.93	1.8	2.08	-0.09	A*02	RCC399
PNPLA2	REHAPFLVA	-1.07	2.42	2.04	0	B*50	RCC399
PDGFRA	DNSEGLTLLDLL	1.07	1.62	1.96	-2	n.z.	RCC399
EHD2	RVHAYIISY	-1.39	0.04	1.89	-0.8	A*03	RCC377
SMS	SPYQNIKIL	-0.49	-3.64	1.89	-1.22	n.z.	RCC377
ADFP	IESRTLAI	0.33	1.3	1.51	0.42	B*50	RCC399
PYCARD	RARDAILDAL	0.54	-1.38	1.5	0.29	n.z.	RCC377

Tab. 23 A

3.3.3.5 Überexprimierte (mRNA) Peptide auf Metastasengewebe

12 der in dieser in dieser Arbeit identifizierten Peptide zeigten eine Überexpression auf dem untersuchten Metastasengewebe, vier davon stammten aus RCC399, acht aus RCC377.

Auch hier konnte für fünf der Peptide keine eindeutige Tumorassoziation anhand der vorhandenen Literatur festgestellt werden. RLIQESPTL aus *membrane bound O-acyltransferase domain containing 5* (MBOAT5), IGVSVIPVIGL aus *5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2C* (HTR2C), MRYVASYLL aus *ribosomal protein, large, P2* (RPLP2) und VLVDRTIYI aus *heat-responsive protein 12* (HRSP12) können zu den klassischen Selbstpeptiden gezählt werden. FPNIPGKSL aus *degenerative spermatocyte homolog 1, lipid desaturase* (DEGS1) wurde wegen seiner zusätzlichen

Überpräsentation auf Metastasengewebe schon in Kapitel 3.3.3.2 besprochen. Ein definitiver Ausschluss der Tumorassoziation dieser Peptide kann letztlich nur durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Ein neues Peptid (KPNANRIAL) dessen Quellprotein lectin, galactoside-binding soluble 3 (galectin 3) (LGALS3) schon lange in der Literatur eine Rolle in der Tumorprogression von zahlreichen Tumoren (Kolon-, Schilddrüsenkarzinom und Hirntumore) spielt, gehört ebenfalls zu den im Metastasengewebe überexprimierten Peptiden und wird in der Diskussion genauer besprochen.

Fünf der im Metastasengewebe überexprimierten Peptide stellen potentielle Kandidaten für tumorassoziierte Antigene dar: LTDRGVMSY aus *interferon regulatory factor 3* (IRF3), der als Tumorsuppressor beschreiben wurde [334], RPELVRPAL aus *aldo-keto reductase family 1, member C1 (dihydrodiol dehydrogenase 1; 20-alpha (3-alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase)* (AKR1C4), das in Leber-, Bronchial- und Endometriumkarzinomen überexprimiert ist [335-337], ARALMLQGVDL aus *heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)* (HSPD1), das als Marker für das Prostatakarzinom verwendet wird und im metastasierten Kolonkarzinom überexprimiert ist [338], STDPSVLGKY aus *hairy and enhancer of split 1* (HES1), von dem eine Überexpression im Mammakarzinom bekannt ist und APARLFALL aus Syndecan 4 (SDC4), das in progredienten aggressiven Mammakarzinomen überexprimiert ist [316, 339].

Gen-symbol	Sequenz	Pep T/N	Pep T/M	RNA T/N	RNA T/M	HLA	Gewebe
RPLP2	MRYVASYLEL	-0.05	0.26	-4.01	-2.61	B*08	RCC399
MBOAT5	RLIQESPTL	-1.82	0.2	-0.04	-1.9	n.z.	RCC399
IRF3	LTDRGVMSY	0.11	-1.9	-0.2	-1.8	A*01	RCC399
AKR1C4	RPELVRPAL	0.08	0.29	-3.09	-1.71	B*07	RCC377
HSPD1	ARALMLQGVDL	0.17	-0.84	0.77	-1.7	Fr.	RCC377
HTR2C	IGVSVPIPIVIGL	-0.46	0.25	-0.07	-1.6	n.z.	RCC377
CCNL1	RIRDVINVF	2.76	1.57	0.32	-1.55	n.z.	RCC377
HRSP12	VLVDRTIYI	0.48	0.29	-1.11	-1.5	A*02	RCC399
HES1	STDPSVLGKY	0.57	1.02	-1.44	-1.44	A*01	RCC377
SDC4	APARLFALL	2.23	-1.28	-1.81	-1.31	B*07	RCC377
LGALS3	KPNANRIAL	0.74	0.02	1.09	-1.23	B*07	RCC377
DEGS1	FPNIPGKSL	0.42	-1.37	0.2	-1.2	B*07	RCC377

Tab. 23 B

3.3.3.6 Überexprimierte (mRNA) Peptide nur auf Tumorgewebe

Es konnten insgesamt vier Peptide analysiert werden, die eine Überexpression auf dem Tumorgewebe im Vergleich zu Normal- und Metastasengewebe zeigten, zwei davon auf RCC377 und zwei auf RCC399.

Die Quellproteine von drei der analysierten Peptide werden in der Literatur ausschließlich als Selbstpeptide dargestellt. Hierzu gehören SLWDRLIFH aus *acyl-CoA synthetase long-chain family member 1* (ACSL1), RPSLRALL aus *glutamate receptor, ionotropic, AMPA 4* (GRIA4) und FRVGNVQEL aus *collagen type VI alpha 3* (COL6A3), wobei COL6A3 aufgrund der zusätzlichen, zuvor beschriebenen Überpräsentation im Tumorgewebe noch weiter untersucht werden muss.

Durch die Interaktion seines Quellproteins *transformation/transcription domain associated protein* mit dem *Tumorprotein p53* kann das Peptid TALDLVHHV als Kandidat für ein neues, tumorassoziiertes Antigen des Nierenzellkarzinoms angesehen werden [340].

Gen-symbol	Sequenz	Pep T/N	Pep T/M	RNA T/N	RNA T/M	HLA	Gewebe
COL6A3	FRVGNVQEL	3.43	2.01	2.1	1.59	n.z.	RCC399
ACSL1	SLWDRLIFH	0.12	-0.84	1.59	0.88	A*03	RCC377
TRRAP	TLADLVHHV	-0.65	1.35	1.58	0.8	A*02	RCC399
GRIA4	RPSLRALL	0.2	-1.47	1.39	0.56	n.z.	RCC377

Tab. 23 C

Alle auf mRNA-Ebene überexprimierten Peptide wurden auch im Bezug auf ihre Expression auf Normalgeweben im menschlichen Körper untersucht, da für eine Immuntherapie nur Peptide in Betracht kommen, die nicht in signifikanten Mengen auf gesunden Normalgeweben vorkommen. Eine signifikante Überexpression auf Tumor- und Metastasengewebe des Nierenzellkarzinoms im Vergleich zu allen menschlichen Normalgeweben ergab sich für ADFP, APOL1 (Abb. 15 A,C), DOPEY2, CP, C1QA, AQP9 und PNPLA2 (Abb. 14 A, B, C, D, E).

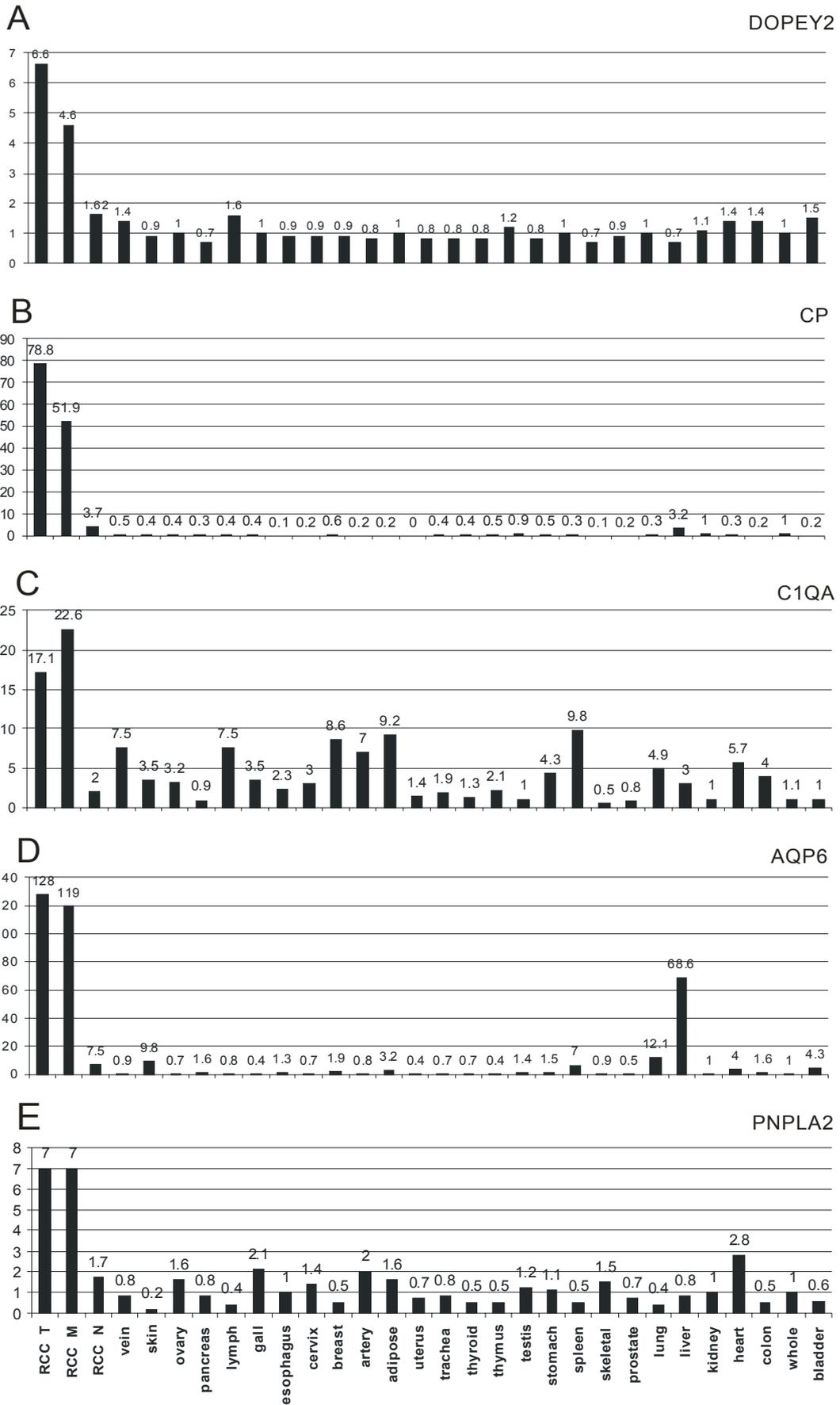


Abb. 14: Relative mRNA-Expressionswerte für:

A) Dopey family member 2 (DOPEY2),

B) Ceruloplasmin (CP),

C) Complement component 1, q subcomponent alpha polypeptide (C1QA),

D) Aquaporin 6 (AQP6) und

E) Patatin-like-phospholipase A2 (PNPLA2).

mRNA-Expression für menschliche Normalgewebe, sowie für Tumor, Metastase und Normalgewebe des Nierenzellkarzinoms auf dem das entsprechende Peptid identifiziert wurde.

Alle in diesen drei Kapiteln besprochenen Kandidaten für neue tumorassoziierte Antigene stehen in ihrer Bedeutung hinter denjenigen, die aufgrund des HLA-Präsentationsvergleichs ermittelt wurden, da eine mögliche Immuntherapie nicht das Genom, sondern die auf der Zelloberfläche präsentierten Peptide zum Ziel haben würde.

Abbildung 15 zeigt exemplarisch für fünf der identifizierten tumorassoziierten Antigene den Vergleich zwischen HLA-Präsentationsverhältnis und mRNA-Expression. Im oberen Bereich der Grafik ist das jeweilige HLA-Peptidpärchen im Vergleich Tumor- und Normalgewebe bzw. Metastasengewebe dargestellt. Es wurde jeweils die Intensität des Monoisotopenpeaks von Metastase bzw. Normalgewebe auf 100% festgelegt und für das Tumorgewebe hochgerechnet. Im unteren Bereich der Abbildung wird die mRNA-Expression des Peptids im Gewebe gezeigt, aus dem es sequenziert wurde, sowie seine Expression in allen menschlichen Normalgeweben. Peptide aus APOL1 und ADFP zeigen für Tumor- und Metastasengewebe sowohl eine Überpräsentation, als auch eine Überexpression. ADFP (A) ist auf Tumor und Metastase im Vergleich zum Nierennormalgewebe 9,5-fach überpräsentiert und im Vergleich zu allen menschlichen Normalgeweben ca. 4,5-fach überexprimiert.

Auch APOL1 (C) ist auf HLA-Ebene 3,6-fach überpräsentiert und auf dem Metastasengewebe auch im Vergleich zu allen Normalgeweben 2-4-fach überexprimiert. Auf dem Tumorgewebe kann außer im Vergleich zu Lunge, Leber und Magen auch eine 2-fache Überexprimierung im Vergleich zu den Normalgeweben festgestellt werden. P53 und CD151 stellen Erfolg versprechende Kandidaten für eine Immuntherapie dar. P53 zeigt eine 4,9 fache Überpräsentation auf Tumor- und Metastasengewebe im Vergleich zum

Normalgewebe, wohingegen keine Überexpression auf mRNA-Ebene vorhanden war.

CD151 zeigt eine leichte Überpräsenation auf Tumorgewebe im Vergleich zu Normalgewebe und eine Überpräsenation von 3,2 auf Metastasengewebe. Auf mRNA-Ebene zeigt sich eine 2-fache Überexpression des Peptids auf dem Metastasengewebe im Vergleich zum Normalgewebe, allerdings findet sich keine signifikante Überexpression im Vergleich zu den anderen Normalgeweben.

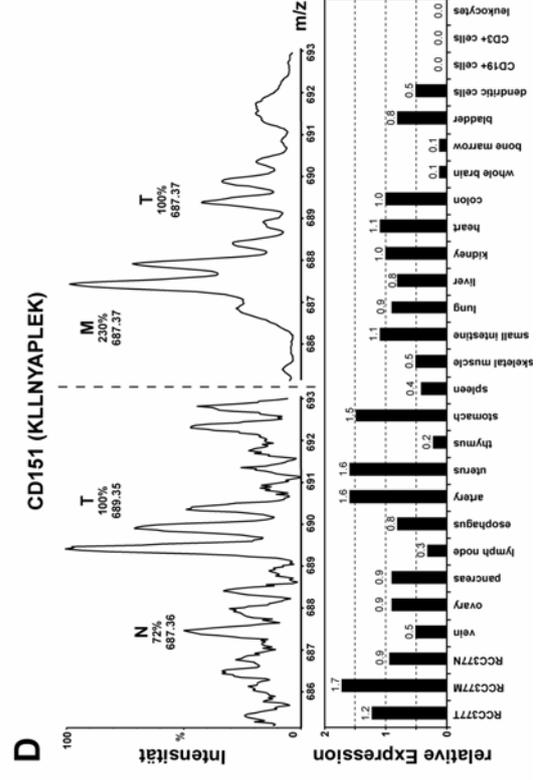
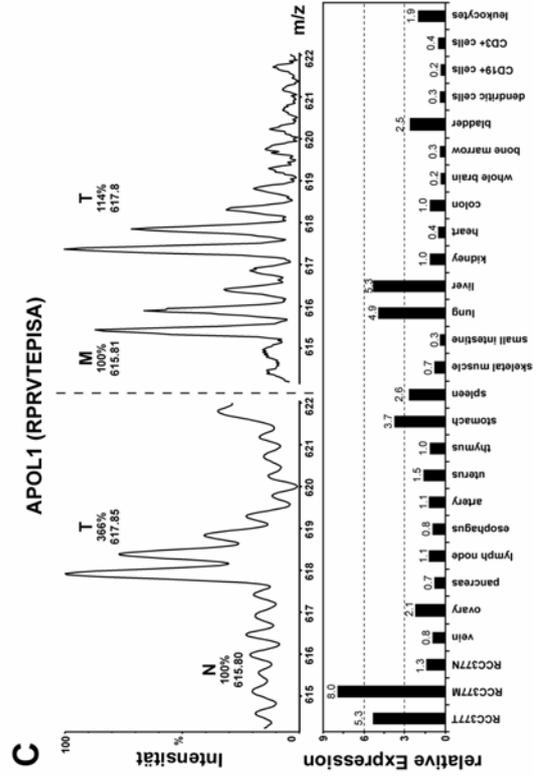
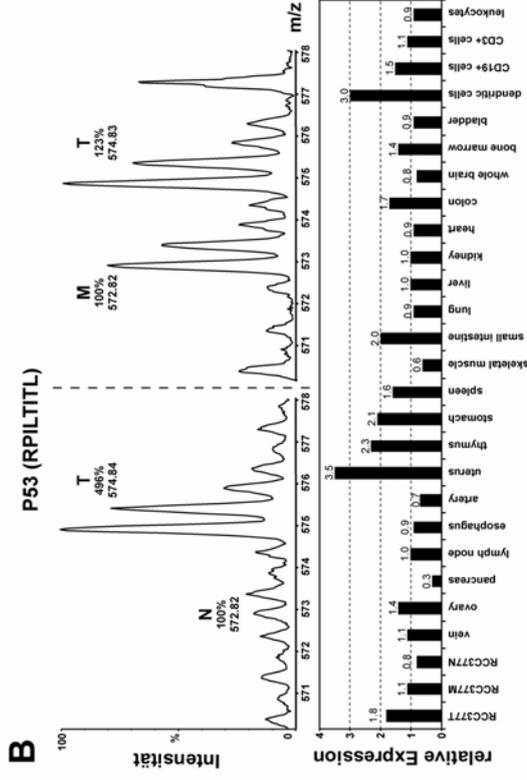
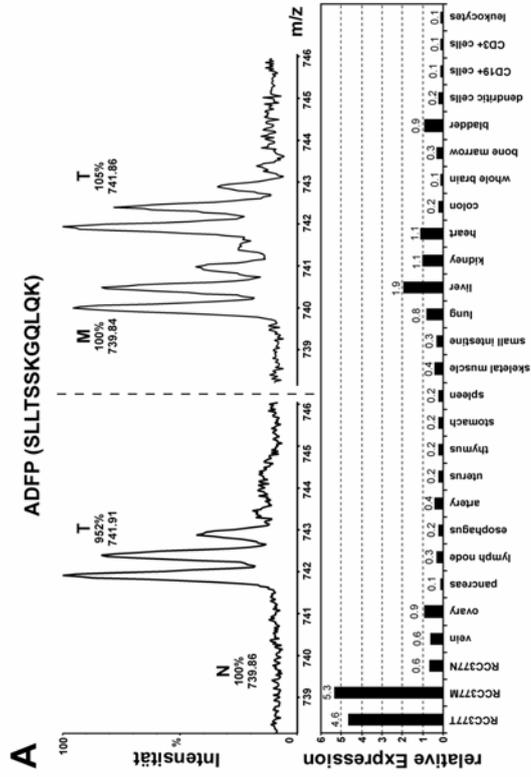


Abb. 15: Daten der HLA-Präsentation und mRNA-Expression für ausgewählte tumorassoziierte Antigene.

A) Adipose differentiation related protein (ADFP, SLLTSSKGQLQK),

B) Tumor protein p53 (TP53, RPILTIITL),

C) Apolipoprotein 1 (APOL1, RPRVTEPISA),

D) CD151 (CD151, KLLNYAPLEK)

Oberes Element: Quantitative Peptidanalyse mittels H₄NIC/D₄NIC modifizierten Peptidpaaren. Für die relative Quantifizierung wurde die Intensität des ersten Isotopenpeaks des mit leichtem H₄NIC modifizierten Peptides (Metastase/Normalgewebe) auf 100% festgelegt und das entsprechende Verhältnis für das mit schwerem D₄NIC modifizierten Peptid (Tumor) berechnet. Unteres Element: Genexpression der entsprechenden Antigene auf menschlichen Normalgeweben, sowie Tumor (T), Metastase (M) und Nierennormalgewebe (N) der untersuchten RCCs.

3.4. Ergebnisse der T-Zell Experimente

Die Frage nach der Immunogenität eines Peptids, d.h. nach seiner Wirksamkeit als tumorassoziiertes T-Zell-Epitop lässt sich *in vitro* in letzter Konsequenz nur in T-Zell-Stimulationsversuchen klären.

Das prinzipielle experimentelle Vorgehen zur Erbringung eines solchen Nachweises ist in Abbildung 16 dargestellt. Methodisch wurde in dieser Arbeit die Aufreinigung CD8⁺-T-Zellen und dendritischer Zellen (DCs), die Stimulation von T-Zellen mit spezifischem Peptid auf MHC/anti-CD28-Microbeads und auf DCs sowie die FACS-Analyse mit Peptid:HLA-Tetrameren und Interferon- γ -Staining durchgeführt. Dementsprechend sind auch nur diese Arbeitsgänge im Kapitel *Material und Methoden* beschrieben.

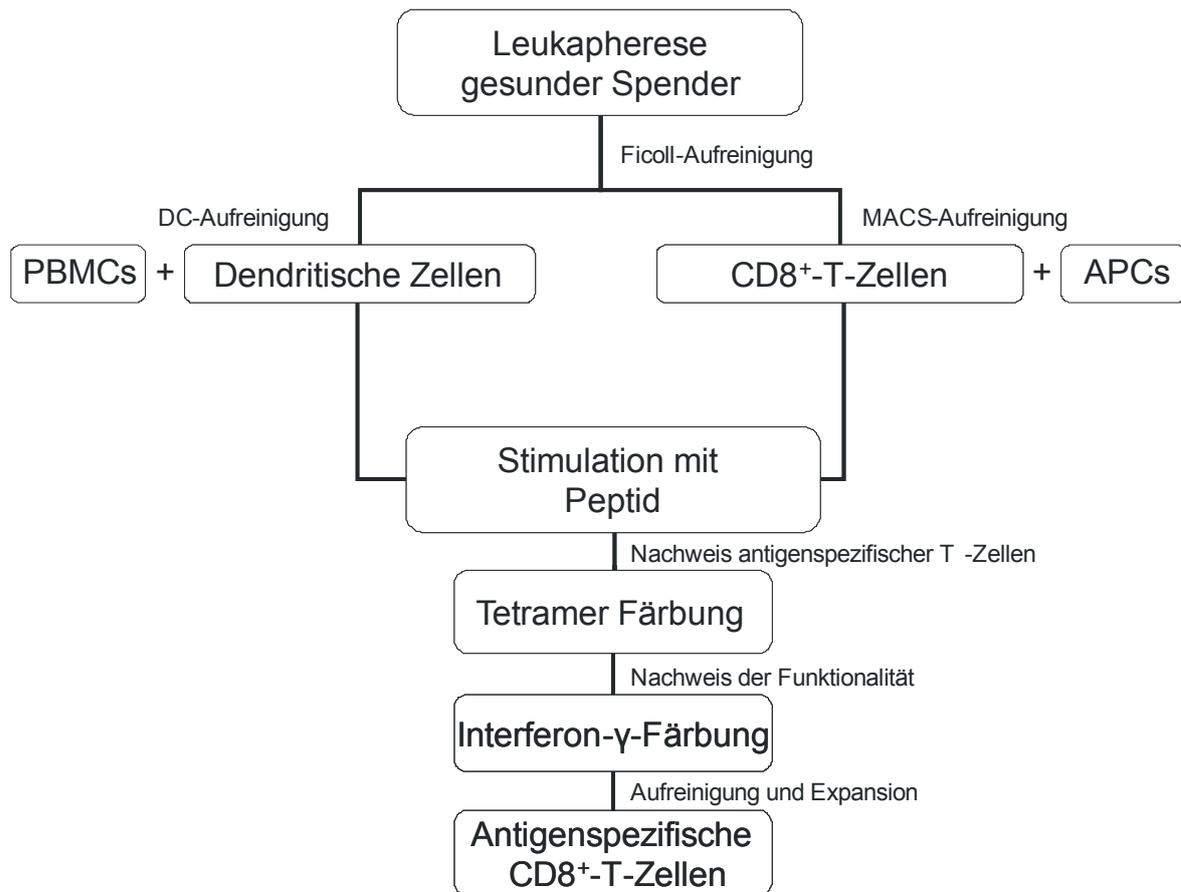


Abb. 16: Prinzipielles methodisches Vorgehen zur Erbringung des Nachweises der Immunogenität eines massenspektrometrisch sequenzierten HLA-Liganden.

Methodisch wurde in dieser Arbeit die Aufreinigung von CD8⁺-T-Zellen und dendritischen Zellen (DCs), die Stimulation von T-Zellen mit spezifischem Peptid auf MHC/anti-CD28-Microbeads und auf DCs sowie die FACS-Analyse und die Interferon- γ -Färbung mit Peptid:HLATetrameren durchgeführt.

Die in dieser Arbeit durchgeführten T-Zellexperimente wurden weitgehend parallel und damit unabhängig von den zuvor beschriebenen quantitativen und qualitativen Peptiduntersuchungen des Nierenzellkarzinoms durchgeführt.

Obwohl sich für zahlreiche in dieser Arbeit vorgestellte Peptide aufgrund der differentiellen Präsentations- und Expressionsanalysen, aber auch aufgrund der Literatur der Verdacht auf eine Tumor- bzw. Metastasenassoziation für das Nierenzellkarzinom ergaben, konnte aus dem zuvor genannten Grund nur für 2 der aufgeführten Peptide die Immunogenität mittels T-Zellstimulation durchgeführt werden. Für einige der gezeigten Peptide konnten andere

Arbeitsgruppen den Nachweis einer Tumorassoziation bereits erbringen, so zum Beispiel für das Peptid aus *Adipophilin* [341].

Insgesamt wurden in der vorliegenden Arbeit 5 Peptide in T-Zellstimulationsversuchen auf ihre Immunogenität hin getestet:

1. Das HLA-A*02 präsentierte Peptid TVGLIRNL aus *Catenin beta* (CTNNB1), einem Genprodukt, das in zahlreichen Karzinomen eine deutliche Überexpression zeigt, unter anderem, durch aktuelle Studien bestätigt, im Nierenzellkarzinom (siehe Kapitel 3.3.3.3).
2. Das HLA-A*03 präsentierte Peptid SLLTSSKGQLQK aus *adipose differentiation related protein* (ADFP), das schon zuvor als tumorassoziiertes Antigen des Nierenzellkarzinoms beschrieben wurde und bereits in ersten Immuntherapiestudien zum Einsatz kommt (siehe Kapitel 3.3.3.1, 3.3.3.4).
3. Das HLA-A*03 präsentierte Peptid TSALPIIQK, das ebenfalls aus *adipose differentiation related protein* (ADFP) stammt. Es wird auch in ersten Impfstudien getestet, ein definitiver T-Zellepitopbeweis konnte allerdings bis jetzt noch nicht erbracht werden.
4. Das HLA-A*02 präsentierte Peptid SVFAGVVGCV aus *guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3* (GUCY1A3), das ebenfalls bereits als tumorassoziiertes Antigen des Nierenzellkarzinoms beschrieben wurde und auch in ersten Impfstudien zum Einsatz kommt. Auch hier konnte bis jetzt kein definitiver Epitopnachweis erbracht werden.
5. Das HLA-A*02 präsentierte Peptid GLNEEIARV aus *kinetochore associated 2* (KNTC2), für das in der Literatur bereits erhöhte Expressionswerte im Nierenzellkarzinom [300] und zahlreichen anderen Tumoren beschrieben wurden. Daher wurde es auch schon als Prognosefaktor für Tumoren wie das Prostatakarzinom vorgeschlagen [342]. Innerhalb unserer Arbeitsgruppe wurde GLNEEIARV bereits mehrfach auf seine Immunogenität getestet, allerdings mit widersprüchlichen Ergebnissen, sodass eine erneute Untersuchung gerechtfertigt schien.

Da drei der untersuchten Peptide momentan in einer Impfstudie getestet werden, soll diese hier in einem kurzen Exkurs beschreiben werden:

SVFAGVVGV aus *guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3* (GUCY1A3), sowie SLLTSSKGQLQK und TSALPIIQK, beide aus *adipose differentiation related protein* (ADFP), werden momentan in einer prospektiv randomisierten Phase I/II-Studie zur adjuvanten antigenspezifische Immuntherapie von Patienten mit fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom mit Tumorassozierten Peptiden der Klinik für Urologie und des Interfakultären Institut für Zellbiologie der Universität Tübingen untersucht. In die Studie wurden Patienten mit fortgeschrittenem, jedoch noch nicht metastasiertem Nierenzellkarzinom aufgenommen. Die Immuntherapie erfolgt als adjuvante Therapie zur Prävention der Bildung sichtbarer Metastasen bei Hochrisikopatienten nach chirurgischer Resektion. Die Applikation der nierenzellkarzinomspezifischen Peptidvakzine erfolgte intradermal bzw. subkutan entsprechend den Applikationsformen der zwei Studienarme:

Studienarm 1: Intradermale Applikation der Peptidvakzine (Dosis: 300 µg pro Peptid) in Kombination mit Applikation von GM-CSF. Ziel ist es, durch gleichzeitige Gabe von Wachstumsfaktor GM-CSF eine stärkere Immunantwort als mit Peptiden alleine zu erzielen.

Studienarm 2: Subkutane Applikation der Peptidvakzine (Dosis: 300 µg pro Peptid) emulgiert in Montanide ISA-51. Ziel ist es, einen Depoteffekt auszulösen und somit eine stärkere Immunantwort als mit Peptiden alleine zu erzielen.

Die Vakzine wird zunächst 8x an den Tagen 0, 1, 2, 7, 14, 21, 35 und 63 (Studienarm 1), bzw. 6x an den Tagen 0, 7, 14, 21, 35 und 63 (Studienarm 2) verabreicht. Anschließend erfolgte ein Restaging (Tag 70) zur Evaluation des klinischen Verlaufs. Die Therapie wird bis zur dokumentierten Progression fortgesetzt, jedoch höchstens für 12 Monate nach Therapiebeginn. Das Staging wird alle 3 Monate wiederholt.

Da für die drei oben genannten Peptide noch nicht bewiesen wurde, dass es sich um T-Zell-Epitope des Nierenzellkarzinoms handelt, sollte der Nachweis im Rahmen dieser Dissertation erbracht werden.

Als Positivkontrollen in den T-Zellstimulationsversuchen wurden je nach HLA-Typisierung des Leukozyten-Spenders verschiedene bekanntermaßen immunogene Peptide verwendet:

T-Zellen von HLA-A*02-positiven Spendern wurden mit einem modifizierten Peptid

aus Melan-A (ELAGIGILTV) stimuliert, als Positivkontrollen für HLA-A*03-positive Spender dienten Peptide aus dem Influenzavirus (ILRGSVAHK). Bei beiden Peptiden handelt es sich um Epitope, gegen die sich in praktisch allen gesunden Spendern eines definierten HLA-Typs T-Zellen finden lassen.

Insgesamt wurden CD8⁺-T-Zellen von 8 verschiedenen gesunden Spendern auf ihre Reaktivität gegen die genannten Peptide getestet. Die T-Zellen zweier Spender wurden mit dendritischen Zellen stimuliert, alle anderen mit artifiziellen antigenpräsentierenden Zellen (MHC/anti-CD28-Microbeads). Mit den Peptiden aus *Catenin beta* und KNTC2 wurde jeweils nur einmal stimuliert, während T-Zellen von drei Spendern mit den beiden Peptiden aus ADFP und von 4 Spendern mit dem Peptid aus GUCY1A3 stimuliert wurden. Alle T-Zellen wurden aus Leukaphereseprodukten gewonnen, diese wurden jeweils vom Transfusionsmedizinischen Institut der Universität Tübingen bereitgestellt. Die HLA-Typisierungen und der CMV-Status der Spender, sowie die Peptide, mit denen jeweils stimuliert wurde, sind in Tabelle 24 dargestellt.

Tab. 22: Liste der Spender CD8+ T-Zellen und Peptide, mit denen diese Zellen jeweils stimuliert wurden.

Spender	HLA	CMV	Testpeptide (HLA)	Kontroll-peptide (HLA)	Präsen-tiert durch
1	A*02, B*13, B*14, Cw*06, Cw*08	+	- CTNNB1, TVGLIRNL (A*02); - GUCY1A3, SVFAGVVG (A*02)	Melan A, ELAGIGILTV (A*02)	DCs
2	A*02, B*07, B*44, Cw*02, Cw*07		- GUCY1A3, SVFAGVVG (A*02)	Melan A, ELAGIGILTV (A*02)	aAPCs
3	A*02, A*03, B*15, Cw*03, Cw*05		- GUCY1A3, SVFAGVVG (A*02)	Melan A, ELAGIGILTV (A*02)	aAPCs
4	A*01, A*30, B*08, B*15, Cw*07, Cw*03		- ADFP, SLLTSSKGQLQ K (A*03) - ADFP, TSALPIIQ (A*03)	Influenza, ILRGSVAHK (A*03)	aAPCs
5	A*03, A*31, B*07, B*55, Cw*03, Cw*07	+	- ADFP, SLLTSSKGQLQ K (A*03) - ADFP, TSALPIIQ (A*03)	Influenza, ILRGSVAHK (A*03)	aAPCs
6	A*02, A*03, B*52, B*60, Cw*03	-	- ADFP, SLLTSSKGQLQ K (A*03) - ADFP, TSALPIIQ (A*03)	Influenza, ILRGSVAHK (A*03)	DCs
7	A*01, A*02, B*07, B*08, Cw*7	+	- GUCY1A3, SVFAGVVG (A*02)	Melan A, ELAGIGILTV (A*02)	aAPCs
8	A*02, B*13, B*60, Cw*06	+	- KNTC2 GLNEEIARV (A*02)	Melan A, ELAGIGILTV (A*02)	aAPCs

Die Präparation der T-Zellen, die mittels einer Ficoll- Gradientenzentrifugation und einer MACS-Aufreinigung erfolgte, erbrachte für die Leukaphereseprodukte jeweils eine durchschnittliche Ausbeute von 6×10^8 CD8⁺-T-Zellen, für die Stimulation mit dendritischen Zellen konnten aus einem Leukaphereseprodukt jeweils ca. $2,5 \times 10^9$ DCs gewonnen werden.

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

Die Detektion epitopspezifischer CD8⁺-T-Zellen erfolgte durchflusszytometrisch mittels der Tetramer-/anti-CD8-Färbung. Bei positivem Ergebnis wurde zur Sicherung der Funktionalität dieser Zellen eine Interferon- γ -Färbung durchgeführt. Da es im Rahmen dieser Arbeit nicht gelang ein MHC-Tetramer für TVGLIRNL aus CTNNB1 herzustellen, erfolgte hier die Detektion epitopspezifischer T-Zellen direkt über eine Interferon- γ -Färbung.

In allen neun Versuchsansätzen konnten nach der fünfwöchigen Phase der Stimulation und Kultivierung lebende CD8⁺-Zellen im FACS nachgewiesen werden.

Die Analyse der CD8⁺-T-Zellen aus den Spendern 1, 4, 5 und 6 zeigte jedoch für die Positivkontrolle mit Melan A und Influenza-Peptiden keinen eindeutigen Nachweis epitopspezifischer T-Zellen, sie waren also negativ, was eine weitere Interpretation der Messungen streng genommen verbietet. Für die Testpeptide aus GUCY1A3, CTNNB1 und ADFP konnte in den genannten Spendern ebenfalls kein Hinweis auf epitopspezifische T-Zellen generiert werden. Leider gelang es uns in den gezeigten Versuchsreihen für Spender 1, 4, 5 und 6 also nicht, schlüssige Ergebnisse zu generieren und epitopspezifische T-Zellen nachzuweisen.

Für Spender 2,3,7 und 8 hingegen ließen sich in der Positivkontrolle mit Melan A Peptid epitopspezifische T-Zellen nachweisen.

2,1% der CD8⁺-T-Zellen aus Spender 2, 3,1% der Zellen aus Spender 3, 1,9% der Zellen aus Spender 8 und 2,1% der Zellen aus Spender 8 zeigten eine Eпитосpezifität für Melan A.

In den genannten Versuchsreihen ließen sich ebenso positive Nachweise auf epitopspezifische T-Zellen für das Testpeptid SVFAGVVGV aus GUCY1A3 erbringen. Für alle drei Versuchsreihen wurden daraufhin Interferon- γ -Färbungen durchgeführt, die allerdings nur eine unspezifische Interferon- γ -Produktion ergaben.

Für die T-Zellen aus Spender 8, die mit GLNEEIARV aus KNTC2 stimuliert wurden, ergab sich eine sehr fragliche Epitopspezifität mit nur ca. 0,08% epitopspezifischen Zellen; dies könnte durchaus auch für einen Artefakt sprechen. Leider war eine Interferon- γ -Färbung zur Verifizierung der Ergebnisse aufgrund der geringen Zellzahl in dieser Versuchsreihe nicht möglich.

Abbildung 17 und 18 zeigen exemplarisch die Ergebnisse der Tetramer und anti-CD8-Färbung (Abb. 17), sowie die Interferon- γ -Färbung (Abb.18). Beispielhaft für alle anderen mit SVFAGVVGV aus GUCY1A3 positiv getesteten Spender sollen in diesen Abbildungen die aus der Analyse des Spenders 3 gewonnenen Daten dargestellt werden.

Die *ex vivo*-Färbung (Abb. 17 B) entstand kurz nach der Aufreinigung der T-Zellen, also ohne Kultur und Stimulation. Alle anderen in den Abbildungen 17 und 18 gezeigten *dot-blots* spiegeln die Situation nach fünfwöchiger bzw. sechswöchiger (für die Interferon- γ -Färbung dürfen die Zellen, um eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden eine Woche nicht stimuliert worden sein) Kultur und Stimulation wider. Durch die MACS-Aufreinigung konnten CD8⁺ T-Zellen mit hohem Reinheitsgrad gewonnen werden (Abb. 17 B,C,D). Nach fünfwöchiger Stimulation mit MHC/Anti-CD28-Microbeads waren in allen Ansätzen lebende CD8⁺-Zellen nachweisbar. Für die Positivkontrollen Melan-A, HLA-A*02 (Abb. 17 C) wurde ein Gesamtanteil von 3,1% spezifischer CD8⁺-Zellen nachgewiesen. Gegen das Testpeptid SVFAGVVGV aus GUCY1A3 (Abb. 17 D) wurden ebenfalls epitopspezifische T-Zellen nachgewiesen (2,1%).

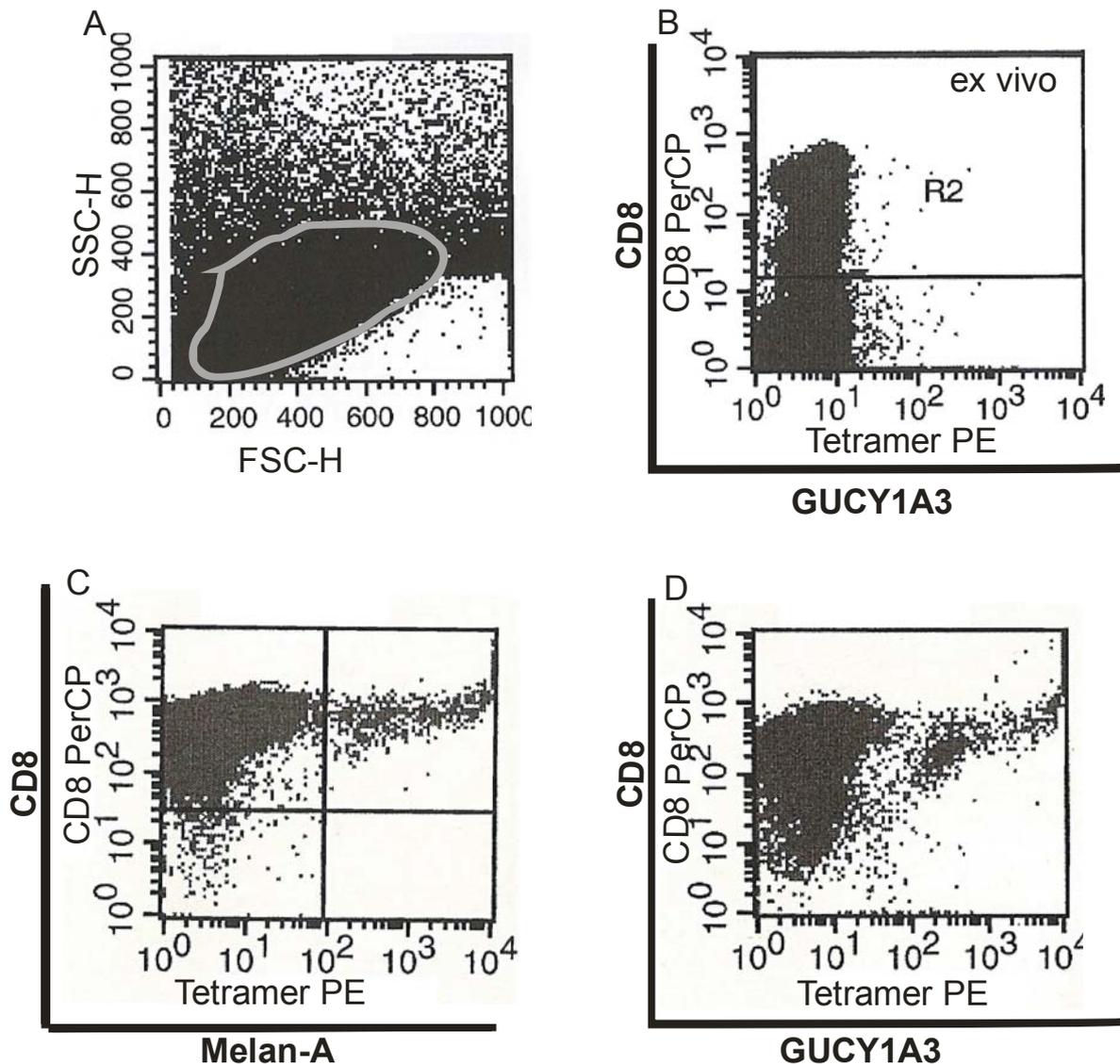
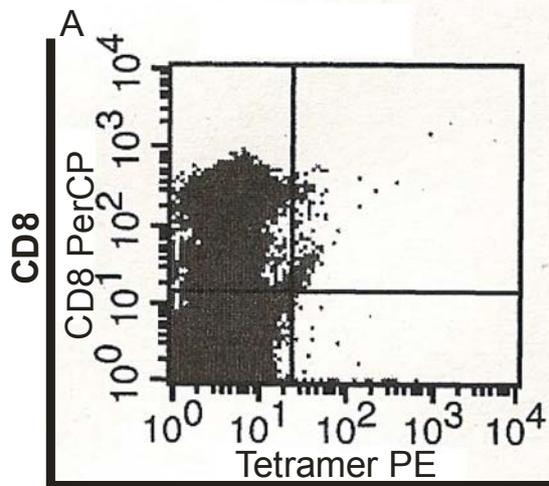


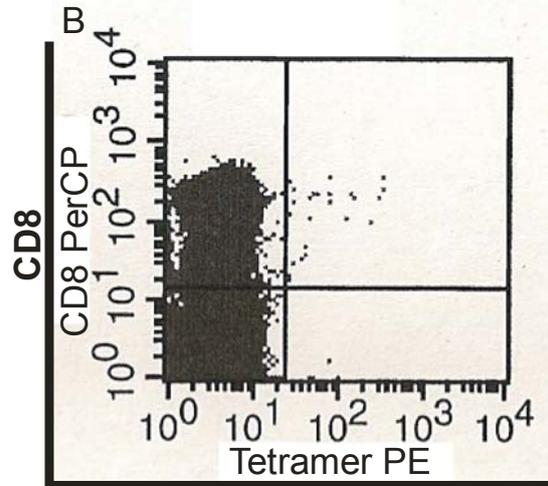
Abb. 17: Durchflusszytometrische Analyse des Spenders 3, Tetramer-/anti-CD8-Färbung. Detaillierte Beschreibung siehe Text.

Eine Verifizierung dieser Ergebnisse und ein Funktionalitätsnachweis der Zellen mittels Interferon- γ -Färbung gelang weder für das Kontrollpeptid aus Melan A, noch für das Testpeptid aus GUCY1A3 (Abb. 18).

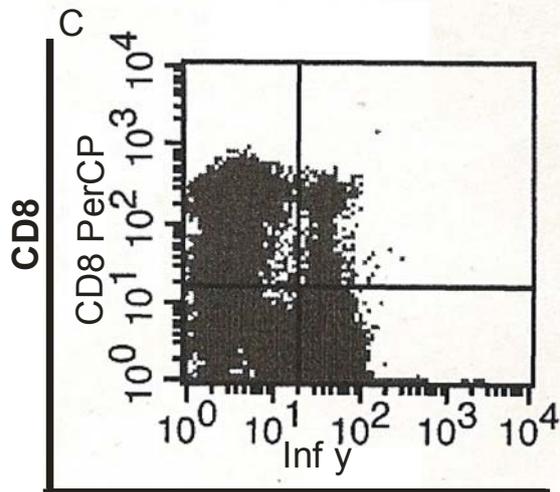
Für beide Peptide ließen sich bei dieser Färbung nur sehr geringe Mengen an epitopspezifischen T-Zellen detektieren (Abb. 18 A, B). Zwar zeigte sich für beide Versuchsreihen eine deutliche Interferon- γ -Produktion von CD8⁺-T-Zellen (Abb. 18 C, D) allerdings keine spezifische IFN- γ -Produktion von epitopspezifische T-Zellen (Abb. 18 E, F).



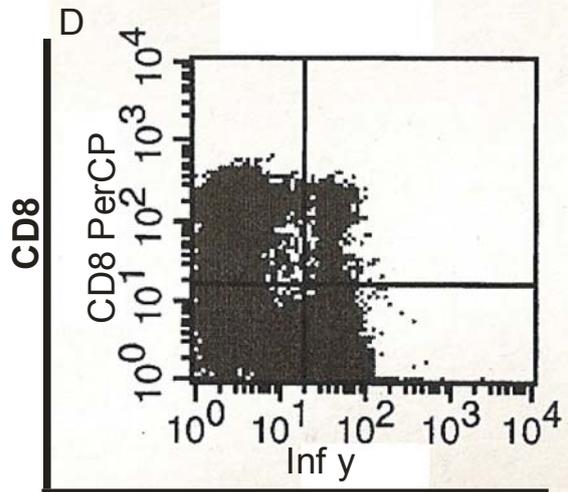
Melan A



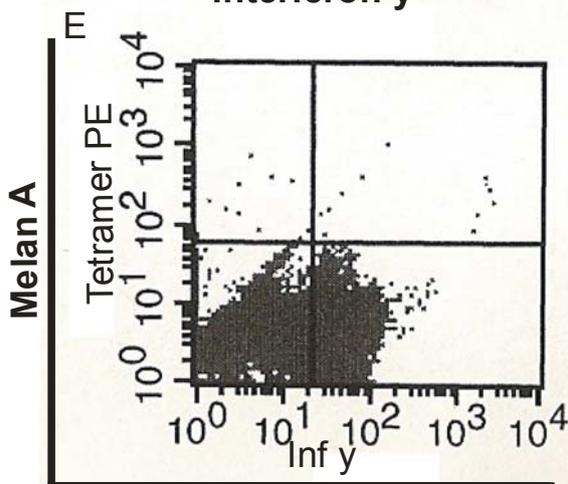
GUCY1A3



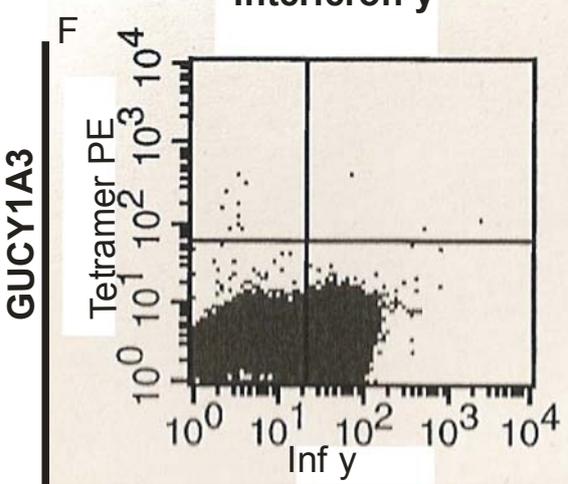
Interferon γ



Interferon γ



Interferon γ



Interferon γ

Abb. 18: Durchflusszytometrische Analyse des Spenders 3, Interferon- γ -Färbung. Detaillierte Beschreibung siehe Text.

Tabelle 25 zeigt zusammenfassend die Ergebnisse der T-Zell-Stimulationsversuche, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden.

Tab. 23: Ergebnisse der T-Zell-Experimente

+, antigenspezifische T-Zellen konnten nachgewiesen werden; - es konnten keine antigenspezifischen T-Zellen nachgewiesen werden; n.d., nicht durchgeführt.

Spender	Test/Kontrollpeptide	Tetramerfärbung	Interferon- γ -Färbung
1	- CTNNB1, TVGLIRNL;	n.d.	-
	- GUCY1A3, SVFAGVVG	-	n.d.
	- Melan A, ELAGIGILTV	-	n.d.
2	- GUCY1A3, SVFAGVVG	+	-
	- Melan A, ELAGIGILTV	+	-
3	- GUCY1A3, SVFAGVVG	+	-
	- Melan A, ELAGIGILTV	+	-
4	- ADFP, SLLTSSKGQLQK	-	n.d.
	- ADFP, TSALPIIQK	-	n.d.
	- Influenza, ILRGsvaHK	-	n.d.
5	- ADFP, SLLTSSKGQLQK	-	n.d.
	- ADFP, TSALPIIQK	-	n.d.
	- Influenza, ILRGsvaHK	-	n.d.
6	- ADFP, SLLTSSKGQLQK	-	n.d.
	- ADFP, TSALPIIQK	-	n.d.
	- Influenza, ILRGsvaHK	-	n.d.
7	- GUCY1A3, SVFAGVVG	+	-
	- Melan A, ELAGIGILTV	+	-
8	- KNTC2, GLNEEIARV	+ ?	n.d.
	- Melan A, ELAGIGILTV	+	n.d.

Die Gründe für das Fehlschlagen der Versuchsreihen, die weder für die Kontroll- noch auch für die Testpeptide positive Ergebnisse erbrachten, sowie der Interferon- γ -Färbung der für GUCY1A3 positiv getesteten T-Zellen, sind vielfältig; sie reichen von Problemen in der Synthese und Handhabung der

Peptide und der Microbeads, über Fehler in der Herstellung und Verwendung der Tetramere bis hin zu ungelösten Problemen in der Kultivierung und Färbung der CD8⁺-T-Zellen. Vor dem Hintergrund der Fülle der Fehlermöglichkeiten wurde auf eine weiterführende Evaluation des Versuchsprotokolls im Rahmen der vorliegenden Arbeit verzichtet.

Aufgrund der positiven Ergebnisse für SVFAGVVGV aus GUCY1A3 bei drei verschiedenen Spendern in der Tetramer-/anti-CD-8-Färbung wäre eine wiederholte Untersuchung dieses Peptids auf Epitopspezifität in T-Zell-Stimulationsversuchen wünschenswert.

4. Diskussion

4.1. Diskussion der Methoden und Ergebnisse der quantitativen HLA-Liganden Analyse

4.1.1 Diskussion der Methoden: Edmansequenzierung und Western Blotting

4.1.1.1. Verarbeitete Gewebeproben

Für eine erfolgreiche Aufarbeitung von Tumorgewebe ist in erster Linie eine ausreichend große Tumormasse nötig, um nach der Isolierung und Fraktionierung von MHC-Klasse-I-gebundenen Peptiden eine massenspektrometrisch messbare Menge an Liganden zu erhalten. In vorausgegangenen Arbeiten wurde diese Masse auf 5 g festgelegt [343, 344]. Diese Vorgabe konnte im Rahmen dieser Dissertation nicht immer erfüllt werden, da vor allem das Metastasengewebe oft nur in sehr geringen Mengen von 1-2 g vorlag. Bei 7 der 9 analysierten RCC-Patienten wog zumindest eine der analysierten Gewebeproben unter 5 g. Trotzdem konnten aus allen bearbeiteten Geweben HLA-Liganden isoliert werden. Dies dürfte vor allem auf die Abwandlung der Methode der Gewebezerkleinerung zurückzuführen sein. Die Zerkleinerung kleinster Gewebeproben mit dem Skalpell ergab eine weitaus höhere HLA-Ausbeute als das alleinige Zerkleinern mit einem Mixer.

Ebenso maßgeblich für die MHC-Ausbeute sind die zugesetzten Antikörpermengen, sowie ihre Bindungseigenschaft. Da die Bindungseigenschaften und damit die Funktionalität der Antikörper zum Teil stark variieren können, wurden diese in FACS-Analysen von Claudia Falkenburger untersucht.

Es wurde versucht die Zeitspanne zwischen operativer Gewebeentnahme und Einfrieren des Gewebes in flüssigem Stickstoff auf 5-10 min zu reduzieren, da in dieser Zeit die Proteine proteolytischer Aktivität ausgesetzt waren.

Die Gewebeentnahme aus dem operativen Präparat wurde unter makroskopischen Bedingungen durchgeführt, eine mikroskopische Abgrenzung von Tumor- und Normalgewebe bzw. Metastasen- und Normalgewebe fand

nicht statt. Normalgewebe wurde jeweils mit großem Abstand zum Tumorgewebe entnommen.

Obwohl anzunehmen ist, dass der Hauptteil aller in Tumor- und Metastasengewebe identifizierten Peptide aus RCC-Gewebe stammt, lässt sich aus oben genannten Gründen nicht ausschließen, dass auch Peptide aus Bindegewebe oder TILs (tumorinfiltrierende Lymphozyten) sequenziert wurden. Für die Entwicklung immuntherapeutischer Ansätze ist diese Tatsache allerdings nicht weiter von Bedeutung, da hierfür nur Peptide in Frage kommen, die auf HLA- und RNA-Ebene eine deutliche Überpräsentation- bzw. expression im Bezug zum Normalgewebe zeigen.

Bei allen analysierten Nierenzellkarzinomen handelt es sich um klarzellige RCCs, die vom Tubulusgewebe der Niere abstammen. Um möglichst korrespondierendes Normalgewebe zu erhalten wurden die Proben aus dem Kortex der Niere entnommen, da hier der Anteil an Tubulusgewebe mit 75% am höchsten ist.

4.1.1.2. Western Blotting

Die Quantifizierung von MHC-Klasse-I im Eluat mittels Western Blot ist eine mit relativ einfachen Mitteln durchführbare Methode der Quantifizierung, die zwar gute Ergebnisse liefert, jedoch sehr zeitaufwändig ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Quantifizierung der MHC-Menge anhand des β_2 -Mikroglobulins (12 kDa) durchgeführt.

Besonders schwierig gestaltete sich die Herstellung einer Eichreihe aus verschiedenen MHC-Monomerkonzentrationen, um genauere Aussagen über den MHC-Gehalt der Probe treffen zu können. Trotz zahlreicher Versuche gelang es nicht, eine zufriedenstellende Eichreihe zu erstellen, die eine zuverlässige Abschätzung der MHC-Menge erlaubte. Als Ursache hierfür kann am ehesten eine Verunreinigung der verwendeten MHC-Monomere, die in Harnstoffpuffer gelagert waren, vermutet werden.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Quantifizierung mittels Western Blot wie oben bereits beschrieben, nicht zur genauen Quantifizierung der HLA-Menge genutzt, sondern zur semiquantitativen Abschätzung des

Elutionsergebnisse der einzelnen Elutionschritte, sowie zum direkten Vergleich der eluierten HLA-Klasse-I-Peptide aus Tumor-, Normal- und Metastasengewebe.

4.1.1.3. Edmansequenzierung

Seit über 40 Jahren gehört die Edmansequenzierung zu den bedeutendsten Werkzeugen bei der Proteincharakterisierung [345]. Obwohl andere Methoden im Bezug auf Kosten und Routinegebrauch bei der Proteinanalyse der Edmansequenzierung heute überlegen sind, bleibt sie die effektivste Methode um N-terminale Aminosäuresequenzen zu identifizieren. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit die Sequenzierung nach Edman genutzt um die aus Tumor-, Normal- und Metastasengewebe gewonnene MHC-Menge exakt festzulegen.

Nach unserer Erkenntnis ist dies die erste Studie, die, mittels einer direkten Quantifizierungsmethode, die MHC-Menge auf der Zelloberfläche von Tumor-Normal- und Metastasengewebe vergleicht. Alle bereits existierenden Studien nutzen indirekte Methoden, wie die Immunfluoreszenz oder untersuchten die MHC-Klasse-I-Expression auf mRNA-Ebene [346-348].

Da in jedem Zyklus die N-terminale Aminosäure von allen in der Probe befindlichen Peptiden und Proteinen abgespalten wird, kommt es zu, im Laufe der Sequenzanalyse zunehmenden zu Überlagerungen und Hintergrundsignalen, die die Auswertung erschweren. Deswegen wurden nur die ersten sieben Aminosäuren der MHC-Klasse-I α -Kette (GSHSMRY) sequenziert und analysiert. Für die meisten Edmangeräte wird die pro Zyklus erreichte Peptidmenge, nach Abzug von Verlusten auf ca. 92-94% geschätzt [345]. So kann man beispielsweise davon ausgehen, dass nach 3 bzw. 7 Zyklen die durchschnittliche MHC-Menge noch 80% bzw. 65% ($94^3=83.1\%$, $0.94^7=64.8\%$) der initialen Menge beträgt.

Wie zuvor beschrieben wurden die quantitativen Bestimmungen auf den Konzentrationsanstieg des Histidins im 3. Zyklus fokussiert. Hierfür gibt es zwei Hauptgründe: Zum einen haben Kontrollmessungen mit festgelegten MHC-Menge gezeigt, dass der Konzentrationsanstieg von Histidin der reliabelste

Parameter für die Gesamt-MHC-Menge darstellt. Zum anderen wurde von mehreren Autoren gezeigt, dass der Berechnungsfehler umso größer ist je mehr unterschiedliche Aminosäuren für die Kalkulation der Peptidmenge herangezogen werden [345, 349, 350].

Des Weiteren ist das Quantifizierungsergebnis stets abhängig von Reaktionsbedingungen, Hydrophobizität, Peptidlänge und Kontamination durch Salze, Detergenzien und freie Aminosäuren. Um möglichst vergleichbare Bedingungen zu schaffen wurden Eluate, die von Geweben eines Patienten stammten, gemeinsam aufgetragen und ausgewertet.

Das Ziel der quantitativen Analyse war keinesfalls eine Methode zu etablieren, die exakte Aussagen über die absolute MHC-Klasse-I-Menge auf Tumorzellen trifft, sondern vielmehr relative Mengenangaben generiert, die vergleichbar sind zwischen verschiedenen Geweben. Eine Studie der „Edman Sequencing Research Group (ESRG) zeigte, dass die absoluten Peptidemengen ermittelt durch die Edmansequenzierung im Schnitt ca. 30% unter dem tatsächlichen Peptidgehalt der Probe liegt. Für den Vergleich der relativen Peptidmenge zwischen zwei Proben lag der relative Fehler in dieser Studie allerdings bei nur 6,8% [345].

Aus diesen Gründen scheint die Edmansequenzierung eine geeignete Methode für den direkten quantitativen Vergleich des MHC-Klasse-I-Gehalts auf der Zelloberfläche von Tumor-, Normal- und Metastasengewebe von RCC Patienten.

4.1.2 Diskussion der Ergebnisse der quantitativen Analyse

Im Rahmen dieser Dissertation konnten für alle analysierten Gewebeproben in Western Blot und Edmanabbau MHC-Klasse-I-Moleküle nachgewiesen werden. Der nachgewiesene MHC-Gehalt lag zwischen 10 und 6000pmol, und zeigte sich eindeutig abhängig von der bearbeiteten Gewebemasse (Tab. 17).

Dieses Ergebnis ist umso beachtlicher, wenn man bedenkt, dass ein Großteil der untersuchten Proben unter 5g wogen, und somit eigentlich als ungeeignet für die MHC-Extraktion galten. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass 5g keinesfalls als allgemein gültiger Grenzwert für die Immunpräzipitation gelten

kann; durch die sehr zeitaufwändige Zerkleinerung der Gewebe mit einem Skalpell scheint es möglich, schon aus Gewebeproben ab 1g Masse MHC-Moleküle zu extrahieren.

Obwohl die quantitative Analyse der gewonnenen MHC-Klasse-I-Menge in den meisten Arbeiten hauptsächlich der Methodenüberprüfung und Selektion der Proben für massenspektrometrischen Experimente dient, scheint eine genauere Betrachtung der quantitativen Ergebnisse dieser Arbeit interessant. Für die Entwicklung einer Immuntherapie steht vor allem die Peptidanalyse im Vordergrund, dennoch ist die Frage nach der Gesamt-HLA-Menge auf Tumor-, Normal- und Metastasengewebe als durchaus interessant anzusehen. Bis heute ist noch nicht klar wo, die kritische Grenze an pMHC-I-Komplexen auf der Zelloberfläche liegt, die zur Aktivierung von T-Zellen führt - Angaben variieren zwischen einigen Tausend und unter zehn pMHC-I-Komplexen [66]. Obwohl neue Untersuchungen zeigen, dass T-Zellen in der Lage sind spezifische kleine Mengen (3-10 pMHC-I-Moleküle) präsentierter Tumorpeptide zu erkennen [67], gilt die Herunterregulation oder der Verlust von HLA auf der Zelloberfläche immer noch als einer der bedeutendsten Faktor für das Scheitern neuer immuntherapeutischer Verfahren.

Vor allem der partielle Verlust von MHC-Molekülen stellt einen der Hauptmechanismen des Immunescapes dar, da diese Zellen sowohl der Überwachung durch CTLs, als auch durch NK-Zellen entgehen [351].

Es ist bekannt, dass eine homogene Expression von HLA-Klasse-I-Molekülen in soliden Tumoren nicht generell gegeben ist [112]. Ein totaler oder teilweiser Verlust von MHC-Klasse-I wurde bereits für beinahe alle Tumorarten beschrieben, in einigen Fällen auch im Zusammenhang mit einer schlechteren Prognose [352, 353]. So lag die Häufigkeit für eine HLA-Klasse-I Herunterregulation oder einen kompletten Verlust in Studien für Melanome, Mamma-, Bronchial-, Kolon-, Nierenzell-, Cervix- und Prostatakarzinom zwischen 10 und 50 % [354]. HLA-positive Tumoren zeigten in Studien ein vergleichsweise besseres Ansprechen auf verschiedene Therapieoptionen. So wurde gezeigt, dass HLA-positive Harnblasenkarzinome besser auf eine

Therapie mit BCG ansprechen, als Karzinome mit partiellem oder vollständigem HLA-Verlust [355].

Auch für das Nierenzellkarzinom wurde eine Herunterregulation und ein Verlust von MHC-Klasse-I-Molekülen beschrieben. Der Anteil an Tumoren mit HLA-Verlust lag in Studien bei bis zu 37,8 % [348] und konnte mit einer schlechteren 5-Jahres-Überlebensrate korreliert werden [356]. Allerdings ist zu beachten, dass bei all diesen Studien keine direkte quantitative MHC-Bestimmung durchgeführt wurde, sondern Immunhistochemie und Expressionsanalysen auf mRNA-Ebene.

Da diese Arbeit besonders die Metastasen des Nierenzellkarzinoms untersucht, ist es von besonderem Interesse, wie sich die MHC-Klasse-I-Menge auf metastasierten Tumoren von nicht-metastasierenden Tumoren und Normalgewebe unterscheidet.

Es ist bekannt, dass die Tumorprogression mit HLA Downregulation und Verlust einhergeht [357, 358]. So wurde beispielsweise eine Reduktion von MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Oberfläche von metastasierten Mammakarzinomen beschrieben [359]. Immuntherapiestudien mit metastasierten Melanomen zeigten für Metastasen mit hoher HLA-Expression eine Regression und für Metastasen mit geringer HLA-Expression eine Progression [357].

Momentan existieren noch keine veröffentlichten Studien zur MHC-Menge auf metastasierten RCCs, ebenso fehlen Studien, die über direkte Extraktion die HLA-Menge auf Nierenzellkarzinomen bestimmen.

Grafik 9 zeigt die durchschnittliche MHC-Klasse-I-Menge aller analysierten Gewebeproben auf 1g Gewebe für Tumor, Normalnieren und Metastasen. Abweichend von bisher veröffentlichten Studien konnte in dieser Arbeit ein deutlich höherer Gehalt an MHC-Klasse-I auf Tumor- und Metastasengewebe im Vergleich zum Normalgewebe nachgewiesen werden. Dieses Resultat bestätigt die von Weinzierl et al. getroffene Annahme, dass keine verlässliche Korrelation zwischen mRNA-Expression und HLA-Präsentation an der Zelloberfläche besteht [360]. Ebenso gibt es berechtigte Hoffnung für die Wirksamkeit und Entwicklung von Immuntherapien auch gegen metastasierte Stadien des Nierenzellkarzinoms.

Leider konnte aufgrund der geringen Fallzahl und somit hohen Standardabweichung nur für den Vergleich Tumor- und Normalgewebe das Signifikanzniveau erreicht werden nicht jedoch für den Vergleich Metastasen- und Normalgewebe.

Um diese Ergebnisse zu bekräftigen müssen darum in Zukunft weitere Studien zur quantitativen MHC-Bestimmung durchgeführt werden, in denen möglichst mit mehreren unterschiedlichen Methoden und höherer Fallzahl genauere Aussagen über den HLA-Gehalt auf der Oberfläche der unterschiedlichen Gewebe getroffen werden können.

4.2. Diskussion der Methoden und Ergebnisse der qualitativen-differentiellen HLA-Liganden Analyse

Zur Identifizierung potentiell tumorassoziierter HLA-Liganden wurde in dieser Arbeit eine methodische Dreifach-Kombination aus *Liquid Chromatography*, *Tandem-MassSpectrometry* (LC-MS/MS), *GeneChip*-basierter Genexpressionsanalyse (Affimetrix), sowie differentieller Peptidanalytik mittels *stable isotope labelling* verwendet.

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

Hinsichtlich der Peptidanalytik konnten aus allen aufgearbeiteten Tumoren Peptide isoliert und aufgereinigt werden. In allen Proben, die massenspektrometrisch analysiert wurden, konnte eine große Anzahl von auswertbaren Fragmentspektren gewonnen werden. Da die Auswertung der Fragmentspektren zum größten Teil manuell erfolgte, ist die Richtigkeit und Zuverlässigkeit der Peptidsequenzen direkt vom Auswerter abhängig. Die stichprobenartig durchgeführte Verifikation der Daten, durch den Vergleich der aus dem Tumor gewonnenen Fragmentspektren mit solchen synthetischer Peptide attestierte jedoch eine hohe Treffsicherheit dieser sorgfältig durchgeführten manuellen Auswertung.

Die mRNA-basierte Identifikation von tumorassozierten Antigenen (TAAs) ist ebenfalls gut etabliert und weit verbreitet, dennoch stellt sich in den letzten

Jahren zunehmend die Frage, ob die verwendete methodische Kombination tatsächlich in der Lage ist, neben der qualitativen Charakterisierung des durch die Zelle präsentierten Ligandoms eine Identifikation tumorassoziierter Peptide durch quantitative mRNA-Expressionsanalyse zu leisten.

Man könnte argumentieren, dass insbesondere solche Peptide an der Zelloberfläche in hoher Dichte präsentiert werden, die aus auf Translationsebene überexprimierten Genprodukten stammen. Diese Vermutung ist auch dadurch gerechtfertigt, dass nachgewiesen ist, dass Peptide aus, im Tumor überexprimierten, Genprodukten als tumorassozierte T-Zell-Epitope wirken können [88, 97, 361-363]

Aufgrund von Unterschieden auf mRNA-Ebene Rückschlüsse auf das HLA-Ligandom zu schließen, birgt jedoch auch die Gefahr von Fehlschlüssen in sich, da z.B. zunehmend Hinweise existieren, dass bestimmte Epitope nur auf Tumorzellen präsentiert werden, obgleich das Quellprotein in gleichen Mengen in beiden Zelltypen vorhanden ist [364]. Darüberhinaus gibt es zunehmend Beweise für Unterschiede der Peptidpools, die vom Immunproteasom bzw. dem konstitutiven Proteasom generiert werden [365-367]. Die zuverlässigste Informationsquelle für HLA-Epitope scheinen daher die MHC-Liganden selbst zu sein und nicht die ihnen zugrunde liegende mRNA oder Proteine.

Die von Claudia Lemmel im Jahr 2004 entwickelte Methode zur differentiellen Peptidanalytik mittels staple isotope labelling ermöglicht zum ersten Mal die direkte quantitative Analyse des HLA-Ligandoms in seiner Gesamtheit sowie die HLA-Präsentation einzelner Peptide [146].

Mit Hilfe dieser Methode konnte Andreas Weinzierl, ein Mitarbeiter der Arbeitsgruppe, beweisen, dass zwischen Transkriptom und HLA-Ligandom eine noch schwächere Korrelation ($r = 0.32$), als schon zuvor für Transkriptom und Proteom bekannt war ($r = 0.45$), besteht [360].

Die hohe Expression eines Genprodukts auf Transkriptionsebene lässt also nicht ohne weiteres auf eine quantitativ höhere Peptidpräsentation an der Zelloberfläche schließen. Diese geringe Vorhersagewahrscheinlichkeit erklärt sich aus der unterschiedlichen Transkriptionseffizienz und der unterschiedlichen Halbwertszeit der Proteine in der Zelle, sowie aus den verschiedenen

Prozessen der Proteindegradation und Antigenprozessierung, die, wie in der Einleitung dieser Arbeit (Kap. 1.1.2.) dargestellt, ebenso qualitative und quantitative Einflüsse auf die Peptidpräsentation haben.

Aus den oben genannten Gründen wurde im Rahmen dieser Arbeit die Identifikation von TAAs erstmals um die Methode der differentiellen Peptidanalytik mittels stable isotope labelling erweitert. So war es möglich die HLA-Präsentation sowie die mRNA-Expression der sequenzierten Peptide auf Tumor-, Normal- und Metastasengewebe zu untersuchen und vergleichen.

4.2.1. Diskussion der Methode differentielle Peptid-analyse mittels „stable isotope labeling“

Quantitative Aspekte der MHC-Ligandenpräsentation konnten bis vor wenigen Jahren nur unter Einsatz von Kalibrierungspeptiden in der *online* LCMS-Analyse untersucht werden. Die Verwendung von Peptiden zu Kalibrierungszwecken bei quantitativen Untersuchungen ist notwendig, da es sich bei der Massenspektrometrie um eine zwar sehr sensitive, aber nur semiquantitative Methode handelt. Zur differentiellen Untersuchung des gesamten MHC-Ligandoms war dieser experimentelle Ansatz jedoch nicht durchführbar, da die synthetische Herstellung und Kalibrierung aller MHC-Peptide nötig gewesen wäre.

Während der letzten Jahre wurden durch die Entwicklung differentieller quantitativer Peptidanalysen große Fortschritte bei der Charakterisierung des Proteoms verschiedener Zellstadien erzielt [368, 369]. Ziel all dieser Methoden ist die Derivatisierung von, aus zwei unterschiedlichen Quellen stammenden HLA-Liganden, entweder mit einem ein leichtes Isotop enthaltenden Reagenz (Wasserstoff) oder mit einem ein schweres Isotop enthaltenden Reagenz (Deuterium). Gleiche Peptidsequenzen aus unterschiedlichen Quellen erhalten somit eine Differenz in ihrer Masse, jedoch weisen beide nach wie vor das gleiche physikalisch-chemische Verhalten auf. Dies ist von Bedeutung bei der nachfolgenden chromatographischen Auftrennung der Liganden, die nach der Mischung der beiden unterschiedlich derivatisierten Peptidpools durchgeführt wird und bei der Derivate der gleichen Sequenz im Wesentlichen koeluiieren.

Leider erwies sich weder die Isotop-kodierte Affinitätsmarkierung (ICAT), die spezifisch mit Cyteinresten in Proteinen reagiert [370], noch die von Ringrose et al. [371] für HLA-B*2704 durchgeführte metabolische Markierung mit N-Arginin als geeignete Methoden zur Quantifizierung aller MHC-gebundener Peptide.

Die von Claudia Lemmel entwickelte Methode der Acetylierung erlaubte erstmals diese Quantifizierung, allerdings traten Probleme durch Signalaufspaltung und fehlende Ladung am N-Terminus auf.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Methode zur Modifizierung von Peptiden, die Guanidinylierung und Nikotinylierung, gilt nach aktuellem Stand der Forschung als geeignetste Methode zur Quantifizierung von MHC-Klasse-I-Liganden.

Die Guanidinylierung sollte eine Signalaufspaltung verhindern, indem alle ϵ -Aminogruppen der Lysinreste der Peptide vor der N-terminalen Modifizierung blockiert werden. Die Nikotinylierung des N-Terminus hat den Erhalt des N-terminalen Ladungsträgers im Peptid zum Ziel.

Die ebenfalls von Claudia Lemmel entwickelte Methode hat ihren Ausgangspunkt

bei der Guanidinylierung aus einem im Jahr 2002 veröffentlichten Protokoll nach Beardsley [372] und bei der Nikotinylierung aus einer Publikation von Munchbach und Kollegen aus dem Jahr 2000 [373]. Das in dieser Dissertation angewandte Protokoll wurde zusätzlich von Andreas Weinzierl modifiziert.

Zwei Faktoren sind für die optimale Modifizierung von HLA-Liganden von besonderer Bedeutung: Zum einen die Kinetik der MHC-Klasse-I-Liganden Nicotinylierung (99% nach 15 min), zum anderen das adäquate Mischverhältnis der modifizierten Proben mittels UV-Absorption. Untersuchungen mit synthetischen Peptiden ergaben für diese UV-absorptions-basierte Peptidmischung eine relative Fehlerrate von unter 8%, was ein vergleichbares Ergebnis mit anderen Isotopen-basierten Quantifizierungsstrategien darstellt [374].

Zur Kontrolle der Verlässlichkeit der Guanidinylierungs/Nicotinylierungs-Methode bei der Quantifizierung von natürlichen HLA-Liganden wurde ein synthetischer Peptidpool verwendet. Der errechnete Fehler für Peptidpärchen

mit hoher Signalintensität lag bei unter 10%, dieses Ergebnis kann somit als Bestätigung für die Zuverlässigkeit der Guanidinylierungs/Nikotinylierungs-Methode gewertet werden [146, 360].

Durch die dNIC-Methode wird jedes Peptid unabhängig von seiner Sequenz modifiziert und so eine Massendifferenz zwischen leichtem und schwerem Reagenz von 4 Da erzeugt. Diese konstante Massendifferenz ermöglicht eine verlässliche, automatisierte Analyse von Peptidverhältnissen und somit ist diese Methode geeignet für Experimente mit hohem HLA-Ligandendurchsatz.

Schlussfolgernd betrachtet ist die dNIC-Strategie ein MS-basierter Ansatz mit großem Potential für die Identifizierung von Unterschieden im HLA-Ligandom von zwei Proben. Dies kann für ein breites Anwendungsspektrum eingesetzt werden, welches von den quantitativen HLA-Ligandomanalysen bis hin zur Identifizierung von Tumor-assoziierten Antigenen reicht.

4.2.2. Diskussion der Ergebnisse: Vergleich aller Peptide auf Tumor- und Normalgewebe bzw. Tumor- und Metastasengewebe

Die zentrale Zielsetzung dieser Arbeit besteht in der Analyse der Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen Primärtumor, autologem Normalgewebe und Metastasen des Nierenzellkarzinoms. Dieser Dreifach-Vergleich wurde sowohl auf HLA-Liganden-Ebene, als auch auf mRNA-Expressionsebene durchgeführt. Obwohl das Hauptinteresse darin liegt, neue HLA-Liganden zu identifizieren, die sich als direkte Angriffspunkte für eine Immuntherapie anbieten, scheint auch ein Gesamtvergleich der HLA-Präsentation und mRNA-Expression, von Tumor, Metastase und Normalgewebe, vor allem in Hinblick auf die Metastasenentstehung, durchaus von Bedeutung. Wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit erläutert, stehen zwei unterschiedliche Theorien für die Metastasenentwicklung zur Diskussion:

Früher wurde vermutet, dass nur ein kleiner Anteil der Tumorzellen, der erst spät im Krankheitsverlauf entsteht, die Fähigkeit besitzt sich vom Primärtumor zu lösen und Absiedlungen zu bilden [163]. Dies würde bedeuten, dass große Unterschiede zwischen Primärtumor und Metastasengewebe bestehen, was die Entwicklung einer Immuntherapie für das metastasierte Nierenzellkarzinom

deutlich erschweren und bestehende Therapieansätze für metastasierte Neoplasien in Frage stellen würde.

Die von Bernards und Weinberg entwickelte zweite Theorie, nach der die Fähigkeit zur Metastasierung schon früh in der Primärtumorentwicklung erlangt wird und somit an die meisten Tumorzellen weitergegeben wird [184], wurde bereits durch mehrere Genom- und Mausstudien unterstützt. Es konnte gezeigt werden, dass das Metastasierungspotential eng mit bestimmten Genexpressionsmustern korreliert [185-187]. Nicht nur das Metastasierungspotential an sich, sondern auch die Metastasierung in ein bestimmtes Organ, ist genetisch schon im Primärtumor festgelegt [188].

Nach unseren Erkenntnissen ist die in dieser Dissertation beschriebene Studie die erste, die Gewebe aus Primärtumor und Metastase nicht nur auf mRNA-Ebene, sondern auch auf HLA-Liganden-Ebene vergleicht. Der Vergleich zwischen Tumor- und Normalgewebe auf HLA-Liganden-Ebene wurde in der Literatur bereits beschrieben, allerdings nur mit einer sehr geringen Anzahl an Peptidpärchen [375].

Der Vergleich der HLA-Präsentation scheint aus zwei Gründen von besonderem Interesse: Zum einen sind mögliche Immuntherapieansätze gegen HLA-präsentierte Peptide auf der Oberfläche von Tumorzellen gerichtet und zum anderen wurde gezeigt, dass nur eine schwache Korrelation zwischen mRNA-Expression und HLA-Präsentation besteht [360], was die Aussage einer reinen mRNA-Expressionsanalyse stark einschränkt.

Für beide im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proben (RCC377 und RCC399) konnte gezeigt werden, dass die HLA-Ligandenpräsentation zwischen Primärtumor und Metastase ähnlicher ist als zwischen Primärtumor und Normalgewebe.

Dieses Ergebnis bestärkt die auf Genomebene längst nachgewiesene zweite Theorie der Metastasenentstehung, die davon ausgeht, dass die Fähigkeit zur Metastasierung bereits im Primärtumor vorliegt. Außerdem eröffnet diese Erkenntnis die Möglichkeit einer peptidbasierten Immuntherapie, die sich gegen Primärtumor und Metastasen richtet, das gesunde Nierengewebe aber nicht beeinträchtigt.

Diese Ergebnisse konnten auch auf mRNA-Ebene bestätigt werden. Auch hier wurde für drei untersuchte Proben (RCC377, RCC399 und RCC343) gezeigt, dass die Genexpression im Tumorgewebe mehr der im Metastasengewebe, als der im Normalgewebe ähnelt.

Die Resultate auf mRNA-Ebene stimmen mit bereits veröffentlichten Studien überein. So wurde für Magenkarzinome eine größere Ähnlichkeit zwischen Tumor und Metastase, als zwischen Tumor und Normalgewebe auf Transskriptomebene [376], für Mammakarzinome auf Transkriptom- und Proteomebene, gezeigt [298, 377]. Allerdings ist hier zu beachten, dass diese Vergleiche nur mit Lymphknotenmetastasen, nie mit Fernmetastasen durchgeführt wurden.

Auch für zahlreiche andere Tumorarten wurde diese Ähnlichkeit auf mRNA-Ebene bestätigt, allerdings immer nur für einzelne Gene oder Gengruppen [245, 297, 378-380]. Für das Nierenzellkarzinom wurde ein solcher Vergleich ebenso bis jetzt nur für einzelne Gene durchgeführt [231].

Der in Abbildung 12 gezeigte Vergleich zwischen Nierennormalgewebe und Metastase bzw. Normalgewebe am Ort der Metastasenlokalisierung und Metastasengewebe auf mRNA Ebene, bestätigt ebenso die zuvor beschriebenen Ergebnisse. Wie zu erwarten zeigt sich im Vergleich der Halbwertsbreiten zwischen Tumor- und Metastasengewebe (Abb. 11) und zwischen Normal- und Metastasengewebe (Abb. 12), dass sich auf Ebene des Genoms Tumor und Metastase ähnlicher sind als Metastase und Normalgewebe. Zudem kann diese Gegenüberstellung auch der Überprüfung dienen, ob es sich beim untersuchten Gewebe wirklich um Metastasengewebe und nicht um Lymphknoten- bzw. Lebergewebe handelt. Die deutlich höhere Halbwertsbreite im Vergleich Normalgewebe der Metastasenlokalisierung und Metastasengewebe auf allen drei untersuchten Proben (RCC377, RCC399 und RCC343) kann als beweisend angesehen werden, dass es sich bei den in dieser Arbeit untersuchten Metastasenproben tatsächlich um Metastasengewebe eines Nierenzellkarzinoms handelt. Da bisher keine geeignete Methode der differentiellen Peptidanalytik vorliegt, die es erlaubt Peptide aus mehr als zwei verschiedenen Geweben gleichzeitig zu vergleichen,

konnte der Vergleich zwischen Nierennormalgewebe und Metastase bzw. Normalgewebe der Metastasenlokalisierung und Metastasengewebe leider nur auf mRNA Ebene durchgeführt werden.

Obwohl die Ergebnisse dieser Dissertation die Hoffnung stärken, eine Immuntherapie auch gegen metastasierte Formen des Nierenzellkarzinoms zu entwickeln, gibt es doch Einschränkungen, die zu bedenken sind:

Ziel unserer Untersuchung war auf keinen Fall die Durchführung einer großen klinischen Studie mit einer hohen Anzahl untersuchter Gewebe. Solch ein Vorhaben scheint nahezu unmöglich, bedenkt man, welche Mengen an Gewebe für die HLA-Extraktion nötig sind und wie aufwändig sich die manuelle Auswertung der einzelnen Proben darstellt. Die in dieser Dissertation erbrachten Ergebnisse sind aus diesem Grund als sehr patientenspezifisch anzusehen. Dies wird umso deutlicher, wenn man bedenkt, dass trotz der Übereinstimmung in einer HLA-Subklasse zwischen RCC377 und RCC399 nur ein Peptid (DTDHYFLRY, COLQ, collagen-like tail subunit of asymmetric acetylcholinesterase) auf beiden Geweben identifiziert werden konnte.

Ein weiteres Problem bei der Auswertung der HLA-Präsentationsverhältnisse stellt die im Vergleich zur mRNA-Expression relativ geringe Anzahl an analysierten Peptidpärchen dar. Aus diesem Grund konnte für RCC399 bei der Betrachtung der Unterschiede in der Verteilung der HLA-Liganden-Präsentationsverhältnisse im Vergleich Primärtumor und Normalgewebe- bzw. Metastasengewebe kein Signifikanzniveau erreicht werden, obwohl die Halbwertsbreite im Vergleich Primärtumor und Normalgewebe deutlich über der des Vergleiches Tumor- und Metastasengewebe lag.

Da unsere Methode aus den genannten Gründen durch die geringe Anzahl an untersuchten RCCs limitiert ist, müssen weitere Studien zeigen, ob unsere Ergebnisse verallgemeinert werden können. Es wäre zudem interessant, ob die von uns an synchron entnommenen Lymphknotenmetastasen erbrachten HLA-Präsentationsergebnisse ebenfalls für Fernmetastasen (z.B. Leber, Lunge) und metachrone Metastasen gültig sind.

Die Untersuchung größerer Probenmengen würde zusätzliche Informationen über die Individualität des metastasierten Nierenzellkarzinoms, seiner Antigene und Epitope und hoffentlich eine Antwort auf die Frage nach tumor- bzw. metastasenspezifischen Antigenen für eine Vakzinierung erbringen.

4.2.3. Diskussion der Ergebnisse: Vergleich der Einzelpeptide auf Tumor- und Normalgewebe bzw. Tumor- und Metastasengewebe

Übergeordnetes Ziel dieser Arbeit war die Identifikation von Peptiden aus tumorassoziierten Antigenen im metastasierten Nierenzellkarzinom. Eine potentielle Tumor- bzw. Metastasenassoziation wurde nicht, wie in zuvor publizierten Studien, angenommen, wenn die den Peptiden zugehörigen Genprodukte im Tumormaterial relevant gegenüber dem korrespondierenden Normalgewebe überexprimiert waren, sondern aufgrund zuvor erwähnter Studienergebnisse im Bezug auf die HLA-Präsentation beurteilt. Wie im Ergebnisteil dargestellt, wurde der Grenzwert ab der ein Peptid auf einem Gewebe als überpräsentiert gilt auf 10% festgelegt (xTOP10%), d.h. alle Peptide mit einem Präsentationsverhältnis zwischen Tumor- und Normalgewebe bzw. zwischen Tumor- und Metastasengewebe, das außerhalb 90% der Normalverteilung lag, sind auf dem entsprechenden Gewebe überpräsentiert und gelten somit als potentielle tumorassoziierte Antigene. Im Rahmen dieser Dissertation wurde ebenfalls die mRNA-Expression jedes identifizierten Peptides betrachtet. Zwar war eine mRNA-Überexpression zusätzlich zur HLA-Überpräsentation erwünscht, aber nicht wie in früheren Arbeiten Bedingung für eine weitere Untersuchung der Peptide.

In dieser Arbeit wurden insgesamt 74 Peptide auf RCC377 identifiziert, von denen 17 eine differentielle HLA-Präsentation und 16 eine differentielle mRNA-Expression zeigten. Auf RCC399 wurden 68 Peptide identifiziert, von denen 13 eine differentielle Präsentation auf HLA-Ebene und 12 eine differentielle Expression auf mRNA-Ebene zeigten.

Alle Peptide, die überpräsentiert waren konnten auch auf dem entsprechenden Gewebe sequenziert werden.

Unser Hauptinteresse war auf HLA-Liganden fokussiert, die eine Überpräsentation auf Tumor- und Metastasengewebe im Bezug zum Nierennormalgewebe zeigten. Diese Strategie erlaubte uns tumorassoziierte HLA-Liganden zu identifizieren, die als immunologische Zielstrukturen bei Patienten mit klinisch noch nicht detektierbaren aber für das Immunsystem bereits zugänglichen Mikrometastasen, dienen können. Zusätzlich kann durch Peptide, die eine spezifische Überpräsentation auf Metastasengewebe zeigen, eine Aussage über die Abläufe auf Proteomebene während der Metastasenentstehung gemacht werden.

Alle überpräsentierten- bzw. überexprimierten Peptide stellen potentielle Tumorassoziierte Antigene dar, eine detaillierte Diskussion aller würde allerdings den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Im Ergebnisteil wurde bereits auf die Bedeutung, die die einzelnen Peptide in der Entwicklung immuntherapeutischer Strategien spielen könnten, eingegangen. Im Folgenden sollen speziell auf jene Peptide genauer eingegangen werden, die bereits in der Literatur im Bezug auf Tumorassoziation erwähnt wurden und somit besonders interessante Kandidaten für eine Immuntherapie darstellen.

Es muss allerdings bedacht werden, dass in der Literatur nicht erwähnte Peptide, wie beispielsweise ALFKHILLY aus *dopey family member 2*, KVANIILSY aus *KIAA1840* und aus *clathrin heavy polypeptide*, keinesfalls als Antigene ausscheiden, vielmehr müssen weitere Studien deren Bedeutung für die Immuntherapie zeigen.

4.2.3.1 Diskussion ausgewählter überpräsentierter (HLA) Peptide auf Tumor- und Metastasengewebe

14 der im Rahmen dieser Arbeit analysierten Peptide zeigten eine signifikante Überpräsentation auf Tumor- und Metastasengewebe im Vergleich zum Nierennormalgewebe. Elf davon wurden auf RCC377 identifiziert, drei auf RCC399. Fünf dieser Peptide erwiesen sich aufgrund der bestehenden Literatur als besonders interessant und sollen im Folgenden diskutiert werden:

APARLFALL aus **Syndecan 4 (SDC4)** zeigte sowohl auf HLA- als auch auf mRNA-Ebene eine deutliche Überpräsentation bzw. –expression auf Tumor und Metastase im Vergleich zum Nierennormalgewebe. *Syndecan 4* gehört zu einer Familie von Proteoglycanen und agiert als intrazellulärer Rezeptor in der Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren. Zusätzlich wird *Syndecan 4* eine Rolle bei der für die Entstehung von Metastasen bedeutenden Zell-Zell-Adhäsion zugeschrieben [316]. Eine Überexpression von *Syndecan 4* wurde in der Literatur bereits für einzelne Tumoren belegt; so zählt *Syndecan 4* zu den etablierten Tumormarkern des malignen Melanoms [381]. Ebenso wird eine Überexpression von *Syndecan 1* und *4* für Östrogen-negative und somit aggressive Mammakarzinome beschrieben. In dieser Studie korrelierte die Expression von *Syndecan 4* zusätzlich mit dem Grading und der Größe des Primärtumors [316].

Obwohl die Tumorassoziation von *Syndecan 4* erst für wenige Tumorarten untersucht wurde und bislang auch für Nierenzellkarzinom keine Überexpression beschrieben wurde, stellt dieses Peptid vor allem aufgrund der Überpräsentation bzw. –expression auf HLA- und mRNA-Ebene und seiner Funktion im Bereich der Zell-Zell-Adhäsion einen vielversprechenden Kandidaten für eine Immuntherapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms dar.

KIADRFLLY aus **LIM domain only 4 (LMO4)** gehört zu einer Gruppe von Coregulatoren der Transkription [382, 383], die eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung von Organen sowie der Zellregeneration und der Apoptose spielen. Während LMO1 und 2 bereits seit langem als Onkogene, vor allem in Leukämien, diskutiert werden [384-386], wurde LMO4 erst in den letzten Jahren dieser Proteinfamilie zugeordnet und genauer untersucht. *LIM domain only 4* ist in nahezu allen menschlichen Geweben auf niedrigem Niveau exprimiert [387] und spielt in der Entstehung und Progression zahlreicher maligner Tumoren eine bedeutende Rolle. LOM4 zeigt eine deutliche Überexpression in oralen Plattenepithelkarzinomen [388], Prostata- und Pankreaskarzinomen [318, 389]. In Mamma- und Ovarialkarzinomen ist LOM4 als Repressor des

Tumorsuppressorgenes BRCA1 bekannt [387, 390]. Sein sehr verbreitetes Vorkommen in den unterschiedlichsten Karzinomen legt nahe, dass es sich bei LOM4 um ein Onkogen handelt.

Nach heutigem Stand liegen noch keine Daten zur Bedeutung von LOM4 für den Metastasierungsprozess im Allgemeinen, sowie für das Nierenzellkarzinom vor, trotzdem könnten Peptide des Onkogenes *LIM domain only 4* als hochinteressante Kandidaten für eine tumor- und metastasenspezifische Immuntherapie gelten und sollten in weiteren Studien auf ihre Eignung als T-Zell-Epitope überprüft werden.

Der erstmals identifizierte HLA-B*07 Ligand **RPRVTEPISA** aus ***Apolipoprotein L-1 (APOL1)*** sowie der HLA-A*03 Ligand **SLLTSSKGQLQK** und HLA-B*50 Ligand **IESRTLAI**A, beide aus ***Adipose differentiation related protein (ADFP)***, zeigen eine Überpräsentation auf Tumor- sowie Metastasengewebe von RCC377. Ihre zugehörigen Antigene auf mRNA-Ebene sind in Tumor und Metastase im Vergleich zum Nierennormalgewebe ebenfalls überexprimiert. Zusätzlich konnte diese mRNA-Überexpression auch gegenüber nahezu allen Normalgeweben des menschlichen Körpers gezeigt werden (Abb. 15a+c).

Beide Proteine sind bereits als tumorassoziierte Antigene des Nierenzellkarzinoms bekannt [391, 392].

ADFP zeigt bereit in frühen Stadien des Nierenzellkarzinoms eine deutliche Überexpression auf Proteom und Genom-Ebene [300, 391]. Für das klarzellige RCC konnte die Höhe der ADFP-Expression mit einem besseren Gesamtüberleben korreliert werden [393]. Für eines der *Adipophilin*-Peptide wurde durch eine andere Arbeitsgruppe nachgewiesen, dass es als immunogenes T-Zell-Epitop wirkt und die Tumorzelllyse durch T-Zellen vermittelt [341]. Die hohe Expression von *Adipophilin*, besonders in klarzelligen Nierenzellkarzinomen, das häufige Vorkommen von *Adipophilin*-Peptiden auf Tumorzellen sowie die nachgewiesene Immunogenität eines dieser Peptide ließen *Adipophilin* als ein attraktives Quellprotein von Peptiden für die Tumor-Vakzinierung erscheinen und führten schließlich zum Einsatz von ADFP-Peptiden in der im Ergebnisteil beschriebenen Impfstudien.

Ähnliches gilt für APOL1: Die Identifikation des Proteins als dominante Peptidquelle und die deutliche Überexpression des Genprodukts in der Mehrzahl der getesteten Tumoren [300] ließ auch Peptide aus APOL1 als interessante Kandidaten für eine experimentelle Immuntherapie erscheinen und führte auch hier zum Einschluss von APOL1 in die Tübinger RCC-Vakzinierungsstudie. Im Gegensatz zu ADFP liegen für Peptide aus APOL1 noch keine Daten zur Immunogenität vor, daher scheint es erstrebenswert diese in T-Zell-Stimulationsversuchen zu überprüfen.

Unsere Untersuchungen konnten nun beweisen, dass der Einsatz beider Antigene gegen das metastasierte Nierenzellkarzinom gerechtfertigt ist, da zum ersten Mal die HLA-Liganden-Überpräsentation von ADFP und APOL1 auf Tumor- und Metastasengewebe des Nierenzellkarzinoms gezeigt wurde.

Ein weiteres hoch interessantes Peptid, das im Rahmen dieser Dissertation erstmals auf einem Nierenzellkarzinom identifiziert werden konnte, ist **RPILTIITL** aus *tumor protein p53 (TP53)*. P53 zeigte auf HLA-Ligandenlevel sowohl auf Tumor- als auch auf Metastasengewebe eine deutliche Überpräsentation im Vergleich zum Nierennormalgewebe.

TP53 wurde schon in den frühen 90er Jahren als häufigstes Ziel molekularer Veränderungen in jeglicher Art von maligner Entartung beschrieben [394, 395]. TP53 spielt eine bedeutende Rolle in der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose und gilt somit heute als bedeutendster Tumorsuppressor in nahezu allen Tumorerkrankungen [396, 397]. In gesunden Zellen wird p53 nur in sehr geringen Mengen exprimiert, wohingegen in zahlreichen Neoplasien eine deutlich erhöhte Expression beschrieben wurde. Mutierte Formen des *tumor proteins p53* können in den meisten malignen Erkrankungen identifiziert werden und führen hier zum Kontrollverlust über den Zellzyklus mit ineffizienter DNA-Reparatur und schließlich zur Entstehung genetisch instabiler Zellen [398-401]. In zahlreichen Studien wurde bereits eine Überexpression von p53 in Nierenzellkarzinomen auf mRNA-Ebene beschrieben [299, 379, 402]. Eine erhöhte Expression von p53 konnte des Weiteren mit seltenen RCC-Formen, höherem Grading, schlechterem Ansprechen auf Radio- und Chemotherapie

und geringerem Gesamtüberleben korreliert werden [403-406]. All diese Daten prädestinieren p53 Peptide geradezu als Kandidaten für eine Vakzinierungstherapie des metastasierten RCCs. Die Tatsache, dass in mehreren Studien spontane Antikörper gegen p53 in Körperflüssigkeiten von Krebspatienten, beispielsweise Aszites isoliert werden konnten [407-409], gibt zusätzlich Hoffnung im Bezug auf die Immunogenität dieser Peptide. Weitere Studien müssen nun zeigen, ob diese Immunogenität auch für die Aktivierung spezifischer CD-8⁺-T-Zellen ausreicht und somit Peptide aus p53 als T-Zell-Epitope dienen können.

4.2.3.2 Diskussion ausgewählter überpräsentierter (HLA) Peptide auf Metastasengewebe

Sechs Peptide aus den analysierten Geweben zeigten eine Überpräsentation auf Metastasengewebe im Vergleich zum Tumor- und Normalgewebe, vier aus RCC377, zwei aus RCC399. Für vier dieser Peptide konnte in der Literatur eine eindeutige Metastasenassoziation gefunden werden, sie sollen im Folgenden genauer diskutiert werden:

Das Protein ***Isochromatase domain containing 2 (ISOC2)*** aus dem das Peptid **RLLEVPVML** identifiziert wurde, ist im Jahr 2007 zum ersten Mal beschrieben worden. Aus diesem Grund ist die genaue Funktion sowie die Bedeutung dieses recht neuen Proteins für die Tumorgenese und Metastasierung noch nicht hinreichend geklärt. Erste Studien konnten aber bereits zeigen, dass es sich bei ISOC2 mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit um ein Protein mit multiplen Funktionen im Bereich der Proteinbindung, der Proteinstabilisierung und verschiedenster metabolischer Prozesse handelt. Zudem ergaben sich Hinweise, dass ISOC2 möglicherweise als Tumoronkogen wirkt. Eine Studie am Mausmodell konnte zeigen, dass ISOC2 dosisabhängig den Tumorsuppressor p16(INK4a) hemmen kann [321]. Eine Überexpression von ISOC2 könnte somit eine bedeutende Rolle in der Entstehung verschiedenster Malignome spielen.

Trotz dieser sehr eindrucksvollen Erkenntnisse muss beachtet werden, dass es noch Jahre dauern wird, bis genug Daten über ISOC2 vorhanden sind um seinen Einsatz in der Immuntherapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms zu rechtfertigen.

SLMHSFILK aus *Dynein light chain roadblock type 1 (DYNLRB1)*, zeigte von alle im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Peptide mit einer 12-fachen Überpräsentation die höchste differentielle HLA-Präsentation auf Metastasengewebe im Vergleich zu Tumor- und Normalgewebe. DYNLRB1 ist ein zytoplasmatisches Protein, das für den intrazytoplasmatischen Transport von Membranvesikeln verantwortlich ist [410, 411]. Zudem scheint Dynein eine Rolle im Signalweg des Transforming growth factor β zu spielen, der für die Entstehung zahlreicher Malignome mitverantwortlich gemacht wird [412].

Die vorhandene Literatur ist im Bezug auf die Bedeutung von DYNLRB1 bei der Tumorentstehung sehr widersprüchlich. So wird von einigen Autoren das Vorkommen und die Bedeutung von Dynein in kolorektalen, Ovarial- und Mammakarzinomen als extrem gering und untergeordnet beschrieben [180, 319]; andere Autoren hingegen schreiben DYNLRB1 eine durchaus bedeutende Rolle z.B in der Entstehung von Ovarialkarzinomen zu [413].

Auch für dieses Protein müssen neue Studien in den nächsten Jahren zeigen, ob ein Einsatz in der Immuntherapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms gerechtfertigt ist. Zum jetzigen Zeitpunkt liegen weder Daten zur Bedeutung von Dynein im Nierenzellkarzinom, noch in der allgemeinen Metastasierungskaskade vor.

Auf Metastase und Tumorgewebe von RCC399 konnte das Peptid **QEPSDVVNSL** aus *Integrin alpha 2 (ITGA2)* isoliert werden. Integrine gehören zu einer Gruppe von heterodimeren Oberflächenrezeptoren, die auf zahlreichen Zelltypen, wie beispielsweise T-Zellen, Thrombozyten und Fibroblasten, vorkommen. Ihnen wird eine zentrale Rolle, in der auch für die Metastasenentstehung bedeutende Zell-Zell-Adhäsion sowie Interaktion, zugeschrieben [414].

Nach heutigen Erkenntnissen wird angenommen, dass die Überexpression von Integrinen einen der wichtigsten Faktoren im Metastasierungsprozess darstellt [415].

Für ITGA2 konnte in zahlreichen Studien eine Tumor- bzw. Metastasenassoziation nachgewiesen werden: So konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte ITGA2 Expression, sowohl in Kolon- als auch in Pankreaskarzinomen, mit einem aggressiveren, resistenteren und früher metastasierenden Subtyp einhergeht [416-418]. In der Entstehung und Progression des Mammakarzinoms konnte ITGA2 ebenfalls eine bedeutende Rolle zugeschrieben werden [419], da die durch Integrine vermittelte Adhäsion hier ein Eintreten maligner Zellen in den Apoptosezyklus verhindert [415].

Auch für das Nierenzellkarzinom wurden in zwei Studien Genexpressionsanalysen für unterschiedliche Integrine durchgeführt. Allerdings sind die Ergebnisse vor allem für ITGA2 nicht eindeutig. Während eine Studie eine Überexpression von ITGA2 beschreibt [420], wurde in der anderen Arbeit nur eine Überexpression für ITGA1,3 und 5 und sogar eine Downregulation von ITGA2 postuliert [421].

Peptide aus ITGA2 stellen nach heutigem Wissenstand hochinteressante Kandidaten für eine Vakzinierungstherapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms da. Aufgrund ihrer zentralen Rolle in der Tumourprogression und Metastasierungskaskade scheint ihr Einsatz für Patienten mit bereits chirurgisch entferntem Primärtumor, aber bestehender Metastasen, besonders geeignet.

Einschränkend muss allerdings die noch recht geringe und kontroverse Studienlage für RCC bedacht werden.

Ein weiteres hochinteressantes Peptid, das im Rahmen dieser Arbeit auf Tumor- und Metastasengewebe identifiziert werden konnte, ist **KLLNYAPLEK** aus **CD151**. Es zeigte auf RCC377 eine 1.4-fache Überpräsentation auf Metastasengewebe im Vergleich zum Tumorgewebe (Abb.15). CD151 ist ein Mitglied der Tetraspanin-Familie, einer recht neuen Familie von Membranproteinen, die vornehmlich über die Bildung von Komplexen mit

weiteren Tetraspaninen und einer Vielzahl weiterer Molekülfamilien agieren und diese in definierten Membrandomänen zusammenführen. Diese lipidreichen Membrandomänen spielen eine bedeutende Rolle in der Regulation von Zellentwicklung, Aktivierung, Wachstum und Motilität [422]. Nach heutigen Erkenntnissen steht diese recht neue Proteinfamilie der Tetraspanine im Zentrum der Metastasierungskaskade. Einige Mitglieder wie CD28/KAI1 sind bereits als Tumorsuppressorgene bekannt, während anderen wie CD151 und Co-029, eine fördernde Rolle in der Metastasenentstehung zugeschrieben wird [423]. CD151 war das erste Mitglied der Tetraspanine, dem eine Metastasenassoziation nachgewiesen werden konnte [424]. Ihm wird eine bedeutende Rolle in der Regulation von Zellmotilität, Tumordinvasion und Metastasierung zugeschrieben [424, 425]. In den letzten Jahren wurden zahlreiche Studien publiziert, die die Bedeutung von CD151 für die unterschiedlichsten Tumorentitäten untersucht haben:

Eine Überexpression von CD151 konnte mit einer schlechteren Prognose bei Kolon-, Pankreas- und Prostatakarzinomen assoziiert werden [298, 380, 426]. Beim Mammakarzinom korreliert eine hohe CD151 Expression mit einem höheren Grading und Östrogenrezeptornegativität [427].

In vitro konnte bereits gezeigt werden, dass CD151-Antikörper in der Lage sind die Motilität von Tumorzellen einzuschränken und sogar komplett zu hemmen [424, 428].

Obwohl momentan noch keine Studien zu Bedeutung von CD151 in RCC vorliegen, legen die Ergebnisse unserer Arbeit eine Beteiligung von CD151 am Metastasierungsprozess des Nierenzellkarzinoms nahe. Weitere Studien, vor allem zur Immunogenität der CD151 Peptide, wären für die Zukunft wünschenswert um diese hoffnungsvollen HLA-Liganden möglichst bald in Immuntherapieansätzen für Patienten mit metastasierter Erkrankung einsetzen zu können.

4.2.3.3 Diskussion ausgewählter überpräsentierter (HLA) Peptide auf Tumorgewebe

Insgesamt zeigten zehn der im Rahmen dieser Arbeit analysierten Peptide eine Überpräsentation auf dem Tumor im Vergleich zu Normal- und Metastasengewebe, wovon zwei auf RCC377 und acht auf RCC399 identifiziert wurden. Da diese Peptide für eine eventuelle Immuntherapie gegen das metastasierte Nierenzellkarzinom ungeeignet sind, ist ihre Betrachtung für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit weniger interessant. Ein Peptid erschien uns allerdings aufgrund seiner bereits großen Bedeutung auf onkologischer Ebene trotzdem einer genaueren Diskussion wert:

Aus ***Catenin beta 1 (CTNNB1)*** konnten im Rahmen dieser Arbeit zwei Peptide identifiziert werden: **VGLIRNLAL** und das zuvor unbekannte **TVGLIRNL**, beide passen auf den HLA-Allotyp A*02. Beide Peptide zeigten auf RCC Tumorgewebe eine 4 bzw. 6-fache HLA-Überpräsentation im Vergleich zum korrespondierenden Metastasen- bzw. Normalgewebe.

CTNNB1 gehört zur Familie der Catenine, einer Gruppe von Proteinen, die zuerst als Verbindungsproteine zwischen Zelladhäsionsmolekülen und dem Zellzytoskelett bei bestimmten Zell-Zellverbindungen, den *Adherens junctions*, beschrieben wurden [429]. Diese *Adherens junctions* spielen eine bedeutende Rolle im Aufbau und Erhalt von Epithelschichten z.B. auf Organoberflächen; sie sind beteiligt an verschiedenen Schritten der Embryogenese, der Wundheilung und auch der Metastasierungskaskade. Zusätzlich agiert *Catenin beta* als Transkriptionsfaktor im WNT-Signalweg, der im Zentrum zahlreicher Neoplasieprozesse steht [430].

Eine Überexpression von Catenin beta wurde für zahlreiche Tumoren, wie Mamma- [431], Bronchial- [432, 433], Magen- [434, 435] und hepatozelluläres Karzinom [436] beschrieben. Am besten untersucht scheint die Bedeutung von Catenin beta für das Kolonkarzinom, hier wird die Expression von CTNNB1 als prognostischer Faktor genutzt [437, 438].

Auch im Nierenzellkarzinom spielt der WNT-Signalweg eine bedeutende Rolle. Die Untersuchung von Zang et al. [323] zur Expression von CTNNB1 im

Nierenzellkarzinom stimmt mit unseren Ergebnissen überein. Beide Studien konnten keinen relevanten Unterschied in der mRNA-Expression zwischen Tumor- und Normalgewebe identifizieren, allerdings beschreibt Zang eine Überexpression- bzw. Präsentation im Zytoplasma (PCR) und auf der Oberfläche von Tumorzellen (Immunhistochemie) [323].

Trotz der durchaus interessanten Ergebnisse auf Tumorebene, kann Catenin beta aufgrund der fehlenden Überpräsentation auf Metastasenebene nicht als geeigneter Kandidat für eine Immuntherapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms gesehen werden.

Diese verminderte HLA-Präsentation auf Metastasengewebe lässt sich am ehesten durch die Funktion und Interaktion von CTNNB1 zusammen mit E-Cadherin bei der Zell-Zell-Adhäsion erklären. Der Verlust dieser Adhäsionen wird als zentraler Schritt in der Metastasierungskaskade betrachtet und geht vermutlich mit einer Downregulation bzw. Verlust der an ihr beteiligten Proteine einher. Für E-Cadherin wurde dieser Verlust im Metastasierungsprozess zahlreicher Tumoren bereits belegt [439] und auch für *Catenin beta* wurde dieser Verlust z.B. bei Mamma- und Prostatakarzinom bestätigt [440, 441].

4.2.3.4 Diskussion ausgewählter überexprimierter (mRNA) Peptide

Obwohl der mRNA-Expression wie oben schon ausführlich erläutert in dieser Dissertation nicht mehr die Bedeutung wie in früheren Arbeiten beigemessen wird, spielt sie dennoch eine nicht unbedeutende Rolle in der Beurteilung tumorassoziierter Antigene.

Damit ein tumorassoziertes Antigen als Kandidat für eine Immuntherapie geeignet erscheint, muss es stark auf Tumor- und Metastasengewebe präsentiert sein und möglichst gering oder gar nicht auf allen anderen menschlichen Geweben.

Dieser Vergleich ist zum heutigen Zeitpunkt mit der differentiellen HLA-Analytik noch nicht möglich. Aus diesem Grund dient die mRNA-Expressionsanalyse vor allem der Frage, wie stark ein tumorassoziertes Antigen auf anderen menschlichen Geweben exprimiert wird.

Im Rahmen dieser Diskussion sollen zwei Peptide genauer betrachtet werden, deren zugehörige Proteine eine deutliche Überexpression in Tumor- und Metastasengewebe im Vergleich zu allen anderen menschlichen Geweben zeigen (Abb. 14). Zusätzlich werden zwei Peptide diskutiert, die eine deutliche Überexpression in Tumor- und Metastasengewebe im Vergleich zum Nierennormalgewebe zeigen und in der Literatur bereits als tumorassoziierte Antigene beschrieben wurden:

Aquaporin 6 (AQP6), aus dem erstmals das Peptid **LDFGSLSNL** identifiziert werden konnte, zeigt eine bis zu 100-fache Überexpression in Tumor- und Metastasengewebe im Vergleich zu allen menschlichen Normalgeweben. Einzig im Vergleich zum Lebernorgangewebe besteht nur eine 1,8 fache Überexpression.

Aquaporin 6 gehört zu einer Familie von Wasserkanälen, die sich hauptsächlich auf Plasmamembranen befinden [442-444]. Allerdings unterscheidet sich AQP6 in Verteilung und Funktion deutlich von den anderen Mitgliedern dieser Familie. Nach neuesten Erkenntnissen kommt AQP6 ausschließlich auf intrazellulären Vesikeln vor und dient vermutlich als Ionenkanal [445].

Für AQP6 selbst ist bis heute noch keine Tumorassoziation beschrieben, allerdings sind andere Mitglieder der Aquaporinfamilie für ihre Überexpression in verschiedensten Tumoren bekannt. So ist AQP1 in Bronchial- und kolorektalen Karzinomen [446, 447] sowie im multiplen Myelom [448] und in Gehirntumoren überexprimiert [449]. Die AQP5 Expression ist in malignen Pankreastumoren erhöht und für AQP3 ist sogar eine Überexpression im Nierenzellkarzinom beschrieben [450, 451].

Aufgrund der extrem hohen Expression von AQP6 auf Tumor und Metastase von RCC399 scheint es trotz der in dieser Arbeit fehlenden HLA-Überpräsentation interessant, noch weitere Nierenzellkarzinome auf ihre HLA-Präsentation von Aquaporin zu untersuchen.

TVDQVKDLY aus **Ceruloplasmin (CP)** zeigte ebenfalls eine bis zu 80-fache Überexpression in Tumor- und Metastasengewebe im Vergleich zu anderen menschlichen Normalgeweben.

Ceruloplasmin dient als Cofaktor für zahlreiche Enzymreaktionen im menschlichen Körper, wie beispielsweise dem Kupfertransport [452] und dem Erhalt des Gefäßtonus [453, 454], sowie als *Akute Phase Protein* bei verschiedensten entzündlichen Vorgängen.

CP ist schon sehr lange als diagnostischer und prognostischer Serummarker in zahlreichen Neoplasien bekannt [455, 456]. Eine Überexpression auf mRNA- sowie auf Genom-Ebene wurde für zahlreiche Tumoren, wie zum Beispiel dem Schilddrüsen- und Ovariakarzinom [457, 458] sowie dem malignen Melanom [459] beschrieben.

Obwohl Peptide aus CP interessante Kandidaten für eine Immuntherapie darstellen, sind unsere Ergebnisse aufgrund der hohen Serumlevel von Ceruloplasmin mit Einschränkung zu betrachten. Durch Immunogenitätsprüfung mittels T-Zellexperimenten muss erst eindeutig geklärt werden, ob CP-Peptide wirklich auf der Zelloberfläche von Nierenzellkarzinomen präsentiert werden, oder ob es sich um Artefakte aus dem Serum der Patienten handelt.

Galectin-3 (Gal-3), aus dem das Peptid **KPNANRIAL** identifiziert werden konnte, zeigt eine deutliche Überexpression in Metastasengewebe im Vergleich zu Tumor- und Normalgewebe. Einer genaueren Betrachtung würdig scheint dieses Peptid vor allem aufgrund seiner bereits bekannten Tumor- und Metastasenassoziation:

Extrazelluläres *Galectin-3* fördert Zellmigration, Zelladhäsion und Zell-Zell-Kontakte [460], während intrazelluläres Gal-3 die FAS-induzierte Apoptose hemmt [461]. Betrachtet man diese Funktionen von *Galectin-3*, ist es nicht verwunderlich, dass eine Überexpression in zahlreichen malignen Tumoren wie Mamma-, Prostata-, Schilddrüsen-, Kolon-, Leber-, Pankreas und Blasenkarzinomen sowie Melanomen [462-472] mit Tumorprogression und Metastasierung assoziiert ist.

Im Nierenzellkarzinom wird die Expression von Galectin-3 kontrovers diskutiert; während ältere Studien eine *Galectin-3*-Überexpression mit Progression und schlechterer Prognose des RCC assoziieren [473], beschreibt eine Studie von 2008 den kompletten Verlust von *Galectin-3* als entscheidenden Schritt in der Karzinogenese des RCCs [474].

Zusätzlich wurde *Galectin-3* als immunodiagnostischer Marker für die Subtypenunterteilung des Nierenzellkarzinoms beschrieben [475].

Ein weiteres Antigen, das aufgrund seiner bereits bekannten Tumorassoziation interessant erscheint, ist der **platelet derived growth factor receptor (PDGFR)**. Aus diesem Protein konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals ein MHC-präsentiertes Peptid **DNSEGLTLLDLL** identifiziert werden.

PDGFRs sind Tyrosinkinaserzeptoren, die sowohl auf zahlreichen Normalgeweben im menschlichen Körper, als auch auf den verschiedensten Neoplasien des Menschen vorkommen [476]. Ihre Funktion ist abhängig von der intrazellulären Signalkaskade und reicht von Zellwachstum über Chemotaxis bis zur Apoptosehemmung [477]. In den letzten Jahren konnte den PDGFRs sowohl eine bedeutende Rolle in der Entwicklung von Organen wie Leber und Nieren [478] als auch in der Entstehung und Progression maligner Tumoren zugesprochen werden [476]. In der Tat konnte für zahlreiche Neoplasien wie beispielsweise Gehirntumoren, Leukämien, GIST-Tumoren, Osteosarkome sowie Ovarial- und Prostatakarzinome eine Überexpression von PDGFR nachgewiesen werden [477, 479-482]. Zusätzlich konnte eine erhöhte Expression von PDGFR in Mamma- [483], Bronchial- [484], Kolon- [485] und Ovarialkarzinomen [486] mit einer schlechteren Prognose und einer erhöhten Metastasierungsrate assoziiert werden.

Auch für das Nierenzellkarzinom wurde PDGFR bereits als prognostischer Marker vorgeschlagen [477]. Studien haben gezeigt, dass eine Überexpression von PDGFR mit höherem Grading der RCCs, sowie kürzerem progressionsfreiem und gesamtem Überleben korreliert [487].

Aufgrund ihres breiten Vorkommens in verschiedensten Neoplasien gelten PDGFRs als bedeutende neue Targets in der Antitumorthherapie. Erste

Tyrosinkinaseinhibitoren (Sunitinib, Imatinib) konnten bereits erfolgreich getestet werden, wobei Sunitinib als orale Medikation in der „second-line“ Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms bereits anerkannt ist [266]. Der im Rahmen dieser Dissertation identifizierte HLA-Ligand aus PDGFR stellt somit einen interessanten Kandidaten für eine Vakzinierungstherapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms dar, auch wenn zum jetzigen Zeitpunkt nur eine Überexpression auf Genomebene und nicht auf HLA-Präsentationsebene gezeigt werden konnte.

4.3. Diskussion der Methoden und Ergebnisse der T-Zell-Experimente

Der entscheidende Schritt in der Identifikation von tumorassoziierten T-Zellepitopen ist die Analyse von Peptiden hinsichtlich ihrer Immunogenität in T-Zell-Stimulationsversuchen. Tumorpeptide, gegen die *in vitro* eine T-Zell-Antwort generiert werden kann, stellen vielversprechende Kandidaten für die Immuntherapie dar. Insgesamt wurden in der vorliegenden Arbeit 5 Peptide in T-Zellstimulationsversuchen auf ihre Immunogenität hin getestet: das HLA-A*02 präsentierte Peptid TVGLIRNL aus *Catenin beta* (CTNNB1), das HLA-A*03 präsentierte Peptid SLLTSSKGQLQK und TSALPIIQK aus *adipose differentiation related protein* (ADFP), das HLA-A*02 präsentierte Peptid SVFAGVVGV aus *guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3* (GUCY1A3), sowie das HLA-A*02 präsentierte Peptid GLNEEIARV aus *kinetochore associated 2* (KNTC2). Insgesamt wurden CD8⁺-T-Zellen von 8 verschiedenen gesunden Spendern auf ihre Reaktivität gegen die genannten Peptide getestet. Die T-Zellen zweier Spender wurden mit dendritischen Zellen stimuliert, alle anderen mit artifiziellen antigenpräsentierenden Zellen (MHC/anti-CD28-Microbeads). Mit den Peptiden aus *Catenin beta* und KNTC2 wurde jeweils nur einmal stimuliert, während T-Zellen von drei Spendern mit den beiden Peptiden aus ADFP und von 4 Spendern mit dem Peptid aus GUCY1A3 stimuliert wurden. Da die T-Zell-Experimente parallel mit den Versuchen zur differentiellen Peptidanalytik begonnen wurden, stammen nur zwei der hier getesteten Peptide aus den analysierten RCC-Proben (TVGLIRNL, RCC399 und

SLLTSSKGQLQK, RCC399). Weitere T-Zell-Stimulationsversuche mit in dieser Dissertation identifizierten tumorassoziierten Peptiden hätten den Rahmen dieser Arbeit gesprengt und bleiben so anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe vorbehalten.

Bedauerlicherweise konnten für drei der fünf Peptide (ADFP, CTNNB1) in keinem der vier Spender schlüssige Ergebnisse generiert werden (Tab.25). Dies liegt daran, dass gegen die als Positivkontrollen verwendeten etablierten T-Zell-Epitope aus Melan-A und Influenza keine T-Zellreaktion beobachtet werden konnte. Es sind also methodische Probleme als Grund für das Fehlschlagen der Experimente anzunehmen. Wie im Ergebnisteil dieser Arbeit gezeigt wurde, verliefen die Arbeitsschritte der Aufreinigung und Kultivierung der CD8⁺-T-Zellen aus Blutprodukten fehlerfrei, in allen analysierten Proben konnten nach der fünfwöchigen Kulturzeit lebende CD8⁺-Zellen nachgewiesen werden. Es ist also wahrscheinlich, dass ein systematischer Fehler in der Stimulation der T-Zellen mit den Peptid:MHC/anti-CD28-Microbeads oder in deren Synthese, bzw. der Aufreinigung und Kultivierung, dendritischer Zellen vorlag. Ebenso als Fehlerquelle nicht auszuschließen ist die analytische Färbung der T-Zellen mit Peptid:MHC-Fluorochrom-Tetrameren. Trotz ausgedehnter Evaluation der Methodik konnte die Fehlerquelle nicht eindeutig festgelegt werden. Letztendlich wird vermutet, dass es sich um Fehler bei der Färbung der stimulierten Zellen handelt, da das oben beschriebene Problem sowohl bei Stimulationsansätzen mit dendritischen Zellen, als auch bei Ansätzen mit aAPCs auftrat. Da beide Stimulationen nur im Protokoll der Tetramerfärbung übereinstimmen, ist das Scheitern der Experimente mit großer Wahrscheinlichkeit in diesem Schritt zu vermuten.

Da das Scheitern der Versuchsansätze mit TVGLIRNL aus *Catenin beta*, sowie SLLTSSKGQLQK und TSALPIIQK aus ADFP, eindeutig auf methodische Probleme zurückzuführen ist, wäre eine erneute T-Zell-Versuchsreihe durchaus wünschenswert. Hier ist vor allem zu beachten, dass für beide Peptide in dieser Dissertation eine Überpräsentation auf HLA-Ebene gezeigt werden konnte, was sie als zukünftige Targets einer Immuntherapie geradezu prädestiniert.

Erfreulicherweise ließen sich in den Positivkontrollen mit Melan A der anderen vier Spender epitopspezifische T-Zellen nachweisen. In diesen Spendern gelang es auch für die Testpeptide positive Nachweise für epitopspezifische T-Zellen zu erbringen.

Für GLNEEIARV aus KNTC2, mit dem nur in einem Spender stimuliert wurde, ergab sich mit nur ca. 0,08% epitopspezifischer Zellen eine sehr fragliche Epitopspezifität. Dies könnte durchaus auch für ein Artefakt sprechen. Allerdings ist zu bedenken, dass sich der Nachweis tumorspezifischer T-Zellen im Vergleich zu virusspezifischen T-Zellen stets viel schwieriger darstellt und häufig nur sehr geringe Mengen epitopspezifischer T-Zellen generiert werden können.

Aus diesem Grund wäre eine Verifizierung der Ergebnisse mittels Interferon- γ -Färbung wünschenswert gewesen, was aufgrund der insgesamt zu geringen Zellzahl in dieser Versuchsreihe leider nicht möglich war.

In insgesamt drei Versuchsreihen ließen sich eindeutig positive Nachweise auf epitopspezifische T-Zellen für das Testpeptid SVFAGVGV aus GUCY1A3 erbringen. Eine Verifizierung dieser Ergebnisse und ein Funktionalitätsnachweis der Zellen mittels Interferon- γ -Färbung gelang weder für das Kontrollpeptid aus Melan A noch für das Testpeptid aus GUCY1A3 (Abb. 18).

Für beide Peptide ließen sich bei dieser Färbung nur sehr geringen Mengen an epitopspezifischen T-Zellen detektieren (Abb. 18 A, B). Zwar zeigte sich für beide Versuchsreihen eine deutliche Interferon- γ -Produktion von CD8⁺-T-Zellen (Abb. 18 C, D) allerdings keine spezifische IFN- γ -Produktion für epitopspezifische T-Zellen (Abb. 18 E, F). Die Gründe hierfür sind ebenfalls am ehesten in der methodischen Durchführung der Färbung zu suchen. Vor allem der wiederholte Verlust von Zellen bei verschiedensten Waschschritten, könnte dazu geführt haben, dass die zuvor schon geringe Zahl epitopspezifischer T-Zellen unter die im FACS detektierbare Grenze reduziert wurde. Die unspezifische IFN- γ -Produktion kann vielfältige Ursachen haben, wie Kreuzreaktionen des IFN-Antikörpers oder eine unspezifische Stimulation der CD8⁺-T-Zellen durch Kontamination.

Auch hier erscheint eine Wiederholung der Stimulation wünschenswert um SVFAGVVGV als T-Zell-Epitop zu bestätigen und die Funktionalität der epitopspezifischen T-Zellen zu prüfen.

Im Falle eines positiven Ausgangs dieser Experimente hätten wir in weiteren Versuchen die zytotoxische Aktivität der T-Zellen gegen peptidpräsentierende Zellen studieren können. Damit wäre die Durchführbarkeit unseres Ansatzes zur Identifizierung tumorassoziierter HLA-Liganden für die Immuntherapie des Nierenzellkarzinoms und die prinzipielle Wirksamkeit dieses Peptids als Therapeutikum zumindest *in vitro* beweisbar gewesen. Eine ausgedehnte Evaluation der Methodik und die folgende erneute Analyse der Peptide ist also zur Klärung dieser Frage unbedingt nötig.

Bei einer Wiederholung der beschriebenen Experimente sei ebenfalls zu beachten, dass in allen Versuchansätzen, bei denen epitopspezifische T-Zellen detektiert wurden, mit aAPCs stimuliert wurde. Versuchsansätze mit DCs ergaben weder für das Kontrollpeptid noch für das Testpeptid positive Ergebnisse (Tab. 24). Es scheint somit sinnvoll die etwas aufwändigere Stimulation mit aAPCs für die Generierung tumorspezifischer CD8⁺-T-Zellen zu nutzen.

5. Zusammenfassung

In den letzten Jahren, wurden zahlreiche Fortschritte auf dem Weg zu einer peptidbasierten Immuntherapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms errungen. Dennoch ist bis heute nahezu nichts über die HLA-Präsentation auf Metastasen im Vergleich zum Primärtumor und Nierennormalgewebe bekannt. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals Primärtumor, Metastasen und Normalgewebe des Nierenzellkarzinoms mit dem Ziel verglichen, Unterschiede und Ähnlichkeiten zwischen diesen Geweben zu identifizieren.

Dieser Vergleich wurde für zwei RCC-Patienten auf HLA-Ligandenebene mittels Massenspektrometrie und für 3 RCC-Patienten auf mRNA-Ebene mittels Oligonukleotid-Mikroarrays durchgeführt. Die in den letzten Jahren entwickelte Methode der differentiellen Peptidanalytik mittels *stable isotope labelling* ermöglichte uns direkte Aussagen über die HLA-Präsentation des gesamten Peptidpools, sowie einzelner Peptide zu treffen; eine Möglichkeit, die zuvor nur auf Genomebene bestand.

Zusätzlich wurden parallel und weitgehend unabhängig Immunogenitätsprüfungen mittels T-Zellexperimenten für interessante Peptide, die im Rahmen dieser Dissertation identifiziert wurden oder bereits als Impfpeptide in RCC-Studien dienen, durchgeführt. Insgesamt wurden fünf Peptide auf ihre Immunogenität getestet, wobei nur für eines (SVFAGVVGV aus GUCY1A3) positive Ergebnisse generiert werden konnten.

Die quantitative Analyse der isolierten HLA-Liganden mittels Edman-Abbau und Westernblot ergab eine deutlich höhere HLA-Präsentation auf Tumor- und Metastasengewebe im Vergleich zum Nierennormalgewebe. Die höchste HLA-Präsentation konnte auf Metastasengewebe nachgewiesen werden.

Mit der qualitativen Analyse konnte gezeigt werden, dass, sowohl auf HLA- als auch auf Genomebene, Primärtumor und Metastase mehr Ähnlichkeiten aufweisen als Primärtumor und Normalgewebe.

Insgesamt konnten im Rahmen dieser Arbeit 142 Peptide identifiziert werden. 14 dieser Peptide zeigten eine signifikante HLA-Überpräsentation auf Tumor-

und Metastasengewebe im Vergleich zum Nierennormalgewebe, darunter Peptide aus *adipose differentiation related protein* (ADFP) und *apolipoprotein L-1* (APOL1), sowie aus *tumor protein p53* (TP53); 6 Peptide zeigten eine signifikante Überpräsentation auf Metastasengewebe im Vergleich zu Tumor- und Normalgewebe, darunter Peptide aus metastasenassoziierten Proteinen, wie *integrin, alpha 2* (ITGA2) und *CD151* (CD151).

Die Ergebnisse unserer Arbeit konnten erstmals zeigen, dass eine peptidbasierte Immuntherapie sowohl gegen den Primärtumor, als auch die Metastasen des Nierenzellkarzinoms gerichtet sein kann, ohne dass sie das gesunde Nierengewebe beeinträchtigt. Des Weiteren konnten zahlreiche neue und interessante tumor- bzw. metastasenassoziierte Peptide identifiziert werden, die für den Einsatz in der Immuntherapie nicht nur des RCC-Primärtumors sondern auch seiner bedrohlich Metastasen geeignet erscheinen.

Abkürzungsverzeichnis

aAPCS	artifizielle antigenpräsentierende Zellen
ABC	ATP-Bindungskassette
ACN	Acetonitril
AML	akute myeloische Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin Triphosphat
ATZ	Anilinothiazolinon
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BrCN	Bromcyan
BSA	Bovines Serum Albumin
Bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
Ca	Karzinom
ccRCC	klarzelliges Nierenzellkarzinom
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDR	<i>complementarity determining region</i>
CEA	Carzinoembryotisches Antigen
CHAPS	3-(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio))-propansulfonate
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CTC	zirkulierende Tumorzelle
CTx	Zytostatikum
Da	Dalton
DC	dendritische Zellen
ddH ₂ O	doppeldestilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPTU	Diphenylharnstoff
DTC	disseminierte Tumorzelle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
ER	endoplasmatisches Retikulum
FACS	<i>fluorescence-activated-cell-sorter</i> (fluoreszenzaktivierter Zellsorter)
GD	Gangliosid
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
HCC	Hepatocelluläres Karzinom
HLA	humanes Leukozyten Antigen
HPV	humanes Papilloma Virus
ICAT	Isotop-kodierte Affinitätsmarkierung
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFA	inkomplettes Freundsches Adjuvans
IL	Interleukin
IFN	Interferon
ITAM	Tyrosinaktivierungssequenz von Immunrezeptoren
Klin	klinisch

LAT	<i>linker of activation in T-cells</i>
LMP	<i>low molecular mass polypeptide</i>
MACS	<i>magnet assisted cell sorting</i>
mAK	monoklonaler Antikörper
MECL	<i>multicatalytic endopeptidase complex like</i>
Met	Metastase
MHC	Majorhistokompatibilitätskomplex
min	Minuten
ml	Milliliter
MMP	Matrixmetalloproteinase
MS	Massenspektrometer
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NaOH	Natriumhydroxid
NCC	Nierenzellkarzinom
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PFS	progressionsfreies Überleben
PITC	Phenylisothiocyanat
pMHC	Peptid:MHC-Ligand
PTC	Phenylthiocarbonyl
PTH	Phenylthiohydantoin
RR	relatives Risiko
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec.	Sekunden
SMD	<i>small molecule drug</i>
TAA	tumor-assoziiertes Antigen
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TBB	<i>Tris BSA buffer</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TFG	<i>transforming growth factor</i>
TILs	<i>tumor infiltrating lymphocytes</i> (tumorinfiltrierende Lymphozyten)
TNM	Tumor-Lymphknoten-Metastasen
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TSA	tumorspezifisches Antigen
TWB	<i>Tris washing buffer</i>
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
z.B.	zum Beispiel
µl	Mikroliter

Literaturverzeichnis

1. P Ehrlich: On immunity with special reference to cell life. Proc Royal Soc London 1900, 66:424-448.
2. QJ Liu, B Gao: Manipulation of MHC-I/TCR interaction for immune therapy. Cell Mol Immunol 2008, 5:171-82.
3. V Steimle, CA Siegrist, A Mottet, B Lisowska-Groszpiere, B Mach: Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. Science 1994, 265:106-9.
4. J Dengjel, MD Nastke, C Gouttefangeas, G Gitsioudis, O Schoor, F Altenberend, M Muller, B Kramer, A Missiou, M Sauter, et al: Unexpected abundance of HLA class II presented peptides in primary renal cell carcinomas. Clin Cancer Res 2006, 12:4163-70.
5. DH Fremont, M Matsumura, EA Stura, PA Peterson, IA Wilson: Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2Kb. Science 1992, 257:919-27.
6. JM Johnson-Tardieu, EW Walworth, JG Cornelius, X Ye, SM Schuster, AB Peck: Autoimmune diabetes-prone NOD mice express the Lyt2 alpha (Lyt2.1) and Lyt3 alpha (Lyt3.1) alleles of CD8. Immunogenetics 1996, 43:6-12.
7. LJ Stern, DC Wiley: Antigenic peptide binding by class I and class II histocompatibility proteins. Structure 1994, 2:245-51.
8. M Bouvier, DC Wiley: Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of MHC class I molecules. Science 1994, 265:398-402.
9. K Falk, O Rotzschke, S Stevanovic, G Jung, HG Rammensee: Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. Nature 1991, 351:290-6.
10. GA Weiss, EJ Collins, DN Garboczi, DC Wiley, SL Schreiber: A tricyclic ring system replaces the variable regions of peptides presented by three alleles of human MHC class I molecules. Chem Biol 1995, 2:401-7.
11. HG Rammensee, K Falk, O Rotzschke: MHC molecules as peptide receptors. Curr Opin Immunol 1993, 5:35-44.
12. A Dessen, CM Lawrence, S Cupo, DM Zaller, DC Wiley: X-ray crystal structure of HLA-DR4 (DRA*0101, DRB1*0401) complexed with a peptide from human collagen II. Immunity 1997, 7:473-81.
13. DH Fremont, WA Hendrickson, P Marrack, J Kappler: Structures of an MHC class II molecule with covalently bound single peptides. Science 1996, 272:1001-4.
14. VL Murthy, LJ Stern: The class II MHC protein HLA-DR1 in complex with an endogenous peptide: implications for the structural basis of the specificity of peptide binding. Structure 1997, 5:1385-96.
15. HG Rammensee: Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. Curr Opin Immunol 1995, 7:85-96.
16. A Rudensky, P Preston-Hurlburt, SC Hong, A Barlow, CA Janeway, Jr.: Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. Nature 1991, 353:622-7.

17. K Falk, O Rotzschke, HG Rammensee: Cellular peptide composition governed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* 1990, 348:248-51.
18. G Niedermann, E Geier, M Lucchiari-Hartz, N Hitziger, A Ramsperger, K Eichmann: The specificity of proteasomes: impact on MHC class I processing and presentation of antigens. *Immunol Rev* 1999, 172:29-48.
19. L Stoltze, AK Nussbaum, A Sijts, NP Emmerich, PM Kloetzel, H Schild: The function of the proteasome system in MHC class I antigen processing. *Immunol Today* 2000, 21:317-9.
20. J Yewdell, LC Anton, I Bacik, U Schubert, HL Snyder, JR Bennink: Generating MHC class I ligands from viral gene products. *Immunol Rev* 1999, 172:97-108.
21. IA York, AL Goldberg, XY Mo, KL Rock: Proteolysis and class I major histocompatibility complex antigen presentation. *Immunol Rev* 1999, 172:49-66.
22. A Townsend, C Ohlen, L Foster, J Bastin, HG Ljunggren, K Karre: A mutant cell in which association of class I heavy and light chains is induced by viral peptides. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989, 54 Pt 1:299-308.
23. R Abele, R Tampe: The ABCs of immunology: structure and function of TAP, the transporter associated with antigen processing. *Physiology (Bethesda)* 2004, 19:216-24.
24. B Lankat-Buttgereit, R Tampe: The transporter associated with antigen processing TAP: structure and function. *FEBS Lett* 1999, 464:108-12.
25. S Uebel, R Tampe: Specificity of the proteasome and the TAP transporter. *Curr Opin Immunol* 1999, 11:203-8.
26. E Pamer, P Cresswell: Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol* 1998, 16:323-58.
27. PM van Endert: Genes regulating MHC class I processing of antigen. *Curr Opin Immunol* 1999, 11:82-8.
28. GG Burrows, K Ariail, B Celnik, JE Gamber, BF Bebo, Jr., H Offner, AA Vandenberg: Variation in H-2K(k) peptide motif revealed by sequencing naturally processed peptides from T-cell hybridoma class I molecules. *J Neurosci Res* 1996, 45:803-11.
29. P Cresswell, AL Ackerman, A Giodini, DR Peaper, PA Wearsch: Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. *Immunol Rev* 2005, 207:145-57.
30. P Cresswell, N Bangia, T Dick, G Diedrich: The nature of the MHC class I peptide loading complex. *Immunol Rev* 1999, 172:21-8.
31. PM Day, JW Yewdell, A Porgador, RN Germain, JR Bennink: Direct delivery of exogenous MHC class I molecule-binding oligopeptides to the endoplasmic reticulum of viable cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94:8064-9.
32. IA York, KL Rock: Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 1996, 14:369-96.
33. FV Cromme, J Airey, MT Heemels, HL Ploegh, PJ Keating, PL Stern, CJ Meijer, JM Walboomers: Loss of transporter protein, encoded by the

- TAP-1 gene, is highly correlated with loss of HLA expression in cervical carcinomas. *J Exp Med* 1994, 179:335-40.
34. DM Miller, DD Sedmak: Viral effects on antigen processing. *Curr Opin Immunol* 1999, 11:94-9.
 35. B Seliger, MJ Maeurer, S Ferrone: Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol Today* 2000, 21:455-64.
 36. F Esquivel, J Yewdell, J Bennink: RMA/S cells present endogenously synthesized cytosolic proteins to class I-restricted cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1992, 175:163-8.
 37. NA Hosken, MJ Bevan: An endogenous antigenic peptide bypasses the class I antigen presentation defect in RMA-S. *J Exp Med* 1992, 175:719-29.
 38. R Khanna, SR Burrows, DJ Moss, SL Silins: Peptide transporter (TAP-1 and TAP-2)-independent endogenous processing of Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 2A: implications for cytotoxic T-lymphocyte control of EBV-associated malignancies. *J Virol* 1996, 70:5357-62.
 39. HG Ljunggren, NJ Stam, C Ohlen, JJ Neefjes, P Hoglund, MT Heemels, J Bastin, TN Schumacher, A Townsend, K Karre, et al: Empty MHC class I molecules come out in the cold. *Nature* 1990, 346:476-80.
 40. Y Shi, KD Smith, CT Lutz: TAP-independent MHC class I peptide antigen presentation to alloreactive CTL is enhanced by target cell incubation at subphysiologic temperatures. *J Immunol* 1998, 160:4305-12.
 41. I Bacik, JH Cox, R Anderson, JW Yewdell, JR Bennink: TAP (transporter associated with antigen processing)-independent presentation of endogenously synthesized peptides is enhanced by endoplasmic reticulum insertion sequences located at the amino- but not carboxyl-terminus of the peptide. *J Immunol* 1994, 152:381-7.
 42. H de la Salle, E Houssaint, MA Peyrat, D Arnold, J Salamero, D Pinczon, S Stevanovic, H Bausinger, D Fricker, E Gomard, et al: Human peptide transporter deficiency: importance of HLA-B in the presentation of TAP-independent EBV antigens. *J Immunol* 1997, 158:4555-63.
 43. PA MacAry, M Lindsay, MA Scott, JI Craig, JP Luzio, PJ Lehner: Mobilization of MHC class I molecules from late endosomes to the cell surface following activation of CD34-derived human Langerhans cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98:3982-7.
 44. KD Smith, CT Lutz: Peptide-dependent expression of HLA-B7 on antigen processing-deficient T2 cells. *J Immunol* 1996, 156:3755-64.
 45. X Zhou, R Glas, T Liu, HG Ljunggren, M Jondal: Antigen processing mutant T2 cells present viral antigen restricted through H-2Kb. *Eur J Immunol* 1993, 23:1802-8.
 46. HJ Zweerink, MC Gammon, U Utz, SY Sauma, T Harrer, JC Hawkins, RP Johnson, A Sirotna, JD Hermes, BD Walker, et al: Presentation of endogenous peptides to MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes in transport deletion mutant T2 cells. *J Immunol* 1993, 150:1763-71.
 47. SP Clark, Y Yoshikai, S Taylor, G Siu, L Hood, TW Mak: Identification of a diversity segment of human T-cell receptor beta-chain, and comparison with the analogous murine element. *Nature* 1984, 311:387-9.

48. TW Mak, Y Yanagi: Genes encoding the human T cell antigen receptor. *Immunol Rev* 1984, 81:221-33.
49. G Siu, SP Clark, Y Yoshikai, M Malissen, Y Yanagi, E Strauss, TW Mak, L Hood: The human T cell antigen receptor is encoded by variable, diversity, and joining gene segments that rearrange to generate a complete V gene. *Cell* 1984, 37:393-401.
50. Y Yanagi, Y Yoshikai, K Leggett, SP Clark, I Aleksander, TW Mak: A human T cell-specific cDNA clone encodes a protein having extensive homology to immunoglobulin chains. *Nature* 1984, 308:145-9.
51. S Beetz, D Wesch, L Marischen, S Welte, HH Oberg, D Kabelitz: Innate immune functions of human gammadelta T cells. *Immunobiology* 2008, 213:173-82.
52. B Moser, M Eberl: gammadelta T cells: novel initiators of adaptive immunity. *Immunol Rev* 2007, 215:89-102.
53. KC Garcia, M Degano, RL Stanfield, A Brunmark, MR Jackson, PA Peterson, L Teyton, IA Wilson: An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science* 1996, 274:209-19.
54. D Housset, G Mazza, C Gregoire, C Piras, B Malissen, JC Fontecilla-Camps: The three-dimensional structure of a T-cell antigen receptor V alpha V beta heterodimer reveals a novel arrangement of the V beta domain. *EMBO J* 1997, 16:4205-16.
55. MM Davis, PJ Bjorkman: T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 1988, 334:395-402.
56. JL Jorgensen, U Esser, B Fazekas de St Groth, PA Reay, MM Davis: Mapping T-cell receptor-peptide contacts by variant peptide immunization of single-chain transgenics. *Nature* 1992, 355:224-30.
57. J Borst, H Jacobs, G Brouns: Composition and function of T-cell receptor and B-cell receptor complexes on precursor lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 1996, 8:181-90.
58. B Malissen, L Ardouin, SY Lin, A Gillet, M Malissen: Function of the CD3 subunits of the pre-TCR and TCR complexes during T cell development. *Adv Immunol* 1999, 72:103-48.
59. TW Gobel, L Bolliger: Evolution of the T cell receptor signal transduction units. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000, 248:303-20.
60. GA Bentley, RA Mariuzza: The structure of the T cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol* 1996, 14:563-90.
61. DN Garboczi, P Ghosh, U Utz, QR Fan, WE Biddison, DC Wiley: Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* 1996, 384:134-41.
62. J Buslepp, H Wang, WE Biddison, E Appella, EJ Collins: A correlation between TCR Valpha docking on MHC and CD8 dependence: implications for T cell selection. *Immunity* 2003, 19:595-606.
63. MK Teng, A Smolyar, AG Tse, JH Liu, J Liu, RE Hussey, SG Nathenson, HC Chang, EL Reinherz, JH Wang: Identification of a common docking topology with substantial variation among different TCR-peptide-MHC complexes. *Curr Biol* 1998, 8:409-12.

64. YH Ding, KJ Smith, DN Garboczi, U Utz, WE Biddison, DC Wiley: Two human T cell receptors bind in a similar diagonal mode to the HLA-A2/Tax peptide complex using different TCR amino acids. *Immunity* 1998, 8:403-11.
65. KC Garcia, M Degano, LR Pease, M Huang, PA Peterson, L Teyton, IA Wilson: Structural basis of plasticity in T cell receptor recognition of a self peptide-MHC antigen. *Science* 1998, 279:1166-72.
66. S Kageyama, TJ Tsomides, Y Sykulev, HN Eisen: Variations in the number of peptide-MHC class I complexes required to activate cytotoxic T cell responses. *J Immunol* 1995, 154:567-76.
67. M Krogsgaard, MM Davis: How T cells 'see' antigen. *Nat Immunol* 2005, 6:239-45.
68. JA Weidanz, T Nguyen, T Woodburn, FA Neethling, M Chiriva-Internati, WH Hildebrand, J Lustgarten: Levels of specific peptide-HLA class I complex predicts tumor cell susceptibility to CTL killing. *J Immunol* 2006, 177:5088-97.
69. J Lin, A Weiss: T cell receptor signalling. *J Cell Sci* 2001, 114:243-4.
70. M Turner, E Schweighoffer, F Colucci, JP Di Santo, VL Tybulewicz: Tyrosine kinase SYK: essential functions for immunoreceptor signalling. *Immunol Today* 2000, 21:148-54.
71. KE Zoller, IA MacNeil, JS Brugge: Protein tyrosine kinases Syk and ZAP-70 display distinct requirements for Src family kinases in immune response receptor signal transduction. *J Immunol* 1997, 158:1650-9.
72. C Visco, G Magistrelli, R Bosotti, R Perego, L Rusconi, S Toma, M Zamai, O Acuto, A Isacchi: Activation of Zap-70 tyrosine kinase due to a structural rearrangement induced by tyrosine phosphorylation and/or ITAM binding. *Biochemistry* 2000, 39:2784-91.
73. B Schraven, A Marie-Cardine, C Hubener, E Bruyns, I Ding: Integration of receptor-mediated signals in T cells by transmembrane adaptor proteins. *Immunol Today* 1999, 20:431-4.
74. NS van Oers: T cell receptor-mediated signs and signals governing T cell development. *Semin Immunol* 1999, 11:227-37.
75. M Barry, JA Heibin, MJ Pinkoski, SF Lee, RW Moyer, DR Green, RC Bleackley: Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Mol Cell Biol* 2000, 20:3781-94.
76. KM Edwards, JE Davis, KA Browne, VR Sutton, JA Trapani: Anti-viral strategies of cytotoxic T lymphocytes are manifested through a variety of granule-bound pathways of apoptosis induction. *Immunol Cell Biol* 1999, 77:76-89.
77. IM Medana, A Gallimore, A Oxenius, MM Martinic, H Wekerle, H Neumann: MHC class I-restricted killing of neurons by virus-specific CD8+ T lymphocytes is effected through the Fas/FasL, but not the perforin pathway. *Eur J Immunol* 2000, 30:3623-33.
78. T Suda, T Takahashi, P Golstein, S Nagata: Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993, 75:1169-78.

79. R Watanabe-Fukunaga, CI Brannan, NG Copeland, NA Jenkins, S Nagata: Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 1992, 356:314-7.
80. MF Callan, C Fazou, H Yang, T Rostron, K Poon, C Hatton, AJ McMichael: CD8(+) T-cell selection, function, and death in the primary immune response in vivo. *J Clin Invest* 2000, 106:1251-61.
81. DH Fowler, RE Gress: Th2 and Tc2 cells in the regulation of GVHD, GVL, and graft rejection: considerations for the allogeneic transplantation therapy of leukemia and lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2000, 38:221-34.
82. M Vukmanovic-Stejic, B Vyas, P Gorak-Stolinska, A Noble, DM Kemeny: Human Tc1 and Tc2/Tc0 CD8 T-cell clones display distinct cell surface and functional phenotypes. *Blood* 2000, 95:231-40.
83. C WB: Further observations upon treatment of malignant tumors with the toxins of erysipelas and *Bacillus prodigiosus* with a report of 160 cases. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1896, 7:157-162.
84. GP Dunn, AT Bruce, H Ikeda, LJ Old, RD Schreiber: Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002, 3:991-8.
85. JF Buell, TG Gross, ES Woodle: Malignancy after transplantation. *Transplantation* 2005, 80:S254-64.
86. EM Jaffee, DM Pardoll: Murine tumor antigens: is it worth the search? *Curr Opin Immunol* 1996, 8:622-7.
87. H-GR Christoph Huber, Thomas Wölfel: *Krebsimmuntherapie*. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag; 2008.
88. HG Rammensee, T Weinschenk, C Gouttefangeas, S Stevanovic: Towards patient-specific tumor antigen selection for vaccination. *Immunol Rev* 2002, 188:164-76.
89. T Wolfel, M Hauer, J Schneider, M Serrano, C Wolfel, E Klehmann-Hieb, E De Plaen, T Hankeln, KH Meyer zum Buschenfelde, D Beach: A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 1995, 269:1281-4.
90. I Saeterdal, J Bjorheim, K Lislud, MK Gjertsen, IK Bukholm, OC Olsen, JM Nesland, JA Eriksen, M Moller, A Lindblom, et al: Frameshift-mutation-derived peptides as tumor-specific antigens in inherited and spontaneous colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98:13255-60.
91. RE Clark, IA Dodi, SC Hill, JR Lill, G Aubert, AR Macintyre, J Rojas, A Bourdon, PL Bonner, L Wang, et al: Direct evidence that leukemic cells present HLA-associated immunogenic peptides derived from the BCR-ABL b3a2 fusion protein. *Blood* 2001, 98:2887-93.
92. JC Skipper, RC Hendrickson, PH Gulden, V Brichard, A Van Pel, Y Chen, J Shabanowitz, T Wolfel, CL Slingluff, Jr., T Boon, et al: An HLA-A2-restricted tyrosinase antigen on melanoma cells results from posttranslational modification and suggests a novel pathway for processing of membrane proteins. *J Exp Med* 1996, 183:527-34.
93. I Tarpey, S Stacey, J Hickling, HD Birley, A Renton, A McIndoe, DH Davies: Human cytotoxic T lymphocytes stimulated by endogenously

- processed human papillomavirus type 11 E7 recognize a peptide containing a HLA-A2 (A*0201) motif. *Immunology* 1994, 81:222-7.
94. KY Tsang, S Zaremba, CA Nieroda, MZ Zhu, JM Hamilton, J Schlom: Generation of human cytotoxic T cells specific for human carcinoembryonic antigen epitopes from patients immunized with recombinant vaccinia-CEA vaccine. *J Natl Cancer Inst* 1995, 87:982-90.
 95. C Traversari, P van der Bruggen, IF Luescher, C Lurquin, P Chomez, A Van Pel, E De Plaen, A Amar-Costesec, T Boon: A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E. *J Exp Med* 1992, 176:1453-7.
 96. ML Disis, MA Cheever: HER-2/neu oncogenic protein: issues in vaccine development. *Crit Rev Immunol* 1998, 18:37-45.
 97. V Karanikas, LA Hwang, J Pearson, CS Ong, V Apostolopoulos, H Vaughan, PX Xing, G Jamieson, G Pietersz, B Tait, et al: Antibody and T cell responses of patients with adenocarcinoma immunized with mannan-MUC1 fusion protein. *J Clin Invest* 1997, 100:2783-92.
 98. DA Cheresh, CJ Honsik, LK Staffileno, G Jung, RA Reisfeld: Disialoganglioside GD3 on human melanoma serves as a relevant target antigen for monoclonal antibody-mediated tumor cytolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985, 82:5155-9.
 99. E Jager, YT Chen, JW Drijfhout, J Karbach, M Ringhoffer, D Jager, M Arand, H Wada, Y Noguchi, E Stockert, et al: Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *J Exp Med* 1998, 187:265-70.
 100. N Renkvist, C Castelli, PF Robbins, G Parmiani: A listing of human tumor antigens recognized by T cells. *Cancer Immunol Immunother* 2001, 50:3-15.
 101. GM Halliday, A Patel, MJ Hunt, FJ Tefany, RS Barnetson: Spontaneous regression of human melanoma/nonmelanoma skin cancer: association with infiltrating CD4+ T cells. *World J Surg* 1995, 19:352-8.
 102. T Inoue, K Yoneda, M Manabe, T Demitsu: Spontaneous regression of merkel cell carcinoma: a comparative study of TUNEL index and tumor-infiltrating lymphocytes between spontaneous regression and non-regression group. *J Dermatol Sci* 2000, 24:203-11.
 103. KM Kerr, SK Johnson, G King, MM Kennedy, J Weir, R Jeffrey: Partial regression in primary carcinoma of the lung: does it occur? *Histopathology* 1998, 33:55-63.
 104. JB Haanen, A Baars, R Gomez, P Weder, M Smits, TD de Gruijl, BM von Blomberg, E Bloemena, RJ Scheper, SM van Ham, et al: Melanoma-specific tumor-infiltrating lymphocytes but not circulating melanoma-specific T cells may predict survival in resected advanced-stage melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother* 2006, 55:451-8.
 105. F Pages, A Berger, M Camus, F Sanchez-Cabo, A Costes, R Molidor, B Mlecnik, A Kirilovsky, M Nilsson, D Damotte, et al: Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005, 353:2654-66.

106. L Zhang, JR Conejo-Garcia, D Katsaros, PA Gimotty, M Massobrio, G Regnani, A Makrigiannakis, H Gray, K Schlienger, MN Liebman, et al: Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003, 348:203-13.
107. H Ji, AM Houghton, TJ Mariani, S Perera, CB Kim, R Padera, G Tonon, K McNamara, LA Marconcini, A Hezel, et al: K-ras activation generates an inflammatory response in lung tumors. *Oncogene* 2006, 25:2105-12.
108. JP Russell, JB Engiles, JL Rothstein: Proinflammatory mediators and genetic background in oncogene mediated tumor progression. *J Immunol* 2004, 172:4059-67.
109. KL Rock, A Hearn, CJ Chen, Y Shi: Natural endogenous adjuvants. *Springer Semin Immunopathol* 2005, 26:231-46.
110. CA Carlos, HF Dong, OM Howard, JJ Oppenheim, FG Hanisch, OJ Finn: Human tumor antigen MUC1 is chemotactic for immature dendritic cells and elicits maturation but does not promote Th1 type immunity. *J Immunol* 2005, 175:1628-35.
111. E Saeland, SJ van Vliet, M Backstrom, VC van den Berg, TB Geijtenbeek, GA Meijer, Y van Kooyk: The C-type lectin MGL expressed by dendritic cells detects glycan changes on MUC1 in colon carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 2007, 56:1225-36.
112. WF Bodmer, MJ Browning, P Krausa, A Rowan, DC Bicknell, JG Bodmer: Tumor escape from immune response by variation in HLA expression and other mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 1993, 690:42-9.
113. LA Koopman, WE Corver, AR van der Slik, MJ Giphart, GJ Fleuren: Multiple genetic alterations cause frequent and heterogeneous human histocompatibility leukocyte antigen class I loss in cervical cancer. *J Exp Med* 2000, 191:961-76.
114. A Houston, MW Bennett, GC O'Sullivan, F Shanahan, J O'Connell: Fas ligand mediates immune privilege and not inflammation in human colon cancer, irrespective of TGF-beta expression. *Br J Cancer* 2003, 89:1345-51.
115. AJ Muller, GC Prendergast: Indoleamine 2,3-dioxygenase in immune suppression and cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2007, 7:31-40.
116. BA Teicher: Transforming growth factor-beta and the immune response to malignant disease. *Clin Cancer Res* 2007, 13:6247-51.
117. C Bergmann, L Strauss, R Zeidler, S Lang, TL Whiteside: Expansion and characteristics of human T regulatory type 1 cells in co-cultures simulating tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother* 2007, 56:1429-42.
118. PE Fecci, DA Mitchell, JF Whitesides, W Xie, AH Friedman, GE Archer, JE Herndon, 2nd, DD Bigner, G Dranoff, JH Sampson: Increased regulatory T-cell fraction amidst a diminished CD4 compartment explains cellular immune defects in patients with malignant glioma. *Cancer Res* 2006, 66:3294-302.
119. G Klein: Cancer, apoptosis, and nonimmune surveillance. *Cell Death Differ* 2004, 11:13-7.
120. G Kohler, C Milstein: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975, 256:495-7.

121. GJ Weiner, BK Link: Monoclonal antibody therapy of B cell lymphoma. *Expert Opin Biol Ther* 2004, 4:375-85.
122. S Lien, HB Lowman: Therapeutic anti-VEGF antibodies. *Handb Exp Pharmacol* 2008:131-50.
123. MJ Piccart-Gebhart, M Procter, B Leyland-Jones, A Goldhirsch, M Untch, I Smith, L Gianni, J Baselga, R Bell, C Jackisch, et al: Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005, 353:1659-72.
124. G Enblad, H Hagberg, M Erlanson, J Lundin, AP MacDonald, R Repp, J Schetelig, G Seipelt, A Osterborg: A pilot study of alemtuzumab (anti-CD52 monoclonal antibody) therapy for patients with relapsed or chemotherapy-refractory peripheral T-cell lymphomas. *Blood* 2004, 103:2920-4.
125. M Gramatzki, R Burger, G Strobel, U Trautmann, CR Bartram, G Helm, G Horneff, S Alsalameh, M Jonker, E Gebhart, et al: Therapy with OKT3 monoclonal antibody in refractory T cell acute lymphoblastic leukemia induces interleukin-2 responsiveness. *Leukemia* 1995, 9:382-90.
126. R Perez-Soler, A Chachoua, LA Hammond, EK Rowinsky, M Huberman, D Karp, J Rigas, GM Clark, P Santabarbara, P Bonomi: Determinants of tumor response and survival with erlotinib in patients with non--small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2004, 22:3238-47.
127. WJ Urba, C Ewel, W Kopp, JW Smith, 2nd, RG Steis, JD Ashwell, SP Creekmore, J Rossio, M Sznol, W Sharfman, et al: Anti-CD3 monoclonal antibody treatment of patients with CD3-negative tumors: a phase IA/B study. *Cancer Res* 1992, 52:2394-401.
128. M Feuring-Buske, M Kneba, M Unterhalt, A Engert, M Gramatzki, E Hiller, L Trumper, W Brugger, H Ostermann, J Atzpodien, et al: IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 antibody treatment in relapsed advanced-stage follicular lymphomas: results of a phase-II study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Ann Hematol* 2000, 79:493-500.
129. OJ Finn: Cancer immunology. *N Engl J Med* 2008, 358:2704-15.
130. NA Mitchison: Immunologic approach to cancer. *Transplant Proc* 1970, 2:92-103.
131. SA Rosenberg, BS Packard, PM Aebersold, D Solomon, SL Topalian, ST Toy, P Simon, MT Lotze, JC Yang, CA Seipp, et al: Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N Engl J Med* 1988, 319:1676-80.
132. CM Bollard, L Aguilar, KC Straathof, B Gahn, MH Huls, A Rousseau, J Sixbey, MV Gresik, G Carrum, M Hudson, et al: Cytotoxic T lymphocyte therapy for Epstein-Barr virus+ Hodgkin's disease. *J Exp Med* 2004, 200:1623-33.
133. ME Dudley, JR Wunderlich, JC Yang, RM Sherry, SL Topalian, NP Restifo, RE Royal, U Kammula, DE White, SA Mavroukakis, et al: Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2005, 23:2346-57.

134. A Mackensen, N Meidenbauer, S Vogl, M Laumer, J Berger, R Andreesen: Phase I study of adoptive T-cell therapy using antigen-specific CD8+ T cells for the treatment of patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2006, 24:5060-9.
135. C Yee, JA Thompson, D Byrd, SR Riddell, P Roche, E Celis, PD Greenberg: Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99:16168-73.
136. U Koehl, J Sorensen, R Esser, S Zimmermann, HP Gruttner, T Tonn, C Seidl, E Seifried, T Klingebiel, D Schwabe: IL-2 activated NK cell immunotherapy of three children after haploidentical stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis* 2004, 33:261-6.
137. JS Miller, Y Soignier, A Panoskaltsis-Mortari, SA McNearney, GH Yun, SK Fautsch, D McKenna, C Le, TE Defor, LJ Burns, et al: Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood* 2005, 105:3051-7.
138. JR Passweg, A Tichelli, S Meyer-Monard, D Heim, M Stern, T Kuhne, G Favre, A Gratwohl: Purified donor NK-lymphocyte infusion to consolidate engraftment after haploidentical stem cell transplantation. *Leukemia* 2004, 18:1835-8.
139. TM Clay, MC Custer, J Sachs, P Hwu, SA Rosenberg, MI Nishimura: Efficient transfer of a tumor antigen-reactive TCR to human peripheral blood lymphocytes confers anti-tumor reactivity. *J Immunol* 1999, 163:507-13.
140. RJ Orentas, SJ Roskopf, GP Nolan, MI Nishimura: Retroviral transduction of a T cell receptor specific for an Epstein-Barr virus-encoded peptide. *Clin Immunol* 2001, 98:220-8.
141. RA Willemsen, ME Weijtens, C Ronteltap, Z Eshhar, JW Gratama, P Chames, RL Bolhuis: Grafting primary human T lymphocytes with cancer-specific chimeric single chain and two chain TCR. *Gene Ther* 2000, 7:1369-77.
142. SA Rosenberg, ME Dudley: Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101 Suppl 2:14639-45.
143. E Jager, M Ringhoffer, M Altmannsberger, M Arand, J Karbach, D Jager, F Oesch, A Knuth: Immunoselection in vivo: independent loss of MHC class I and melanocyte differentiation antigen expression in metastatic melanoma. *Int J Cancer* 1997, 71:142-7.
144. KL Knutson, K Schiffman, ML Disis: Immunization with a HER-2/neu helper peptide vaccine generates HER-2/neu CD8 T-cell immunity in cancer patients. *J Clin Invest* 2001, 107:477-84.
145. SA Rosenberg, JC Yang, NP Restifo: Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 2004, 10:909-15.
146. C Lemmel, S Weik, U Eberle, J Dengjel, T Kratt, HD Becker, HG Rammensee, S Stevanovic: Differential quantitative analysis of MHC ligands by mass spectrometry using stable isotope labeling. *Nat Biotechnol* 2004, 22:450-4.

147. E Davila, R Kennedy, E Celis: Generation of antitumor immunity by cytotoxic T lymphocyte epitope peptide vaccination, CpG-oligodeoxynucleotide adjuvant, and CTLA-4 blockade. *Cancer Res* 2003, 63:3281-8.
148. G Dranoff, E Jaffee, A Lazenby, P Golumbek, H Levitsky, K Brose, V Jackson, H Hamada, D Pardoll, RC Mulligan: Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, 90:3539-43.
149. JJ Donnelly, JB Ulmer, JW Shiver, MA Liu: DNA vaccines. *Annu Rev Immunol* 1997, 15:617-48.
150. DM Pardoll: Spinning molecular immunology into successful immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2002, 2:227-38.
151. SA Rosenberg: Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 2001, 411:380-4.
152. K Murali-Krishna, JD Altman, M Suresh, DJ Sourdive, AJ Zajac, JD Miller, J Slansky, R Ahmed: Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* 1998, 8:177-87.
153. M Bellone, D Cantarella, P Castiglioni, MC Crosti, A Ronchetti, M Moro, MP Garancini, G Casorati, P Dellabona: Relevance of the tumor antigen in the validation of three vaccination strategies for melanoma. *J Immunol* 2000, 165:2651-6.
154. Y Lou, G Wang, G Lizee, GJ Kim, SE Finkelstein, C Feng, NP Restifo, P Hwu: Dendritic cells strongly boost the antitumor activity of adoptively transferred T cells in vivo. *Cancer Res* 2004, 64:6783-90.
155. K Shimizu, EK Thomas, M Giedlin, JJ Mule: Enhancement of tumor lysate- and peptide-pulsed dendritic cell-based vaccines by the addition of foreign helper protein. *Cancer Res* 2001, 61:2618-24.
156. JN Kochenderfer, RE Gress: A comparison and critical analysis of preclinical anticancer vaccination strategies. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007, 232:1130-41.
157. ID Davis, W Chen, H Jackson, P Parente, M Shackleton, W Hopkins, Q Chen, N Dimopoulos, T Luke, R Murphy, et al: Recombinant NY-ESO-1 protein with ISCOMATRIX adjuvant induces broad integrated antibody and CD4(+) and CD8(+) T cell responses in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101:10697-702.
158. D Rudolf, T Silberzahn, S Walter, D Maurer, J Engelhard, D Wernet, HJ Buhring, G Jung, BS Kwon, HG Rammensee, et al: Potent costimulation of human CD8 T cells by anti-4-1BB and anti-CD28 on synthetic artificial antigen presenting cells. *Cancer Immunol Immunother* 2008, 57:175-83.
159. DE Speiser, D Lienard, N Rufer, V Rubio-Godoy, D Rimoldi, F Lejeune, AM Krieg, JC Cerottini, P Romero: Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909. *J Clin Invest* 2005, 115:739-46.
160. AF Chambers, LM Matrisian: Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 1997, 89:1260-70.

161. IDJ Bross, Blumenson, L.E.: Metastatic sites that produce generalized cancer: identification of generalizing sites.: North-Holland Publ. Co, Amsterdam-Oxford; 1976.
162. LS-S Liotta, WG: Principles of molecular cell biology of cancer metastasis; 1989.
163. G Poste, IJ Fidler: The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature* 1980, 283:139-46.
164. PM Gullino: In vivo release of neoplastic cells by mammary tumors. Baltimore-London-Tokyo: University Park Press; 1977.
165. G Belleannee: [The TNM system: only 3 letters for a rich but sometimes ambiguous language]. *Ann Pathol* 2006, 26:435-44; quiz 418.
166. R Willis: The spread of human tumours in the human body. London: Butterworth; 1973.
167. JH Morgan-Parkes: Metastases: mechanisms, pathways, and cascades. *AJR Am J Roentgenol* 1995, 164:1075-82.
168. R Carter: General pathology of the metastatic process. In: Secondary spread of cancer Edited by R Baldwin. San Diego, CA: Academic Press; 1978: 1-52.
169. I Hart: the spread of tumours. In: Introduction to the cellular and molecular biology of cancer Edited by L Franks, Teich, NM. New York: Oxford Univ. Press; 1991: 31-48.
170. H Kaiser: Spreading by implantation on epithelial surfaces and iatrogenic spreading by implantation. In: Local invasion and spread of cancer Edited by K Brunson, vol. 7. Netherlands: Kluwer; 1988: 38-41.
171. IJ Fidler: Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res* 1978, 38:2651-60.
172. HE Walther: Krebsmetastasen. Basel: Benno Schwabe-Verlag; 1948.
173. IJ Fidler: The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 2003, 3:453-8.
174. GL Nicolson: Paracrine and autocrine growth mechanisms in tumor metastasis to specific sites with particular emphasis on brain and lung metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1993, 12:325-43.
175. S Paget: The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* 1989, 8:98-101.
176. CY Dai, CM Haqq, JE Puzas: Molecular correlates of site-specific metastasis. *Semin Radiat Oncol* 2006, 16:102-10.
177. SA Eccles: Targeting key steps in metastatic tumour progression. *Curr Opin Genet Dev* 2005, 15:77-86.
178. MH Herynk, O Stoeltzing, N Reinmuth, NU Parikh, R Abounader, J Lattera, R Radinsky, LM Ellis, GE Gallick: Down-regulation of c-Met inhibits growth in the liver of human colorectal carcinoma cells. *Cancer Res* 2003, 63:2990-6.
179. C Parker, BJ Roseman, CD Bucana, R Tsan, R Radinsky: Preferential activation of the epidermal growth factor receptor in human colon carcinoma liver metastases in nude mice. *J Histochem Cytochem* 1998, 46:595-602.

180. Y Kang, PM Siegel, W Shu, M Drobnjak, SM Kakonen, C Cordon-Cardo, TA Guise, J Massague: A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* 2003, 3:537-49.
181. AJ Minn, Y Kang, I Serganova, GP Gupta, DD Giri, M Doubrovin, V Ponomarev, WL Gerald, R Blasberg, J Massague: Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors. *J Clin Invest* 2005, 115:44-55.
182. SA Eccles, DR Welch: Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *Lancet* 2007, 369:1742-57.
183. BA Yoshida, MM Sokoloff, DR Welch, CW Rinker-Schaeffer: Metastasis-suppressor genes: a review and perspective on an emerging field. *J Natl Cancer Inst* 2000, 92:1717-30.
184. R Bernards, RA Weinberg: A progression puzzle. *Nature* 2002, 418:823.
185. DX Nguyen, J Massague: Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet* 2007, 8:341-52.
186. S Ramaswamy, KN Ross, ES Lander, TR Golub: A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet* 2003, 33:49-54.
187. U Woelfle, J Cloos, G Sauter, L Riethdorf, F Janicke, P van Diest, R Brakenhoff, K Pantel: Molecular signature associated with bone marrow micrometastasis in human breast cancer. *Cancer Res* 2003, 63:5679-84.
188. B Weigelt, AJ Bosma, AA Hart, S Rodenhuis, LJ van 't Veer: Marker genes for circulating tumour cells predict survival in metastasized breast cancer patients. *Br J Cancer* 2003, 88:1091-4.
189. K Pantel, RH Brakenhoff: Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 2004, 4:448-56.
190. MA Huber, N Kraut, H Beug: Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 2005, 17:548-58.
191. EJ Robson, WT Khaled, K Abell, CJ Watson: Epithelial-to-mesenchymal transition confers resistance to apoptosis in three murine mammary epithelial cell lines. *Differentiation* 2006, 74:254-64.
192. L Larue, A Bellacosa: Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene* 2005, 24:7443-54.
193. JM Lee, S Dedhar, R Kalluri, EW Thompson: The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 2006, 172:973-81.
194. NA Gloushankova: Changes in regulation of cell-cell adhesion during tumor transformation. *Biochemistry (Mosc)* 2008, 73:742-50.
195. SM Frisch, E Ruoslahti: Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol* 1997, 9:701-6.
196. SM Frisch, RA Screaton: Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* 2001, 13:555-62.
197. LA Liotta, E Kohn: Anoikis: cancer and the homeless cell. *Nature* 2004, 430:973-4.
198. P Mehlen, A Puisieux: Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer* 2006, 6:449-58.
199. J Folkman: Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res* 1985, 43:175-203.

200. G Bergers, LE Benjamin: Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003, 3:401-10.
201. KS Klos, SL Wyszomierski, M Sun, M Tan, X Zhou, P Li, W Yang, G Yin, WN Hittelman, D Yu: ErbB2 increases vascular endothelial growth factor protein synthesis via activation of mammalian target of rapamycin/p70S6K leading to increased angiogenesis and spontaneous metastasis of human breast cancer cells. *Cancer Res* 2006, 66:2028-37.
202. Y Mizukami, K Fujiki, EM Duerr, M Gala, WS Jo, X Zhang, DC Chung: Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor through the induction of phosphatidylinositol 3-kinase/Rho/ROCK and c-Myc. *J Biol Chem* 2006, 281:13957-63.
203. P Strauli, L Weiss: Cell locomotion and tumor penetration. Report on a workshop of the EORTC cell surface project group. *Eur J Cancer* 1977, 13:1-12.
204. TP Butler, PM Gullino: Quantitation of cell shedding into efferent blood of mammary adenocarcinoma. *Cancer Res* 1975, 35:512-6.
205. IJ Fidler: Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor embolilabeled with ¹²⁵I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst* 1970, 45:773-82.
206. CW Wong, A Lee, L Shientag, J Yu, Y Dong, G Kao, AB Al-Mehdi, EJ Bernhard, RJ Muschel: Apoptosis: an early event in metastatic inefficiency. *Cancer Res* 2001, 61:333-8.
207. AF Chambers, AC Groom, IC MacDonald: Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002, 2:563-72.
208. J Condeelis, RH Singer, JE Segall: The great escape: when cancer cells hijack the genes for chemotaxis and motility. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005, 21:695-718.
209. W Wang, S Goswami, E Sahai, JB Wyckoff, JE Segall, JS Condeelis: Tumor cells caught in the act of invading: their strategy for enhanced cell motility. *Trends Cell Biol* 2005, 15:138-45.
210. T Tanaka, Z Bai, Y Srinoulprasert, BG Yang, H Hayasaka, M Miyasaka: Chemokines in tumor progression and metastasis. *Cancer Sci* 2005, 96:317-22.
211. K Dano, N Behrendt, G Hoyer-Hansen, M Johnsen, LR Lund, M Ploug, J Romer: Plasminogen activation and cancer. *Thromb Haemost* 2005, 93:676-81.
212. EI Deryugina, JP Quigley: Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2006, 25:9-34.
213. MJ Duffy: The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy. *Curr Pharm Des* 2004, 10:39-49.
214. S Kumar, VM Weaver: Mechanics, malignancy, and metastasis: the force journey of a tumor cell. *Cancer Metastasis Rev* 2009, 28:113-27.
215. P Anglard, K Tory, H Brauch, GH Weiss, F Latif, MJ Merino, MI Lerman, B Zbar, WM Linehan: Molecular analysis of genetic changes in the origin and development of renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1991, 51:1071-7.
216. J Jones, TA Libermann: Genomics of renal cell cancer: the biology behind and the therapy ahead. *Clin Cancer Res* 2007, 13:685s-692s.

217. A Jemal, R Siegel, E Ward, T Murray, J Xu, MJ Thun: Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 2007, 57:43-66.
218. H Wunderlich, S Schumann, V Jantitzky, P Moravek, M Podhola, H Kosmehl, J Schubert: Increase of renal cell carcinoma incidence in central Europe. *Eur Urol* 1998, 33:538-41.
219. S Storkel, JN Eble, K Adlakha, M Amin, ML Blute, DG Bostwick, M Darson, B Delahunt, K Iczkowski: Classification of renal cell carcinoma: Workgroup No. 1. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer* 1997, 80:987-9.
220. G Kovacs, M Akhtar, BJ Beckwith, P Bugert, CS Cooper, B Delahunt, JN Eble, S Fleming, B Ljungberg, LJ Medeiros, et al: The Heidelberg classification of renal cell tumours. *J Pathol* 1997, 183:131-3.
221. AJCC Cancer Staging Handbook. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer; 2009.
222. V Ficarra, R Righetti, S Pilloni, A D'Amico, N Maffei, G Novella, L Zanolla, G Malossini, G Mobilio: Prognostic factors in patients with renal cell carcinoma: retrospective analysis of 675 cases. *Eur Urol* 2002, 41:190-8.
223. JJ Hiles, JM Kolesar: Role of sunitinib and sorafenib in the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Am J Health Syst Pharm* 2008, 65:123-31.
224. G Kovacs, L Wilkens, T Papp, W de Riese: Differentiation between papillary and nonpapillary renal cell carcinomas by DNA analysis. *J Natl Cancer Inst* 1989, 81:527-30.
225. JR Gnarra, K Tory, Y Weng, L Schmidt, MH Wei, H Li, F Latif, S Liu, F Chen, FM Duh, et al: Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet* 1994, 7:85-90.
226. AJ Pantuck, G Zeng, AS Belldegrun, RA Figlin: Pathobiology, prognosis, and targeted therapy for renal cell carcinoma: exploiting the hypoxia-induced pathway. *Clin Cancer Res* 2003, 9:4641-52.
227. RI Sufan, MA Jewett, M Ohh: The role of von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and hypoxia in renal clear cell carcinoma. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004, 287:F1-6.
228. WY Kim, WG Kaelin: Role of VHL gene mutation in human cancer. *J Clin Oncol* 2004, 22:4991-5004.
229. RE Soccio, RM Adams, KN Maxwell, JL Breslow: Differential gene regulation of StarD4 and StarD5 cholesterol transfer proteins. Activation of StarD4 by sterol regulatory element-binding protein-2 and StarD5 by endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 2005, 280:19410-8.
230. B Sivaramakrishna, NP Gupta, P Wadhwa, AK Hemal, PN Dogra, A Seth, M Aron, R Kumar: Pattern of metastases in renal cell carcinoma: a single institution study. *Indian J Cancer* 2005, 42:173-7.
231. J Jones, H Otu, D Spentzos, S Kolia, M Inan, WD Beecken, C Fellbaum, X Gu, M Joseph, AJ Pantuck, et al: Gene signatures of progression and metastasis in renal cell cancer. *Clin Cancer Res* 2005, 11:5730-9.
232. RC Flanigan, SC Campbell, JI Clark, MM Picken: Metastatic renal cell carcinoma. *Curr Treat Options Oncol* 2003, 4:385-90.

233. J O'Dea M, H Zincke, DC Utz, PE Bernatz: The treatment of renal cell carcinoma with solitary metastasis. *J Urol* 1978, 120:540-2.
234. RC Flanigan, SE Salmon, BA Blumenstein, SI Bearman, V Roy, PC McGrath, JR Caton, Jr., N Munshi, ED Crawford: Nephrectomy followed by interferon alfa-2b compared with interferon alfa-2b alone for metastatic renal-cell cancer. *N Engl J Med* 2001, 345:1655-9.
235. A Cozzoli, S Milano, G Cancarini, T Zanotelli, S Cosciani Cunico: Surgery of lung metastases in renal cell carcinoma. *Br J Urol* 1995, 75:445-7.
236. Y Kollender, J Bickels, WM Price, KL Kellar, J Chen, O Merimsky, I Meller, MM Malawer: Metastatic renal cell carcinoma of bone: indications and technique of surgical intervention. *J Urol* 2000, 164:1505-8.
237. AW Ritchie, GD Chisholm: The natural history of renal carcinoma. *Semin Oncol* 1983, 10:390-400.
238. N Griffin, ME Gore, SA Sohaib: Imaging in metastatic renal cell carcinoma. *AJR Am J Roentgenol* 2007, 189:360-70.
239. KS Hafez, AC Novick, SC Campbell: Patterns of tumor recurrence and guidelines for followup after nephron sparing surgery for sporadic renal cell carcinoma. *J Urol* 1997, 157:2067-70.
240. DA Levy, JW Slaton, DA Swanson, CP Dinney: Stage specific guidelines for surveillance after radical nephrectomy for local renal cell carcinoma. *J Urol* 1998, 159:1163-7.
241. M Masatoshi, I Masatsugu, I Jun-ichiro, B Shiro: [An optimal follow-up protocol for renal cell carcinoma based on the occurrence of recurrences after surgery]. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* 2000, 91:700-7.
242. DS Sandock, AD Seftel, MI Resnick: A new protocol for the followup of renal cell carcinoma based on pathological stage. *J Urol* 1995, 154:28-31.
243. MB Amin, P Tamboli, J Javidan, H Stricker, M de-Peralta Venturina, A Deshpande, M Menon: Prognostic impact of histologic subtyping of adult renal epithelial neoplasms: an experience of 405 cases. *Am J Surg Pathol* 2002, 26:281-91.
244. SD Beck, MI Patel, ME Snyder, MW Kattan, RJ Motzer, VE Reuter, P Russo: Effect of papillary and chromophobe cell type on disease-free survival after nephrectomy for renal cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2004, 11:71-7.
245. C Gouttefangeas, A Stenzl, S Stevanovic, HG Rammensee: Immunotherapy of renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 2007, 56:117-28.
246. D Filipas, C Spix, D Schulz-Lampel, J Michaelis, R Hohenfellner, S Roth, JW Thuroff: Screening for renal cell carcinoma using ultrasonography: a feasibility study. *BJU Int* 2003, 91:595-9.
247. M Jayson, H Sanders: Increased incidence of serendipitously discovered renal cell carcinoma. *Urology* 1998, 51:203-5.
248. HW Wechsel, E Petri, KH Bichler, G Feil: Marker for renal cell carcinoma (RCC): the dimeric form of pyruvate kinase type M2 (Tu M2-PK). *Anticancer Res* 1999, 19:2583-90.

249. CJ Robson: Radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *J Urol* 1963, 89:37-42.
250. CJ Robson, BM Churchill, W Anderson: The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *J Urol* 1969, 101:297-301.
251. AF Fergany, KS Hafez, AC Novick: Long-term results of nephron sparing surgery for localized renal cell carcinoma: 10-year followup. *J Urol* 2000, 163:442-5.
252. MR Licht, AC Novick: Nephron sparing surgery for renal cell carcinoma. *J Urol* 1993, 149:1-7.
253. F Steinbach, M Stockle, SC Muller, JW Thuroff, SW Melchior, R Stein, R Hohenfellner: Conservative surgery of renal cell tumors in 140 patients: 21 years of experience. *J Urol* 1992, 148:24-9; discussion 29-30.
254. RC Flanigan, G Mickisch, R Sylvester, C Tangen, H Van Poppel, ED Crawford: Cytoreductive nephrectomy in patients with metastatic renal cancer: a combined analysis. *J Urol* 2004, 171:1071-6.
255. RJ Motzer, M Mazumdar, J Bacik, P Russo, WJ Berg, EM Metz: Effect of cytokine therapy on survival for patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2000, 18:1928-35.
256. A Yagoda, B Abi-Rached, D Petrylak: Chemotherapy for advanced renal-cell carcinoma: 1983-1993. *Semin Oncol* 1995, 22:42-60.
257. JS Waters, C Moss, L Pyle, M James, S Hackett, R A'Hern, M Gore, T Eisen: Phase II clinical trial of capecitabine and gemcitabine chemotherapy in patients with metastatic renal carcinoma. *Br J Cancer* 2004, 91:1763-8.
258. LJ Costa, HA Drabkin: Renal cell carcinoma: new developments in molecular biology and potential for targeted therapies. *Oncologist* 2007, 12:1404-15.
259. H Juusela, K Malmio, O Alfthan, KJ Oravisto: Preoperative irradiation in the treatment of renal adenocarcinoma. *Scand J Urol Nephrol* 1977, 11:277-81.
260. B van der Werf-Messing, RO van der Heul, RC Ledeboer: Renal cell carcinoma trial. *Strahlentherapie [Sonderb]* 1981, 76:169-75.
261. R Finney: The value of radiotherapy in the treatment of hypernephroma--a clinical trial. *Br J Urol* 1973, 45:258-69.
262. M Kjaer, PL Frederiksen, SA Engelholm: Postoperative radiotherapy in stage II and III renal adenocarcinoma. A randomized trial by the Copenhagen Renal Cancer Study Group. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1987, 13:665-72.
263. M Stein, A Kuten, J Halpern, NM Coachman, Y Cohen, E Robinson: The value of postoperative irradiation in renal cell cancer. *Radiother Oncol* 1992, 24:41-4.
264. A Hines-Peralta, SN Goldberg: Review of radiofrequency ablation for renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004, 10:6328S-34S.
265. S Faivre, C Delbaldo, K Vera, C Robert, S Lozahic, N Lassau, C Bello, S Deprimo, N Brega, G Massimini, et al: Safety, pharmacokinetic, and antitumor activity of SU11248, a novel oral multitarget tyrosine kinase inhibitor, in patients with cancer. *J Clin Oncol* 2006, 24:25-35.

266. RJ Motzer, BI Rini, RM Bukowski, BD Curti, DJ George, GR Hudes, BG Redman, KA Margolin, JR Merchan, G Wilding, et al: Sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *JAMA* 2006, 295:2516-24.
267. SM Wilhelm, C Carter, L Tang, D Wilkie, A McNabola, H Rong, C Chen, X Zhang, P Vincent, M McHugh, et al: BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 2004, 64:7099-109.
268. G Sonpavde, TE Hutson, BI Rini: Axitinib for renal cell carcinoma. *Expert Opin Investig Drugs* 2008, 17:741-8.
269. NB Davis, DA Taber, RH Ansari, CW Ryan, C George, EE Vokes, NJ Vogelzang, WM Stadler: Phase II trial of PS-341 in patients with renal cell cancer: a University of Chicago phase II consortium study. *J Clin Oncol* 2004, 22:115-9.
270. GV Kondagunta, B Drucker, L Schwartz, J Bacik, S Marion, P Russo, M Mazumdar, RJ Motzer: Phase II trial of bortezomib for patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2004, 22:3720-5.
271. HL Kenerson, LD Aicher, LD True, RS Yeung: Activated mammalian target of rapamycin pathway in the pathogenesis of tuberous sclerosis complex renal tumors. *Cancer Res* 2002, 62:5645-50.
272. G Hudes, M Carducci, P Tomczak, J Dutcher, R Figlin, A Kapoor, E Staroslawska, J Sosman, D McDermott, I Bodrogi, et al: Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007, 356:2271-81.
273. J Lokich: Spontaneous regression of metastatic renal cancer. Case report and literature review. *Am J Clin Oncol* 1997, 20:416-8.
274. I Penn: Primary kidney tumors before and after renal transplantation. *Transplantation* 1995, 59:480-5.
275. C Coppin, F Porzolt, A Awa, J Kumpf, A Coldman, T Wilt: Immunotherapy for advanced renal cell cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2005:CD001425.
276. C Doehn, I Kausch, S Melz, A Behm, D Jocham: Cytokine and vaccine therapy of kidney cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2004, 4:1097-111.
277. E Huland, A Burger, J Fleischer, P Fornara, E Hatzmann, A Heidenreich, H Heinzer, H Heynemann, L Hoffmann, R Hofmann, et al: Efficacy and safety of inhaled recombinant interleukin-2 in high-risk renal cell cancer patients compared with systemic interleukin-2: an outcome study. *Folia Biol (Praha)* 2003, 49:183-90.
278. JS Lam, AS Belldegrun, RA Figlin: Advances in immune-based therapies of renal cell carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2004, 4:1081-96.
279. S Pyrhonen, E Salminen, M Ruutu, T Lehtonen, M Nurmi, T Tammela, H Juusela, E Rintala, P Hietanen, PL Kellokumpu-Lehtinen: Prospective randomized trial of interferon alfa-2a plus vinblastine versus vinblastine alone in patients with advanced renal cell cancer. *J Clin Oncol* 1999, 17:2859-67.
280. J Atzpodien, H Kirchner, U Jonas, L Bergmann, H Schott, H Heynemann, P Fornara, SA Loening, J Roigas, SC Muller, et al: Interleukin-2- and interferon alfa-2a-based immunochemotherapy in advanced renal cell

- carcinoma: a Prospectively Randomized Trial of the German Cooperative Renal Carcinoma Chemoimmunotherapy Group (DGCIN). *J Clin Oncol* 2004, 22:1188-94.
281. JC Yang, L Haworth, RM Sherry, P Hwu, DJ Schwartzentruber, SL Topalian, SM Steinberg, HX Chen, SA Rosenberg: A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med* 2003, 349:427-34.
 282. JD Hainsworth, JA Sosman, DR Spigel, DL Edwards, C Baughman, A Greco: Treatment of metastatic renal cell carcinoma with a combination of bevacizumab and erlotinib. *J Clin Oncol* 2005, 23:7889-96.
 283. EK Rowinsky, GH Schwartz, JA Gollob, JA Thompson, NJ Vogelzang, R Figlin, R Bukowski, N Haas, P Lockbaum, YP Li, et al: Safety, pharmacokinetics, and activity of ABX-EGF, a fully human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in patients with metastatic renal cell cancer. *J Clin Oncol* 2004, 22:3003-15.
 284. RJ Motzer, R Amato, M Todd, WJ Hwu, R Cohen, J Baselga, H Muss, M Cooper, R Yu, MS Ginsberg, et al: Phase II trial of anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 in patients with advanced renal cell carcinoma. *Invest New Drugs* 2003, 21:99-101.
 285. Z Varga, P de Mulder, W Kruit, A Hegele, R Hofmann, C Lamers, S Warnaar, C Mala, S Ullrich, P Mulders: A prospective open-label single-arm phase II study of chimeric monoclonal antibody cG250 in advanced renal cell carcinoma patients. *Folia Biol (Praha)* 2003, 49:74-7.
 286. R Childs, A Chernoff, N Contentin, E Bahceci, D Schrupp, S Leitman, EJ Read, J Tisdale, C Dunbar, WM Linehan, et al: Regression of metastatic renal-cell carcinoma after nonmyeloablative allogeneic peripheral-blood stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 2000, 343:750-8.
 287. J Roigas, G Massenkeil: Nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation in metastatic renal cell carcinoma: a new therapeutic option or just a clinical experiment? *World J Urol* 2005, 23:213-20.
 288. RJ Amato: Vaccine therapy for renal cell carcinoma. *Rev Urol* 2003, 5:65-71.
 289. D Jocham, A Richter, L Hoffmann, K Iwig, D Fahlenkamp, G Zakrzewski, E Schmitt, T Dannenberg, W Lehmacher, J von Wietersheim, et al: Adjuvant autologous renal tumour cell vaccine and risk of tumour progression in patients with renal-cell carcinoma after radical nephrectomy: phase III, randomised controlled trial. *Lancet* 2004, 363:594-9.
 290. Antigenics. In. City.
 291. N Aass, PH De Mulder, GH Mickisch, P Mulders, AT van Oosterom, H van Poppel, SD Fossa, L de Prijck, RJ Sylvester: Randomized phase II/III trial of interferon Alfa-2a with and without 13-cis-retinoic acid in patients with progressive metastatic renal cell Carcinoma: the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Genito-Urinary Tract Cancer Group (EORTC 30951). *J Clin Oncol* 2005, 23:4172-8.
 292. RJ Motzer, J Bacik, BA Murphy, P Russo, M Mazumdar: Interferon-alfa as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2002, 20:289-96.

293. S Negrier, A Caty, T Lesimple, JY Douillard, B Escudier, JF Rossi, P Viens, F Gomez: Treatment of patients with metastatic renal carcinoma with a combination of subcutaneous interleukin-2 and interferon alfa with or without fluorouracil. Groupe Francais d'Immunotherapie, Federation Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer. *J Clin Oncol* 2000, 18:4009-15.
294. L Holtl, R Ramoner, C Zelle-Rieser, H Gander, T Putz, C Papesh, W Nussbaumer, C Falkensammer, G Bartsch, M Thurnher: Allogeneic dendritic cell vaccination against metastatic renal cell carcinoma with or without cyclophosphamide. *Cancer Immunol Immunother* 2005, 54:663-70.
295. RJ Motzer, NH Bander, DM Nanus: Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 1996, 335:865-75.
296. NJ Vogelzang, WM Stadler: Kidney cancer. *Lancet* 1998, 352:1691-6.
297. PH De Mulder, CM van Herpen, PA Mulders: Current treatment of renal cell carcinoma. *Ann Oncol* 2004, 15 Suppl 4:iv319-28.
298. J Ang, M Lijovic, LK Ashman, K Kan, AG Frauman: CD151 protein expression predicts the clinical outcome of low-grade primary prostate cancer better than histologic grading: a new prognostic indicator? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004, 13:1717-21.
299. G Pomara, G Salinitri, G Nesi, E Maio, A Minervini, AM Gammazza, F Francesca, F Cappello, C Selli: p53 and Ki-67 expression in renal cell carcinomas of pregnant women and their correlation with prognosis: a pilot study. *Int J Gynecol Cancer* 2008, 18:132-5.
300. T Kruger, O Schoor, C Lemmel, B Kraemer, C Reichle, J Dengjel, T Weinschenk, M Muller, J Hennenlotter, A Stenzl, et al: Lessons to be learned from primary renal cell carcinomas: novel tumor antigens and HLA ligands for immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2005, 54:826-36.
301. CJ Barnstable, WF Bodmer, G Brown, G Galfre, C Milstein, AF Williams, A Ziegler: Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis. *Cell* 1978, 14:9-20.
302. UK Laemmli: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227:680-5.
303. F Lottspeich, Zorbach, H: *Bioanalytik*. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH; 1998.
304. H Towbin, T Staehelin, J Gordon: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979, 76:4350-4.
305. P Kebarle: A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2000, 35:804-17.
306. RS Johnson, SA Martin, K Biemann, JT Stults, JT Watson: Novel fragmentation process of peptides by collision-induced decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine. *Anal Chem* 1987, 59:2621-5.

307. P Roepstorff, J Fohlman: Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom* 1984, 11:601.
308. DN Perkins, DJ Pappin, DM Creasy, JS Cottrell: Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 1999, 20:3551-67.
309. S Walter, L Herrgen, O Schoor, G Jung, D Wernet, HJ Buhring, HG Rammensee, S Stevanovic: Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres. *J Immunol* 2003, 171:4974-8.
310. K Ohishi, K Nagamune, Y Maeda, T Kinoshita: Two subunits of glycosylphosphatidylinositol transamidase, GPI8 and PIG-T, form a functionally important intermolecular disulfide bridge. *J Biol Chem* 2003, 278:13959-67.
311. K Chikamatsu, K Sakakura, G Takahashi, A Okamoto, N Furuya, TL Whiteside, AB Deleo, K Masuyama: CD4+ T cell responses to HLA-DP5-restricted wild-type sequence p53 peptides in patients with head and neck cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2009.
312. SA Perez, MV Karamouzis, DV Skarlos, A Ardavanis, NN Sotiriadou, EG Iliopoulou, ML Salagianni, G Orphanos, CN Baxevanis, G Rigatos, et al: CD4+CD25+ regulatory T-cell frequency in HER-2/neu (HER)-positive and HER-negative advanced-stage breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2007, 13:2714-21.
313. YH Bae, Z Ding, L Zou, A Wells, F Gertler, P Roy: Loss of profilin-1 expression enhances breast cancer cell motility by Ena/VASP proteins. *J Cell Physiol* 2009, 219:354-64.
314. N Wu, W Zhang, Y Yang, YL Liang, LY Wang, JW Jin, XM Cai, XL Zha: Profilin 1 obtained by proteomic analysis in all-trans retinoic acid-treated hepatocarcinoma cell lines is involved in inhibition of cell proliferation and migration. *Proteomics* 2006, 6:6095-106.
315. L Zou, M Jaramillo, D Whaley, A Wells, V Panchapakesa, T Das, P Roy: Profilin-1 is a negative regulator of mammary carcinoma aggressiveness. *Br J Cancer* 2007, 97:1361-71.
316. F Baba, K Swartz, R van Buren, J Eickhoff, Y Zhang, W Wolberg, A Friedl: Syndecan-1 and syndecan-4 are overexpressed in an estrogen receptor-negative, highly proliferative breast carcinoma subtype. *Breast Cancer Res Treat* 2006, 98:91-8.
317. R Defferrari, GP Tonini, M Conte, F Papio, AR Sementa, A Valent, F Schena, P Perri, K Mazzocco: Concomitant DDX1 and MYCN gain in neuroblastoma. *Cancer Lett* 2007, 256:56-63.
318. J Yu, K Ohuchida, K Nakata, K Mizumoto, L Cui, H Fujita, H Yamaguchi, T Egami, H Kitada, M Tanaka: LIM only 4 is overexpressed in late stage pancreas cancer. *Mol Cancer* 2008, 7:93.
319. IG Campbell, WA Phillips, DY Choong: Genetic and epigenetic analysis of the putative tumor suppressor km23 in primary ovarian, breast, and colorectal cancers. *Clin Cancer Res* 2006, 12:3713-5.

320. MA Riojas, M Guo, SC Glockner, EO Machida, SB Baylin, N Ahuja: Methylation-induced silencing of ASC/TMS1, a pro-apoptotic gene, is a late-stage event in colorectal cancer. *Cancer Biol Ther* 2007, 6:1710-6.
321. X Huang, Z Shi, W Wang, J Bai, Z Chen, J Xu, D Zhang, S Fu: Identification and characterization of a novel protein ISOC2 that interacts with p16INK4a. *Biochem Biophys Res Commun* 2007, 361:287-93.
322. E Moller, N Mandahl, F Mertens, I Panagopoulos: Molecular identification of COL6A3-CSF1 fusion transcripts in tenosynovial giant cell tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 2008, 47:21-5.
323. T Zang, L Zhuang, Z Zhang, D Xin, Y Guo: Expression of beta-catenin in renal cell carcinoma. *Chin Med J (Engl)* 2001, 114:152-4.
324. LC Hsu, X Huang, S Seasholtz, DM Potter, SM Gollin: Gene amplification and overexpression of protein phosphatase 1alpha in oral squamous cell carcinoma cell lines. *Oncogene* 2006, 25:5517-26.
325. V D'Alessandro, LA Muscarella, M Copetti, L Zelante, M Carella, G Vendemiale: Molecular detection of neuron-specific ELAV-like-positive cells in the peripheral blood of patients with small-cell lung cancer. *Cell Oncol* 2008, 30:291-7.
326. C Jacquot, X Lanco, D Carbonnelle, O Sevestre, C Tomasoni, G Briad, M Juget, V Roussis, C Roussakis: Effect of four genes (ALDH1, NRF1, JAM and KBL) on proliferation arrest in a non-small cell bronchopulmonary cancer line. *Anticancer Res* 2002, 22:2229-35.
327. S Ma, KW Chan, TK Lee, KH Tang, JY Wo, BJ Zheng, XY Guan: Aldehyde dehydrogenase discriminates the CD133 liver cancer stem cell populations. *Mol Cancer Res* 2008, 6:1146-53.
328. N Walsh, P Dowling, N O'Donovan, M Henry, P Meleady, M Clynes: Aldehyde dehydrogenase 1A1 and gelsolin identified as novel invasion-modulating factors in conditioned medium of pancreatic cancer cells. *J Proteomics* 2008, 71:561-71.
329. E Racila, DM Racila, JM Ritchie, C Taylor, C Dahle, GJ Weiner: The pattern of clinical breast cancer metastasis correlates with a single nucleotide polymorphism in the C1qA component of complement. *Immunogenetics* 2006, 58:1-8.
330. SB Nayak, VR Bhat, SS Mayya: Serum copper, ceruloplasmin and thiobarbituric acid reactive substance status in patients with ovarian cancer. *Indian J Physiol Pharmacol* 2004, 48:486-8.
331. SB Nayak, VR Bhat, D Upadhyay, SL Udupa: Copper and ceruloplasmin status in serum of prostate and colon cancer patients. *Indian J Physiol Pharmacol* 2003, 47:108-10.
332. O Ozyilkan, E Baltali, S Kirazli: CA 15-3, ceruloplasmin and tissue polypeptide specific antigen as a tumour marker panel in breast cancer. *East Afr Med J* 2000, 77:291-4.
333. PJ van der Watt, CP Maske, DT Hendricks, MI Parker, L Denny, D Govender, MJ Birrer, VD Leaner: The Karyopherin proteins, Crm1 and Karyopherin beta1, are overexpressed in cervical cancer and are critical for cancer cell survival and proliferation. *Int J Cancer* 2009, 124:1829-40.
334. D Goubau, R Romieu-Mourez, M Solis, E Hernandez, T Mesplede, R Lin, D Leaman, J Hiscott: Transcriptional re-programming of primary

- macrophages reveals distinct apoptotic and anti-tumoral functions of IRF-3 and IRF-7. *Eur J Immunol* 2009, 39:527-40.
335. CY Chen, CP Hsu, NY Hsu, CS Shih, TY Lin, KC Chow: Expression of dihydrodiol dehydrogenase in the resected stage I non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2002, 9:515-9.
336. TL Rizner, T Smuc, R Ruprecht, J Sinkovec, TM Penning: AKR1C1 and AKR1C3 may determine progesterone and estrogen ratios in endometrial cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2006, 248:126-35.
337. MD Yang, CC Wu, SH Chiou, CF Chiu, TY Lin, IP Chiang, KC Chow: Reduction of dihydrodiol dehydrogenase expression in resected hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 2003, 10:271-6.
338. A Glaessgen, S Jonmarker, A Lindberg, B Nilsson, R Lewensohn, P Ekman, A Valdman, L Egevad: Heat shock proteins 27, 60 and 70 as prognostic markers of prostate cancer. *APMIS* 2008, 116:888-95.
339. S Zang, C Ji, X Qu, X Dong, D Ma, J Ye, R Ma, J Dai, D Guo: A study on Notch signaling in human breast cancer. *Neoplasma* 2007, 54:304-10.
340. PG Ard, C Chatterjee, S Kunjibettu, LR Adside, LE Gralinski, SB McMahon: Transcriptional regulation of the mdm2 oncogene by p53 requires TRRAP acetyltransferase complexes. *Mol Cell Biol* 2002, 22:5650-61.
341. SM Schmidt, K Schag, MR Muller, T Weinschenk, S Appel, O Schoor, MM Weck, F Grunebach, L Kanz, S Stevanovic, et al: Induction of adipophilin-specific cytotoxic T lymphocytes using a novel HLA-A2-binding peptide that mediates tumor cell lysis. *Cancer Res* 2004, 64:1164-70.
342. Y Liang, AW Bollen, KD Aldape, N Gupta: Nuclear FABP7 immunoreactivity is preferentially expressed in infiltrative glioma and is associated with poor prognosis in EGFR-overexpressing glioblastoma. *BMC Cancer* 2006, 6:97.
343. U Eberle: Quantitative Analyse von MHC-Klasse-I-Molekülen in kolorektalen Karzinomen und Identifizierung tumorassoziierter MHC-gebundener Peptide. Tübingen: Tübingen; 2005.
344. C Reichle: Patientenspezifische Analyse von Tumorantigenen. Tübingen: Tübingen; 2006.
345. DC Brune, B Hampton, R Kobayashi, JW Leone, KD Linse, J Pohl, RS Thoma, ND Denslow: ABRF ESRG 2006 study: Edman sequencing as a method for polypeptide quantitation. *J Biomol Tech* 2007, 18:306-20.
346. D Atkins, S Ferrone, GE Schmahl, S Storkel, B Seliger: Down-regulation of HLA class I antigen processing molecules: an immune escape mechanism of renal cell carcinoma? *J Urol* 2004, 171:885-9.
347. EC Ibrahim, Y Allory, F Commo, B Gattegno, P Callard, P Paul: Altered pattern of major histocompatibility complex expression in renal carcinoma: tumor-specific expression of the nonclassical human leukocyte antigen-G molecule is restricted to clear cell carcinoma while up-regulation of other major histocompatibility complex antigens is primarily distributed in all subtypes of renal carcinoma. *Am J Pathol* 2003, 162:501-8.

348. H Kitamura, I Honma, T Torigoe, H Asanuma, N Sato, T Tsukamoto: Down-regulation of HLA class I antigen is an independent prognostic factor for clear cell renal cell carcinoma. *J Urol* 2007, 177:1269-72; discussion 1272.
349. D Brune, ND Denslow, R Kobayashi, WS Lane, JW Leone, BJ Madden, JM Neveu, J Pohl: ABRF ESRG 2005 study: identification of seven modified amino acids by Edman sequencing. *J Biomol Tech* 2006, 17:308-26.
350. O Smithies, D Gibson, EM Fanning, RM Goodfliesth, JG Gilman, DL Ballantyne: Quantitative procedures for use with the Edman-Begg sequenator. Partial sequences of two unusual immunoglobulin light chains, Rzf and Sac. *Biochemistry* 1971, 10:4912-21.
351. NF Watson, JM Ramage, Z Madjd, I Spendlove, IO Ellis, JH Scholefield, LG Durrant: Immunosurveillance is active in colorectal cancer as downregulation but not complete loss of MHC class I expression correlates with a poor prognosis. *Int J Cancer* 2006, 118:6-10.
352. P Rolland, S Deen, I Scott, L Durrant, I Spendlove: Human leukocyte antigen class I antigen expression is an independent prognostic factor in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2007, 13:3591-6.
353. B Seliger, T Cabrera, F Garrido, S Ferrone: HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells. *Semin Cancer Biol* 2002, 12:3-13.
354. FM Marincola, EM Jaffee, DJ Hicklin, S Ferrone: Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol* 2000, 74:181-273.
355. H Kitamura, T Torigoe, I Honma, E Sato, H Asanuma, Y Hirohashi, N Sato, T Tsukamoto: Effect of human leukocyte antigen class I expression of tumor cells on outcome of intravesical instillation of bacillus calmette-guerin immunotherapy for bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2006, 12:4641-4.
356. J Bukur, B Malenica, C Huber, B Seliger: Altered expression of nonclassical HLA class Ib antigens in human renal cell carcinoma and its association with impaired immune response. *Hum Immunol* 2003, 64:1081-92.
357. N Aptsiauri, R Carretero, A Garcia-Lora, LM Real, T Cabrera, F Garrido: Regressing and progressing metastatic lesions: resistance to immunotherapy is predetermined by irreversible HLA class I antigen alterations. *Cancer Immunol Immunother* 2008, 57:1727-33.
358. F Garrido, F Ruiz-Cabello, T Cabrera, JJ Perez-Villar, M Lopez-Botet, M Duggan-Keen, PL Stern: Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today* 1997, 18:89-95.
359. M Saio, M Teicher, G Campbell, H Feiner, Y Delgado, AB Frey: Immunocytochemical demonstration of down regulation of HLA class-I molecule expression in human metastatic breast carcinoma. *Clin Exp Metastasis* 2004, 21:243-9.
360. AO Weinzierl, C Lemmel, O Schoor, M Muller, T Kruger, D Wernet, J Hennenlotter, A Stenzl, K Klingel, HG Rammensee, et al: Distorted

- relation between mRNA copy number and corresponding major histocompatibility complex ligand density on the cell surface. *Mol Cell Proteomics* 2007, 6:102-13.
361. ML Disis, E Calenoff, G McLaughlin, AE Murphy, W Chen, B Groner, M Jeschke, N Lydon, E McGlynn, RB Livingston, et al: Existent T-cell and antibody immunity to HER-2/neu protein in patients with breast cancer. *Cancer Res* 1994, 54:16-20.
 362. Y Hedberg, B Ljungberg, G Roos, G Landberg: Expression of cyclin D1, D3, E, and p27 in human renal cell carcinoma analysed by tissue microarray. *Br J Cancer* 2003, 88:1417-23.
 363. M Koga, S Shichijo, A Yamada, J Ashihara, H Sawamizu, J Kusukawa, K Itoh: Identification of ribosomal proteins S2 and L10a as tumor antigens recognized by HLA-A26-restricted CTL. *Tissue Antigens* 2003, 61:136-45.
 364. ES Schultz, J Chapiro, C Lurquin, S Claverol, O Burlet-Schiltz, G Warnier, V Russo, S Morel, F Levy, T Boon, et al: The production of a new MAGE-3 peptide presented to cytolytic T lymphocytes by HLA-B40 requires the immunoproteasome. *J Exp Med* 2002, 195:391-9.
 365. W Chen, CC Norbury, Y Cho, JW Yewdell, JR Bennink: Immunoproteasomes shape immunodominance hierarchies of antiviral CD8(+) T cells at the levels of T cell repertoire and presentation of viral antigens. *J Exp Med* 2001, 193:1319-26.
 366. S Morel, F Levy, O Burlet-Schiltz, F Brasseur, M Probst-Kepper, AL Peitrequin, B Monsarrat, R Van Velthoven, JC Cerottini, T Boon, et al: Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity* 2000, 12:107-17.
 367. RE Toes, AK Nussbaum, S Degermann, M Schirle, NP Emmerich, M Kraft, C Laplace, A Zwinderman, TP Dick, J Muller, et al: Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J Exp Med* 2001, 194:1-12.
 368. G Cagney, A Emili: De novo peptide sequencing and quantitative profiling of complex protein mixtures using mass-coded abundance tagging. *Nat Biotechnol* 2002, 20:163-70.
 369. J Ji, A Chakraborty, M Geng, X Zhang, A Amini, M Bina, F Regnier: Strategy for qualitative and quantitative analysis in proteomics based on signature peptides. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000, 745:197-210.
 370. SP Gygi, B Rist, SA Gerber, F Turecek, MH Gelb, R Aebersold: Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol* 1999, 17:994-9.
 371. JH Ringrose, HD Meiring, D Speijer, TE Feltkamp, CA van Els, AP de Jong, J Dankert: Major histocompatibility complex class I peptide presentation after *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection assessed via stable isotope tagging of the B27-presented peptide repertoire. *Infect Immun* 2004, 72:5097-105.
 372. RL Beardsley, JP Reilly: Optimization of guanidination procedures for MALDI mass mapping. *Anal Chem* 2002, 74:1884-90.

373. M Munchbach, M Quadroni, G Miotto, P James: Quantitation and facilitated de novo sequencing of proteins by isotopic N-terminal labeling of peptides with a fragmentation-directing moiety. *Anal Chem* 2000, 72:4047-57.
374. SP Gygi, Y Rochon, BR Franza, R Aebersold: Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* 1999, 19:1720-30.
375. T Flad, L Mueller, H Dihazi, V Grigorova, R Bogumil, A Beck, C Thedieck, GA Mueller, H Kalbacher, CA Mueller: T cell epitope definition by differential mass spectrometry: identification of a novel, immunogenic HLA-B8 ligand directly from renal cancer tissue. *Proteomics* 2006, 6:364-74.
376. L Wang, JS Zhu, MQ Song, GQ Chen, JL Chen: Comparison of gene expression profiles between primary tumor and metastatic lesions in gastric cancer patients using laser microdissection and cDNA microarray. *World J Gastroenterol* 2006, 12:6949-54.
377. B Weigelt, AM Glas, LF Wessels, AT Witteveen, JL Peterse, LJ van't Veer: Gene expression profiles of primary breast tumors maintained in distant metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100:15901-5.
378. P Brossart: Dendritic cells in vaccination therapies of malignant diseases. *Transfus Apher Sci* 2002, 27:183-6.
379. A Haitel, HG Wiener, U Baethge, M Marberger, M Susani: mdm2 expression as a prognostic indicator in clear cell renal cell carcinoma: comparison with p53 overexpression and clinicopathological parameters. *Clin Cancer Res* 2000, 6:1840-4.
380. H Hashida, A Takabayashi, T Tokuhara, N Hattori, T Taki, H Hasegawa, S Satoh, N Kobayashi, Y Yamaoka, M Miyake: Clinical significance of transmembrane 4 superfamily in colon cancer. *Br J Cancer* 2003, 89:158-67.
381. J Timar, L Meszaros, A Ladanyi, LG Puskas, E Raso: Melanoma genomics reveals signatures of sensitivity to bio- and targeted therapies. *Cell Immunol* 2006, 244:154-7.
382. IB Dawid, R Toyama, M Taira: LIM domain proteins. *C R Acad Sci III* 1995, 318:295-306.
383. I Sanchez-Garcia, TH Rabbitts: The LIM domain: a new structural motif found in zinc-finger-like proteins. *Trends Genet* 1994, 10:315-20.
384. T Boehm, L Foroni, Y Kaneko, MF Perutz, TH Rabbitts: The rhombotin family of cysteine-rich LIM-domain oncogenes: distinct members are involved in T-cell translocations to human chromosomes 11p15 and 11p13. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, 88:4367-71.
385. T Boehm, I Lavenir, A Forster, RB Wadey, JK Cowell, J Harbott, F Lampert, J Waters, P Sherrington, P Couillin, et al: The T-ALL specific t(11;14)(p13;q11) translocation breakpoint cluster region is located near to the Wilms' tumour predisposition locus. *Oncogene* 1988, 3:691-5.
386. B Royer-Pokora, U Loos, WD Ludwig: TTG-2, a new gene encoding a cysteine-rich protein with the LIM motif, is overexpressed in acute T-cell leukaemia with the t(11;14)(p13;q11). *Oncogene* 1991, 6:1887-93.

387. RR Singh, CJ Barnes, AH Talukder, SA Fuqua, R Kumar: Negative regulation of estrogen receptor alpha transactivation functions by LIM domain only 4 protein. *Cancer Res* 2005, 65:10594-601.
388. H Mizunuma, J Miyazawa, K Sanada, K Imai: The LIM-only protein, LMO4, and the LIM domain-binding protein, LDB1, expression in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Br J Cancer* 2003, 88:1543-8.
389. S Mousses, L Bubendorf, U Wagner, G Hostetter, J Kononen, R Cornelison, N Goldberger, AG Elkahlon, N Willi, P Koivisto, et al: Clinical validation of candidate genes associated with prostate cancer progression in the CWR22 model system using tissue microarrays. *Cancer Res* 2002, 62:1256-60.
390. EY Sum, B Peng, X Yu, J Chen, J Byrne, GJ Lindeman, JE Visvader: The LIM domain protein LMO4 interacts with the cofactor CtIP and the tumor suppressor BRCA1 and inhibits BRCA1 activity. *J Biol Chem* 2002, 277:7849-56.
391. T Weinschenk, C Gouttefangeas, M Schirle, F Obermayr, S Walter, O Schoor, R Kurek, W Loeser, KH Bichler, D Wernet, et al: Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. *Cancer Res* 2002, 62:5818-27.
392. M Yao, H Tabuchi, Y Nagashima, M Baba, N Nakaigawa, H Ishiguro, K Hamada, Y Inayama, T Kishida, K Hattori, et al: Gene expression analysis of renal carcinoma: adipose differentiation-related protein as a potential diagnostic and prognostic biomarker for clear-cell renal carcinoma. *J Pathol* 2005, 205:377-87.
393. M Yao, Y Huang, K Shioi, K Hattori, T Murakami, N Nakaigawa, T Kishida, Y Nagashima, Y Kubota: Expression of adipose differentiation-related protein: a predictor of cancer-specific survival in clear cell renal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007, 13:152-60.
394. C Caron de Fromentel, T Soussi: TP53 tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis. *Genes Chromosomes Cancer* 1992, 4:1-15.
395. L Crawford: The 53,000-dalton cellular protein and its role in transformation. *Int Rev Exp Pathol* 1983, 25:1-50.
396. MB Kastan, O Onyekwere, D Sidransky, B Vogelstein, RW Craig: Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 1991, 51:6304-11.
397. E Yonish-Rouach, D Resnitzky, J Lotem, L Sachs, A Kimchi, M Oren: Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 1991, 352:345-7.
398. AJ Giaccia, MB Kastan: The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev* 1998, 12:2973-83.
399. AJ Levine: p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997, 88:323-31.
400. M Oren, V Rotter: Introduction: p53--the first twenty years. *Cell Mol Life Sci* 1999, 55:9-11.
401. C Prives: Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit. *Cell* 1998, 95:5-8.

402. HE Warburton, M Brady, N Vlatkovic, WM Linehan, K Parsons, MT Boyd: p53 regulation and function in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2005, 65:6498-503.
403. H Mombini, M Givi, I Rashidi: Relationship Between Expression of p53 Protein and Tumor Subtype and Grade in Renal Cell Carcinoma. *Urol J* 2006, 3:79-81.
404. NH Stickle, LS Cheng, IR Watson, N Alon, D Malkin, MS Irwin, M Ohh: Expression of p53 in renal carcinoma cells is independent of pVHL. *Mutat Res* 2005, 578:23-32.
405. AK Uzunlar, H Sahin, F Yilmaz, S Ozekinci: Expression of p53 oncoprotein and bcl-2 in renal cell carcinoma. *Saudi Med J* 2005, 26:37-41.
406. R Zigeuner, M Ratschek, P Rehak, L Schips, C Langner: Value of p53 as a prognostic marker in histologic subtypes of renal cell carcinoma: a systematic analysis of primary and metastatic tumor tissue. *Urology* 2004, 63:651-5.
407. K Angelopoulou, EP Diamandis: Detection of the TP53 tumour suppressor gene product and p53 auto-antibodies in the ascites of women with ovarian cancer. *Eur J Cancer* 1997, 33:115-21.
408. R Munker, O Stotzer, M Darsow, S Classen, A Lebeau, W Wilmanns: Autoantibodies against p53 are not increased in human ascites and pleural effusions. *Cancer Immunol Immunother* 1996, 42:200-1.
409. M Tavassoli, N Brunel, R Maher, NW Johnson, T Soussi: p53 antibodies in the saliva of patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Int J Cancer* 1998, 78:390-1.
410. RD Vale: The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* 2003, 112:467-80.
411. RB Vallee, JC Williams, D Varma, LE Barnhart: Dynein: An ancient motor protein involved in multiple modes of transport. *J Neurobiol* 2004, 58:189-200.
412. Q Tang, CM Staub, G Gao, Q Jin, Z Wang, W Ding, RE Aurigemma, KM Mulder: A novel transforming growth factor-beta receptor-interacting protein that is also a light chain of the motor protein dynein. *Mol Biol Cell* 2002, 13:4484-96.
413. JF Liu, ZX Wang, XQ Wang, Q Tang, XM An, LL Gui, DC Liang: Crystal structure of human dynein light chain Dnlc2A: structural insights into the interaction with IC74. *Biochem Biophys Res Commun* 2006, 349:1125-9.
414. GR Van de Walle, K Vanhoorelbeke, Z Majer, E Illyes, J Baert, I Pareyn, H Deckmyn: Two functional active conformations of the integrin $\alpha_2\beta_1$, depending on activation condition and cell type. *J Biol Chem* 2005, 280:36873-82.
415. MK Pec, M Artwohl, JJ Fernandez, ML Souto, D Alvarez de la Rosa, T Giraldez, A Valenzuela-Fernandez, F Diaz-Gonzalez: Chemical modulation of VLA integrin affinity in human breast cancer cells. *Exp Cell Res* 2007, 313:1121-34.
416. JJ Grzesiak, M Bouvet: Determination of the ligand-binding specificities of the $\alpha_2\beta_1$ and $\alpha_1\beta_1$ integrins in a novel 3-dimensional in vitro model of pancreatic cancer. *Pancreas* 2007, 34:220-8.

417. JJ Grzesiak, M Bouvet: The alpha2beta1 integrin mediates the malignant phenotype on type I collagen in pancreatic cancer cell lines. *Br J Cancer* 2006, 94:1311-9.
418. RS Sawhney, B Sharma, LE Humphrey, MG Brattain: Integrin alpha2 and extracellular signal-regulated kinase are functionally linked in highly malignant autocrine transforming growth factor-alpha-driven colon cancer cells. *J Biol Chem* 2003, 278:19861-9.
419. U Langsenlehner, W Renner, B Yazdani-Biuki, T Eder, TC Wascher, B Paulweber, H Clar, G Hofmann, H Samonigg, P Krippel: Integrin alpha-2 and beta-3 gene polymorphisms and breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 2006, 97:67-72.
420. J Markovic-Lipkovski, D Brasanac, GA Muller, CA Muller: Cadherins and integrins in renal cell carcinoma: an immunohistochemical study. *Tumori* 2001, 87:173-8.
421. A Oertl, B Relja, J Makarevic, E Weich, S Hofler, J Jones, D Jonas, H Bratzke, PC Baer, RA Blaheta: Altered expression of beta1 integrins in renal carcinoma cell lines exposed to the differentiation inducer valproic acid. *Int J Mol Med* 2006, 18:347-54.
422. MD Wright, MG Tomlinson: The ins and outs of the transmembrane 4 superfamily. *Immunol Today* 1994, 15:588-94.
423. M Zoller: Gastrointestinal tumors: metastasis and tetraspanins. *Z Gastroenterol* 2006, 44:573-86.
424. JE Testa, PC Brooks, JM Lin, JP Quigley: Eukaryotic expression cloning with an antimetastatic monoclonal antibody identifies a tetraspanin (PETA-3/CD151) as an effector of human tumor cell migration and metastasis. *Cancer Res* 1999, 59:3812-20.
425. M Kohno, H Hasegawa, M Miyake, T Yamamoto, S Fujita: CD151 enhances cell motility and metastasis of cancer cells in the presence of focal adhesion kinase. *Int J Cancer* 2002, 97:336-43.
426. T Tokuhara, H Hasegawa, N Hattori, H Ishida, T Taki, S Tachibana, S Sasaki, M Miyake: Clinical significance of CD151 gene expression in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2001, 7:4109-14.
427. XH Yang, AL Richardson, MI Torres-Arzayus, P Zhou, C Sharma, AR Kazarov, MM Andzelm, JL Strominger, M Brown, ME Hemler: CD151 accelerates breast cancer by regulating alpha 6 integrin function, signaling, and molecular organization. *Cancer Res* 2008, 68:3204-13.
428. M Yanez-Mo, A Alfranca, C Cabanas, M Marazuela, R Tejedor, MA Ursa, LK Ashman, MO de Landazuri, F Sanchez-Madrid: Regulation of endothelial cell motility by complexes of tetraspan molecules CD81/TAPA-1 and CD151/PETA-3 with alpha3 beta1 integrin localized at endothelial lateral junctions. *J Cell Biol* 1998, 141:791-804.
429. DR Chesire, WB Isaacs: Beta-catenin signaling in prostate cancer: an early perspective. *Endocr Relat Cancer* 2003, 10:537-60.
430. RT Moon, B Bowerman, M Boutros, N Perrimon: The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science* 2002, 296:1644-6.
431. A Prasad, V Paruchuri, A Preet, F Latif, RK Ganju: Slit-2 induces a tumor-suppressive effect by regulating beta-catenin in breast cancer cells. *J Biol Chem* 2008, 283:26624-33.

432. P Hu, B Shi, F Geng, C Zhang, W Wu, XZ Wu: E-cadherin core fucosylation regulates nuclear beta-catenin accumulation in lung cancer cells. *Glycoconj J* 2008, 25:843-50.
433. W Yue, Q Sun, S Dacic, RJ Landreneau, JM Siegfried, J Yu, L Zhang: Downregulation of Dkk3 activates beta-catenin/TCF-4 signaling in lung cancer. *Carcinogenesis* 2008, 29:84-92.
434. XY Chen, ZC Wang, H Li, XX Cheng, Y Sun, XW Wang, ML Wu, J Liu: Nuclear translocations of beta-catenin and TCF4 in gastric cancers correlate with lymph node metastasis but probably not with CD44 expression. *Hum Pathol* 2005, 36:1294-301.
435. KF Pan, WG Liu, L Zhang, WC You, YY Lu: Mutations in components of the Wnt signaling pathway in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2008, 14:1570-4.
436. B Cieply, G Zeng, T Proverbs-Singh, DA Geller, SP Monga: Unique phenotype of hepatocellular cancers with exon-3 mutations in beta-catenin gene. *Hepatology* 2009, 49:821-31.
437. A Elzagheid, A Buhmeida, E Korkeila, Y Collan, K Syrjanen, S Pyrhonen: Nuclear beta-catenin expression as a prognostic factor in advanced colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008, 14:3866-71.
438. W Wanitsuwan, S Kanngurn, T Boonpipattanapong, R Sangthong, S Sangkhathat: Overall expression of beta-catenin outperforms its nuclear accumulation in predicting outcomes of colorectal cancers. *World J Gastroenterol* 2008, 14:6052-9.
439. E Margineanu, CE Cotrutz, C Cotrutz: Correlation between E-cadherin abnormal expressions in different types of cancer and the process of metastasis. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2008, 112:432-6.
440. JP Junior, M Srougi, PM Borra, MF Dall' Oglio, LA Ribeiro-Filho, KR Leite: E-cadherin and beta-catenin Loss of Expression Related to Bone Metastasis in Prostate Cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2008.
441. R Yoshida, N Kimura, Y Harada, N Ohuchi: The loss of E-cadherin, alpha- and beta-catenin expression is associated with metastasis and poor prognosis in invasive breast cancer. *Int J Oncol* 2001, 18:513-20.
442. P Agre, LS King, M Yasui, WB Guggino, OP Ottersen, Y Fujiyoshi, A Engel, S Nielsen: Aquaporin water channels--from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol* 2002, 542:3-16.
443. LS King, P Agre: Pathophysiology of the aquaporin water channels. *Annu Rev Physiol* 1996, 58:619-48.
444. AS Verkman, AN van Hoek, T Ma, A Frigeri, WR Skach, A Mitra, BK Tamarappoo, J Farinas: Water transport across mammalian cell membranes. *Am J Physiol* 1996, 270:C12-30.
445. M Ikeda, E Beitz, D Kozono, WB Guggino, P Agre, M Yasui: Characterization of aquaporin-6 as a nitrate channel in mammalian cells. Requirement of pore-lining residue threonine 63. *J Biol Chem* 2002, 277:39873-9.
446. MO Hoque, JC Soria, J Woo, T Lee, J Lee, SJ Jang, S Upadhyay, B Trink, C Monitto, C Desmaze, et al: Aquaporin 1 is overexpressed in lung

- cancer and stimulates NIH-3T3 cell proliferation and anchorage-independent growth. *Am J Pathol* 2006, 168:1345-53.
447. C Moon, JC Soria, SJ Jang, J Lee, M Obaidul Hoque, M Sibony, B Trink, YS Chang, D Sidransky, L Mao: Involvement of aquaporins in colorectal carcinogenesis. *Oncogene* 2003, 22:6699-703.
 448. A Vacca, A Frigeri, D Ribatti, GP Nicchia, B Nico, R Ria, M Svelto, F Dammacco: Microvessel overexpression of aquaporin 1 parallels bone marrow angiogenesis in patients with active multiple myeloma. *Br J Haematol* 2001, 113:415-21.
 449. S Saadoun, MC Papadopoulos, DC Davies, BA Bell, S Krishna: Increased aquaporin 1 water channel expression in human brain tumours. *Br J Cancer* 2002, 87:621-3.
 450. B Burghardt, ML Elkaer, TH Kwon, GZ Racz, G Varga, MC Steward, S Nielsen: Distribution of aquaporin water channels AQP1 and AQP5 in the ductal system of the human pancreas. *Gut* 2003, 52:1008-16.
 451. Y Kageyama, S Sasaki, Y Yamamura, H Oshima, Y Ikawa: Water channel protein subtype suggests the origin of renal cell carcinoma. *J Urol* 1996, 156:291-5.
 452. SC Luza, HC Speisky: Liver copper storage and transport during development: implications for cytotoxicity. *Am J Clin Nutr* 1996, 63:812S-20S.
 453. A Bianchini, G Musci, L Calabrese: Inhibition of endothelial nitric-oxide synthase by ceruloplasmin. *J Biol Chem* 1999, 274:20265-70.
 454. M Cappelli-Bigazzi, G Ambrosio, G Musci, C Battaglia, MC Bonaccorsi di Patti, P Golino, M Ragni, M Chiariello, L Calabrese: Ceruloplasmin impairs endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta. *Am J Physiol* 1997, 273:H2843-9.
 455. A Senra Varela, JJ Lopez Saez, D Quintela Senra: Serum ceruloplasmin as a diagnostic marker of cancer. *Cancer Lett* 1997, 121:139-45.
 456. M Zowczak, M Iskra, L Torlinski, S Cofta: Analysis of serum copper and zinc concentrations in cancer patients. *Biol Trace Elem Res* 2001, 82:1-8.
 457. A Kondi-Pafiti, V Smyrniotis, M Frangou, A Papayanopoulou, M Englezou, H Deligeorgi: Immunohistochemical study of ceruloplasmin, lactoferrin and secretory component expression in neoplastic and non-neoplastic thyroid gland diseases. *Acta Oncol* 2000, 39:753-6.
 458. CM Lee, HW Lo, RP Shao, SC Wang, W Xia, DM Gershenson, MC Hung: Selective activation of ceruloplasmin promoter in ovarian tumors: potential use for gene therapy. *Cancer Res* 2004, 64:1788-93.
 459. C Cox, TN Teknos, M Barrios, GJ Brewer, RD Dick, SD Merajver: The role of copper suppression as an antiangiogenic strategy in head and neck squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 2001, 111:696-701.
 460. J Ochieng, V Furtak, P Lukyanov: Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconj J* 2004, 19:527-35.
 461. S Nakahara, N Oka, A Raz: On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. *Apoptosis* 2005, 10:267-75.

462. S Akahani, P Nangia-Makker, H Inohara, HR Kim, A Raz: Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family. *Cancer Res* 1997, 57:5272-6.
463. HB Jiang, M Xu, XP Wang: Pancreatic stellate cells promote proliferation and invasiveness of human pancreatic cancer cells via galectin-3. *World J Gastroenterol* 2008, 14:2023-8.
464. MA Mayoral, C Mayoral, A Meneses, L Villalvazo, A Guzman, B Espinosa, JL Ochoa, E Zenteno, J Guevara: Identification of galectin-3 and mucin-type O-glycans in breast cancer and its metastasis to brain. *Cancer Invest* 2008, 26:615-23.
465. AS Merseburger, MW Kramer, J Hennenlotter, P Simon, J Knapp, JT Hartmann, A Stenzl, J Serth, MA Kuczyk: Involvement of decreased Galectin-3 expression in the pathogenesis and progression of prostate cancer. *Prostate* 2008, 68:72-7.
466. TH Than, GK Swethadri, J Wong, T Ahmad, D Jamil, RK Maganlal, MM Hamdi, MS Abdullah: Expression of Galectin-3 and Galectin-7 in thyroid malignancy as potential diagnostic indicators. *Singapore Med J* 2008, 49:333-8.
467. RS Bresalier, N Mazurek, LR Sternberg, JC Byrd, CK Yunker, P Nangia-Makker, A Raz: Metastasis of human colon cancer is altered by modifying expression of the beta-galactoside-binding protein galectin 3. *Gastroenterology* 1998, 115:287-96.
468. A Grassadonia, N Tinari, I Iurisci, E Piccolo, A Cumashi, P Innominato, M D'Egidio, C Natoli, M Piantelli, S Iacobelli: 90K (Mac-2 BP) and galectins in tumor progression and metastasis. *Glycoconj J* 2004, 19:551-6.
469. H Lahm, S Andre, A Hoefflich, H Kaltner, HC Siebert, B Sordat, CW von der Lieth, E Wolf, HJ Gabius: Tumor galectinology: insights into the complex network of a family of endogenous lectins. *Glycoconj J* 2004, 20:227-38.
470. N Oka, S Nakahara, Y Takenaka, T Fukumori, V Hogan, HO Kanayama, T Yanagawa, A Raz: Galectin-3 inhibits tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by activating Akt in human bladder carcinoma cells. *Cancer Res* 2005, 65:7546-53.
471. Y Takenaka, T Fukumori, A Raz: Galectin-3 and metastasis. *Glycoconj J* 2004, 19:543-9.
472. F van den Brule, S Califice, V Castronovo: Expression of galectins in cancer: a critical review. *Glycoconj J* 2004, 19:537-42.
473. C Francois, R van Velthoven, O De Lathouwer, C Moreno, A Peltier, H Kaltner, I Salmon, HJ Gabius, A Danguy, C Decaestecker, et al: Galectin-1 and galectin-3 binding pattern expression in renal cell carcinomas. *Am J Clin Pathol* 1999, 112:194-203.
474. AS Merseburger, MW Kramer, J Hennenlotter, J Serth, S Kruck, A Gracia, A Stenzl, MA Kuczyk: Loss of galectin-3 expression correlates with clear cell renal carcinoma progression and reduced survival. *World J Urol* 2008, 26:637-42.
475. L Kopper, J Timar: Genomics of renal cell cancer-- does it provide breakthrough? *Pathol Oncol Res* 2006, 12:5-11.

476. CH Heldin, B Westermark: Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 1999, 79:1283-316.
477. I Sulzbacher, P Birner, M Traxler, M Marberger, A Haitel: Expression of platelet-derived growth factor-alpha alpha receptor is associated with tumor progression in clear cell renal cell carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2003, 120:107-12.
478. C Betsholtz: Insight into the physiological functions of PDGF through genetic studies in mice. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004, 15:215-28.
479. ID Clarke, PB Dirks: A human brain tumor-derived PDGFR-alpha deletion mutant is transforming. *Oncogene* 2003, 22:722-33.
480. MB Dabrow, MR Francesco, FX McBrearty, S Caradonna: The effects of platelet-derived growth factor and receptor on normal and neoplastic human ovarian surface epithelium. *Gynecol Oncol* 1998, 71:29-37.
481. K Fudge, DG Bostwick, ME Stearns: Platelet-derived growth factor A and B chains and the alpha and beta receptors in prostatic intraepithelial neoplasia. *Prostate* 1996, 29:282-6.
482. MC Heinrich, CL Corless, A Duensing, L McGreevey, CJ Chen, N Joseph, S Singer, DJ Griffith, A Haley, A Town, et al: PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 2003, 299:708-10.
483. I Carvalho, F Milanezi, A Martins, RM Reis, F Schmitt: Overexpression of platelet-derived growth factor receptor alpha in breast cancer is associated with tumour progression. *Breast Cancer Res* 2005, 7:R788-95.
484. T Donnem, S Al-Saad, K Al-Shibli, S Andersen, LT Busund, RM Bremnes: Prognostic impact of platelet-derived growth factors in non-small cell lung cancer tumor and stromal cells. *J Thorac Oncol* 2008, 3:963-70.
485. TC Wehler, K Frerichs, C Graf, D Drescher, K Schimanski, S Biesterfeld, MR Berger, S Kanzler, T Junginger, PR Galle, et al: PDGFRalpha/beta expression correlates with the metastatic behavior of human colorectal cancer: a possible rationale for a molecular targeting strategy. *Oncol Rep* 2008, 19:697-704.
486. D Matei, RE Emerson, YC Lai, LA Baldrige, J Rao, C Yiannoutsos, DD Donner: Autocrine activation of PDGFRalpha promotes the progression of ovarian cancer. *Oncogene* 2006, 25:2060-9.
487. OW Tawfik, B Kramer, B Shideler, M Danley, BF Kimler, J Holzbeierlein: Prognostic significance of CD44, platelet-derived growth factor receptor alpha, and cyclooxygenase 2 expression in renal cell carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 2007, 131:261-7.

Danksagung

an Prof. Dr. H.-G. Rammensee für die Aufnahme in sein Institut und seine Unterstützung bei meiner Arbeit.

an Prof. Dr. Stefan Stevanovic für die hervorragende fachliche und persönliche Betreuung, für seine Zeit und unendliche Geduld, für seine humorvolle Art und dass er stets ein offenes Ohr für meine Fragen und Anregungen hatte.

an Oliver Drews und Despina Rudolf für die Einarbeitung und Betreuung bei der Tumorpräparation und den T-Zell-Experimenten.

an Andreas Weinzierl für die Einarbeitung in die differentielle MS-Analytik sowie die unermüdliche Unterstützung bei meiner Publikation.

an alle Elche von denen jeder einzelne einen Teil zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen hat. Danke für die fachliche und persönliche Unterstützung, für das tolle Arbeitsklima für die hilfreichen Diskussionen und die schönen gemeinsamen Unternehmungen.

an das Graduierten Kolleg „Zellbiologische Mechanismen immunassoziierter Prozesse“ für die Förderung und die sehr bereichernden Veranstaltungen.

an Jörg Hennenlotter für die Versorgung mit Tumorproben und das Interesse an meinem Projekt.

an Kerstin Stephan, ohne deren Einsatz die Durchführung meiner Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre.

an meine Eltern für ihre liebevolle Unterstützung und, dass sie mir ein sorgenfreies Studium ermöglicht haben.

an meine Schwester, die stets ein offenes Ohr für jegliche meiner Fragen hatte und für die große Geduld bei der Korrektur meiner Arbeit.

an Simon, ohne dich wäre nichts wie es ist! Danke für Alles!

Publikationen

Stickel, J.S., Weinzierl, A.O., Hillen, N., Drews, O., Schuler, M.M., Hennenlotter, J., Wernet, D., Muller, C.A., Stenzl, A., Rammensee, H.G. and Stevanović, S., (2009). HLA ligand profiles of primary renal cell carcinoma maintained in metastases. *Cancer Immunol Immunother*, 58 (9):1407-1417.

Stickel, J.S., Stickel, N., Hennenlotter, J.,Klingel, K., Stenzl, A.,Rammensee, H.G., Stevanović, S., (2010). Quantification of HLA class I molecules on renal cell carcinoma using Edman degradation. *BMC Urol*. 2011 Jan 20;11:1.

Lebenslauf

Juliane Sarah Stickel
geboren am 11.2.1985
in Calw

- **Ausbildung**

1991 – 1995	Grund- und Hauptschule Neubulach
1995 – 2004	Christophorus Gymnasium Altensteig, Abitur
seit 2004	Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
9/2006	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
10/2009 – 7/2010	Praktisches Jahr
11.11.2010	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

- **Auslandsaufenthalte**

2008	Famulatur Hämatologie, James Cook University Hospital, Middlesbrough, England
2009	Famulatur onkologische Gynäkologie, University of Massachusetts Medical School, Worcester, USA
2009	PJ-Tertial Gynäkologie und Geburtshilfe, Kantonspital St Gallen, Schweiz

- **Promotion**

4/2007- 8/2010	Am Interfakultären Institut für Zellbiologie, Abteilung für Immunologie der Universität Tübingen mit dem Thema „Qualitative und quantitative Analyse und Vergleich von Tumorantigenen und HLA Klasse I-Liganden in Primärtumoren und Metastasen des Nierenzellkarzinoms“. Im Rahmen der Dissertation Mitgliedschaft im Graduiertenkolleg 794
----------------	---