

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

**Charakterisierung von MHC-I-Liganden zum Einsatz in
der Patienten-individuellen Immuntherapie des
Nierenzellkarzinoms**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Björn Friedemann Krämer
aus
Tübingen

2006

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

Meinen Eltern und Brüdern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Antigenprozessierung und Präsentation im MHC-Klasse-I-Weg.....	2
1.1.1 Funktion der MHC-I-Moleküle.....	2
1.1.2 Struktur und Funktion des MHC-I.....	3
1.1.3 Computerbasierte Vorhersage von T-Zellepitopen	5
1.1.4 MHC-I-Gene und Polymorphismus.....	6
1.1.5 Mechanismen der Antigenprozessierung und Antigenpräsentation	8
1.2 MHC / T-Zellrezeptor Interaktion und T-Zellstimulation.....	11
1.3 Kreuzpräsentation – cross presentation.....	13
1.4 Einteilung von Tumorantigenen.....	13
1.5 Methoden der Identifizierung Tumor-assoziiertes Antigene.....	16
1.6 Besondere Charakteristika von Tumoren.....	18
1.6.1 Mechanismen der Tumorevasion.....	18
1.6.2 Gewebeinvasion und Metastasierung.....	20
1.6.3 Angiogenese.....	21
1.6.4 Karzinogenese.....	21
1.7 Immuntherapeutische Vakzinierungsstrategien am Beispiel von Melanomen.....	22
1.8 Das Nierenzellkarzinom (RCC).....	25
1.8.1 Therapieverfahren und Therapieansätze für RCC.....	27
1.9 Konzept der Patientien-individuellen Peptidvakzinierung von RCC-Patienten.....	29
1.10 MHC-I-Quantifizierung.....	30
1.11 Prozessoptimierung der Peptidextraktion.....	31
1.12 Zielsetzung der Arbeit.....	32
2 Material und Methoden	33
2.1 Peptidextraktion per Immunpräzipitation aus humanen Tumoren.....	33
2.1.1 Gewinnung von nativem Tumorgewebe zur Immunpräzipitation...	33
2.1.2 Zellbiologische Methoden zur Antikörpergewinnung.....	33
2.1.2.1 Kultivierung der Hybridomzelllinie W6/32.....	34
2.1.2.2 Antikörperreinigung aus Hybridomzellüberstand.....	34

2.1.3	Herstellung von Affinitätsäulen.....	35
2.1.3.1	Herstellung von Protein-A-beladenen Säulen.....	35
2.1.3.2	Herstellung von CNBr-Säulen.....	36
2.1.4	Homogenisierung des Tumorgewebes.....	37
2.1.5	Affinitätschromatographie.....	38
2.1.6	Säureextraktion und MHC-I / Peptidelution.....	38
2.2	MHC-I-Quantifizierung.....	40
2.2.1	MHC-I-Quantifizierung per Edman-Abbau.....	40
2.2.2	MHC-I-Quantifizierung per Western-Blot.....	41
2.2.2.1	Herstellung der SDS-Gele.....	41
2.2.2.2	Verdünnung der Proben und Beladung der Gele.....	42
2.2.2.3	Blotten auf Nitrozellulosemembran.....	43
2.2.2.4	Behandlung der Nitrozellulosemembran.....	44
2.2.3	MHC-I-Quantifizierung per ELISA.....	45
2.2.3.1	ELISA mit adsorbierten Lysatproben zur MHC-I-Quantifizierung..	45
2.2.3.2	Sandwich-ELISA-Technik zur MHC-I-Quantifizierung.....	47
2.2.3.2.1	Verdünnung der Proben und Pipettierung der Eichreihe.....	47
2.2.3.2.2	Modifizierung der Eichgeraden und Anpassung an die Mediumsbedingungen.....	48
2.2.3.2.3	Quantitativer Vergleich des MHC-I-Gehalts von Tumorausgangs- und Restlysat per ELISA.....	49
2.2.3.2.4	Bestimmung von MHC-I aus Tumoreluat per ELISA-Technik.....	50
2.3	Analytische Verfahren.....	50
2.3.1	Genexpressionsanalyse.....	50
2.3.2	Massenspektrometrie - ESI mit kombiniertem LCMS-System.....	51
3	Ergebnisse	54
3.1	Ausgewählte und verarbeitete Tumorproben.....	54
3.2	Verteilung der HLA-Allele in den verwendeten Tumorproben.....	56
3.3	Identifizierung Tumor-assoziiertes Peptide zum Einsatz in der Patienten- individuellen Peptidvakzinierung am Beispiel RCC98.....	57
3.3.1	Isolierte und identifizierte Peptide aus RCC98.....	57
3.3.2	Genexpressionsanalyse und Auswahl der Impfpeptide.....	61
3.3.3	Zur Vakzinierung von RCC98 verwendete Peptide.....	63

3.4	Analyse weiterer RCC-Proben auf Vorkommen Tumor-assoziierter Liganden.....	65
3.4.1	RCC100.....	65
3.4.2	RCC103.....	65
3.4.3	RCC112.....	66
3.5	Identifizierung Tumor-assoziierter Liganden aus Kolon-CA und BPH.....	66
3.6	MHC-I-Quantifizierung.....	67
3.6.1	MHC-I-Quantifizierung per Edman-Abbau aus Tumoreluat.....	67
3.6.1.1	Ergebnisse des quantitativen MHC-I-Nachweises aus Tumoreluat.....	68
3.6.2	Quantifizierung von MHC-I per Western-Blot.....	70
3.6.2.1	MHC-I-Quantifizierung aus Tumoreluat.....	70
3.6.2.2	MHC-I-Quantifizierung aus Tumorlysat per Western-Blot.....	71
3.6.3	Etablierung eines quantitativen ELISA-Verfahrens zum Nachweis von MHC-Klasse-I-Molekülen aus Tumorlysat- und Eluat.....	73
3.6.3.1	Erstellung einer Eichgeraden mit rekombinanten Monomeren und Festlegung des Linearitätsbereiches bei direkt adsorbiertem Antigen.....	73
3.6.3.2	Quantitative Bestimmung von MHC-I aus Tumorlysat per Sandwich-ELISA.....	74
3.6.3.2.1	Erstellung einer Eichgeraden mit rekombinanten MHC-I Monomeren.....	74
3.6.3.2.2	Feststellung des linearen Messbereichs der Lysatproben.....	75
3.6.3.2.3	Modifizierung der Eichgerade und Anpassung an die Mediumsbedingungen im Lysat.....	76
3.6.3.2.4	Untersuchung von Lysatproben vor und nach Immunpräzipitation per ELISA.....	78
3.6.4	Quantitative Analyse von Tumorlysatproben.....	78
3.6.5	Vergleichende Darstellung MHC-I-Quantifizierung per Western-Blot und ELISA.....	80
3.6.6	Quantitative Bestimmung von MHC im Restlysat.....	80
3.6.7	MHC-I-Quantifizierung per ELISA aus Tumoreluat.....	81
3.6.8	Prozessoptimierung der Peptidextraktion.....	81

4 Diskussion	82
4.1 Patienten-individuelle Peptidvakzinierung von Patienten mit RCC.....	82
4.1.1 Identifizierte MHC-I-Liganden aus RCC98 und deren Bedeutung als Impfpeptide.....	83
4.1.2 Bewertung identifizierter und signifikant überexprimierter Liganden aus RCC103.....	91
4.1.3 Zur Vakzinierung verwendete Liganden aus RCC112.....	95
4.1.4 Identifizierte Liganden aus RCC100.....	95
4.1.5 Bewertung der gewonnenen Erkenntnisse und Perspektive der Peptidvakzinierung.....	96
4.2 Bewertung quantitativer Nachweisverfahren von MHC-I aus Eluaten und Lysaten.....	98
4.2.1 Quantitativer MHC-I-Nachweis im Tumoreluat mit Edman-Abbau und Western-Blot.....	98
4.2.2 Etablierung eines quantitativen ELISA-Verfahrens.....	101
4.2.3 Quantitativer MHC-I-Nachweis per ELISA im Tumorslysat.....	103
4.2.4 Quantitativer MHC-I-Nachweis per ELISA im Restlysat.....	103
4.2.5 MHC-I-Quantifizierung mit Western-Blot aus Lysat.....	105
4.2.6 Vergleich MHC-I-Quantifizierung ELISA~Western-Blot.....	106
4.3 Schlussfolgerung aus der Arbeit.....	108
5. Zusammenfassung	110
6. Literaturangaben	112
7. Danksagungen	126
8. Lebenslauf	127

Abkürzungsverzeichnis

ADFP	Adipose differentiation related peptide, Adipophilin
AK	Antikörper
APCs	Antigen-präsentierende Zellen
APP	Amyloid Vorläuferprotein
AS	Aminosäure
Bcl	B-Zelllymphom
CCA / CA	Kolon-Karzinom / Karzinom
CD	Cluster of differentiation
CEA	Karzi-embryonales Antigen
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie
CNBr	Cyanbromid
CTLs	Zytotoxische T-Lymphozyten
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Ebstein-Barr Virus
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAAP	Aminopeptidase associated with antigen- presentation in ER
HBV	Hepatitis B Virus
HHV	Human Herpes Virus
HIV	Human Immuno-deficiency Virus
HLA	Human Leukocyte Antigen
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
IGF	Insulin-like growth factor
IL	Interleukin
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
MHC	Major Histocompatibility Complex
PBLs	Peripheral Blood Lymphocytes
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate buffered Saline
RCC	Nierenzellkarzinom (Renal cell carcinoma)
RPM	Umdrehungen / min
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transcriptase PCR
SD	Standartabweichung
SEREX	Serological identification of antigens by recombinant expression cloning
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TAP	Transporter associated with antigen presentation
TBB	TRIS-blocking buffer
TBS	Tris-buffered saline
TCR	T-Zellrezeptor
TFA	Trifluor-Essigsäure
TILs	Tumor infiltrierende Lymphozyten
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor Necrosis Factor
Tof	Time-of-flight
TWB	TRIS-washing buffer
UE	Untereinheit
VHL	Von Hippel-Lindau

1. Einleitung

Karzinome gehören heute, insbesondere im höheren Alter, zu den häufigsten Todesursachen weltweit. Über alle Fachdisziplinen hinweg beschäftigen sich Wissenschaftler mit neuen Erkenntnissen zur Tumorentstehung, begünstigenden Faktoren, Prävention und Ansätzen der Tumorthherapie. Bislang stehen chirurgische, pharmakologische und radiologische Ansätze als primäre Therapieansätze zur Verfügung. Für verschiedene Tumorgattungen sind diese Ansätze jedoch bislang unbefriedigend, da mangelndes Ansprechen, Tumorrezidive und schädigende Nebenwirkungen auf den Gesamtorganismus zu Therapieversagen führen. Mit der erweiterten Kenntnis der essentiellen Rolle des Immunsystems in der Kontrolle von maligner Entartung, molekularen Interaktionsprozessen zwischen Tumor- und Immunzellen sowie Kenntnissen der Antigenprozessierung und – präsentation, stellt die Immuntherapie eine neue Form der Tumorthherapie mit großem Potential dar. Da Tumoren eine Vielzahl dieser Prozesse manipulieren, um sich der Immunantwort zu entziehen, ist ein möglichst vollständiges Verständnis dieser Prozesse erforderlich. Wie effektiv das körpereigene Immunsystem arbeitet wird daran ersichtlich, dass der Organismus bei unzähligen Zellproliferationsprozessen der Gefahr maligner Entartung ausgesetzt ist, dies aber nur in einem geringen Teil der Fälle zu Tumorwachstum führt. Gleichzeitig wird das schwerwiegende Ausmaß beim Vorliegen angeborener oder erworbener Immundefizienz, wie z.B. HIV, deutlich. Die Ausnutzung der natürlichen Anti-Tumor-Ressourcen der Immunüberwachung steht im Zentrum des Interesses in der Immuntherapie. Basierend auf wachsenden Erkenntnissen Tumor-immunologischer Prozesse wird weltweit versucht spezifische Tumorantigene zu identifizieren, gegen die sich eine Immunantwort induzieren lässt. In Vakzinierungsstudien wurde versucht, mit Hilfe von Tumorzelllysaten, DNA-Vakzinen oder Peptidvakzinierung eine spezifische Immunantwort gegen Tumorzellen zu induzieren. Erste Erfolge konnten in einzelnen Fällen von Melanom-Patienten beschrieben werden. Eine herausragende Rolle spielt hierbei die Antigenpräsentation über MHC-I sowie die Induktion zytotoxischer CD8⁺-T-Zellen (CTLs). Darüber hinaus wird auch der humoralen, Antikörper-vermittelten Immunantwort Bedeutung

zugemessen. Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Identifizierung Tumor-assoziiertes, MHC-I-restringierter Antigene aus Nierenzellkarzinomen (RCC) mit dem Ziel eines Einsatzes als Peptidvakzine. Im Folgenden sollen wichtige zelluläre Prozesse, die Grundlage dieses Ansatzes und der Immuntherapie im allgemeinen sind beschrieben werden.

1.1 Antigenprozessierung und Präsentation im MHC-Klasse-I-Weg

1.1.1 Funktion der MHC-I-Moleküle

Mit der Entdeckung des Major Histocompatibility Complex (MHC) wurde ein wichtiges Geheimnis der Interaktion zwischen Körperzellen und Immunsystem sowie zwischen verschiedenen Immunzellen gelüftet. Die Entdeckung dieser Oberflächenproteine erfolgte aus der Beobachtung, dass Tumoren, die von einer Maus in eine andere verpflanzt wurden, dort im Gegensatz zur Wirtsmaus abgestoßen wurden. 1936 entdeckten Gorer und Mitarbeiter die dafür entscheidenden Proteine, deren Gene später als Haupthistokompatibilitäts-Komplex (MHC) bezeichnet wurden (Gorer, 1936).

Auch beim Menschen wurde daraufhin die Bedeutung dieser Moleküle entdeckt. Sie tragen seither den Namen Human Leukocyte Antigen (HLA) (Dausset, 1958; van Rood et al., 1958; Payne, 1958). Zinkernagel und Kollegen konnten erstmals zeigen, dass Virus-spezifische T-Zellen virale Antigene erkennen können, wenn diese über die entsprechenden MHC-Allele präsentiert werden (Zinkernagel and Doherty, 1974). Dieser Vorgang wurde fortan als MHC-Restriktion bezeichnet und gab wichtige Hinweise auf die immunologische Bedeutung von MHC. Darüberhinaus konnten T-Zellen mit über MHC-I-präsentierten synthetischen Peptiden stimuliert werden (Wabuke-Bunoti et al., 1984), die wesentliche Grundlage für spätere Peptidvakzinierungen. Townsend und Kollegen zeigten dabei, dass die präsentierten Antigene Fragmente intrazellulärer Proteine sind (Townsend et al., 1986).

Die Entdeckung der genetischen Grundlagen des MHC-Klasse-I-Polymorphismus gab Einblicke in die allelische Vielfalt der MHC-Expression und die Einzigartigkeit des Gewebeexpressionsmusters im einzelnen

Individuum. Mit der Möglichkeit einer HLA-Typisierung zur Bestimmung der Gewebeverträglichkeit wurde eine Grundlage der Transplantationsmedizin geschaffen. HLA-Oberflächenmoleküle spielen eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von Immunantwort oder Immuntoleranz und stellen die elementare Schlüsselfunktion bei der Erkennung von Tumorzellen oder anderer pathologisch veränderter Zellen dar.

MHC-I-Moleküle werden an der Zelloberfläche aller humanen kernhaltigen Zellen exprimiert, mit Ausnahme männlicher Keimzellen. Diese MHC-I-Moleküle ermöglichen der Zelle ihren inhärenten Proteinbestand in Form von MHC-I-gebundenen Peptidfragmente den Zellen des Immunsystems zu präsentieren und so Peptidfragmente aus Fremdproteinen (viralen oder Tumor-veränderten Ursprungs) für zirkulierende zytotoxische T-Zellen erkennbar zu machen. Der Beweis der Beteiligung von MHC-I an der Antigenerkennung erfolgte durch Stimulation von T-Zellen mit gereinigten Peptid:MHC-Komplexen. Dabei zeigt sich, dass T-Zellen nur durch MHC-präsentierte Liganden stimuliert werden. Bei den über MHC-I präsentierten Peptiden handelt es sich vorwiegend um zytosolische, zelleigene Peptide, die durch Degradation von Proteinen im zytosolisch lokalisierten Proteasom gebildet werden (Rock et al., 2002).

Mit Hilfe TAP-defizienter Zelllinien konnte das Zytosol als Kompartiment für die Proteindegradation identifiziert werden (Townsend et al., 1989).

Häufig stammen die präsentierten Liganden aus neusynthetisierten Proteinen, um Fremd- oder pathologisch veränderte Proteine frühzeitig den überwachenden CTLs anzuzeigen (Schubert et al., 2000). Körperzellen tragen je nach Gewebe und Aktivitätsgrad 50000 -100000 MHC-I-Moleküle (Yewdell et al., 2003) mit bis zu 10000 verschiedenen Proteinfragmenten an ihrer Oberfläche (Rammensee, 2002).

1.1.2 Struktur und Funktion des MHC-I

Bei MHC-Klasse-I-Molekülen handelt es sich um heterodimere Immunglobuline. Sie bestehen aus zwei Untereinheiten, der α -Kette (43 kDa) und dem nicht-

kovalent assoziierten β 2-Mikroglobulin (12 kDa). Die α -Kette durchspannt die Plasmamembran. Die β 2-Mikroglobulin-Untereinheit zeigt im Gegensatz zur α -Kette keinen Polymorphismus und ist außerhalb der MHC-Region kodiert. Die HLA-A, -B und -C Genregionen der schweren Kette sind sehr polymorph (Bjorkman and Parham, 1990). Die α -Kette besteht aus drei extrazellulären Immunglobulin-domänen (α 1-3), von denen die α 3-UE die Transmembrandomäne und die Domänen α 1 und α 2 die Peptidbindungsfurche bilden. Diese Peptidbindungsfurche ist das wesentliche Element für die Bindung präsentierter Peptide und unterliegt folglich besonders in diesen Domänen einem ausgeprägten Polymorphismus. Für eine ordnungsgemäße Bindungskonformation und damit eine effektive, stabile Präsentation ist hierbei eine Reihe von Bindungseigenschaften zu beobachten: MHC-Moleküle binden Peptide als integralen Bestandteil und sind ohne dessen Bindung instabil. Durch eine verlässliche, stabile Bindung wird so verhindert, dass es zu einem Austausch des spezifischen Antigens kommt.

Die meist aus 8-10 AS bestehenden Peptide kommen vollständig und in gestreckter Konformation in der Bindungsfurche zu liegen. Hierbei finden sie an beiden Enden der Peptidbindungsfurche konservierte Aminosäureseitenketten, die Peptide C- und N-terminal über Wasserstoffbrückenbindung binden. Diese terminalen Bindungsstellen zwischen den α -Ketten stellen die wesentlichen stabilisierenden Bindungen dar.

Zur spezifischeren Bindung befinden sich in der Bindungsfurche hochpolymorphe Bindungstaschen, die Peptidfragmente von 8-10 Aminosäuren an typischen, chemisch verwandten Aminosäurestellen (Ankeraminosäuren) über Wasserstoffbrücken binden. Für viele MHC-I-Moleküle finden sich diese Ankeraminosäuren der gebundenen Peptide an Stelle 2 und 9. Die AS-Komposition der Bindungstaschen stellt einen bedeutenden Teil des MHC-Polymorphismus dar, da die Peptidkette hierdurch an Schlüsselbindungsstellen gebunden wird, die für jedes Allel zur bevorzugten Bindung von Peptiden mit ähnlichen Aminosäureeigenschaften in diesen Lokalisationen führt.

Weiterhin weist die Bindungsfurche der MHC-I-Moleküle gleicher Allelzugehörigkeit auch außerhalb der Ankeramino­säuren Affinität zu weiteren bevorzugten und weniger bevorzugten Aminosäuresequenzen auf, die allesamt für eine ordnungsgemäße, stabile Bindungskonformation von Bedeutung zu sein scheinen. Die Gesamtheit dieser Allel-spezifischen Bindungsmerkmale, die für eine effektive und stabile Bindung des Peptides an das Träger-MHC-I erforderlich sind, wird als Peptidmotiv bezeichnet (Falk et al., 1991).

Die Bestimmung solcher Peptidmotive erfolgt mit Hilfe homozygoter Zelllinien, aus denen MHC-I-gebundene Peptide durch beispielsweise N-terminalen Edman-Abbau sequenziert werden und so die Ankeramino­säuren an den hierfür typischen Stellen vermehrt detektiert werden (Falk et al., 1991).

Kenntnisse über Ankeramino­säuren sowie weitere typischerweise vorkommende Aminosäuren werden für Algorithmen zur Epitopvorhersage verwendet. Die Datenbank SYFPEITHI ermöglicht so, anhand der für das jeweilige HLA-Allel typischen Peptidmotive, Peptidliganden vorherzusagen.

Für HLA-B*1510 beispielsweise konnten Histidin an zweiter und Leucin an neunter Stelle als Ankeramino­säuren neben einer Reihe von Aminosäuren an bevorzugten Nebenbindungsstellen identifiziert werden (Rammensee et al., 1999).

1.1.3 Computerbasierte Vorhersage von T-Zellepitopen

Unter Kenntnis des Peptidmotivs eines gegebenen HLA-Allels ist es möglich Proteine auf das Vorkommen entsprechender charakteristischer Muster zu untersuchen. Enthält ein Protein Teilsequenzen, die mit einem bekannten Motiv übereinstimmen, besteht potentiell die Möglichkeit einer Bindung dieses Abschnittes. Wie oben beschrieben zeichnen sich MHC-Klasse-I-Liganden durch ca. 10 AS Länge und charakteristische Ankeramino­säuren sowie bevorzugte AS an Nebenbindungsstellen aus. Mit Hilfe von im Internet verfügbaren Vorhersageprogrammen z.B. SYFPEITHI (www.syfpeithi.de) oder einem Programm des NIH (http://bimas.dcrn.nih.gov/molbio/hla_bind) können Liganden auf ihre Übereinstimmung mit Epitopmotiven überprüft werden. Das

Vorhersageprogramm des NIH basiert auf Bindungsuntersuchungen (Parker et al., 1994) und berechnet Dissoziationshalbwertszeiten von Peptid-MHC-Komplexen.

Der Algorithmus der Vorhersagedatenbank SYFPEITHI der Arbeitsgruppe von H.G. Rammensee basiert auf der Vergabe von Punkten für die einzelnen Bindungsstellen bezüglich der Bindungswahrscheinlichkeit, wodurch die Genauigkeit der Motivübereinstimmung anhand eines *Score* abgelesen werden kann (Rammensee et al., 1999). Dabei werden Ankeramino-säuren und bevorzugte/weniger bevorzugte Nebenbindungsstellen miteinbezogen, da etliche MHC-Liganden nicht die optimalen Ankeramino-säuren besitzen (Ruppert et al., 1993). Die Grundlage der Untersuchung der Bindungseigenschaften von Peptiden basiert dabei auf analytischen Erkenntnissen aus natürlichen MHC-I-Liganden. Dabei können unter den am wahrscheinlichsten bindenden 2% der vorhergesagten Peptide potentielle T-Zellepitope vermutet werden (Rammensee et al., 1999). In nur 10% der Vorhersagen gelingt keine Identifizierung des entsprechenden Epitops. Darüberhinaus können aus der Datenbank auch Informationen über Tumor-Assoziation der Liganden entnommen werden. Die Vorhersage von T-Zellepitopen kam beispielsweise zur Bestimmung von Impfliganden für Patient RCC112 zur Anwendung.

1.1.4 MHC-I-Gene und Polymorphismus

Polygenie und Polymorphismus, zwei wichtige Merkmale der MHC, sind zugleich essentielle Bedingungen für die Sicherstellung einer großen Vielfalt verschiedener MHC-I-Moleküle. Die drei Hauptloci der MHC-I werden beim Menschen mit HLA-A, -B und -C bezeichnet, in der Maus als H2-K, -D und -L. Sie repräsentieren die klassischen HLA-Klasse-Ia-Gene. Die Moleküle der HLA-Klasse-Ia bilden die wesentlichen Moleküle der Antigenpräsentation im MHC-Klasse-I-Weg und werden nach Antigenbeladung und Bindung der β 2-Untereinheit vom ER an die Zelloberfläche transportiert.

Die Gene des MHC-I liegen beim Menschen auf dem kurzen Arm von Chromosom 6, bei Mäusen auf Chromosom 17. Die Gene für die β 2-

Mikroglobulin-Untereinheit liegen auf Chromosom 15 bzw. Chromosom 5 bei Mäusen. Im April 2004 sind für den Menschen 309 HLA-A, 563 HLA-B und 167 HLA-C, 6 HLA-E, 2 HLA-F und 15 HLA-G Allele bekannt (Polygenie) (www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html). Die Gene des MHC sind kodominant vererbt, wobei jeder Mensch bis zu 6 verschiedene MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Zelloberfläche exprimiert. Durch diese Mechanismen erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass möglichst viele Pathogene dem Immunsystem präsentiert und von diesem erkannt werden können. Hierbei haben Veränderungen in der Morphologie der Peptidbindungsfurche bzw. der Peptidbindungstaschen direkte Auswirkung auf die so präsentierten Peptide. Produkte einzelner MHC-Allele können sich dabei um bis zu 20 Aminosäuren unterscheiden. Die Vielfalt der MHC-Moleküle stellt nicht nur einen Vorteil für das Individuum dar, sondern ist auch essentiell für das Überleben der Gesamtspezies, da sich so einzelne Allelspezifitäten herausselektionieren, die dem bedrohenden infektiösen Agens widerstehen können. Selektionsvorgänge können anhand von Mutationen und Substitutionen im MHC-Gen nachvollzogen werden.

Beispielsweise wurde beobachtet, dass Träger von HLA-B53 tödliche Malariaformen überleben und in diesen Regionen das betreffende Gen, im Gegensatz zu Populationen, die keiner Malariagefahr ausgesetzt sind, sehr häufig vorkommt (Hill et al., 1992). Auf der anderen Seite kann gerade das Vorkommen eines stark prävalenten HLA-Allels zur Selektionierung einer resistenten Pathogenmutante führen. Beispielsweise wurde die Selektionierung einer Ebstein-Barr Virusmutante in Papua Neuguinea beobachtet, wo das Allel HLA-A*11 deutlich vorherrschte (Campos-Lima et al., 1993). Aus der hohen Vielfalt an MHC-I-Molekülen und der daraus resultierenden Einzigartigkeit des Individuums, resultiert folglich die Schwierigkeit für die Gewebetransplantation, da für nicht verwandte Individuen eine Übereinstimmung des HLA-Typs bezüglich aller Allele sehr unwahrscheinlich ist.

Neben den klassischen Ia-Genen (HLA - A, -B und -C) gibt es weitere, als Ib-Gene bezeichnete Regionen (E, F, G), die im selben 3800 kb umfassenden

Genbereich lokalisiert sind. Sie sind in Gewebeverteilung und Expression sehr variabel und über ihre Funktion ist wenig bekannt. Es gibt jedoch Anzeichen, dass sie in der Eisenresorption, bei Hämochromatose, der Embryonalentwicklung und der Regulation von Rezeptoren auf NK-Zellen von Bedeutung sind. Immunsuppressive Wirkungen auf NK und CTLs werden mit HLA-G/HLA-E in Verbindung gebracht (Malmberg et al., 2002).

In der MHC-Klasse-II-Region befinden sich neben den direkt an der Antigenpräsentation per MHC-II auf Antigen-präsentierenden Zellen beteiligten Allele HLA-DR, -DP und -DQ auch eine Reihe von Genen, die an der Antigenprozessierung im MHC-I-Weg beteiligt sind. So werden beispielsweise die Untereinheiten des TAP-Transporters und die induzierbaren Untereinheiten des Proteasomkomplexes (LMP2 und LMP7) in dieser Region kodiert.

Als MHC-Klasse-III-Gene werden Genabschnitte bezeichnet, die für Komplementkomponenten, Zytokine, oder TNF α / β kodieren. Sie liegen zwischen den Genabschnitten für MHC-I und MHC-II.

1.1.5 Mechanismen der Antigenprozessierung und Antigenpräsentation

Zur Aktivierung von T-Zellen bedarf es der Interaktion zwischen T-Zellrezeptor und MHC-Peptid-Komplex, da T-Zellen nicht in der Lage sind freie Fremdantigene zu erkennen. Zusätzlich bedarf es costimulatorischer Signale über CD28 auf T-Zellen. Bei den auf MHC-Klasse-I-geladenen Peptiden handelt es sich um Peptide intrazellulären Ursprungs, aus Zytosol oder anderen Kompartimenten, die CD8+ zytotoxischen T-Zellen präsentiert werden. Der Protein-Pool einer Zelle wird unabhängig seiner Herkunft (endogen, viral) kontinuierlich abgebaut und wieder ersetzt, wobei Peptidfragmente zur Erkennung des Proteinbestands an die Oberfläche transportiert werden und dort per MHC-I präsentiert werden. Vor allem defekte ribosomale Translationsprodukte (DriPS) werden prozessiert und präsentiert, so dass sofort nach Synthese Fremdproteine von CTLs erkannt werden können (Yewdell et al., 1996).

Der Abbau der Proteine erfolgt im zytosolischen Proteasom, einem multikatalytischen Proteasenkomples. Vieles spricht dafür, dass das Proteasom so einen wichtigen Beitrag zur Antigenpräsentation stellt. Der ubiquitinabhängige Abbauweg von Proteinen durch das Proteasom konnte experimentell nachgewiesen werden (Hochstrasser, 1996). Daneben wurden auch ubiquitin-unabhängige Abbauwege beschrieben (Michalek et al., 1996). Die Bedeutung des Proteasoms in der Antigenprozessierung wird durch Nachweis der Abnahme der MHC-Präsentation unter Gabe von Protease-Inhibitoren ersichtlich (Rock et al., 1994). Ob weitere Proteasen am Proteinabbau beteiligt sind ist bislang unbekannt. Das Proteasom ist ein zylindrischer Komplex aus 28 Untereinheiten, die auf 4 Ringe mit je 7 Untereinheiten aufgeteilt sind. Hierbei besteht das 26S-Proteasom aus einem 20S-Kern und einer regulatorischen 19S-Kappe (Coux et al., 1996). Stimulation mit Interferon- γ führt zum Einbau spezieller induzierbarer Untereinheiten LMP2, LMP7 und MECL1 anstelle der konstitutiven in das Proteasom (Yang et al., 1992). Durch diesen Mechanismus, aber auch durch den 11S Regulator PA28 und die regulatorischen 19S-Kappen, wird so das Schnittmotiv/Schnittspezifität des Proteasoms, jetzt auch Immunproteasom genannt, modifiziert (Tanaka and Kasahara, 1998). Das Proteasom erzeugt vor allem das zumeist hydrophobe Carboxylende der Peptide, die beim Transport ins Endoplasmatische Retikulum durch TAP bevorzugt transportiert werden und günstige Bindungseigenschaften an MHC besitzen (Rock and Goldberg, 1999; Beninga et al., 1998). Es werden bevorzugt Peptide mit einer für MHC-I typischen Länge transportiert, jedoch wurden auch schon TAP-assoziierte Transportvorgänge von bis zu 40 AS Länge beschrieben (Koopmann et al., 1996). Bevor die im Proteasom entstandenen Peptide jedoch über TAP ins ER gelangen können, werden sie im Zytosol durch Aminopeptidasen N-terminal weiter verkürzt (trimmen) oder zur Wiederverwertung der AS vollständig abgebaut. Das Aminoende hat dabei einen wichtigen Einfluss auf die Abbaurate und Effizienz der Epitopräsentation (Townsend et al., 1988). Die verbliebenen Peptide gelangen also vom Zytosol über TAP, einem heterodimeren Transporter in der ER-Membran, ins Innere des ER. Dort werden die Peptide von dem im ER entdeckten Enzym ERAAP

(Serwold et al., 2002) abgebaut, es sei denn, das Peptid passt auf eines der bereitstehenden MHC-I-Moleküle. Bereits 9 Aminosäuren lange Peptide können auch direkt ERAAP-unabhängig auf MHC-I präsentiert werden, andere bedürfen des weiteren Zuschneidens durch ERAAP bevor eine passende Bindung erfolgen kann. Auch ERAAP ist wie weitere Enzyme der Antigenprozessierung durch Interferon- γ induzierbar (Serwold et al., 2002). Systematiken beim Zuschneiden der Proteine im Proteasom und dem späteren Trimmen der Peptide in Zytosol und ER wurden durch Schnittmotiv - und Prozessierungsuntersuchungen nachweisbar (Toes et al., 2001).

Diese Prozessierungsmechanismen erfolgen jedoch mit Blick auf die im ER bereitstehenden MHC-I-Moleküle zufällig (Rammensee, 2002) und führen idealerweise zu einem Zusammenpassen von Peptid und MHC-I im ER.

Zur ordnungsgemäßen Assemblierung der α -Kette und β 2-Mikroglobulin zum MHC-I sind eine Reihe von Chaperonproteinen beteiligt, die vermutlich an der Qualitätskontrolle mitwirken (van Endert, 1999). Nicht zuletzt ist die Bindung des Peptids essentiell für die Stabilität des MHC-I-Komplexes, ohne die das MHC nicht stabil wäre. Zunächst werden neusynthetisierte α -Ketten ins ER transportiert und dort an Calnexin in partiell gefaltetem Zustand festgehalten und so stabilisiert. Nach Bindung der β 2-Mikroglobulin-Untereinheit an die α -Kette dissoziiert das MHC-I-Heterodimer von Calnexin ab und bindet an einen Komplex aus Chaperonproteinen, an denen die Beladung des MHC-I erfolgt. Hierbei wird Calnexin durch Calreticulin ersetzt, das dann den MHC-I-Komplex stabilisiert. Tapasin verbindet den MHC-I-Komplex mit dem TAP-Transporter, über den die zu präsentierenden Peptide antransportiert werden (Li et al., 2000; Sadasivan et al., 1996). Tapasin spielt dabei möglicherweise eine Rolle in der Koordination der Peptidtranslokation. Einen weiteren Teil des Chaperonkomplexes bildet Erp57, das vermutlich an Bindungs- und Ablösevorgängen in der α 2-Untereinheit während des Beladungsvorgangs beteiligt ist. Nach Bindung des Peptids an MHC-I löst sich der nun vollständig gefaltete MHC/Peptidkomplex vom Chaperonkomplex und wird per Vesikel über das Trans-Golgi Netzwerk zur Präsentation an die Oberfläche exportiert. Erfolgt keine Peptidbeladung oder Assoziation mit β 2-Mikroglobulin, werden die α -

Ketten durch das Proteasom abgebaut. Unter quantitativen Gesichtspunkten erweist sich das System der Antigenpräsentation als ineffizient, da durch Antigenabbau an verschiedenen Stellen des Prozessierungswegs aus nur 0,1% der abgebauten Proteine Peptide präsentiert werden (Yewdell et al., 2003).

1.2 MHC / T-Zellrezeptor Interaktion und T-Zellstimulation

Die im Thymus durch negative Selektion für das körpereigene Proteinrepertoire tolerant gemachte T-Zellen zirkulieren im Organismus, um Zellen mit qualitativ oder quantitativ veränderten Antigenen an der Oberfläche zu erkennen und zu eliminieren. Native T-Zellen werden hierzu zunächst durch Antigenpräsentation über dendritische Zellen zu T-Effektorzellen stimuliert. Neben der Interaktion von T-Zellrezeptor und Corezeptor CD4 oder CD8 mit MHC:Peptidkomplexen der DCs sind costimulatorische Signale über CD80/CD86 auf DCs und CD28 auf T-Zellen erforderlich. T-Zellen sind daraufhin in der Lage auf Körperzellen präsentierte Oberflächenpeptide sowohl quantitativ als auch qualitativ zu erfassen. Es werden einerseits tatsächliche Fremdproteine, aber auch quantitativ überexprimierte Eigenproteine aufgrund der hohen Dichte präsentierte Liganden von CTLs als abweichend erkannt. Somit könnte in Impfstudien die Immuntoleranz gegenüber Eigenproteinen durch Darbietung großer Mengen an Selbstpeptiden überwunden werden. Diese Eigenschaft macht man sich auch in der Entwicklung von Peptidvakzinen gegen Tumoren zu nutze, bei dem zytotoxische T-Zellen per Präsentation von Tumor-assoziierten Antigenen über DCs stimuliert werden (Brossart, 2002). Die besondere Bedeutung von CD8⁺-T-Zellen bei der Anti-Tumor-Antwort wurde auch durch Entdeckung Tumor-infiltrierender Lymphozyten (TILs) verdeutlicht. Die zentrale Rolle bei der Erkennung der Peptide und der Aktivierung der T-Zellen besteht hierbei in der Interaktion zwischen MHC-Molekül und T-Zellrezeptor. Eine wesentliche Funktion für die Antigenerkennung geht hierbei vom MHC aus. So wurde beobachtet, dass die Spezifität der zytotoxischen T-Zellen vom allelischen Polymorphismus der MHC-Moleküle abhängt. Es konnte gezeigt werden, dass T-Zellen, die durch einen bestimmten MHC-Genotyp

induziert wurden, nur infizierte Zellen der selben MHC-Zugehörigkeit erkennen konnten. Dieser Effekt wird als MHC-Restriktion bezeichnet (Zinkernagel and Doherty, 1974) und beruht sowohl auf Unterschieden in der Peptidbindung als auch auf direktem Kontakt zwischen MHC-Molekül und T-Zellrezeptor. Der T-Zellrezeptor ist ein Heterodimer aus einer α - und β -Kette (TCR α/β). Diese Ketten bilden den hochvariablen Teil des T-Zellrezeptors, über den die Erkennung des MHC-präsentierten Antigens erfolgt. Dieses Heterodimer ist mit CD3 an der Zelloberfläche komplexiert über dessen Untereinheiten (CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ) die Regulation der TCR Expression sowie die Signalkaskade ins Zellinnere erfolgt. Zur Vervollständigung dieser Signalmaschinerie befinden sich 2 ξ - Ketten an der Zellinnenseite, durch die der CD3-Komplex über ITAMs an der Signalkaskade beteiligt ist. Erfolgt nach temporär unspezifischer Bindung zwischen T-Zelle und Zielzelle über Adhäsionsmoleküle (ICAM) eine Antigen-spezifische Interaktion zwischen TCR und MHC, wird auf diese Weise die Signalkaskade ins Zellinnere induziert, was zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führt.

Erkennt eine CD8+-zytotoxische T-Zelle ein ihr dargebotenes Oberflächenpeptid als körperfremd, führt diese Antigen-spezifische Erkennung zu einer stabilen Paarung. Die CD8+-Zelle verfügt dabei über verschiedene Mechanismen, die Zielzelle unschädlich zu machen. Zytotoxische T-Zellen exprimieren an ihrer Oberfläche den TNF verwandten CD95-Ligand (Fas-Ligand), der in CD95-Rezeptor (Fas) tragenden Zielzellen den programmierten Zelltod (Apoptose) induzieren kann. Weiterhin können T-Zellen Zielzellen durch Freisetzung von lytischen Faktoren zerstören. Dies können einerseits Serinproteasen (Granzyme) sein, die zu Apoptose führen, aber auch Perforine, die sich zu Poren in der Zellmembran polymerisieren und so zur osmotischen Lyse der Zielzelle führen.

Voraussetzung für einen effektiven Einsatz dieser Eliminationswerkzeuge ist die spezifische Antigenerkennung über MHC-TCR-Interaktion, das Vorhandensein der notwendigen costimulatorischen Signale sowie eine stabile Bindung zwischen T-Zelle und Zielzelle.

1.3 Kreuzpräsentation – cross presentation

Über MHC-Klasse-I werden, wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben, vorwiegend zytosolische Peptide präsentiert, um Bruchstücke des intrazellulären Proteinumsatzes den Immuneffektorzellen anzuzeigen. Darüber hinaus ist es jedoch möglich, dass Zellen extrazelluläre Proteine aufnehmen, die dann im Zytosol durch das Proteasom degradiert werden und gemäß dem bekannten MHC-I-Weg im ER auf MHC-Klasse-I geladen und zur Zelloberfläche transportiert werden. Die Zelle der Antigen-synthese und –präsentation sind dabei nicht identisch. Dieser beispielsweise in dendritischen Zellen beobachtete Präsentationszyklus exogen aufgenommener Antigene über MHC-I wird als Kreuzpräsentation (*cross presentation*) bezeichnet.

Das Phänomen der Kreuzpräsentation wurde erstmalig von Bevan im Jahre 1976 beschrieben (Bevan, 1976). Dabei konnten er MHC-Klasse-I-restringierte CTLs nach Vakzinierung mit MHC-Klasse-I-unterschiedlichen Zellen nachweisen. Der Vorgang der *cross presentation/ priming* ist ein wesentlicher Prozess in der Erzeugung von TAA-spezifischen CTLs (*cross priming*) und stellt die Grundlage für die Verwendung von Antigen-beladenen DCs zur Induktion einer Anti-Tumorantwort dar (Greenberg, 1991). So ermöglicht dieser Präsentationsweg professionellen Antigen-präsentierenden Zellen die Einschleusung extrazellulärer, beispielsweise Tumor-assoziiertes Proteine in den MHC-Klasse-I-Prozessierungsweg mit Stimulierung spezifischer, gegen das Antigen gerichteter CD8⁺ CTLs. Ein direkter Kontakt zwischen Tumorzelle und Immunzelle ist hierbei nicht erforderlich (Huang et al., 1994). Dendritische Zellen können auf diese Weise sowohl Immunität als auch Toleranz gegen Pathogene erzeugen.

1.4 Einteilung von Tumorantigenen

Tumorantigene können aufgrund ihrer Eigenschaften und der unterschiedlichen Expression in Tumor- und Normalgewebe in verschiedene Untergruppen klassifiziert werden:

Differenzierungsantigene

Differenzierungsantigene kommen nur in bestimmten Geweben vor, sind dann aber in sowohl Tumor- als auch Normalgewebe exprimiert. Beispielsweise wurde beobachtet, dass es bei einer gegen das Antigen Tyrosinase, ein Enzym mit wichtiger Funktion im Melaninstoffwechsel, gerichteten Reaktion, neben der Wirkung auf Melanomzellen auch zum Krankheitsbild der Vitiligo mit Reaktion gegen gesunde Melanozyten kommt (Topalian et al., 1994; Bystryk et al., 1987). Weitere Beispiele sind MART-1/Melan A oder gp100. Obwohl induzierte Autoimmunität im Rahmen von Peptidvakzinierungsstudien selten ist, birgt der Einsatz von Differenzierungsantigenen dennoch die potentielle Gefahr der Kreuzreaktivität gegen Gewebe.

Darüber hinaus muss aufgrund des Vorkommens in Normalgewebe auch mit der Entwicklung immunologischer Toleranz unter Immuntherapie gerechnet werden.

Cancer-testis antigens

Diese Antigene werden selektiv von Tumoren und Geweben der Keimbahn (Hoden, Plazenta) exprimiert, nicht aber in den übrigen Körpergeweben. Normalerweise sind diese Gene in adulten Geweben stumm, können in Tumoren aus unerklärlichen Gründen jedoch aktiviert werden. 1991 konnte mit einem HLA-A*0101-restringierten Peptid aus MAGE-1 das erste humane T-Zellepitop für diese Gruppe identifiziert werden (van der Bruggen et al., 1991); (Traversari et al., 1992). Weitere Antigene dieser Gruppe sind BAGE, GAGE, RAGE und NY-ESO-1. Nach Einsatz dieser Antigene in Vakzinierungsstudien konnten wiederholt T-Zellantworten nachgewiesen werden sowie in einzelnen Fällen Tumorregression. Da Hodengewebe keine MHC-I-Moleküle exprimiert, muss bei diesen Antigenen nicht mit der Induktion einer Autoimmunantwort gerechnet werden.

Tumor-spezifische, mutierte Antigene

Hierunter versteht man Antigene, die, aufgrund von Mutationen in der Antigensequenz, eine für den individuellen Tumor einzigartige Antigenstruktur

entwickelt haben. Dies kann zu einem neuen, immunogenen T-Zellepitop oder veränderter Affinität zum MHC-Molekül führen. Auch kann ein vormals immun-tolerantes Antigen aufgrund einer Mutation eine CTL-Antwort induzieren. Beispielsweise sind ein Basenaustausch im CDK4-Gen als Ursache für die Entstehung eines Tumor-spezifischen Antigens (Wolfel et al., 1995) oder eine im Intron gelegene Sequenzmutation als Antigen für CTL-Induktion in Melanomen beschrieben (Coulie et al., 1995).

Weiterhin wurde ein mutiertes β -Catenin-Gen identifiziert, das für ein von CTL erkanntes Antigen in Melanomen kodiert (Robbins et al., 1996). Mandruzzato und Kollegen beschrieben eine Mutation im Stopcodon des Caspase-8-Gens, einer Schaltstation der Apoptosekaskade, das zu einem verlängerten Protein führte. Hierdurch entstand neben einer reduzierten Funktionsfähigkeit des Proteins eine Antigenstruktur, die von CTLs erkannt wird (Mandruzzato et al., 1997). Da diese Antigene zufällig entstehen und nur in individuellen Tumoren, nicht aber im Normalgewebe vorkommen, sind sie zwar für eine Patienten-individuelle Vakzinierung ideal, nicht aber für übergreifende Patientenkollektive.

Virale Onkoproteine

Viren sind in der Lage ihr Genom in Zellen zu integrieren, was zur Transformation von Zellen zu Tumorzellen führen kann. So gelten die humanen Papillomaviren Typ 16/18 als wichtiger ätiologischer Faktor bei der Entstehung von Zervixkarzinomen. Die hierbei kodierten Onkoproteine E6 und E7 sind in vielen der Zervixtumoren nachweisbar. E6 und E7 sind folglich als Ziel einer immunologischen Antwort interessante Angriffspunkte (Ressing et al., 1995).

Überexprimierte Antigene

Es gibt eine Reihe von Tumorantigenen, für die im Tumorgewebe typischerweise eine Überexpression besteht. Da der Expressionsgrad des Antigens bei der Induktion einer T-Zellantwort eine wichtige Rolle spielt, bilden diese Antigene einen weiteren Angriffspunkt in der Immuntherapie. So gehören CEA (Tsang et al., 1995), MUC1 (Brossart et al., 1999) und HER2/neu (Fisk et al., 1995) zur Gruppe häufig überexprimierter Gene in Tumoren.

1.5 Methoden der Identifizierung Tumor-assoziiertes Antigene

In den vergangenen Jahrzehnten wurde intensive Forschung zur Identifizierung von Tumorantigenen betrieben. Um dem grundlegenden Ziel näher zu kommen, Antigene zu identifizieren, die einzigartig und spezifisch für den Tumor sind, wurde eine Reihe verschiedener Identifikationsmethoden etabliert (Paschen et al., 2003):

(1) der klassische Ansatz bedient sich Tumor-reaktiver T-Zellen (TILs oder PBLs), die *in vivo* sensitiviert wurden. Die cDNA einer Tumorexpressionsbibliothek wird in Zielzellen transfiziert und über das zugehörige HLA-Molekül präsentiert. Anschließend werden die T-Zellen zur Bestimmung jener Zellen zugegeben, die das Zielantigen präsentieren. Auf diese Weise konnten verschiedene Antigene charakterisiert werden, die von CD8⁺, aber auch von CD4⁺-Zellen, präsentiert werden. Diese Methode ist aber nur für Tumoren anwendbar, für die Tumorzellen und reaktive T-Zellen zur Verfügung stehen.

(2) In einem alternativen Ansatz werden Tumorantigene anhand der Genexpressionsuntersuchung entdeckt. Dieser Ansatz ist auch Teil des in dieser Arbeit beschriebenen analytischen Ansatzes. Typischerweise regulieren Tumoren Gene, die für Bildung oder Erhalt der Malignität bedeutsam sind, auf RNA-Ebene herauf. Die entsprechenden Genprodukte sind wahrscheinlich nützliche Zielstrukturen, die von CTLs erkannt werden. Zu diesen gehören beispielsweise katalytische Untereinheiten der Telomerase (Vonderheide et al., 1999) und Survivin (Schmitz et al., 2000).

(3) Ein weiterer Ansatz zur Identifizierung von Tumorantigenen ist die SEREX-Methode (serological screening of recombinant cDNA expression libraries) (Sahin et al., 1995). Die Methode bedient sich der Tatsache, dass bestimmte Tumorantigene sowohl eine humorale als auch zelluläre Immunantwort induzieren. In dem Verfahren werden Seren von Tumorpatienten mit Hilfe von in *E. coli* transfizierten Expressionsbibliotheken auf Antikörpervorkommen gegen die Tumorgenprodukte untersucht. Auf diese Weise konnten Tyrosinase, MAGE und NY-ESO-1 als Tumorantigene identifiziert werden. Aus NY-ESO-1 konnten

im Folgenden sowohl B- und T-Zellantigene präzisiert werden und somit ein Zusammenhang zwischen zellulärer und humoraler Immunantwort hergestellt werden (Jager et al., 1998).

(4) Wichtiger noch als die Identifizierung von Tumorantigenen ist die Kenntnis von HLA-Klasse-I-T-Zellepitopen.

Hierzu werden folgende Methoden angewandt:

- reverse immunology-Ansatz: Bei dieser Methode werden für ein HLA-Allel spezifische Motive mit Hilfe von Computerprogrammen vorhergesagt z.B. www.syfpeithi.de. Die vorhergesagten Peptide werden anschließend synthetisiert und zur *in vitro* Stimulierung naiver T-Zellen auf DCs geladen.

Alternativ können auch autologe DCs verwendet werden, die das globale Tumorantigen endogen exprimieren oder DCs in die mit Hilfe rekombinanter viraler Vektoren das Antigen transduziert wurde. Anschließend werden die induzierten CTLs auf Reaktivität gegen Tumorzellen untersucht (Brossart et al., 1998). Darüberhinaus muss gezeigt werden, dass das endogen exprimierte Antigen dem vorhergesagten entspricht. Dies wird durch die Transfektion von cDNA in DCs erreicht, die dann die Epitopprozessierung aus dem globalen Antigen auf dem natürlichen Prozessierungsweg durchführen.

Neben der Vorhersage von Epitopen stehen inzwischen auch Programme zur Vorhersage von Proteasomschnittstellen zur Identifizierung von Epitopen zur Verfügung (z.B. www.paproc.de) (Nussbaum et al., 2001).

– Ein weiterer Ansatz ist die Analyse von Peptiden per HPLC Massenspektrometrie. Mögliche Tumorepitope werden HLA-spezifisch vorhergesagt, synthetisiert und zur Kalibrierung des Massenspektrometrie-gerätes verwendet („predict, calibrate, detect-Methode“). Damit werden Peptidliganden, die über das betreffende HLA-Allel präsentiert werden, auf natürliches Vorkommen in Tumorzelllysaten analysiert und identifiziert (Pascolo et al., 2001). Anschließend müssen die Liganden durch *in vitro* T-Zellsensitivierungstechniken auf T-Zellstimulationspotential untersucht werden. Weiterhin kann der kombinierte Ansatz aus Genexpression und Massenspektrometrie, der auch dieser Arbeit zu Grunde liegt, zur Identifizierung potentieller Epitope herangezogen werden (Weinschenk et al., 2002).

1.6 Besondere Charakteristika von Tumoren

1.6.1 Mechanismen der Tumorevasion

Tumoren bedienen sich einer Vielzahl von Mechanismen, um sich der Erkennung durch das Immunsystem zu entziehen. Hierbei modulieren Tumoren den eigenen Zellstoffwechsel, greifen aber auch in die Funktionalität von Immunzellen ein.

- Veränderte MHC-I- und Antigenpräsentation auf Tumorzellen:

Einen wesentlicher Mechanismus, mit dem sich Tumoren der Immunabwehr entziehen, stellt die verringerte oder aufgehobene Expression von MHC-I an der Tumorzelloberfläche dar. Häufig werden Mutationen in der α -Kette oder dem β 2-Mikroglobulin des MHC-I für diesen Vorgang verantwortlich gemacht. Auch die Herabregulation oder der Verlust ganzer HLA-Allele wurde beobachtet. MHC-I-Verluste beliefen sich auf bis zu 96% in Zervix-CA, 96% in Brust-CA, 87% Kolon-CA und 70% in Larynx-CA (Garcia-Lora et al., 2003).

Neben strukturellen Veränderungen an MHC-I wird auch weitreichende Beeinflussung von Antigenprozessierungswegen beobachtet (Pawelec, 2004): Defekte im TAP-Transporter mit MHC-I-Verlust und Herunterregulation von Proteinen der Antigenprozessierung spielen hierbei eine Rolle. Seliger und Kollegen beobachteten eine weitreichende Herunterregulation von TAP und LMP2 in RCCs (Seliger et al., 2003). Es wurde darüberhinaus beschrieben, dass Rezeptoren wie HLA-E heraufreguliert werden, die hemmende Rezeptoren wie CD94/NKG2A auf T-Zellen und NKZs ligieren und die Zellen inaktivieren. Diese Effekte werden im Beisein bestimmter Zytokine wie TGF- β noch verstärkt (Guerra et al., 1999).

Auch IFN- γ kann derartige Effekte durch Heraufregulation von HLA-G auf Tumorzellen mit verstärkter inhibitorischer Funktion von CD94/NKG2A auf Effektorzellen hervorrufen (Malmberg et al., 2002).

- Zur erfolgreichen Interaktion zwischen Immun - und Zielzelle bedarf es anfänglich nicht-Antigen-spezifischer Adhäsionsmechanismen.

Tumorzellen regulieren deshalb Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 (Vora et al., 1997) oder costimulatorische Faktoren wie z.B. CD40 in Melanomzellen herunter (von Leoprechting et al., 1999). Darüberhinaus werden auf Tumorinfiltrierenden DCs essentielle Signalmoleküle wie CD80 und CD86 nicht exprimiert, was zu Anergie von T-Zellen führt.

Eine besonders wichtige Ursache für mangelnde Induktion einer T-Zellantwort ist die fehlende Costimulation durch Tumorzellen.

- Tumoren bedienen sich weiterhin der Sekretion von immunsuppressiven Substanzen, um die Immunüberwachung zu beeinflussen. Es kommt zur Freisetzung von akute Phase Proteinen, unspezifischen Hemmstoffen, zur Blockierung von Adhäsionsmolekülen und Blockierung der Apoptose.

Der Freisetzung von löslichem Fas, MUC1/MUC2, Annexin II, Defensinen, Adenosin und hohen Spiegeln an IL-10 werden immunsuppressive Effekte nachgesagt.

- Tumoren können weiterhin eine Funktionsunfähigkeit in TILs induzieren.

Mit Hilfe der Expression von Fas-Ligand können Tumorzellen den Untergang von Anti-Tumor-T-Zellen induzieren (Hahne et al., 1996) bzw. kommt es zur Expression von Fas-Ligand auf T-Zellen mit Autodestruktion von T-Zellen nach Aktivierung durch Tumorzellen (Restifo, 2000). So konnte in Magen-, Brust-, Ösophagus-CA und Melanomen die Expression von Fas-Ligand auf Tumorzellen nachgewiesen werden.

Durch die Freisetzung von bestimmten Zytokinen, wie IL-10, bewirken Tumorzellen eine Anergie von Anti-Tumor-T-Zellen (Steinbrink et al., 2002). Auch die Präsentation bestimmter Antigene kann als Agonist oder Antagonist auf T-Zellklone wirken und Anergie erzeugen. T-Zellanergie kann dabei auch durch Vakzinierung immunogener Peptide aus Tumorantigenen induziert werden (Toes et al., 1996). Weiterhin wurden unter TILs aus Melanomen auch Suppressor-Zellen identifiziert, die durch Sekretion verschiedener Zytokine immunsuppressiv wirken könnten.

Darüber hinaus wurde eine direkte Einschränkung der Funktionsfähigkeit von T-Lymphozyten in Tumorpatienten durch Herunterregulation von CD28 sowie Veränderungen in der Expression des TCR beobachtet.

Zusammenfassend werden in Tumorzellen aktive Mechanismen zur Unterwanderung der Immunabwehr sowie verschiedene Merkmale induzierter oder vorliegender Immundefizienz beobachtet. Hierbei selektionieren sich die Zellen mit den am besten entwickelten Resistenzmechanismen heraus.

Diese Mechanismen sind als wesentliche Hürden für den erfolgreichen Einsatz der Immuntherapie zu betrachten.

1.6.2 Gewebeinvasion und Metastasierung

Ein weiteres Merkmal maligner Tumoren ist ihre Fähigkeit zu Gewebeinvasion und Metastasierung. An erster Stelle steht hierbei der Verlust von Zell-Zell-Kontakten und die Freisetzung aus dem Zellverband. Dies geschieht durch Verlust von Haftstrukturen (Cadherine) durch z.B. fehlende Expression oder Allelverlust/Mutation von Cadherin E. Auch Veränderungen im Phosphorylierungs- und Glykosylierungszustand der Cadherine beeinflusst deren Funktion. Die weitere Invasion des Gewebes erfolgt mit Hilfe von Matrix-Metalloproteinasen (Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine), die auch von Tumorzellen produziert werden können. Die Tumorzellen bewegen sich dabei amöboid unter Nutzung des intrazellulären Aktinfilamentsystems im Gewebe fort. Dieser Vorgang wird durch Zell-Matrix-Interaktionen zwischen Extrazelluläre-Matrix-Rezeptoren auf Tumorzellen (Integrine) und Komponenten des Gewebestromas (Kollagene, Laminine, Fibronectin) unterstützt.

Der finale Schritt in der Tumorausbreitung ist die Metastasierung mit Tumorzellverschleppung in entfernte Körperregionen. Dies kann lymphogen, hämatogen oder kavitär erfolgen. Der Vorgang unterteilt sich in die Intravasation, die Verschleppung mit Blut oder Lymphe sowie die Extravasation ins Gewebe.

Die Metastasierung erfolgt häufig in Form eines Tumorzellembolus, was einen Schutz vor den Immunzellen in der Blutbahn sowie eine erleichterte Bindung an das Gefäßendothel bewirkt. Bestimmte Tumorarten metastasieren bevorzugt in charakteristische Regionen, was einerseits am Abstromgebiet, aber auch an der Membranrezeptorstruktur verschiedener Gewebe liegt.

1.6.3 Angiogenese

Tumorstadium ist in hohem Maße an die Tumor-eigene Gefäßversorgung gebunden. Bis zu einer bestimmten Größe können sich Tumorzellen per Diffusion aus dem umliegenden Gewebe ernähren, benötigen dann aber zum weiteren Wachstum eine eigene Gefäßversorgung. Das Gefäßwachstum wird über Angiogenesefaktoren FGF, Angiogenin, VEGF, TGF und TNF- α sowie Angiogenese-Inhibitoren Angiostatin, IFN- α , β -Thrombospondin und TIMP-2 reguliert (Böcker et al., 2001). Unter günstigen Bedingungen kann der Tumor ein rasches Wachstum vollziehen.

1.6.4 Karzinogenese

Grundvorstellung der Karzinogenese ist das Vorliegen eines entarteten Tumorklons, der sich im Folgenden ungehindert teilt und zur Bildung eines Tumorerkranktes führt. Zu den häufigsten Tumoren des Mannes gehören das Lungen-CA vor Prostata und Kolon-CA, bei der Frau das Brust-CA vor Uterus/Ovar- und Kolon-CA. Bei der Entstehung von Malignität spielen verschiedene Regulatorproteine (Onkogene, Tumorsuppressorgene), Apoptosegene, DNA-Reparaturgene oder Telomerasegene eine wichtige Rolle. Jede Form der Schädigung der DNA durch Noxen oder genetisch begünstigte Entartung in diesen Genregionen kann zur Auslösung malignen Zellwachstums führen. So kann bereits die Aktivierung eines Onkogens ausreichen, während im Falle von Tumorsuppressorgenen beide Gene betroffen sein müssen. Dies kann durch Amplifikation, chromosomale Translokation, Punktmutationen, Integration viraler Genabschnitte sowie Deregelation der Genexpression erfolgen. Für verschiedene Karzinome konnten ätiologisch wichtige Tumorsuppressorgene identifiziert werden: Retinoblastom (Rb1), Wilms-Tumor (WT1), Neurofibromatose (NF1), Kolon-CA (APC), endokrine Tumoren (MEN) und Nierenzellkarzinom (VHL). Störungen in der Funktionalität von DNA-Reparaturmechanismen führt beispielsweise zum Krankheitsbild Xeroderma pigmentosum mit multiplen Hauttumoren.

Eine Vielzahl von chemischen Noxen (aromatische Kohlenwasserstoffe, aromatische Amine, Alkohol, Aflatoxin) sowie ionisierende Strahlung sind bedeutsame Karzinogene. Schließlich sind eine Reihe von Karzinomen bekannt, die durch die Integration von Virusgenom in menschliche DNA entstehen. So stehen Humane Papillomviren mit der Entstehung des Zervix-CA, EBV mit Burkitt-Lymphom und Nasopharynx-CA, HBV/HCV mit hepatozellulärem CA und HHV-8 mit Kaposi-Sarkom in Verbindung. Darüberhinaus ist eine Vielzahl retroviraler Onkogene mit maligner Entartung vergesellschaftet.

1.7 Immuntherapeutische Vakzinierungsstrategien am Beispiel von Melanomen

Die Strategie der Erzeugung einer T-Zellantwort gegen Tumorgewebe durch Vakzinierung von Liganden aus Tumor-assoziierten Proteinen fand erstmals für Melanompatienten erfolgreich Anwendung. Dabei wurde vollständige oder partielle Tumorregression in 10 bis 30 % der Fälle beobachtet (Parmiani et al., 2002). Da die meisten bekannten TAAs aus Melanomen stammen, sollen Verfahren der Immuntherapie daran beschrieben werden. Einzelne Ansätze fanden auch Anwendung in der Impfstudie für RCC, der diese Arbeit zu Grunde liegt. Die Grundlage wurde mit der Entdeckung Tumor-spezifischer Proteine (MAGE, Melan A) gelegt, die entweder ausschließlich im Tumor vorkamen oder als Differenzierungsantigene in nur sehr wenigen, zumeist embryonalen Geweben (Hoden, Plazenta) exprimiert waren (van der Bruggen et al., 1991).

Hierbei konnten in Melanomen drei Antigenklassen identifiziert werden: (Minev, 2002): (1) Differenzierungsantigene, die in Melanomzellen und normalen Melanozyten exprimiert waren, (2) Antigene, die in verschiedenen Tumoren und im Hoden exprimiert waren (Cancer testis antigens) und (3) Antigene, die für individuelle Tumoren spezifisch waren. Folgende Differenzierungsantigene konnten in Melanompatienten identifiziert werden: Tyrosinase, MART-1/Melan-A, gp100, TRP1/gp75 und TRP2. Da diese Proteine jedoch auch im Normalgewebe exprimiert werden, besteht grundsätzlich die Möglichkeit einer immunologischen Toleranzentwicklung oder der Erzeugung einer

Autoimmunreaktion. In Gruppe 2 konnten MAGE, BAGE, GAGE, RAGE und NY-ESO-1 identifiziert werden, die bereits in Impfstudien zum Einsatz kamen. Die dritte Gruppe von Proteinen resultiert aus (Punkt)-Mutationen, die zu einem für den Tumor-spezifischen Antigen führen. Diese Peptide sind jedoch nur eingeschränkt für Vakzinierungen geeignet, da sie an wenige individuelle Tumoren gebunden sind.

Verschiedene Verfahren wurden daraufhin zur Immuntherapie des Melanoms unternommen (Minev, 2002):

- Nach Applikation von autologen Melanomzellen und Vakzinierung von allogenen Tumorzellen wurde klinisches Ansprechen auf die Therapie mit verzögertem Tumorrezidiv beobachtet (Berd et al., 1998; Chan and Morton, 1998). Hierbei ist neben der zellulären Immunantwort vermutlich auch eine humorale Antwort mitentscheidend. Jedoch konnte keine der später folgenden Phase-III-Studien die Überlebensrate von Melanom-Patienten verlängern.
- Im Rahmen von Peptidvakzinierungen gelang es mit verschiedenen Liganden der oben aufgeführten Proteine eine CTL-Immunantwort gegen Melanomzellen zu erzeugen. Mit MAGE-1-beladenen DCs konnten Tumor-spezifische CTLs induzieren werden (Mukherji et al., 1995). Auch gelang die Stimulierung von CTLs mit gp100 (Salgaller et al., 1995). Jager und Kollegen gelang es durch Vakzinierung mit NY-ESO-1 Stabilisierung und Regression von Melanommetastasen zu erreichen (Jager et al., 2000a). Die Induktion von CTLs wurde mit Hilfe von Liganden aus Melan-A erreicht (Jaeger et al., 1996). Weitreichende Regression von metastasiertem Melanom konnte durch Vakzinierung eines Patienten mit Peptiden aus MART-1, Tyrosinase und gp100 erzielt werden (Jager et al., 2000b). Durch Modifizierung der Liganden mit verbesserten Bindungseigenschaften an MHC-I (Parkhurst et al., 1996), Schutz gegen rasche Proteolyse (Celis et al., 1994), verbesserte Präsentationseigenschaften (Minev et al., 2000), Zugabe von Adjuvantien (IL-2, GM-CSF) oder Freund's adjuvant (Wang et al., 1999) sowie der Peptidpräsentation über DCs (Mukherji et al., 1995) konnten die beobachteten Effekte weiter verstärkt werden.

Den Hauptvorteil der Peptidvakzinierung stellt die einfache Synthesemöglichkeit von Peptiden in großen Quantitäten dar. Ein weiterer Vorzug liegt in der Bestimmung verschiedener, eindeutiger Epitope, gegen die die Immunreaktion gerichtet ist. Die Möglichkeit der Beladung dendritischer Zellen erweist sich weiterhin als günstig. Nachteile liegen im raschen Abbau von Peptiden sowie der Tatsache, dass jedes Individuum aufgrund seiner MHC-Konstellation unterschiedliche Epitope des Tumors erkennt. Durch biochemische Modifikation sowie die Identifizierung weitreichend vorkommender, Tumor-assoziiertes Antigene können diese Nachteile minimiert werden (Minev, 2002).

- eine weitere Möglichkeit der Vakzinierung, die in Melanompatienten untersucht wurde, ist die Vakzinierung mit Hilfe rekombinanter Viren. Hierbei wurden Vaccinia Viren oder Adenoviren als Vektoren für DNA aus MART-1, gp100, Tyrosinase verwendet (Drexler et al., 1999; Rosenberg et al., 1998). Nach Transduktion des Tyrosinase-Vektors in DCs wurde eine CTL-Reaktion *in vitro* nachweisbar. Diese Art der Transduktion bietet weiterhin die Möglichkeit, gleichzeitig multiple Tumorantigene im Sinne einer Polyepitop-Vakzinierung zu transduzieren (Mateo et al., 1999). Damit könnte die Immunevasion des Tumors durch Herunterregulation von MHC-I unterwandert werden (Bonnet et al., 2000). Vorteilhaft ist weiterhin, dass neben der zellulären auch eine humorale Immunantwort induziert wird. Nachteile liegen in der Antikörperbildung gegen das Vektorvirus sowie der potentiellen Vermehrung des Virus in immunkompromittierten Patienten.

- Eine geringe, jedoch langandauernde Expression von Antigenen kann mit Hilfe der Vakzinierung von DNA-Plasmiden erreicht werden. Es ist hierbei möglich sowohl eine humorale als auch zelluläre Immunantwort mit der Generation Antigen-spezifischer CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen zu erreichen (Pertmer et al., 1995). Da nur professionelle APCs in der Lage sind durch zeitgleiches Zusammenbringen von Antigen und costimulatorischen Signalen eine primäre Immunantwort einzuleiten, ist die Aufnahme von DNA-Plasmiden in diese Zellen Grundlage der Vakzinierung. Ein weiterer Ansatz ist die Transduktion von immunologisch aktiven Substanzen in Tumorzellen (Pardoll, 2000). Eine Vielzahl von Zytokinen wurde auf diese Weise untersucht,

wobei noch keine signifikanten Ergebnisse vorliegen. Vorteile der DNA-Vakzinierung liegen in der langanhaltenden Immunantwort, der einfachen Herstellung des Impfstoffs sowie keiner Erzeugung einer anamnestic Immunantwort, die beispielsweise zur raschen Eliminierung viraler Konstrukte führen kann.

- Weiterhin Anwendung fand die Antigenpräsentation über dendritische Zellen. DCs sind die potentesten APCs zur Erzeugung einer Immunantwort (Steinman, 1991). Sie sind in der Lage Antigene sowohl CD4⁺ - als auch CD8⁺ - T-Zellen zu präsentieren. Dabei zeigt sich, dass eine DC-vermittelte Peptidpräsentation einer reinen Vakzinierung mit Peptiden bei der Erzeugung einer CTL-Antwort überlegen ist (Porgador and Gilboa, 1995).

Es gelang mit verschiedenen Tumor-assoziierten Proteinen (MART-1, gp100) eine T-Zellantwort *in vivo* und *in vitro* zu erzeugen (Mackensen et al., 2000).

Hierbei wurden die MHC-Moleküle der DCs entweder per viralen Vektor oder über den zelleigenen MHC-I-Prozessierungsweg beladen.

1.8 Das Nierenzellkarzinom (RCC)

Das Nierenzellkarzinom ist mit 3% aller Tumoren ein vergleichsweise seltener Tumor. RCCs stellen aufgrund des oftmals späten symptomatischen Auftretens und der dann mangelnden therapeutischen Beeinflussbarkeit, ein wichtiges Ziel in der Bewertung alternativer Therapieansätze (z.B. Immuntherapie) dar. RCCs haben ihren Häufigkeitsgipfel bei 55-60 Jahren und überwiegen in der Inzidenz bei Männern. Bei 30% der Patienten liegt bei Diagnose bereits ein metastasiertes Nierenzellkarzinom vor (Martel and Lara, 2003). Die Metastasierung erfolgt vorwiegend in Lunge, Leber, Knochen und Gehirn. Histologisch lässt sich das Nierenzellkarzinom in 4 Klassen unterteilen:

(1) Klarzell-CA – umfasst ca. 70-80% aller RCCs, entsteht aus Zellen des proximalen Tubulus und ist mit Verlust des VHL-Gens sowie Deletionen auf Chromosom 3 assoziiert. (2) Chromophiles RCC – umfasst 10-15% aller RCCs, entsteht aus Zellen des proximalen Tubulus und ist mit Trisomie 7/17 sowie Aktivierung des MET-Protoonkogens vergesellschaftet.

(3) Chromophobes RCC – umfasst 4-5 % aller RCCs und entsteht aus Zwischenzellen des Sammelrohrs. (4) Sammelrohr-CA – umfasst weniger als 1 % der RCCs und entsteht aus medullären Zellen des Sammelrohrs.

Zu den Risikofaktoren des RCC gehören chronische Niereninsuffizienz, Rauchen und Fettleibigkeit. Eine Reihe von genetischen Erkrankungen ist mit RCC assoziiert. Bei der von Hippel-Lindau Krankheit wird ein mutiertes Tumorsuppressorgen für die Entstehung von RCCs verantwortlich gemacht (Linehan et al., 1995). Darüberhinaus sind, unabhängig von VHL, ein familiäres Klarzell-CA (Li et al., 1993) sowie ein familiäres chromophiles (papilläres) Nierenzell-CA beschrieben, das durch Mutation im Met-Protoonkogen verursacht wird beschrieben (Schmidt et al., 1997). Letztlich ist auch die tuberöse Hirnsklerose mit Klarzell-CA vergesellschaftet.

Das Staging des RCC basiert auf der angeführten TNM-Klassifikation der WHO.

Tabelle 1.1: TNM-Klassifikation des Nierenzellkarzinoms gemäß WHO

T- Tumorausdehnung, N – Lymphknotenbefall, M - Fernmetastasierung

T1a	Tumor < 4 cm; begrenzt auf Niere
T1b	Tumor 4 – 7 cm, begrenzt auf Niere
T2	Tumor > 7 cm begrenzt auf Niere
T3a	Tumor infiltriert Nebenniere od. perirenales Fettgewebe innerhalb der GEROTA-Faszie
T3b	Ausbreitung in V. renalis od. V.cava unterhalb des Zwerchfells
T3c	Ausbreitung in V. cava oberhalb des Zwerchfells
T4	Tumor überschreitet GEROTA-Faszie
N1	Einzelne regionale Lymphknotenmetastase
N2	> 1 regionale Lymphknotenmetastasen
M1	Fernmetastase(n)

Die 5-Jahresüberlebensrate beträgt 95% im Stadium I, 88% im Stadium II, 59% im Stadium III, sowie 20% im Stadium IV (Javidan et al., 1999). Hierbei haben Patienten mit chromophilem RCC eine bessere Prognose als Patienten mit Klarzell-CA, Patienten mit VHL eine bessere Prognose als sporadische RCC-

Fälle (Neumann et al., 1998b). Alternativ wurde eine Reihe von Tumorfaktoren wie Ki67, CD44, RAGE1, Prame und MUC1 seither auf ihren prognostischen Wert untersucht, ohne dass sich einer der Marker dem bisherigen Stagingssystem als überlegen erwies (Michael and Pandha, 2003).

1.8.1 Therapieverfahren und Therapieansätze für RCC

Bislang unumstrittene Therapie der Wahl für RCC ist die Operation mit zumeist radikaler Nephrektomie. Aufgrund der weitgehenden Strahlenresistenz von RCCs spielt die Strahlentherapie nur palliativ bei Knochen- oder Gehirnmastasen ein Rolle (DiBiase et al., 1997). Therapieversuche mit Chemotherapeutika verliefen unbefriedigend und erzielten minimale Erfolge von 10 % (Amato, 2000). Dies wird damit begründet, dass RCCs durch p-Glykoprotein-Transporter zytostatische Substanzen aus dem Zytosol entfernen (Bak, Jr. et al., 1990) und weitere Drug-Resistance-Proteine exprimieren. Traditionelle Behandlungsmethoden wie Radio- und Chemotherapie belaufen sich auf 2-6 % therapeutische Erfolgsrate (Bleumer et al., 2003).

Der Einsatz von Interferon- α erzielte Erfolgsraten von 15% (Fossa, 2000). Allerdings dauerte die positive Wirkung selten länger als 4-6 Monate an und begünstigte vor allem Patienten in ohnehin günstiger Konstitution. Studien mit Interleukin-2 konnten in 15% der Fälle ein Ansprechen verzeichnen (Fisher et al., 2000). Die Hälfte der ansprechenden Patienten zeigte vollständige dauerhafte Remission. Beschränkend ist die Toxizität von IL-2, die auch durch Gabe von Steroiden und anti-TNF nicht gesenkt werden konnte. Der IL-2-Effekt konnte auch in Kombination mit anderen Zytokinen nicht weiter gesteigert werden und begünstigte nur vereinzelte Patienten. Therapieverfahren mit humoraler Immuntherapie führten zum Einsatz von mit toxischen Substanzen und Radionukleotiden beladenen Antikörper gegen G250 (Bleumer et al., 2003). Da die meisten Antigene intrazellulär vorkommen, ist Antikörper-vermittelte Immuntherapie vermutlich für weit weniger Tumorantigene anwendbar.

DC- vermittelte Vakzinierungsstudien für RCC (Holtl et al., 2002; Oosterwijk-Wakka et al., 2002) zeigten Immunantwort, jedoch bislang keine weitreichenden klinischen Erfolge. Zusammenfassend konnte mit keiner der bislang angewandten Therapiestrategien ein weitreichender Therapieerfolg erzielt werden.

In der Literatur finden sich Fälle spontaner Remission von metastasiertem RCC (Oliver et al., 1988; Snow and Schellhammer, 1982), was diese Tumoren bezüglich der Induktion einer Immunantwort im Rahmen einer Immuntherapie als hoffnungsvoll erscheinen lässt.

Nur wenige CTL-Linien, die spezifisch für autologe RCC sind, konnten bislang identifiziert werden. Dazu gehören Zielantigene aus RAGE1 (Gaugler et al., 1996) und einem mutierten HLA-A*02 Protein (Brandle et al., 1996), die jedoch nur in einer geringen Anzahl primärer RCCs exprimiert sind. Eine Reihe von TAAs wie MAGE-1, MAGE-3, G250 (Ringhoffer et al., 2004), RAGE-1, PRAME, glycoprotein 75 (Neumann et al., 1998a), Her2/neu (Brossart et al., 1998), Adipophilin (Schmidt et al., 2004) und MET wurden in RCCs identifiziert, jedoch blieben klinische Therapieerfolge bislang aus. Die weitreichende Expression von G250 in RCC konnte institutsintern bestätigt werden, nicht jedoch für PRAME und RAGE. Wesentliche Erkenntnisse über Expression und Liganden von ADFP und MET entstammen ebenfalls der Arbeitsgruppe. G250, das in 85% aller RCCs exklusiv vorkommt (Bleumer et al., 2003), sowie Liganden aus MET und Adipophilin (Vakzinierungsstudie AG Rammensee) finden gegenwärtig in immuntherapeutischen Studien Anwendung. Die Identifizierung weiterer Tumor-assoziiertes Antigene zum Einsatz in der Peptidvakzinierung ist deshalb wesentlicher Teil auch dieser Arbeit.

1.9 Konzept der Patienten-individuellen Peptidvakzinierung von RCC-Patienten

Grundlage dieses speziellen Ansatzes ist die Erstellung eines individuellen Peptidcocktails für Tumorpatienten aus Peptidliganden, die real auf den Tumorzellen des Patienten nachgewiesen werden konnten und der Präsentation auf verschiedenen HLA-Allelen zugehören (Multi-Epitop-Ansatz). Eine Reihe festgelegter Einschlusskriterien wurde für die Auswahl der Impfliganden zu Grunde gelegt:

(1) Isolierung des Liganden aus Tumorzellen, (2) deutliche Überexpression des Quellproteins im Tumorgewebe, (3) möglichst geringe Expression in allen übrigen Geweben, (4) Hinweise auf Tumor-Assoziation aus Literaturangaben. Damit fließen Informationen auf Protein- und Nukleinsäureebene sowie funktionelle Aspekte per Literatur in den Prozess ein.

Liganden mit deutlicher Überexpression oder exklusiver Expression im Tumorgewebe werden aufgrund der vermutlich hohen Ligandendichte auf Tumorzellen als günstig bewertet. Konnten keine den Einschlusskriterien entsprechenden Liganden identifiziert werden, wurden für überexprimierte Proteine Liganden mit Hilfe der Epitopvorhersage durch „SYFPEITHI“ berechnet. Dieses Verfahren erscheint angemessen, da nur ein Bruchteil der präsentierten Liganden auch per Massenspektrometrie nachgewiesen werden kann (Singh-Jasuja et al., 2004). Vielversprechende Liganden wurden anschließend synthetisiert und in bis zu 8 Zyklen über beladene DCs dem Patienten appliziert. Notwendiges klinisches Einschlusskriterium für die Patientenauswahl war das Vorliegen von Metastasen als klinischem Messwert für Tumorregression. Nach jedem Impfzyklus wurden Blutproben zum Nachweis von CTLs entnommen. Der Nachweis von Tumor-spezifischen CTLs erfolgte *ex vivo* nach Peptidstimulation durch RT-PCR und Tetramerfärbung. Da bislang keine übergreifenden Tumor-assoziierten Antigene bekannt sind und auch potentiell universelle Tumorantigene, wie HER2/neu in z.B. Mammagewebe, nur zu 20 % überexprimiert sind (Witton et al., 2003), erscheint dieser Ansatz angesichts der HLA-Restriktion von Liganden vorteilhaft. In Untersuchungen der

Arbeitsgruppe Rammensee an 20 RCC-Proben konnte keine HER2/neu - Expression in RCC beobachtet werden (Singh-Jasuja et al., 2004).

Die qualitative Aussage über die *in vivo* applizierten, Tumor-assoziierten Peptide bekommt durch die *ex vivo* Untersuchung einen hohen Grad an Aussagekraft. Das beschriebene Patienten-individuelle Design trägt dabei den physiologischen Eigenschaften des Patienten durch individuelle Analyse in besonderem Maße Rechnung.

1.10 MHC-I-Quantifizierung

Wie alle Zellen des Organismus exprimieren auch Tumorzellen ihren intrazellulären Proteinbestand in Form prozessierter Peptide über MHC-I an der Zelloberfläche.

Da maligne Zellen jedoch versuchen sich durch Herunterregulierung, Verlust oder Mutation ihrer Oberflächen-MHC-I-Moleküle diesem Mechanismus zu entziehen, unterscheiden sich Tumoren erheblich in der Menge nachweisbarer MHC-I-Moleküle. Die Möglichkeit eines quantitativen Nachweises der Tumor-gebundenen MHC-I im Vergleich zwischen Tumorproben, aber auch zwischen Tumorgattungen, ist deshalb ein wichtiger Parameter für die Immunogenität und das Peptidpräsentationsverhalten von Tumoren.

Weiterhin ist der quantitative MHC-I-Nachweis ein wichtiger Indikator für die zu erwartende Peptidmenge im Vorfeld der massenspektrometrischen Analyse.

Bislang diente zur Bestimmung des zellulären MHC-I-Gehalts der quantitative Nachweis der schweren Kette des MHC-I per Edman-Abbau aus dem Eluat mit einem bestätigenden Western-Blot.

Eine Aussage über den ursprüngliche MHC-I-Gehalt des Tumorgewebes im Ausgangslysat ist hiermit jedoch nicht möglich, da eine vollständige und verlustfreie MHC-I-Extraktion hierzu Voraussetzung wäre.

Dies leitet zu der Frage über, ob es möglich ist MHC-I-Moleküle quantitativ bereits im Tumorlysat, d.h. in einem frühen Schritt der Immunpräzipitation nachzuweisen, um hierdurch näher an der ursprünglichen Ausgangsmenge zu liegen.

Dies soll im Verlauf dieser Arbeit mit Hilfe der Etablierung eines quantitativen ELISA-Verfahrens, aber auch unter Einbeziehung der bisherigen Methoden Edman-Abbau und Western-Blot, untersucht werden.

Aufgrund der hohen Sensitivität, der schnellen Durchführbarkeit und der zeitlich frühen Einsetzbarkeit im Peptidextraktionsprozess, könnte die Verfügbarkeit eines quantitativen ELISA eine günstige Möglichkeit der MHC-I-Quantifizierung aus Tumorlysat darstellen.

1.11 Prozessoptimierung der Peptidextraktion

Ein allgegenwärtiges Problem im Prozess der Extraktion von Peptiden aus Tumorgewebe sind Verlustquellen entlang der verschiedenen Teilschritte.

Eine dieser Quellen lässt sich beispielweise bei der Lyophilisation und Entsalzung der Eluate vor der Einspritzung ins Massenspektrometer vermuten.

Aus diesem Grund soll, zusätzlich zur herkömmlichen Methode der Immunpräzipitation per Protein-A-Säule, die MHC-I/Peptidextraktion per Cyanbromid-Säule untersucht werden, die geringere Eluatvolumen und eine salzfreie Elution der Säulen ermöglicht.

Auch im Rahmen der Prozessoptimierung soll die Möglichkeit einer quantitativen Bestimmung der MHC-I-Menge im Lysat per ELISA untersucht werden. Hierbei würde ein quantitativer Vergleich des MHC-I-Gehalts im Ausgangslysat und nach der Immunpräzipitation wichtige Anhaltspunkte zur Extraktionsleistung der Säulen ermöglichen und gegebene Defizite aufdecken.

Ein weiterer Ansatzpunkt der Prozessoptimierung liegt in der Verbesserung der Ausbeute an Peptiden aus den Tumorlysaten. Herkömmlicherweise wird das Tumorgewebe in einem speziellen Lysepuffer homogenisiert, der die Zellmembranen zerstört und damit die membranständigen MHC-Moleküle in Lösung freisetzt. Die Möglichkeit, diesen Vorgang mit Hilfe einer hochfrequenten Ultraschallbehandlung zu unterstützen, soll im weiteren Verlauf ebenfalls untersucht werden.

1.12 Zielsetzung der Arbeit

Schwerpunkt dieser Arbeit ist die Isolierung und Identifizierung möglicher Tumor-assoziiertes Antigene aus Nierenzellkarzinomen sowie deren vergleichende Bewertung anhand von Expressionsdaten aus Tumorgewebe und weiteren humanen Geweben.

Zielsetzung hierbei ist die Detektion potentieller T-Zellepitope zum Einsatz im Rahmen der angeschlossenen Patienten-individuellen Peptidvakzinierungsstudie sowie zukünftigen Vakzinierungsstudien.

Die angewendete Präzipitationstechnik wurde auch zur Isolation von Antigenen aus Kolon-CA und benigner Prostatahyperplasie angewendet.

Darüberhinaus besteht die Aufgabe der Etablierung eines quantitativen ELISA-Verfahrens zur Quantifizierung von MHC-I-Molekülen in Tumorlysaten.

Die Messwerte sollen anschließend mit entsprechenden quantitativen Ergebnissen aus Western-Blot und Edman-Abbau verglichen werden. Zuletzt sind Optimierungsuntersuchungen des Immunpräzipitationsprozesses durch Ultraschallbehandlung von Proben und die Erprobung reduzierter Eluatvolumen durch CNBr-Elution Teil dieser Arbeit.

2 Material und Methoden

2.1 Peptidextraktion per Immunpräzipitation aus humanen Tumoren

2.1.1 Gewinnung von nativem Tumorgewebe zur Immunpräzipitation

Im Rahmen dieser Arbeit wurden MHC/Peptidkomplexe per Immunpräzipitation (Affinitätschromatographie) aus solidem humanen Tumorgewebe von Nieren und Kolonkarzinomen extrahiert.

Hierbei wurde nur Tumorgewebe aufgenommen, das mindestens eine Masse von 5 g umfasste und nach Möglichkeit mindestens eine ebenso große Menge Normalgewebe zur Verfügung stand. Es konnten so 12 Nieren – und 9 Kolonkarzinome aufgearbeitet werden. Weiterhin wurden 3 Gewebe aus benigner Prostatahyperplasie (BPH) aufgearbeitet.

Von dem chirurgisch entnommenen Resektat wurde mit Einverständnis des Patienten, unter Aufsicht des Pathologen, ein möglichst großes Stück Tumor und Normalgewebe nativ entnommen. Als Normalgewebe wurde, im Falle von Kolonkarzinomen, in einigem Abstand zum Tumor gesunde Mukosa, bei Nierenkarzinomen umliegendes gesundes Nierengewebe entnommen. Das entnommene Gewebe wurde sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Weiterhin wurden 10 ml EDTA-Blut zur HLA-Typisierung entnommen. Einverständniserklärung des Patienten und Votum der Ethikkommission (Nr. 272/2000) liegen vor.

2.1.2 Zellbiologische Methoden zur Antikörpergewinnung

Die im Rahmen der Säulen-Immunpräzipitation isolierten MHC/Peptidkomplexe wurden mit Hilfe des Detektionsantikörper W6/32 (Maushybridom IgG_{2α} - anti HLA-A, -B, -C) (Barnstable et al., 1978), eines für HLA -A, -B und -C-Allele bindenden monoklonalen IgG-Antikörpers extrahiert.

2.1.2.1 Kultivierung der Hybridomzelllinie W6/32

Zunächst wurde ein Röhrchen mit etwa 5×10^6 Hybridomzellen aufgetaut und auf eine 6 Well-Platte verteilt. Als Nährmedium wurde RPMI-Spezialmedium (mit NaHCO_3 , HEPES, L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin, Na-Pyruvat, Non-essential aminoacids, Mercapto-Ethanol) unter Zugabe von 10% FCS (fetal calf serum, PAN biotech GmbH) verwendet. Die Aufzucht erfolgte im Inkubator (Labotech, Water jacketed incubator) bei 37°C und 7,0% CO_2 in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre.

Nach ca. 1 Woche Aufzucht konnten dann je 5 ml pro Well in 50 ml Kulturflaschen (Cellstar, Greiner Bio-one) überführt werden. Die Zelldichte und der Zustand der Zellen wurden mikroskopisch kontrolliert. Die Kulturflaschen wurden im Weiteren unter Zugabe von RPMI-Nährmedium weiter „gesplittet“ und in 250 ml Kulturflaschen (Cellstar, Greiner Bio-one) überführt. Zuletzt wurden je zwei 250 ml Kulturflaschen in sterile 2 l Glaskulturflaschen überführt und unter Wärmeraumbedingungen (37°C auf Rollergestell) bis auf ein Maximalvolumen von 1200 ml angezüchtet.

Nach Auskultivierung der Zelllinie in Glaskulturflaschen wurden je 2 l Hybridomzellsuspension mit 0,02% (oder 20 ml 2%) Natriumazid versetzt. Der pH wurde mit 10 M NaOH auf pH 8,0 eingestellt und die Kulturflaschen zur passiven Absedimentation der Zellen und anderer partikulärer Bestandteile bei 4°C im Kühlraum gelagert. Der Überstand wurde dann vor Reinigung per Protein-A-Säule durch einen 0,2 μl Filter von feineren Partikeln gereinigt.

2.1.2.2 Antikörperreinigung aus Hybridomzellüberstand

Die im Überstand befindlichen Hybridomantikörper wurden mit Hilfe einer Affinitätschromatographiesäule (\rightarrow Kapitel 2.1.3.1), beschickt mit 0,6 g Protein-A-Sepharose (Amersham, Biosciences) extrahiert. Die Säule wurde hierzu zunächst 30 min mit PBS (pH 7,2) bei einer Flussrate von 1,5 ml/min äquilibriert.

Die Protein-A-Sepharosematrix bindet hierbei die Fc-Teile der Antikörper gemäß der natürlichen Funktion von *Staphylococcus aureus*.

Im Folgenden wurden jeweils 4 l des gefilterten Hybridomüberstandes über Nacht passiv über die Protein-A-Säulenmatrix laufen lassen. Anschließend wurde die Säulen 30 min mit PBS-Puffer (laborinterne Herstellung) gewaschen. Die Säulen-gebundenen Antikörper wurden darauf mit 4 ml Elutionspuffer (Citratpuffer 50 mM, pH 3) im Säuren von der Säule eluiert. Das Eluat wurde in 9 ml Kopplungslösung (0,5 M NaCl, 0,1 M NaHCO₃, pH 8,3) aufgefangen, nachdem die ersten 0,5 ml des Eluats verworfen wurden.

Der Hybridomüberstand wurde zumeist 3 - 4 mal per Protein-A-Säule aufgereinigt und die Säulen entsprechend des obigen Vorgehens gewaschen und eluiert. Zuletzt wurde die Konzentration des gewonnenen Antikörpers photometrisch (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech) bei 280 nm bestimmt.

Die Konzentration des Antikörpers wurde gemäß folgender Formel ermittelt:

$$\text{Absorption}_{280\text{nm}} \times 0,7 = \text{Antikörperkonzentration (mg / ml)}$$

Zumeist konnten 10 - 20 mg AK pro Ersteluat und 5 -10 mg in den weiteren Elutionen gewonnen werden.

Der Großteil der zur Immunpräzipitation verwendeten Antikörper wurde freundlichsten von Claudia Falkenburger zur Verfügung gestellt.

2.1.3 Herstellung von Affinitätssäulen

2.1.3.1 Herstellung von Protein-A-beladenen Säulen

0,4 bzw. 0,6 g Protein-A-Sepharose (Amersham Bioscience) wurden zunächst in ein Plastikröhrchen abgewogen und unter Zugabe von ca. 5 ml aq. dest. quellen lassen. Dies erfolgte für ca. 30 min unter ständigem Schwenken in horizontaler Lage. Abschließend wird das Röhrchen für 30-60 min senkrecht stehen lassen, so dass sich das Säulenmaterial passiv absetzen konnte.

Der Wasserüberstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen, um eventuelle Schwebstoffe oder Fasern zu entfernen.

Das Säulenmaterial wurde dann in 5 ml PBS resuspendiert und auf die Säule gegeben. Nach 30-minütigem Waschen per Pumpenlauf mit PBS (pH 7,2), Flussrate 2 ml/min, ist die Säule einsatzfertig.

2.1.3.2 Herstellung von CNBr-Säulen

0,6 g CNBr-Sepharose (Amersham Biosciences) wurden abgewogen und zur Reinigung und Aktivierung mit 40 ml 1 mM HCl für 1 h auf dem Drehrad vermischt.

Im Gegensatz zur oben beschriebene Protein-A-Säule wird der Immunpräzipitationsantikörper hier zunächst chemisch an die Sepharose - matrix gebunden.

Pro 37,5 mg CNBr-Sepharose wurde jeweils 1 mg W6/32 AK zur Kopplung aufgereinigt.

Hierzu wurde die Antikörperlösung zunächst 3 - 4 mal zyklisch über eine 0,6 g Protein-A-Säule aufgereinigt und anschließend mit 4 ml Citratpuffer pH 3 in 9 ml Kopplungspuffer (0,5 M NaCl, 0,1 M NaHCO₃, pH 8,3) von der Säule eluiert. Der Antikörpergehalt wurde photometrisch gemäß obiger Formel (→ Kapitel 2.1.2.2) bestimmt.

Die CNBr-Sepharose Matrix wurde nach dem Aktivierungsvorgang 2 min bei 300 rpm ohne Bremse abzentrifugiert und der HCl-Überstand entnommen. Der aufgereinigte Antikörper wurde mit Kopplungspuffer auf ein Volumen von 30 ml aufgefüllt und anschließend mit der CNBr-Sepharose Matrix 3 - 4 h auf dem Drehrad vermischt.

Sofort nach Zugabe des Antikörpers wurden 130 µl Probe des Antikörper-Sepharose Gemisches entnommen und in einem 500 µl „Eppendorf-Tube“ bei 30000 Umdrehungen, 2 min abzentrifugiert (Biofuge 13, Heraeus instruments).

Der photometrisch ermittelte Wert des abzentrifugierten Überstandes dient als Ausgangspunkt für die Ermittlung der Kopplungseffizienz. Im Weiteren wurden so wiederholt Proben gemäß des obigen Ansatzes entnommen, bis die

gemessene Absorption der Probe < 10 % der ursprünglichen Absorption bzw. die Kopplungseffizienz > 90% betrug.

Nach erfolgreicher Kopplung wurde die CNBr-Sepharose bei 300 rpm per Megafuge 1.0 R (Heraeus instruments) 2 min ohne Bremse abzentrifugiert, der Überstand entnommen und zur Blockierung unspezifischer Bindungen mit 40 ml 0,1 M Glycinlösung im Kopplungspuffer (0,5 M NaCl, 0,1 M NaHCO₃, pH 8,3) vermischt. Nach 1 h Blockierung unter Rotierung auf dem Drehrad wurde per Megafuge-Zentrifuge abzentrifugiert, der Überstand entnommen und nochmals unter Zugabe von 40 ml PBS gewaschen.

Anschließend wurde das Gelmaterial auf die Säule überführt und nochmals 30 min mit PBS bei 2 ml/min linear per Pumpe gewaschen.

2.1.4 Homogenisierung des Tumorgewebes

Das zu lysierende Tumorgewebe wurde zunächst im gefrorenen Zustand unter Zugabe eines entsprechenden Volumens (1 ml Lysepuffer / g Gewebe) doppelt konzentriertem Aufschlusspuffer (1,2 g CHAPS: 3 – [(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propansulfonate (Roche); 3 Tabletten „Complete Protease Inhibitor“, Roche in 100 ml PBS) in den Laboratory Blender (Waring Commercial) gegeben. Hierzu wurde zunächst 1 ml doppelt konzentrierter Lysepuffer pro 1 g Gewebe verwendet. Nach einem ersten Homogenisierungsschritt im Blender wurde der Lysepuffer auf einfache Konzentration verdünnt und nochmals die 3 – 4-fache Menge des Tumorumfanges (1 ml / g Gewebe) zugegeben. Das Tumorlysate wurde anschließend 20 min per Potter-Homogenisator (Heidolph RZR 2020) homogenisiert. Abschließend folgten 30 min Homogenisierung der Tumorsuspension per Glashomogenisator DOUNCE (Sartorius AG) mit zunächst großem (L – large) dann kleinem (S – small) Kolbenspalt. Danach wurde das Tumorlysate 90 min unter Rühren zum weiteren Aufschluss der Zellmembranen im Lysepuffer belassen.

Das Tumorlysate wurde dann auf zwei 50 ml „Cellstar-Tubes“ (Greiner bio-one) verteilt und grobe Gewebereste bei 4000 Umdrehungen (4°C, 20 min) per

Megafuge 1.0 R Zentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde zur feineren Abzentrifugation in 25 ml Ultrazentrifugenröhrchen unter Gewichtskontrolle verteilt. Pellets und die enthaltenen Zellfragmente wurden verworfen.

Die anschließende Ultrazentrifugation des Tumorlysates per Beckmann Ultrazentrifuge L 80 mit Rotor Ti70 erfolgte für 1 h bei 40000 Umdrehungen und 4 °C.

Der hierdurch gewonnene Überstand wurde dann in eine 50 ml Infusionsspritze aufgezogen und mit Hilfe eines 0,2 µm Filters (Sartolab P plus, Sartorius AG) ultrafiltriert.

2.1.5 Affinitätschromatographie

Im Falle einer MHC-I-Extraktion mit CNBr-Matrix konnte nach Gewinnung des filtrierten Tumorlysates die Säule mit Aufschlusspuffer äquilibriert werden und anschließend das Tumorlysat mit 1,5 ml/min über Nacht zyklisch über die Säule gepumpt werden.

Die Äquilibrierung per Lysepuffer dient hierbei der Anpassung der Säulumgebung an die im Lysat vorherrschenden Bedingungen.

Im Falle einer MHC-I-Extraktion per Protein-A-Säule muss der Präzipitationsantikörper W6/32 zunächst 1 h unter Rühren mit dem Lysat inkubiert werden. Hierbei wurde 1 mg Antikörper pro 1 g Tumorausgangsgewebe verwendet. Anschließend kann das Lysat mit zugegebenem Antikörper, nach Äquilibrierung der Säule mit Lysepuffer, zyklisch über Nacht mit 1,5 ml/min über die Säule gepumpt werden.

Der Antikörper wird hierbei nicht-kovalent an Protein-A gebunden, so dass die Säulenmatrix nach der Säureelution wieder verwendet werden kann.

2.1.6 Säureextraktion und MHC-I / Peptidelution

CNBr - und Protein-A-Säule werden nach Bindung der MHC-I / Peptidkomplexe aus dem Tumorlysat an die Säulenmatrix zunächst 15 min mit Lysepuffer, dann je 45 min mit PBS und H₂O bei 1,5 ml/min gewaschen und anschließend per

Säurezugabe eluiert. Hierzu werden für die Elution der CNBr - Säulen 300 µl eines Gemisches aus 10 ml 0,1% TFA (Trifluoressigsäure, Applied Biosystems) und 1 ml 10 % TFA zugegeben. Die säuregetränkte Säulenmatrix wird 5-10 min zur Durchmischung des Gelbettes senkrecht gestellt und anschließend unter Pumpendruck in ein Centriconröhrchen mit Ultrafiltrationsmembran (Centricon, Centrifugal Filter Devices, Millipore) ausgeblasen. Dieser Elutionsvorgang wird 3 mal mit 300 µl TFA-Elutionsgemisch wiederholt, so dass ein Eluatvolumen von ca. 1 ml entsteht.

Durch den sehr sauren pH 1 der TFA-Elutionslösung wird die nicht-kovalente Bindung zwischen CNBr-Sepharose und Antikörper gelöst und die Sepharose-Matrix zerstört, so dass das Säulematerial nicht für eine weitere Elution verwendet werden kann.

Die Centriconröhrchen zur Trennung von Peptid und Antikörper wurden zuvor für CNBr-Elutionen unter Zugabe obiger TFA-Elutionslösung, für Protein-A-Säulen mit 50 mM Citrat plus 10% (v/v) 50%-igem TFA von Plastikweichmachern gereinigt und die Oberfläche unter Glycinzugabe geblockt. Bei diesen Reinigungsschritten werden Säure- und Glycinlösung durch die bei 4000 rpm in der Megafuge-Zentrifuge 1.0 R erzeugten Zentrifugalkräfte durch die Centricon-Membran (Aufschlussgrenze 10 kDa) gedrückt.

Die Elution der Protein-A-Säule erfolgte unter Zugabe von 4 ml Citratpuffer (50 mM, pH 3) für 0,6 g Säulenmatrix bzw. 3 ml für 0,4 g Säulenmatrix, wobei jeweils die ersten 0,5 ml verworfen wurden. Eluiert wurde in Citratpuffer-gespülte Centrikons mit anschließender Zugabe von 10% (v/v) 50%-igem TFA ins das Eluat.

Im Falle der Protein-A-Säule wurde dann die Säule mit zunächst 30 min PBS und 15 min Lysepuffer per Pumpenlauf äquilibriert und das Tumorsatvolumen erneut 3 mal zyklisch über die Säulenmatrix gepumpt. Waschung und erneute Elution der Säulenmatrix erfolgten analog. Vom Eluatvolumen wurden jeweils 50 µl für den MHC-I-Nachweis per Edman-Abbau und Western-Blot entnommen.

Die Eluate werden anschließend im Centrikon bei 4000 Umdrehungen per Megafuge-Zentrifuge 1.0 R ultrafiltriert. Durch die im Centrikon befindliche

Ultrafiltrationsmembran werden die Peptide von MHC und Antikörpern getrennt und stehen schließlich im endgültigen Eluat zur Analyse zur Verfügung. Die Probe wird dann vor Analyse im Massenspektrometer bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Die im Kapitel 2.1 beschriebene Methode der Peptidextraktion wurde von Falk und Kollegen beschrieben (Falk et al., 1991).

2.2 MHC-I-Quantifizierung

2.2.1 MHC-I-Quantifizierung per Edman-Abbau

Die von Edman beschriebene Methode erlaubt die N-terminale Sequenzanalyse von Peptiden und Proteinen. Hierbei wird in jedem Reaktionszyklus vom N-terminalen Ende her die jeweils randständige AS abgespalten und identifiziert. Dieser Vorgang besteht aus den drei Teilschritten Kupplung, Spaltung und Konvertierung. Zunächst wird die N-terminale AS an Phenylisothiocyanat (PITC) gekoppelt und es entsteht ein Phenylthiocarbamoyl (PTC)-Peptid.

Im nächsten Schritt, der Spaltung, entsteht aus der randständigen AS ein heterozyklisches Derivat, Anilinothiazolinon(ATZ)-Aminosäure, und eine um ein Peptid verkürzte Peptidkette. Im letzten Abbauschritt wird die instabile ATZ-Aminosäure in ein stabiles Derivat, die Phenylthiohydantoin-(PTH)-Aminosäure, umgesetzt. Die PTH-Aminosäuren zeigen charakteristische UV-Spektren bei 269 nm Absorptionsmaximum. Die Nachweisgrenze liegt inzwischen bei 1 pmol. (Lottspeich und Zorbas, 1998)

Im Rahmen der MHC-I-Quantifizierung konnte so, unter Kenntnis der zu detektierenden Peptidsequenz der α - Kette des MHC-I-Moleküls, eine quantitative Aussage über den MHC-I-Gehalt der Probe getroffen werden (\rightarrow Kapitel 3.6.1). Weiterhin ermöglicht der Edman-Abbau auch die Detektion der leichten Kette des zugegebenen Antikörpers und somit der Menge des extrahierten Antikörpers per Säulenaffinitätschromatographie.

Für den Edman-Abbau wurde das automatische Proteinsequenzierungsgerät (ProciseTM 494 A Protein Sequencer, Applied Biosystems) verwendet.

2.2.2 MHC-I-Quantifizierung per Western Blot

2.2.2.1 Herstellung der SDS-Gele

Vor dem eigentlichen Blot-Vorgang werden die zu untersuchenden Probengemische zunächst per SDS (Natriumdodecylphosphat) – PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese) aufgetrennt. Durch die im Ladepuffer zugegebenen Substanzen Mercaptoethanol und SDS werden die in den Proben enthaltenen Proteine entsprechend ihrer Molekülgröße mit negativen Ladungen versehen. Wird an die mit Proteingemisch beladenen Gele eine Spannung angelegt, trennen sich die Proteinfractionen gemäß ihrer Ladung und damit ihrer Molekülgröße beim Lauf zur Anode im Gel auf. Hierbei liegen niedermolekulare vor höhermolekularen Teilchen, d.h. sie laufen schneller im elektrischen Gradienten.

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proben wurde ein 15%iges Polyacrylamid-Trenngel (6 x 8 cm) zur eigentlichen Auftrennung der Proben und obenauf ein 5%-iges Sammelgel zur vorherigen Konzentrierung der Proben verwendet.

Trenngel (15%)
für 2 Gele:

7,3 ml aqua dest
5 ml 1,5 M Tris pH 8,6
7,5 ml 40 % Acrylamid (Sigma, Steinheim)
0,2 ml 10% SDS (Sigma, Steinheim)
0,02 ml TEMED (SERVA Feinbiochemica GmbH, HD)
0,1 ml APS (Ammonium-peroxodisulfat, Merck)

Sammelgel: (5%)
für 2 Gele

12,8 ml aqua dest
5 ml 1,0 M Tris pH 6,8
2 ml Acrylamid
0,2 ml 10% SDS
0,02 ml TEMED
0,1 ml APS

Die Elektrophorese-Gele wurden zwischen abgedichteten Glasplatten gegossen, die an beiden Seiten durch Plastik-spacer getrennt waren.

APS als Starter der Polymerisierungsreaktion wurde den Gellösungen jeweils zuletzt zugegeben. Die Gellösungen wurden dann sofort geschwenkt und zwischen die Glasplatten pipettiert.

Das Trenngel wurde hierbei bis auf 6 cm vom Unterrand gegossen und mit H₂O zur Glättung der Oberfläche überschichtet.

Nach Auspolymerisierung des Trenngels wurde das Wasser abgegossen und das Sammelgel obenauf gegossen. Sofort wurde ein Kamm für 16 Geltaschen eingesetzt und das Sammelgel zur Auspolymerisation stehen lassen.

2.2.2.2 Verdünnung der Proben und Beladung der Gele

Ladepuffer: (doppelt konzentriert)

250 mM Tris-HCl, pH 6,8

4% (w/v) SDS (Sigma), 20 % (w/v) Glycerin, 10% (v/v) β - Mercaptoethanol

0,002% (w/v) Bromphenolblau

Zur quantitativen Erfassung des Gehalts an β 2-Mikroglobulin in den Tumor-Eluatproben wurden 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 ng eines MHC-I-Monomer Standard in 10 μ l H₂O in „Eppendorf-Tubes“ angesetzt. Hierzu wurde das rekombinante MHC-I-Monomer (HLA-A*0201 biotinyliert, HIV 476-484 ILKEPVHGV) verwendet (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Steffen Walter). Von den Eluatproben wurden zunächst 2 oder 5 μ l mit H₂O auf 10 μ l Gesamtvolumen verdünnt. Die in den Eluatproben vorhandene Säure wurde unter Zugabe von 10% (v/v) 1 M NaOH neutralisiert (bis Bromphenolblau wieder blau) und damit zur elektrophoretischen Auftrennung befähigt.

Anschließend wurden weitere 10 μ l doppelt konzentrierten Ladepuffer (s.o.) zugegeben. Lysatproben wurden ohne Säurezugabe mit 5 μ l Lysatprobe + 5 μ l PBS oder unverdünnt mit 10 μ l Lysatprobe angesetzt und ebenfalls 10 μ l doppelt konzentrierter Ladepuffer zugegeben.

Die „Eppendorf-Tubes“ mit Eluat und Monomer-Standard wurden anschließend

gut durchmischt und bei 30000 rpm, 2 min per Tischzentrifuge (Biofuge 13, Heraeus Instruments) abzentrifugiert. Anschließend wurden die Proben 5 min bei 95 °C im Heizblock (Eppendorf Thermomixer 5436) inkubiert und dann erneut per Tischzentrifuge 2 min abzentrifugiert.

Die zwischen den Glasplatten befindlichen SDS-Gele wurden dann senkrecht in die Elektrophoresekammer eingespannt und die Kammer mit SDS Laufpuffer (190 mM Glycin, 0,1% SDS, 25 mM TRIS-HCl, pH 8,75) zur Umspülung der Gele aufgefüllt.

Anschließend wurden die eingesetzten Kämme gezogen und die Proben sowie der Monomer-Standard in die Geltaschen überführt.

Als Kontrolle für die ordnungsgemäße Auftrennung der Proben und das spätere Blotten wurden vorgefärbte Markerproteine (New England Biolabs) mit den Molekülmassen (175 kDa, 83 kDa, 62 kDa, 47,5 kDa, 32,5 kDa, 25 kDa, 16,5 kDa, 6,5 kDa) im Gel mitlaufen lassen.

Die β 2-Mikroglobulinmoleküle des MHC-I wurden hierbei bei 12 kDa erwartet.

Die Elektrophoresekammern wurden zunächst mit 110 V, 150 mA, 100 W im Trenngel betrieben und nach Übertritt der Lösungsmittelfront ins Sammelgel mit 140 V. Die Trennfront wurde bis an den unteren Rand des Gels laufen gelassen und dann gestoppt.

2.2.2.3 Blotten auf Nitrozellulosemembran

Das Übertragen der im SDS-Gel aufgetrennten Proteinfractionen auf eine Nitrozellulosemembran (Blotten), erlaubt die Detektion einzelner Fractionen (Proteine) mit Hilfe von spezifischen Antikörpern.

Hierbei wandern die im Gel aufgetrennten Proteinfractionen durch die angelegte Spannung auf die Membran und werden dort adsorbiert. Diese Banden können nun über einen spezifischen Nachweisantikörper und einen gegen diesen gerichteten Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper nach Zugabe von Substrat sichtbar gemacht werden.

Der Blotvorgang erfolgte in einer Quarzelektroden-Blotkammer über Nacht in „semi-dry blotting“ Technik. Hierzu wurden auf der Anodenseite der Blotkammer zunächst vier in Anodenpuffer (50 mM Na-Borat; pH 9,0, 20% Methanol) getränkte Filterpapiere (Whatman-Papier, 3MM) aufgeschichtet und darauf die ebenfalls in Anodenpuffer getränkte Nitrozellulosemembran (Hybond™ – ECL™, Amersham Biosciences) gegeben.

Darauf wurde das SDS-Gel platziert und obenauf vier in Kathodenpuffer (50 mM Na-Borat pH 9, 0,05 % SDS) getränkte Filterpapiere unter Abschluss durch die Kathodenplatte. Für die hier verwendete Acrylamidkonzentration und Gelgröße wurde für 2 Gele eine Transferzeit von 4 h bei 40 mA, 600 V, 100 W angesetzt.

2.2.2.4 Behandlung der Nitrozellulosemembran

10x TBS	TBB
500 mM Tris-Base pH 8,0	15 g BSA (Roth GmbH, Albumin Protease free)
1,5 M NaCl	0,5 g (w/w) IGEPAL CA 630 (Sigma)
in 1 l aq dest.	5 ml 0,5 M EDTA in 500 ml 1x TBS

10 x TWB
1% (w/w) IGEPAL CA 630 (Sigma) in 10x TBS

Nach Abschluss des Blotvorgangs wurde die Nitrozellulosemembran für 2 h in TBB zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen geschwenkt.

Anschließend wurde die Membran mit 50 ml 1. Antikörperlösung gegen β 2-Mikroglobulin in 1:50000 Verdünnung (rabbit anti-human β 2-microglobulin, DAKO 1:50000 in 50 ml TBB mit 0,02% Na Azid) für 1,5 h inkubiert.

Im Folgenden wurde der 1. Antikörper abgenommen und die Membran 3 x 5 min in TWB bei RT gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation für 1 h mit dem 2. Antikörper (anti-rabbit IgG, horseradish peroxidase linked F(ab') fragment, Amersham Biosciences, 1:5000 in 50 ml TBB) gegen den gebundenen 1. Antikörper.

Danach wurde 1 x 5 min mit TBS, 3 x 10 min mit TWB und 2 x 5 min mit TBS gewaschen und anschließend das Substrat zugegeben.

Hierfür wurden je 800 µl der 2 Komponenten des Chemilumineszenzsubstrats (Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent, Perkin Elmer Life Sciences) gemischt und für 3 min auf die Membran gegeben. Die Membran wurde hierzu zwischen Klarsichtfolien gelegt und danach ausgestrichen.

Zur Analyse der Banden wurde die Membran im Image Reader (Fujifilm LAS-1000) eingelesen und gemäß der relativen Schwärzung zwischen Proben und Eichreihe quantitativ ausgewertet.

2.2.3 MHC-I-Quantifizierung per ELISA

Blockierungspuffer: 0,05% (v/v) Tween 20 (Merck), 1% (w/v) BSA (Roth) in PBS

Bindungspuffer: 0,1 M NaHCO₃, pH 9,5

Waschlösung: 0,05% (v/v) Tween 20 (Merck) in PBS

ABTS: 150 mg 2,2-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic-acid) mit 500ml 0,1 M Zitronensäure, pH 4,35

2.2.3.1 ELISA mit adsorbierten Lysatproben zur MHC-I-Quantifizierung

Im Zuge der Etablierung eines quantitativen ELISA zur MHC-I-Bestimmung wurde zunächst versucht mit Hilfe rekombinanter MHC-I-Monomere (HLA-A*0201 biotinylated HIV-1 476-484 ILKEPVHGV 2 µg/µl) eine Eichgerade zu generieren und einen linearen Messbereich festzulegen.

Zu diesem Zweck wurde versucht Monomerkonzentrationen von 5 ng, 10 ng, 20 ng, 40 ng, 50 ng, 60 ng, 80ng, 100 ng direkt in die 96 Well Mikrotiter Platte (Nunc-Immuno™ Maxi Sorp™, Nalge Nunc Int.) zu adsorbieren und mit dem Erstantikörper W6/32 zu detektieren.

- Die Standardmonomerproben wurden in je 100 µl Bindungspuffer pro Well bei alkalischem pH angesetzt.

- Zusätzlich wurden Lysatproben in Bindungspuffer in 10- bis 200-facher Verdünnung angesetzt und ebenfalls mit je 100 µl pro Well zur Adsorption an die Mikrotiterplatte zugegeben.

Monomerstandardproben und Lysatproben wurden dann über Nacht zur Bindung an die 96-Well Platte im Kühlraum stehen lassen. Alternativ kann dieser Bindungsvorgang auch für 2 h bei 37°C im Wärmerraum durchgeführt werden. Alle Proben und Standards wurden in Dreifachbestimmung angesetzt. Als Negativkontrollen dienten adsorbierte MHC-I-Monomere, wobei hier jeweils 1. oder 2. Antikörper weggelassen wurden, bei ansonsten gleichem Versuchsvorgang. Nach dem Bindungsvorgang wurden die Proben abgekippt und unspezifische Bindungsstellen für 2 h unter Zugabe von 200 µl Blockierungspuffer bei Raumtemperatur geblockt.

Nach dem Blockierungsvorgang wurde 5 x mit Waschlösung gewaschen und anschließend der Erstantikörper W6/32 in mindestens 10-fachem Überschuss bezüglich der 100 ng Probe zugegeben (z.B. 1 µg AK in 100 µl Blockierungspuffer / Well). Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte bei Raumtemperatur unter Abdeckung mit Parafilm. Nach 1,5 h Inkubationszeit wurde erneut 5 x mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde der 2. Antikörper (Peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG, DIANOVA, Jackson Immuno Research) gegen den Fc-Teil von W6/32 1 : 5000 oder 1: 2500 in Blockierungspuffer verdünnt und je 100 µl pro Well für 1,5 h bei Raumtemperatur zugegeben. Zuletzt wurde nochmals 5 x mit Waschpuffer gewaschen und anschließend 100 µl ABTS-Substrat oder TMB (Sigma-Aldrich) zur Entwicklung zugegeben. Die Platte wurde dann im ELISA-Reader (Spectra max 340, Molecular Devices) bei 405 nm für ABTS oder 450 nm für TMB (Sigma-Aldrich) eingelesen. Die Reaktion konnte für ABTS sofort gemessen werden und wurde beendet, sobald die 60 ng Monomerprobe eine Absorption von 1 OD erreichte. Hierzu ließ man die Reaktion für ABTS schlicht auslaufen. Bei Zugabe von TMB als Substrat musste die Reaktion erst durch Zugabe von 100 µl 2 M H₂SO₄ gestoppt werden und konnte dann nach gelbem Farbumschlag bei 450 nm eingelesen werden.

Aufgrund der fehlenden Möglichkeit den Absorptionsverlauf zu verfolgen sowie dem unkontrollierbar schnellen Reaktionsablauf bei TMB Zugabe wurde die ABTS-Methode bevorzugt.

Die gemessenen Absorptionswerte in Dreifachbestimmung wurden nach Abzug des Leerwertes gemittelt. Aus den Absorptionswerten wurde mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft Excel Verdünnungs- und Eichkurven erstellt. Der Absorptionswert einer gegebenen Verdünnung wurde in die ermittelte Eichgerade eingesetzt und die MHC-I-Menge in ng im Well errechnet.

2.2.3.2 Sandwich-ELISA-Technik zur MHC-I-Quantifizierung

Im Gegensatz zu obigem Versuchsansatz wurde hierbei nicht das Antigen an die Mikrotiterplatte adsorbiert, sondern zunächst der Primärantikörper W6/32.

Hierzu wurde eine 96-Well Mikrotiterplatte (Nunc-Immuno™ Maxi Sorp™, Nalge Nunc Int.) mit pro Well 2 µg W6/32 Erstantikörper in 100 µl Bindungspuffer über Nacht oder alternativ für 2 h im Wärmeschrank inkubiert. In je drei Wells wurde für jeden Standard- oder LySATmesswert W6/32 adsorbiert.

Nach Bindung des Antikörpers W6/32 an die Mikrotiterplatte wurden 200µl Blockierungspuffer pro Well zugegeben und 2 h zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 4 x mit je 200 µl Waschlösung gewaschen und die Platte dazwischen abgekippt.

2.2.3.2.1 Verdünnung der Proben und Pipettierung der Eichreihe

- Als Eichreihe zum quantitativen Vergleich wurden rekombinante MHC-I-Monomere (HLA-A*0201 biotinyliert HIV-1 476-484 ILKEPVHGV 2 µg/µl) mit 5 ng, 10 ng, 20 ng, 40 ng, 50 ng, 60 ng, 80 ng, 100 ng pro 100 µl Lysepuffer in Dreifachbestimmung zugegeben.
- Die TumorsySATproben wurden ebenfalls in Lysepuffer 10- bis 200-fach verdünnt und zu je 100 µl pro Well in Dreifachbestimmung zur Inkubation zugegeben.

Als Negativkontrolle wurde Lysepuffer statt Monomer- oder Lysatprobe auf den Erstantikörper zugegeben. Die Platte wurde mit Parafilm versiegelt und Proben und Referenzlösungen wurden für 1,5 h bei Raumtemperatur mit dem gebundenen Primärantikörper W6/32 inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Platte 5 x mit Waschlösung gewaschen. Anschließend wurde der Zweitantikörper gegen die β 2-Mikroglobulinuntereinheit (β 2-Mikroglobulin-HRP-conjugated rabbit anti-human, 0,4 g / L, DAKO, Denmark) mit 1600 ng / Well (4 μ l AK oder 1:25) in 100 μ l Blockierungslösung zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Dies entspricht einem 10-fachen Antikörperüberschuss gegenüber der 60 ng Monomerprobe.

Nach Abschluss der Inkubationszeit des Zweitantikörpers wurde fünf mal mit Waschlösung gewaschen.

11 ml ABTS-Substrat wurden mit 10 μ l 30% H_2O_2 (Aldrich) versetzt und je 100 μ l Substrat pro Well zugegeben. Die Mikrotiterplatte wurde nach Zugabe des Substrates per ELISA Lesegerät (Spectra max 340, Molecular Devices) bei 405 nm eingelesen.

Die Farbreaktion zeigte sich bereits nach 2 - 3 Minuten. Die Reaktion wurde optional unter Zugabe von 100 μ l 2 M H_2SO_4 gestoppt, sobald die 60 ng Referenzprobe eine Absorption von 1 erreichte.

Alternativ können 100 μ l TMB (Sigma-Aldrich) als Substrat verwendet werden und bei 450 nm eingelesen werden (\rightarrow Kapitel 2.2.3.1)

Zur Berechnung siehe MHC-I-Bestimmung aus Tumorlysate im Ergebnisteil (\rightarrow Kapitel 3.6.4; Tabelle 3.9).

2.2.3.2.2 Modifizierung der Eichgeraden und Anpassung an die Mediumsbedingungen

Um die Mediumsbedingungen in Standardprobe und Lysatprobe anzugleichen und damit vergleichbar zu machen, wurde die Monomereichgerade durch Zugabe eines möglichst MHC-I-freien Tumorstrestlysates modifiziert.

Hierzu wurden die rekombinanten Standardmonomere in Mengen von 5 bis 60 ng in 50 µl Lysepuffer angesetzt, unter Zugabe weiterer 50 µl des Tumorestlysates RCC49 in der halben Verdünnung der zu messenden Lysatverdünnung. Soll beispielsweise die Tumorausgangslysatsprobe bei einer 80-fachen Verdünnung gemessen werden, wurden 50 µl eines 40-fach verdünnten Restlysates den Monomerproben zugegeben.

Zur Ermittlung der Eigenabsorption dieses Restlysates bei der gegebenen Verdünnung wurde das Restlysat entsprechend der Verdünnung der zu messenden Ausgangslysatsprobe verdünnt und mit 100 µl pro Well in Dreifachbestimmung gemessen.

Dieser Absorptionswert wurde anschließend von den gemessenen Werten der modifizierten Eichreihe abgezogen, um den tatsächlichen Mediumsverhältnissen in den Lysatproben, mit möglichen Überlagerungseffekten Rechnung zu tragen. Zur weiteren Durchführung siehe (→ Kapitel 2.2.3.2.1) und Auswertung (→ Kapitel 3.6.4)

2.2.3.2.3 Quantitativer Vergleich des MHC-I-Gehalts von Tumorausgangs- und Restlysat per ELISA

Durch die vergleichende Untersuchung der MHC-I-Menge in Tumorausgangs- und Restlysat soll eine quantitative Aussage über den zu erwartenden MHC-I-Gehalt der Probe sowie die Extraktionsleistung der Immunpräzipitation getroffen werden.

Hierzu wurden neben den Ausgangslysaten auch die Restlysate in verschiedenen Verdünnungen per Sandwich-ELISA gemessen. Die Restlysatproben wurden meist in 10 - oder 20 - facher Verdünnung gemessen. Dieser Versuchsansatz wurde nur für Proben angestrebt, die mit Cyan-Bromid Säulen präzipitiert wurden, da durch die Zugabe von W6/32 in die Lysatprobe die MHC-I-Moleküle nicht mehr frei detektiert werden können.

Die weitere Versuchsdurchführung erfolgte analog der Sandwich-ELISA Technik mit modifizierter Eichgerade (→ Kapitel 2.2.3.2.2).

2.2.3.2.4 Bestimmung von MHC-I aus Tumoreluat per ELISA Technik

Durch den Säureelutionsvorgang wird in CNBr-Proben durch TFA-Elution die α -Kette des MHC-I denaturiert und wahrscheinlich präzipitiert, so dass sich die Detektion der MHC-I-Moleküle nur gegen die β 2-Mikroglobulinkette richten kann. Analog des Vorgehens bei dem Elisaverfahren mit direkt adsorbiertem Antigen wurden Standardmonomere und Protein-A- bzw. CNBr-Eluatproben in Kopplungspuffer verdünnt und mit je 100 μ l pro Well über Nacht an die Mikrotiterplatte adsorbiert. Für die Eichgerade wurden hierzu Monomerproben von 5 – 100 ng in Kopplungspuffer angesetzt. Nach beschriebenen Wasch- und Blockierungsvorgängen wurde der anti- β 2-Mikroglobulin Antikörper (rabbit anti-human β 2-microglobulin, DAKO) 1:50000 in Blockierungspuffer verdünnt, mit 100 μ l pro Well zugegeben und 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde 5 x mit Waschlösung gewaschen und anschließend der enzymgekoppelte Sekundärantikörper (anti-rabbit IgG, horseradish peroxidase linked F(ab') fragment, (Amersham Biosciences)) 1:5000 in Blockierungspuffer mit 100 μ l pro Well zugegeben und bei Raumtemperatur 1,5 h inkubiert. Substratzugabe und Messung erfolgen gemäß dem Versuchsablauf (\rightarrow Kapitel 2.2.3.1 direkt adsorbiertes Antigen; \rightarrow Kapitel 3.6.3.1).

2.3 Analytische Verfahren

2.3.1 Genexpressionsanalyse

Um Aussagen über die genetische Expression der korrespondierenden Genabschnitte der identifizierten Proteine treffen zu können, wurde die Genexpression mit Hilfe des 22000 Gene umfassenden Gen-Chips Affymetrix Human Genome U133A (Affymetrix-Microarrays) ermittelt.

Hierzu wurde zunächst RNA aus dem entsprechenden soliden Tumor- und Normalgewebe isoliert. Die RNA wurde durch Homogenisierung des Gewebes in flüssigem Stickstoff unter Verwendung von TRIzol Reagents (Invitrogen) isoliert. Durch RNA-Fällung mit Isopropanol und unter Ausnutzung des

Bindungsverhaltens von RNA an Silikat konnte so spezifisch RNA extrahiert werden. Die gewonnene mRNA wurde dann per Reverse-Transkriptase Reaktion in cDNA umgeschrieben und daraus biotinylierte target-aRNA erzeugt. Im Folgenden wurde diese aRNA zur Bindung an die zu analysierenden Chipbindungsstellen am Affymetrix-Gen-Chip hybridisiert.

RNA-Extraktion und Chipanalyse wurden freundlicherweise von O. Schoor durchgeführt. Die hierdurch gewonnenen Daten ermöglichen die Untersuchung des Expressionsverhaltens von Tumor- und Normalgewebe mit Hinblick auf die identifizierten Genprodukte sowie den Vergleich mit weiteren Gewebearten, deren Genexpressionsverteilung aus Probandenuntersuchungen ermittelt wurde.

2.3.2 Massenspektrometrie - ESI mit kombiniertem LCMS-System

Die per Ultrafiltration im Centrikon gewonnenen Proben wurden anschließend per Q-ToF- Massenspektrometer (Micromass, Manchester) auf enthaltene Peptidsequenzen analysiert.

Hierbei konnte die chromatographische Auftrennung der Proben bereits durch vorgeschaltete HPLC (High performance liquid chromatography) vor der Analyse im Massenspektrometer erfolgen (LC-MS). Eine separate, vorherige Auftrennung per reversed-phase HPLC (SMART-System) wurde so entbehrlich. Die LC-MS-Kopplung ermöglicht die Analyse geringster Peptidmengen mit hoher Sensitivität bei sehr geringen Flussraten (30 nl/min) und kleinsten, hochkonzentrierten Probenvolumen. Auf diese Weise ist eine kontinuierliche Aufnahme von Massenspektren der von der HPLC eluierten Peptidfraktionen möglich, da ESI (Elektrospray-Ionisierung)-Quelle und HPLC-System direkt über dessen Kapillarsäule verbunden sind.

Das gefrorene Tumoreluat wird zunächst im Vakuum lyophilisiert, um so die umgebende Flüssigkeit möglichst schonend zu entfernen. Der Niederschlag wird anschließend wieder in 400 µl Lösungsmittel A (4 mM Ammoniumacetat in wässriger Lösung, pH 3) aufgenommen und auf eine Vorsäule zur Entsalzung und Volumenreduktion gegeben. Für das verwendete HPLC-Pumpensystem

wurde meist ein Probenvolumen von 100 μl verwendet, dessen Peptide zunächst bei einer Flussrate von 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ an eine mit C18-Material gefüllte Kartusche gebunden wurden und anschließend per Lösungsmittelgradient auf die Kapillarsäule (analytische Säule) eluiert und aufgetrennt werden. Dieser Zwischenschritt ist notwendig, da das Probenvolumen von 100 μl nicht direkt in das Kapillarsystem injiziert werden kann.

Die Peptidfraktionen der so konzentrierten und entsalzten Probe werden dann nach der Auftrennung per Liquid-Chromatographie Säule (analytische Säule) mit Hilfe eines angelegten Acetonitrilgradienten (15-80%) gemäß dem Lösungsverhalten der Peptide von der Säule eluiert. Nun erfolgt der Einspritzvorgang ins Massenspektrometer per Nanokapillare, bei dem die Probenflüssigkeit durch eine spannungsgeladene Kapillare (Elektrospray-Ionisierung, ESI) bei 1000 – 2000 V vernebelt wird. Die kleinen Tröpfchen wandern nun einem Druck – und Potentialgradienten folgend durch einen senkrecht zur Flugrichtung stehenden Stickstoffstrom in den Massenanalysator. Durch den hierbei stattfindenden Lösungsmittelverlust (Desolvation) und „Coulomb-Explosionen“ entstehen völlig desolvatisierte Ionen, die sich abstoßen und gemäß ihrer Ladung beschleunigt werden können.

Das hier verwendete Massenspektrometer besteht aus zwei Untereinheiten: einer ersten Einheit MS1, in der die Teilchenselektion und die Fragmentierung stattfindet und einer analytischen Einheit, dem Reflektron-Tof-Massenspektrometer MS2, in der die Flugzeitmessung und Massendetektion erfolgt.

Charakteristischerweise treten in ESI-Spektren unterschiedlich geladene Ionen derselben Molekülart auf. Durch die Fähigkeit der Massenspektrometer nach m/z aufzulösen, können auch hochmolekulare, mehrfach geladene Verbindungen gemessen werden.

Die geladenen Teilchen wandern nun durch eine unabhängig evakuierte Ionenoptik in den Quadrupol-Analysator.

Zur Selektion bestimmter Massen oder Ladungen (m/z -Werte) kann an dieser Stelle der frequenzgepulste Quadrupol eingeschaltet werden, der durch hochfrequente Variation der Ladung im Quadrupol Teilchen vorgegebener

Masse passieren lässt. Hier erfolgt die Auswahl der Ionen für die folgende Fragmentierung in der Hexapol-Kollisionszelle.

In einem ersten Übersichtslauf können so automatisch alle Frequenzen zur Übersichtsgewinnung der Teilchenmassen abgefahren werden, bei nicht aktivierter Kollisionskammer. Die Teilchen werden nach Passage des Quadrupol und der Kollisionskammer auf den „pusher“ der analytischen Einheit gelenkt und zum Reflektor abgelenkt. Um ein genaues zeitliches Zusammentreffen von Teilchen gleicher Masse am Detektor zu ermöglichen, werden die Teilchen mittels des Reflektors reflektiert und somit im Beschleunigungsvorgang entstandene Zeitverzögerungen ausgeglichen.

Aus der Flugzeit der Ionen auf der beschriebenen Strecke wird am Ende per ToF - Detektor (time of flight) die Flugzeit und daraus die Masse der Teilchen aus den m/z -Werten ermittelt. Hierbei ist das Verhältnis der Molekülmasse zur Ladung m/z proportional dem Quadrat der Flugzeit.

Der analytische Bereich des Geräts liegt zwischen 2 und 4000 Da, wobei durch die Mehrfachladung auch höhermolekulare Verbindungen gemessen werden können.

Nach einem ersten Übersichtslauf kann nun die mit Argon beschickte Kollisionskammer zwischengeschaltet werden, in dem die im Quadrupol gemäß Masse oder Ladung selektierten Peptide fragmentiert werden.

Hierbei wechselt das Gerät automatisch durch Zu - und Abschalten der Kollisionszelle, um in kurzer Zeitfolge Übersichts- und Fragmentspektren der eluierten Peptidfraktionen zu ermitteln. Im Kollisionsvorgang zwischen Peptid und inerten Gas brechen typischerweise die Säureamidbindungen zwischen den Aminosäuren, deren Bruchstücke im Fragmentspektrum dargestellt werden. Mit Hilfe der Fragmentspektren ist es nun möglich die Peptidsequenzen der einzelnen Peptidfraktionen anhand der Massendifferenz zwischen den charakteristischen Fragment-peaks zu ermitteln (Abbildung 3.1). Zur Systemsteuerung und Datenerfassung wurde die PC-Software MassLynx NT verwendet.

Die massenspektrometrische Analyse und Untersuchung der Tumorproben wurde freundlicherweise von T. Weinschenk und C. Lemmel durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Ausgewählte und verarbeitete Tumorproben

Im Folgenden sind Tumorproben aufgelistet, die im Verlauf der Studie aus Tumorresektaten aus den Universitätskliniken für Urologie und Allgemeinchirurgie der Universität Tübingen gewonnen werden konnten (Tabelle 3.1). Hierbei wurde für die Auswahl der aufgearbeiteten und analysierten Proben eine Mindestmasse von 5 g für Nierenzellkarzinome und ca.10 g für Kolonkarzinome zu Grunde gelegt. Dies begründet sich aus dem erfahrungsgemäß geringeren MHC-I-Gehalt in Kolonkarzinomen (→ Kapitel 4.2.6). Weiterhin wurde das Vorhandensein einer nach Möglichkeit mindestens ebenso großen Menge korrespondierenden Normalgewebes, der bestätigende pathologische Befund und eine bestehende HLA-Typisierung bei der Auswahl miteinbezogen.

Im Falle geringer Tumormassen oder unmittelbarer Kenntnis eines negativen pathologischen Befundes wurde von einer Blutentnahme und HLA-Typisierung abgesehen.

Die in Tabelle 3.2 aufgelisteten Proben wurden aus Beständen des Instituts für Immunologie mit in das Probenkollektiv aufgenommen und ebenfalls aufgearbeitet. Die kursiv gedruckten Proben wurden mit CNBr-, die übrigen mit Protein-A-Säule immunpräzipitiert. So konnten 12 Nierenzellkarzinome, 9 Kolonkarzinome und drei Gewebe aus benigner Prostatahyperplasie (BPH) zum Zwecke der Peptidisolierung und MHC-I-Quantifizierung bearbeitet werden. Die Proben RCC112, RCC103, RCC100 und RCC98 konnten im Folgenden per Massenspektrometrie und Genexpressionsanalyse analysiert werden. Die CCA-Proben wurden Dipl.-Biochem. Claudia Lemmel zur quantitativen massenspektrometrischen Analyse zur Verfügung gestellt. Die 3 Proben aus benigner Prostatahyperplasie (BPH) wurden zur Identifizierung typischer Prostata-spezifischer Peptide von Dipl.-Biochem. Toni Weinschenk untersucht. Zu diesen Proben sowie den übrigen aufgeführten Proben liegen bislang keine Daten vor.

Tabelle 3.1.: Übersicht der gewonnenen Tumorgewebe.

RCC: Nierenzellkarzinom; CCA: Kolonkarzinom ; BPH – benigne Prostatahyperplasie

Gewebemasse in [g]; T – Tumorgewebe ; N – korrespondierendes Normalgewebe

Fett unterlegt - verwendete und aufgearbeitete Proben; *kursiv* - CNBr-Säulen Proben.

TNM/Grading: Stadieneinteilung WHO und histologischer Differenzierungsgrad

Gewebe Nummer	Masse [g] T	Masse [g] N	Gewebetyp und Befund	TNM/Grading	HLA-Typisierung
RCC112	2,5	--	RCC-Metastase	entfällt	A*01, A*31, B*08, B*27
RCC108	30,0	--	Urothel-Karzinom	entfällt	A*02, A*68, B*07, B*15
RCC107	3,9	--	Urothel-Karzinom	entfällt	keine
RCC106	2,5	4,0	Urothel-Karzinom	entfällt	keine
RCC105	4,4	3,6	Keine Malignität	entfällt	keine
RCC104	3,0	5,0	Keine Malignität	entfällt	keine
RCC103	10,0	--	Klarzell/ chromophob.RCC	pT1c, pN ₀ , pM _x ; G2	A*11, A*25, B*15, B*44
RCC102	3,0	--	Klarzell. RCC	pT1a, pN _x , pM _x	A*03, A*24, B*15, B*18
RCC101	7,5	--	Klarzell. RCC	pT1b; G2	A*01, A*02, B*08, B*40
RCC100	8,0	12,6	Klarzell. RCC	pT1b, pN _x , M _x	A*02, A*03, B*07, B*18
RCC 99	7,7	12,4	Klarzell. RCC	pT1b, pN _x , M _x ; G2	A*02, B*27, B*57
RCC 98	21,1	--	Klarzell. RCC	pT3a, pN _x , M1; G2-3	A*01, A*03, B*07, B*18
CCA156	16,9	19,0	Kolon-CA	pT3, pN ₀ , M _x , G2	A*03, A*24, B*08, B*044
CCA155	10,0	7,0	Rektum-CA	pT3, pN ₀ , M _x ; G2	A*02, A*31, B*07, B*15
CCA154	4,8	8,0	Sigma-CA	pT3, pN ₀ , M _x	A*03, A*68, B*15, B*35
CCA153	4,2	6,0	Rektum-CA	pT3, pN ₂ , M _x ; G2	A*01, A*02, B*08, B*38
CCA152	7,2	11,5	keine	keine	keine
CCA151	--	10,0	Kolon-CA	pT3, pN ₁ , pM _x , G2	A*02, A*03, B*35, B*40
CCA150	6,7	13,3	Sigma-CA	pT2, pN ₀ , pM _x ; G2-3	A*01, A*11, B*35, B*44
CCA149	45,0	52,0	Rektum-CA	pT3, pN ₁ ; G2-3	A*01, A*24, B*08, B*4901
CCA148	25,0	23,0	Rezidiv Rektum	entfällt	A*02, B*15, B*44
CCA147	5,0	5,0	Rektum-CA	pT3, pN ₁ , pM _x , G2-3	keine
CCA146	10,0	25,0	Rektum-CA	pT3, pN ₀ , pM _x ; G2	A*01, A*26, B*08
<i>BPH23</i>	<i>8,6</i>	--	<i>BPH</i>	keine	keine
<i>BPH21</i>	<i>24,2</i>	--	<i>BPH</i>	keine	keine
<i>BPH20</i>	<i>23,8</i>	--	<i>BPH</i>	keine	keine

Tabelle 3.2.: Zusätzlich aufgenommene Tumorproben aus Beständen des Instituts für Immunologie.

RCC: Nierenzellkarzinom; CCA: Kolonkarzinom

Gewebemasse in [g]; T – Tumorgewebe ; N – korrespondierendes Normalgewebe

Fett unterlegt - verwendete und aufgearbeitete Proben; *kursiv* - CNBr-Säulen Proben.

TNM/Grading: Stadieneinteilung WHO und histologischer Differenzierungsgrad

Proben Nummer	Masse [g] T	Masse [g] N	Gewebetyp und Befund	TNM/Grading	HLA-Typisierung
RCC 71	7,0	9,0	RCC	PT3b, pN _x , pM _x , G3	A*02, A*68, B*35, B*41
<i>RCC 57</i>	<i>8,7</i>	<i>6,8</i>	<i>RCC</i>	pT1, pN _x , pM _x , G2	keine
<i>RCC 53</i>	<i>6,2</i>	<i>6,9</i>	<i>RCC</i>	keine	keine
<i>RCC 52</i>	<i>7,0</i>	<i>7,4</i>	<i>RCC</i>	pT1, pN ₀ , pM _x , G1	A*03
<i>RCC 51</i>	<i>7,8</i>	<i>7,0</i>	<i>Nierenbecken-CA</i>	keine	A*02
<i>RCC 49</i>	<i>8,8</i>	<i>7,0</i>	<i>RCC</i>	pT2, pN ₀ , pM _x , G2	A*02
CCA 140	9,8	8,0	Kolon-CA	pT4, pN1, pM _x , G2	A*02, A*29, B*40, B*45
<i>CCA137</i>	<i>6,5</i>	<i>14,0</i>	<i>Caecum-CA</i>	pT3, pN ₀ , pM _x , G2	A*29, A*66, B*44
CCA 136	10,0	12,0	Sigma-CA	pT3, pN ₀ , pM _x , G2	A*01, A*30, B*37, B*4901
CCA 134	8,0	10,0	Rektum-CA	pT3, pN ₀ , pM _x , G2	A*02, A*24, B*35, B*57

3.2 Verteilung der HLA-Allele in den verwendeten Tumorproben

Für 9 Nierenzellkarzinome und 13 Kolonkarzinome liegen Daten der HLA-Typisierung vor. Unter den Nierenzellkarzinomen kamen je dreimal die Allele A*01, A*02 und A*03 vor. Die Allele B*07, B*15 und B*18 konnten jeweils dreimal, die Allele B*08, B*27 und B*35 je zweimal nachgewiesen werden.

6 weitere HLA-A Allele und 4 HLA-B Allele wurden jeweils einfach gefunden.

Unter den Kolonkarzinomen fanden sich A*01 und A*02 jeweils fünffach, A*03 und A*24 je dreifach. Die Allele B*08, B*15, B*35, B*44 konnten jeweils dreimal, B*29, B*40 und B*49 zweifach nachgewiesen werden. Nur einfach wurden weitere 5 HLA-A Allele, sowie 6 HLA-B Allele gefunden.

Auf die Gesamtheit der 22 Tumoren gesehen, konnten so A*01, A*02, A*03, A*24, B*07, B*08, B*15, B*35 und B*44 mindestens vierfach nachgewiesen werden.

3.3. Identifizierung Tumor-assoziiertes Peptide zum Einsatz in der Patienten-individuellen Peptidvakzinierung am Beispiel RCC98

3.3.1 Isolierte und identifizierte Peptide aus RCC98

148 Peptide konnten durch Immunpräzipitation aus dem Tumorgewebe von RCC98 isoliert und per Massenspektrometrie sequenziert werden.

Erstmalig konnte damit aus einem Tumorgewebe eine solch große Zahl an Peptiden isoliert und identifiziert werden, was über die Optimierung der Analyseverfahren durch die Arbeitsgruppe Stevanović möglich wurde.

In Tabelle 3.3 sind daraus die 115 Peptide gezeigt, für die entsprechende Expressionsdaten vorhanden waren. Abbildung 3.1 veranschaulicht beispielhaft, wie aus einem Fragmentspektrum die Peptidsequenz des fragmentierten Peptides ermittelt werden kann. Unter Kenntnis der spezifischen Massen der Aminosäuren und der Gesamtmasse des zu untersuchenden Peptides kann durch Rekonstruktion der Massendifferenz zwischen prominenten Peaks im Fragmentspektrum die Sequenz ermittelt werden. Betrachtet man beispielsweise die Stelle b6 bis b7, so ergibt sich eine Massendifferenz von $\Delta 71$, was genau der Einzelmasse von Alanin entspricht. Untersucht man die weiteren Massendifferenzen zwischen den dargestellten Peaks des Fragmentspektrums, so gehen die Einzelmassen der Aminosäuren genau auf die Gesamtmassen des Peptids auf und ergeben die Sequenz RPTLWAAAL.

Die Kenntnis dieser Sequenzen erlaubt nun die entsprechenden Quellproteine mit Hilfe von Datenbanken zu ermitteln. Somit kann nun die Bedeutung dieses Peptides auch durch Erfahrungen aus der Fachliteratur ergänzt werden. Die Allelzugehörigkeit der gefundenen Peptide wurde mit Hilfe der Datenbank „SYFPEITHI“ (www.syfpeithi.de) ermittelt.

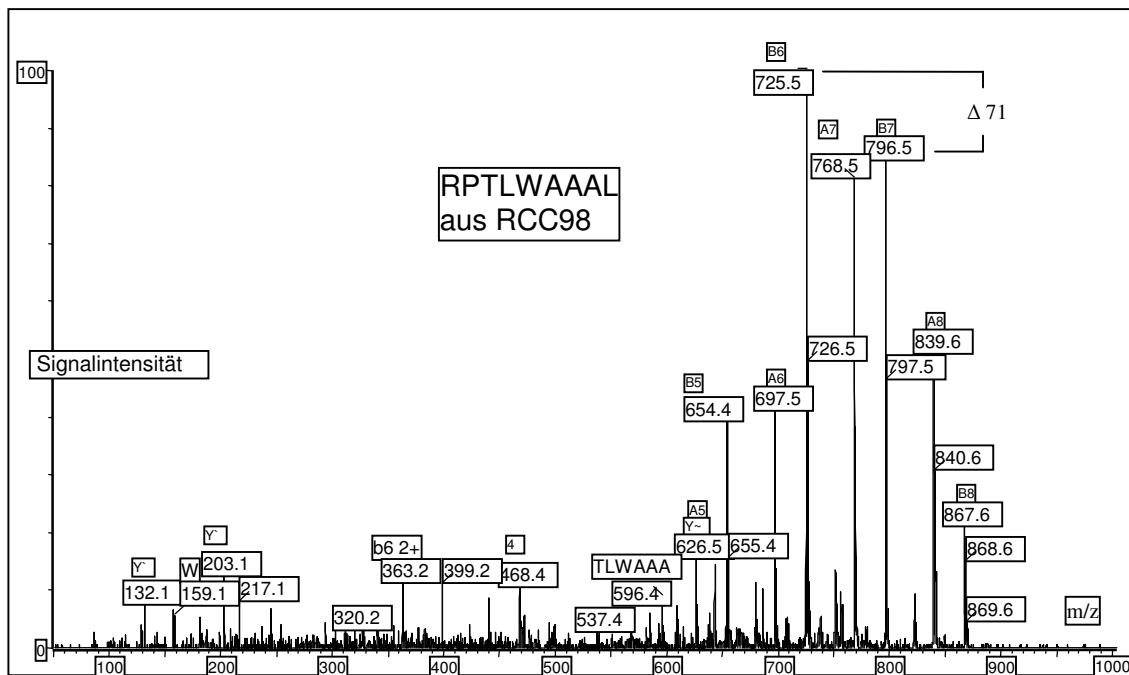


Abbildung 3.1: Fragmentspektrum des Peptids RPTLWAAAL aus IGFBP3. Auf der x-Achse sind die m/z-Werte angegeben, die y-Achse stellt die relative Signalintensität [%] dar. Die Peaks sind mit den einzelnen Fragmentmassen bezeichnet.

Tabelle 3.3.: Per Massenspektrometrie sequenzierte und identifizierte Peptide aus RCC98. Gezeigt sind die Peptidsequenz, der HLA-Typ, über dessen MHC-I-Moleküle das Peptid präsentiert wird sowie das Gensymbol und die Bezeichnung des zugehörigen Gens. Spalte 5 zeigt das Verhältnis der Genexpression in Tumor (T)- und korrespondierendem Normalnierengewebe (N) für das jeweilige Gen [x-fach]. Spalte 6 bezeichnet die relative Expression des Gens zwischen Tumor- und korrespondierendem Normalgewebe: NC – keine Überexpression, I – Überexpression, D – Unterexpression. Die Spalten 7 und 8 geben Auskunft über die Detektion des Gens im Tumor (T) und Normalgewebe (N) in der Expressionsuntersuchung; P steht hierbei für präsent, A für abwesend bezüglich der Expression, M - grenzwertig. Die markierten Peptide wurden in den Impfcocktail zur Vakzinierung aufgenommen.

Sequenz	HLA	Gen-Symbol	Titel	98T	98T	98T	98N
				$\frac{V}{N}$	$\frac{V}{N}$		
NEADVHGIYF	B*18	CP	ceruloplasmin (ferroxidase)	29,06	I	P	A
GLFSLVARK	A*03	NNMT	nicotinamide N-methyltransferase	19,93	I	P	A
SEELLREHY	B*18	NME3	non-metastatic cells 3	12,73	I	A	A
LEDVVIERY	A*01/ B*18	FKBP10	FK506 binding protein 10, 65 kDa	12,30	I	A	A
RPTLWAAAL	B*07	IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3	14,20	I	P	P
SPRENILVSL	B*07	SCD	stearoyl-CoA desaturase	8,57	I	P	A
SLFPNSPKWTSK	A*03	MMP7	matrix metalloproteinase 7	6,19	I	P	M
GTDELRLLY	B*07	FLJ12525	hypothetical protein FLJ12525	4,96	NC	A	A
GLASFKSFLK	A*03	RGS5	regulator of G-protein signalling 5	4,67	I	P	P
ALRPSTSRSLY	A*03	RPLP2	ribosomal protein, large P2	3,56	I	P	P
NLRETNLDSL		RPLP2	ribosomal protein, large P2	3,56	I	P	P
SSVPGVRLQLQSDVDF		RPLP2	ribosomal protein, large P2	3,56	I	P	P
DEPLLKHWEF	B*18	HLA-DRA	major histocompatibility complex, class II, DR alpha	3,36	I	P	P
HEALLYVVL	B*18	KIAA0746	KIAA0746 protein	3,20	I	P	P
MENLFINRF	B*18	ALOX5	arachidonate 5-lipoxygenase	3,07	I	P	A
HERTFLLEY	B*18	SNX6	sorting nexin 6	2,95	NC	A	A
KVYNIQIRY	A*03	LCP2	lymphocyte cytosolic protein 2	2,93	I	P	P
IARNLTQQL	B*07	ADFP	adipose differentiation-related protein	2,20	I	P	P
SLLTSSKGQLQK	A*03	ADFP	adipose differentiation-related protein	2,20	I	P	P
TSALPIIQK	A*03	ADFP	adipose differentiation-related protein	2,20	I	P	P
SEREAIEVF	B*18	GBP1	guanylate binding protein 1	2,16	I	P	P
DEVKFLTVL	B*18	ANXA4	annexin A4	2,04	I	P	P
MEHAMETMMF	B*18	S100A10	S100 calcium binding protein A10	2,01	I	P	P
APLLRWVL	B*07	HMOX1	heme oxygenase (decycling) 1	1,89	I	P	P
VTEIFRQAF	A*01	KIAA0884	KIAA0884 protein	1,79	NC	A	A
APRALLLLL	B*07	HLA-C	MHC, class I, C	1,69	I	P	P
RIHFPLATY	A*03	K-ALPHA-1	tubulin, alpha, ubiquitous	1,64	I	P	P
QIASFILLR	A*03	HIMAP4	immunity associated protein 4	1,62	I	P	A
YTDLLRLFEY	A*01	PPP1CB	protein phosphatase 1, beta isoform	1,62	I	P	P
DQEIDFKEY	A*01	S100A5	S100 calcium binding protein A5	1,56	NC	A	A
DEAAFLERL	B*44	CALD1	caldesmon 1	1,41	I	P	P
GVLAWVKEK	A*03	NK4	natural killer cell transcript 4	1,41	I	P	A
AETHIVLLF	B*44	DKFZp564K142	hypothetical protein DKFZp564K142	1,39	I	P	P
QVDPLSALKY	A*03	MKLN1	muskelin 1	1,39	NC	A	A
YSEEECRQY	A*01	GNAI2	guanine nucleotide binding protein alpha inhibiting activity polypeptide 2	1,39	NC	P	A
SEFTGVWKY	B*18	PDCD6	programmed cell death 6	1,38	I	P	P
WPLWRLVSL	B*07	BGN	biglycan	1,38	I	P	P
ITDSAGHILY	A*01	TMP21	transmembrane trafficking protein	1,34	I	P	P
DEGRVLVEF	B*44	SOAT1	sterol O-acyltransferase 1	1,33	I	P	P
VLPKLYVKL		RPS26	ribosomal protein S26	1,32	I	P	P
QIFVKTLTGK	A*03	UBA52	ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1	1,28	I	P	P
DEIGLPKIFY	B*44	IQGAP1	IQ motif containing GTPase activating protein 1	1,27	I	P	P
IPRAALLPLL	B*07	PRSS11	protease, serine, 11 (IGF binding)	1,24	I	P	P
DGHLFQVEY		PSMA7	proteasome subunit, alpha type, 7	1,16	I	P	A
ASEFPGAQHY	A*01	DKFZP434B195	hypothetical protein DKFZp434B195	1,15	I	P	A
ESYEALPQH	A*03	DNMT1	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1	1,12	I	A	A
YEYKFGFEL	B*18	TXNIP	thioredoxin interacting protein	1,12	I	P	P
DEVDIKSRAAY	B*18	MGC5149	hypothetical protein MGC5149	1,09	NC	P	P
SVLSPLLNK	A*03	EPS8	epidermal growth factor receptor pathway substrate 8	1,06	I	P	P
VLDPYLLKY	A*01	MRPS17	mitochondrial ribosomal protein S17	1,06	NC	P	P
RVMAPRALL	B*07	HLA-C	MHC, class I, C	1,04	NC	P	P
RIIEETLALK	A*03	ARPC2	actin related protein 2/3 complex 2,	1,03	I	P	P
ASDFITKMDY	A*01	GSN	gelsolin (amyloidosis, Finnish type)	1,01	I	P	P
DEVQVVRGHY	B*18	RPL26	ribosomal protein L26	1,00			
FTDVNSILRY	A*01	RPL26	ribosomal protein L26	1,00			
DEWLKPELF	B*18	CGI-26	CGI-26 protein	0,97	NC	P	P
HLDLGILYY	A*01	DPAGT1	GlcNAc-1-P transferase	0,97	NC	P	P
KVFQEPLFY	A*03	CTSL	cathepsin L	0,97	NC	P	P

STDKAEYTFY	A*01	RBPSUH	recombining binding protein suppressor of hairless (Drosophila)	0,97	I	P	P
TELLLKEGF	B*18	p100	EBNA-2 co-activator (100kD)	0,91	I	P	A
IDQTALAVY	B*18	TPP2	tripeptidyl peptidase II	0,90	NC	P	P
YVDPQFLTY	A*01	PJA1	praja 1	0,89	NC	P	P
YSEKIVDMY	A*01	MYH11	myosin, heavy polypeptide 11	0,86	NC	A	A
AMLDTVVFK	A*03	POH1	Proteasome 26S subunit pad1 homolog	0,84	NC	P	P
RLFVGSIPK	A*03	HNRPR	heterogeneous nuclear ribonucleoprot. R	0,83	NC	P	P
RPSLRALL	B*07	IGFBP7	insulin-like growth factor binding protein 7	0,83	NC	P	P
DEKLLYDTF	B*18	SF3B4	splicing factor 3b, subunit 4, 49kDa	0,80	NC	P	A
RVQEAVESMVK	A*03	FLJ14668	hypothetical protein FLJ14668	0,80	NC	P	P
ATGSWDSFLK	A*03	GNB1	guanine nucleotide binding protein 1	0,79	NC	P	P
DEHLITFF	B*18	U5-200KD	U5 snRNP-specific protein, 200-KD	0,79	NC	P	P
SEEEIREAF	B*18	CALM2	calmodulin 2	0,79	NC	P	P
DELHYLEVY	B*18	VPS35	vacuolar protein sorting 35 (yeast)	0,76	NC	P	P
HTDDPLTWDY	A*01	HCA66	hepatocellular carcinoma- associated antigen 66	0,76	NC	P	A
RMFDMGFEY	A*03	RNAHP	RNA helicase-related protein	0,76	NC	P	P
TMELVKIYK	A*03	CGI-83	CGI-83 protein	0,74	NC	P	P
LAELAHREY	A*01	OGT	O-linked N-acetylglucosamine trans - ferase	0,73	NC	P	P
MEKIWHHTF	B*18	ACTB	actin, beta	0,72	NC	P	P
SLMHSFILK	A*03	DNCL2A	dynein, cytoplasmic, light polypeptide 2A	0,72	NC	P	P
APGPPGRSML	B*07	RAVER1	RAVER1	0,70	NC	P	A
DELQQPLEL	B*18	STAT2	signal transducer and activator of transcription 2	0,70	NC	P	P
STDHIPILY	A*01	GFPT1	glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 1	0,68	NC	A	A
KIADRFLLY	A*03	LMO4	LIM domain only 4	0,67	NC	P	P
GLFEVGAGWIGK	A*03	HSD17B4	hydroxysteroid (17-β) dehydrogenase 4	0,66	NC	P	P
KVMQQNLVY	A*03	CRTAP	cartilage associated protein	0,66	NC	P	P
TENDIRVMF	B*18	CUGBP1	CUG triplet repeat, RNA binding protein 1	0,65	NC	P	P
DEIVRINGY	B*18	USH1C	Usher syndrome 1C / NY-CO-37/38	0,64	NC	P	P
DEMKVLVL	B*18	SPTBN1	spectrin, beta, non-erythrocytic 1	0,63	NC	A	A
EEIFNLKF	B*18	GTF2I	general transcription factor II, i	0,63	NC	P	P
DEYIYRHFF	B*18	CPR8	cell cycle progression 8 protein	0,62	NC	P	P
EEFELLGKAY	B*18	EIF3S8	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 8	0,62	NC	P	P
EERVINEEY	B*18	RBBP4	retinoblastoma binding protein 4	0,61	NC	P	P
EEIEGFY	B*18	NOH61	putative nucleolar RNA helicase	0,60	NC	P	P
ETDLLDIRSEY	A*01	ANXA11	annexin A11	0,60	NC	P	P
APARLFALL	B*07	SDC4	syndecan 4 (amphiglycan, ryudocan)	0,58	NC	P	P
IE(Methyl)HGIVTNW	B*18	ACTG1	actin, gamma 1	0,58	NC	P	P
KLFDHAVSKF	A*03	FACL4	fatty-acid-CoA ligase, long-chain 4	0,58	NC	P	P
RADGNFLLY	A*01	KIAA0930	KIAA0930 protein	0,58	NC	P	P
DLFVPRPL	A*03	DDX24	DEAD/H box polypeptide 24	0,56	NC	P	M
DELEIEGMKF	B*18	HSPD1	heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)	0,54	NC	P	P
GDAVDVTQDY	B*18	PXR1	peroxisome receptor 1	0,54	NC	P	P
RQIPYTMK	A*03	SLC25A3	solute carrier family 25, member 3	0,54	D	P	P
EELQQKVSYS	B*18	STAT3	signal transducer and activator of transcription 3	0,53	NC	M	A
YIDEQFERY	A*01	NEDD5	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 5	0,53	NC	P	P
DEHYILTF	B*18	OSBPL9	oxysterol binding protein-like 9	0,50	MD	P	P
deinflrql	B*18	KRT8	keratin 8	0,49	NC	P	P
KLLNYAPLEK	A*03	POLR2L	polymerase (RNA) II polypeptide L	0,48	D	P	P
DEYSLVREL	B*44	TLN1	talin 1	0,45	NC	P	P
APSPRPLSL	B*07	MGC20700	hypothetical protein MGC20700	0,42	D	A	M
IVPANFPSL	B*07	FLJ14675	hypothetical protein FLJ14675	0,41	NC	A	A
AVIVLVENFYK	A*03	MGC17528	hypothetical protein MGC17528	0,40	NC	P	P
KVCNPIITKL	B*07	HSPA8	heat shock 70kDa protein 8	0,40	D	P	P
SIDRTVMYY	A*01	SLC3A1	solute carrier family 3 member 1	0,40	D	P	P
QLEDGRTLSDY	A*03	UBB	ubiquitin B	0,39	D	P	P
DEKSIITY	B*18	SPTBN1	spectrin, beta, non-erythrocytic 1	0,37	D	P	P

Bei einigen der hier nicht gezeigten Sequenzen war die Zuordnung zu HLA-A/B Molekülen nicht zweifelsfrei möglich. Solche Peptide könnten über HLA-C oder HLA-E präsentiert werden, oder kein optimales Motiv enthalten.

3.3.2 Genexpressionsanalyse und Auswahl der Impfpeptide

Ein weiteres vorrangig wichtiges Kriterium zur Erfassung der Bedeutsamkeit eines Peptides und zur Auswahl von Impfpeptiden ist die Genexpressionsanalyse. Die hier durchgeführte Genexpressionsanalyse dient zum Vergleich der Expression des Gens eines Quellproteins im Tumor- und Normalgewebe und zeigt dessen typische Expression in verschiedenen anderen humanen Geweben. Die Expressionsdaten des RCC-Tumor- und Normalgewebes stammen direkt aus dem Patienten. Die übrige Gewebeexpression zeigt die typische Gewebeexpression aus Untersuchungen eines Pools von Individuen. Definiert wurden Kandidatenantigene durch mehrere Kriterien: (1) Nachweis des Peptides im Gewebe per Massenspektrometrie (2) eine deutliche Überexpression des Quellproteins im RCC-Tumorgewebe verglichen zum korrespondierenden Normalgewebe (Signifikanzgrenze 4-fache Überexpression bei *präsent*-Detektion) sowie (3) eine möglichst niedrige Expression in den anderen menschlichen Geweben. Darüberhinaus wurden Angaben über mögliche Tumor-assoziation aus der Literatur miteinbezogen. Für den überwiegenden Teil der 148 identifizierten Quellproteine konnten Daten zur Genexpression erhoben und bewertet werden (Tabelle 3.3), von denen 8 Quellproteine mindestens 4-fach überexprimiert waren. Abbildung 3.2 zeigt das Expressionsverhalten beispielhaft für IGFBP3 (Insulin-like growth factor binding protein 3). Für dieses Protein zeigt sich eine 7-fache Überexpression des Tumorgewebes, sowie eine weitgehend niedrige Basalexpression für IGFBP3 in den übrigen Gewebe. Lediglich für das Gewebe des Uterus und der Plazenta werden hohe Expressionsmuster für IGFBP3 gefunden.

Mit Hilfe der Genexpressionsanalyse steht damit neben der Peptid- und Proteincharakterisierung zusätzlich eine Analyseverfahren auf DNA-Ebene zur Verfügung.

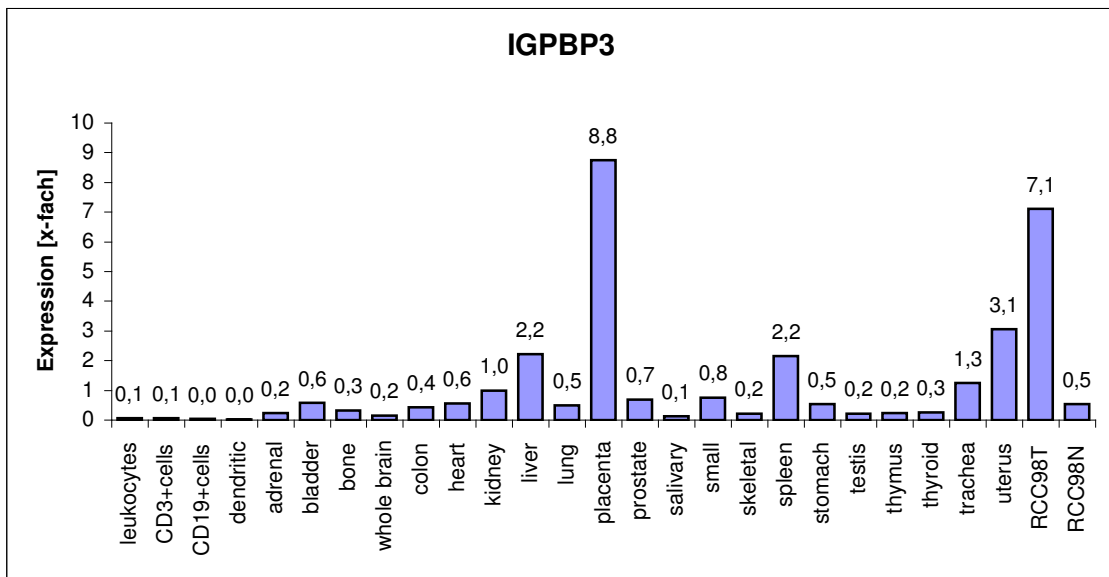


Abbildung 3.2: Expressionsprofil für IGFBP3 aus RCC98.

Gezeigt ist das Expressionsverhalten für Tumor und Normalgewebe von RCC98 sowie für verschiedene Referenzgewebe (x-Achse). Die Überexpression ist auf der y-Achse als Vielfaches der Standardniereexpression (kidney) angegeben.

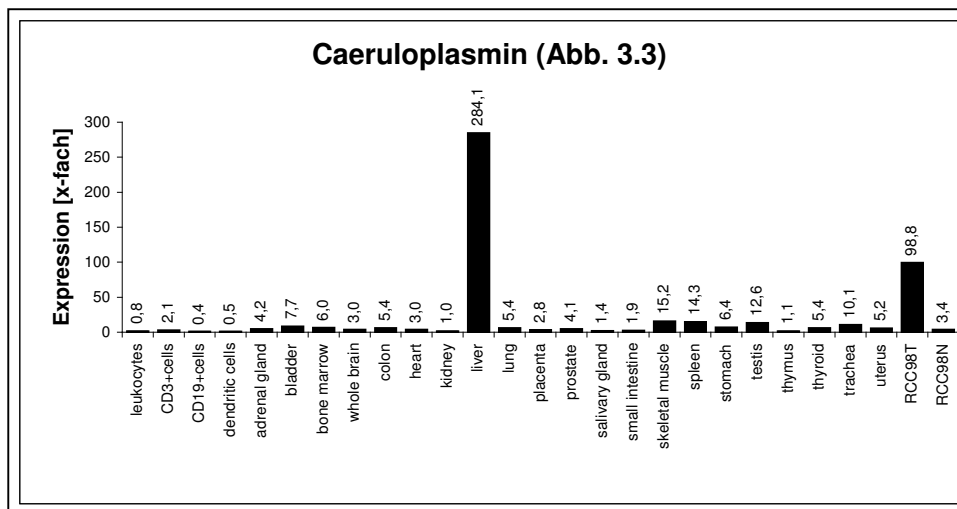


Abbildung 3.3: Expressionsprofil von Caeruloplasmin aus RCC98.

Gezeigt sind das Expressionsverhalten von Tumor und Normalgewebe sowie für verschiedene Referenzgewebe (x-Achse). Die Überexpression ist als Vielfaches [x-fach] auf der y-Achse bezogen auf die Standardniere (kidney) angegeben. Expressionsunterschiede zwischen Normalniere (N) und Standardniere des Gewebeprofiles ergeben sich durch natürliche Expressionsschwankungen.

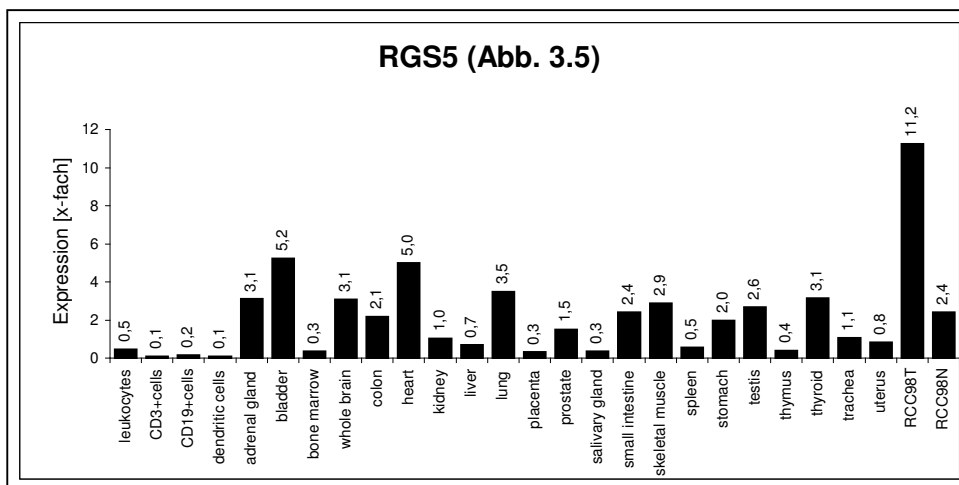
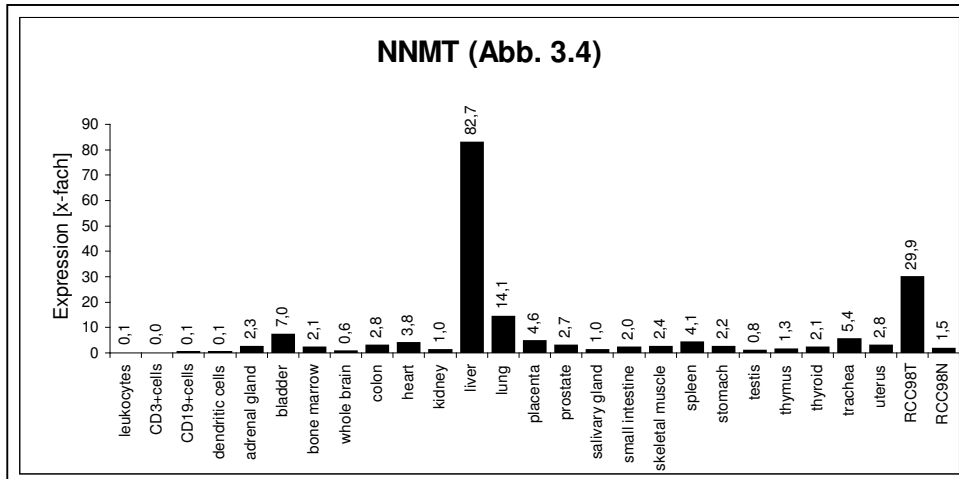


Abbildung 3.4 – 3.5: Expressionsprofile von NNMT und RGS5 aus RCC98. Gezeigt sind das Expressionsverhalten von Tumor und Normalgewebe, sowie für verschiedene Referenzgewebe (x-Achse). Die Überexpression ist als Vielfaches [x-fach] auf der y-Achse bezogen auf die Standardniere (kidney) angegeben. Expressionsunterschiede zwischen Normalniere (N) und Standardniere des Gewebeprofiles ergeben sich durch natürliche Expressionsschwankungen.

3.3.3 Zur Vakzinierung von RCC98 verwendete Peptide

Tabelle 3.4 zeigt die 8 Impfpeptide, die zur Vakzinierung für Patient RCC98 verwendet wurden. RCC98 ist der vierte Impfpatient, der in der 2003 begonnenen Impfstudie vakziniert wurde. Im Vorfeld konnte die Arbeitsgruppe Stevanović bereits für drei Patienten mit RCC einen für den Patienten individuell

zusammengestellten Peptidimpfstoff generieren. Für RCC98 konnten mit Ausnahme von CD70, das nur in der Genchipanalyse überexprimiert war, alle Peptide direkt aus dem Tumorgewebe isoliert und analysiert werden. Die Peptide waren zwischen 9 und 12 Aminosäuren lang und wurden über die Allele A*01, A*03, B*07 und B*18 präsentiert. Die in der Tabelle 3.4 dargestellte Überexpression ist gegen die korrespondierende Normalniere gemessen, wobei alle dargestellten Quellproteine auch im Normalnierengewebe exprimiert waren. Aus Tabelle 3.4 werden die drei Säulen ersichtlich, deren Informationen aus dem Versuchsaufbau gewonnen werden konnten:

(a) Die Peptidsequenz ermittelt per Massenspektrometrie, (b) die Erfassung auf Genebene per Genexpressionsanalyse sowie (c) die darausfolgende Kenntnis des Quellproteins und damit Zugriff auf Literaturangaben (Tabelle 3.4). Das Vorhandensein der jeweiligen Kriterien (→ Kapitel 3.3.2) für die einzelnen Impfpeptide ist hierbei mit + und - gekennzeichnet. Die Quellproteine aller Impfpeptide waren mit Ausnahme von USH1C mindestens 2-fach überexprimiert. Die Signifikanzgrenze der Überexpression wurde bei einer 4-fachen Überexpression bei gleichzeitiger *präsent*-Detektion festgelegt. Mit (+) wurden jene Peptide gekennzeichnet, die zwar überexprimiert waren, jedoch unterhalb der Signifikanzgrenze lagen. Die hier gezeigten Peptide wurden in diesem Impflauf erstmals eingesetzt, da die Kenntnis der Peptidsequenzen aus diesem Tumor stammt.

Tabelle 3.4.: Zur Vakzinierung verwendete Peptide für RCC98.

Gezeigt sind die Allelzugehörigkeit des Peptides, das Quellprotein, die Peptidsequenz, sowie die Überexpression [x-fach] zwischen RCC-Tumor~Normalnierengewebe.

USH1C – Usher syndrome 1C

ADFP – Adipose differentiation related peptide (adipophilin)

IGFBP3 – Insulin like growth factor binding protein 3

MMP7 – Matrix metalloproteinase 7

RSG5 – Receptor of G-protein signalling 5

CD70 – Tumor necrosis factor superfamily, member 7

+ = Kriterium erfüllt, - = Kriterium nicht erfüllt, (+) Kriterium erfüllt aber < Signifikanzgrenze

HLA- Allel	Genname	Peptidsequenz	Überexpression [x-fach]	Kriterien ¹		
				(1)	(2)	(3)
B*18	USH1C	DEIVRINGY	0,6	+	-	+
A*03	ADFP	TSALPIIQK	2,2	+	(+)	+
B*07	IGFBP3	RPTLWAAAL	14,2	+	+	+
A*03	ADFP	SLLTSSKGQLQK	2,2	+	(+)	+
A*03	ADFP	IARNLTQQL	2,2	+	(+)	+
A*03	MMP 7	SLFPNSPKWTSK	6,2	+	+	+
A*03	RGS 5	GLASFKSFLK	4,7	+	+	+
B*07	CD70	GPALGRSFL	21,9	-	+	+

¹ (1) Peptidnachweis im Gewebe (2) Überexpression des Quellproteins im Tumor
(3) niedrige Normalgewebeexpression oder mögliche Tumor-assoziation aus Literatur

3.4 Analyse weiterer RCC-Proben auf Vorkommen Tumor-assoziiertes Liganden

3.4.1 RCC100

Die Probe RCC100 wurde mit Hilfe einer durch Dipl. Biochem. Claudia Lemmel etablierten Methode zur quantitativen massenspektrometrischen Untersuchung vergleichend zur Genexpressionsanalyse untersucht. Hierbei ergaben sich von den 20 identifizierten Peptidpaaren aus Tumor- und Normalgewebe 3 Peptide, deren Quellproteine überexprimiert waren. Die Liganden stammen aus EH-domain containing 2, Chondroitin-sulfate proteoglycan 4 und Adipophilin.

3.4.2 RCC103

Die in Tabelle 3.5 gezeigten Peptide stammen aus insgesamt 130 Peptiden, die in RCC103 identifiziert werden konnten. Dargestellt sind Peptide, die die festgelegte Signifikanzgrenze von 4-facher Überexpression übersteigen.

Weiterhin aufgeführt sind BAX, das im Tumorgewebe exprimiert war, nicht aber im Normalgewebe, sowie Adipophilin. Der zu Grunde liegende HLA-Typ für Patient RCC103 war A*11, A*25, B*15, B*44. Die gezeigten Peptide konnten zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht in der Impfstudie verwandt werden, da der

Patient nach OP tumor-frei war. Dargestellt ist folglich nicht der verwendete Impfcocktail, sondern Peptide, die im Folgenden bezüglich ihrer Eignung anhand der Einschlusskriterien (→ Kapitel 3.3.2) diskutiert werden sollen.

Tabelle 3.5: Ausgewählte Liganden aus RCC103. Gezeigt sind Allelzugehörigkeit des Peptides, die Peptidsequenz, Gensymbol und Titel des Quellprotein, die relative Veränderung in der Expression sowie das Überexpressionsverhältnis zwischen RCC-Tumor~Normalgewebe [x-fach]; Spalte 7 zeigt den Status der Expression in der Genchipanalyse im Tumorgewebe, Spalte 8 im Normalgewebe. P steht hierbei für präsent, A für anwesend bezüglich der Expression. I - steht für Überexpression (I).

HLA- Allel	Sequenz	Gen - symbol	Titel	Verän- derung	Ratio T~N [x-fach]	103T Det	103N Det
A*25	NIGDEALIGRW	MAGED4	"melanoma antigen, family D, 4"	I	18,0	P	A
A*25	ETITGLRVW	NEB	nebulin	I	12,4	P	A
A*25	EVIDLMIKEY	PHF10	PHD finger protein 10	I	6,6	P	A
A*11	GQYGNPLNK	ADAM10	a disintegrin and metalloproteinase domain 10	I	5,9	P	P
A*25	ELIRTIMGW	BAX	BCL2-associated X protein	I	3,6	P	A
A*11	TSALPIIQK	ADFP	Adipose differentia- tion-related protein	I	3,1	P	P

3.4.3 RCC112

Die aus RCC112 identifizierten 100 Peptide (nicht gezeigt) wurden in Zusammenarbeit mit cand. med. Tobias Krüger gewonnen. Keines der identifizierten Peptide erfüllte die Kriterien für die Verwendung als Impfpeptid. Für diesen Patienten wurden durch Epitopvorhersage definierte Peptide aus RGS und MET zur Vakzinierung verwendet.

3.5 Identifizierung Tumor-assoziiertes Liganden aus Kolon-CA und BPH

Das im Kapitel 2.1 beschriebene Immunpräzipitationsverfahren wurde auch zur Isolation von Liganden aus Kolon-CA und BPH verwendet. Damit sollen Tumor-assoziierte Liganden aus Kolon-CA zum möglichen Einsatz in zukünftigen Peptidvakzinierungsstudien identifiziert werden. Aus den BPH-Proben sollen

typische Oberflächenpeptide der Prostata identifiziert werden als Grundlage für die Identifizierung typischer Peptide auch in Prostatakarzinomen. Bislang liegen hierzu jedoch keine Daten vor.

3.6 MHC-I-Quantifizierung

Im Zuge der vergleichenden Untersuchung der MHC-I-Expression in Tumor- und Normalgewebe verschiedener Gewebe wurden Eluat- und Lysatproben mit Hilfe etablierter Untersuchungsmethoden (Edman-Abbau, Western-Blot) sowie in diesem Zusammenhang neu etablierten Methoden (ELISA) quantitativ untersucht. Im Folgenden bezieht sich die Bezeichnung Eluat auf die von der Präzipitationssäule gewonnene MHC-I-Probe. Ausgangslysat steht für die lysierte Gewebeprobe vor Immunpräzipitation, Restlysat für die entsprechende Probe nach MHC-I-Extraktion per Präzipitationssäule.

3.6.1 MHC-I-Quantifizierung per Edman-Abbau aus Tumoreluat

Unter Kenntnis der Aminosäuresequenz der α -Kette des MHC-I-Moleküls kann die Menge der MHC-I-Moleküle in der Probe per Edman-Abbau ermittelt werden. Die Sequenz der zu detektierenden α -Kette lautet GSHSMRY und wurde aufgrund des charakteristischen Signals von Histidin an dritter Stelle des Sequenzierungsablaufs bestimmt. Hierzu wird die Differenz des Histidinsignals im dritten Sequenzschritt zum zweiten Sequenzschritt unter Vorgabe eines deutlichen Signalabfalls im vierten Schritt errechnet. Diese Differenz wird aufgrund der nicht vollständigen Detektierung verdoppelt, gemäß von S. Stevanović überlieferten Erfahrungswerten. Der so ermittelte MHC-I-Gehalt entspricht dem Gehalt der Probe in pmol. Die MHC-I-Menge in diesen 50 μ l wird nun auf die Ausgangsmenge des Eluates hochgerechnet und entsprechend mit Faktor 50 oder 70 multipliziert. Tabelle 3.6 zeigt die Rohdaten aus dem Edman-Abbau für die Probe RCC98TE2. Die charakteristischen Signalanstiege- und abfälle zur Bestimmung der Probenmenge sind für die α -Kette grau unterlegt und für die κ -Antikörperkette fett gedruckt. Die Sequenzierung per Edman-

Abbau war nur für jene Proben möglich, die per Protein-A-Säule immunpräzipitiert wurden (Tabelle 3.1 und 3.2 nicht kursiv), da die α -Kette bei der TFA-Elution für CNBr-Proben im sehr sauren pH vermutlich denaturiert und somit nicht detektierbar ist. Eine dritte Elution wurde nur für Proben ausgeführt, bei denen die Immunpräzipitation mit Hilfe einer 0,6 g Protein-A-Säule durchgeführt wurde.

Unter Zuhilfenahme der Sequenz der κ -Kette des W6/32-Antikörpers DIVMTQS konnte durch das charakteristische Signal für Methionin in Position 4 die Menge des extrahierten Antikörpers ermittelt werden. Die Differenz von 4 nach 3 wurde hierbei halbiert und ebenfalls auf das Ausgangsvolumen hochgerechnet. Im angegebenen Beispiel ergibt sich als HLA-Menge $\sim 22 \times 2 \times 70 \text{ pmol} = 3,1 \text{ nmol}$, als AK-Menge $\sim 750:2 \times 50 = 26,3 \text{ nmol}$.

Tabelle 3.6.: Edman-Sequenzierung der Tumoreluatprobe RCC98TE2.

Waagrecht angeordnet sind die Signale der detektierten AS in den einzelnen Zyklen. Der Schritt im Sequenzierungszyklus (Z) ist vertikal angegeben. Grau unterlegt sind die charakteristischen Signalanstiege und -abfälle der α -Kette (GSHSMRY), fett unterlegt für die κ -Kette W6/32 (DIVMTQGS).

Aminosäuren																
Z	D	E	G	H	I	K	L	M	P	Q	R	S	T	V	Y	
1	270,8	360,0	111,7	15,90	50,55	0,0	27,27	18,21	271,4	18,00	22,6	222,3	45,9	37,3	56,8	
2	100,4	130,8	59,4	18,9	814,6	0,0	41,0	15,4	63,5	56,8	24,8	93,0	55,2	336,5	40,5	
3	88,0	117,9	71,5	40,7	63,1	68,0	120,0	17,4	69,5	285,6	53,6	85,1	0,00	769,0	62,2	
4	90,0	73,2	90,2	30,7	42,8	88,7	370,9	766,8	102,2	98,2	47,0	132,2	150,0	201,4	70,7	
5	97,8	73,4	107,3	30,8	63,1	107,0	162,9	93,0	147,4	99,5	56,8	130,8	463,2	276,2	82,2	
6	116,7	202,5	116,6	33,7	71,7	137,2	145,5	43,4	177,8	466,3	86,1	156,2	173,5	204,0	96,9	
7	140,6	115,7	134,2	40,36	89,42	157,3	162,0	43,5	207,7	163,7	93,2	430,9	233,3	230,2	134,4	

3.6.1.1 Ergebnisse des quantitativen MHC-I-Nachweises aus Tumoreluat

Tabelle 3.7 zeigt die per Western-Blot und Edman-Abbau ermittelten MHC-I-Mengen aus Tumoreluaten von Nieren- und Kolonkarzinomproben in nmol.

Die verschiedenen Elutionen sind mit E1, E2 usw. gekennzeichnet. Weiterhin

ersichtlich sind die Gewebemasse in g, die verwendete Antikörpermenge in mg. CNBr-Proben konnten nicht im Edman-Abbau quantifiziert werden. Für ausgewählte große Tumorproben wurde eine dritte Elution durchgeführt.

Tabelle 3.7.: Gemessene MHC-I-Mengen [nmol] aus Eluatproben von Nierenzell- und Kolon-CA ; *Kursiv:* CNBr-Säulen-Elutionen.

T - Tumorgewebe, N – Normalgewebe, N/A – nicht quantifizierbar

E1/E2/E3 – Eluat1/2/3 gemessen per Edman-Analyse

West E1/E2 – Eluat 1/2 gemessen mit Western-Blot

AK – verwendete Antikörpermenge [mg]

Proben Nr.	Masse [g]	AK [mg]	E1 [nmol]	E2 [nmol]	E3 [nmol]	West E1 [nmol]	West E2 [nmol]
Nierenzellkarzinome :							
RCC51N	7,8	9,9	2,1	N/A		2,1	0,4
RCC51T	7,6	12,9	2,0	N/A		4,4	1,4
RCC52N	7,4	10,2	N/A	0,1		1,1	0,3
RCC52T	7,0	10,5	1,8	0,2		4,6	1,5
RCC71N	9,0	7,6	N/A	--		--	--
RCC71T	7,0	7,6	3,0	--		--	--
RCC98T	21,1	21,3	2,1	3,1	0,6	5,7	13,2
RCC99N	12,4	12,0	0,7	0,8		0,8	1,4
RCC99T	7,7	8,0	0,9	0,4		1,7	1,1
RCC100N	12,6	13,4	1,1	0,3		3,2	1,4
RCC100T	8,0	8,9	0,9	0,4		5,0	1,2
RCC101T	7,5	9,1	0,7	0,1		--	--
RCC103T	10,0	16,5	3,7	0,7		24,8	19,3
RCC108T	30,0	36,0	1,5			1,2	0,2
RCC112T	2,1	5,0	0,4	0,3		2,6	1,2
<i>RCC53N</i>	6,9	16,2				1,3	
<i>RCC53T</i>	6,2	15,3				1,9	
<i>RCC57N</i>	6,8	11,3				1,9	
<i>RCC57T</i>	8,7	13				2,5	
<i>RCC49T</i>	7,1	15,6				1,3	
<i>RCC49N</i>	8,8	16,6				2,9	
Kolonkarzinome:							
CCA134T	8,0	9,3	0,6	0,2		2,0	0,7
CCA134N	10,0	9,3	0,6	0,1		2,3	0,5

CCA136T	10,0	8,3	0,5	0,3		7,8	0,6
CCA136N	12,0	10,7	1,0	0,1		3,0	1,2
CCA148N	23,0	19,3	1,4	0,4		1,7	0,6
CCA148T	25,0	23,4	0,9	0,2		3,9	0,8
CCA149N	52,0	52,7	1,0	0,42		1,1	3,3
CCA149T	45,0	45,8	6,6	2,0	0,9	2,2	2,3
CCA137N	14,0	21,2				4,1	
CCA137T	6,5	19				2,8	
CCA155N	7,0	7,5				3,1	
CCA155T	10,0	10				4,9	
CCA156N	19,0	19,1				1,0	
CCA156T	16,9	17,3				1,3	

Die so im Edman-Abbau ermittelten MHC-I-Mengen rangierten pro Eluat zwischen 1-7 nmol und waren in RCC verglichen zu Kolonkarzinomen vergleichbarer Masse ausgeprägter. Im Vergleich zwischen Tumor- und Normalgeweben für die jeweiligen Probe konnte keine eindeutig höhere oder niedrigere MHC-I-Menge im Tumor bei vergleichbarer Masse nachgewiesen werden. Die MHC-I-Menge im Zweiteluat war mit Ausnahme von RCC98 geringer als im Ersteluat. Wiederholt war es in der Edman-Analyse nicht möglich den charakteristischen Histidin-Peak auszumachen (N/A), so dass hier keine Berechnung der MHC-I-Menge möglich war.

3.6.2 Quantifizierung von MHC-I per Western-Blot

3.6.2.1 MHC-I-Quantifizierung aus Tumoreluat

In Eluaten von 15 Proben aus RCC und 19 Proben aus CCA sowie Proben des jeweils korrespondierenden Normalgewebes wurde per Western Blot der MHC-I-Gehalt quantifiziert (Durchführung → Kapitel 2.2.2). Abbildung 3.6 zeigt beispielhaft einen Western-Blot mit Standard-MHC-I-Monomeren von 100 bis 700 ng in den linken 7 Spuren und die 6 MHC-I-Banden von Tumoreluatproben zur Rechten. Oberhalb ist die schwere Kette des Präzipitationsantikörpers W6/32 angefärbt. Mit Hilfe der Standardmonomere wurde eine Eichgerade zur Berechnung der MHC-I-Menge von Eluatproben erstellt.

Abbildung 3.7 zeigt die aus den Standard-Monomeren gebildete Eichgerade (Einzelwerte), mit deren Hilfe die aus Schwärzung und Bandendicke errechneten Absorptionswerte in nmol MHC-I umgerechnet werden.

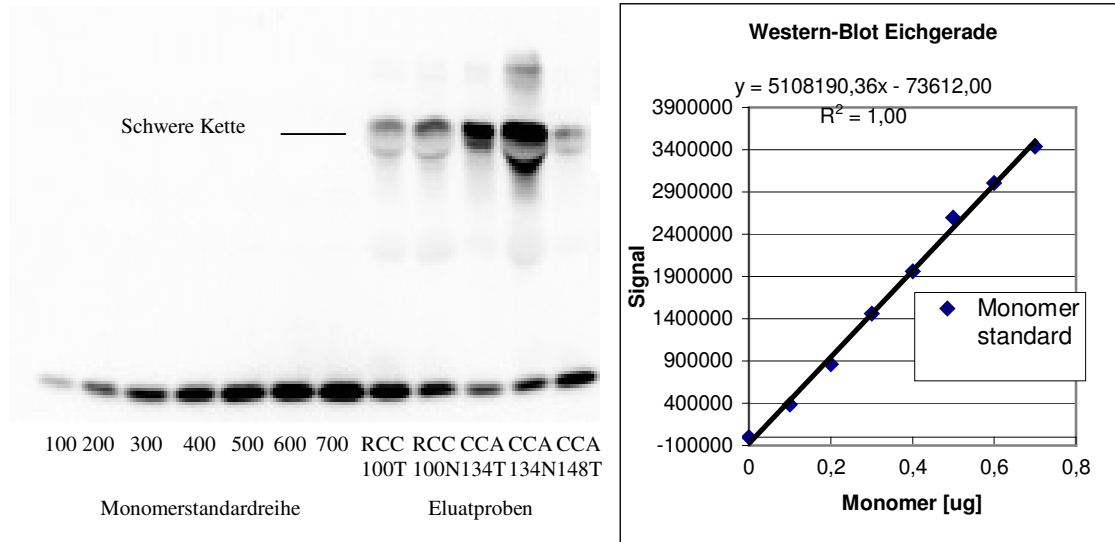


Abbildung 3.6: Nitrozellulose-Blot für Eich-Monomere und Tumoreluatproben. Monomerstandardreihe in [ng] oben: schwere Kette W6/32-AK

Abbildung 3.7: Monomer-Eichgerade zur MHC-I-Quantifizierung per Western-Blot. Monomerangaben in [µg] R^2 - Bestimmtheitsmaß

Tabelle 3.7 zeigt die mit Western-Blot bestimmten MHC-I-Mengen aus Tumoreluaten in nmol. Die MHC-I-Mengen bewegten sich pro Eluat zwischen 1 und 25 nmol und lagen fast durchweg höher als im Edman-Abbau.

3.6.2.2 MHC-I-Quantifizierung aus Tumorlysat per Western-Blot

Im Folgenden wurde die MHC-I-Expression von 4 Proben aus RCC, 3 Proben aus CCA und einer Probe aus BPH (PC21) per Western Blot quantifiziert. Bei den dargestellten Lysatproben handelt es sich um Ausgangslysate, d.h. vor der MHC-I-Extraktion per Säulen-Immünpräzipitation. Bei RCC49R handelt es sich um eine Restlysatprobe nach MHC-I-Extraktion per Säule. Mit Hilfe der in den Spuren 1 - 4 detektierten MHC-I-Standardmonomere wurde eine Eichgerade zur quantitativen Berechnung der Lysatproben erstellt.

Abbildung 3.8: Western-Blot aus Tumor-Lysaten. Die vier linken Spuren zeigen die Monomerbanden zur Erstellung der Eichgeraden in [ng]. In den übrigen Spuren sind Proben aus Nierenzell-CA (RCC), Kolon-CA (CCA) und BPH (PC) aufgetragen. Mit Ausnahme von RCC103 und PC21 wurden die Proben mit CNBr immunpräzipitiert.

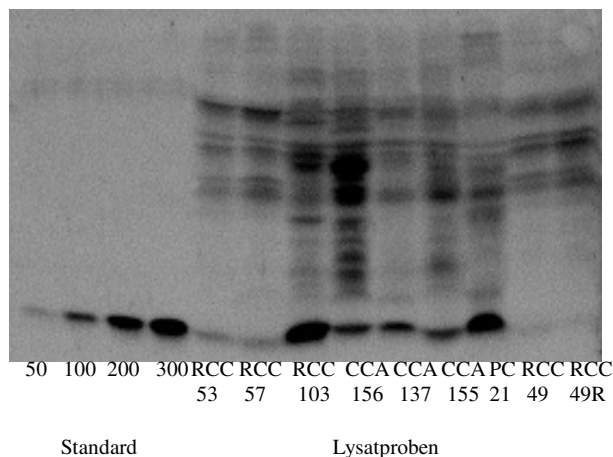


Tabelle 3.8 zeigt die quantitativen Ergebnisse dieser Untersuchung in [nmol]. Es handelt sich bei den untersuchten Proben um Ausgangslysate, nur bei RCC49R um eine Restlysatprobe.

Probe	Masse [g]	MHC-I [nmol]
RCC53	6,2	7,7
RCC57	8,7	7,1
RCC103	10,0	43,5
CCA156	16,9	12,5
CCA137	6,5	14,0
CCA155	10,0	12,8
PC21	24,2	33,0
RCC49	7,1	5,8
RCC49R	7,1	6,0

Tabelle 3.8: MHC-I-Quantifizierung im Tumorlysate per Western-Blot.

Gemessene MHC-I-Mengen als Einzelwerte in nmol.

Gewebemassen in [g]

BPH-Probe bezeichnet als (PC)

RCC – Nierenzellkarzinom

CCA - Kolonkarzinom

Die gemessenen MHC-I-Werte lagen zwischen 5 und 44 nmol, wobei RCC103 das größte MHC-I-Vorkommen zeigt. Es wurde insgesamt ein höherer MHC-I-Gehalt in den Proben gegenüber den Eluatuntersuchungen gemessen. Die drei CCA-Proben unterschieden sich trotz unterschiedlicher Ausgangsmassen nur geringfügig im MHC-I-Gehalt. RCC49 Lysat- und Restlysate zeigten keinen Signalunterschied in der MHC-I-Detektion

3.6.3 Etablierung eines quantitativen ELISA-Verfahrens zum Nachweis von MHC-Klasse-I-Molekülen aus Tumorlysat- und Eluat

Mit der Etablierung eines quantitativen Elisaverfahrens zum MHC-I-Nachweis aus Tumorlysat sollte eine Methode mit folgender Anwendung eingeführt werden (→ Kapitel 1.10):

- Untersuchung der Proben in einem frühen Abschnitt der Immunpräzipitation aus Tumorlysat und somit nächstmöglich an der nativen Ausgangsmenge
- Schnelle Durchführbarkeit, Anpassbarkeit und hohe Sensitivität
- Vergleich zwischen MHC-I-Ausgangsmenge und Residualmenge zur Bestimmung der Extraktionsleistung und Qualitätskontrolle der Immunpräzipitation
- Vergleichend und ergänzend zu Edman-Abbau und Western-Blot

3.6.3.1 Erstellung einer Eichgeraden mit rekombinanten Monomeren und Festlegung des Linearitätsbereiches bei direkt adsorbiertem Antigen

Zur Erstellung der Standard Eichgerade wurden 10, 20, 40, 50, 60, 80 und 100 ng der rekombinanten MHC-I-Monomere direkt an die Platte adsorbiert. (Durchführung → Kapitel 2.2.3.1). Die daraus resultierende Eichkurve ist in Abbildung 3.9 zu sehen. Auf der x-Achse sind die Monomermengen in ng gegen die daraus entstehenden Absorptionswerte aufgetragen. Wie aus Abbildung 3.9 ersichtlich, konnte auf diese Weise keine Linearität nachgewiesen werden. Der Befund wurde anschließend nochmals reproduziert, ohne dass sich ein Linearitätsbereich erzeugen ließ. Auch schwankten die in Dreifachbestimmung gemessenen Werte bisweilen erheblich. Zeitgleich wurden Tumorlysate (→ Kapitel 2.2.3.1) in verschiedenen Verdünnungen an die Platte adsorbiert und detektiert, wobei sich ebenfalls keine Linearität feststellen ließ. Zwar konnte hierbei ein adäquater relativer Absorptionsunterschied zwischen einzelnen Verdünnungsstufen, zwischen Proben sowie zwischen Ausgangs- und Endlysat festgestellt werden, jedoch keine Linearität ermittelt werden.

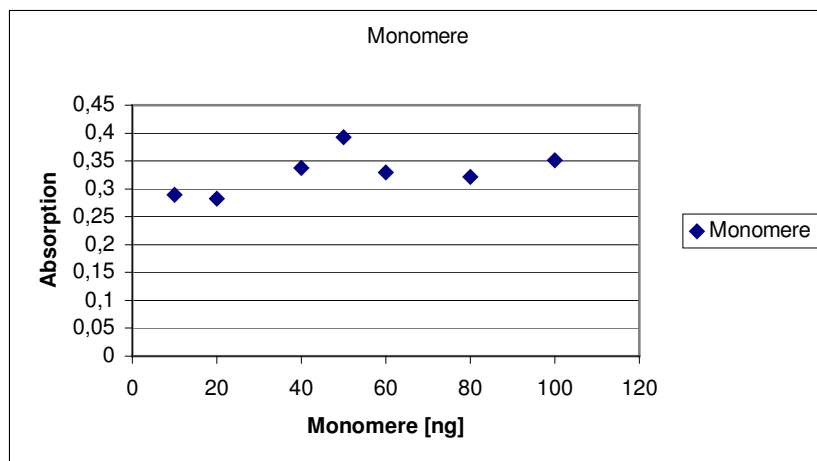


Abbildung 3.9: Versuch der Erstellung einer Monomereichgerade durch direktes Adsorbieren von rekombinanten MHC-I-Monomeren. Die Monomermengen pro Well sind in [ng] angegeben, Absorptionswerte als Mittelwert der 3 Einzelwerte.

3.6.3.2 Quantitative Bestimmung von MHC-I aus Tumorlysat per Sandwich-ELISA

3.6.3.2.1 Erstellung einer Eichgeraden mit rekombinanten MHC-I-Monomeren

Nachdem es nicht gelungen war, durch direktes Adsorbieren der Standardmonomere und der Tumorlysatproben lineare Bereiche zu definieren, wurde nun die MHC-I-Quantifizierung mit Hilfe eines Sandwich-ELISA Ansatzes unternommen. (→ Kapitel 2.2.3.2). Zur Erstellung der Eichgeraden wurden Monomere in Schritten von 5, 10, 20, 40, 50, 60, 80, 100 ng adsorbiert und der lineare Bereich definiert. Wie aus Abbildung 3.10 ersichtlich, ergibt sich so ein linearer Messbereich zwischen 5 und 60 ng.

Ausgehend von diesen Messwerten ergab sich der Bereich bis 60 ng als linearer Bereich und der Messbereich wurde in diesem Bereich gehalten. Abbildung 3.11 zeigt den linearen Bereich der Monomerstandardkurve bei einem Bestimmtheitsmaß von 0,99. Die Werte der Dreifachbestimmung erwiesen sich als sehr stabil.

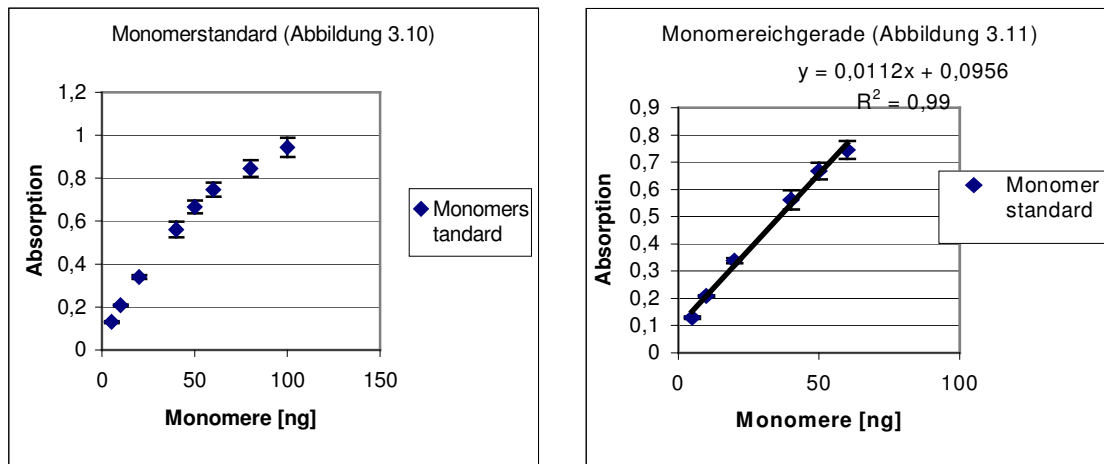


Abbildung 3.10: Monomerstandardkurve, erstellt mit rekombinanten MHC-I-Monomeren in Sandwich-ELISA Technik.

Abbildung 3.11: Linearer Messbereich der Monomerstandardkurve zwischen 5 und 60 ng. Abbildungen 3.10 und 3.11: Die MHC-Mengen pro Well sind in [ng] angegeben. Die Absorptionswerte sind der Mittelwert der 3 Einzelwerte mit SD. R^2 -Bestimmtheitsmaß

3.6.3.2.2 Feststellung des linearen Messbereichs der Lysatproben

Zur Ermittlung des linearen Messbereichs der Lysatproben wurden die Lysatproben in Lysepuffer mit Verdünnungen von 1:10, 1:20, 1:40, 1:50, 1:60, 1:80, 1:100, 1:200, 1:400 verdünnt und gemäß der Beschreibung des Sandwich-ELISA angesetzt (→ Kapitel 2.2.3.2 und 2.2.3.2.1).

Abbildung 3.12 zeigt die Verdünnungsreihe der Tumorklysatprobe RCC49. Dabei ist der Verdünnungsfaktor auf der x-Achse gegen die Absorption aufgetragen.

Der lineare Bereich ergibt sich gemäß dieser Darstellung zwischen 1:20 und 1:80 Verdünnung (Abbildung 3.13). Für die 1:10 Verdünnung ergaben sich im Verlauf der Untersuchung bezüglich des Linearitätsintervalls unzuverlässige Befunde, insbesondere bei hohem MHC-I-Gehalt der Probe. Durch Darstellung von mehr als 8 Verdünnungsreihen unterschiedlicher Tumorklysatproben stellte sich das Intervall von 1:20 bis 1:80 als stetig und reproduzierbar heraus.

Abbildung 3.14 zeigt anhand weiterer Tumorklysatproben den nachgewiesenen Linearitätsbereich zwischen 1:20 und 1:80. Das Bestimmtheitsmaß R^2 liegt hier zwischen 0,97 und 0,99.

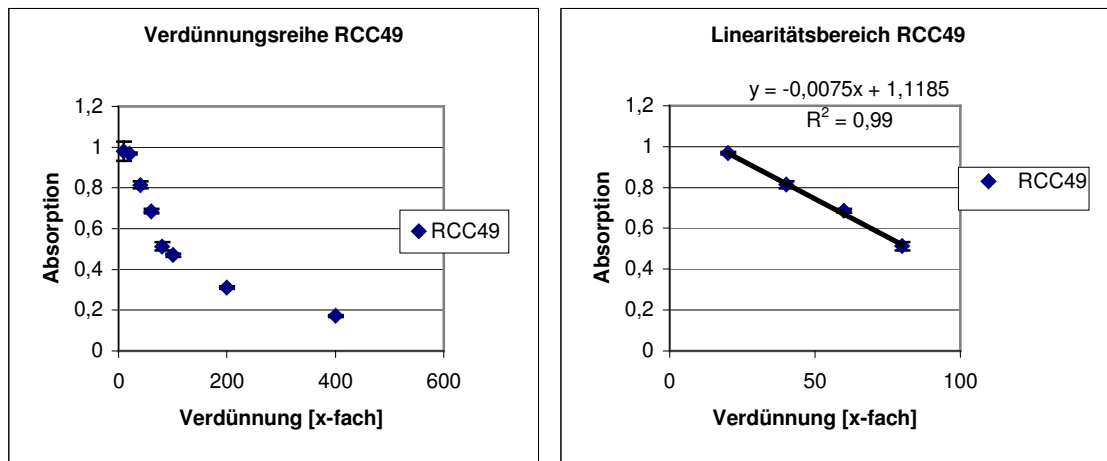


Abbildung 3.12: Verdünnungsreihe der Tumorlysatprobe RCC49.

Abbildung 3.13: Linearitätsbereich der Tumorlysatproben anhand RCC49.

Zu Abbildung 3.12 / 3.13: Die Verdünnung ist als Vielfaches auf der x-Achse angegeben. Die Absorption ist dargestellt als Mittelwert der 3 Einzelwerte mit SD.

R^2 -Bestimmtheitsmaß

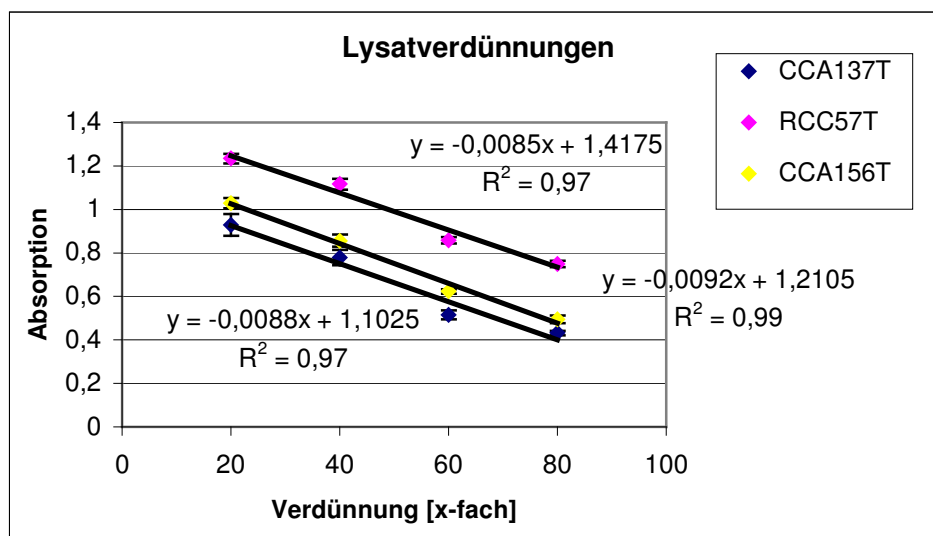


Abbildung 3.14: Beispiele für Lysatprobenverdünnungen mit linearem Bereich und Parallelität zwischen 1:20 und 1:80; Verdünnung als Vielfaches [x-fach] auf x-Gerade R^2 - Bestimmtheitsmaß; Absorptionswerte als Mittelwerte der 3 Einzelwerte mit SD.

3.6.3.2.3 Modifizierung der Eichgerade und Anpassung an die Mediumsbedingungen im Lysat

Um die Bedingungen in Monomerstandardprobe und Tumorlysatprobe vergleichbar zu machen, wurden die rekombinanten MHC-I-Monomere in einem

nahezu MHC-I-freien Tumorlysat nach mehrfacher MHC-I-Extraktion verdünnt (→ Kapitel 2.2.3.2.2). Im hier gezeigten Beispiel wurde das Restlysat RCC49R in einer Verdünnung von 1:40 verwandt, das als Ausgangsabsorption bei 1:80 eine Absorption von 0,055 zeigt und vermutlich geringe MHC-I-Mengen enthält. Wie aus Abbildung 3.15 ersichtlich, zeigt die modifizierte Standardgerade (rosa, oben) eine partielle Aufaddierung der Absorptionswerte verglichen zur reinen Monomerstandardgerade (blau, Mitte). Es ergibt sich jedoch keine vollständige Aufaddierung von Monomerprobe und verdünnter Restlysatprobe. Die Eigenabsorption der Restlysatprobe wird im Folgenden abgezogen, so dass man die bereinigte, den Mediumsbedingungen entsprechende Eichgerade (gelb, unten) erhält. Die ermittelte Eichgerade $y = 0,0106x + 0,0882$ wurde für die im Kapitel 3.6.4 gezeigten Quantifizierungsbeispiele für MHC-I aus Tumorlysat verwendet.

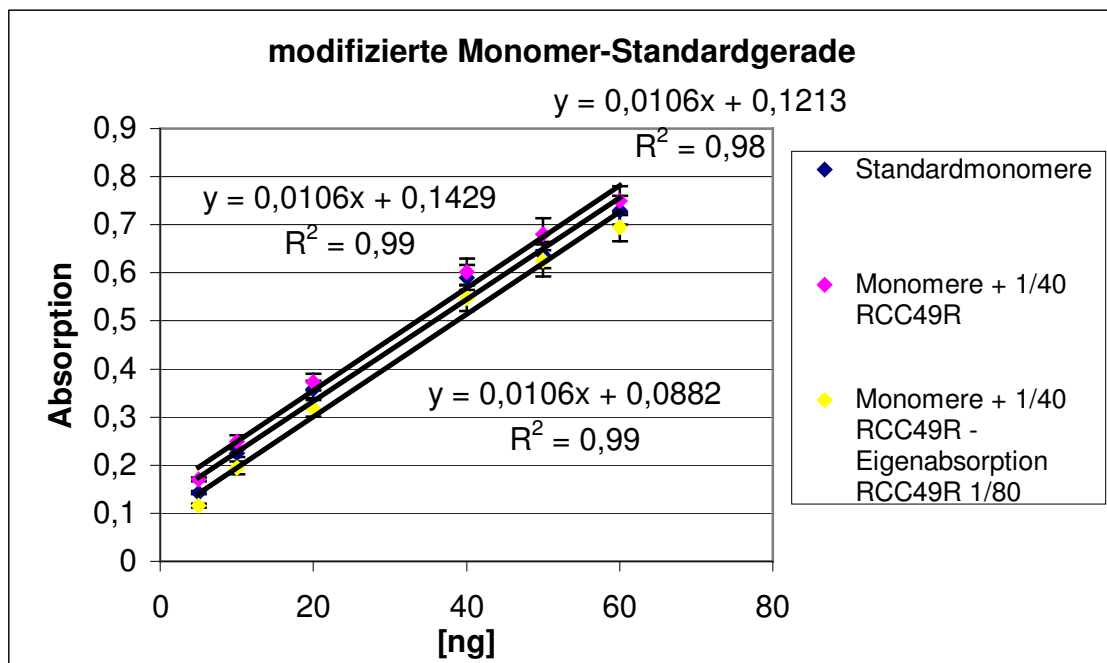


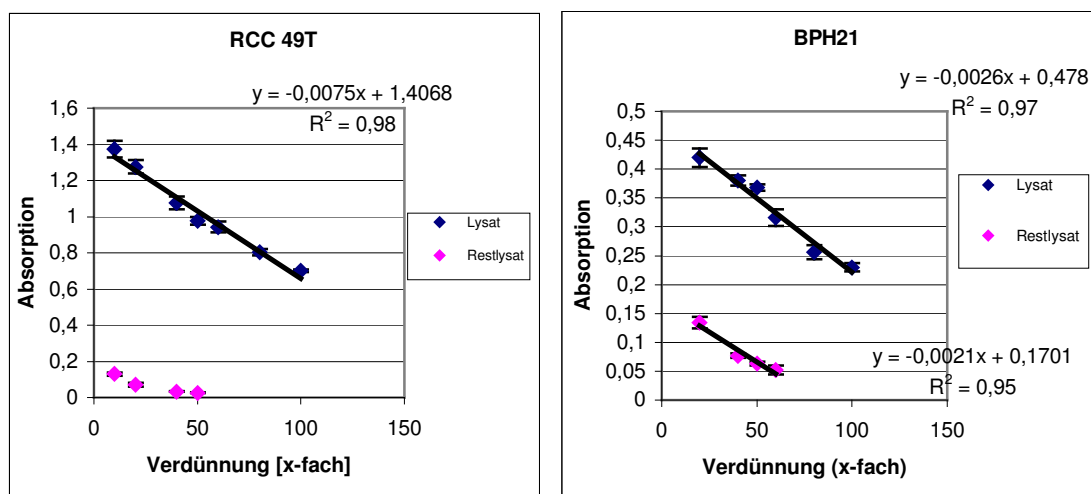
Abbildung 3.15: Mediumsangepasste Monomereichgerade.

Gezeigt ist die Eichgerade, bestehend aus reinen Standardmonomeren (Mitte, blau), die kombinierte, modifizierte Eichgerade aus Standardmonomeren, angesetzt in Tumorrestlysat (oben, rosa), sowie die bereinigte Eichgerade nach Abzug der Eigenabsorption des Restlysat (unten, gelb). Monomerangaben in [ng]; Absorptionswerte als Mittelwerte der 3 Einzelwerte mit SD. R^2 – Bestimmtheitsmaß

3.6.3.2.4 Untersuchung von Lysatproben vor und nach Immunpräzipitation per ELISA

Eine wichtige Fragestellung bei der Entwicklung des ELISA war die Möglichkeit, die MHC-I-Konzentration in Lysatproben vor und nach Immunpräzipitation gegenüberzustellen und so eine Aussage über die Extraktionsleistung der Immunpräzipitation machen zu können. Abbildung 3.16 und 3.17 zeigen die Verdünnungsreihen für RCC49 und BPH21 in der Gegenüberstellung von Lysatproben vor (oben) und nach Immunopräzipitation (unten). Hierbei zeigt RCC49 einen stärkeren Signalabfall als BPH21.

Zur quantitativen Berechnung stellten sich meist Restlysatverdünnungen von 1:10 – 1:40 und Lysatverdünnungen von 1:80 als durchführbar heraus.



Abbildungen 3.16 und 3.17: Vergleich Tumorlysat gegenüber Restlysat.

Die Lysatverdünnungsreihe in blau (oben) ist der Verdünnungsreihe des Restlysates (rosa, unten) gegenübergestellt. Verdünnungen sind als Vielfaches [x-fach] angegeben. Die Absorptionswerte sind die Mittelwerte der 3 Einzelwerte mit SD.

3.6.4 Quantitative Analyse von Tumorlysatproben

Im Folgenden wurden die MHC-I-Mengen in Tumor- und Restlysat aus 6 RCC und 3 CCA bestimmt (Tabelle 3.9). Die Proben wurden hierzu mit 1,25 µl Lysatprobe pro 100 µl Lysepuffer 1:80 verdünnt gemessen. Die Restlysate wurden zwischen 1:10 und 1:40 verdünnt gemessen. Die Eichgerade wurde als modifizierte Eichgerade mit Monomeren von 5 bis 60 ng generiert (Abbildung

3.15). Die gemessene Absorption wurde in die Geradengleichung der Eichgerade eingesetzt und daraus die Monomermenge in ng pro Well bestimmt. Anschließend wurde die Gesamtmenge an MHC-I in der Gesamtlösung (meist 40 – 60 ml) in ng bestimmt (Faktor siehe Tabelle 3.9). Zur Umrechnung in nmol wurde die Molmasse für die rekombinanten Monomere von 46000 g / mol eingesetzt. Die gemessenen MHC-Mengen bewegten sich zwischen 20 und 50 nmol. Die Messung wurde anschließend nochmals mit gleicher Messanordnung auf Reproduzierbarkeit geprüft (in Klammern). Hierbei ergaben sich insgesamt 10-15% höhere Messwerte, bei in sich stimmigen quantitativen Verhältnissen.

Tabelle 3.9: Gemessene MHC-I-Mengen im Tumorlysat per Sandwich-ELISA.

Gezeigt ist die im Well gemessene Absorption (Mittelwert) / Standardabweichung (SD), die errechnete Menge MHC-I im Well und in der Ausgangslösung ([ng] ges) sowie die Gesamtmenge ([nmol] ges) in nmol. Gewebemassen sind in [g] angegeben, der Faktor entspricht der Hochrechnung auf die Gesamtmenge an vorliegendem MHC-I in der Lösung. In Klammern ist das Ergebnis der wiederholten Messung gezeigt.

Lysatprobe	Masse [g]	Absorption / SD	[ng] / Well	Lysat [ml]	Faktor	[ng] ges	[nmol] ges
RCC53T	6,2	0,48 / 0,007	37	50	40000	1480000	32,2 (36)
RCC53N	6,9	0,49 / 0,010	38	50	40000	1520000	33,0
RCC49T	8,8	0,56 / 0,043	45	50	40000	1800000	39,1 (44)
RCC49N	7,1	0,37 / 0,018	27	50	40000	1080000	23,5
RCC57T	8,7	0,70 / 0,024	58	50	40000	2320000	50,4 (54)
RCC57N	6,8	0,43 / 0,008	32	50	40000	1280000	27,8
RCC51T	7,6	0,43 / 0,008	32	60	48000	1536000	33,4 (35)
RCC51N	7,8	0,44 / 0,005	33	50	40000	1320000	28,7
RCC52T	7,0	0,48 / 0,006	37	55	44000	1628000	35,4
RCC52N	7,4	0,35 / 0,005	25	60	48000	1200000	26,1
RCC100T	8,0	0,42 / 0,005	31	70	56000	1736000	37,7
RCC100N	12,6	0,45 / 0,013	34	65	52000	1768000	38,4
CCA137T	6,5	0,44 / 0,008	33	50	40000	1320000	28,7 (33)
CCA137N	14,0	0,46 / 0,026	35	60	48000	1680000	36,5
CCA156T	16,9	0,55 / 0,045	44	45	36000	1584000	34,4 (37)
CCA156N	19,0	0,50 / 0,004	39	30	24000	936000	20,3
CCA155T	10,0	0,65 / 0,030	53	40	32000	1696000	36,9 (42)
CCA155N	7,0	0,50 / 0,015	39	50	40000	1560000	33,9

3.6.5 Vergleichende Darstellung der MHC-I-Quantifizierung per Western-Blot und ELISA

Abbildung 3.18 stellt die mit Western-Blot (Tabelle 3.7) und ELISA (Tabelle 3.9) gemessenen MHC-I-Gesamtwerte vergleichend gegenüber. Im Western-Blot wurden Eluate, im ELISA Lysatproben untersucht. Die dargestellten MHC-I-Konzentrationen in [nmol] sind pro g Gewebe auf der y-Achse angegeben. Durchweg zeigen sich höhere MHC-I-Werte in der Untersuchung per ELISA von 2 - 6 nmol / g gegenüber 0,1 – 1 nmol / g im Western-Blot.

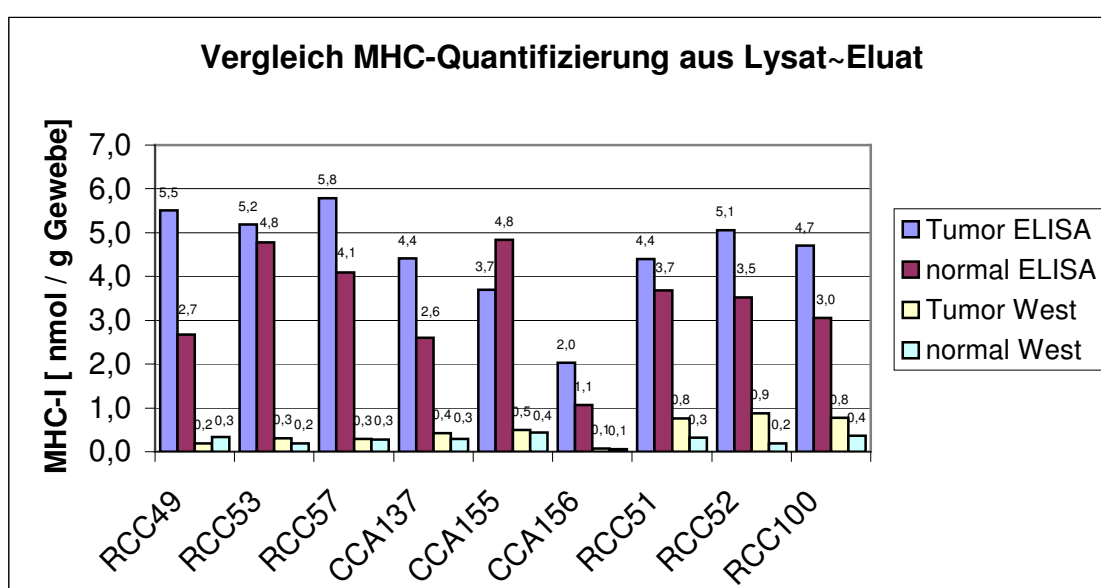


Abbildung 3.18: Vergleichende Darstellung MHC-I / g Gewebe in RCC und CCA-Proben untersucht mit Western-Blot und ELISA. Dargestellt sind Tumor- und entsprechendes Normalgewebe. MHC-I-Mengen sind angegeben in [nmol MHC-I / g Gewebe] auf der y-Achse.

3.6.6 Quantitative Bestimmung von MHC-I im Restlysat

Tabelle 3.10 zeigt die MHC-I-Menge in nmol im Restlysat nach Immunpräzipitation. Auch hier wurden die ermittelten Messwerte in die Standardgeradengleichung $y = 0,0106x + 0,0882$ eingesetzt und unter Berücksichtigung der verwendeten Probenmenge die MHC-I-Restmenge im Gesamtlysat berechnet. Hierbei wurden die Proben zwischen 1:10 und 1:40

verdünnt gemessen. 3 Proben konnten nicht quantifiziert werden, da der Messwert außerhalb der Eichgerade lag (Berechnung → Kapitel 3.6.4).

Tabelle 3.10: Gehalt von MHC-I in [nmol] im Restlysat.

Die Absorptionswerte sind die Mittelwerte der 3 Einzelwerte / Standardabweichung (SD). Die MHC-I-Menge/ Well ist in [ng] angegeben, weiterhin der Verdünnungsfaktor sowie die [ng] und [nmol] Menge an MHC-I im Gesamtylsat ([ng] und [nmol] ges).

Lysatprobe	Absorption / SD	[ng] / Well	Lysatmenge [ml]	Faktor	[ng] ges	[nmol] ges
RCC53T	0,16 / 0,004	6,8	50	10000	68000	1,5
RCC49T	0,08 / 0,002	Zu niedrig	50	20000	--	--
RCC57T	0,46 / 0,007	35,1	50	8000	280800	6,1
RCC51T	0,07 / 0,005	Zu niedrig	60	6000	--	--
RCC52T	0,09 / 0,005	Zu niedrig	55	5500	--	--
CCA137T	0,10 / 0,008	1,1	50	5000	55000	1,2
CCA156T	0,14 / 0,006	4,9	44	4400	21560	0,5
CCA155T	0,60 / 0,007	48,3	45	18000	894600	18,9

3.6.7 MHC-I-Quantifizierung per ELISA aus Tumoreluat

Weiterhin wurde versucht die ELISA-Technik auch zur Detektion von MHC-I aus Tumoreluat und somit der Bestimmung der tatsächlich aus dem Tumor gewonnenen MHC-I-Menge zu verwenden (→ Kapitel 2.2.3.2.4).

Es gelang hierbei jedoch nicht eine Linearität zu erzeugen und MHC-I quantitativ im Eluat nachzuweisen.

3.6.8 Prozessoptimierung der Peptidextraktion

Bislang liegen keine massenspektrometrischen Daten bezüglich einer verbesserten Peptidextraktion durch Ultraschallbehandlung der Proben oder verbesserter Analytik mit geringeren Probenvolumen per CNBr-Säule vor. In den ELISA-Untersuchungen wurde keine vermehrte MHC-I-Detektion in CNBr-Proben beobachtet. Begleitende quantitative Untersuchungen mit Western-Blot und Edman-Abbau waren für die Proben nicht möglich.

4 Diskussion

4.1 Patienten-individuelle Peptidvakzinierung von Patienten mit RCC

Das bereits einleitend beschriebene Studienprotokoll basiert auf der Vorstellung einer Patienten-individuellen Peptidvakzinierung. Folglich ist bei der Auswahl der verwendeten Impfpptide nicht nur der Gesichtspunkt der Tumor-Assoziation zu berücksichtigen, sondern weiterhin die Einbeziehung einer möglichst breiten Diversifikation der Peptide, gemäß des vorliegenden HLA-Typs, sowie die Gewebeexpression in den übrigen Körpergeweben. So besteht ein Impfcocktail idealerweise aus mehreren Peptiden oder Epitopen, die über möglichst viele MHC-Subtypen präsentiert werden, um so einen wirksamen Impfansatz trotz kompensatorischer Herunterregulation von MHC-Proteinen auf Tumorzellen zu erzielen.

Eine mögliche Tumor-Assoziation von Proteinen wurde mit Hilfe des bereits beschriebenen kombinierten Ansatzes aus massenspektrometrischer Analyse und Expressionsdaten (Weinschenk et al., 2002) aus Tumor und Normalgewebe untersucht. Wie bereits eingehend beschrieben, wurden zur Auswahl der verwendeten Impfpptide eine Reihe von Auswahlkriterien zu Grunde gelegt: Die ideale Konstellation für die Auswahl eines Impfpptides gemäß dieser Kriterien wäre (1) der direkte Nachweis des Peptides per Massenspektrometrie im untersuchten Tumorgewebe, (2) eine deutliche Überexpression des Quellproteins im Tumorgewebe gegenüber dem Normalgewebe sowie (3) eine möglichst niedrige Expression in den übrigen menschlichen Geweben.

Weiterhin wurden Informationen aus Literatur, Datenbanken (SEREX) oder *in vitro*-Ergebnissen über bestehende Tumor-Assoziation von Proteinen in den Entscheidungsprozess miteinbezogen. Für die im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Liganden wurde eine Signifikanzgrenze von 4-facher Gewebeüberexpression zu Grunde gelegt. Im Folgenden sollen die in RCC98, RCC100, RCC103 und RCC112 identifizierten Peptide auf eine mögliche Tumor-Assoziation und bezüglich ihrer Verwendbarkeit für diese oder zukünftige Peptid-Vakzinierungsstudien diskutiert werden.

4.1.1 Identifizierte MHC-I-Liganden aus RCC98 und deren Bedeutung als Impfpeptide

In Tabelle 3.4 wurde bereits der für RCC98 verwendete Impfcocktail gezeigt. Wie aus der Tabelle ersichtlich, konnten alle Peptide direkt aus dem Tumorgewebe isoliert und analysiert werden, mit Ausnahme von CD70, das nur in der Genchipanalyse überexprimiert war.

In RCC98 konnte mit 8 Peptiden der bislang umfangreichste Impfcocktail verwendet werden, bei dem die Kenntnis der ermittelten Peptidsequenzen nahezu vollständig aus dem analysierten Tumorgewebe stammt. Somit konnten nicht nur interessante, neue Impfpeptide identifiziert werden, sondern auch eine Fülle neuer Peptidsequenzen aus real auf Tumorzellen präsentierten Liganden gewonnen werden. Mit 148 identifizierten Peptiden ist dies zugleich die größte Anzahl an Peptiden, die aus einem einzelnen Tumorgewebe isoliert und identifiziert werden konnte und übersteigt die bisher von Weinschenk und Kollegen veröffentlichten Ergebnisse von 77 Peptiden (Weinschenk et al., 2002). Da dies in erster Linie auf die Arbeit der Gruppe Stevanović an der Verbesserung der Analysetechnik zurückzuführen ist, sind in Zukunft noch weit bessere Peptidausbeuten zu erwarten. Erfahrungsgemäß kann für die Mehrheit der identifizierten Peptide keine Tumor-Assoziation belegt werden, so dass hier von normalen Selbstpeptiden auszugehen ist. So sollen im Folgenden jene Liganden und Quellproteine der 148 identifizierten Liganden untersucht werden, die Teile der vorgegebenen Einschlusskriterien erfüllen. Hierbei wurde die Signifikanzgrenze für die Gewebeexpression als 4-fache Überexpression angenommen.

Caeruloplasmin

Caeruloplasmin zeigt mit seiner 29-fachen Überexpression im Tumorgewebe gegenüber dem Normalgewebe die herausragendste Überexpression unter den dargestellten Proteinen. Funktionell ist Caeruloplasmin (Ferrioxidase I) ein kupferhaltiges, membranständiges Protein, das wesentlich an der Regulation des intrazellulären Kupfers beteiligt ist. Wie aus Abbildung 3.3 ersichtlich, wird Caeruloplasmin vor allem in der Leber exprimiert. Übereinstimmend mit dieser

Observation in RCC98, wurde auch in der Literatur die Überexpression von Caeruloplasmin in RCC-Tumorgewebe nachgewiesen, ohne dass hierbei eine spezifische Assoziation mit diesem Tumor nachgewiesen werden konnte. (Nishie et al., 2001). Bezüglich der Verwendung als Impfpeptid ist Caeruloplasmin aufgrund der hohen Expression in der Leber (Abbildung 3.3) ungeeignet. Da davon auszugehen ist, dass bei einer möglichen *in vivo* T-Zellstimulation vor allem die Gewebe mit der höchsten Expression des Quellproteins betroffen wären, wäre folglich von einer immunologischen Schädigung der Leber auszugehen.

NNMT (Nicotinamid N-Methyltransferase)

Das Enzym NNMT bewirkt funktionell die N-Methylierung von Nicotinamid. Natürlicherweise wird das Enzym vorwiegend in der Leber exprimiert, was auch aus dem Expressionsprofil (Abbildung 3.4) ersichtlich wird. Im RCC-Tumorgewebe zeigt sich eine deutliche 20-fache Überexpression im RCC-Tumorgewebe. Eine mögliche Assoziation von NNMT und dem M. Parkinson wird diskutiert, da eine verstärkte Expression von NNMT in Gehirnen von Parkinson Patienten beobachtet wurde (Parsons et al., 2003; Matsubara et al., 2002). Eine vermehrte Expression von NNMT wurde darüberhinaus in papillären Schilddrüsen-CA beobachtet (Xu et al., 2003). Weinschenk und Kollegen beschrieben eine Überexpression von NNMT in RCC (Weinschenk et al., 2002). Bei der Untersuchung von RCC-Proben konnten, gemäß laborinterner Daten, ebenfalls wiederholt NNMT-Liganden sowie Genüberexpression in RCC-Tumorproben nachgewiesen werden. Wie bereits für Caeruloplasmin angedeutet, sind Liganden aus NNMT aufgrund der hohen Expression im Lebergewebe als Impfpeptide ungeeignet.

Insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3)

Bislang konnten 6 IGFBPs identifiziert werden (IGFBP1-6). Sie sind über die Regulation von freien IGFs an der Regulation von Wachstumsvorgängen beteiligt. Hohe Konzentrationen von IGF1 sind über Bindung an IGF1R mit einem gesteigerten Risiko für Brust-, Prostata-, Kolon- und Lungen-CA

vergesellschaftet. Insbesondere IGFBP3 bindet 90% der zirkulierenden IGFs und spielt damit eine wesentliche Rolle im Regulationsprozess. IGFBP3 wird allerdings in diesem Zusammenhang eine pro-apoptotische, d.h. Tumorwachstum regulierende Eigenschaft nachgesagt, da es durch p53 induziert wird und die Menge an freiem IGF1 reguliert. So findet sich in der Literatur die Beobachtung eines erhöhten Krebsrisikos bei hohen IGF1 und niedrigen IGFBP3-Spiegeln. So konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von Brust-CAs mit Tamoxifen zu einer Abnahme der IGF1 Serumspiegel führt (Pollak et al., 1990; Helle et al., 1996). Dabei weisen Cheung und Kollegen auf den möglichen Nutzen einer therapeutischen Beeinflussung von IGF1 und IGFBP3 in der Therapie von RCC hin (Cheung et al., 2004). Die Rolle von IGFBP3 in diesem Regulationsvorgang wurde in *reviews* zusammengetragen (Furstenberger and Senn, 2002; Yu and Rohan, 2000).

In Abbildung 3.2 ist das Expressionsverhalten für IGFBP3 gezeigt sowie die Gewebeverteilung. Für dieses Protein zeigt sich eine deutliche 14,2-fache Überexpression gegenüber dem Normalgewebe sowie eine weitgehend niedrige Basalexpression im übrigen Gewebe. Auffällig ist die Überexpression in Uterus und Plazenta. Da es sich bei dem Impfpatienten RCC98 jedoch um einen männlichen Patienten handelt, besteht keine Gefahr für eine Immunreaktion gegen diese Zielgewebe, was für den Einsatz von IGFBP3 in der Vakzinierungsstudie spricht. Überexpression von IGFBP3 in RCC wurde weiterhin in der Literatur beschrieben (Hintz et al., 1991). IGFBP3 ist somit ein anschauliches Beispiel, in dem alle angestrebten Kriterien erfüllt werden konnten und eine Tumor-Assoziation vermutet werden kann. Auch funktionell ist über das Mitwirken an der Wachstumskontrolle eine Assoziation zwischen IGFBP3-Expression und Tumorwachstum nachvollziehbar. Allerdings muss einschränkend angemerkt werden, dass eine Überexpression von IGFBP3 im RCC-Tumorgewebe der in der Literatur belegten pro-apoptotischen Wirkung entgegensteht.

MMP7 (Matrix-Metalloproteinase 7)

Proteine der Matrix-Metalloproteinase-Subfamilie (derzeit 23 bekannte Subtypen) sind am Abbau extrazellulärer Matrix (EZM) im Rahmen physiologischer Prozesse wie der Embryogenese, aber auch in krankhaften Prozessen wie der rheumatoiden Arthritis und der Metastasierung von Tumoren beteiligt. So bauen MMPs neben EZM-Proteinen Adhäsionsproteine ab, die für den Zellkontakt bedeutsam sind und beeinflussen Mediatoren der Apoptose sowie Wachstumsfaktoren (Leeman et al., 2003). Sherief und Kollegen untersuchten MMPs als Screeningmethode für RCCs im Urin und fanden signifikant gesteigerte MMP-Aktivität (Sherief et al., 2003). Insbesondere der in RCC98 überexprimierte Subtyp MMP7 (Matrilysin) wurde seit seiner Entdeckung vor 20 Jahren in zahlreichen Tumorarten intensiv untersucht. So konnte eine Überexpression von MMP7 in verschiedenen gastrointestinalen Tumoren (Kolon-CA, Magen-CA), aber auch gynäkologischen Tumoren (Endometrium), Tumoren des ZNS (Glioblastomen, Oligodendrogliomen) sowie Blasen und Nierenzell-CA festgestellt werden. Es konnte gezeigt werden, dass MMP7 in *high-grade* RCCs stärker exprimiert ist als in *low-grade* RCCs (Sumi et al., 2003a). Weiterhin konnte am Beispiel von Blasen-CAs zeigen werden, dass MMP-7 tatsächlich von den Tumorzellen produziert wird (Sumi et al., 2003b). In zahlreichen Artikeln wird auf die Assoziation von MMP-7 im Metastasierungsprozess, in beispielsweise Kolon- und Magen-CA, hingewiesen (Ikeda et al., 2002; Leeman et al., 2003). Eine besonders interessante Verbindung ist zwischen MMP-7 und IGFBP3 beschrieben (Mochizuki et al., 2004; Miyamoto et al., 2004). Gemäß ihrer Untersuchungen aktiviert MMP-7, das von verschiedenen Tumoren exprimiert wird, das Enzym ADAM28, welches wiederum zum Abbau von IGFBP3 führt. Die damit verbundene Regulation von IGF-1 wird mit der Tumorgenese von Kolon-, Brust-, Prostata- und Lungen-CAs in Verbindung gebracht (→ IGFBP3).

Wie bereits angedeutet, sind MMPs an der Spaltung verschiedener Moleküle beteiligt. So werden lösliche Fas-Liganden durch MMP-7 gespalten, wobei die Bedeutung hiervon als pro- oder anti-apoptotisch noch nicht geklärt ist (Vargo-Gogola et al., 2002). Aufgrund der weitreichend belegten Bedeutsamkeit von

MMP-7 im Zusammenhang mit Metastasierung und Tumorgenese, wird auch die Frage nach der Möglichkeit einer pharmakologischen Beeinflussbarkeit von MMP-7 diskutiert (Wielockx et al., 2004). In RCC98 konnte eine 6-fache Überexpression von MMP-7 im RCC-Tumorgewebe gegenüber dem Normalgewebe festgestellt werden. Aus Expressionsuntersuchungen weiterer RCCs konnte in 6 von 11 Fällen eine mehr als 4-fache Überexpression von MMP7 beobachtet werden. Mit Blick auf die übrigen Gewebe lag nur die Expression von MMP7 im Blasengewebe über der Basalexpression. Bezieht man neben den im Rahmen dieser Impfstudie festgelegten Einschlusskriterien, die Fülle unterstützender Literaturhinweise mit ein, so erscheint eine Tumor-Assoziation von MMP-7 als sehr wahrscheinlich. Somit steht mit dem in RCC98 identifizierten Peptid aus MMP-7 ein interessanter Impfligand zur Verfügung, der nebenbei auf dem häufig vorkommenden HLA-Allel A*03 präsentiert wird.

RGS5 (Regulator of G-Protein Signalling 5)

G-Proteine sind bedeutsame *second messenger* in der intrazellulären Signaltransduktion. Auch Wachstumsfaktoren werden über G-Proteine vermittelt, so dass eine Steigerung der G-Protein Kaskade auch zu unkontrollierten Zellwachstum führen kann. RGS5 zeigt häufiges Vorkommen im Gefäßendothel. Furuya und Kollegen fanden eine 6,6-fache Überexpression von RGS5 in RCC-Tumorgewebe gegenüber Normalgewebe und identifizierten Gefäßendothel als das Gewebe mit vorwiegender RGS5-Expression (Furuya et al., 2004). Somit könnte RGS5 eine Rolle in der Angiogenese und dem RCC-Tumorwachstum spielen. Überexpression von RGS5 in RCC konnte darüberhinaus nachwiesen werden (Rae et al., 2000). In RCC98 war RGS5 4,7-fach überexprimiert. 8 von 11 weiteren untersuchten RCC Proben zeigten eine mehr als 4-fache Überexpression von RGS5. Aus Abbildung 3.5 wird weiterhin ersichtlich, dass Herzgewebe und Blasengewebe eine geringfügig höhere Expression von RGS5 als RCC-Normalgewebe zeigen, jedoch RCC-Tumorgewebe deutlich am höchsten über der Basalexpression liegt.

RGS5 erfüllt somit die zu Grunde gelegten Einschlusskriterien und erscheint auch aufgrund der funktionellen Assoziation mit Zellwachstum ein

vielversprechender Kandidat für die Peptidvakzinierung zu sein. Sollte sich bestätigen, dass die RGS5-Expression in RCCs in erster Linie auf das Gefäßendothel zurückgeht, erscheint der Einsatz von Peptiden aus RGS5 aufgrund einer möglichen Funktion in der Angiogenese dennoch geeignet zur immuntherapeutischen Beeinflussung des RCC. Mit RGS5 steht somit ein neuer interessanter Impfligand, präsentiert auf HLA-A*03, zur Verfügung. Nach 7 Vakzinierungszyklen konnte die AG Gouttefangas nach T-Zellaktivierung mit dem Liganden aus RGS5 erstmals eine T-Zellantwort *ex vivo* per Zytokin-PCR in RCC98 nachweisen.

ADFP (Adipose differentiation related peptide, Adipophilin)

Dieses Protein kommt auf der Oberfläche von Lipidvakuolen in Adipozyten und einer Reihe weiterer Gewebe vor, wobei es jedoch auf spezifische Gewebe wie laktierendes Brustgewebe, Nebennierenrinde, Sertoli und Leydig-Zellen sowie den männlichen Reproduktionstrakt beschränkt bleibt (Heid et al., 1998).

Weinschenk und Kollegen fanden Adipophilin in zwei RCC-Tumorgeweben selektiv überexprimiert (Weinschenk et al., 2002). Ein möglicher Zusammenhang zwischen einer Überexpression von ADFP und Tumorentwicklung mag in der Funktion von ADFP als Hypoxie-induzierbarer Faktor begründet sein (Saarikoski et al., 2002). Da die Adaptation von Tumoren an die Sauerstoffbedingungen im Gewebe ein wichtiger Faktor für das Tumorstadium ist, könnte Adipophilin hierbei möglicherweise eine wichtige Rolle spielen. So ist ein weiterer Hypoxia inducible factor (HIF-1) als wichtiger Bestandteil der Angiogenese und des Tumorstadiums beschrieben (Shi and Fang, 2004). Darüber hinaus ist ein Zusammenhang zwischen dem von Hippel-Lindau Gen und der Regulation von HIF bei der Entstehung von RCCs beschrieben (Maynard and Ohh, 2004). In RCC98 konnten drei neue, HLA-A*03 präsentierte Liganden aus ADFP identifiziert werden. Obwohl ADFP im hier vorliegenden Falle nur 2-fach überexprimiert war, erscheint es ein vielversprechender Kandidat im Rahmen einer Peptidvakzinierung zu sein. Gemäß institutsinterner Angaben, wurde ADFP vielfach in RCC-Tumorgeweben als überexprimiert identifiziert und es sind bislang 8 verschiedene Liganden

bekannt. Darüber hinaus konnte mit Liganden aus ADFP eine HLA-A*02-restringierte T-Zellantwort *in vitro* mit Lyse von Tumorzellen erzeugt werden (Schmidt et al., 2004). Weiterhin wird aus der Publikation ersichtlich, dass Adipophilin in 8 der 12 Tumorproben überexprimiert ist, unter ihnen auch RCC98 und RCC103. So konnten bereits mehrere Patienten mit Liganden aus ADFP vakziniert werden und es stehen mit den drei neu-identifizierten Liganden aus RCC98 weitere wichtige Peptide auf dem Weg zu einer Multi-Epitop-Vakzinierung zur Verfügung.

USH1C (Usher syndrome 1C, NY-CO-37/38)

Das aus dem Protein USH1C, auch bezeichnet als NY-CO-37/38, stammende Peptid wurde nicht aufgrund seiner Expression in der Expressionsanalyse als Impfligand berücksichtigt, sondern wegen einer vermuteten Tumor-Assoziation, gemäß Daten der SEREX-Datenbank (www.licr.org/SEREX.html). Bei der SEREX-Methode werden Sera von Tumorpatienten auf das Vorliegen von Antikörpern gegen dargebotene Tumorantigene untersucht. Die Anti-Tumor-Antikörper werden mit Hilfe von cDNA-Expressionuntersuchungen in *E. coli* nachgewiesen (Sahin et al., 1995; Scanlan et al., 1999).

Interessanterweise stammt das identifizierte Peptid aus einem Protein, das mit dem autosomal-rezessiven Usher Syndrom, gekennzeichnet durch Retinopathia pigmentosa, progrediente Schwerhörigkeit und Vestibularisausfall, in Verbindung steht. Es stellt sich die Frage, warum Peptide aus diesem Quellprotein auf Tumorzellen exprimiert werden und eine AK-Bildung induzieren. Eine Assoziation zwischen Usher Syndrom und RCC ist bislang nicht beschrieben. Sicherlich wäre es interessant zu verfolgen, ob das Peptid wiederholt in RCC-Tumorgewebe nachgewiesen werden kann. Im Rahmen der Peptidimpfstudie ist das Peptid durch seine vermutete Tumor-Assoziation und die Präsentation über B*18 ein interessanter Impfkandidat.

CD70 (Tumor necrosis factor superfamily, member 7)

CD70 gehört zur Zytokinfamilie der Tumor-Nekrose-Faktoren. Es entwickelt seine Funktion durch Bindung an CD27 auf ruhenden, nicht aber aktivierten T- und B-Zellen. CD70 spielt vermutlich eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von T-Effektorzellen und B-Zellen im Rahmen der anti-viralen und Anti-Tumor-Antwort (Douin-Echinard et al., 2003; Yokoi et al., 2003). Rowley und Mitarbeiter beschreiben eine bedeutende Zunahme der Qualität und Quantität von T-Effektorzellantwort nach Stimulation mit löslichem CD70 *in vivo* (Rowley and Al Shamkhani, 2004). Die gezeigten Beispiele verdeutlichen die wichtige Funktion von CD70 bei der T-Effektorzellaktivierung und lassen die deutliche Überexpression auf RCC-Tumorzellen (Tabelle 3.4) als nicht sinngemäß erscheinen. Bei genauerer Betrachtung erscheint CD70 jedoch als „zweischneidiges Schwert“. Es wird vermutet, dass Dauerstimulation von CD70/CD27 auch zu einer Erschöpfung der T-Zellaktivierung mit umgekehrtem Effekt führen kann (Tesselaar et al., 2003). Eine Überexpression von CD70 wurde bereits in Gliomzelllinien beschrieben (Held-Feindt and Mentlein, 2002). Eine Interaktion zwischen CD70 aus Gliomzellen und CD27 aus PBMCs mit Apoptoseinduktion in PBMCs wird als möglicher Mechanismus der Tumorevasion beschrieben (Wischhusen et al., 2002). Die Interaktion von CD70/CD27 hemmt weiterhin die IL-10 vermittelte humorale IgE-B-Zellantwort (Kobayashi et al., 2002). Die mögliche immunsuppressive Wirkung von CD70 lässt die Vermutung zu, dass Tumorzellen über die Expression von CD70 immunmodulierend wirken. Unter diesem Gesichtspunkt erscheint die beobachtete 22-fache Überexpression von CD70 in RCC98 funktionell plausibel. 5 von 11 weiteren untersuchten RCC-Proben zeigten eine mehr als 10-fache Überexpression. CD70 wurde als einziger Ligand nicht direkt in RCC98 identifiziert. Die Kenntnis der verwendeten Peptidsequenz resultiert aus Analysen der EBV-transformierten B-Zelllinie JY. Der Ligand stellt aufgrund der deutlichen Überexpression, den Informationen aus der Literatur sowie der Kenntnis eines natürlichen Liganden einen interessanten Kandidaten dar.

Die weiteren mindestens 4-fach überexprimierten Proteine aus RCC98 waren entweder in der Expressionsanalyse als abwesend erfasst (NME3 und FKBP10) oder waren ubiquitär exprimiert, wie SCD im Fettgewebe. Weiterhin konnten keine Hinweise auf Tumor-assoziierte Funktion in der Literatur gefunden werden. Die übrigen identifizierten Proteine waren weniger als 4-fach überexprimiert und verfügen vermutlich über keine Tumor-Assoziation.

4.1.2 Bewertung identifizierter und signifikant überexprimierter Liganden aus RCC103

MAGED4 (MAGE-E1)

Das in RCC103 identifizierte Peptid stammt aus MAGED4 (MAGE-E1) (Tabelle 3.5). Die Gensequenz hierzu wurde im Jahr 2001 entschlüsselt (Kawano et al., 2001). Die Autoren beschreiben weiterhin, dass dieses Gen sich entwicklungsgeschichtlich von den übrigen MAGE-Genen unterscheidet.

Es gibt Hinweise, dass sich die übrigen MAGE-Gene aus den MAGED-Genen entwickelt haben, die somit möglicherweise besonders wichtige Funktionen u.a. in der Implantation des Embryo haben (Chomez et al., 2001).

Sasaki und Kollegen identifizierten daraufhin eine Überexpression von MAGED4 bei exklusivem Vorkommen in Gliomzellen (Sasaki et al., 2001). Gemäß ihrer Untersuchungen, ist MAGED4 im Normalgewebe ausschließlich im Gehirn und Ovar exprimiert. Proteine der MAGE-Gruppe sind eine vielversprechende Quelle von Impfliganden, da sie spezifisch nur in wenigen Geweben (v.a. Keimbahn) exprimiert werden (→ Kapitel 1.4). So konnte im Jahr 1991 MAGE-1 als erstes von T-Zellen erkanntes Tumor-assoziiertes Antigen nachgewiesen werden (van der Bruggen et al., 1991). Seither konnten Impfliganden aus MAGE-Proteinen erfolgreich zur Erzeugung einer T-Zellantwort mit Tumorregression in Melanom-Patienten eingesetzt werden (Coulie et al., 2002). Ein aus MAGE-3 identifizierter Ligand führte dabei zur ersten klinisch nachweisbaren Immunantwort auf Peptid-basierte Immuntherapie. Durch die weitgehende Tumorspezifität von MAGE-Liganden besteht geringes Risiko für Immunreaktion gegen gesundes Gewebe. Eine

Überexpression verschiedener MAGE-Gene in RCC wurde beobachtet (Yamanaka et al., 1998). Aus einer Mammakarzinomlinie wurde 2001 erstmalig ein HLA-A*02 - präsentierte Ligand aus MAGE-1 per Massenspektrometrie identifiziert (Pascolo et al., 2001). Das in RCC103 identifizierte Peptid ist der erste bekannte Ligand aus MAGED4. Aus der vielversprechenden Gruppe der MAGE-Peptide ist damit ein neuer Ligand für RCC bekannt.

Obwohl die durchgeführten Expressionsuntersuchungen auch Überexpression in anderen Geweben zeigen, kann die in der Literatur auf Ovar und ZNS beschränkte Verteilung als günstig bewertet werden. Da keine eindeutig spezifische Expressionsuntersuchung für MAGED4 möglich war, ist die durchgeführte Expressionsbetrachtung per Genchip stark eingeschränkt. Diese zeigte in 5 von 11 Fällen eine 10-fache Überexpression von MAGED4 und bestätigte die deutliche Überexpression von MAGED4 im Gehirngewebe. Insgesamt besteht für MAGED4 eine hinsichtlich der angesetzten Einschlusskriterien vielversprechende Konstellation für den Einsatz als Impfpeptid für diesen, aber auch für zukünftige RCC-Patienten. Das Peptid konnte bislang nicht auf *in vivo* Funktion untersucht werden, da die Impfung aufgrund der Tumorfreiheit des Patienten nicht indiziert war.

BCL2- associated X-Protein (Bax)

Das für Bax kodierende Gen gehört zur Bcl2-Familie und liegt auf Chromosom 19q. Das Protein bildet ein Heterodimer mit dem Apoptose-Inhibitor Bcl2 und wirkt als Apoptoseaktivator. Bax wirkt vornehmlich an der mitochondrialen Membran, vermutlich aber auch in anderen Kompartimenten. Im Apoptosevorgang integriert sich Bax in die äußere Mitochondrienmembran und oligomerisiert dort, was zu erhöhter Membranpermeabilität oder möglicherweise Kanalbildung mit Freisetzung von Apoptoseproteinen führt (Kuwana et al., 2002). Diese Oligomerisierung kann vermutlich durch das anti-apoptische Bcl2 verhindert werden (Mikhailov et al., 2001). Die Expression des Bax-Gens erfolgt durch p53 und steht direkt mit dem p53-induzierten Apoptosevorgang in Verbindung (Chipuk et al., 2004). Herunterregulierte Expression von Bax oder Mutationen in Bax werden mit schlechter Prognose in Seminomen, Blasen-CA,

CLL und Kolon-CA in Verbindung gebracht. So wird wiederholt ein hoher Bcl2/Bax-Index (apoptotischer Index) mit negativem prognostischen Wert für Tumoren in Verbindung gebracht. Bax stellt somit den funktionellen Gegenspieler zu Bcl2 dar, dem durch seine Anti-apoptotische Wirkung ein bedeutsamer Stellenwert in der Karzinogenese beigemessen wird. Bcl2-Expression steht mit einer Reihe von malignen Erkrankungen in Verbindung, wie zum Beispiel der Unterdrückung des p53 vermittelten Apoptosevorgangs in Kolon-CA sowie durch kanzerogene Funktion in der Entstehung von Blasen-CA, Melanom, Lungen-CA und RCC. Die beschriebenen Befunde unterstreichen die wichtige Bedeutung von Bax in der Apoptoseinduktion sowie dessen günstige Funktion in der Verhinderung maligner Entartung. Der Bax-Expression wird dabei vor allem Bedeutung in der Tumorinduktion, nicht der Progression beigemessen (Redondo et al., 2003). Deutliche Expression von Bax ist in Gallenblasen-CA beschrieben (Zhang et al., 2003), ohne dass dies in Zusammenhang mit der Begünstigung maligner Entartung steht. Die 3,6-fache Überexpression auf Tumorzellen von RCC103 erscheint hinsichtlich dieser Informationen überraschend und stellt höchstwahrscheinlich keine begünstigende Konstellation für Tumorwachstum dar. Apoptoseinduktion durch Bax-Überexpression wird in RCC beschrieben (Gobe et al., 2002). Die vielfach belegte Assoziation mit Apoptosevorgängen von Bax sowie die gleichzeitige Überexpression in RCC103, ist eine interessante Entdeckung. Die beobachtete Überexpression ließ sich jedoch in keiner der anderen 10 RCC-Proben bestätigen. Möglicherweise finden sich im Verlauf der Karzinomentwicklung unterschiedliche Stadien der Bax-Expression mit Phasen von Bax-Überexpression und vermehrter Apoptose. Anhand dieser Daten scheint Bax nicht primär als Impfligand geeignet.

ADAM10 (A Disintegrine and Metalloproteinase Domain 10)

Die Gruppe der ADAM-Familie sind Zelloberflächenproteine mit sowohl einer Adhäsions- als auch einer proteolytischen Domäne. ADAMs sind an einer Fülle von Prozessen beteiligt, wie dem Abbau von Zytokinen, Zytokinrezeptoren, Wachstumsfaktoren, IGFBPs, Prionproteinen, APP-Proteinen sowie

extrazellulären Matrixkomponenten (Seals and Courtneidge, 2003). So wird die Prozessierung von TNF α durch ADAM10 *in vitro* beobachtet (Lunn et al., 1997; Rosendahl et al., 1997). ADAM10 ist weiterhin am Abbau von Prionproteinen beteiligt (Vincent et al., 2001). Weitere Bedeutsamkeit erlangten ADAMs durch ihre Rolle in der Zellmigration von Zellen der Neuralleiste, Embryogenese, Axonwachstum und -führung, Abbau von Adhäsionsmolekülen, der Zelladhäsion im Befruchtungsvorgang sowie Myoblastenfusion (Seals and Courtneidge, 2003). Tumor-assoziierte Prozesse können ebenfalls mit ADAM-Funktionen in Verbindung gebracht werden. Tumoren verwenden Matrix-Metalloproteinasen für Wachstum und Metastasierung (Chang and Werb, 2001), was auch eine Teilfunktion der ADAMs darstellt. Durch Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Regulation von Adhäsion und Beweglichkeit von Zellen könnten ADAMs eine Rolle in der Karzinogenese spielen. ADAM12 wurde auf Kolon- und Brust-CA Zellen überexprimiert, ADAM10 auf Phäochromozytomen und Neuroblastomen überexprimiert gefunden (Seals and Courtneidge, 2003). ADAMs wird eine Rolle in der Regulation mitogener Faktoren PGE2 in Kolonkarzinomlinien zugeschrieben (Pai et al., 2002). ADAM9 und ADAM23 stehen im Zusammenhang mit der Induktion von Tumorzellmigration in Neuroblastomen (ADAM23) (Cal et al., 2000) und Fibrosarkomen (ADAM9) (Nath et al., 2000). Mechtersheimer und Mitarbeiter beschrieben die Rolle von ADAM10 in der Induktion von Zellmigration durch die Freisetzung von L1-Adhäsionsmolekülen (Mechtersheimer et al., 2001). Obwohl die Fülle der Funktionen von ADAMs nur ansatzweise geklärt ist, so zeigt eine Reihe der Funktionen eine mögliche Assoziation zu Prozessen der Karzinogenese. ADAM10 wurde auf Tumorzellen von RCC103 6-fach überexprimiert gefunden. In 8 von 11 untersuchten RCC-Proben ließ sich eine mindestens 4-fache Überexpression von ADAM10 nachweisen. ADAM10 zeigte dabei jedoch ein nahezu ubiquitäres Vorkommen in der Gewebeexpression. Mit Blick auf die mögliche Rolle von ADAMs im Karzinogeneseprozess erscheint der gefundene Ligand aus ADAM10 ein funktionell interessanter Kandidat mit fragwürdiger Einsatzmöglichkeit für die Peptidvakzinierung aufgrund der Gewebeexpression.

Für die weiteren überexprimierten Proteine NEB und PHF10 ließ sich keine Tumor-Assoziation oder -Funktion anhand der Literatur belegen.

4.1.3 Zur Vakzinierung verwendete Liganden aus RCC112

Erstmals konnten aus einer minimalen Gewebemasse von nur 2 g nahezu 100 Liganden identifiziert werden. Dieser Sensitivitätsgewinn wurde durch die stete Optimierung des Analysevorgangs durch die Arbeitsgruppe Stevanović möglich. Da keine eindeutig Tumor-assoziierten Liganden identifiziert werden konnten, wurden Liganden vorhergesagt. Für RCC112 stammten diese aus den im Gewebe überexprimierten Proteinen RGS5 und MET und wurden gemäß des HLA-Typs vorhergesagt. Dieses Vorgehen entspricht nicht der idealen Konstellation der Patienten-individuellen Immuntherapie, da die Liganden nicht im Gewebe nachgewiesen werden konnten. Mit der Massenspektrometrie gelingt jedoch nur der Nachweis eines Bruchteils der präsentierten Liganden (Singh-Jasuja et al., 2004), so dass einer der Liganden durchaus auf Zellen vorhanden sein kann. Die Grundlage der vorhergesagten Liganden basiert auf real vorkommenden Epitopen und lässt in Kombination mit der Genexpressionsanalyse diesen Ansatz als gerechtfertigte Alternative erscheinen.

4.1.4 Identifizierte Liganden aus RCC100

Abgesehen von ADFP, dessen Funktion im Kapitel 4.1.1 beschrieben ist, ließ sich für keines der überexprimierten Proteine aus RCC100 eine offensichtliche Tumor-Assoziation anhand der Literatur feststellen.

4.1.5 Bewertung der gewonnenen Erkenntnisse und Perspektive der Peptidvakzinierung

Aus den gezeigten Daten wird ersichtlich, dass mit Hilfe des kombinierten Ansatzes aus Antigensequenzierung per Massenspektrometrie und Expressionsvergleich von Tumor- und Normalgewebe eine Reihe neuer und vielversprechender Liganden aus RCC identifiziert werden konnte. Gemäß der zu Grunde liegenden Einschlusskriterien lässt sich dabei häufig eine Tumor-Assoziation vermuten. Es wird weiter deutlich, dass die identifizierten Quellproteine größtenteils auch funktionell an Zellproliferation und -wachstum sowie Tumor-assoziierten Prozessen beteiligt sind. Ein entscheidender Vorteil der Patienten-individuellen Peptidvakzinierung ist die Tatsache, dass die Zielantigene tatsächlich auf den Tumorzellen präsentiert wurden und auch auf Genebene überexprimiert waren. So konnte ein auf den HLA-Typ der Patienten zugeschnittener Impfcocktail generiert werden, da bislang nur wenige übergreifende TAAs wie G250, PRAME, RAGE, ADFP und MET in RCC bekannt sind (→ Kapitel 1.8.1). Durch den Multi-Epitop-Ansatz mit mehreren Liganden auf unterschiedlichen HLA-Molekülen wird einem wichtigen Mechanismus der Immunevasion von Tumoren, dem Allelverlust oder Herunterregulation von MHC-Molekülen, entgegengewirkt. Vorteile der Peptidvakzinierung liegen weiterhin in der relativ einfachen Herstellung von Peptiden, dem Vorhandensein von Nachweismöglichkeiten des Zielantigens im Tumorpatienten, z.B. per Massenspektrometrie sowie dem Bestehen von Nachweismöglichkeiten von T-Zellantwort *in vitro* durch ELISPOT, Tetramerfärbung oder Zytokinnachweis. Die Verwendung von DCs zur Antigenpräsentation oder die Zugabe von Adjuvantien erscheint weiterhin hilfreich bei der Induktion einer CTL-Antwort und der Überwindung von Immuntoleranz (→ Kapitel 1.7). Weitere Vorteile liegen im geringen Vorkommen beschriebener Nebenwirkungen. Positiv zu bewerten ist weiterhin, dass in einzelnen Studien durch Peptidvakzinierung von Melanompatienten Tumorregression in 10-30% der Patienten erzielt werden konnte (Parmiani et al., 2002).

Nachteilig kann bewertet werden, dass der Großteil der identifizierten TAAs aus normalen Proteinen stammt, bei denen Immuntoleranz einer T-Zellantwort im Wege stehen könnte. Wie aus *in vitro* - Experimenten mit T-Zellen zu beobachten ist, bedarf es einer wiederholten Stimulation mit TAAs zur Induktion einer CTL-Antwort, die *in vivo* noch geringer ausfällt (Parmiani et al., 2002). Schwierig zu bewerten ist, dass in Tumorpatienten, besonders im fortgeschrittenen Stadium, möglicherweise nicht-immunogene Tumorzellen selektioniert werden sowie im Verlauf T-Zellenergie begünstigt wird, was eine Einschränkung für die Induktion einer T-Zellantwort durch Vakzinierung in späteren Stadien darstellt. Weiterhin wird beobachtet, dass selbst erfolgreich stimulierte CD8 oder CD4-Zellen nicht in der Lage sind das entsprechende Epitop auch auf Tumorzellen zu erkennen (Parmiani et al., 2002; Van Elsas et al., 1995). Dies wird zumeist mit der reduzierten Präsentation des Epitops auf Tumorzellen sowie weiterer Escape-Mechanismen (→ Kapitel 1.6.1) begründet. Auch durch Präsentation über dendritische Zellen lassen sich vielfach zwar CTLs induzieren, aber bisher nur in wenigen Fällen klinische Tumorregression (Parmiani et al., 2002). Ein durchschlagender klinischer Erfolg steht deshalb bislang aus.

Zusammenfassend konnten im Rahmen dieser Arbeit mit den beschriebenen Methoden interessante Tumor-assoziierte Liganden zur Peptidvakzinierung identifiziert werden. Mit Hilfe der Einbeziehung weitreichender Einschlusskriterien, Patienten-individuellem Vakzinedesign, Multi-Epitop-Ansatz und DC-vermittelter Antigenpräsentation könnte möglicherweise eine Reihe gängiger Probleme der Immuntherapie umgangen werden. Die Beobachtung spontaner Tumorregression in RCC lässt diesen immuntherapeutischen Ansatz als vielversprechende Methode zur Therapie dieses bislang schwer zu beeinflussenden Karzinoms erscheinen. Zukünftige grundlegende Bedeutung kommt hierbei der Identifizierung einer möglichst großen Zahl Tumor-assoziiertes Liganden aus einem möglichst breiten MHC-Spektrum sowie der Evaluierung eines optimalen Vakzinierungsdesigns zu. Auch könnten zukünftig Vakzinierungen zur Prävention von Tumorrezidiven zum Einsatz kommen.

4.2 Bewertung quantitativer Nachweisverfahren von MHC-I aus Eluaten und Lysaten

4.2.1 Quantitativer MHC-I-Nachweis im Tumoreluat mit Edman-Abbau und Western-Blot

Wie in Tabelle 3.7 gezeigt, wurden 34 Eluatproben aus RCC und CCA mit entsprechendem Normalgewebe per Edman-Abbau und Western-Blot quantifiziert. Die quantitativen Ergebnisse lagen im Edman-Abbau durchweg niedriger als im Western-Blot. Bei Vorgabe einer bekannten MHC-I-Konzentration, wurde in nicht dargestellten Untersuchungen beobachtet, dass nur ca. 15% der ursprünglichen MHC-I-Menge per Edman-Abbau detektiert wird. Darüberhinaus könnten die höheren Werte des Western-Blot an einer höheren Sensitivität des Verfahrens liegen. Bei vergleichbarer Ausgangsmasse, ließ sich im Edman-Abbau keine höhere oder niedrigere MHC-I-Expression zwischen Tumor- und entsprechendem Normalgewebe erkennen. Deutliche quantitative Unterschiede zwischen einzelnen Proben wurden meist nur bei größeren Massenunterschieden erkennbar. So bestehen geringe quantitative MHC-I-Unterschiede zwischen Proben mit 7 - 8 g (RCC51T/N, RCC52T/N, RCC99T), verglichen zu großen Gewebemassen wie RCC98T oder CCA149T, die deutlich im MHC-I-Gehalt abgegrenzt werden konnten (Tabelle 3.7).

Trotz der teilweise geringen quantitativen Unterscheidungsmöglichkeit zwischen einzelnen Proben, lässt sich im Edman-Abbau doch ein höheres MHC-I-Vorkommen in Nierengewebe, verglichen zu Kolongewebe, bei vergleichbarer Gewebemasse feststellen. Auch zwischen Erst- und Zweiteluat ließen sich deutlichere Unterschiede erkennen, die bezüglich höherer oder niedrigerer Ergebnisse dem Western-Blot entsprachen. Eine quantitative Korrelation zwischen Tumormasse und MHC-I-Expression ist mit dem Edman-Abbau nur sehr eingeschränkt beurteilbar. Für die Untersuchung von Proben, die mit CNBr-Säulen immunpräzipitiert wurden, war die Untersuchung per Edman-Abbau nicht möglich, da die α -Kette durch die saure Elutionslösung denaturiert und nicht detektiert werden kann.

Betrachtet man die quantitative Untersuchung der Eluatproben per Western-Blot, so scheinen sich hiermit feinere MHC-I-Unterschiede erfassen zu lassen. Stellte sich beispielsweise RCC51T/N mit vergleichbarer MHC-I-Expression im Edman-Abbau dar, so lässt sich im Western-Blot eine doppelt so hohe MHC-I-Expression im Tumorgewebe gegenüber dem Normalgewebe erkennen. Damit lassen sich bereits Massenunterschiede von wenigen Gramm per Western-Blot deutlich im MHC-I-Gehalt abgrenzen. Eindeutig überwiegt, gemäß den Western-Blot-Daten, die MHC-I-Expression im RCC-Tumorgewebe gegenüber dem Normalgewebe bezogen auf die Gewebemasse. In RCC51T/N und RCC52T/N zeigt sich bei nahezu gleicher Ausgangsmasse eine mehr als doppelt so große MHC-I-Menge im Tumorgewebe, für RCC99T/N und RCC100T/N eine vergleichbare MHC-I-Menge bei größerer Gewebemasse des Normalgewebes. Vergleicht man Tumor- und Normalgewebe von CCA unter diesem Gesichtspunkt, lässt sich dieser Sachverhalt nicht feststellen. Wie bereits durch die Edman-Untersuchung angedeutet, zeigt sich im Western-Blot ein deutlich höherer MHC-I-Gehalt in RCC-Tumorproben gegenüber Kolon-CA-Proben, bezogen auf die vorliegende Gewebemasse (Tabelle 3.7). Vergleicht man die Normalgewebe von RCCs und CCAs, so lässt sich keine überwiegende MHC-I-Expression in RCC-Normalgewebe erkennen.

Das massenbezogene Überwiegen der MHC-I-Expression im RCC-Tumorgewebe gegenüber RCC-Normalgewebe und CCA-Tumorgewebe lässt sich an den hier gezeigten Beispielen belegen. Darüberhinaus ist aber jede Zuordnung von Masse und MHC-I-Expression als schwierig zu erachten, da Tumorgewebe sehr heterogen bezüglich ihres MHC-Expressionsverhalten sind. Auch die Aufarbeitung und Homogenisierung des Gewebes und die damit verbundene Freisetzung von Oberflächen-MHC in die Eluatprobe hat einen entscheidenden Einfluss auf den MHC-I-Nachweis.

Untersucht man die mit CNBr bearbeiteten Proben (Tabelle 3.7 kursiv) per Western-Blot auf MHC-I-Expressionsverhalten zwischen Tumor- und Normalgewebe oder zwischen RCC und CCA, so nur minimale quantitative Unterschiede zu erkennen. In den Proben ist weder die erwähnte deutlich vermehrte MHC-I-Expression im RCC - Tumorgewebe gegenüber dem

Normalgewebe noch ein Überwiegen gegenüber dem Kolongewebe erkennbar (Abbildung 3.18). Im Vergleich Tumorgewebe~Normalgewebe für CCA überwiegt die MHC-Menge/ g Gewebe im Tumorgewebe. Insgesamt zeigen sich für die CNBr- Proben wenig differenzielle Abweichungen ohne eindeutige Tendenzen bezüglich der MHC-I-Expression. Da die α -Kette im Zuge der Säureelution zerstört wird, konnten diese Proben nicht zusätzlich durch Edman-Abbau quantifiziert werden.

Auffällig ist weiterhin, dass die drei mit Protein-A präzipitierten RCC-Tumorproben RCC51, RCC52, RCC100 pro g Gewebe eine nahezu doppelt so hohe MHC-I-Menge zeigen wie die drei Proben mit CNBr (RCC53, RCC57, RCC49) (Abbildung 3.18). Dies könnte daran liegen, dass bei der CNBr-Methode mit nur einem Elutionsschritt nicht die gleiche Menge MHC-I extrahiert wurde wie im Protein-A-Versuch. Bei der Untersuchung der Restlysate per ELISA (Tabelle 3.10), zeigte sich jedoch eine gute Extraktionsleistung mit deutlich geringerem MHC-I-Restgehalt, so dass eine mangelnde Extraktion als Ursache unwahrscheinlich erscheint. Wahrscheinlicher aber ist die Annahme, dass bei der sehr sauren Peptidelution ein guter Teil der β 2-Mikroglobulin-Untereinheit denaturiert und somit falsch niedrige MHC-I-Werte mit geringer differenzieller Aussage detektiert werden. Der Western-Blot scheint daher zur MHC-I-Quantifizierung von CNBr-Proben nicht geeignet zu sein.

Stellt man abschließend die so gewonnenen Ergebnisse zwischen Edman-Abbau und Western-Blot gegenüber, so lässt sich zwar kein festes quantitatives Verhältnis zwischen Edman-Abbau und Western-Blot ermitteln, jedoch kann man innerhalb der Proben und bei deutlichem MHC-I-Vorkommen doch semi-quantitative Korrelationen erkennen. Hinsichtlich des besseren quantitativen Auflösungsvermögens des Western-Blots und der Tatsache, dass die zur Quantifizierung per Edman-Abbau benötigten charakteristischen Signale nicht immer detektierbar sind, erscheint der Western-Blot die zuverlässigste Methode zur MHC-I-Quantifizierung aus Tumoreluat. Da der Edman-Abbau jedoch sehr stabile Ergebnisse erzielt, ist er bei Kenntnis einer vielversprechenden Gewebemasse mit ausreichender MHC-I-Expression (z.B. > 5 nmol) ein

wichtiges Hilfsmittel in der Bewertung des MHC-I-Gehalts und dem zu erwartendem Peptidgehalt. Für die quantitative Untersuchung von CNBr-eluierten Proben erscheint keines der beiden Verfahren geeignet.

4.2.2 Etablierung eines quantitativen ELISA-Verfahrens

Mit der Etablierung eines quantitativen ELISA, sollte die Möglichkeit untersucht werden Lysatproben früh im Immunpräzipitationsprozess zu quantifizieren und beispielsweise CNBr – Elutionsproben, die nicht mit Western-Blot oder Edman-Abbau quantifiziert werden können, zu untersuchen. Wie in Kapitel 2.2.3.1 beschrieben ist, wurde hierzu das Antigen zunächst direkt an die Mikrotiterplatte adsorbiert. Aus Abbildung 3.9 ist zu schließen, dass es vermutlich Überlagerungseffekte unmöglich machten lineare Messreihen zu erzeugen. Geeignet erwies sich die Sandwich-ELISA-Technik mit zweitem Angriffspunkt am MHC-I und verbesserter Sensitivität. Mit dieser Methode wurde es möglich eine Eichgerade zu erstellen und einen linearen Messbereich zu definieren. Hierbei stellte sich der Messbereich von 5 bis 60 ng als stabil und reproduzierbar heraus (Abbildung 3.11). Wiederholt wurde ein charakteristisches Abknicken der Messkurve oberhalb von 60 ng bei ausreichendem Antikörperüberschuss beobachtet (Abbildung 3.10). Möglicherweise wird ab dieser Monomermenge die Kapazität der Platte für eine lineare Detektion der Eichmonomere überschritten. Auch ist vorstellbar, dass der 10-fache Antikörperüberschuss, der an dieser Stelle unterschritten wird, zu dieser Verlaufsänderung führt. Da jedoch die Menge des Sekundärantikörpers nicht beliebig gesteigert werden kann und höchstwahrscheinlich die Kapazität der Adsorptionsplatte spätestens bei höheren MHC-Konzentrationen überschritten wird, müssen die Lysatproben im Folgenden entsprechend verdünnt werden, um im linearen Messbereich zu liegen. Dies hatte zur Folge, dass sich teilweise hohe Verdünnungsfaktoren ergaben und die Lysatprobe nicht nahe an der Ausgangskonzentration gemessen werden konnte. Wie aus Abbildung 3.12 und 3.13 ersichtlich, wurde auch für die Lysatproben ein linearer Bereich ermittelt und nach Untersuchung mehrerer Proben zwischen 1:20- und 1:80- Verdünnung als reproduzierbar

festgelegt. Abbildung 3.14 zeigt den parallelen Kurvenverlauf der Lysatproben, die damit die Grundvoraussetzung der quantitativen Untersuchung erfüllen, in jedem Punkt vergleichbar zu sein. Um sicherzustellen, dass die Lysatproben im linearen Bereich der Eichgerade gemessen werden, wurden die Proben aus Vergleichbarkeitsgründen bei 1:80-Verdünnung gemessen. Auch für die Restlysatproben ließ sich ein linearer Messbereich festlegen und somit die Menge an MHC-I nach Immunpräzipitation bestimmen (Abbildung 3.16 und 3.17). Einschränkend muss hier jedoch bemerkt werden, dass Restlysate nicht beim gleichen Verdünnungswert gemessen werden konnten wie Lysate, da höhere Verdünnungen bereits nicht mehr vom Hintergrund abgegrenzt werden konnten. Auch lässt sich für Restlysate kein absoluter Nullpunkt des MHC-I-Gehalts definieren und somit die tatsächliche MHC-I-Residualmenge nicht absolut bestimmen. Um die Eichgerade den Mediumbedingungen des Tumorslysats anzupassen, wurden die Standardmonomere in Restlysatmedium angesetzt (Abbildung 3.15). Hierbei konnte beobachtet werden, dass sich das Signal der Standardmonomere und das Signal der Restlysatprobe zwar aufaddierten, jedoch nicht vollständig, wie dies idealerweise zu erwarten wäre. Gerade diese zu erwartenden Überlagerungs- bzw. Auslöschungseffekte werden jedoch mit der modifizierten Versuchsanordnung berücksichtigt. Es ist zu beachten, dass das Restlysate in ausreichender Verdünnung zugegeben werden muss, da ein absoluter Nullpunkt nicht definiert werden kann und somit keine Aussage über die Residualmenge an MHC im Restlysate getroffen werden kann. Die mit dem ELISA gewonnenen Messwerte erwiesen sich insgesamt als sehr stabil und reproduzierbar (Tabelle 3.9 mit Standardabweichung).

So wichen die Werte nach wiederholter Anwendung nur bis zu 15 % ab, bei in sich stimmigen quantitativen Relationen (Tabelle 3.9 in Klammern). Zusammenfassend konnte mit dem hier beschriebenen und durchgeführten ELISA-Verfahren eine Technik etabliert werden, die den theoretischen Erfordernissen einer quantitativen Untersuchungsmethode Rechnung trägt.

Schwierig ist sicherlich zu beurteilen, dass teilweise sehr große Verdünnungen erforderlich wurden, die bei der Berechnung Messungenauigkeiten deutlich verstärken können. Auch sind die Messwerte nur im angegebenen schmalen

Messbereich vergleichbar und reproduzierbar. Wie aus Kapitel 3.6.7 zu vermuten, ist die ELISA-Technik nur für Lysatproben mit erhaltener MHC-I-Tertiärstruktur, nicht aber für Eluatproben geeignet.

4.2.3 Quantitativer MHC-I-Nachweis per ELISA im Tumorlysat

Der per ELISA gemessene MHC-I-Gehalt der Proben bewegte sich zwischen 20 bis 50 nmol und 2 bis 6 nmol / g Tumorgewebe (Tabelle 3.9; Abbildung 3.18). Sie liegen damit höher als die in Edman-Abbau oder Western-Blot ermittelten Werte. Gemäß von Dr. Stevanović überlieferten Werten wäre für 1 g Tumorgewebe ca. 1×10^{14} Moleküle bzw. 1/6 nmol zu erwarten. Vermutlich ergibt sich diese Differenz aus den hohen Verdünnungswerten, die bei der Berechnung aus Lysatproben berücksichtigt werden müssen. Genaue Richtwerte liegen jedoch nicht vor.

Wie bereits beobachtet, zeigte sich zwischen den RCC-Tumorproben weitgehend ein höherer MHC-I-Gehalt bei höherer Ausgangsmasse. RCC57 zeigt pro g Gewebe den höchsten MHC-I-Gehalt der untersuchten Proben. Alle untersuchten RCC-Tumorproben zeigen pro g Gewebe und bei vergleichbarer Ausgangsmasse eine größere MHC-I-Menge als das entsprechende Normalgewebe (Abbildung 3.18). Wie schon zuvor beobachtet, zeigen die Kolon-CA-Proben, ausgenommen CCA137, gegenüber den RCC-Proben auf die Gewebemasse gesehen einen deutlich geringeren MHC-I-Gehalt. Betrachtet man Tumor- und Normalgewebe für CCA in der ELISA-Untersuchung, so lässt sich keine übereinstimmende Überexpression von MHC-I im Tumorgewebe feststellen.

4.2.4 Quantitativer MHC-I-Nachweis per ELISA im Restlysat

Da es nicht möglich war, mit der ELISA-Technik direkt die von der Säule eluierte Eluatprobe zu messen (→ Kapitel 3.6.7), ist es wichtig, mit Hilfe der vergleichenden Untersuchung von Lysat und Restlysat, Auskunft über das Extraktionsverhalten und die zu erwartende isolierte MHC-I-Menge zu

bekommen. Aus den in Abbildung 3.16 und 3.17 gezeigten Grafiken wird ersichtlich, dass ein deutlicher Signalunterschied zwischen Anfangs- und Endlysat und damit eine sehr viel geringere Menge MHC-I im Restlysat zu detektieren war.

Da bei der Säulenimmunpräzipitation lediglich die MHC-I-Peptidkomplexe extrahiert werden, muss die Signalabnahme auf die verminderte MHC-I-Menge im Restlysat zurückzuführen sein. Diese Beobachtung liefert die wesentliche Grundlage für die Funktionsfähigkeit des etablierten Messsystems und unterstützt die Annahme, dass das Messsystem tatsächlich MHC-I misst. Bereits jetzt kann eine semi-quantitative Aussage über das Maß der MHC-I-Extraktion getroffen werden. So zeigt Probe RCC49 (Abbildung 3.16) einen verhältnismäßig stärkeren Signalabfall als Probe BPH21 (Abbildung 3.17) und damit eine bessere Extraktionsleistung. Die Verdünnungskurven von Lysat und Restlysat zeigen einen parallelen linearen Bereich, so dass ein Vergleich bezüglich der MHC-I-Abnahme möglich ist. Es lässt sich jedoch erkennen, dass in Abbildung 3.16 bereits eine 1:80 - Verdünnung, die sich für Lysat als günstig herausgestellt hat, nicht mehr vom Hintergrund abgrenzbar ist. Somit können hier Ausgangs- und Restlysat nicht beim gleichen Verdünnungswert gemessen werden. In Abbildung 3.17 ist eine 1:60 - Verdünnung noch abgrenzbar.

Betrachtet man die Absorptionwerte der Restlysatproben, so konnten nur noch geringe MHC-I-Mengen nachgewiesen werden (Tabelle 3.10). Es ist allerdings nicht möglich eine absolute Aussage über die Residualmenge an MHC-I im Restlysat zu treffen, da das Signal irgendwann nicht mehr vom Hintergrund abzugrenzen ist. So lagen drei Proben außerhalb des linearen Messbereichs. Für RCC57 zeigte sich eine gegenüber den anderen untersuchten Proben erhöhte Restmenge von 6,1 nmol. Besonders auffällig ist die sehr hohe Residualmenge für CCA155. Hier kann jedoch angemerkt werden, dass bei diesem Präzipitationslauf nur eine unvollständige Kopplung von 75% des Antikörpers an die Sepharosematrix vorgelegen hat, was die insuffiziente Extraktionsleistung erklärt.

Zusammenfassend ist es also möglich per ELISA eine vergleichende quantitative Aussage über die Ursprungsmenge und die Residualmenge an

MHC-I zu machen. Absolut gesehen ist die Aussagekraft dieser Messung jedoch eingeschränkt, da Tumorlysatsprobe und Restlysatsprobe nicht bei der gleichen Verdünnung gemessen werden können und durch den unterschiedlichen Verdünnungsfaktor große Schwankungen auftreten.

Die Messung des Restlysates war nur für CNBr-Proben geeignet, da hier kein W6/32 in die Lysatsprobe zugegeben wird und MHC-I-Moleküle frei detektierbar bleiben.

Insgesamt steht mit dem ELISA-Verfahren ein schnell durchführbares und sensitives Messsystem zur Verfügung, mit dem es möglich ist, früh im Immunpräzipitationsprozess eine orientierende Aussage über den MHC-I-Gehalt zu treffen. Die Extraktionsleistung des Präzipitationsvorgangs kann über die Residualmenge an MHC-I bewerten werden. Es konnte gezeigt werden, dass das etablierte ELISA-System grundsätzlich den Anforderungen eines quantitativen Nachweisverfahrens entspricht und MHC-I-Konzentrationen differenziert werden können. Über die Richtigkeit der hier dargestellten Absolutwerte können keine verlässlichen Angaben gemacht werden, da bislang keine gesicherten Erfahrungswerte vorliegen. Aus Informationen von Dr. Stevanović muss jedoch angenommen werden, dass die gemessenen Werte durchweg über den angenommenen Werten liegen.

4.2.5 MHC-I-Quantifizierung mit Western-Blot aus Lysat

Wie aus Abbildung 3.8 erkennbar, wurde versucht auch Lysate per Western-Blot zu untersuchen. Die hierbei ermittelten Messwerte (Tabelle 3.8) lagen bedeutend niedriger als die entsprechenden per ELISA ermittelten Messwerte. Entgegen der bisherigen Befunde, zeigten die RCC-Proben, mit Ausnahme von RCC103, keinen massenbezogen höheren MHC-I-Gehalt. Eine besonders ausgeprägte MHC-I-Detektion zeigte sich für RCC103, was sich mit der hohen MHC-I-Detektion der entsprechenden Eluatprobe im Western-Blot deckt. Betrachtet man die Lysatsprobe RCC49 und die entsprechende Restlysatsprobe RCC49R, so impliziert das übereinstimmende quantitative Ergebnis, dass keine MHC-I-Extraktion aus der Probe stattgefunden hat. Diese Beobachtung wird

jedoch durch Abbildung 3.16 sowie die Eluatuntersuchung (Tabelle 3.7) widerlegt. Es erscheint somit fragwürdig, ob eine quantitative Analyse von Tumorslysaten per Western-Blot, insbesondere im unteren Messbereich, möglich bzw. ausreichend genau ist. Erneut ist diese Frage aufgrund der mangelnden absoluten Erfahrungswerte nicht sicher zu beantworten. Für geringe MHC-I-Konzentrationen in Lysatproben oder Restlysatproben erscheint es jedoch notwendig, ein sensitiveres Verfahren wie den ELISA einzusetzen, beziehungsweise eine Kombination aus Western-Blot und ELISA zu wählen.

4.2.6 Vergleich MHC-I-Quantifizierung ELISA~Western-Blot

Mit Hilfe von Abbildung 3.18 sollen die zur MHC-I-Quantifizierung verwendeten Methoden auf Übereinstimmungen bezüglich der MHC-I-Expression von Gewebeproben verglichen werden. Hierbei lagen für den Western-Blot Eluate, für den ELISA Lysate als Untersuchungsmedium vor. Da der Western-Blot zur Quantifizierung von CNBr-Eluationen nicht geeignet erscheint (→ Kapitel 4.2.1), sollen die Protein-A Proben RCC51, RCC52, RCC100 verglichen werden. Zunächst fällt eine durchweg höhere MHC-I-Detektion bei der Untersuchung per ELISA verglichen zu den Western-Blot-Daten auf. Weiterhin kann beobachtet werden, dass die Ergebnisse in soweit übereinstimmen, dass eine höhere oder niedrigere Detektion von MHC-I sowohl per ELISA als auch per Western-Blot detektiert wurde. Dabei beziehen sich diese Beobachtung auf den Absolutbefund und nicht die quantitativen Verhältnisse. Für sowohl RCC51, RCC52 als auch RCC100 detektieren Western-Blot und ELISA übereinstimmende tendenzielle Unterschiede in der MHC-I-Expression in Tumor- und Normalgewebe bezogen auf 1 g Gewebe (Abbildung 3.18). Die Gesamtgewebemassen des Tumor- und Normalgewebes waren für RCC51 und RCC52 nahezu identisch, für RCC100 unterschieden sich die Gewebemassen Tumor~Normalgewebe absolut gesehen.

Zusammenfassend lässt sich zwar aus den gezeigten Werten kein quantitatives Verhältnis zwischen den Absolutwerten der Western-Blot und ELISA-Untersuchung ermitteln, doch lassen sich übereinstimmende Tendenzen

bezüglich eines höheren oder niedrigeren MHC-I-Gehalts erkennen. Da bislang keine absolut verlässlichen Messwerte vorliegen, können beide Quantifizierungsmethoden nur als orientierend bezüglich der zu erwartenden MHC-I-Menge und damit der isolierten Peptidmenge betrachtet werden. Da jedoch Tendenzen in der MHC-I-Expression übereinstimmend erkannt werden, steht mit der ELISA-Technik neben Western-Blot und Edman-Abbau eine weitere Messtechnik zur Verfügung, die frühestmöglich orientierende Auskunft über die verhältnismäßige MHC-I-Expression ermöglicht. So erscheint die Western-Blot Untersuchung für Eluatproben, die am besten geeignete Untersuchungsmethode. Für Proben, die mit CNBr-Säulen immunpräzipitiert wurden, erscheint aber die ELISA-Technik die einzige anwendbare Methode.

Insgesamt lässt sich aus den im Kapitel 4.2 beschriebenen Werten schließen, dass in RCC-Tumorgewebe die MHC-I-Expression gegenüber dem Normalgewebe hochreguliert ist, während sich für CCA-Tumorproben widersprüchliche Erkenntnisse bezüglich der Expressionsveränderung ergeben. Weiterhin zeigen RCC-Tumorgewebe übereinstimmend einen höheren MHC-I-Gehalt pro g Gewebe als CCA-Tumorproben. Überexpression von MHC-I in RCC-Proben wurde auch in RCC1 beobachtet (Weinschenk et al., 2002). In der Literatur wird häufig eine verminderte MHC-I-Expression in Kolon-CA mit HLA-Verlust bis zu 87% beobachtet (Garcia-Lora et al., 2003). Je nach Untersuchung fallen diese Zahlen jedoch sehr unterschiedlich aus. Auch für RCCs fallen die Zahlen unterschiedlich aus, wobei vollständiger MHC-I-Verlust selten beobachtet wird (Buszello and Ackermann, 1994). Die MHC-I-Expression nimmt in Metastasen gegenüber dem Primärtumor deutlich ab. Tumorgewebe könnten möglicherweise mit den genannten Methoden auch vergleichend auf ihre Immunogenität bezüglich des MHC-I-Gehalts untersucht werden. Zur Beurteilung des Expressionsverhaltens von Tumoren bedarf es, aufgrund der Heterogenität der Tumorgewebe, einer ausreichend großen Anzahl von Proben. Die vorwiegende Anwendungsmöglichkeit der beschriebenen Methoden liegt jedoch auch zukünftig in der Bestimmung des zu erwartenden Peptidgehalts der Proben.

Zur endgültigen Klärung der Frage nach dem exakten quantitativen MHC-I-Gehalt von Gewebeproben, bedarf es weiterer vergleichender quantitativer Analysen sowie der Weiterentwicklung der quantitativen Methoden.

4.3 Schlussfolgerung aus der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es mit Hilfe des kombinierten Ansatzes aus massenspektrometrischer Analyse und Genexpressionsuntersuchung eine Reihe neuer, Tumor-assoziiertes Peptide aus dem RCC zu identifizieren, die in einer angeschlossenen Patienten-individuellen Impfstudie zum Einsatz kamen. Der Großteil der verwendeten Liganden wurde erstmals in den beschriebenen Tumorgeweben nachgewiesen und entstammt zumeist Proteinen, die funktionell mit Zellwachstum und –proliferation in Verbindung stehen. Damit konnte ein Beitrag zur Identifizierung einer breiteren Vielfalt Tumor-assoziiertes Liganden aus dem RCC geleistet werden.

Obwohl der Nachweis einer T-Zellantwort gegen diese Liganden *in vivo* aussteht, sind diese Erkenntnisse bedeutsam mit Blick auf die Entwicklung von Multi-Epitop-Vakzinen mit weitreichendem Antigenpektrum. Damit könnte es gelingen Mechanismen der Tumorevasion zu umgehen. Die hier verwendete Methode mit mehrgleisiger Analyseverfahren, umfassender Einschlusskriterien und Patienten-individueller Vakzinierung erscheint dabei vielversprechend.

Insgesamt konnten aus den analysierten Tumorgeweben ca. 350 Peptidliganden unterschiedlicher HLA-Restriktion analysiert werden, was einen bedeutenden Zugewinn an bekannten, natürlich vorkommenden Liganden darstellt. Erwartungsgemäß entstammt der Großteil der Liganden normalen Selbstpeptiden ohne Hinweis auf Tumor-Assoziation. Durch den wiederholten Nachweis von mehr als 100 Peptiden pro Tumorgewebe wurde eine neue Dimension der Nachweisgrenze erreicht. Es darf erwartet werden, dass auf diese Weise die Zahl bekannter Liganden sowie Liganden mit Tumor-Assoziation aus dem RCC rasch anwachsen wird.

Mit der Etablierung eines quantitativen ELISA-Verfahrens im Rahmen dieser Arbeit, konnte eine im Ablauf früh einsetzbare Methode zur MHC-I-

Quantifizierung aus Tumorlysaten eingeführt werden. Die ELISA-Technik erscheint gemäß Untersuchungen von 18 Lysatproben besonders bei der Bewertung von CNBr-Präzipitationen hilfreich, deren Eluate nicht mit Western-Blot oder Edman-Abbau bewertet werden können. Es wurde gezeigt, dass ELISA und Western-Blot hinsichtlich quantitativer Tendenzen übereinstimmen. Absolut gesehen waren keine verlässlichen quantitativen Aussagen möglich. Western-Blot und Edman-Abbau erscheinen die geeignetsten Methoden zur Untersuchung von Eluaten von Protein-A-Säulen zu sein. Mit Hilfe der beschriebenen Methoden können grobe Anhaltspunkte über die MHC-I-Expression unterschiedlicher Gewebe getroffen werden, wie der höhere MHC-I-Gehalt in RCC-Proben gegenüber Kolon-CA-Proben nahelegt. Im Vordergrund steht jedoch die Bewertung von Proben hinsichtlich des zu erwartenden Peptidgehalts. Da bislang keine verlässlichen Messwerte vorliegen, bedarf es zur endgültigen Bestimmung quantitativer MHC-I-Verhältnisse weitergehender Untersuchungen und Weiterentwicklung der Methoden. Untersuchungen der Prozessoptimierung wie Ultraschallbehandlung der Proben und verringerte Probenvolumen müssen hinsichtlich der Bewertbarkeit an einer größeren Anzahl von Proben evaluiert werden.

5. Zusammenfassung

Im Zuge dieser Arbeit wurden 12 RCC, 9 CCA und 3 Gewebe aus BPH zum Zweck der Peptidisolierung bearbeitet.

Aus RCC98, RCC100, RCC103 und RCC112 konnten insgesamt ca. 350 HLA-A*01, -A*03, -A*11, -A*31, -B*07, -B*08, -B*18 und -B*27 zugeordnete Peptide massenspektrometrisch identifiziert werden. Mit Hilfe ergänzender Expressionsanalysen von Tumor- und Normalgewebe wurden diese Liganden bezüglich ihrer Tumor-Assoziation und Gewebeexpression bewertet. Dies führte zur Identifizierung von natürlich im RCC vorkommenden Liganden aus RGS5, IGFBP3, MMP7, USH1C und ADFP, die aufgrund vermuteter Tumor-Assoziation in der angeschlossenen Peptidvakzinierungsstudie mit 8 Impfliganden zum Einsatz kamen. Darüberhinaus gelang der Nachweis des ersten natürlich vorkommenden Liganden aus MAGED4 in RCC103 sowie eines Liganden aus ADAM10. Für die übrigen Liganden war keine Überexpression der Quellproteine nachzuweisen oder es bestanden ungünstige Konstellationen bezüglich der Gewebeexpression. In RCC98 ist mit 148 Peptiden eine neue Marke für die Anzahl der identifizierten Liganden aus einem einzelnen Tumorgewebe gesetzt worden, was zukünftig eine stete Verbesserung der Peptidausbeute erwarten lässt. Im Rahmen dieser Arbeit sind sowohl eine Reihe interessanter, Tumor-assoziiertes Liganden als auch eine Vielzahl neuer, natürlich vorkommender Liganden aus dem RCC identifiziert worden. Da im Zuge der Entwicklung von Multi-Epitop-Vakzinen die Kenntnis einer breiten Palette von Tumorantigenen notwendig ist, konnte diese Arbeit hierzu einen Beitrag leisten.

Im Verlauf der Impfstudie muss bewertet werden, ob einzelne Liganden als T-Zellepitope funktionieren.

Mit der Etablierung eines quantitativen ELISA-Verfahrens zum Nachweis von MHC-Klasse-I konnte eine Methode zur Bewertung des zu erwartenden Peptidaufkommens aus Tumorlysaten eingeführt werden. Zur MHC-I-Quantifizierung aus Eluaten von Protein-A-Säulen erscheinen Edman-Abbau und Western-Blot als geeignete Methoden.

ELISA und Western-Blot wurden anhand einer Reihe von Proben verglichen und zeigten übereinstimmende quantitative Tendenzen. Für keine der Quantifizierungsmethoden sind jedoch bislang absolute quantitative Aussagen möglich. Prozessoptimierungsstrategien durch Ultraschallbehandlung der Proben sowie geringere Probenvolumen bedürfen weiterer Untersuchungen. Da wenige übergreifende TAAs im RCC bekannt sind, könnte das Konzept der Patienten-individuellen Peptidvakzinierung, das dieser Arbeit zu Grunde liegt, einen bedeutsamen Beitrag in der Entwicklung einer Therapie für diesen bislang schwer zu beeinflussenden Tumor leisten. Die Weiterführung der Analyse von Kolon-CA und Prostata-CA mit Blick auf die Identifizierung Tumor-assoziiertes Peptide könnte möglicherweise zu einem zukünftigen Einsatz von Peptidvakzinierungen auch für diese Tumoren führen.

6. Literaturverzeichnis

- Amato,R.J. (2000). Chemotherapy for renal cell carcinoma. *Semin. Oncol.* 27, 177-186.
- Bak,M., Jr., Efferth,T., Mickisch,G., Mattern,J., and Volm,M. (1990). Detection of drug resistance and P-glycoprotein in human renal cell carcinomas. *Eur. Urol.* 17, 72-75.
- Barnstable,C.J., Bodmer,W.F., Brown,G., Galfre,G., Milstein,C., Williams,A.F., and Ziegler,A. (1978). Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis. *Cell* 14, 9-20.
- Beninga,J., Rock,K.L., and Goldberg,A.L. (1998). Interferon-gamma can stimulate post-proteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase. *J. Biol. Chem.* 273, 18734-18742.
- Berd,D., Kairys,J., Dunton,C., Mastrangelo,M.J., Sato,T., and Maguire,H.C., Jr. (1998). Autologous, hapten-modified vaccine as a treatment for human cancers. *Semin. Oncol.* 25, 646-653.
- Bevan,M.J. (1976). Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J. Exp. Med.* 143, 1283-1288.
- Bjorkman,P.J. and Parham,P. (1990). Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu. Rev. Biochem.* 59:253-88., 253-288.
- Bleumer,I., Oosterwijk,E., De Mulder,P., and Mulders,P.F. (2003). Immunotherapy for renal cell carcinoma. *Eur. Urol.* 44, 65-75.
- Böcker,W.,Denk,H.,Heitz,Ph.U. (2001). Pathologie. Urban & Fischer Verlag, 2. Auflage, München - Jena, S. 190.
- Bonnet,M.C., Tartaglia,J., Verdier,F., Kourilsky,P., Lindberg,A., Klein,M., and Moingeon,P. (2000). Recombinant viruses as a tool for therapeutic vaccination against human cancers. *Immunol. Lett.* 74, 11-25.
- Brandle,D., Brasseur,F., Weynants,P., Boon,T., and Van den Eynde,E.B. (1996). A mutated HLA-A2 molecule recognized by autologous cytotoxic T lymphocytes on a human renal cell carcinoma. *J. Exp. Med.* 183, 2501-2508.
- Brossart,P. (2002). Dendritic cells in vaccination therapies of malignant diseases. *Transfus. Apheresis. Sci.* 27, 183-186.
- Brossart,P., Heinrich,K.S., Stuhler,G., Behnke,L., Reichardt,V.L., Stevanovic,S., Muhm,A., Rammensee,H.G., Kanz,L., and Brugger,W. (1999). Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies. *Blood* 93, 4309-4317.
- Brossart,P., Stuhler,G., Flad,T., Stevanovic,S., Rammensee,H.G., Kanz,L., and Brugger,W. (1998). Her-2/neu-derived peptides are tumor-associated antigens expressed by human renal cell and colon carcinoma lines and are recognized by in vitro induced specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res.* 58, 732-736.

Buszello,H. and Ackermann,R. (1994). Immunohistochemical studies on the expression of HLA class I antigens in renal cell carcinoma: comparison of primary and metastatic tumor tissue. *Eur. Urol.* *25*, 158-163.

Bystryjn,J.C., Rigel,D., Friedman,R.J., and Kopf,A. (1987). Prognostic significance of hypopigmentation in malignant melanoma. *Arch. Dermatol.* *123*, 1053-1055.

Cal,S., Freije,J.M., Lopez,J.M., Takada,Y., and Lopez-Otin,C. (2000). ADAM 23/MDC3, a human disintegrin that promotes cell adhesion via interaction with the alphavbeta3 integrin through an RGD-independent mechanism. *Mol. Biol. Cell* *11*, 1457-1469.

Campos-Lima,P.O., Gavioli,R., Zhang,Q.J., Wallace,L.E., Dolcetti,R., Rowe,M., Rickinson,A.B., and Masucci,M.G. (1993). HLA-A11 epitope loss isolates of Epstein-Barr virus from a highly A11+ population. *Science* *260*, 98-100.

Celis,E., Tsai,V., Crimi,C., DeMars,R., Wentworth,P.A., Chesnut,R.W., Grey,H.M., Sette,A., and Serra,H.M. (1994). Induction of anti-tumor cytotoxic T lymphocytes in normal humans using primary cultures and synthetic peptide epitopes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *91*, 2105-2109.

Chan,A.D. and Morton,D.L. (1998). Active immunotherapy with allogeneic tumor cell vaccines: present status. *Semin. Oncol.* *25*, 611-622.

Chang,C. and Werb,Z. (2001). The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol.* *11*, S37-S43.

Cheung,C.W., Vesey,D.A., Nicol,D.L., and Johnson,D.W. (2004). The roles of IGF-I and IGFBP-3 in the regulation of proximal tubule, and renal cell carcinoma cell proliferation. *Kidney Int.* *65*, 1272-1279.

Chipuk,J.E., Kuwana,T., Bouchier-Hayes,L., Droin,N.M., Newmeyer,D.D., Schuler,M., and Green,D.R. (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* *303*, 1010-1014.

Chomez,P., De Backer,O., Bertrand,M., De Plaen,E., Boon,T., and Lucas,S. (2001). An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family. *Cancer Res.* *61*, 5544-5551.

Coulie,P.G., Karanikas,V., Lurquin,C., Colau,D., Connerotte,T., Hanagiri,T., Van Pel,A., Lucas,S., Godelaine,D., Lonchay,C., Marchand,M., Van Baren,N., and Boon,T. (2002). Cytolytic T-cell responses of cancer patients vaccinated with a MAGE antigen. *Immunol. Rev.* *188:33-42.*, 33-42.

Coulie,P.G., Lehmann,F., Lethe,B., Herman,J., Lurquin,C., Andrawiss,M., and Boon,T. (1995). A mutated intron sequence codes for an antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *92*, 7976-7980.

Coux,O., Tanaka,K., and Goldberg,A.L. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.* *65:801-47.*, 801-847.

Dausset,J. (1958). Iso-leuco-anticorps. *Acta Haematol.* *20*, 156-166.

DiBiase,S.J., Valicenti,R.K., Schultz,D., Xie,Y., Gomella,L.G., and Corn,B.W. (1997). Palliative irradiation for focally symptomatic metastatic renal cell carcinoma: support for dose escalation based on a biological model. *J. Urol.* *158*, 746-749.

Douin-Echinard,V., Peron,J.M., Lauwers-Cances,V., Favre,G., and Couderc,B. (2003). Involvement of CD70 and CD80 intracytoplasmic domains in the co-stimulatory signal required to provide an antitumor immune response. *Int. Immunol.* *15*, 359-372.

Drexler,I., Antunes,E., Schmitz,M., Wolfel,T., Huber,C., Erfle,V., Rieber,P., Theobald,M., and Sutter,G. (1999). Modified vaccinia virus Ankara for delivery of human tyrosinase as melanoma-associated antigen: induction of tyrosinase- and melanoma-specific human leukocyte antigen A*0201-restricted cytotoxic T cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* *59*, 4955-4963.

Falk,K., Rotzschke,O., Stevanovic,S., Jung,G., and Rammensee,H.G. (1991). Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* *351*, 290-296.

Fisher,R.I., Rosenberg,S.A., and Fyfe,G. (2000). Long-term survival update for high-dose recombinant interleukin-2 in patients with renal cell carcinoma. *Cancer J. Sci. Am.* *6 Suppl 1:S55-7.*, S55-S57.

Fisk,B., Blevins,T.L., Wharton,J.T., and Ioannides,C.G. (1995). Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines. *J. Exp. Med.* *181*, 2109-2117.

Fossa,S.D. (2000). Interferon in metastatic renal cell carcinoma. *Semin. Oncol.* *27*, 187-193.

Furstenberger,G. and Senn,H.J. (2002). Insulin-like growth factors and cancer. *Lancet Oncol.* *3*, 298-302.

Furuya,M., Nishiyama,M., Kimura,S., Suyama,T., Naya,Y., Ito,H., Nikaido,T., and Ishikura,H. (2004). Expression of regulator of G protein signalling protein 5 (RGS5) in the tumour vasculature of human renal cell carcinoma. *J. Pathol.* *203*, 551-558.

Garcia-Lora,A., Algarra,I., and Garrido,F. (2003). MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *J. Cell Physiol* *195*, 346-355.

Gaugler,B., Brouwenstijn,N., Vantomme,V., Szikora,J.P., Van der Spek,C.W., Patard,J.J., Boon,T., Schrier,P., and Van den Eynde,B.J. (1996). A new gene coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human renal carcinoma. *Immunogenetics* *44*, 323-330.

Gobe,G., Rubin,M., Williams,G., Sawczuk,I., and Buttyan,R. (2002). Apoptosis and expression of Bcl-2, Bcl-XL, and Bax in renal cell carcinomas. *Cancer Invest* *20*, 324-332.

Gorer,P.A. (1936). Detection of hereditary antigenic difference in blood of mice by means of human group A serum. *J. Genetics.* *32*, 17-31.

Greenberg,P.D. (1991). Adoptive T cell therapy of tumors: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells. *Adv. Immunol.* *49:281-355.*, 281-355.

Guerra,N., Benlhassan,K., Carayol,G., Guillard,M., Pardoux,C., Chouaib,S., and Caignard,A. (1999). Effect of tumor growth factor-beta on NK receptor expression by allostimulated CD8+ T lymphocytes. *Eur. Cytokine Netw.* 10, 357-364.

Hahne,M., Rimoldi,D., Schroter,M., Romero,P., Schreier,M., French,L.E., Schneider,P., Bornand,T., Fontana,A., Lienard,D., Cerottini,J., and Tschopp,J. (1996). Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 274, 1363-1366.

Heid,H.W., Moll,R., Schwetlick,I., Rackwitz,H.R., and Keenan,T.W. (1998). Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. *Cell Tissue Res.* 294, 309-321.

Held-Feindt,J. and Mentlein,R. (2002). CD70/CD27 ligand, a member of the TNF family, is expressed in human brain tumors. *Int. J. Cancer* 98, 352-356.

Helle,S.I., Holly,J.M., Tally,M., Hall,K., Vander,S.J., and Lonning,P.E. (1996). Influence of treatment with tamoxifen and change in tumor burden on the IGF-system in breast cancer patients. *Int. J. Cancer* 69, 335-339.

Hill,A.V., Elvin,J., Willis,A.C., Aidoo,M., Allsopp,C.E., Gotch,F.M., Gao,X.M., Takiguchi,M., Greenwood,B.M., Townsend,A.R., and . (1992). Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria. *Nature* 360, 434-439.

Hintz,R.L., Bock,S., Thorsson,A.V., Bovens,J., Powell,D.R., Jakse,G., and Petrides,P.E. (1991). Expression of the insulin like growth factor-binding protein 3 (IGFBP-3) gene is increased in human renal carcinomas. *J. Urol.* 146, 1160-1163.

Hochstrasser,M. (1996). Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu. Rev. Genet.* 30:405-39., 405-439.

Hottl,L., Zelle-Rieser,C., Gander,H., Papesh,C., Ramoner,R., Bartsch,G., Rogatsch,H., Barsoum,A.L., Coggin,J.H., Jr., and Thurnher,M. (2002). Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with tumor lysate-pulsed autologous dendritic cells. *Clin. Cancer Res.* 8, 3369-3376.

Huang,A.Y., Golumbek,P., Ahmadzadeh,M., Jaffee,E., Pardoll,D., and Levitsky,H. (1994). Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science* 264, 961-965.

Ikeda,S., Kimura,H., and Shibata,T. (2002). [Correlation between expression of MMP-7 in gastric submucosal invasive carcinoma and lymph node micrometastasis]. *Rinsho Byori* 50, 196-201.

Jaeger,E., Bernhard,H., Romero,P., Ringhoffer,M., Arand,M., Karbach,J., Ilsemann,C., Hagedorn,M., and Knuth,A. (1996). Generation of cytotoxic T-cell responses with synthetic melanoma-associated peptides in vivo: implications for tumor vaccines with melanoma-associated antigens. *Int. J. Cancer* 66, 162-169.

Jager,E., Chen,Y.T., Drijfhout,J.W., Karbach,J., Ringhoffer,M., Jager,D., Arand,M., Wada,H., Noguchi,Y., Stockert,E., Old,L.J., and Knuth,A. (1998). Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *J. Exp. Med.* *187*, 265-270.

Jager,E., Gnjatic,S., Nagata,Y., Stockert,E., Jager,D., Karbach,J., Neumann,A., Rieckenberg,J., Chen,Y.T., Ritter,G., Hoffman,E., Arand,M., Old,L.J., and Knuth,A. (2000a). Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8+ T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1+ cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 12198-12203.

Jager,E., Maeurer,M., Hohn,H., Karbach,J., Jager,D., Zidianakis,Z., Bakhshandeh-Bath,A., Orth,J., Neukirch,C., Necker,A., Reichert,T.E., and Knuth,A. (2000b). Clonal expansion of Melan A-specific cytotoxic T lymphocytes in a melanoma patient responding to continued immunization with melanoma-associated peptides. *Int. J. Cancer* *86*, 538-547.

Javidan,J., Stricker,H.J., Tamboli,P., Amin,M.B., Peabody,J.O., Deshpande,A., Menon,M., and Amin,M.B. (1999). Prognostic significance of the 1997 TNM classification of renal cell carcinoma. *J. Urol.* *162*, 1277-1281.

Kawano,Y., Sasaki,M., Nakahira,K., Yoshimine,T., Shimizu,K., Wada,H., and Ikenaka,K. (2001). Structural characterization and chromosomal localization of the MAGE-E1 gene. *Gene* *277*, 129-137.

Kobayashi,N., Nagumo,H., and Agematsu,K. (2002). IL-10 enhances B-cell IgE synthesis by promoting differentiation into plasma cells, a process that is inhibited by CD27/CD70 interaction. *Clin. Exp. Immunol.* *129*, 446-452.

Koopmann,J.O., Post,M., Neefjes,J.J., Hammerling,G.J., and Momburg,F. (1996). Translocation of long peptides by transporters associated with antigen processing (TAP). *Eur. J. Immunol.* *26*, 1720-1728.

Kuwana,T., Mackey,M.R., Perkins,G., Ellisman,M.H., Latterich,M., Schneiter,R., Green,D.R., and Newmeyer,D.D. (2002). Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* *111*, 331-342.

Leeman,M.F., Curran,S., and Murray,G.I. (2003). New insights into the roles of matrix metalloproteinases in colorectal cancer development and progression. *J. Pathol.* *201*, 528-534.

Li,F.P., Decker,H.J., Zbar,B., Stanton,V.P., Jr., Kovacs,G., Seizinger,B.R., Aburatani,H., Sandberg,A.A., Berg,S., Hosoe,S., and . (1993). Clinical and genetic studies of renal cell carcinomas in a family with a constitutional chromosome 3;8 translocation. *Genetics of familial renal carcinoma. Ann. Intern. Med.* *118*, 106-111.

Li,S., Paulsson,K.M., Chen,S., Sjogren,H.O., and Wang,P. (2000). Tapasin is required for efficient peptide binding to transporter associated with antigen processing. *J. Biol. Chem.* *275*, 1581-1586.

Linehan,W.M., Lerman,M.I., and Zbar,B. (1995). Identification of the von Hippel-Lindau (VHL) gene. Its role in renal cancer. *JAMA* *273*, 564-570.

Lottspeich,F.,Zorbas,H. (1998). Bioanalytik. 2.Auflage. Spektrum Verlag, Heidelberg-Berlin. S. 289-312

Lunn,C.A., Fan,X., Dalie,B., Miller,K., Zavodny,P.J., Narula,S.K., and Lundell,D. (1997). Purification of ADAM 10 from bovine spleen as a TNFalpha convertase. FEBS Lett. *400*, 333-335.

Mackensen,A., Herbst,B., Chen,J.L., Kohler,G., Noppen,C., Herr,W., Spagnoli,G.C., Cerundolo,V., and Lindemann,A. (2000). Phase I study in melanoma patients of a vaccine with peptide-pulsed dendritic cells generated in vitro from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *Int. J. Cancer* *86*, 385-392.

Malmberg,K.J., Levitsky,V., Norell,H., de Matos,C.T., Carlsten,M., Schedvins,K., Rabbani,H., Moretta,A., Soderstrom,K., Levitskaya,J., and Kiessling,R. (2002). IFN-gamma protects short-term ovarian carcinoma cell lines from CTL lysis via a CD94/NKG2A-dependent mechanism. *J. Clin. Invest* *110*, 1515-1523.

Mandruzzato,S., Brasseur,F., Andry,G., Boon,T., and van der Bruggen,B.P. (1997). A CASP-8 mutation recognized by cytolytic T lymphocytes on a human head and neck carcinoma. *J. Exp. Med.* *186*, 785-793.

Martel,C.L. and Lara,P.N. (2003). Renal cell carcinoma: current status and future directions. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* *45*, 177-190.

Mateo,L., Gardner,J., Chen,Q., Schmidt,C., Down,M., Elliott,S.L., Pye,S.J., Firat,H., Lemonnier,F.A., Cebon,J., and Suhrbier,A. (1999). An HLA-A2 polyepitope vaccine for melanoma immunotherapy. *J. Immunol.* *163*, 4058-4063.

Matsubara,K., Aoyama,K., Suno,M., and Awaya,T. (2002). N-methylation underlying Parkinson's disease. *Neurotoxicol. Teratol.* *24*, 593-598.

Maynard,M.A. and Ohh,M. (2004). von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and hypoxia-inducible factor in kidney cancer. *Am. J. Nephrol.* *24*, 1-13.

Mechtersheimer,S., Gutwein,P., Agmon-Levin,N., Stoeck,A., Oleszewski,M., Riedle,S., Postina,R., Fahrenholz,F., Fogel,M., Lemmon,V., and Altevogt,P. (2001). Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins. *J. Cell Biol.* *155*, 661-673.

Michael,A. and Pandha,H.S. (2003). Renal-cell carcinoma: tumour markers, T-cell epitopes, and potential for new therapies. *Lancet Oncol.* *4*, 215-223.

Michalek,M.T., Grant,E.P., and Rock,K.L. (1996). Chemical denaturation and modification of ovalbumin alters its dependence on ubiquitin conjugation for class I antigen presentation. *J. Immunol.* *157*, 617-624.

Mikhailov,V., Mikhailova,M., Pulkrabek,D.J., Dong,Z., Venkatachalam,M.A., and Saikumar,P. (2001). Bcl-2 prevents Bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane. *J. Biol. Chem.* *276*, 18361-18374.

Minev,B.R. (2002). Melanoma vaccines. *Semin. Oncol.* *29*, 479-493.

Minev,B.R., Chavez,F.L., Dudouet,B.M., and Mitchell,M.S. (2000). Synthetic insertion signal sequences enhance MHC class I presentation of a peptide from the melanoma antigen MART-1. *Eur. J. Immunol.* *30*, 2115-2124.

Miyamoto,S., Yano,K., Sugimoto,S., Ishii,G., Hasebe,T., Endoh,Y., Kodama,K., Goya,M., Chiba,T., and Ochiai,A. (2004). Matrix metalloproteinase-7 facilitates insulin-like growth factor bioavailability through its proteinase activity on insulin-like growth factor binding protein 3. *Cancer Res.* *64*, 665-671.

Mochizuki,S., Shimoda,M., Shiomi,T., Fujii,Y., and Okada,Y. (2004). ADAM28 is activated by MMP-7 (matrilysin-1) and cleaves insulin-like growth factor binding protein-3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *315*, 79-84.

Mukherji,B., Chakraborty,N.G., Yamasaki,S., Okino,T., Yamase,H., Sporn,J.R., Kurtzman,S.K., Ergin,M.T., Ozols,J., Meehan,J., and . (1995). Induction of antigen-specific cytolytic T cells in situ in human melanoma by immunization with synthetic peptide-pulsed autologous antigen presenting cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *92*, 8078-8082.

Nath,D., Slocombe,P.M., Webster,A., Stephens,P.E., Docherty,A.J., and Murphy,G. (2000). Meltrin gamma(ADAM-9) mediates cellular adhesion through alpha(6)beta(1) integrin, leading to a marked induction of fibroblast cell motility. *J. Cell Sci.* *113*, 2319-2328.

Neumann,E., Engelsberg,A., Decker,J., Storkel,S., Jaeger,E., Huber,C., and Seliger,B. (1998a). Heterogeneous expression of the tumor-associated antigens RAGE-1, PRAME, and glycoprotein 75 in human renal cell carcinoma: candidates for T-cell-based immunotherapies? *Cancer Res.* *58*, 4090-4095.

Neumann,H.P., Bender,B.U., Berger,D.P., Laubenberger,J., Schultze-Seemann,W., Wetterauer,U., Ferstl,F.J., Herbst,E.W., Schwarzkopf,G., Hes,F.J., Lips,C.J., Lamiell,J.M., Masek,O., Riegler,P., Mueller,B., Glavac,D., and Brauch,H. (1998b). Prevalence, morphology and biology of renal cell carcinoma in von Hippel-Lindau disease compared to sporadic renal cell carcinoma. *J. Urol.* *160*, 1248-1254.

Nishie,A., Masuda,K., Otsubo,M., Migita,T., Tsuneyoshi,M., Kohno,K., Shuin,T., Naito,S., Ono,M., and Kuwano,M. (2001). High expression of the Cap43 gene in infiltrating macrophages of human renal cell carcinomas. *Clin. Cancer Res.* *7*, 2145-2151.

Nussbaum,A.K., Kuttler,C., Haderl,K.P., Rammensee,H.G., and Schild,H. (2001). PProC: a prediction algorithm for proteasomal cleavages available on the WWW. *Immunogenetics* *53*, 87-94.

Oliver,R.T., Miller,R.M., Mehta,A., and Barnett,M.J. (1988). A phase 2 study of surveillance in patients with metastatic renal cell carcinoma and assessment of response of such patients to therapy on progression. *Mol. Biother.* *1*, 14-20.

Oosterwijk-Wakka,J.C., Tiemessen,D.M., Bleumer,I., de Vries,I.J., Jongmans,W., Adema,G.J., Debruyne,F.M., de Mulder,P.H., Oosterwijk,E., and Mulders,P.F. (2002). Vaccination of patients with metastatic renal cell carcinoma with autologous dendritic cells pulsed with autologous tumor antigens in combination with interleukin-2: a phase 1 study. *J. Immunother.* *25*, 500-508.

Pai,R., Soreghan,B., Szabo,I.L., Pavelka,M., Baatar,D., and Tarnawski,A.S. (2002). Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. *Nat. Med.* *8*, 289-293.

Pardoll,D.M. (2000). Therapeutic vaccination for cancer. *Clin. Immunol.* *95*, S44-S62.

Parker,K.C., Bednarek,M.A., and Coligan,J.E. (1994). Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J. Immunol.* *152*, 163-175.

Parkhurst,M.R., Salgaller,M.L., Southwood,S., Robbins,P.F., Sette,A., Rosenberg,S.A., and Kawakami,Y. (1996). Improved induction of melanoma-reactive CTL with peptides from the melanoma antigen gp100 modified at HLA-A*0201-binding residues. *J. Immunol.* *157*, 2539-2548.

Parmiani,G., Castelli,C., Dalerba,P., Mortarini,R., Rivoltini,L., Marincola,F.M., and Anichini,A. (2002). Cancer immunotherapy with peptide-based vaccines: what have we achieved? Where are we going? *J. Natl. Cancer Inst.* *94*, 805-818.

Parsons,R.B., Smith,S.W., Waring,R.H., Williams,A.C., and Ramsden,D.B. (2003). High expression of nicotinamide N-methyltransferase in patients with idiopathic Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* *342*, 13-16.

Paschen,A., Eichmuller,S., and Schadendorf,D. (2003). Identification of tumor antigens and T-cell epitopes, and its clinical application. *Cancer Immunol. Immunother.* *53*(3), 196-203

Pascolo,S., Schirle,M., Guckel,B., Dumrese,T., Stumm,S., Kayser,S., Moris,A., Wallwiener,D., Rammensee,H.G., and Stevanovic,S. (2001). A MAGE-A1 HLA-A A*0201 epitope identified by mass spectrometry. *Cancer Res.* *61*, 4072-4077.

Pawelec,G. (2004). Tumour escape: antitumour effectors too much of a good thing? *Cancer Immunol. Immunother.* *53*, 262-274.

Payne,R., Rolfs,M.R. (1958). Fetomaternal Leucocyte incompatibility. *J. Clin. Invest.* *37*, 1756-1763.

Pertmer,T.M., Eisenbraun,M.D., McCabe,D., Prayaga,S.K., Fuller,D.H., and Haynes,J.R. (1995). Gene gun-based nucleic acid immunization: elicitation of humoral and cytotoxic T lymphocyte responses following epidermal delivery of nanogram quantities of DNA. *Vaccine* *13*, 1427-1430.

Pollak,M., Costantino,J., Polychronakos,C., Blauer,S.A., Guyda,H., Redmond,C., Fisher,B., and Margolese,R. (1990). Effect of tamoxifen on serum insulinlike growth factor I levels in stage I breast cancer patients. *J. Natl. Cancer Inst.* *82*, 1693-1697.

Porgador,A. and Gilboa,E. (1995). Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with a class I-restricted peptide are potent inducers of cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* *182*, 255-260.

Rae,F.K., Stephenson,S.A., Nicol,D.L., and Clements,J.A. (2000). Novel association of a diverse range of genes with renal cell carcinoma as identified by differential display. *Int. J. Cancer* *88*, 726-732.

Rammensee,H., Bachmann,J., Emmerich,N.P., Bachor,O.A., and Stevanovic,S. (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50, 213-219.

Rammensee,H.G. (2002). Survival of the fitters. *Nature* 419, 443-445.

Redondo,M., Garcia,J., Rodrigo,I., Villar,E., Gonzalez,C., and Morell,M. (2003). Expression of bax and p53 proteins in the tumorigenesis and progression of breast carcinomas. *Tumour. Biol.* 24, 23-31.

Ressing,M.E., Sette,A., Brandt,R.M., Ruppert,J., Wentworth,P.A., Hartman,M., Oseroff,C., Grey,H.M., Melief,C.J., and Kast,W.M. (1995). Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity studies of HLA-A*0201-binding peptides. *J. Immunol.* 154, 5934-5943.

Restifo,N.P. (2000). Not so Fas: Re-evaluating the mechanisms of immune privilege and tumor escape. *Nat. Med.* 6, 493-495.

Ringhoffer,M., Muller,C.R., Schenk,A., Kirsche,H., Schmitt,M., Greiner,J., and Gschwend,J.E. (2004). Simultaneous expression of T-cell activating antigens in renal cell carcinoma: implications for specific immunotherapy. *J. Urol.* 171, 2456-2460.

Robbins,P.F., El Gamil,M., Li,Y.F., Kawakami,Y., Loftus,D., Appella,E., and Rosenberg,S.A. (1996). A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.* 183, 1185-1192.

Rock,K.L. and Goldberg,A.L. (1999). Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu. Rev. Immunol.* 17:739-79., 739-779.

Rock,K.L., Gramm,C., Rothstein,L., Clark,K., Stein,R., Dick,L., Hwang,D., and Goldberg,A.L. (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78, 761-771.

Rock,K.L., York,I.A., Saric,T., and Goldberg,A.L. (2002). Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides. *Adv. Immunol.* 80:1-70., 1-70.

Rosenberg,S.A., Zhai,Y., Yang,J.C., Schwartzenuber,D.J., Hwu,P., Marincola,F.M., Topalian,S.L., Restifo,N.P., Seipp,C.A., Einhorn,J.H., Roberts,B., and White,D.E. (1998). Immunizing patients with metastatic melanoma using recombinant adenoviruses encoding MART-1 or gp100 melanoma antigens. *J. Natl. Cancer Inst.* 90, 1894-1900.

Rosendahl,M.S., Ko,S.C., Long,D.L., Brewer,M.T., Rosenzweig,B., Hedl,E., Anderson,L., Pyle,S.M., Moreland,J., Meyers,M.A., Kohno,T., Lyons,D., and Lichenstein,H.S. (1997). Identification and characterization of a pro-tumor necrosis factor-alpha-processing enzyme from the ADAM family of zinc metalloproteases. *J. Biol. Chem.* 272, 24588-24593.

Rowley,T.F. and Al Shamkhani,A. (2004). Stimulation by soluble CD70 promotes strong primary and secondary CD8+ cytotoxic T cell responses in vivo. *J. Immunol.* 172, 6039-6046.

Ruppert,J., Sidney,J., Celis,E., Kubo,R.T., Grey,H.M., and Sette,A. (1993). Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A2.1 molecules. *Cell* 74, 929-937.

Saarikoski,S.T., Rivera,S.P., and Hankinson,O. (2002). Mitogen-inducible gene 6 (MIG-6), adipophilin and tuftelin are inducible by hypoxia. *FEBS Lett.* 530, 186-190.

Sadasivan,B., Lehner,P.J., Ortmann,B., Spies,T., and Cresswell,P. (1996). Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity.* 5, 103-114.

Sahin,U., Tureci,O., Schmitt,H., Cochlovius,B., Johannes,T., Schmits,R., Stenner,F., Luo,G., Schoberl,I., and Pfreundschuh,M. (1995). Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 11810-11813.

Salgaller,M.L., Afshar,A., Marincola,F.M., Rivoltini,L., Kawakami,Y., and Rosenberg,S.A. (1995). Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by peripheral blood lymphocytes stimulated in vitro with synthetic peptides. *Cancer Res.* 55, 4972-4979.

Sasaki,M., Nakahira,K., Kawano,Y., Katakura,H., Yoshimine,T., Shimizu,K., Kim,S.U., and Ikenaka,K. (2001). MAGE-E1, a new member of the melanoma-associated antigen gene family and its expression in human glioma. *Cancer Res.* 61, 4809-4814.

Scanlan,M.J., Gordan,J.D., Williamson,B., Stockert,E., Bander,N.H., Jongeneel,V., Gure,A.O., Jager,D., Jager,E., Knuth,A., Chen,Y.T., and Old,L.J. (1999). Antigens recognized by autologous antibody in patients with renal-cell carcinoma. *Int. J. Cancer* 83, 456-464.

Schmidt,L., Duh,F.M., Chen,F., Kishida,T., Glenn,G., Choyke,P., Scherer,S.W., Zhuang,Z., Lubensky,I., Dean,M., Allikmets,R., Chidambaram,A., Bergerheim,U.R., Feltis,J.T., Casadevall,C., Zamarron,A., Bernues,M., Richard,S., Lips,C.J., Walther,M.M., Tsui,L.C., Geil,L., Orcutt,M.L., Stackhouse,T., Zbar,B., and . (1997). Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat. Genet.* 16, 68-73.

Schmidt,S.M., Schag,K., Muller,M.R., Weinschenk,T., Appel,S., Schoor,O., Weck,M.M., Grunebach,F., Kanz,L., Stevanovic,S., Rammensee,H.G., and Brossart,P. (2004). Induction of adipophilin-specific cytotoxic T lymphocytes using a novel HLA-A2-binding peptide that mediates tumor cell lysis. *Cancer Res.* 64, 1164-1170.

Schmitz,M., Diestelkoetter,P., Weigle,B., Schmachtenberg,F., Stevanovic,S., Ockert,D., Rammensee,H.G., and Rieber,E.P. (2000). Generation of survivin-specific CD8+ T effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides. *Cancer Res.* 60, 4845-4849.

Schubert,U., Anton,L.C., Gibbs,J., Norbury,C.C., Yewdell,J.W., and Bennink,J.R. (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404, 770-774.

Seals,D.F. and Courtneidge,S.A. (2003). The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev.* 17, 7-30.

Seliger,B., Atkins,D., Bock,M., Ritz,U., Ferrone,S., Huber,C., and Storkel,S. (2003). Characterization of human lymphocyte antigen class I antigen-processing machinery defects in renal cell carcinoma lesions with special emphasis on transporter-associated with antigen-processing down-regulation. *Clin. Cancer Res.* 9, 1721-1727.

Serwold,T., Gonzalez,F., Kim,J., Jacob,R., and Shastri,N. (2002). ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* 419, 480-483.

Sherief,M.H., Low,S.H., Miura,M., Kudo,N., Novick,A.C., and Weimbs,T. (2003). Matrix metalloproteinase activity in urine of patients with renal cell carcinoma leads to degradation of extracellular matrix proteins: possible use as a screening assay. *J. Urol.* 169, 1530-1534.

Shi,Y.H. and Fang,W.G. (2004). Hypoxia-inducible factor-1 in tumour angiogenesis. *World J. Gastroenterol.* 10, 1082-1087.

Singh-Jasuja,H., Emmerich,N.P., and Rammensee,H.G. (2004). The Tübingen approach: identification, selection, and validation of tumor-associated HLA peptides for cancer therapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 53, 187-195.

Snow,R.M. and Schellhammer,P.F. (1982). Spontaneous regression of metastatic renal cell carcinoma. *Urology* 20, 177-181.

Steinbrink,K., Graulich,E., Kubsch,S., Knop,J., and Enk,A.H. (2002). CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood* 99, 2468-2476.

Steinman,R.M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* 9:271-96., 271-296.

Sumi,T., Nakatani,T., Yoshida,H., Hyun,Y., Yasui,T., Matsumoto,Y., Nakagawa,E., Sugimura,K., Kawashima,H., and Ishiko,O. (2003a). Expression of matrix metalloproteinases 7 and 2 in human renal cell carcinoma. *Oncol. Rep.* 10, 567-570.

Sumi,T., Yoshida,H., Hyun,Y., Yasui,T., Matsumoto,Y., Hattori,K., Sugimura,K., Kawashima,H., Nakatani,T., and Ishiko,O. (2003b). Expression of matrix metalloproteinases in human transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Oncol. Rep.* 10, 345-349.

Tanaka,K. and Kasahara,M. (1998). The MHC class I ligand-generating system: roles of immunoproteasomes and the interferon-gamma-inducible proteasome activator PA28. *Immunol. Rev.* 163:161-76., 161-176.

Tesselaar,K., Arens,R., van Schijndel,G.M., Baars,P.A., van der Valk,M.A., Borst,J., van Oers,M.H., and van Lier,R.A. (2003). Lethal T cell immunodeficiency induced by chronic costimulation via CD27-CD70 interactions. *Nat. Immunol.* 4, 49-54.

Toes,R.E., Nussbaum,A.K., Degermann,S., Schirle,M., Emmerich,N.P., Kraft,M., Laplace,C., Zwinderman,A., Dick,T.P., Muller,J., Schonfisch,B., Schmid,C., Fehling,H.J., Stevanovic,S., Rammensee,H.G., and Schild,H. (2001). Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J. Exp. Med.* 194, 1-12.

Toes,R.E., Offringa,R., Blom,R.J., Melief,C.J., and Kast,W.M. (1996). Peptide vaccination can lead to enhanced tumor growth through specific T-cell tolerance induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *93*, 7855-7860.

Topalian,S.L., Rivoltini,L., Mancini,M., Markus,N.R., Robbins,P.F., Kawakami,Y., and Rosenberg,S.A. (1994). Human CD4+ T cells specifically recognize a shared melanoma-associated antigen encoded by the tyrosinase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *91*, 9461-9465.

Townsend,A., Bastin,J., Gould,K., Brownlee,G., Andrew,M., Coupar,B., Boyle,D., Chan,S., and Smith,G. (1988). Defective presentation to class I-restricted cytotoxic T lymphocytes in vaccinia-infected cells is overcome by enhanced degradation of antigen. *J. Exp. Med.* *168*, 1211-1224.

Townsend,A., Ohlen,C., Bastin,J., Ljunggren,H.G., Foster,L., and Karre,K. (1989). Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. *Nature* *340*, 443-448.

Townsend,A.R., Rothbard,J., Gotch,F.M., Bahadur,G., Wraith,D., and McMichael,A.J. (1986). The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short synthetic peptides. *Cell* *44*, 959-968.

Traversari,C., van der Bruggen,B.P., Luescher,I.F., Lurquin,C., Chomez,P., Van Pel,A., De Plaen,E., Amar-Costesec,A., and Boon,T. (1992). A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E. *J. Exp. Med.* *176*, 1453-1457.

Tsang,K.Y., Zaremba,S., Nieroda,C.A., Zhu,M.Z., Hamilton,J.M., and Schlom,J. (1995). Generation of human cytotoxic T cells specific for human carcinoembryonic antigen epitopes from patients immunized with recombinant vaccinia-CEA vaccine. *J. Natl. Cancer Inst.* *87*, 982-990.

van der Bruggen,B.P., Traversari,C., Chomez,P., Lurquin,C., De Plaen,E., Van den,E.B., Knuth,A., and Boon,T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* *254*, 1643-1647.

Van Elsas,A., Nijman,H.W., Van der Minne,C.E., Mourer,J.S., Kast,W.M., Melief,C.J., and Schrier,P.I. (1995). Induction and characterization of cytotoxic T-lymphocytes recognizing a mutated p21ras peptide presented by HLA-A*0201. *Int. J. Cancer* *61*, 389-396.

van Endert,P.M. (1999). Genes regulating MHC class I processing of antigen. *Curr. Opin. Immunol.* *11*, 82-88.

van Rood,J.J., Eernisse,J.G., and van Leeuwen,A. (1958). Leucocyte antibodies in sera from pregnant women. *Nature* *181*, 1735-1736.

Vargo-Gogola,T., Crawford,H.C., Fingleton,B., and Matrisian,L.M. (2002). Identification of novel matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) cleavage sites in murine and human Fas ligand. *Arch. Biochem. Biophys.* *408*, 155-161.

Vincent,B., Paitel,E., Saftig,P., Frobert,Y., Hartmann,D., De Strooper,B., Grassi,J., Lopez-Perez,E., and Checler,F. (2001). The disintegrins ADAM10 and TACE contribute to the constitutive and phorbol ester-regulated normal cleavage of the cellular prion protein. *J. Biol. Chem.* *276*, 37743-37746.

von Leoprechting,A., van der Bruggen,B.P., Pahl,H.L., Aruffo,A., and Simon,J.C. (1999). Stimulation of CD40 on immunogenic human malignant melanomas augments their cytotoxic T lymphocyte-mediated lysis and induces apoptosis. *Cancer Res.* *59*, 1287-1294.

Vonderheide,R.H., Hahn,W.C., Schultze,J.L., and Nadler,L.M. (1999). The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity.* *10*, 673-679.

Vora,A.R., Rodgers,S., Parker,A.J., Start,R., Rees,R.C., and Murray,A.K. (1997). An immunohistochemical study of altered immunomodulatory molecule expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Br. J. Cancer* *76*, 836-844.

Wabuke-Bunoti,M.A., Taku,A., Fan,D.P., Kent,S., and Webster,R.G. (1984). Cytolytic T lymphocyte and antibody responses to synthetic peptides of influenza virus hemagglutinin. *J. Immunol.* *133*, 2194-2201.

Wang,F., Bade,E., Kuniyoshi,C., Spears,L., Jeffery,G., Marty,V., Groshen,S., and Weber,J. (1999). Phase I trial of a MART-1 peptide vaccine with incomplete Freund's adjuvant for resected high-risk melanoma. *Clin. Cancer Res.* *5*, 2756-2765.

Weinschenk,T., Gouttefangeas,C., Schirle,M., Obermayr,F., Walter,S., Schoor,O., Kurek,R., Loeser,W., Bichler,K.H., Wernet,D., Stevanovic,S., and Rammensee,H.G. (2002). Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. *Cancer Res.* *62*, 5818-5827.

Wielockx,B., Libert,C., and Wilson,C. (2004). Matrilysin (matrix metalloproteinase-7): a new promising drug target in cancer and inflammation? *Cytokine Growth Factor Rev.* *15*, 111-115.

Wischhusen,J., Jung,G., Radovanovic,I., Beier,C., Steinbach,J.P., Rimner,A., Huang,H., Schulz,J.B., Ohgaki,H., Aguzzi,A., Rammensee,H.G., and Weller,M. (2002). Identification of CD70-mediated apoptosis of immune effector cells as a novel immune escape pathway of human glioblastoma. *Cancer Res.* *62*, 2592-2599.

Witton,C.J., Reeves,J.R., Going,J.J., Cooke,T.G., and Bartlett,J.M. (2003). Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer. *J. Pathol.* *200*, 290-297.

Wolfel,T., Hauer,M., Schneider,J., Serrano,M., Wolfel,C., Klehmann-Hieb,E., De Plaen,E., Hankeln,T., Meyer zum Buschenfelde,K.H., and Beach,D. (1995). A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* *269*, 1281-1284.

Xu,J., Moatamed,F., Caldwell,J.S., Walker,J.R., Kraiem,Z., Taki,K., Brent,G.A., and Hershman,J.M. (2003). Enhanced expression of nicotinamide N-methyltransferase in human papillary thyroid carcinoma cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab* *88*, 4990-4996.

- Yamanaka,K., Miyake,H., Hara,I., Gohji,K., Arakawa,S., and Kamidono,S. (1998). Expression of MAGE genes in renal cell carcinoma. *Int. J. Mol. Med.* 2, 57-60.
- Yang,Y., Waters,J.B., Fruh,K., and Peterson,P.A. (1992). Proteasomes are regulated by interferon gamma: implications for antigen processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 4928-4932.
- Yewdell,J.W., Anton,L.C., and Bennink,J.R. (1996). Defective ribosomal products (DRiPs): a major source of antigenic peptides for MHC class I molecules? *J. Immunol.* 157, 1823-1826.
- Yewdell,J.W., Reits,E., and Neefjes,J. (2003). Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 952-961.
- Yokoi,H., Seki,M., Okazoe,S., Okumura,K., and Yoshikawa,H. (2003). The role and expression of CD27 and CD70 lymphocytes in the human tonsil. *Lymphology* 36, 74-83.
- Yu,H. and Rohan,T. (2000). Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 1472-1489.
- Zhang,M., Pan,J.W., Ren,T.R., Zhu,Y.F., Han,Y.J., and Kuhnel,W. (2003). Correlated expression of inducible nitric oxide synthase and P53, Bax in benign and malignant diseased gallbladder. *Ann. Anat.* 185, 549-554.
- Zinkernagel,R.M. and Doherty,P.C. (1974). Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248, 701-702.

7. Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee für das Privileg meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe machen zu können. Ich bedanke mich herzlich für die freundliche Betreuung meiner Doktorarbeit und für schöne gemeinsame Unternehmungen während meiner Laborzeit.

Ferner danke ich Herrn PD Dr. Stefan Stevanović für die hervorragende persönliche und fachliche Betreuung, für seine Zeit und Geduld, für seine humorvolle Art, und dass er stets ein offenes Ohr für meine Fragen und Anregungen hatte.

Ich danke Claudia Lemmel, Oliver Schoor, Toni Weinschenk, Jörn Dengjel und Norbert Hilf für ihren Rat und Unterstützung während meiner Doktorarbeit. Ich bedanke mich herzlich bei Oliver Schoor für seine Unterstützung bei der Vorbereitung der Publikation.

Christian Reichle und Patricia Hrستیć danke ich für die freundliche Einarbeitung.

Ich bedanke mich sehr für die Förderung durch das Graduiertenkolleg „Zellbiologische Mechanismen Tumor-assoziiertes Prozesse“ und danke Valerie Bahr für die Organisation der sehr bereichernden Veranstaltungen.

All den freundlichen Mitarbeitern des Instituts für Immunologie möchte ich für die angenehme Atmosphäre und die damit verbundene Freude bei der Arbeit im Labor danken.

Herrn Jörg Hennenlotter gilt mein Dank für die Bereitstellung der RCC-Tumorproben.

Ich bedanke mich herzlich bei meinen Eltern für ihre liebevolle Unterstützung, und dass sie mir ein sorgenfreies Studium ermöglicht haben. Ferner gilt mein Dank allen Freunden, die mich durchs Studium begleitet haben.

8. Lebenslauf

Björn Friedemann Krämer

Persönliche Daten:

Geburtstag: 25. August 1978

Geburtsort: Tübingen

1989 – 1998: Quenstedt-Gymnasium Mössingen / Abitur
 06/1998-12/1998: Auslandsstudium am Pasadena City College, USA
 12/1998-10/1999: Zivildienst Bethesda Krankenhaus Stuttgart
 10/1999-10/2001: Medizinstudium Universität Heidelberg
 30.08.2001: Physikum
 seit 10/2001: Medizinstudium Universität Tübingen
 05/2002: Aufnahme Studienstiftung des deutschen Volkes
 29.08.2002: Erstes Staatsexamen
 12/2002-05/2003: Auslandsstipendium Brown Medical School, Providence, RI, USA
 09/2003: Aufnahme Graduiertenkolleg „Zellbiologische Mechanismen immunassoziierter Prozesse“
 04/2004: Erstes Amerikanisches Staatsexamen Medizin (USMLE)
 24.03.2005: Zweites Staatsexamen
 04/2005 - 04/2006: PJ: Innere Medizin: Stadtspital Waid Zürich, Schweiz
 Chirurgie: Mount Sinai School of Medicine, NYC, USA
 Pädiatrie: Universitätskinderklinik, Tübingen
 03.05.2006: Drittes Staatsexamen

Aus der Arbeit entstandene Veröffentlichungen:

- *"Lessons to be learned from primary renal cell carcinomas: Novel tumor antigens and HLA ligands for immunotherapy"*

T. Krüger, O. Schoor, C. Lemmel, B. Krämer, C. Reichle, J. Dengjel, T. Weinschenk, M. Müller, J. Hennenlotter, A. Stenzl, H.-G. Rammensee, S. Stevanović. *Cancer Immunology and Immunotherapy* (2005) 54(9):826-36.

- *"MAGED4 – Expression in renal cell carcinoma and identification of an HLA-A25-restricted class I ligand from solid tumor tissue"*

B.F. Krämer, O. Schoor, T. Krüger, C. Reichle, T. Weinschenk, J. Hennenlotter, A. Stenzl, S. Stevanović, H.-G. Rammensee. *Cancer Biology and Therapy* (2005) 4(9):943-8.